

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 – 109-394 / 13.11. 2017 г.

относно дисертационен труд на тема

„ЕКСПРЕСИЯ на МАРКЕРИ за АВТОФАГИЯ и НЕКРОПТОЗА при
ДЕБЕЛОЧРЕВЕН КАРЦИНОМ”,

за присъждане на ОНС „доктор”

с автор д-р Надежда Тодорова Стефанова,
научен ръководител доц. 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 Надежда Тодорова Стефанова.

1. Д-р Надежда Тодорова Стефанова е родена на 10.12.1986 г. в гр. Павликени. Завършва средно образование в СОУ „Бачо Киро“ в родния си град, профил „природоматематически“ с английски език. През 2011 г. завършва магистърска степен, специалност медицина в Медицински университет „проф. Д-р Параскев Стоянов” – Варна. От месец октомври 2011 г. работи като лекар и хонорован асистент в клиниката „Обща и клинична патология” и съответно в Катедрата по „Обща и клинична патология, Съдебна медицина и Деонтология” към МБАЛ „Св. Марина”, гр. Варна. През м. февруари 2012 г. е зачислена въз основа на проведен конкурс за редовен асистент към същата катедра.

Д-р Стефанова има 6 г. стаж като преподава на студенти от четирите факултета на МУ - Варна - „Медицина“, „Дентална медицина“, „Фармация“ и „Обществено здравеопазване“ – на български и на англоезични студенти.

Тя е член е на Българското и Европейско дружеството по патология, на БЛС и на Българската Медицинска Хомеопатична Асоциация.

Д-р Стефанова е изкарала курс на обучение в Австрия по молекулярна патология.

2. Дисертационният труд на доц. д-р Надежда Тодорова Стефанова е посветен на актуален проблем в областта на човешката патология - колоректалния карцином. Всяка година от този тумор заболяват приблизително един милион души. Това го нарежда на трето място по честота сред злокачествените заболявания и на второ като причина за смърт.

КРК възниква вследствие на генетични и епигенетични промени в нормалния чревен епител. Няколко последователни стъпки водещи до мутации в тумор-супресорните гени и протоонкогени предизвикват развитието на тумора. В основата на това стоят три пътя - хромозомната нестабилност, микросателитната нестабилност и фенотипа на метилираните CpG-острови. При КРК се наблюдават характерни молекулно-генетични отклонения в CEA, в гена на аденоматозната полипоза, в KRAS протоонкогена, в BRAF (част от RAS фамилията и посредник в EGFR-сигналния път), в загубата на хетерозиготност на 18q хромозома, в мутации на p53 тумор-супресорния ген.

В крайна сметка се развиват познатите отклонения в строежа и диференциацията на клетките характерни за КРК. Морфологичният им вид е известен на специалистите от години. Малко са обаче данните за ролята и значението на автофагията и некроптозата при КРК. Това са два механизма със съответни морфологични прояви за рециклиране и клетъчна смърт, които се откриват при този тумор. Липсва достатъчно информация за тяхното място при еволюцията на КРК и връзката им с по-горе посочените молекулярно-генетични отклонения. Фактът, че те са залегнали в основата на работата на д-р Стефанова прави нейния труд актуален.

Представеният дисертационен труд, както и авторефератът са съобразени с изискванията за структура и обем залегнали в правилника на МУ- Варна. Дисертацията

е написана на 187 страници и включва следните основни глави: използвани съкращения (1 стр.), въведение (3 стр.), литературен обзор (47 стр.), цел и задачи (1 стр.), материали и методи (8 стр.), резултати и обсъждане (78 стр.), заключение (1 стр.), изводи (1 стр.), приноси (1 стр.) и литература - 35 стр. включваща 324 заглавия, 6 от които на български език, а останалите на английски, значителна част от които от последните 10 г. Тя е онагледена е с 64 фигури, вкл. микроскопските фотоснимки и 25 таблици.

Литературният обзор е добре структуриран и изчерпателен. В него са посочени най-важните проблеми свързани с епидемиологията, рисковите фактори и етиологията на КРК. Изчерпателно са описани механизмите на туморогенезата като е наблегнато на значението на молекулно-генетичните нарушения. Подробно е представена морфологичната характеристика, принципите на стадиране, хистологичните варианти, прогностичните и предиктивни фактори като съдова инвазия, периневрална инвазия, туморно пъпкуване, некрози, възпалителен отговор. Изтъкнати са видовете лечение като не са пропуснати и най-съвременните методи като таргетната терапия и оценката на преживяемостта. Отделна част е посветена на клетъчната смърт и преустройство. Направена е подробна характеристика на автофагията и механизмите и, както и ролята и за клетъчното модулиране и мястото и при КРК. Обяснено е значението на некроптозата, молекулярната и патогенезата и връзката и с рака на дебелото черво. На основата на този задълбочен преглед правилно е преценено, че взаимодействието между видовете клетъчна смърт е сложно и многостранно. Че негово разгадаване би дало шанс за точна преценка на начините, по които туморните клетки избягват апоптозата и некроптозата и оцеляват. А това би било предпоставка за създаване на по-ефективни таргетни средства за лечение на КРК.

Така обзорът логично насочва към целите и задачите на дисертационния труд.

Целта на дисертационния труд е да се изследват експресията на маркерите – Beclin-1 за автофагия и на RIP3 за некроптоза във връзка с клинично-патологичните показатели и общата преживяемост.

Във връзка с нея са поставени 6 задачи, формулирани точно и конкретно. Те трябва да помогнат да бъде преценена корелацията между експресията на двата маркера, т.е. автофагията и некроптозата от една страна и клинично-морфологичните, молекулярно-генетичните характеристики и смъртността и преживяемостта от друга при КРК.

За решаването на поставените задачи са използвани материали от 107 пациенти с диагноза КРК, лекувани в УМБАЛ „Св. Марина“ – Варна, за период от 9 г.: 2007 – 2015 г. Диагнозата и стадият са определени съгласно 7-то издание на AJCC. При всички пациенти са извършени хирургическо отстраняване на първичния тумор и последваща химиотерапия.

Използваните методи – рутинна биопсия, ИХХ и определяне на мутационни статус са надлежно представени. На всички пациенти е проведено изследване за *Veclin-1*, а на 81 – и за *RIP3*. Подробно са описани критериите за категоризиране на локализацията на тумора, хистологичния тип, растежа, стромната и десмопластичната реакция, *TILs*, пъпкуването, видовете инвазии, площта на некрозите.

Наред с морфологичните и генетични методи са използвани и значителен брой статистически – дисперсионен анализ, вариационен, корелационен, регресионен, *ROC curve* анализ – които обективизират преценката и интерпретацията на резултатите.

Получените резултати показват, че КРК е най-чест във възрастта 61 – 70 г. Мъжете боледуват малко по-често. Локализация на тумора в повечето случаи е в лявата половина на колона. Преобладават тумори диагностицирани в напреднал стадий – Т3. Умерено диференцираните карциноми доминират. Лимфни метастази не са установени в малък процент – само в 21,5 % от случаите. Инфилтративният растеж е преобладаващият – в 71%. Некрози са констатирани в 86 % от туморите, а наличие на *TILs* в 96 %. Висок е процентът и на установената имунна реакция – 93,5 %, както и на десмопластичната реакция – 83,2 % изразена в различна степен при отделните пациенти.

При сравнителния анализ на клинично-морфологичните параметри и преживяемостта се установява, че средното ниво на последната е 21,59 +/- 17,03 мес., като минималната е 2 мес., а максималната - 86 мес. Рискът от настъпване на смърт е по-голям когато туморът е локализиран в десния колон. Най-много починали пациенти има при умерена диференциация на тумора G2. Екзитиралите пациенти с установена мутация на *KRAS* са значително повече от от преживелите. Инфилтративният начин на растеж носи по-висок риск от летален изход (72,10 %) отколкото експанзивния. Най-много пациенти са починали в случаите когато са налице огнищни некрози. Важна констатация е, че всички пациенти без *TILs* са починали. По-ниска преживяемост се констатира при пациенти без или със слаба стромна реакция. Повече починали има

сред пациентите с наличие на съдова инвазия (59,30 %). А при тези с периневрална инвазия има по-висока смъртност, но голяма преживяемост.

Резултатите за експерсията на *Veclin-1* са сигнификатно свързани с локализацията на тумора, диференциацията му и наличието на *KRAS* мутация. При десностранна локализация има по-висока експерсия, тя е по-висока при високо диференцираните тумори и при пациенти с налична *KRAS* мутация. По-висока е и при липса на некрози. Ниска експерсия присъства при наличие на съдова инвазия, а висока при липса на такава. Ниска експерсия на *Veclin-1* и обширни некрози в тумора се съпровождат с най-малка преживяемост. Ниската експерсия на *Veclin-1* също така при пациенти с G3 диференциация показва 3 пъти по-лоша преживяемост. Изследване на прогностичната стойност на експерсията на *Veclin-1* свидетелства, че когато тя е висока вероятността пациентите да преживеят по-малко също е висока (84,10 %), докато при ниска има вероятност за по-дълга преживяемост. Това дава основание на авторите да приемат, че експерсията на *Veclin-1* зависи от локализацията на тумора, диференциацията и съдовата инвазия. Останалите параметри – пол, възраст, T и N стадий, начинът на растеж, *RAS* мутационният статус не влияят на автофагията. Тези данни показват и че автофагията може да има както тумор-промотиращ, така и тумор-супресиращ ефект.

Данните от изследването на експерсията на маркера *RIP3* показват, че висока негова цитоплазмена експерсия е налице при експанзивен растеж. Високото му цитоплазмено ниво в туморната тъкъв също така се свързва и с слабо изразена имунна реакция, което налага твърдението, че той я инхибира. Докато ядрената му експерсия съпровожда силна имунна реакция, т.е. така той активира вродения имунитет.

При направеното сравнение между изявата на двата маркера се оказва, че при живи пациенти най-висок е дялът на онези, които имат висока експерсия на *Veclin-1* и ниска на цитоплазмен *RIP3*, докато при починали най-висок е дялът на имащи висока експерсия и на двата маркера. По отношение на локализацията сравнителният анализ между *Veclin-1* и *RIP3* сочи, че при лява локализация преобладава процентът на имащи висока експерсия на първия и ниска на втория, докато при дясна най-висок е процентът на групата с висока експерсия и на двата маркера. Най-голям дял при ниската имунна реакция показва групата с висока *Veclin-1* – реакция и ниска цитоплазмена *RIP3*, докато при изразена имунна реакция най-голяма е групата с висока експерсия и на двата кита. При липса на туморни некрози най-много са случаите, при които и двата маркера са с ниска експерсия, докато при наличие – преобладават тези с ниска и при *Veclin-1* и при

RIP3. При липсваща съдова инвазия най-голяма е групата, в която и двата кита имат ниска експресия, докато при наличие на такава – тази с ниска експресия и при двата.

На финала на работата са оформени 6 извода отговарящи на целта и задачите на дисертацията и основаващи се на получените резултати. Те, накратко са :

Възрастта, T-стадият, съдовата инвазия и диференциацията са рискови фактори за общата преживяемост по отношение на КРК. Експресията на Beclin-1 е висока при пациенти над 65 г. възраст при наличие на некрози, съдова инвазия и KRAS мутация. Високата експресия на същия маркер в туморната тъкан прогнозира във висок процент по-малка преживяемост. Цитоплазмената експресия на RIP3 се асоциира с туморния растеж и с имунната реакция, а ядрената с имунната и десмопластичната реакции. Висока цитоплазмена експресия на двата маркера за автофагия и некроптоза има при десностранна локализация на тумора, при некрози, при висока степен на изразеност на имунната реакция, при съдова инвазия и при висока смъртност. При живите пациенти преобладава изразената автофагия съчетана със слаба некроптоза главно при лява локализация с обширни некрози и слаба имунна реакция. При починали – и двата процеса са силно изразени, главно при туморите в лявата половина, с огнищни некрози, съдова инвазия и силна имунна реакция. При ниско ниво на автофагия и високо на некроптоза в КРК липсват некрози, имунна реакция и съдова инвазия.

Представеният научен труд съдържа два научно-оригинални приноса :

1. Комплексно клинично морфологично и молекулно-генетично изследване на пациенти с КРК в съчетание с преценката на автофагията и некроптозата.
2. Извършване на анализ на експресията на Beclin-1 и RIP3 с цел преценка на автофагията и некроптозата.

Други четири приноса са с практическо-приложен характер, а именно :

1. Първото у нас определяне на прогностичния потенциал на Beclin-1 за ниска обща преживяемост при пациенти с КРК.
2. Оценка за първи път на прогностичната стойност на RIP3 като маркер за некроптоза.
3. Синхронна оценка на маркерите Beclin-1 и RIP3 във връзка с клинично-патологични показатели при пациенти с КРК.
4. Определяне на профила на пациенти с повишен риск за смърт при КРК на базата на клинично-морфологични характеристики и на оценката на автофагията и некроптозата.

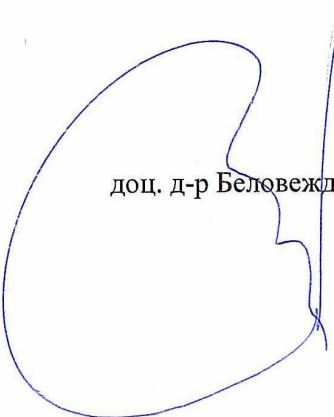
Данните от дисертацията са представени в три научни публикации, едната от които в чуждоезично списание.

Въпреки, че представените в дисертацията резултати за морфологичните феномени автофагия и некроптоза при КРК във връзка с клинично-морфологичните параметри са до известна степен противоречиви, те представляват ценен принос в хистопатологията и морфогенезата на тумора и дават простор на нови бъдещи разработки.

Въз основа на горе изложеното считам, че дисертационният труд на д-р Стефанова е напълно завършен, съдържащ 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 Надежда Стефанова.

20.01.2018 г.



доц. д-р Беловеждов