

## РЕЦЕНЗИЯ

от

доц. д-р Веселин Т. Беловеждов, дм  
Катедра по обща и клинична патология,  
Медицински университет - Пловдив

в качеството му на член на научно жури въз основа  
на заповед Ректора на МУ - Варна № Р-109-469

*относно дисертационен труд на тема*

„ЕКСПРЕСИЯ НА ТЕТРАСПАНИНОВИ МАРКЕРИ ПРИ ДОБРОКАЧЕСТВЕНА  
ХИПЕРПЛАЗИЯ И КАРЦИНОМ НА ПРОСТАТНАТА ЖЛЕЗА”,

*за присъждане на ОНС „доктор”*

с автор д-р Любен Людмилов Стоев,  
научен ръководител проф. д-р Мария Ангелова Цанева, д.м.

*Катедра по обща и клинична патология, съдебна медицина и деонтология  
Факултет по медицина, МУ – Варна*

За конкурса са депозираны материали на хартиен и електронен носител - дисертационен труд, автореферат, биографични и професионални данни, административни документи, копия от публикации от д-р Любен Людмилов Стоев.

Д-р Любен Людмилов Стоев е роден през 1991 г., завършва средно образование в Първа езикова гимназия, гр. Варна през 2010 г., а през 2016 г. - магистърска степен, специалност медицина в Медицински университет - Варна. От 2017 г. работи като асистент в Катедрата по „Обща и клинична патология, Съдебна медицина и Деонтология” към МУ – Варна и като специализант в УМБАЛ „Св. Марина”. От 2018 г. работи и като експлантатор по тъканно дароство към OSTEO-CENTRE EAD Bulgaria. След успешно положен държавен изпит за придобиване на специалност по „Обща и клинична патология“ през месец май 2021 г., д-р Стоев е назначен като лекар-асистент в УМБАЛ „Св. Марина“.

Д-р Стоев има 4 г. стаж като преподавател на студенти по „Медицина“ и „Дентална медицина“ – на български и на англоезични студенти.

Той е член на Българското и Европейско дружеството по патология, на Международното дружество по урологична патология (ISUP) и на БЛС.

Дисертационният труд на д-р Любен Людмилов Стоев е посветен на актуален проблем в областта на човешката патология - карцинома на простатата. Карциномът на простатната жлеза е вторият по честота злокачествен тумор при мъжете и е сред най-честите причини за летален изход, възникнал във връзка с неопластичната прогресия. При някои пациенти това заболяване се открива в ранен стадий и има благоприятен клиничен ход, но при много от случаите към момента на поставянето на диагнозата, туморът е локално авансирал и дори е дал метастази в регионални и далечни лимфни възли, кости и по-рядко във вътрешни органи. Това е най-често диагностицираният карцином при мъжете в повече от половината (112 от 185) от страните по света. Смъртността е по-малко променлива величина (от 3.1 до 27.9 на 100 000), но е налице. А в България се наблюдава най-ниска преживяемост сред европейските държави, участвали в проучването – 68%. Тези данни доказват актуалността на работата на д-р Стоев, която е посветена на изследването на проблеми на простатния карцином.

Представеният дисертационен труд, както и авторефератът, са съобразени с изискванията за структура и обем, залегнали в правилника на МУ- Варна. Дисертацията е написана на 115 стандартни страници и включва следните основни глави: използвани съкращения (2 стр.), въведение (2 стр.), литературен обзор (34 стр.), цел и задачи (1 стр.), материали и методи (6 стр.), резултати (37 стр.), обсъждане (12 стр.), приноси (1 стр.), изводи (1 стр.), публикации (1 стр.) и литература - 18 стр. включваща 194 заглавия, 4 от които на кирилица, а останалите на латиница, значителна част от които от последните 10 г. Тя е онагледена с 38 фигури, вкл. 14 микроскопски фотоснимки и 48 таблици.

Литературният обзор е добре структуриран и изчерпателен. В него са посочени най-важните проблеми, свързани с епидемиологията, рисковите фактори, като възрастта, тютюнопушенето, затлъстяването, връзките с расата, диетичните навици и



значението на предполагаеми генетични фактори на простатния карцином. Допуска се връзка с мутации на BRCA1, BRCA2, дефектния *HPC1* ген, понижена експресия на гена *GSTP1* и др. Установява се, че при увреждания на гените карциномът се развива в по-млада възраст (около и над 40 г), с честота около 10%. В тези случаи се касае за истински наследствен простатен карцином. В обзора подробно са представени морфологичната характеристика и хистологичните варианти, надлежно са описани принципите определящи диференциацията по Gleason - Gleason score (GS), новите концепции за градиране по групи (GG), правилата за стадиране от гледната точка на засегнатите зони в жлезата и извън нея – семенни мехурчета, лимфни възли, други органи; представени са прогностичните хистологични фактори – морфологичен вариант, лимфоваскуларна инвазия, периневрална инвазия, резекционни линии, наличие на некрози. Важно място е отделено на изследването на серумния маркер PSA, който наред с GS, вкл. GG е важен параметър и в определяните като Кеймбриджки прогностични групи за неметастатичен простатен карцином от 2018 г. Не са пропуснати и имунохистохимичните маркери, използвани при диагностиката на простатния карцином, както и правилата за лечение.

На финала в обзора е отделено място и за характеристика на тетраспанините. Тетраспанините са семейство мембранни белтъци, съдържащи 4 трансмембранни фрагмента, представляващи 12% от белтъчния състав на екзозомите. Екзозомите са мембранни везикули с размери 30-200 nm секретирани се в междуклетъчното пространство на различни клетки, включително и на туморни клетки. Те участват в много физиологични и патологични процеси като междуклетъчно сигнализиране, ремоделиране на стромата, индукция на ангиогенеза, участие в процесите на метастазиране и резистентност към химиотерапия. Тетраспанините образуват тетраспанинови микродомени, които взаимодействат с голямо количество трансмембранни и цитозолни сигнални белтъци. Д-р Стоев е избрал да изследва в своята работа експресията на два тетраспанинови маркера - CD9 и CD151. Основните функции на CD9 са, че той е фактор свързан с клетъчната подвижност, а CD151 се свързва с поддържане целостта на клетъчните мембрани на епителните клетки и има влияние върху канцерогенезата, и метастазирането. Интересът към протеините от групата на тетраспанините се повишава и те все повече се утвърждават като молекулни биомаркери с изразен прогностичен и диагностичен потенциал. Ключовата им роля на координатори на клетъчния мотилитет и междуклетъчни взаимодействия в екстрацелуларния матрикс при физиологични и патологични условия ги поставя във



фокуса на редица научни изследвания. Ето защо с цел изясняване на молекулните механизми на CD9 и CD151 и ролята им в неопластичния процес при простатния карцином е необходимо провеждане и на допълнителни проучвания. Включването им в дисертационния труд на д-р Стоев придава иновативен характер на работата.

В заключение обзорът логично насочва към целта на дисертационния труд: да се анализират клинично-морфологичните параметри на пациентите с неавансирал и авансирал простатен карцином във връзка с имунохистохимичната експресия на тетраспанините CD9 и CD151 и изясняване ролята им за туморната прогресия.

Във връзка с нея са поставени 4 основни задачи, формулирани точно и конкретно. Те са да се проучат клинично-морфологичните характеристики на пациентите с неавансирал и авансирал карцином, извършване на сравнителен анализ между отделните клинично-морфологични параметри при тези две групи пациенти, да се изследва имунохистохимичната експресия на CD9 и CD151 при простатната хиперплазия и при простатен карцином (неавансирал и авансирал).

За решаването на поставените задачи са използвани биопсични материали от простатна жлеза на общо 101 пациента, от които прицелната група е от 91 пациента с диагноза карцином на простатната жлеза, 10 пациента са без туморен процес, те са с ДПХ и образуват контролната група; 50 от пациентите с карциноми са без далечни метастази (M0) (неавансирали карциноми) и 41 са с карцином, проявил се с далечни метастази. На всички пациенти е определена интензивността на цитоплазмената експресия на CD9 и на CD151 в епитела на жлезите.

Използваните методи са рутинна биопсична техника и определяне и на следните клинично-морфологични параметри: хистологичен тип на тумора, TNM стадий, степен на диференциация по *Gleason score* и *ISUP Grade groups*, перинеурална инвазия, туморна некроза, екстрапростатна екстензия, наличие на крибриформен хистологичен строеж и ИХХ, което е достатъчно за да бъде дадени адекватни отговори на поставените задачи.

Наред с морфологичните са приложени и статистически методи: 1. за проверката на хипотези за връзка между две качествени променливи е използван тестът хи – квадрат. 2. при изследване на връзката между две величини измерени по ординалната скала е използвана рангова корелация на Спийрман. 3. корелацията между две количествени променливи е тествана с корелационен анализ на Пийърсън. 4. сравненията между две количествени променливи са правени с t тест на Стюдънт, а при сравнения между повече от две групи - с еднофакторен дисперсионен анализ ANOVA.



Всеки показател е представен с 95% интервал на доверителност. Статистическите анализи са извършени със статистическия пакет IBM SPSS ver. 21, а графиките са построени в Microsoft Excel за Windows. По този начин са потвърждава обективността на установените данни.

Получените резултати показват, че средната възраст на пациентите с простатен карцином е  $69,39 \pm 7,98$  години, като минималната възраст е 45 години, а максималната е 90 години. От тях 50 (54, 95%) са с неавансирал карцином, а 41 (45, 05%) са с авансирал.

От тези 50 случая с неавансирал карцином 46 случая са изследвани за нивото на PSA, при което се установява, че 22 (47,83%) са под 10,00 ng/mL, 11 (23,91%) с PSA между 10,00 и 20,00 ng/mL, 9 (19,57%) между 20,01 и 50,00 ng/mL и 4 (8,70%) с PSA над 50,00 ng/mL. От всички изследвани 50 неавансирани карцинома, крибриформен модел на растеж се установява в 27 (54%) случая, докато при 23 (46%) случая липсва. При 12 (24%) от неавансиралите карциноми Gleason score е 6, в 22 (44%) е 7, в 9 (18%) е 8, в 6 (12%) е 9 и само в 1 (2%) е 10. При разпределение по прогностични групи се намира, че съответно 12 (24%) са в Grade Group 1, 17 (34%) - в Grade Group 2 и по 7 (14%) съответно в Grade group 3, 4 и 5. Перинеурална инвазия се установява в 35 (70%) от всички неавансирани карциноми. При неавансиралите карциноми 29 (58%) са ограничени в простатната жлеза, 20 (40%) показват екстрапростатна екстензия в капсулата или семенните мехурчета и само 1 (2%) е ангажирал съседни на простатната жлеза структури.

За авансиралите карциноми се установява, че 2 (5,71%) случая са с PSA под 10,00 ng/mL, 2 (5,71%) с PSA между 10,00 и 20,00 ng/mL, 4 (11,43%) между 20,01 и 50,00 ng/mL и 27 (77,14%) с PSA над 50,00 ng/mL. При 30 случая (73,2%) има крибриформен модел на растеж, докато при 11 (26,8%) - липсва. В 1 (2,4%) от авансиралите карциноми Gleason score е 6, в 4 (9,8%) е 7, в 15 (36,6%) е 8, в 16 (39%) е 9 и в 5 (12,2%) е 10. Разпределение по прогностични групи е съответно 1 (2,4%) в Grade Group 1, 4 (9,8%) в Grade Group 2, нито един в Grade group 3, 15 (36,6%) в Grade group 4 и 21 (51,2%) в Grade group 5. Перинеурална инвазия има в 28 (68,3%) от авансиралите случаите, а в 13 (31,7%) липсват. В 41 случая на авансирал карцином има туморни некрози, а в 37 (90,2%) случая те липсват. В 35 (85,4%) случая туморът е ограничен в простатната



жлеза, 3 (7,3%) показват екстрапростатна екстензия в капсулата или семенните мехурчета и 3 (7,3%) са ангажирани съседни на простатната жлеза структури.

При сравнителния анализ на променливите възраст до и над 70 години и PSA не се установява статистически значима зависимост между тях, както в групата на неавансирани тумори, така и в групата на авансиралите карциноми. Сравнителният анализ между променливите възраст и Gleason score показва, че във високите възрастовите групи Gleason score е по-висок, като се изключи възрастта над 80 г.

Стойностите на PSA в групата на неавансиралите карциноми и крибриформния хистологичен растеж показват, че при високи стойности на PSA, туморите по-често имат крибриформни структури. При неавансиралите стойности на PSA в групите с различен Gleason score показва тенденция към увеличаване на PSA с увеличаване на Gleason score. Нивото на PSA при туморите с перинеурална инвазия е по-високо от това при карциномите без данни за перинеурална инвазия, докато между PSA стойността и T-стадия при пациентите без метастази не се намира връзка. При авансиралите тумори средните стойности на PSA при крибриформния модел на растеж са по-високи в сравнение със случаите, когато липсва подобен модел. Между средните стойности на PSA в групата на авансиралите тумори не се установява статистически значима зависимост между нивата на PSA и Gleason score, както и между средните стойности на PSA в групата на метастатичните тумори, нивата на PSA и наличието на перинеурална инвазия. Средните стойности на PSA в пациентите с простатен карцином показва тенденция за повишаване в групата на авансиралите тумори в сравнение с неавансиралите. Само при един случай има хистологични данни за крибриформен растеж. При неавансиралите карциноми без перинеурална инвазия, най-много са тези с Gleason score 6 – 7. Пак при тях при по-голямата част от туморите - 66,7%, които са в патологичен стадий T2 не се намира крибриформен модел на растеж. Статистически значими разлики има при неавансиралите карциноми между Gleason score със стадия като сумата 6 се среща по често при T1 и T2, а по-висок сбор при T3 и T4. Също така при по-напреднал T-стадий честотата на перинеуралната инвазия е 87 % и тя е значително по-висока при неавансиралите.

Какви са резултатите при авансиралите: между крибриформен модел на растеж и „перинеурална инвазия“ не се установи статистически значима зависимост; също и между Gleason score и перинеуралната инвазия; честотата на крибриформния модел на растеж е по-висока при авансиралите тумори.



Данните от имунохистохимичното изследване показват най-високи средни нива на цитоплазмена експресия на CD9 в групата на ДПХ. При карциномите стойностите са по-ниски и при неавансирал карцином, и при авансиралите тумори, но няма статистически значима разлика. Средните стойности на цитоплазмена експресия на CD151 при неавансирал и авансирал карцином и ДПХ показат най-високи нива, но разликата не е статистически значима, като най-ниско е средното ниво в групата на ДПХ.

Резултатите са сравнени в обсъждането с други сходни изследвания. Отбелязани са публикациите, данните на които съвпадат с резултатите и такива при които има разлики.

На финала са работата са направени следните 11 извода, които считам за уместни и които накратко може да бъдат резюмирани така: при високи стойности на PSA, честотата на крибриформните структури и периневралната инвазия също е висока, при неавансиралия простатен карцином липсва зависимост между PSA и възрастта, както и между PSA и T-стадия на простатния карцином, периневрална инвазия се среща често при крибриформен модел на растеж и е асоциирана с T-стадия, крибриформният модел на растеж не показва зависимост от T-стадия; при авансиралия простатен карцином има високи стойности на PSA, без зависимост от крибриформния модел на растеж и от периневралната инвазия, крибриформният модел на растеж се среща 3 пъти по-често при авансиралия карцином; при неавансиралите карциноми цитоплазмената експресия на CD9 се понижава след 70-годишна възраст; при ПНИ пациентите с простатен карцином без далечни метастази имат по-висока експресия на CD9 в сравнение с пациентите с метастази, при авансиралите карциноми експресията на CD9 не показва зависимост от морфологичните показатели крибриформен модел на растеж, GS и ПНИ; високата експресия на CD151 при M0 стадий на простатния карцином се среща при крибриформен модел на растеж, висок Gleason score и периневрална инвазия, при авансиралите карциноми експресията на CD151 в туморната тъкан на простатен карцином не зависи от възрастта на пациентите, крибриформния модел на растеж, Gleason score и ПНИ.

Дисертационният труд на д-р Стоев има следните, посочени от него приноси, които напълно приемам :

1. Извършен е нализ на имунохистохимичната експресия на CD9 и CD151 с оглед

изясняване ролята им за прогнозата при пациенти с простатен карцином – оригинален принос.

2. Направена е оценка на значението на различните стойности на PSA във връзка с клинично-морфологичните показатели, на прогностичната стойност на крибриформния модел и на експресията CD9 и CD151 във връзка с клинично-морфологичните показатели – приноси с практическо-приложен характер.

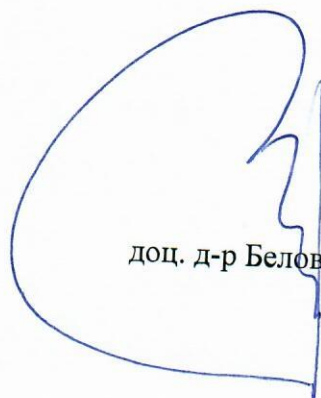
Данните от дисертацията са представени в две научни публикации и едно научно съобщение.

Дисертационният труд на д-р Стоев е написан на добър език и е онагледен адекватно. Той представя множество задълбочени и практически полезни резултати, свързани с морфологията на простатния карцином, като подробно са изследвани зависимости между GS, ПНИ, наличието на крибриформните структури, които ще допринесат за по детайлна оценка на значението им за прогнозата при този често срещан тумор. Направени са ИХХ изследвания на малко изследвани маркери, тетраспанините CD9 и CD151, което хвърля светлина върху нови неизследвани фактори, свързани с патогенезата на простатния карцином. Това е свидетелство за иновативния характер на дисертационния труд.

Въз основа на горе изложеното считам, че дисертационната работа на д-р Стоев е напълно завършена, съдържаща оригинални резултати и такива с практическа значимост. Той отговаря на изискванията на Закона за развитие на академичния състав в България и на условията и реда за придобиване на научни степени в МУ - Варна.

Затова давам позитивна оценка на работата, ще гласувам за, а и си позволявам да препоръчам на членовете на уважаемото Научното жури да подкрепят присъждането на образователната и научната степен „доктор” на д-р Любен Людмилов Стоев .

20.11.2021 г.



доц. д-р Беловеждов