

СТАНОВИЩЕ

от доц. д-р ЕКАТЕРИНА БОЯНОВА СОФТОВА-ЗЛАТАРОВА, дм,

специалност патоанатомия и цитопатология

ОТНОСНО: дисертационен труд на **д-р Любен Людмилов Стоев,**

докторант в редовна форма на обучение в докторска програма „Патологоанатомия и цитопатология“ към Катедрата по обща и клинична патология, съдебна медицина и деонтология при Медицински университет-Варна, за присъждане на образователната и научна степен **„ДОКТОР“** в област на висше образование 7.Здравеопазване и спорт, Професионално направление 7.1. Медицина, Научна специалност „Патологоанатомия и цитопатология“, шифър 03.01.03.

НА ТЕМА: „ЕКСПРЕСИЯ НА ТЕТРАСПАНИНОВИ МАРКЕРИ ПРИ ДОБРОКАЧЕСТВЕНА ХИПЕРПЛАЗИЯ И КАРЦИНОМ НА ПРОСТАТАТА“

Научен ръководител: проф. д-р Мария Ангелова Цанева, дм

С решение от заседание на ФС при Факултет „Медицина“ към МУ-Варна по протокол № 53/28.10.2021 г. и със заповед № Р-109-469/05.11.2021г. на Ректора на МУ-Варна, съм избрана за външен член на Научното жури, а на основание Протокол № 1/11.11.2021 г. съм определена да изготвя становище / на български и английски език/ по процедура за придобиване на образователна и научна степен **„Доктор“** с кандидат д-р Любен Людмилов Стоев в Медицински Университет-Варна.

Като докторант в редовна форма на обучение в докторска програма „Патологоанатомия и цитопатология“, професионална направление 7.1. Медицина, д-р Любен Стоев е зачислен със заповед № Р-109-52/01.02.2019 год. от Ректора на МУ-Варна. С доклад за отчисляване вх. № 102-2649/22.10.2021 г. и със Заповед на Ректора № Р-109-469/05.11.2021 год. д-р Стоев е отчислен с право на защита. Дисертантът е положил успешно изпит за необходимия докторантски минимум на 28.09.2020 год., и изпит по чужд език на 25.02.2021 год. За конкурса той е представил на хартиен и електронен носител комплект от материали, включващи всички необходими документи в съответствие с изискванията на ЗРАСРБ, Правилника за приложението му и ПРАС в МУ-Варна.

Кратки биографични данни и кариерно развитие на докторанта.

Д-р Любен Людмилов Стоев е роден на 13.05.1991 год. в гр. Добрич. Завършва средното си образование през 2010 год. в ПЕГ- Варна. През същата година е приет за студент в МУ-Варна, където през 2016 год. придобива магистърска степен по медицина/ диплома № 004282/11.11.2016 г./ За периода м.януари 2017 год. до м. май 2021 г. е назначен като лекар-специализант в МБАЛ „Св.Марина“ Варна, а през м. март 2017 г. след конкурс е избран за асистент в Катедрата по обща и клинична патология при МУ-Варна, където продължава да работи и досега. От 2018 год. е включен като експлантатор по тъканно дароство в „Tissue bank OSTEO-CENTRE EAD“ - Bulgaria. От м.май 2021 год. има призната специалност по „Патологоанатомия и цитопатология“/св. № 024896/01.07.2021г./.

Д-р Стоев има почти 5 години трудов стаж като асистент-преподавател по специалността „Обща и клинична патология“. Той участва активно в учебната дейност на катедрата, провеждайки практически занятия по обща и клинична патология със студенти по медицина – БЕО/АЕО, и по патоанатомия със студенти по дентална медицина БЕО/АЕ обучение. Като лекар-асистент в Клиниката по Обща и клинична патология при УМБАЛ „Св. Марина“-Варна д-р Стоев участва пълноценно и активно в диагностичната работа. Овладеял е всички основни методи, използвани в диагностичната биопсична дейност, както и голям набор от методи, прилагани в специализираните ИХХ-изследвания. Дисертантът има участия в няколко научни статии, 2 от които са по темата на дисертацията. С научни доклади, постери и презентации е участвал в 4 национални конгреса и научни прояви с международно участие. Професионалните му и научни интереси са насочени предимно в областта на онкопатологията и лицево-челюстната патология. Д-р Стоев владее на много добро ниво писмено и говоримо английски /С2 / и немски език /В2 /, и има изключително добра компютърна грамотност. Член е на Европейското д-во по патология и ISUP; членува в БЛС и БНД по патология.

Актуалност и значимост на темата

Темата на дисертационния труд на д-р Стоев, отнасяща се до диагностиката и свързаното с нея лечение на простатния карцином, не престава да бъде актуална и с изключително голяма социална значимост, като се има предвид факта, че този, отличаващ се с непредсказуемо биологично поведение карцином в световен мащаб остава една от основните причини за загуба на трудоспособност и за летален край при мъжете. Въпреки възможностите за ранна диагностика, постигнатите успехи в изясняване на някои прояви на този карцином и прилаганото лечение, голямата хетерогенност и комбинация на морфологични находки създават редица трудности, определящи ниската 5-годишна преживяемост. Много от проблемите, свързани с клиничните прояви и морфологичната диагностика на ПК са все още недостатъчно проучени, а литературните данни, отнасящи се до корелацията между резултатите от редица изследвания и прогностично-предиктивните клинично-морфологични параметри на тумора са ненапълно изяснени, а в някои случаи-противоречиви. Това налага търсене на други възможности за диагностика, вкл. и прилагане на нови молекули с потенциал за туморни маркери или с оглед провеждане на таргетна терапия.

Молекули с такъв клиничен потенциал са протеините от групата на тетраспанините, действащи като посредници при клетъчна миграция и взаимодействие с ЕЦМ и вземащи участие в процесите на инвазия и метастазиране. Особен интерес представляват два от представителите в групата - CD9 и CD151, разглеждани като супресори и като промотори на туморната прогресия, и за които в литературата все още има противоречия относно данните за експресията им при различни малигнени тумори. Вероятно фактът за съществуващите противоречия по отн. ролята, която тези два маркера играят в неопластичния процес при ПК е провокирал д-р Стоев да насочи научния си интерес и изследователско дирене именно към тях. Проблематиката и съдържанието на представения дисертационен труд са многоаспектни, изискващи професионална култура, компетентност и изследователски опит за разрешаването им - качества, които д-р Стоев безспорно притежава, и които са му помогнали да се справи успешно с предизвикателствата на избраната дисертационна тема.

Структура и анализ на дисертационния труд

Дисертационният труд на д-р Стоев е правилно структуриран, написан е на издържан научен стил и терминология, и е изграден при спазване на изискуемите пропорции. Включва общо 115 стр., съдържа всички изисквани раздели и е богато илюстриран с 38 фигури и 48 таблици. В книгопис от 18 стр. са представени общо 194 заглавия, от които 4 на кирилица и 190 на латиница, като припл. 64% от заглавията са публикувани през последните 10 години.

Литературният обзор впечатлява със задълбочеността при анализа на достъпната литература и показва много добрата осведоменост на д-р Стоев по разработената тема. Дисертантът, запознат с постиженията в световната наука и практика, дава правилна оценка на нерешените въпроси по отн. на проблемите, касаещи основните клинично-морфологични показатели, диагностиката, молекулярни и серумните маркери, и др., имащи връзка с ПК. Представените в достъпен и обобщен вид данни в литературния обзор показват уменията на автора не само да анализира източниците от литературата, но и да обръща внимание на съществуващите по някои пунктове спорни въпроси. Обзорът е структуриран в 7 раздела, отнасящи се до: епидемиология, етиологията и рисковите фактори за развитието на ПК; детайлно са представени морфологичната характеристика, с включени хистологичните варианти на карцинома по СЗО-класификацията от 2016 год; степен на диференциация, стадий, прогностични и предиктивни серумни и хистологични параметри/PSA, хистологичен модел на туморен растеж, периневрална инвазия, туморна некроза;/ ИХХ-характеристика на ПК, с най-често използваните маркери, играещи роля при прогресията на заболяването. В обзора авторът е представил и прилаганите видове лечение при ПК. Самостоятелна част е посветена на тетраспанините, участващи в редица физиологични и патологични процеси, отнасящи се до междуклетъчни/клетъчни сигнали, ремоделиране на стромата, индукция на ангиогенезата, и не на последно място-участие в процеса на туморно метастазиране.

В заключението, с което завършва литературният обзор, д-р Стоев акцентира върху налагащата се необходимост от провеждане на допълнителни проучвания, отнасящи се до взаимодействията между биомаркерите CD9 и CD151 с техни молекулярни партньори, развиващи се при туморна прогресия и метастазиране. Тези изследвания биха допринесли за изясняване на съществуващите при простатния карцином зависимости с някои неблагоприятни клинично-морфологични параметри.

Цел и задачи: Целта на настоящото изследване „Да се анализират клинично-морфологичните параметри на пациентите с неавансирал и авансирал простатен карцином във връзка с имунохистохимичната експресия на тетраспанините и изясняване ролята им за туморната прогресия“ е точно и ясно формулирана, и е адекватна на дисертационната тема. Тя и произтичащите от нея 6 задачи са логично продължение на литературния обзор.

Материал и методи на изследване

За целите на разработвания дисертационния труд е използван достатъчен по обем материал, необходим за статистическа обработка на данните и определяне на тяхната достоверност. База за реализация на разработката са Катедрата по „Обща и клинична патология, съдебна медицина и деонтология“ при МУ-Варна, и Клиниката по обща и клинична патология при УМБАЛ „Св. Марина“-Варна. Обект на проучването са биопсичните материали от

простатна жлеза на общо 101 пациента - 91 с диагноза карцином и 10 пациента с ДПХ, формиращи контролна група. Диагнозата и стадия заболяването според 8-то издание на AJCC са определяни в УМБАЛ „Св.Марина“ - Варна. Пациентите са разпределени в две групи: 50 без данни за авансирал, и 41 пациента с авансирал карцином. Материалите от 10-те пациента с ДПХ, формиращи контролна група, са използвани при оценяване експресията на маркерите CD9 и CD151. При всички пациенти е определян интензитетът на цитоплазмена експресия на маркерите в жлезните епителни клетки. В разработката д-р Стоев е подбрал и включил голям набор от адекватни за целите на изследването методи: 1. Рутинни хистологични методи върху материали само от конвенционални простатни аденокарциноми, взети чрез дебелоиглени биопсии, биопсии от радикални простатни резекции и от ТУР на простатата. За целите на проучването са определяни клиничко-морфологичните параметри, включващи подробно описаните хистологичен тип, крибриформен модел на туморен растеж, TNM стадий, степен на диференциация по Gleason score и ISUP Grade Group; периневрална инвазия, туморна некроза, разпространение в и извън простатата и наличие на метастази. 2. Специфични методи на изследване, включващи индиректен имунопероксидазен метод за имунохистохимичен анализ с количествена оценка, осъществени с помощта на mini KIT high DAKO K 8024. Антителата, реактивите за оцветяване и работните концентрации са представени в табл. 6 и 7. Подробно са описани стъпките в подготовката на биопсичните материали за ИХХ-изследване, ИХХ- протокол, произход на използваното антитяло и визуализиращата система. ИХХ-експресията на CD9 и CD151 е оценявана чрез H-score, като полуколичествено в интервал от 0 до 300 са определяни интензивността на цитоплазмената експресия за всяка клетка от туморните и нетуморни жлези, и процентът на позитивните клетки за всеки отделен интензитет по приложена схема. При провеждане на ИХХ-реакциите са спазени всички елементи на методиката, вкл. технологична дисциплина, описание на позитивна и негативна контроли и др. Критериите за позитивност са точно формулирани при отчитане на резултатите, които са обработени чрез набор от съвременни статистически методи за анализ на данните, напълно отговарящи на поставените цел и задачи. При обработката е използван статистически софтуерен пакет IBM SPSS ver.21, а графиките са построени в Microsoft Excel за Windows.

Оценка на получените резултати

Резултатите от проведеното в дисертационния труд изследване са най-значителната част от труда и демонстрират задълбоченост и опит за максимална обективност на автора. При описанието им е спазена последователността на поставените задачи. Анализът на резултатите е проведен на много добро методично ниво, което е позволило на д-р Стоев да направи съответните изводи и заключения от разработката.

Включени в проучването са биопсични материали от 91 пациента с ПК, като 50 от тях са с неавансирал, и 41-с авансирал карцином. Средната възраст на пациентите е 69,39 год., с минималната възраст 45 год, и максимална- 90 год. Най-чест е карциномът във възрастовата група 60-69 год. /37 случая / и 70-79 год. /38 случая/. Във възрастта до 60 год. са само 6 случая, а над 80 год. са 10 случая. При 46 от 50-те пациента в групата с **неавансирал карцином**, клиничко-лабораторните данни за стойностите на PSA са били налични преди хистологичното изследване. Анализът на клиничко-морфологичните характеристики при пациентите от тази група показва: преобладаване на случаите с ниски средни стойности на PSA /0-9,9 ng/ml /22 пациента/, крибриформен туморен растеж /при 27 случая/, степен на диференциация, проследена чрез

Gleason score - съотв. 6 при 12 от случаите, скор 7 при 22 случая, и в един случай-GS е 10; перинеурална инвазия е установена при 35, липсват случаи с туморна некроза; в 58% от случаите туморът е бил ограничен в жлезата, 40% са били с екстрапростатно разпространение и в един случай /2%/ са били засегнати околни структури. **При авансиралите ПК** преобладават пациенти с високи PSA средни стойности /в 27 пациента с над 50,0 ng/ml, и само в 2 случая средната стойност е под 10,0 ng/ml; крибриформен модел на растеж е установен в 30 случая /73,2%/; висок Gleason score - 8 е при 15 от пациентите, като най-голям брой пациенти /16/ са с Gleason score 8 и 9 /16 пациента/; ПНИ-е установена в 28 от 41-те случая с авансирал ПК, а туморна некроза има при 4 от пациентите. Отчитането на локалната прогресия показва ограничение в жлезата при 35 пациента, в 3 пациента карциномът е с екстрапростатно разпространение, и в 3 от случаите е засегнал околни структури.

Извършеният сравнителен анализ на данните между клинично-морфологичните параметри при пациенти с неавансирал и авансирал ПК показва: 1. Липса на статистическа зависимост при сравняване на променливите възраст /под и над 70 години/ и средни стойности на PSA и в двете групи, като средната стойност на PSA при пациенти под 70 год. е 13,5 ng/ml, а при пациенти над 70,0 год. - 67,3ng/ml, при високо стандартно отклонение. **2. Анализът между променливите възраст и Gleason score** показва наличие на статистическа зависимост само при пациенти с авансирал карцином - с увеличаване на възрастта / 80+/ се увеличава и Gleason score, като всички пациенти с далечни метастази и на възраст над 80 години са имали карцином с Gleason score равен или над 8.

Сравнителният анализ на данните между стойностите на PSA и клинично-морфологичните характеристики показва: 1. При пациенти с неавансирал ПК: при високи стойности на PSA е по-чест крибриформният модел на растеж; при сравнителния анализ между средните стойности на PSA и Gleason score се забелязва тенденция за повишаване на PSA при съответен по-висок Gleason score. Статистически значима разлика има между нивата на PSA и ПНИ - анализът показва, че средната стойност на PSA при карцином с ПНИ е по-висока от тази при карцином без ПНИ. При пациенти с авансирал карцином сравнителният анализ м/у стойностите на PSA и крибриформен модел на растеж показва, макар и без статистически значима разлика, наличие на по-високи средни стойности на PSA при крибриформен туморен растеж; **тенденция има за покачване** стойностите на PSA спрямо Gleason score, но тя отново е без статистически достоверна зависимост; подобна липса на достоверност има при сравняване средните стойности на PSA и наличието на ПНИ.

Сравнителният анализ между морфологичните параметри при пациенти с неавансирал карцином показва, че докато от 15 неавансирали ПК без ПНИ само при 1 има хистологични данни за крибриформен растеж, при тумори с ПНИ крибриформни структури се установяват в 22 случая - т.е., при неавансиралите ПК **крибриформният модел на растеж е по-често свързан с ПНИ**. Зависимост се установява и м/у ПНИ и Gleason score - от 15 случая без ПНИ най-много са пациентите с Глисон скор 6 и 7, като в групата няма случаи с Gleason score 9 и 10. Сравнителният анализ м/у Gleason score и Т-стадия при неавансиралите карциноми показва статистически значима разлика - Gleason sc. 6 е предимно при случаи с Т2 / 7 сл./, докато Gleason score 8 и 9 се среща по-често при случаите с Т3+Т4. ПНИ се наблюдава по-често /в 87% от случаите/ при карциноми в по-напреднал /Т3 и Т4/ стадий.

При **сравнителен анализ** м/у морфологичните параметри при пациенти с **авансирал ПК** не се установява статистически значима разлика при сравняване на двете променливи „крибриформен модел на растеж“ и ПНИ, макар присъствието на крибриформени структури да е по-често от липсата им както при карциноми без ПНИ, така и при тези с ПНИ. Сравнителният анализ между ПНИ и Gleason score показва, че независимо от това, има или не ПНИ, преобладаващ е високият скор - 9 и 10. Сравнителният анализ м/у Gleason score и М-стадий показва статистически значима зависимост: при М1 най-голям е броят на пациентите с Gleason score 9.

Основният акцент в резултатите от проучването е установяването и оценката на експресията на CD9 и CD151 при ПК и ДПХ. Извършен е анализ на средните стойности на цитоплазмена експресия на CD9 и CD151 при неавансирал, авансирал карцином и ДПХ и е проследена ИХХ-експресия на маркерите във връзка с клинично-морфологичните показатели при неавансирал и авансирал ПК. Някои от получените резултати за експресията на маркерите при стadiите от развитието на ПК и корелацията им с клинично-морфологичните характеристики до известна степен са разнопосочни, което дава основание да се смята, че тя не може да бъде използвана като самостоятелен прогностичен маркер, а само в комбинация със съществуващи показатели, като крибриформен модел, Gleason score, ПНИ, и в някои случаи - възраст на пациентите. Базирайки се на литературни данни, д-р Стоев се присъединява към мнението на други автори, че експресията на CD9 има слабо влияние за туморна прогресия при простатен карцином. Що се касае до маркера CD151, имайки предвид мултифункционалната му роля и взаимодействие с много други фактори, може да се предположи, че той не участва в процесите на туморен растеж и метастазирание самостоятелно, а като компонент на тетраспанин- интегринави комплекси във взаимодействие с други молекули. А това от своя страна налага осъществяването на комплексни проучвания сред по-голям брой от пациенти. Независимо от изложеното, изследването на експресията на CD9 и CD151 във връзка с клинично морфологичните показатели при ПК би допринесло за определяне биологичното поведение на тумора, а това може да увеличи възможностите за прилагане на адекватна таргетна терапия.

В глава „**Обсъждане**“ д-р Стоев сравнява получените при неговото изследване резултати с тези, публикувани в литературата от други автори за подобни изследвания. Разгледани са сходствата и различията в посочените данни, като са обсъдени и възможните причини за съществуващите несъответствия. Критичният анализ на научната информация по проблема в контекста на получени от дисертанта резултати показва задълбочените познания на д-р Стоев по темата. Представената разработка е резултат от успешния опит да бъде извършено системно и задълбочено проучване, посветено на простатния карцином. Това е първото по рода си научно изследване у нас, с комплексна клинично-морфологична и ИХХ характеристика на тумора и с такъв голям обем от показатели и статистически методи при обработката на резултатите. Заключение, което прави д-р Стоев е, че случаите, които са използвани в разработката, биха могли да бъдат повече на брой, за да може да се направят категорични изводи!

Изводи От проведеното значително по мащаб проучване произлизат 11 извода, резюмиращи подробно представените резултати и съобразени и съответстващи на целта и поставените от автора задачи. Шест от тях са с потвърдителен характер по отн. известните данни от литературата за зависимостта между някои от изследваните клинично-морфологични показатели. Останалите 5 извода се отнасят до зависимостите между възраст/експресия,

далечни метастази/експресия, и зависимостта между експресията на изследваните тетраспанинови маркери CD9 и CD151 и клинично-морфологичните показатели крибриформен модел на растеж, Gleason score, периневрална инвазия и възраст на пациентите.

Приноси:

Д-р Стоев е формулирал общо 6 приноса на дисертационния труд, разпределени в 2 групи, а именно: 1. Оригинални - 2, отнасящи се до осъществената комплексна клинично-морфологична и ИХХ-характеристика на CD9 и CD151 с оглед изясняване ролята им за прогнозата при пациенти с ПК. 2. Четири научни приноса с научно-приложен характер, сред които се открояват 1, 3 и 4.

Д-р Стоев е представил 2 пълнотекстови научни публикации, свързани с темата на дисертационния труд, публикувани в наши списания, и едно участие в Национален конгрес по патология, 2017 год. Публикационната активност - брой на публикациите, тяхното съдържание и стойност отговарят на изискванията за представяне на резултатите от научните изследвания.

Авторефератът е изготвен в съответствие с приетите научни изисквания. Той е написан на 73 страници, онагледен е с 25 фигури и 43 таблици и представя пълно, точно и адекватно дисертационния труд по отношение структурата, резултатите и изводите от разработката.

Заклучение:

Дисертационният труд на д-р Стоев, написан на много добре издържан научно-литературен език и онагледен по подходящ начин, представлява едно завършено, добре структурирано, с оригинални научни резултати и приноси морфологично проучване, имащо приносен характер за решаване на клинично-морфологични проблеми, свързани с диагнозата, лечение и профилактика при пациенти с простатен карцином. Целта на разработката е постигната, поставените задачи са изпълнени. Изводите са точни, ясно формулирани и изчерпателни. Приносите имат не само научна, но и практическа стойност. Дисертационният труд, както и представените публикации и научно съобщение съдържат научно-приложни резултати, отговарящи на изискванията на ЗРАСРБ, Правилника за прилагането му и на условията и реда за придобиване на научна степен в МУ-Варна. Представеният дисертационен труд показва, че д-р Стоев притежава задълбочени теоретични знания и умения по научната специалност „Патологоанатомия и цитопатология“, като демонстрира качества за самостоятелно провеждане на научно изследване.

Във връзка с гореизложеното, напълно убедено давам своята **положителна оценка** на предложения дисертационен труд, и гласувам „**ЗА**“ присъждането на ОНС „**Доктор**“ на д-р Любен Людмилов Стоев по научната специалност „Патоанатомия и цитопатология“.

03.12.2021г.

гр.Варна

Член на Научното жури: .....

/ доц. д-р Е.Софтова, дм /