

РЕЦЕНЗИЯ

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

специалност „Патоанатомия и цитопатология“; МЦ „Сити Лаб“ -ЕООД, гр. Варна

ОТНОСНО: Защита на дисертационен труд на д-р **Мартина Георгиева Стоева**, 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: „ИМУНОХИСТОХИМИЧНА ЕКСПРЕСИЯ НА МАРКЕРА ЗА НЕКРОПТОЗА РІРКЗ ПРИ КАРЦИНОМ НА МЛЕЧНА ЖЛЕЗА “

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

С решение от заседание на Факултетния съвет при Факултет „Медицина“ към МУ-Варна по Протокол № 58/14.01.2022 г. и със заповед № Р-109-41/21.01.2022г. на Ректора на МУ-Варна, съм избрана за външен член на Научното жури, а на основание Протокол № 1 /27.01.2022 г., съм определена да изготвя рецензия/ на български и английски език/ по процедура за придобиване на образователна и научна степен „Доктор“с кандидат д-р **Мартина Георгиева Стоева** в Медицински университет -Варна.

Като докторант в редовна форма на обучение в докторска програма „Патологоанатомия и цитопатология“, професионално направление 7.1. Медицина, д-р **Мартина Стоева** е зачислена със заповед № Р-109-39/01.02.2019 год. от Ректора на МУ-Варна., а с доклад за отчисляване, вх. № 102-72/10.01.2022 год. от Ръководителя на Катедрата проф. д-р **Мария Цанева**, и със Заповед на Ректора № Р-109-41/21.01.2022 год., д-р **Стоева** е отчислена с право на защита.

Дисертантката е положила успешно изпити за необходимия докторантски минимум и по чужд език. За конкурса д-р **Стоева** е представила 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 професионално развитие на докторантката

Д-р **Мартина Георгиева Стоева** е родена на 22.02.1988 год. в гр. Благоевград. След завършване на средното си образование в МГ „Д-р Петър Берон“-Варна през 2006 год, е приета за студентка в МУ –Варна, където през 2012 год. придобива образователно-квалификационната степен **„магистър“** по специалността „Медицина“, с професионална квалификация **„лекар“**/диплома за висше образование серия МУВ, у.и.№ 001461, рег.№ 001897/1012 год/. От 01.05.2013 год. до 01.05.2017 год. д-р **Стоева** е зачислена като специализантка в Клиниката по обща и клинична патология, а от 13.02.2015 год. до 01.10.2017 год.е хонорувана асистентка в Катедрата по „Обща и клинична патология, съдебна медицина и деонтология“ при МУ-. Варна.

През м. октомври.2017 год. след конкурс д-р Стоева е назначена за редовен асистент към същата катедра при МУ- Варна. От 03.05.2017 год. без прекъсване, до настоящия момент д-р Стоева работи като лекар-асистент към Клиниката по патология при УМБАЛ „Св. Марина“- Варна. След успешно положен държавен изпит през м. декември 2017 год., тя придобива специалност по „Обща и клинична патология“/свидетелство № 021479/20.02.2018 г. Серия МУВ № 3942/.

Д-р Стоева има над 5 години трудов стаж като преподавател по специалността „Обща и клинична патология“, участва активно в учебната дейност на Катедрата с провеждане на български и на английски език на практически занятия, лекции и изпити на студенти по медицина, дентална медицина, фармация и медицински лаборанти. Д-р Стоева е включена активно в организацията на курсове за специализанти по Обща и клинична патология и СИД на студенти по медицина. Като лекар-асистент в Клиниката по обща и клинична патология при УМБАЛ „Св. Марина“-Варна д-р Стоева участва пълноценно в диагностичната биопсична и аутопсионна дейност, с прилагане в ежедневната си работа не само на рутинни, но и на много от високоспециализираните, най-вече имунохистохимични методи на изследване.

Д-р Стоева има участия в 13 публикации, вкл. в 3 списания с IF. С научни доклади, постери и презентации е участвала на 5 научни конференции и конгреси с международно участие у нас. Включена е била в разработките на 3 изследователски проекта по фонд „Наука“ към МУ- Варна. Д-р Стоева владее на много добро ниво писмено и говоримо английски език / C1/. Има отлична компютърна грамотност-и работи добре с инструментите на Microsoft Office /Word, Excel and Power Point/.. Професионалните ѝ и научни интереси са разностранни, с предпочитания към онкопатологията и молекулярната патология. Д-р Стоева е член на БЛС и БДП.

Актуалност и значимост на темата

Дисертационният труд на д-р Стоева, посветен на карцинома на млечната жлеза, е резултат от задълбочени и системни морфологични проучвания и изследвания на актуален, с все по-нарастващо социално значение проблем, създаващ терапевтични затруднения, изискващи стриктно клинично-морфологично разпознаване с оглед поставяне на диагноза и провеждане на лечение. Известно е, че карциномът на гърдата /КГ /е най-често срещаният злокачествен тумор в световен мащаб / 11,7% от общия брой нови случаи/. По данни на Globocan, през 2020 год, са диагностицирани приблизително 2,3 млн. нови случаи, а загубилите живота си са били 685 000 души. Като водеща причина за смърт от злокачествени тумори при жени и мъже в света КГ се нарежда на 5 място. Прогнозни данни на Международната асоциация за анализ на злокачествените заболявания сочат, че до 2040 год. заболяемостта от КГ ще надхвърли 3 млн нови случаи годишно, а смъртните случаи ще бъдат над 1 млн. Въпреки постигнатите успехи в изясняване на някои прояви на КГ, все още съществуват недостатъчно проучени въпроси и редица трудности, породени от голямата хетерогенност и комбинация от морфологични находки при този тумор. И тук, на преден план, като основно предизвикателство пред плеадата от специалисти в областта на медицинската онкология, в световен мащаб се очертава насоченото търсене на нови механизми и молекули, които, притежавайки способността да модулират взаимодействията между тумора и елементите на туморната микросреда, да могат да съхранят, или да причинят смъртта на туморните клетки. Понастоящем основната цел на прилаганите различни терапевтични методи е унищожаването на туморните клетки чрез индуциране на апоптоза. Известно е обаче, че понякога в хода на лечението настъпват промени в сигналните пътища, които водят до резистентност към терапията и развитие на неблагоприятни странични ефекти. В тези случаи предизвикването на неапоптотична клетъчна смърт, към която се

причислява некроптозата, би могло да осигури алтернативни пътища за елиминиране на устойчивите туморни клетки. По този начин евентуалното медикаментозно или друго стимулиране на некроптозата, предизвикващо или манипулиращо некроптотичния път, се очертава като нов подход за преодоляване устойчивостта на туморните клетки към апоптоза. Маркерът за некроптоза RIPK3, който е локализиран предимно в цитоплазмата на нормални и туморни клетки, има способността за придвижване в ядрото, като провежда сигнали за апоптоза, некроптоза, и за активиране на транскрипционни фактори. В литературата има само единични съобщения за връзката на RIPK3-експресията с клинично-морфологичните характеристики, и за ролята му в развитието, прогнозата и лечението на КГ. Изследвания в тази насока, давайки възможност за нова терапевтична стратегия при лечението на карцинома, могат да имат изключително голяма стойност с научно-практическо приложение в областта на онкопатологията. Именно в контекста на изложеното дотук, д-р Стоева е ориентирала своите интереси към научно дирене, свързано с изследване експресията на маркера за некроптоза RIPK3, с оглед оценка на ролята и значението му за биологичното поведение и развитието на мамарния карцином. Използваният достатъчен по обем материал, умело подобрите морфологични характеристики и прилагането на адекватни ИХХ-методики, са дали възможност на д-р Стоева за определяне на критерии и извеждане на изводи, отнасящи се до биологичното поведение на карцинома и прогнозиране вероятността от прогресия в развитието му.

Структура и анализ на дисертационния труд. Дисертационният труд на д-р Стоева е правилно структуриран, написан с много добър, издържан научен стил и терминология. Трудът обхваща 133 стандартни страници и е онагледен с 42 фигури и 50 таблици. Разпределението по раздели е както следва: титулна страница, съдържание и използвани съкращения -5 стр.; въведение 2 стр; литературен обзор 42 стр.; цел и задачи 1 стр.; материал и методи 8 стр.; резултати и обсъждане-55 стр.; изводи 1 стр., приноси 1 стр.; списък с публикации и участия в научни форуми-1стр.; книгопис 17 стр., включващ общо 205 заглавия, от които 4 на кирилица и 201 на латиница. От тях 61% са публикувани през последните 10 години. Към дисертационния труд са приложени 2 публикации в пълен текст, публикувани в наши списания, и свързани с темата на дисертационния труд, и едно участие в сесията на IMAV 2021 г. с научно съобщение, също свързано с темата на дисертацията.

Оценка на литературния обзор

Литературният обзор е структуриран в раздели, отнасящи се до: 1. Епидемиология на карцинома на млечната жлеза; 2.Етиология и рискови фактори за развитието на карцинома; 3. Класификация на карцинома на млечната жлеза; 4. Стадиране на карцинома; 5. Прогностични и предиктивни фактори; 6. Лечение на карцинома; 7.Видове клетъчна смърт, 8. Заключение.

От обзора на литературата проличава много добрата осведоменост на д-р Стоева по отношение отразените в световната наука постижения, касаещи карцинома на млечната жлеза. Това ѝ дава възможност за правилна оценка на въпроси, отнасящи се до класификационни проблеми, диагностиката, морфологията, ИХХ- и молекулярно-генетичния профил на КГ. Представените данни в обзора изтъкват умението на авторката да анализира литературните източници, като същевременно изказва собствено мнение по съществуващите в някои пунктове спорни въпроси. Заслужено внимание д-р Стоева отделя на епидемиологията на КГ, като поставя акцент върху непрекъсващата тенденция за нарастване както на диагностицираните нови случаи, така и на броят на жените, загубили живота си в битката с болестта. Обстойно в обзора

са представени етиологичните и рискови фактори, благоприятстващи развитието на карцинома, разделени от авторката в 4 групи, отнасящи се до: 1. Фамилна обремененост и индивидуални особености; 2. Репродуктивни фактори, включващи бременност, кърмене, приложение на постменопаузални хормони 3. Хранене, затлъстяване и физическа активност и 4. Въздействие на фактори от околната среда. Разглеждайки класификациите на КГ, д-р Стоева насочва вниманието към молекулярната класификация, включваща 4-те основни субтипа: Луминал А, Луминал В, HER2 позитивен и базалоиден субтип. Характеристиките на всеки един от субтиповете са описани и представени в таблица с подробна интерпретация. Д-р Стоева разглежда подробно тройно негативните карциноми на гърдата, които от молекулярна гледна точка отчасти се припокриват с базалоидния субтип, без обаче двата термина да са синоними. Авторката посочва, че не всички базалоидни карциноми имат тройно негативен фенотип, и не всички тройно негативни тумори са молекулярно базалоидни. Дисертантката изтъква, че въпреки направените усилия, все още няма установен или клинично изпитан диагностичен подход при класификацията на тези агресивно протичащи карциноми.

С най-голямо практическо значение за рутинната практика е новата хистопатологичната класификация на СЗО, публикувана в края на 2019 год. Следвайки подхода на предишните класификации и спазвайки последователността за преход от доброкачествени до инвазивни карциноми, д-р Стоева умело и прецизно представя, със съответна обосновка за включването им, новите единици във всяка една от отделните категории на епителните неоплазми на гърдата и хистопатологичните им представители, като същевременно прави паралел между категориите в класификацията от 2012 год. и тази от 2019 година.

В обзора са разгледани обстойно принципите за стадиране на КГ, извършвано на базата на 8-мата ревизия на AJCC от 2018 год., с включените в нея две системи на стадиране-анатомичен и прогностичен стадий. Подробно е описано патологичното стадиране на КГ на базата на използваната pTNM класификация. В таблици са представени отделните категории за преценка на T-стадия, категориите за pN и pM1 стадия, като д-р Стоева поставя акцент върху факта, че не съществуват категории pM0 и pMx. Детайлно са отразени стандартните клинично-патологични прогностични фактори: възраст на пациента, стадий, степен на диференциация, хистологичен вариант, състояние на резекционните линии и лимфоваскуларно ангажиране. Към стандартни прогностични/предиктивни маркери са разгледани хормоналните рецептори и HER2 статуса, и е посочена важната роля на HER2-експресия за тактиката на провежданата терапия. Като допълнителен маркер с най-голяма диагностична и предиктивно/прогностична стойност е посочена експресията на Ki67, като дисертантката отбелязва липсата на пълно разбиране относно избора на терапия при отчетена ниска или висока експресия на Ki67. Не на последно място д-р Стоева отделя внимание на прилаганите методи на лечение, включващи хирургия, неoadювантна и адювантна терапия, ендокринна терапия, химиотерапия, HER2-таргетна терапия и лъчетерапия. Обосновано се отбелязва, че лечението при КГ изисква мултидисциплинарен подход, с участието на -хирурзи, онколози, патолози и лъчетерапевти.

Особено внимание заслужава частта от обзора, посветена на формите на клетъчната смърт. Д-р Стоева представя опростена класификация на различните видове клетъчна смърт, разделени на две групи в зависимост от инициращия ги фактор, а именно: програмирана клетъчна смърт / апоптотична и неапоптотична/ и непрограмирана клетъчна смърт, включваща разнообразни видове, вкл. некроптоза. Тя е сравнително нова форма, стимулирана чрез класическите рецептори на клетъчната смърт, идентични с тези на външния път на апоптозата, и медирана от фамилията на рецептор-взаимодействащите протеин-кинази RIPK1 и RIPK3.

Съществуват доказателства за това, че некроптозата участва както в регулацията на различни физиологични процеси, така и при нарушения, възникнали в регулацията на сигнални пътища, лежащи в основата на някои вирусни и бактериални инфекции, невродегенеративни и най-вече злокачествени заболявания при човека. Некроптозата е сложен процес, като разгадавайки и опознавайки механизмите на нейното развитие, се е стигнало до заключението, че съществува възможност тя да бъде инхибирана от химични съединения, а това от своя страна би помогнало при разработването на противотуморни лекарствени препарати. Тъй като апоптозата и некроптозата се задействат от различни молекулярни механизми, активирането на некроптотични процеси може да се използва като алтернативен път за разрушаване на апоптозо-резистентните клетки. Все още обаче не е напълно изяснен въпросът за това, как некроптозата се контролира от онкогенните сигнали в неопластичните клетки. Съществуват наблюдения, даващи основание да се предполага, че в хода на туморната прогресия се селектират неопластични клетки, притежаващи антинекроптотични механизми, което им осигурява оцеляване, но и дава възможност за манипулиране на некроптозата с цел инхибиране на туморния растеж. Резултати от проведени в последните години проучвания показват, че некроптозата подпомага естествения или терапевтично индуциран противотуморен имунитет.

Представеният литературен обзор е доказателство за умението на д-р Стоева не само да излага отразената в научната литература информация, отнасяща се за определена проблемна област, но и да интерпретира, дискутира и съпоставя резултатите от различните научни проучвания. В заключението към обзора дисертантката основателно акцентира върху налагащата се необходимост от провеждане в бъдеще на допълнителни задълбочени проучвания с цел по-обстойното изясняване на взаимодействията, развиващи се между маркери за некроптоза и някои клинично-морфологични параметри при развитието, туморната прогресия и лечението на пациенти с карцином на гърдата.

Цел и задачи. Целта на дисертационния труд е „Да се проучи експресията на некроптотичния маркер RIPK3 във връзка с клинично-морфологичните показатели, рецепторния статус, пролиферативния маркер Ki67 и преживяемостта на пациентите без прогресия при карцином на млечната жлеза“. Тя е точно и ясно формулирана, конкретна и адекватна на дисертационната тема. Произтичащите от поставената цел 6 задачи са правилно конструирани и изпълними и представляват логично продължение на литературния обзор.

Материал и методи на изследване

База за реализация на дисертационния труд са Катедрата по „Обща и клинична патология, съдебна медицина и деонтология“ при МУ-Варна, Клиниката по Обща и клинична патология и Клиниката по медицинска онкология-УМБАЛ „Св.Марина“-Варна. В настоящото изследване са включени биопсичните материали на общо 98 пациента- 79 с диагноза КГ и контролна група от 19 пациента без карцином, от които 10 случая с непролиферативен, и 9 случая с пролиферативен тип на фибро-кистична болест на гърдата/ФКБ/.Прицелната група включва 16 случая с лобуларен, и 63 случая с дуктален карцином. Диагнозата и стадият на 71 от случаите са определени според 5-то издание на СЗО от 2019 год. за туморите на млечната жлеза. При пациентите е извършена мастектомия с регионална лимфна дисекция. Диагнозата на останалите 8 случая с КГ е поставена на „tru-cut“ биопсия с достатъчно туморна тъкан, а стадият е определен чрез образно изследване. При 58 от случаите е проведена последваща хормоно, лъче-и/или

химиотерапия в УМБАЛ „Св. Марина“, и е определена преживяемостта без заболяване /Disease free survival/. При всички пациенти е отчитана цитоплазмената и ядрена експресия на RIPK3.

В разработката д-р Стоева е подбрала и включила голям набор от адекватни за целите на изследването методи, а именно: **1.Рутинни хистологични изследвания:** От всеки случай с КГ са вземани за хистологично изследване по 4-5 материала от тумора и от кожа и мамила, когато са били налични; проучени са изпратените към всеки случай лимфни възли; материалите са фиксирани в 10% неутрален буфериран формалин и обработени по стандартния парафинов метод. Срези с дебелина 5 микрона са оцветявани с ХЕ за оценка на хистологичните промени в тумора и за наличието на метастази в изпратените лимфни възли. При всички тумори са определяни хистологичният тип, степен на диференциация, стадий на заболяването по TNM; и е извършвана оценка на имунохистохимичния статус според експресията на ER, PR, HER2 и Ki67.

2.Специфични ИХХ- методи на изследване. Върху предварително изработени препарати, след поставяне на диагнозата на всеки тумор, за определяне на молекулярния му профил са оценени нивата на експресия на маркерите ER, PR, HER2 и Ki67. Всички препарати са повторно прегледани и класифицирани спрямо критериите процент на клетките, експресиращи маркера /площ на експресия PS/, интензивност на експресията / IS/ за ER и PR и крайна оценка-TS = сбор от PS+IS. HER2-експресията е определяна в зависимост от степента на ангажираност на туморната клетъчна мембрана в стойности от 0-негативна реакция, до 3+- силно позитивна реакция, когато експресията е по цялата клетъчна мембрана в > от 10% от туморните клетки. Маркерът Ki67 е оценяван на база процент туморни клетки с ядрена експресия, като за граница между ниска и висока експресия е приета стойността 14%. Видът на използваните реагенти е посочен в табл.7. При извършване на ИХХ-изследванията, необходими за целите на дисертацията, е използван индиректен имунопероксидазен метод за ИХХ- анализ с помощта на mini KIT high Ph DAKO K8024, чрез който е оценена експресията на антиялото Anti-RIPK3, произведено от фирма ABCAM RabMab technology. В процеса на провеждане на ИХХ- реакциите са спазени всички елементи на методиката, вкл. технологична дисциплина, описание локализация на експресията, позитивни и негативни контроли и др., като критериите за позитивност са точно формулирани при отчитане на резултатите. Подробно са описани стъпките в подготовката на биопсичните материали за ИХХ- изследване, ИХХ- протокол, произход на използваните антитела, и визуализиращата система. ИХХ-експресията на RIPK3 е оценявана с помощта на H-score върху тъканни проби, като полуколичествено, в интервал от 0 до 300 са определяни интензивността на цитоплазмената експресия за всяка клетка от туморната и нетуморна тъкан, и процентът на позитивните клетки за всеки отделен интензитет по приложена схема. Накрая H-скорът е изчисляван по съответна формула. H-скорът е използван и за оценка на ядрената експресия на RIPK3 , при изчисляване на резултата по същата формула. Получените данни са обработени и анализирани с помощта на софтуер SPSS ver.23, като е използван изключително **богат набор от съвременни статистически методи за анализ на данните.** Резултатите, отчитани като статистически значими при $p < 0,05$ са представени в обобщен вид в таблици и са илюстрирани с подходящи графики.

Резултати и обсъждане

Получените от д-р Стоева резултати от проведеното изследване са представени паралелно с обсъждането, като е спазена последователността на поставените задачи. Анализът на резултатите е осъществен на много добро методично ниво, а обсъждането е изчерпателно, като собствените данни са съпоставяни умело с данните от достъпната литература. Това е първото по рода си научно изследване, посветено на карцинома на млечната жлеза, с осъществена

комплексна клиничко-морфологична и ИХХ- характеристика на тумора, при използване на голям обем от показатели и статистически методи.

Включените в проучването биопсични материали от 79 пациентки с диагноза карцином на гърдата, оперирани в УМБАЛ „Св.Марина“-Варна за период от 8 години /2010-2018 г/ са разделени на две групи- < 65 г./52 случая/ и >65 г. /27 случая/. От получените резултати се вижда, че средната възраст на жените е 59,38 г., с min възраст 27 г., и max- 82 години. Хистологичният тип на тумора при 69 от пациентите е определен като дуктален карцином NOS, а при 16 пациентки-като лобуларен карцином. От изследваните 79 случая с карцином в стадий Т2 са били 42 от случаите, в стадий Т1 – 33 пациента, в стадий Т4- три случая и един -в Т3 стадий. В унисон с данните от литературата е установеният най-голям брой /33 / на пациентите с умерена степен на клетъчна диференциация, следвани от ниско диференциран карцином при 29 случая и високодиференциран карцином-в 17 случая. Според степента им на разпространение, резултатите, получени в изследването на д-р Стоева не се различават от тези, посочени в литературата: най- много пациенти -31 са с тумор, локализиран в гърдата, втората група от 30 пациента е с -метастази в регионални лимфни възли, а третата група включваа 16 пациентки е с развили се далечни метастази.

Анализирайки резултатите от стойностите, получени при проследяване на рецепторния статус и пролиферативния индекс Ki67 в туморната тъкан при карцинома на гърдата, д-р Стоева установява, че най-голям е броят на ER-+/тумори- 32 случая, от които 30 са и PR-+/позитивни; HER2-+/ тумори са 26, а тройно негативни- са 21 случая. При разпределението на пациентките в зависимост от ядрената експресия на Ki67, в 26 от тях маркерът се е позитивирал в < 14%, а при 53 от случаите Ki67 се е експресирал в > 14% от туморните ядра.

Сред изследваните 79 пациента с карцином на гърдата, данни за преживяемост е имало при 58 от тях. На всички пациенти е била проведена адювантна хормоно, лъче и/или химиотерапия. Проследената средна преживяемост без прогресия в представената извадка от 58 пациента показва, че тя е в рамките на 113,8 месеца.

Най-съществената част от дисертационния труд е осъщественото ИХХ- изследване на RIPK3—маркер за некроптозата, като при всичките 79 пациента е проследена цитоплазмената му и ядрена експресия. Средната стойност на цитоплазмена експресия, определена чрез H-score е 119,6 с минимална стойност 5 и максимална-230; средната стойност на ядрена експресия е 189,4- минимална 5, максимална-285. Не се установяват съществени различия от средните стойности на цитоплазмената експресия при сравнение с немамарен /в случая- колоректален/ карцином, докато при ядрената експресия стойностите са значително по-ниски. Д-р Стоева отбелязва, че съществуват разнопосочност и до известна степен противоречия в данните от литературата по този въпрос. При проследяване на нормалното разпределение на ядрената и цитоплазмена експресия тя установява, че получените стойности показват сигнификантна разлика-в разпределението на случаите, което означава, че интензивността на реакцията за RIPK3 в цитоплазмата и ядрото на туморните клетки при отделните случаи не следват нормалното разпределение. При 19-те контроли, и при двата типа на ФКБ е установена цитоплазмена и ядрена експресия, без съществена разлика при цитоплазмената експресия в групите. Що се касае до ядрената експресия, то при ФКБ тя е по-ниска в тъканите на гърдата при сравнение с ядрената експресия в нетуморната тъкан на колоректален карцином. Получените резултати дават основание на дисертантката да направи заключението, че е много вероятно

ядрената и цитоплазмена експресия при ФКБ и нетуморна тъкан от други органи да бъдат тъканно обусловени.

Сравнителен анализ между средните стойности на цитоплазмена и ядрена експресия на RIPK3 в туморната и контролна тъкан показва, че и при двата вида експресия има статистически значима разлика, като Н-скорът показва по-висока цитоплазмената експресия на RIPK3 в тъканите при ФКБ при сравнение с тази от туморната тъкан. При проследяване на ядрената експресия обаче данните са противоположни - в туморната тъкан експресията е по-висока, отколкото тази при ФКБ. Във връзка с отбелязаната разнопосочност на получените резултати в данните от различни литературни източници, д-р Стоева изказва предположение, че е възможно в хода на прогресията на туморите да са придобили механизми, чрез които могат да избегнат некроптозата посредством снижена експресия на ключови компоненти от сигналния път.

Сравнителният анализ на цитоплазмената експресия на RIPK3 в туморната тъкан от КГ в зависимост от клинично-морфологичните характеристики на тумора не показва зависимост от възрастта на пациентите, Т-стадия, степента на разпространение на тумора / метастази/, HER2-статуса на тумора, и не е асоциирана с преживяемостта на пациентите.

Сравнителният анализ на цитоплазмена експресия на RIPK3 установява наличие на известна тенденция за зависимост между нивата на експресията и хистологичния вид на тумора, но без статистически значима разлика. Допълнително проведените тестове на **Mann-Whitney** показва обаче статистически значима разлика в цитоплазмената експресия на RIPK3, като при 16-те лобуларни карциноми тя е 147,52- т.е., значително по-висока в сравнение с тази на 63-пациента с дуктален карцином, при които стойността е 112,6.

Проведеният сравнителен анализ на цитоплазмената експресия в зависимост от степента на диференциация е категоричен, че високодиференцираните тумори имат по-високи средни стойности на експресия в сравнение с тумори с по-ниска степен на диференциация /съотв.146,2 спрямо 98,3/. Резултатите, получени от д-р Стоева са в синхрон с тези на автори от литературата, обединяващи се около мнението, че ниската цитоплазмена експресия на RIPK3 се среща при тумори с ниска степен на диференциация, при асоцииране на експресията с ядрен атипизъм.

Сравнителният анализ на цитоплазмената експресия на RIPK3 в зависимост от ER-експресията показва, че има слаба, към умерено изразена позитивна, и слаба сигнификантна зависимост между тях. Що се касае обаче до цитоплазмената експресия на маркера и IS на ER, се вижда, че при повишена експресия на RIPK3 в ядрата е повишена цитоплазмената експресия. От анализа между показателите цитоплазмена експресия на RIPK3 и TS на ER проличава съответствието между по-високия TS на ER в туморните клетки, и по-интензивна цитоплазмена експресия на RIPK3.

При сравнителен анализ на цитоплазмената експресия на RIPK3 в зависимост от площта на експресия на PR се установява силно +/- зависимост, със сигнификантна значимост между показателите. Подобни резултати са получени при сравнение между IS на PR и цитоплазмената експресия-RIPK3, отново със сигнификантна зависимост между двата показателя. Повишената експресия на PR в туморните ядра се съпровожда от по-интензивна цитоплазмена експресия на RIPK3. Силно позитивна зависимост има и между цитоплазмената експресия на RIPK3 и Total score на PR.

Сравнителният анализ на цитоплазмена експресия на RIPK3 при тройно негативни карциноми спрямо всички останали карциноми показва, че средната стойност на цитоплазмена експресия на RIPK3 при всичките 21 случая на тройно негативни КГ е 80,5, и е значително по-ниска в сравнение със стойностите на останалите 58 пациента, чиито тумори са ER+, или HER2+, при които стойностите са 133,8, със статистически значима разлика на стойностите на RIPK3 между двете групи тумори. Преобладава мнението, че при тройно / -- / карциноми ниската цитоплазмената експресия на RIPK3 се среща значително по-често от високата експресия.

Статистически значима зависимост се установява при сравнителния анализ на цитоплазмената експресия на RIPK3 в зависимост от експресията на маркера Ki67 - при ниска експресия на Ki67 е висока цитоплазмената експресия на RIPK3.

Сравнителният анализ на ядрената експресия на RIPK3 в зависимост от клинично-морфологичните характеристики, молекулярния профил, Ki67 и преживяемостта на пациентите не показва зависимост от възрастта на болните, хистологичния тип на КГ, Т-стадия и степента на туморна диференциация. Липсва сигнификантна зависимост между ядрената експресия на RIPK3, и площта, интензивността и общия скор на ER и PR, HER2-статуса, маркера Ki67 и тройно негативните тумори спрямо всички останали карциноми. Анализът на ядрената експресия спрямо N и M-стадия-обаче показва, че съществува сигнификантна зависимост между нея и наличието на метастази в регионалните лимфни възли. Отбелязвайки, че в литературата липсват данни относно зависимостта м/у ядрената експресия на RIPK3 и степента на разпространение на карцинома, д-р Стоева изказва предположението, че високата ядрена експресия може да се възприеме като начин за избягване на туморните клетки от некроптозата чрез задържане на RIPK3 в ядрото на клетката. Въпреки все още неизяснените механизми, участващи в този процес, базирайки се на собствените резултати и на литературни данни, д-р Стоева стига до заключение, че ниската цитоплазмена и високата ядрена експресия повишават риска от поява на метастази в регионалните лимфни възли.

При извършения за първи път **сравнителния анализ на преживяемостта без заболяване спрямо ядрената експресия на RIPK3** се установява, че при 31 случая ядрената експресия на RIPK3 е ниска, а при 27- висока, като средната преживяемост е 126,0 мес. при ниска ядрена експресия, и 99,9 мес. при случаите с висока експресия. Разликата в преживяемостта без прогресия при пациенти с ниска и висока ядрена експресия е статистически значима. При висока ядрена експресия на RIPK3 в туморните клетки преживяемостта е по-ниска от тази на пациенти с ниски експресионни нива. Основавайки се на данни от литературата за възможността на RIPK3 да преминава от ядрото в цитоплазмата на клетките и обратно, д-р Стоева предполага, че вариант е, чрез задържане на некроптоличния протеин в ядрата на туморните клетки да се избегне формирането на некрозома в цитоплазмата и да не настъпи клетъчна смърт, а това би о би станало причина за дълготрайно оцеляване на туморните клетки.

Изводи: От поведеното изследване са оформени 12 извода, които отговарят на поставените цел и задачи, формулирани са добре и са логичен завършек от получените резултати.

Приноси: Д-р Стоева е формулирала 5 приноса, разпределени в две групи, съответно два научни приноса с оригинален характер, и 3 научни приноса с практическо--приложен характер:

Авторефератът е изготвен в съответствие с приетите научни изисквания. Отпечатан е на 76 страници, включващи всички части на дисертационния труд, таблици и фигури. Съдържанието

му дава достатъчно пълна представа за цялостния дисертационен труд, като отразява постигнатите резултати, направените изводи и приноси. Публикационната активност на д-р Стоева- по отн. брой на публикациите, съдържание и стойност отговарят на изискванията за представяне на резултатите от научните изследвания.

Заклучение:

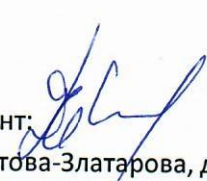
Дисертационният труд на д-р Стоева представлява завършено, много добре структурирано, и с оригинални научни резултати морфологично проучване, имащо определено приносен характер за разрешаване на все още недостатъчно проучени клинично-морфологични проблеми и възможности за определяне на някои предиктивни и прогностични маркери, свързани с диагностиката и лечението на пациенти с карцином на гърдата. Трудът, в който дисертантката се откроява с много добра литературна осведоменост и стил при интерпретацията на резултатите, е изцяло нейно лично дело. Стойността на разработката се повишава от факта, че за първи път у нас е извършен анализ на преживяемостта без заболяване при пациенти с карцином на гърдата спрямо ядрената експресия на маркера за некроптоза RIPK3, и е осъществено комплексно изследване, с определяне прогностичната му стойност. С впечатляваща прецизност са обработени статистически и са представени данните от получените резултати, отнасящи се до сравнителния анализ между цитоплазмената и ядрена експресия на RIPK3 в зависимост от клинично-морфологичните характеристики, молекулярния профил и преживяемостта на пациентите. Целта на разработката и произтичащите от нея задачи са постигнати. Резултатите са онагледени с таблици, графики и цветни фигури с изключително добро качество. Изводите са ясно формулирани, а приносите имат научно-практическа стойност и представляват база за изпълнение на бъдещи изследователски- проучвания.

Получените резултати и приносите в дисертационния труд на д-р Стоева отговарят на всички изисквания на ЗРАСРБ, Правилника за неговото прилагане и Правилника на МУ-Варна. Дисертационният труд показва, че д-р Стоева не само притежава необходимите теоретични знания и умения по научната специалност „Патологична анатомия“, но и демонстрира качества за самостоятелно провеждане на научно изследване.

Предвид гореизложеното, давам своята **положителна оценка** на предложения дисертационен труд, и ще гласувам „**ЗА**“ /положително/ присъждането на ОНС „**Доктор**“ на д-р **Мартина Георгиева Стоева** по научната специалност „Патоанатомия и цитопатология.“

21. 02.2022г.
Варна

Рецензент:


/доц. д-р Екатерина Боянова Софтова-Златарова, дм/