

## РЕЦЕНЗИЯ

от

доц. д-р Веселин Т. Беловеждов, дм

Ръководител на Катедра по обща и клинична патология при МУ – Пловдив,  
Медицински университет - Пловдив

в качеството му на член на научно жури

въз основа на заповед № 1533 / 31.05.2019 г.

на Ректора на Тракийския университет – Стара Загора

*относно дисертационен труд на тема :*

**ЗНАЧЕНИЕ НА ЧОВЕШКИТЕ ЕПИДЕРМАЛНИ РАСТЕЖНИ ФАКТОР РЕЦЕПТОРИ  
И ТУМОРНОТО МИКРООБКРЪЖЕНИЕ В РАЗВИТИЕТО И ПРОГНОЗАТА НА  
НЕДРЕБНОКЛЕТЪЧНИЯ БЕЛОДРОБЕН КАРЦИНОМ**

с автор д-р Пламен Ангелов Минков

Катедра по Обща и клинична патология, съдебна медицина и деонтология, и  
дерматовенерология, МФ, Тракийски университет – Стара Загора

**Научен ръководител:** доц. д-р Юлиан Руменов Ананиев, дм

**Научен консултант:** проф. д-р Мая Владова Гълъбова, дм

Дисертация на д-р Пламен Минков е насочена към проучване на някои от механизмите отговорни за развитието на недробноклетъчния белодробен карцином (НДКБК).

Белодробният карцином (БК) е едно от най-честите онкологични заболявания и се утвърждава като туморът, който е най-честата причина за настъпване на смъртен изход. Той е мултифакторно заболяване, за възникването и протичането на което са отговорни разнообразни нокси, екзогенни и ендогенни. Тези факти определят изключително важното значение на първичната профилактика като метод за ограничаване възникването на БК. От клинична гледна точка лошата прогноза на заболяването се определя от една страна от неговия агресивен ход и от друга от липсата на ранна симптоматика, което е причина за късната му детекция. Намирането на нови методи за откриване, определяне на прогнозата и лечението на БК е обект на множество

разработки. Именно на тях е посветена работата на д-р Минков, което дава основание да приема, че трудът му е насочен към изключително актуална тема.

Дисертацията е написана на 162 страници разпределени по следния начин : заглавие и съдържание – по 1 стр., използвани съкращения – 3 стр, въведение – 2 стр., литературен обзор – 58 стр., цел и задачи – 1 стр., материали и методи – 7 стр., резултати – 27 стр., дискусия – 18 стр., изводи – 2 стр., приложение – 1 стр., библиография – 444 източника, всички на латиница; в работата има 44 фиг., 10 от които са микроскопски снимки, а останалите - графики.

В литературния обзор подробно са разгледани етиологията, епидемиологията и рисковите фактори за развитието на тумора. Въз основа на това коректно е преценено, че съществуват множество прогностични фактори свързани с прогресията и развитието на заболяването: TNM статус, възраст, стадий, пол, хистологичен вариант, серумните нива на ЛДХ (лактат дехидрогеназа), СЕА (карциноембрионален антиген ) както и някои други по-нови биомаркери като EGFR мутации и ALK генните пренареждания. Макар последните два да играят роля при неголям брой пациенти и да е необходимо известно време за получаване на резултати, те биха могли да определят онези високо рисковите групи боледуващи, към които по специфичен начин да се насочи клиничния подход. По-нататък е изтъкнато значение на имунния отговор на пациента за прогресията на туморния процес. Правилно е подчертано, че туморната микросреда обусловена, както от имунния отговор, така и от самата неоплазма, играе съществена роля в процеси като ангиогенеза, метастазирание и пролиферация на раковите клетки. Затова има смисъл да се изследват клетъчните фактори на микросредата – лимфоцити, неутрофили, тромбоцити и съотношенията помежду им, и ефекта им за туморния растеж. Към тях могат да бъдат причислени и тумор-инфилтриращите дендритни клетки и тумор асоциираните макрофаги.

Правилно е представено и съвременното разбиране за възникването и развитието на НДКБК, което приема, че повече от 60% от аденокарциномите и между 50-80% от плоскоклетъчните са причинени от специфични мутации. Затова при тези тумори, при които има EGFR мутации или транслокация на ехинодермален микротубул-асоцииран подобен-протеин 4 (EML4) и анапластична лимфом киназа (ALK), има забележителен терапевтичен отговор при терапия с EGFR и ALK инхибитори.

EGFR мутациите се откриват по-често сред жени, непущачки с хистологичен вариант на тумора - аденокарцином. EGFR мутации се срещат и при другите подвидове на НДКБК, включително при настоящи и бивши пушачи.

Детекцията на генните аномалии на EGFR при пациенти с НДКБК се налага за оптимизиране на тяхната терапия. Необходимостта да се установи повишената експресия на EGFR чрез ИНС при пациенти с НДКБК е противоречива. Според някои проучвания методът има ценна предиктивна стойност за терапевтичния отговор при лечение с тирозин киназни инхибитори, но в други проучвания ИНС методика няма такава значителна предиктивна стойност. В крайна сметка правилно е преценено, че имунохистохимията е метод, който има място при определяне на EGFR статуса поради нейната добра специфичност и сензитивност. Защото установяването на EGFR мутация в последствие дава шанс за по-добра прогноза за пациентите с НДКБК въпреки.

В дисертацията е залегнала и темата за ролята на растежните фактори. Това е логично тъй като се счита, че тези фактори могат да оказват влияние на развитието и прогресията на раковите заболявания. Счита се, че това става чрез предизвикване на автономен и неконтролиран растеж в следствие на автокринна продукция на фактори, които активират специфични рецептори локализирани на повърхността на раковите клетки и индукция на неоваскуларизация чрез паракринна стимулация на нормалните ендотелни клетки на пациента от секретирания от самите ракови клетки ангиогенен растежен фактор (VEGF). Факторите EGF и амхирегуин също играят важна роля в развитието на епителни карциноми, включително и при бронхиални епителни тумори. Такива са и HER 2 - рецепторите намиращи се по повърхността на клетките.

Редица данни са натрупани относно връзката на HER2 свръхекспресията с лоша прогноза при пациенти с НДКБК. Близко 18-33% от НДКБК са позитивни за HER2 като този процент варира според хистологичния тип на тумора : при аденокарциномите свръхекспресията е най-честа - 17- 42%, следвана от едроклетъчния карцином - 2- 40% и най-ниска е тя при сквамозния белодробен карцином.

В клинични проучвания съвместната експресия на EGFR и HER2 при пациенти с НДКБК, оценена чрез FISH, показва по-добър отговор към лечение с гефитиниб, спрямо терапевтичния отговор на пациенти с НДКБК и/или EGFR негативни и/или HER2 негативни – съотношението на общата преживяемост е 20,8 срещу 9,3 месеца.

Въз основа на подробния и изчерпателен литературен обзор е формулирана логична цел - да се проучи значението на някои популации дендритни клетки и макрофаги в тумора и неговото обкръжение, ролята на някои клетъчни съотношения в циркулацията, както и експресията на три от епидермалните растежни фактор рецептори от туморните клетки, и влиянието на тези фактори върху прогнозата и развитието на недребно клетъчния белодробен карцином.

От така поставената цел произтичат закономерно и задачите, които си поставя автора на дисертацията :

1. Да се извърши разпределение на пациентите по съответните клинични, хистологични и демографски показатели.
2. Да се изследва експресията на имунохистохимичните маркери-CD11c и CD123 от тумор-инфилтриращите дендритни клетки в инвазивен фронт на тумора и връзката на инфилтрацията с клинично-морфологичните параметри и преживяемостта на пациентите.
3. Да се изследва инфилтрацията със CD68-позитивните тумор-асоциирани макрофаги и връзката им с клинично-морфологичните параметри и преживяемостта на пациентите.
4. Да се изследва експресията на EGFR, HER2 и HER3 и връзката им с развитието на тумора и преживяемостта на пациентите.
5. Да се изследва значението на съотношенията Neu/Lym и PI/Lym и значението им за развитието на неоплазмения процес.

За изпълнението на тези задачи авторът е изследвал ретроспективно и проспективно 57 случая на НДКБК, брой който намирам за уместен. Те са от периода

2007-2015 г. и са взети от пациентите оперирани в Клиниката по гръдна хирургия на Университетска многопрофилна болница за активно лечение – Стара Загора, ЕАД.

Хистологичните, хистохимичните и имунохистохимичните изследвания на биопсичните материали са изработени в лабораториите на Катедрата по Обща и клинична патология при Медицински факултет на Тракийски университет и Клиниката по обща и клинична патология на УМБАЛ – Стара Загора, ЕАД.

Следва пространно и детайлно описание на самите методи, което показва добро познаване на технологичната част. Сред тях авторът предлага и използване на статистическа програма SPSS for Windows Version 16 (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA), което дава основание да се приеме обективния характер на получените резултати, които са :

По зад. 1. Пациентите са : 51 мъже - 89.5% и 6 жени -10.5%; средната им възраст е 62.4 години. Шестима от тях (10.5%) са в стадии T1 и T2, а 51 (89.5%) пациенти в T3 и T4; от всички 57 пациенти при 36 (63.2%) липсва ангажиране на лимфните възли, а в 21 (36.8%) се наблюдават такива; при 40 пациента (70.2%) не се регистрират далечни метастази, докато при останалите 17 (29.8%) такива се налице. Наблюдават се два типа карциноми – плоскоклетъчен тип – 19 случая (33.3%) и 38 случая с аденокарциноми или 66.7%. По степен на диференциация преобладават ниско диференцираните белодробни карциноми – 50.9%, следвани от случаите на умерено диференцирани – 47.4% и високо диференцирани – 1.8%.

По зад. 2. Намерено е, че CD11c-позитивни ТИДК в тумора и туморната граница имат средното разпределение : в туморната строма - 49.69+/-49.4кл/мм<sup>2</sup>, а в туморната граница - 69.2+/-66.5кл/мм<sup>2</sup>, като средната плътност в туморната строма е статистически значимо по-ниска в сравнение с границата. Статистически достоверна разлика е открита и при сравнението на двете популации ТИДК в туморната строма. Установява се, че 36.8% от аденокарциномите имат висока инфилтрация със CD11c-позитивни клетки в туморната граница, при 26.3% от плоскоклетъчните карциноми тя също е висока.

По зад. 3 . При анализ на инфилтрацията със CD68-позитивните тумор-асоциирани макрофаги в туморната строма и инвазивния фронт и връзката им с клинично-морфологичните параметри и преживяемостта на пациентите статистически достоверен резултат е отчетен единствено при сравняване на инфилтрацията на TAM с туморния стадий. Установено е, че 100% процента от пациентите в T1-2 имат ниска инфилтрация със CD68+TAM в туморната граница и 50.9% от туморите в T3-4 имат висока инфилтрация

По зад. 4. Анализът на експресията на EGFR, HER2 и HER3 в туморната тъкан и връзката им с развитието на тумора и преживяемостта на пациентите не открива сигнификантни разлики между експресиращите рецептори случаи и демографските показатели, както и при повечето клинично-морфологични показатели. Намира се, че 87.5% от туморите експресиращи EGFR са в T3-4 стадий; в 90.5% от туморите с лимфни метастази не се наблюдава експресия на EGFR; аналогични резултати се регистрират и при сравняване експресията на EGFR и клиничният стадий. По отношение на хистологичния тип разпределението е следното - 10.5% от

аденокарциномите експресират EGFR, докато този процент при плоскоклетъчните карциноми е 15.7%. Тенденция по отношение експресията и инфилтрацията с TAM открива, че при 42.9% от EGFR негативните тумори се наблюдава висока инфилтрация с CD68 в туморната строма. Анализирайки експресията на HER2 и сравнявайки я с хистологичния тип на карцинома, авторът откриват следните сигнификантни резултати: 36.9% от аденокарциномите експресират маркера, докато този процент за експресиращите плоскоклетъчни карциноми е 15.9%

По зад. 5. При анализа на значението на съотношението Neu/Lym и Pl/Lym е установено, че 13 пациенти имат ниско съотношение N/L, а останалите 7 - високо (средното е 1,35). При анализиране на съотношението P/L се установява, че 11 пациенти са с ниско, а 9 с високо.

В дискусията дисертантът умело прави съпоставка на своите резултати и известните от литературата, което му дава основание да мотивира заключенията и изводите.

Относно тумор инфилтриращите ДК и прогнозата на БК, въпреки сравнително малкия брой изследвани пациенти може да се направи заключението, според дисертанта, че по-високата инфилтрация с ДК в туморната граница се асоциира с напреднал стадий на заболяване. Тези данни демонстрират влиянието на ДК в процесите на потискане на антитуморния имунитет на ниво туморна микросреда. Разбира се, авторът подчертава че са „необходими повече изследвания за ясното дефиниране на мястото на ДК в онкогенетичните процеси и ролята им като предиктивни маркери“.

За TAM резултатите показват че, при по-авансирало заболяване има по-висока инфилтрация в туморната граница. Тези данни способстват за изясняването на реализираните ефекти на туморната микросреда и по-специално на TAM в хода на онкопатогенезата. И тук обаче, според дисертантът ще е необходимо натрупването на още данни за определяне на мястото на TAM като предиктивен маркер при БК.

Установява се, съгласно получените резултати, че наличието на EGFR мутация определя по-добра прогноза, за пациентите с НДКБК въпреки наличните противоречиви данни, поради по-добрите клинично-патологични характеристики при тези пациенти, но данните не позволяват с категоричност да се каже, че е изяснена прогнозата на пациентите с НДКБК и мутация на EGFR.

Наличието на HER2 експресия, според автора се свързва с хистология на аденокарцином и по-авансирало раково заболяване. Не е ясно мястото на HER2 експресията при определяне на прогнозата на НДКБК. Според някои данни тя е свързана с по-лоша прогноза, докато други не намират взаимовръзка. Установяването на HER2 експресия обаче е от изключително значение за подбора на оптимален терапевтичен подход при пациенти с НДКБК.

За съотношенията между възпалителните клетки становището на дисертанта е, че може да се отбележи, че високите N/Lr и P/Lr се асоциират с влошена прогноза, а самите N/Lr и P/Lr са много достъпни и полезни биомаркери за сравнително бързо определяне на прогнозата на пациенти с НДКБК.

Въз основа на дискусията дисертантът прави следните изводи :

1. При НДКБК преобладават пациентите в T3 и T4 туморен стадий; ангажирането на регионални ЛВ от метастази е в над 1/3 от пациентите; респективно наличие на далечни метастази е в 1/3 от изследваната група; в 2/3 от пациентите хистологичния тип е аденокарцином, а в останалата 1/3 – плоскоклетъчен; в над 50% от случаите степента на диференциация на тумора е ниска.

2. CD11c-позитивните миелоидни тумор инфилтриращи дендритни клетки (ТИДК) са по-многобройни и се явяват популация с по-голяма плътност от CD123-ТИДК в изследваните локализации; това се асоциира с напреднал стадий на заболяване и тези данни подкрепят хипотезата за влиянието им в процесите на потискане на антитуморния имунитет на ниво туморна микросреда при пациенти с НДКБК.

3. Ниският брой ТИДК в туморната граница се асоциира с авансирало заболяване от НДКБК.

4. Тумор асоциираните макрофаги (ТАМ) преобладават в туморната граница, като се установява че висока инфилтрация от тях има при случаите на НДКБК в T3 и T4 стадий, което може да се интерпретира като белег на по-интензивна, но вероятно неефективна активация на антиген презентиращите клетки.

5. Наличието на HER2 експресия е по-високо при аденокарциномите в сравнение с плоскоклетъчните карциноми. В изследваната популация експресията на EGFR корелира с понижения брой CD 68-позитивни ТАМ в туморната строма, което предполага участието на фактор рецептора в модулиране на противотуморния имунитет. HER2 експресията се свързва с по-авансирало раково заболяване.

6. Високото съотношение N/L и P/L се асоциира с влошена прогноза и преживяемост.

На финала на дисертацията д-р Минков извежда следните приноси, четири научно-теоретични и три научно приложни, които напълно приемам. Научно-теоретичните са :


1. За първи път е определена честотата и степента на инфилтрация с миеолоидните (CD11c-позитивни) и плазмоцитоидните (CD123-позитивни) дендритни клетки при пациенти с НДКБК, принадлежащи към българската популация.
2. За първи път е определена честотата и степента на инфилтрация със CD68-позитивни тумор-инфилтриращи макрофаги при пациенти с НДКБК, принадлежащи към българската популация.
3. За първи път комплексно е определена честотата на експресия на три от четирите представителя на човешките епидермалните фактор рецептори (EGFR, HER2, HER3) при пациенти с НДКБК, принадлежащи към българската популация.
4. Установяването на HER2 експресия е от значение за подбор на оптимален терапевтичен подход при пациенти с НДКБК в допълнение към хистологичните и молекулярно-биологичните изследвания на EGFR.

Научно-приложните са :

1. Асоциациите между инфилтрацията с миелоидни и плазмоцитоидни дендритни клетки и клиничните данни на пациентите очертава възможността тази находка да бъде използвана като маркер определящ прогресията на заболяването.
2. Експресията на епидермалните растежни фактор рецептори и корелирането им с клинично-морфологични фактори при пациенти с НДКБК е първото за България изследване и позволява използването му в предикцията на заболяването.
3. Изследването на съотношенията N/L и P/L е достъпно, лесно за изработка и дава възможност за интерпретация на биомаркери за насочващо бързо определяне на прогресията при пациенти с НДКБК.

В заключение мога да кажа, че представената дисертация е добре оформен задълбочен труд, който дава своя принос при изследване на НДКБК. Това ми дава основание да заявя, че тя има достатъчно качества и че отговаря на изискванията на Закона за развитие на академичния състав в България и на условията и реда за придобиване на научни степени в МФ на Тракийския университет - Стара Загора и затова давам позитивна оценка на работата, **ще гласувам за, а и си позволявам да препоръчам на членовете на уважаемото Научно жури да подкрепят присъждането на ОНС „доктор” на д-р Пламен Ангелов Минков.**

20.06.2019 г.



доц. д-р В. Беловеждов, дм