

ВІДГУК

офіційного опонента – доктора медичних наук, професора, завідувача кафедри патологічної анатомії Вінницького національного медичного університету імені М.І. Пирогова Вернигородського Сергія Вікторовича на дисертаційну роботу докторанта кафедри патологічної анатомії Харківського національного медичного університету Потапова Сергія Миколайовича «Герміногенні пухлини яєчка: клініко-морфологічна та імуногістохімічна характеристика, математичне визначення стадії пухлинної прогресії», подану до захисту в спеціалізовану вчену раду Д 64.600.03 при Харківському національному медичному університеті на здобуття наукового ступеня доктора медичних наук за спеціальністю 14.03.02 – патологічна анатомія (22 – Охорона здоров'я).

Актуальність обраної теми

Останні десятиріччя характеризуються стрімким зростанням пухлин яєчок у більшості розвинутих країн, при цьому герміногенні пухлини складають 90–95% усіх пухлин яєчок та виникають переважно у чоловіків працездатного віку. Етіологія і патогенез герміногенних пухлин до кінця не вивчені, проте вважається, що в основі їх виникнення лежить комбінація генетичних, епігенетичних змін і дії екзогенних факторів. Оцінка ризиків подальшого прогресування і рецидиву герміногенних пухлин яєчок (ГПЯ) є одним з провідних показників у сучасній онкології. Не дивлячись на велику кількість робіт, присвячених переважно використанню загальноприйнятих методик для вивчення структурних елементів пухлин яєчок та імуногістохімії для визначення молекулярно-біологічних властивостей ГПЯ, пошук та обґрунтування доцільності застосування нових схем імуногістохімічних (ІГХ) маркерів для верифікації пухлин, визначення критеріїв злоякісності та метастатичного потенціалу залишається наріжним питанням сьогодення. На теперішній час не з'ясовані механізми переходу від неоплазії герміногенних клітин *in situ* до появи інвазійної герміногенної пухлини, вплив специфічного мікрооточення на трансформацію ГПЯ, залишаються не вивченими до кінця

верифікація та прогнозування різних гістологічних типів ГПЯ. Саме вирішенню даної наукової проблеми і присвячена дисертаційна робота Потапова С.М., що безумовно підкреслює актуальність обраної теми.

Зв'язок теми дисертації з державними чи галузевими науковими програмами

Дисертаційна робота Потапова С.М. є частиною планової науково-дослідної роботи Харківського національного медичного університету: «Вивчення значення молекулярно-біологічних маркерів для прогнозу, лікування і виживання хворих з основними локалізаціями раку» (номер державної реєстрації 0114U003394, 2014–2016 рр.). В рамках цієї теми автор був безпосереднім виконавцем досліджень, що присвячені вивченню ГПЯ. Дисертантом визначені клініко-морфологічні особливості та ІГХ характеристика різних гістологічних типів ГПЯ, виділені критерії агресивного перебігу і несприятливого прогнозу, розроблена модель математичного визначення гістологічного типу ГПЯ та стадії пухлинної прогресії. Тема дисертації затверджена на засіданні Вченої ради Харківського національного медичного університету від 20 травня 2015 р. (протокол №5); 20 лютого 2020 р. (протокол №2) тему було змінено на ту, що є дійсною «Герміногенні пухлини яєчка: клініко-морфологічна та імуногістохімічна характеристика, математичне визначення стадії пухлинної прогресії».

Наукова новизна одержаних результатів

Дисертантом уперше виконано комплексне дослідження ГПЯ з аналізом епідеміологічних, клініко-морфологічних та ІГХ характеристик, визначено та уточнено фактори ризику розвитку даних пухлин, а також предиктори їхнього агресивного перебігу та несприятливого прогнозу.

Проведено комплексне вивчення проліферативно-апоптотичних процесів у ГПЯ. Показано, що дані пухлини характеризуються невисокою

проліферативною і апоптотичною активністю, яка має чітку залежність від гістологічного типу пухлини і стадії пухлинної прогресії. Уперше доведено, що збільшення показників експресії Ki-67, Вах, Vc1-2 і p53 корелює з розвитком судинної інвазії, інвазією в придаток, оболонки яєчка і сім'яний канатик, а також розвитком лімфогенних і віддалених метастазів у хворих на семіному, ембріональний рак і пухлину жовткового мішка постпубертатного типу.

Проведено вивчення широкого спектру молекулярно-біологічних властивостей ГПЯ, які відображають стан екстрацелюлярного матриксу (ЕЦМ) і міжклітинної адгезії в даних пухлинах. Показано посилення синтезу MMP-1,-3,-9 в міру зростання стадії пухлинної прогресії ГПЯ разом з редукцією E-cadherin і підвищенням експресії β -catenin. Доведено, що підвищена експресія MMP-1,-3,-9 та зміни характеру експресії E-cadherin і β -catenin корелюють з агресивним перебігом ГПЯ – розвитком судинної інвазії, інвазією в придаток, оболонки яєчка і сім'яний канатик, а також розвитком лімфогенних і віддалених метастазів.

Вивчено різні патогенетичні шляхи новоутворення пухлинних судин – ангіо- та васкулогенез, встановлено явище васкулогенної мімікрії, а також виявлено особливості васкуляризації залежно від гістологічного типу і стадії пухлинної прогресії ГПЯ. Доведено, що зростання кількісних показників васкуляризації корелює з агресивним перебігом даних пухлин.

Для поліпшення та об'єктивізації аналізу експресії ПГХ маркерів розроблена власна методика комп'ютерного аналізу кольорових цифрових зображень для оцінки відносної площі (S) та інтенсивності (L) імунопозитивного забарвлення.

Уперше розроблено математичну модель визначення гістологічного типу та стадії пухлинної прогресії для різних гістологічних типів ГПЯ на основі аналізу сукупності (панелі) кількісних даних експресії молекулярно-біологічних маркерів.

Теоретичне значення отриманих результатів

Отримані результати дисертаційного дослідження розширюють наукове поняття про морфогенез ГПЯ, роль імуногістохімічних маркерів у діагностиці ГПЯ, визначенні проліферативно-апоптотичних процесів, стану міжклітинної адгезії, ЕЦМ та ангіогенезу, що поглиблює розуміння окремих ланок канцерогенезу ГПЯ. Визначені та уточнені в дисертаційній роботі етіологічні, епідеміологічні, клінічні та морфологічні характеристики різних гістологічних типів ГПЯ розширюють інформаційну базу щодо клініко-морфологічних особливостей даних пухлин.

Практичне значення результатів дослідження

Отримані в дисертаційній роботі дані можуть бути використані в практичній роботі лікарів-патологоанатомів, онкологів, хірургів-урологів, роботі науково-дослідних підрозділів відповідного профілю, у навчальному процесі на кафедрах патологічної анатомії, онкології, хірургії в закладах медичної освіти.

Розроблена математична модель дозволяє найбільш точно визначати гістологічний тип і стадію пухлинної прогресії ГПЯ. А отримані ІГХ дані щодо проліферативно-апоптотичних процесів, стану ГЦМ, міжклітинної адгезії, а також особливостей ангіогенезу в перспективі дозволять обирати для пацієнтів персоналізовану терапію і будуть корисними не тільки для патологоанатомів під час діагностики, а ще й для онкологів під час вибору схем лікування.

Пріоритетність досліджень підтверджена отриманими патентами на корисні моделі: «Спосіб кількісної оцінки відносної площі експресії маркерів при імуногістохімічному дослідженні тканин», «Спосіб кількісної оцінки рівня світлості експресії маркерів при імуногістохімічному дослідженні тканин» і винаходом «Спосіб кількісної оцінки рівня світлості та відносної площі експресії маркерів при імуногістохімічному дослідженні тканин», які можуть використовуватися в практичній роботі патологоанатома, а також

працівниками науково-дослідних установ і патоморфологічних лабораторій, що дозволить більш об'єктивно оцінювати експресію ПГХ маркерів і поліпшить трактування отриманих результатів.

Ступінь обґрунтованості та достовірності положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації

Дисертаційне дослідження виконане на достатньому за обсягом матеріалі, отриманому від 301 пацієнта, у яких були виявлені ГПЯ. Застосований комплекс досліджень включав сучасні морфологічні методи. Переконливі результати щодо етапів морфогенезу ГПЯ отримані завдяки застосуванню клінічного (за даними історій хвороби), морфологічних (макроскопічний, органометричний, гістологічний, гістохімічний, імуногістохімічний), морфометричного, статистичного та математичного методів. Результати статистично оброблені і добре представлені. Тому отримані висновки дисертації є достовірними та повністю відповідають зазначеним завданням дослідження.

Повнота викладення матеріалів дисертації в опублікованих працях і авторефераті

Матеріали дисертаційної роботи опубліковані у 42 наукових працях, зокрема у 25 статтях, з яких 16 надруковані в наукових фахових виданнях України, що реферуються міжнародними наукометричними базами даних (*Russian Science Citation Index eLIBRARY.RU, Index Copernicus, Google Scholar, NLM Catalog — US National Library of Medicine, PIHЦ, Ulrichs Web, WorldCat*), 5 статей у закордонних наукових періодичних виданнях (*Грузія, Польща*, з яких 1 стаття індексується міжнародною наукометричною базою Scopus), 4 статті в інших виданнях, які додатково відображають наукові результати дисертації, 14 тезах доповідей Всеукраїнських та міжнародних

науково-практичних конференцій. Отримано 2 патенти на корисну модель та 1 патент на винахід.

В авторефераті лаконічно викладені матеріали дисертаційної роботи, зміст автореферату відповідає змісту дисертації і повністю відображує усі основні положення, висновки та практичні рекомендації.

Структура і зміст дисертації

Дисертація побудована за загальноприйнятою схемою, викладена на 484 сторінках комп'ютерного тексту і складається з анотацій, вступу, переліку умовних скорочень, огляду літератури, опису матеріалів і методів дослідження, 8 розділів з результатами власних досліджень, обговорення отриманих результатів, висновків, практичних рекомендацій, списку використаних літературних джерел і додатків. Матеріали дисертації ілюстровано 76 таблицями та 159 малюнками (з них 107 мікрофотографій), що займають 126 повних сторінок. Перелік використаних літературних джерел містить 555 найменувань вітчизняних і зарубіжних авторів (обсягом 58 сторінок), з яких кирилицею – 142, латиницею – 413.

Анотація дисертації подана двома мовами, зі списком публікацій здобувача, що віддзеркалюють основні результати дослідження та засвідчують апробацію отриманих матеріалів. Ключові слова відповідають основному змісту наукової праці та відображають тематику дослідження.

У «Вступі», який викладено на 9 сторінках, дисертант обґрунтовує актуальність теми дисертації, чітко формулює мету і задачі дослідження, наукову новизну і практичну значимість роботи, шляхом критичного аналізу висвітлює необхідність розробки оптимальної панелі ІГХ маркерів для визначення перебігу і прогнозу ГПЯ.

Розділ 1 «Огляд літератури» складається з п'яти підрозділів, які викладені на 36 сторінках машинописного тексту, що не перевищує 20% основного тексту. В даному розділі автор дає повну характеристику стану проблеми на сьогоднішній день та перспективи її розвитку. Послідовно

аналізує літературні дані, починаючи з питань розповсюдженості та етіології ГПЯ, висвітлює сучасний погляд на неоплазію герміногенних клітин «in situ», поступово переходить до методів їх діагностики, можливостей ІГХ дослідження та перспектив персоналізованої терапії даних пухлин.

У розділі «Матеріали та методи дослідження» всі використані автором методи дослідження є сучасними, вони уможливають цілком об'єктивну оцінку прогностичних критеріїв ГПЯ. Про високий рівень методичної підготовки автора свідчить застосований в роботі широкий спектр ІГХ маркерів.

Перший підрозділ 3.1 «Епідеміологічні та клініко-морфологічні особливості герміногенних пухлин яєчка», третього розділу результатів власних досліджень включає епідеміологічні дані щодо поширеності ГПЯ у Харківському регіоні за період з 1998 по 2017 роки. На основі дослідження архівного матеріалу та історій хвороби виявлені фактори ризику розвитку ГПЯ такі як: варикоцеле, гідроцеле, крипторхізм, високий зріст, зайва вага і П(А) група крові. Також автором встановлено, що середній вік хворих на ГПЯ склав $33,91 \pm 0,57$ років; найчастіше на ГПЯ хворіли чоловіки 20–50 років (90,04%); тривалість захворювання на момент звернення становила $4,73 \pm 0,33$ місяця; типовими скаргами і об'єктивними ознаками виявились збільшення, болісність та ущільнення яєчка.

У підрозділі 3.2 дисертант встановлює взаємозв'язки стадій T, N і S зі ступенем пухлинного ураження яєчка і віддаленими метастазами, підкреслюючи, що віддалені метастази були характерними для кожного десятого пацієнта з ГПЯ і найбільш часто спостерігались у хворих на змішані пухлини і, особливо, на ембріональний рак.

У наступному розділі 4 «Морфологічна характеристика герміногенних пухлин яєчка», який складається з 9 підрозділів, автор послідовно проводить макро- і мікроскопічну характеристику семіноми, ембріонального раку, пухлини жовткового мішка постпубертаного типу, тератоми постпубертатного типу, сперматоцитної пухлини, тератоми з малігнізацією

соматичного типу, хоріокарциноми, змішаних ГПЯ та тератоми препубертатного типу, акцентуючи значущість гістохімічних та ІХ методів у диференційній діагностиці даних пухлин та виявленні неоплазії герміногенних клітин *in situ*.

У розділі 5 «Імуногістохімічна характеристика герміногенних пухлин яєчка» на основі застосування широкого спектру ІХ маркерів автором запропонована панель, що дозволяє визначити молекулярно-біологічну характеристику пухлини конкретного хворого, визначити ступінь її агресивності, а також створює можливість теоретичного обґрунтування персоналізованої терапії з певним різновидом ГПЯ. Так у підрозділі 5.1., вивчаючи ІХ маркери проліферації та апоптозу автор рекомендує включити у панель прогностичних маркерів Ki-67 як маркера, що віддзеркалює злякисний потенціал пухлин, проте зауважує що унаслідок низької або негативної експресії маркерів Vc1-2 і p53 використання їх недоцільне. У наступних підрозділах даного розділу автор детально розкриває стан міжклітинних контактів та ЕЦМ, звертає увагу на особливості васкуляризації ГПЯ. При цьому відокремлює роль матриксних металопротеїназ-1,-3,-9, E-cadherin та β -catenin як таких, що відображають злякисний потенціал ГПЯ та підкреслює доцільність включення даних маркерів, а також CD31 і CD34 у прогностичну панель.

У шостому розділі «Математичне визначення гістологічного типу герміногенної пухлини яєчка та стадії пухлинної прогресії» автор розробив оригінальну математичну модель, що визначає гістологічний тип і стадію пухлинної прогресії ГПЯ, та сформував панель диференціально-діагностичних ІХ маркерів для прогнозування перебігу пухлинного захворювання. Запропонована дисертантом математична модель визначення гістологічного типу і стадії ГПЯ створює підґрунтя для впровадження в роботу патологоанатомічних відділень автоматизованих методів діагностики.

У розділі 7 «Теоретичне обґрунтування окремих аспектів персоналізованої терапії ГПЯ» дисертант, базуючись на результатах власного

дослідження та даних інших авторів, звертає увагу на те, що теоретичним підґрунтям таргетної терапії ГПЯ може бути використання антиангіогенних препаратів різних класів, які блокують спотворений пухлинний ангиогенез, препаратів, що блокують проліферативну активність пухлинних клітин та тих, що стимулюють апоптоз і видалення мутованих клітин. Серед перспективних мішеней можуть бути і терапевтичні антитіла, які стимулюють відторгнення пухлини шляхом активації імунної системи, та блокатори активності пухлинних MMP.

В останньому восьмому розділі «Обговорення отриманих результатів» автор наводить основні положення роботи, які засвідчують реалізацію поставленої мети і задач дисертаційної роботи.

Робота закінчується 10 висновками та практичними рекомендаціями, які повністю віддзеркалюють матеріали дисертації і ґрунтуються на отриманих автором фактах.

Недоліки дисертації та автореферату щодо їхнього змісту і оформлення

Оцінюючи дисертаційну роботу та автореферат Потапова С.М. в цілому позитивно, слід відмітити ряд недоліків:

- в огляді літератури на сторінках 50-55, 60-70 досить багато уваги приділяється пухлинам різноманітної локалізації, все ж таки бажано більше сфокусуватися саме на пухлинах чоловічої репродуктивної системи;
- у підрозділі 2.2.4. «Морфометричний метод дослідження» передмову, викладену на сторінці 83 щодо імуногістохімічного методу, бажано перенести у підрозділ 1.4 розділу 1 «Огляд літератури»;
- у розділі «Матеріали та методи дослідження» автор виокремив 4 основні групи, але в жодних з них не вказана неінвазивна неоплазія герміногенних клітин (GCNIS), хоча вона присутня у наступних таблицях та розділах, також у перерахованих групах відсутня тератома препубертатного типу, хоча їй присвячений окремий підрозділ 4.9;

- у тексті дисертації зустрічаються поодинокі стилістичні помилки, так на сторінці 50 доцільно було б замінити словосполучення «по метастазу» на «за метастазом», на сторінках 38, 41, 42, – «в період» на «у період», а також на початку речень замість «В» частіше використовувати «У», замінити «тучні клітини» на «мастоцити» та «вагінальну оболонку» на «піхвову оболонку»;
- при повторному посиланні на таблиці бажано зазначити «див. таблицю»;
- окремі мікрофотографії (рис. 4.3. А, 4.7, 4.18, 5.11) потребують підсилення контрастності для кращого візуального сприйняття; у підпису до рис. 4.20 А замість «по ван Гізон» краще замінити на «за ван Гізоном», у підпису до рис. 5.50. Б необхідно додати збільшення мікроскопа;
- у восьмому висновку бажано прибрати перше речення: «Встановлено, що кровопостачання та живлення ГПЯ забезпечують як судини, так і васкулогенні канали, а формування інтратуморальних судин у ГПЯ відбувається шляхом ангіо- і васкулогенезу», оскільки це є загальновідомим фактом, а почати з «У семіномі...» і так далі.

В якості дискусії хотілось би почути від дисертанта відповідь на наступні питання:

У своїй роботі на сторінці 127 Ви підкреслюєте, що всі випадки з категорією S_1 припадали на семіному з клітинами синцитіотрофобласта. На Вашу думку який з сироваткових пухлинних маркерів найбільш ефективний в диференціальній діагностиці семіном та несеміномних ГПЯ?

Який з імуногістохімічних маркерів, що були застосовані Вами в роботі є найбільш інформативним прогностичним маркером в діагностиці семіном?

На Вашу думку для визначення злоякісного потенціалу ГПЯ достатньо включення E-cadherin та β -catenin у панель прогностичних маркерів чи все ж таки необхідно комбінувати їх з матриксними металопротеїназами?

Питання стосуються складних дискусійних проблем, не впливають на загальний високий науковий рівень дисертації й не піддають сумніву результати, отримані автором.

Рекомендації щодо використання результатів дисертації в практиці

Виходячи з характеру роботи, доцільне використання її матеріалів у підготовці студентів-медиків як на теоретичних, так і на клінічних кафедрах, а також на курсах підвищення кваліфікації лікарів. Оригінальний, розроблений особисто автором спосіб кількісної оцінки рівня інтенсивності та відносної площі експресії маркерів при імуногістохімічному дослідженні тканин може бути широко застосований у роботі патологоанатомічних лабораторій.

Результати проведених досліджень впроваджені в практичну діяльність Комунального закладу «Дніпропетровське обласне патологоанатомічне бюро», Одеського обласного патологоанатомічного бюро, патологоанатомічного відділення Комунального некомерційного підприємства Харківської обласної ради «Обласна клінічна лікарня», Комунальної установи «Запорізьке обласне патологоанатомічне бюро» Запорізької обласної ради, а також у навчальний процес кафедри загальної та клінічної патології Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна, кафедри патологічної анатомії Харківського національного медичного університету, кафедри патологічної анатомії і судової медицини Державного закладу «Дніпропетровська медична академія Міністерства охорони здоров'я України», кафедри патологічної анатомії медичного інституту Сумського державного університету, кафедри нормальної та патологічної анатомії Одеського національного медичного університету, кафедри патологічної анатомії і судової медицини Запорізького державного медичного університету.

Висновок про відповідність дисертації встановленим вимогам

Таким чином, вважаю, що дисертаційне дослідження С.М. Потапова є самостійною, завершеною науково-дослідницькою роботою, яка містить нові науково обґрунтовані результати, що мають істотне теоретичне та практичне значення для медицини, в сукупності вирішують важливу наукову проблему щодо удосконалення патоморфологічної діагностики ГПЯ та оптимізації, узагальнення та обґрунтування критеріїв перебігу і прогнозу даних пухлин шляхом встановлення зв'язків між ступенем пухлинної прогресії та показниками експресії ПГХ маркерів. Вказані зауваження не є принциповими відносно суті роботи і стосуються трактування результатів або характеру їх викладення та не зменшують наукової цінності дисертації.

В цілому дисертаційна робота С.М. Потапова «Герміногенні пухлини яєчка: клініко-морфологічна та імуногістохімічна характеристика, математичне визначення стадії пухлинної прогресії» є актуальною, методологія виконання відповідає сучасним стандартам морфологічних досліджень, результати мають практичну значимість – все це дозволяє вважати, що дисертація відповідає встановленим вимогам пункту 10 «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 24 липня 2013 р., № 567 (зі змінами, внесеними згідно з Постановами Кабінету Міністрів № 656 від 19.08.2015 р. та № 1159 від 30.12.2015 р.) щодо докторських дисертацій, а її автор заслуговує на присудження наукового ступеня доктора медичних наук за спеціальністю 14.03.02 – патологічна анатомія.

Офіційний опонент,
завідувач кафедри патологічної анатомії
Вінницького національного медичного
університету ім. М.І. Пирогова,
д.мед.н., професор

