

РЕЦЕНЗИЯ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД НА Д-Р ЛИЛЯНА НИКОЛОВА ПЕТКОВА НА ТЕМА:

Експресия на CYCLIN D1, BCL1, P53 и други меланоцитни маркери в малигнени меланоми на кожата и меланоцитни невуси – сравнителен анализ на имунохистохимичната експресия, морфологичния профил и значимостта им за диагностиката и туморната прогресия

Съгласно заповед № Р-109-594/ 31.12.2022 по процедура за придобиване на ОНС „Доктор“ по докторска програма „Патологоанатомия и цитопатология“, професионално направление 7.1. Медицина, област на висше образование 7. Здравеопазване и спорт.

От доцент д-р Маргарита Ангелова Каменова, дм

Биографични данни. Д-р Лиляна Николова Петкова е родена през 1961г. Завършва средно образование в Математическа гимназия, гр. Добрич, 1979г. Висше образование „Медицина“ получава в МУ „Проф. П. Стоянов“, Варна през 1988 г. Постъпва веднага на работа като ординатор и впоследствие хоноруван асистент в катедра „Обща и клинична патология“ МУ, Варна - филиал Добрич до закриването му през 1992 г. Работи като патолог в гр. Русе /1994-95г./ и в гр. Добрич /1995-2014г./ като последните 11 г. е началник отделение „Клинична патология“ при МБАЛ-Добрич АД. От 2014г. до сега е лекар ординатор в клиника „Обща и клинична патология“ на УМБАЛ „Св.Марина“, Варна. Придобива специалност „Патология с цитопатология“ в 1995г. и професионална квалификация по цитопатология от 2000 г. Има общ трудов стаж и по специалността медицина 30 години. Поддържа класификацията си с много курсове по СДК, Европейската асоциация по патология, Европейското училище по онкология и др. Членува в БДП, СУБ и ESP. От 01.02.2019г е зачислена като докторант в редовна форма на обучение в докторска програма „Патологоанатомия и цитопатология“ в МУ „Проф. П. Стоянов“, Варна.

Въведение. Диагностицирането и прогнозирането на малигнения меланом е едно от най-големите предизвикателства пред патолога, което се дължи на няколко фактори: а/ извънредното разнообразие на морфологичната картина, която се припокрива с редица други малигнени тумори, б/трудната диференциална диагноза с меланоцитните невуси и в/ непредвидимостта на еволюцията му, която варира от обширна дисеминация в различни срокове след първичната му поява до възможността за спонтанна регресия. Липсва асоциация между хистологичния вид на меланома и неговото биологично поведение, поради което той е от малкото малигнени тумори без определени степени на диференциация. Посочените затруднения не променят изискването за точна и предвидима диагноза на малигнения меланом, който продължава да поддържа висока честота и причинява висока смъртност.

Изборът на темата на дисертационния труд сам по себе си показва, че авторът има професионална подготовка, амбиция и решителност да навлезе дълбоко в един от най-трудните за интерпретация и диагностика малигнени тумори.

В зависимост от широкия спектър на хистологичен фенотип меланомът може да се диагностицира лесно с рутинни хистологични методи и да бъде много труден и невъзможен за диагноза без въвеждане на допълнителни имунохистохимични /ИХХ/ методики. И дори с тяхна помощ затрудненията в диференциалната диагноза /ДД/ не намаляват, особено от доброкачествените и атипични меланоцитни лезии. Тези предпоставки обосновават решението на автора да избере панел от ИХХ изследвания, които имат потенциал за достоверно и надеждно разграничаване на ММ от доброкачествените аналози и от други малигнени неоплазми.

Обзорът се базира на 126 източника със силно преобладаване на съвременна информация без да са пренебрегнати основоположниците на проучването на меланом. В детайли са представени видовете меланоцитните лезии и са описани морфологичните основания за диагностицирането им. Силен е акцентът върху субтипизацията на ММ, с характеризирани на клиноморфологичните особености на всеки подвид, като са изтъкнати и трудностите в тяхната диагноза и ДД. С особено внимание са разгледани диспластичните невуси, при които също са подчертани типичните хистологични белези и допълнителните ИХХ изследвания, необходими за обективно разграничаване от бенигнни и малигнни формации. Прилагането на ИХХ биомаркери заема важно място предвид значението им за определяне на цитогенезата на малигнените тумори, а също за изясняване на механизма на канцерогенезата и уточняване на прогностичните и предиктивни критерии. Използваните маркери са разделени в две групи – *диагностични фактори за ДД* от другите немеланомни малигнни неоплазми и *второ поколение биомаркери*, разкриващи генетично увредени протеини, даващи информация за канцерогенезата, прогнозирането на ММ и неговите прекурсори. Изчерпателният обзор позволява на дисертанта да открие диагностичните и ДД трудности в групата на меланоцитните лезии като определи маркерите, които могат да подпомогнат диагнозата и тези, които са недостатъчно проучени или обект на дискусията относно значението им като индикатори за малигненост и прогноза.

Цел и задачи. Целта е формулирана ясно и точно. Съответства на темата на изследване и всички части на дисертационния труд логично са свързани и подчинени на нея. Целта и задачите са фокусирани върху установяването на сигнификантни разлики между бенигнените невуси, атипичните невуси и малигнения меланом, които могат да обосноват правилната диагноза и съответно предвидимостта в биологичната им еволюция.

Методики. Приложените рутинни и ИХХ методики произтичат от поставените задачи и обезпечават изпълнението на целта и задачите на проучването. Статистическият анализ създава условия за допълнителна и прецизна обработка на резултатите и допринася за достоверността на направените изводи. Рутинните методики са описани стриктно, следвайки алгоритъма на морфологичната диагноза, съчетана с морфометрични и полуколичествени методи: точна локализация, симетричност на профила, клетъчен състав, атипизъм и неговото разпределение, оценка на дебелината по Бреслау, инвазия по Кларк, митотична активност, улцерация, стромна реакция, регресия и сателитоза. Изборът на ИХХ методики произлиза от темата, целта и задачите, и се базира както на доказателства, определящи цитогенезата им, каквито са S-100 протеин и HMB45, така и на някои нерешени и дискуссионни проблеми в диагностиката, ДД и прогнозата на изследваните лезии.

Проучванията на циклин D1 в пигментните лезии са сравнително малко, въпреки че той е ключов фактор в растежния цикъл. Освен това липсва консистентност в публикациите, което се отдава на методични грешки. Включването му в проучването е мотивирано от наблюденията за активиране на различни свързани с него сигнални пътища при преминаване на диспластичните невуси към ММ с повишената им експресия в прехода към ММ, предупреждаваща за малигненост.

Изследванията на BCL-2 антиапоптотичния фактор във фаза на инициация и промоция на ММ са малко на брой, за разлика от метастатичната фаза, в която BCL-2 има значение като предиктивен фактор. Вероятно тази диспропорция в изследванията и недостатъчната информация за значението му като диагностичен критерий е привлякло вниманието на докторанта. Интересно е,

че експресията на BCL-2 у меланомни метастази се асоциира с по-нисък пролиферативен индекс /ПИ/ и по-дълъг период на преживяемост, повлиян от лечението с инхибитори, без да е изяснен механизма на действието на BCL-2- фамилията. Предполага се, че меланоцитите претърпяващи стрес при метастазирането, увеличават експресията на тези pro-survival BCL-2 протеини. Вероятно лекарствата инхибират анти-апоптотичните протеини чрез комбинация с BHL-1 only протеини и ангажират BAK/BAX активатори за добрите клинични резултати.

Ролята на p53 в процеса на малигнизиране на диспластичния невус също не е изяснена. По аналогия с други малигнени тумори, при които е установено, че е маркер индициращ началото на малигнена трансформация, може да се очаква участието му и във фазата на инициация на ММ.

Изследванията на **S-100 протеина** и на **меланозома клас HMB45** са проучени с оглед точната характеристика на експресията им във видовете меланоцитни образувания.

Ki-67(MIB1) е универсален помощник за определяне на ПИ у неоплазмите, но неговите стойности не са точно валидирани при видовете меланоцитни лезии.

Д-р Петкова въвежда оригинален модел за групиране на ИХХ резултати в меланоцитните лезии в 11 пункта според отчитане на експресията на биомаркерите *по интензитет*, определен в три степени и *разпространение*, също в три подгрупи - в горния слой, петниста и дифузна, обхващаща цялата дебелина на лезията. Две от групите представят липса или хетерогенна реакция. Този метод позволява да се определят статистично сигнификантни разлики в трите лезии. За всички пробвани маркери моделът детайлизира имунореактивността около най-честата структура в групата, наречена типична или характерна. Следващият модел се определя като атипичен поради припокриването на експресията между видовете лезии. Тъй като оценката не може да се базира върху едно анти тяло в някои случаи, авторката прилага комбинация от няколко маркери.

Материалът включва 91 пигментни образувания на кожата, от които 57 доброкачествени пигментни невуси, 10 атипични невуси и 24 малигнени меланоми. Броят на проучваните образувания е представителен и достатъчен за целите на статистическия анализ. Изследванията обхващат пигментни лезии, разположени само в кожата, а ММ е във фаза на промоция. Това е чист клиничен модел, позволяващ точна интерпретация на установените ДД белези между лезиите и прогнозната им стойност без влиянието на фазата на прогресия на тумора с лимфогенна и хематогенна дисеминация, която е свързана с други молекулярно-патологични промени.

Резултати

Това е централната и най-голяма част на дисертацията, в която са описани личните изследвания на авторката, отговарящи на поставената цел и изпълнена с подходящи методики. Резултатите са представени аналитично като меланоцитните лезии са оценени по демографски и топографски показатели, морфологични параметри и ИХХ резултати. Половото разпределение показва преобладаване на бенките в женския пол и равномерно разпределение на атипичните невуси и меланомите в двата пола. Възрастовото разпределение на ММ е статистически обработено и е намерена значима разлика на честотата им над 40 години, така че е доказана положителна корелационна зависимост. При атипичните невуси има разпръскване на информацията, случаите са малко на брой в отделните групи и не са обработени статистически. Топографското разпределение показва, че обичайните невуси са най-чести в главата и шията, следвани от гърба, гърдите и корема, горните крайници и най-рядко на долните крайници.

Атипичните са най-чести на гърба и корема, а ММ доминират в долните крайници, следвани от гърба и гърдите. Установена е различна локализация на бенките и на ММ, силно преобладаващ в долните крайници. Намерените разлики в предпочитаната локализация не са обвързани с особено клинично и прогностично значение. Обаче, те са задължителен етап в проучването на тумори, необходим за общата им клиноморфологична характеристика, насочваща към диагнозата понякога, както и предвид обстоятелството, че при някои немеланомни тумори локализацията силно корелира с прогнозата.

Хистоморфологичната характеристика е високо информативна, добре написана, с точен морфологичен език и съдържа всички елементи, изискуеми за изследване на таргетните лезии: Прегледно са представени видовете бенигнени невуси според разположението им в кожата, съответно интрадермални, съставни и гранични и според клетъчното типизиране в групите А, В и С. Описана е патоморфологията на рядко наблюдавани невуси като този на Spitz и на Reed, 2 конгенитални невуси, 1 син и 1 комбиниран невус. Атипичните невуси са категоризирани според техния топографски вид и изразеност на атипизма като са съпоставени отделните характеристики на лезията, понякога с полуколичествена оценка. Половината от атипичните невуси са гранични, а останалите са съставни, но с атипизъм по-силно проявен в граничната компонента, констатация, насочваща вниманието към невусите с гранична локализация. Поставен е акцент върху неравномерното пигментиране на клетките, понякога видимо и в макроскопската картина, архитектурната асиметрия с образуване на арки от хоризонтално ориентирани меланоцитни гнезда и огнищният атипизъм, вкл. нуклеоларен, както и екстензията на граничната порция извън пределите на дермалната компонента. Всички тези детайли имат определено практическо значение за поставяне на диагнозата. Малигнените меланоми са характеризирани според тяхната локализация в кожата, дебелина по Breslou, начин на растеж за туморите - вертикален или хоризонтално напредващ, атипични белези, вид на клетъчния състав, степен на инвазия по Clark, лимфоцитна инфилтрация, улцерация и митотична активност. Преобладават нодуларните видове / 18 на брой /, 3 са суперфициално напредващи, 1 е малигнен син невус, 1 Шпиц малигнен меланом и 1 детски първичен нодуларен дермален меланом. Пълното описание на особените видове меланоми има приносен характер предвид рядкостта им сред тези тумори.

Освен оценяването на отделните хистологични белези д-р Петкова подчертава ролята на комбинацията от белези за окончателната диагноза на лезията. Този подход, приложен и при ИХХ изследването, показва системност и прецизност в нейния стил при извършване на диагностичния процес.

ИХХ-те изследвания са групирани според предложената от дисертанта оригинална 11 моделна схема, удобна за сравнителен анализ и статистическа обработка на данните. Използвайки този модел дисертантката групира меланоцитните формации според детайлното изследване на ИХХ-те резултати. Определянето на експресията на биомаркерите по идентични показатели, вкл. интензитет и разпространение, дава предпоставки на д-р Петкова да отчита резултатите с педантична точност. Статистическата обработка на данните позволява откриването на убедителни и сигнификантни разлики в полза на диагнозата и ДД на лезиите. Изследванията дават основание за критично обсъждане и за добре аргументирани изводи.

Резултатите са онагледени са с 41 фигури и 30 таблици с отлично изпълнение.

Cyclin D1 разкрива статистически значими разлики в трите групи. Най-честата проява на експресията в невусите е петнистата позитивност и само в един случай реакцията е дифузна, но с ниска интензивност. Най-висока имунопозитивност е намерена в ММ - дифузна или петниста през цялата дебелина на тумора. В диспластичните невуси не може да се установи характерен модел. Поради значително по-високата експресия на Cyclin D1 в ММ в сравнение с бенигнените невуси д-р Петкова приема, че Cyclin D1 е подходящ маркер за разкриване на малигнен потенциал в атипичните невуси и че неговата силна позитивност корелира с диагнозата ММ.

Резултатите от експресията на **p53** разкриват статистически значими разлики в групите - липса или много рядка имунопозитивност в бенигнените и в малка част от атипичните невуси в контраст на ММ, който типично експресира p53. Тези факти се интерпретират като „възможност p53 да се използва като предиктор на малигнен потенциал /показател за малигненост, бел.рец./ при пигментните тумори“.

ИХХ и статистическият анализ на **BCL-2** показва разлики на стойностите в изследваните групи – силно интензивна дифузна реакция е отчетена в 100% при невусите, 66.66% при атипичните невуси и 41.67% от ММ /десети модел на експресия/. Същевременно се открива широка зона на припокриване на експресията на този показател. Резултатите правилно се обобщават, че BCL-2 не корелира с малигнеността и не може да се използва като маркер на малигненост.

S-100 протеин се експресира във всички пигментни лезии, но експресията в невусите е дифузна и високо интензивна в 100%, намалява на 83.33% в атипичните невуси и в случаите с ММ реакцията е вариабилна по интензитет и разпределение в дебелината на тумора. Разликата в интензитета на експресията в трите групи, именно постоянно висока в обичайните невуси, и умерена главно в ММ и някои атипични невуси е типична картина, полезна за диагнозата.

Установена е значителна вариабилност на експресията на **HMB45**. Липсата на градиент в ММ и някои атипични невуси е характерен белег и трябва да се счита като проява на малигненост в ММ или предсказващ фактор на малигненост в атипичните невуси. Авторката подчертава, че липсата на градиент в експресията на HMB45 само в малък процент от атипичните невуси изисква внимателен подход за определяне на биологичния им потенциал, който би трябвало да се базира не на един маркер, а на мултифакторен анализ за избягване на свръхдиагноза на малигненост.

Сравнителният анализ на ПИ чрез използването на **Ki-67** показва, че е най-висок в ММ, най-нисък в невусите и междинен в атипичните невуси със статистически значими процентни разлики. Тъй като изолирани случаи на ММ показват умерена (6-10%), ниска (3-5%) или липса на позитивност на Ki-67, докторантът счита, че „Наличието на ММ с ниска пролиферативна активност не позволява използването на този показател самостоятелно, като предиктор / белег, рец./ на малигненост“.

В проучването наред с високата статистическа значимост за разграничаване на видовете пигментни лезии чрез ИХХ методики, съществуват и случаи с припокриващи се резултати и заличаване на границите между тях. Това мотивира д-р Петкова да проведе статистически анализ за диагностичната /вм. предиктивната, бел.рец./ стойност на комбинацията от Cyclin D1, p53, HMB-45; тези маркери са демонстрирали най-съществени статистически потвърдени разлики в имуноекспресията между групите. Специално за меланозом HMB-45 тя се базира на статистически значимата характеристика - липса на градиент в експресията му в ММ, достигаща до 100% чувствителност за разлика от невуса. **Статистическият анализ на експресията на Cyclin D1, p53 и**

НМВ-45, проведен с няколко методи, показва сигнификантни разлики между ММ и диспластичните невуси, и допринася за максимална точност на диагнозата и ДД.

Обсъждане. В тази глава с логична последователност са съпоставени собствените резултати с литературните данни. Системно и аналитично са интерпретирани клиникобиологичните показатели, рутинните хистоморфологичните данни и резултатите от ИХХ изследвания с оглед тяхното значение за диагнозата и оценката на малигнения потенциал на пигментните лезии. Разглеждането на клиничните показатели от автора е важна предпоставка към правилната диагноза и проява на стремежа към интегративен подход в диагностичния процес. Собствените резултати, съответстващи на литературните насочват към правилния извод за ограниченото им значение в диагнозата и прогнозата на пигментни лезии.

Голямо внимание е отделено на морфологичната характеристика на кожните меланоцитни образувания и особено на параметрите с висока стойност за диагнозата на ММ според актуалните изисквания. Хистопатологичните белези са проучени задълбочено за трите форми на меланоцитните увреждания и сравнени с публикуваните резултати за прогностичната им роля, доказана според преживяемостта на пациентите. Трябва да отбележим, че липсата на здравни досиета на нашите пациенти, поради организационни дефекти в системата на здравеопазването, затруднява българските изследователи, в случая и д-р Петкова, да проведат подобни проучвания върху собствени резултати. Разборът на резултати, съпоставени с публикуваните, завършва с кратко обобщение, показващо значението на отделните параметри за диагнозата. Дисертантката заключава, че дебелината на тумора е независим прогнозен фактор, свързан с преживяемостта, корелиращ с дълбочината на инвазия, митотичната активност и с улцерацията. Ролята на лимфоцитната строма е определена също като позитивен прогнозен фактор – резултатите съответстват на публикациите за корелативна зависимост между плътността на стромата и дебелината на тумора като тя намалява при по-висока степен по Breslou.

Д-р Петкова обосновава необходимостта от допълнителни ИХХ изследвания със затруднената интерпретация и предвидимост за малигнизация на атипичните невуси, направени само въз основа на рутинните методики. Мотивиран е подхода с въвеждане на 11 моделна схема на отчитане на ИХХ експресията по интензитет и топографско разпределение. За разлика от разпространената практика за прилагане на S-100 протеина и НМВ-45 в ДД с тумори - имитатори на ММ, разлики в интензитета на реакциите и разположението на позитивните клетки, каквито виждаме в изследванията на д-р Петкова, не са широко представени в литературата. Авторката подчертава, че за ММ е характерно намаляването на интензитета на ИХХ реакциите за тези маркери в сравнение с невусите. Тя изтъква значението на градиента на експресията на НМВ-45, който е проявен само в бенките, липсва в част от атипичните невуси; пълната му липса с откриване на фокална дълбока реактивност е особеност на ММ, за което има потвърждение и в литературата. Трябва да се подчертае умението на д-р Петкова да анализира малките вариации в имунната реактивност по интензитет и вид на разпределение / петниста, дифузна или хетерогенна/ и да ги изведе с помощта на статистическите методи в правила за диагностиката. Въз основа на тези наблюдения дисертантката утвърждава съществения извод, че използването на НМВ-45 не е само диагностичен маркер, определящ цитогенезата на ММ, но е спомагателен белег за доказване на малигнеността му.

В литературата широко е разгъната ролята на *cyklin D1* като канцерогенен фактор за възникването на ММ, но съобщенията за експресията му в различните пигментни формации не са еднозначни. Само част от авторите намират експресия, която е изолирана в горните части на обичайните бенки. Установените факти в дисертационния труд доказват, че и в бенките има фокално разпределена имунореактивност в цялата дебелина на лезията с умерен интензитет, а не само в горната им част и то в близо в $\frac{3}{4}$ от тях. Относно свръхекспресията на маркера в ММ има единомислие, което се наблюдава и от д-р Петкова, именно, че е обхваната цялата дебелина на ММ, но отново нейното внимание е фокусирано в интензитета на реакцията, която е хетерогенна в някои ММ. При атипичните невуси не е установен характерен модел на интензитет и разпределение на реактивния продукт. Общият извод от изследванията на *cyklin D1* в настоящия труд потвърждават становището, че свръхекспресията му е типична за диспластичните невуси и ММ и корелира с малигнен фенотип на меланоцитните лезии.

Сравнителният анализ на позитивирането на *p53* в трите изследвани процеси показва статистически потвърдени резултати за липсата му в преобладаващия брой невуси, ограничена проява при атипичните и силно доминираща експресия при ММ. Откриването на позитивна реакция в 1.75% от невусите възпират докторантката да приема ролята на *p53* като независим критерий за малигненост. Нейното становище намира потвърждение и в някои литературни данни за по-висока стойност на експресия на *p53* в обичайните невуси, достигащи до 15%.

Данните на дисертанта за експресията на *BCL-2* в изследваните групи показва позитивност, подобна на нормалните меланоцити, съответстват на публикуваните резултати. Авторката отбелязва, че в атипичните невуси има намаление на интензитета и парциална позитивност, белези, които са по-силно проявени в ММ – до 60%. Обосновано е нейното становище, че *BCL-1* не е подходящ диагностичен и прогностичен маркер, потвърдено и от съществуващата практика.

Изследването на *Ki-67* е широко приложимо в туморната патология, но не винаги с валидирана стойност за оценка на малигнеността. Резултатите на д-р Петкова показват статистически значима разлика, близка до публикуваните резултати /средна стойност на ПИ за невусите - 0,9%, за диспластичните невуси - 2,75 %, а за ММ – 14,96%/ . Но, има някои детайли, които се отклоняват от общоприетите. При невусите обикновено се цитира 1-2% ПИ, а д-р Петкова намира в единични случаи до 10%, атипичните достигат до 10%, което ги доближава до диапазона на ММ - от 10 до 20%. Получените резултати с припокриване на ПИ в част от трите групи стеснява, според авторката, значението му като независим прогнозен белег. Всъщност *Ki-67* не се използва като независим фактор дори в малигнени тумори с валидирана стойност, поради голямата вариабилност в експресията му, обяснима с неравномерния цикъл на растеж в малигнените тумори, повлияващ се от много неконтролируеми генетични увреждания. Независимо от тези разсъждения *Ki-67* е полезен и много често използван маркер за определяне на малигнеността на неоплазмите в тяхната комплексна имунофенотипна характеристика и неговото включване в диагностиката на меланоцитните увреждания от дисертанта заслужава положителна оценка.

Трябва да се съобразяваме с факта, че за разлика от маркерите, които са свързани с цитогенезата на тумора и имат висока специфичност, маркерите характеризиращи канцерогенезата и биологично поведение проявяват различна честота и интензитет на експресия, поради хетерогенния клетъчен състав, сложността на молекулярно-генетичните взаимоотношения и

генетичната нестабилност в злокачествените тумори. Затова при тях се предпочита комплексен генетичен анализ, какъвто избор е направила д-р Петкова.

Изводите от дисертационния труд произтичат закономерно от рамката на проучването. Изключение прави първия извод, който има много общ характер и е общовалидно изискване за поставяне на диагнозата на всеки тумор. Подобен е и 4 извод, който потвърждава ролята на S-100 protein и HMB45 като съществени диагностични маркери, доказващи меланоцитната им цитогенеза.

Особено съществен е извод № 2 за значението на комплекса от морфологични критерии на изследваните три пигментни лезии, които са определящи за диагнозата, с особена стойност на критериите за ММ - оценка по Бреслау и Кларк, лимфоцитната инфилтрация, разязвяването и митотичната активност.

Изводът за оценката на ролята на демографските показатели и локализация, макар че е по-слабо изразена в сравнение с морфологичните белези, изразява позитивното отношение на авторката към изискването за интегративна диагноза, отчитаща ролята и на други параметри на туморния растеж, освен морфологичните.

С изключителна важност за практиката са потвърдените особености в експресията на HMB45, засягаща разликата в градиента на разпределението на експресията му при малигнения меланом и в бенигнените невуси. Статистически значимите разлики в експресията на Cyclin D1 го определят като надежден прогностичен и диагностичен маркер за малигнения меланом .

Внимателен подход е проявен към експресията на p53 и на Ki-67. Доказването на p53 в обикновен невус е рядко наблюдаван факт в литературата. Това наблюдение заслужава заострено внимание с практическа полза – повишена експресия на p53 може да се установи и в невуси и не бива да подведе патолога в насока за диагностициране на малигненост. И все пак, бих препоръчала, ако в една пигментна лезия с фенотип на невус отбележим експресия на p53, този факт да се отбележи, да се разширят изследванията и да се следи активно пациента.

Относно извода за значението на ПИ се солидаризирам с мнението на докторанта, че диапазонът на експресия в изследваните меланоцитни лезии варира в широки граници и не може да служи като независим прогностичен индикатор. Действително малко са туморите с валидирана стойност на ПИ или на митотичния индекс, които са решаващи за определяне на малигненост. Но в съпоставка с другите белези на малигненост /респ. бенигненост при меланоцитните образувания ролята на Ki-67 не е за подценяване и съвпада с преобладаващото в литературата становище за нисък процент, около 1-2% при невусите, интермедиерен при атипичните невуси и висок при ММ.

Позитивността на BCL-2 протеина във всички таргетни групи показва, че не е подходящ маркер за предсказване на малигненост. Всъщност BCL-2 не е включен в диагностичния алгоритъм на ММ. Независимо от това изследването е научен факт, потвърждаващ незначителната роля на BCL-2 в диагностиката и прогнозата на меланоцитните формации за разлика от приложението му като предиктор в лечението на ММ.

Статистическият анализ на експресията на Cyclin D1, p53 и HMB-45, проведен с няколко методи, показва сигнификантни разлики между ММ и диспластичните невуси, и допринася за максимална точност на диагнозата и разграничаването им. Изводите за значението на мултифакторния

анализ и въвеждането на 11 моделната схема за отчитане на интензитета на експресията и топографското разпределение на позитивните клетки заслужава висока оценка и е в основата на повечето изводи и приноси в дисертационния труд.

Приноси. Самооценката на автора за приносите на дисертационния труд е коректна, съобразена с действителните обосновани резултати от приложените адекватни на темата методики и с наличната литература по засегнатите проблеми.

Оригинален принос е проучването на експресията на съществени диагностични и прогностични маркери за диагнозата на меланоцитните образувания / Cyclin D1, p53 protein, BCL-2, S-100 protein, HMB45 / с прилагане на 11-моделна схема за пълно оценяване на експресията на всяко антитяло по отношение на интензитета, разпределението и градиента. Проведеният сравнителен анализ, подкрепен със статистическа обработка, позволява отчитането на вариабилността в експресията на отделните маркери да се използва като критерий за малигненост.

Оригинално е доказването на висока прогностична стойност на предложената тройна комбинация от маркери - Cyclin D1, p53 protein, HMB45 като *диагностичен маркер за малигненост при пигментните лезии*.

Приносите с потвърдителен характер са в няколко направления:

- Потвърдени са високите стойности на S-100 протеин и HMB-45 като маркери за меланоцитен произход с експресията им в пигментните тумори от 3-те групи.
- Детайлизирани са промените в интензитета и в разпределението на експресията на S-100 протеина и на HMB-45 в таргетните групи.
- Потвърдителен принос по същество е установената липса на статистически значими разлики в експресията на BCL-2 във всички пигментни лезии, което го прави *неподходящ маркер за диагнозата* /в италиек рец./
- Потвърдена е вариабилността в експресията на Ki-67 в трите групи. Обобщението, че в бенките преобладава ниския ПИ и повишаване на 5% е изключение, а при атипичните невуси и ММ има припокриване на резултатите, следва да се има предвид от патолозите при оценка на малигнеността в пигментните образувания.
- Проведено е хистоморфологично и имунохистохимично проучване на рядко срещани пигментни лезии, което внася нови факти в характеристиката им.

Не на последно място по значение са обобщенията, направени от д-р Петкова за най-съществените рутинни хистологични и ИХХ находки в трите групи, които са водещи критерии за поставяне на правилната диагноза.

Критични бележки и препоръки: „Предикция и предиктивни маркери“ се използват понякога като синоним на прогноза, респ. прогностични маркери и със значение на белег. Предикцията се прилага от дисертантката в широкия смисъл на думата като предвидимост, но в онкологичната терминология нейното значение е като определяща прогнозата, свързана с лечение. Прогнозата и предикцията са термини с различно семантично значение – прогнозата е предвиждане на развитието без прилагане на лекарства, предикцията - предвиждане на ефекта на приложеното лекарство върху еволюцията на тумора. Напр. определението на „циклин D1 като предиктор на малигнен потенциал“ не е правилно, защото по-точно той е диагностичен критерий за

малигнения меланом и рисков /прогнозен/ фактор за трансформация към малигненост при атипичните невуси. С подобен характер е забележката ми относно изследването на BCL-2 и невъзможността му да се използва като „предиктор на малигненост“, всъщност този маркер е добър и полезен предиктор, но не на малигненост. Препоръчвам докторантката да се придържа във всички случаи към установената терминология в онкологичната наука. Направените забележки и препоръки внасят коректност в точността на изложението без да променят по същество показаните и доказани резултати на проучването.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Дисертационният труд на д-р Петкова е задълбочено и съвременно проучване, чието значение се определя от медикосоциалната роля на малигнения меланом - високата му честота и все още висока смъртност - и необходимостта да се определят неговите точни морфологичнодиагностични и прогностични критерии. Проучването е направено според изискванията за дисертационен труд с ясно поставени цел и задачи, избор на подходящи класически и молекулярнопатологични методики на светлинномикроскопско ниво, аналитичен разбор, вкл. със статистическа обработка на резултатите, съпоставени критично с публикуваните изследвания в частта обсъждане. В своята цялост посочените факти водят до извършване на правилни изводи, с научна стойност и практическа приложимост. Оценката на приносите на настоящия труд съответстват в голяма степен на самооценката на автора и произтичат непосредствено от описаните резултати. По своята значимост, правилно структуриране, обосновани изводи и несъмнени приноси в диагнозата, диференциалната диагноза и прогнозата на пигментните лезии с акцент върху малигнения меланом, представеният дисертационен труд заслужава висока оценка и основание да се присъди на нейния автор д-р Петкова научната степен „ Доктор на медицинските науки“. Предвид посочените доказателства, изводи и приноси в дисертацията препоръчвам на членовете на уважаемото научно жури да дадат своя положителен вот при избора на д-р Лиляна Николова Петкова за „Доктор по медицина“.


Рецензент: Доц. Маргарита Каменова