

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 по процедура за присъждане на образователна и научна степен „ДОКТОР“ в област на висше образование 7. Здравеопазване и спорт, професионално направление 7.1. Медицина, по научната специалност „Патологоанатомия и цитопатология“, шифър 03.01.03

НА ТЕМА: „МОЛЕКУЛЯРНИ БИОМАРКЕРИ ПРИ ТРОЙНО НЕГАТИВЕН КАРЦИНОМ НА ГЪРДАТА“

на д-р Василена Росенова Цветкова, докторант на самостоятелна подготовка към Катедра по „Обща и клинична патология, съдебна медицина и деонтология“,

Факултет „Медицина“ при Медицински Университет- гр. Варна

С решение от заседание на ФС на Факултет „Медицина“ при МУ-Варна по протокол № 20/16.03.2020 г. и със заповед № Р-109-136/30.03.2020г. на Ректора на МУ-Варна, съм избрана за външен член на Научното жури, а на основание Протокол № 1 /02.04.2020 г., съм определена за официален рецензент по процедура за придобиване на образователна и научна степен „Доктор“ с кандидат д-р Василена Росенова Цветкова в МУ-Варна.

За конкурса кандидатката 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, а именно: дисертационен труд, автореферат, биографични и професионални данни, административни документи, както и копия от публикации по темата на дисертацията.

Кратки биографични данни и професионално развитие на докторантката

Д-р Василена Росенова Цветкова е родена на 12.09.1989 год. в гр. Разград. Завършва средното си образование през 2008 год. във Втора английска езикова гимназия „Томас Джеферсън“ –гр. София, с профилирана подготовка по английски и испански език, химия и биология. През 2005-2007 година се обучава по специалността „Мениджър в туризма“ към Националното училище по туризъм „Евро сорс, София, България“. През 2008 година е приета за студентка в МУ „Проф. д-р Параскев Стоянов“-Варна, където през 2014 год. придобива образователно-квалификационна степен „магистър“ по специалността „Медицина“. В периода януари-юни 2014 година провежда мобилна практика по програма „Еразъм“ в Медицински Университет Бари /Universita degli studi di Bari /, Италия, по специалностите обща и оперативна хирургия, педиатрия, акушерство и гинекология и обща и клинична патология. След завършване на университетското си обучение, д-р Цветкова поема по труден, но разнообразен път, започващ от Първа детска консултативна клиника- София, където работи като общопрактикуващ лекар от м. януари до м. август 2015 год. От м. XI 2015 до м. XI 2016 год. е стажант-изследовател в Университетската болница Падуа, Италия, в отделение по обща и клинична патология. За периода м. XI. 2016 до XI 2019 год. е Изследовател в Университетската

болница в Падуа, в отделението по обща и клинична патология, а от м. XI 2019 год. е Специализант по обща и клинична патология в Университетската болница във Верона, Италия, в Отделение по обща и клинична патология. Със заповед № Р-109-376 от 31.10.2017 год. на Ректора на МУ-Варна, проф. Красимир Иванов, дмн, и решение на ФС при Факултет по медицина, д-р Цветкова е зачислена като Докторант за самостоятелна форма на обучение за придобиване на образователна и научна степен „Доктор“ към „Катедра по Обща и клинична патология, съдебна медицина и деонтология“ в МУ- Варна.

Д-р Цветкова притежава сертификати за успешно преминал стаж по клинична патология през 2013 год. в Медицински център-Чикаго / САЩ год/, в МУ- Бари /Италия / през 2014 год. и в МУ-Падуа през 2015 год, и два сертификата от прояви в България, за успешно преминал стаж по морска медицина-2013 год в МУ-Варна, и от Втора национална академия по спешна помощ в СУ-„Св.Климент Охридски“,2012 год. в София. Д-р Цветкова притежава сертификати за участия в 7 международни и национални конференции и семинари, два от които са в Италия / Болоня 2017 год., на тема „Патология на млечната жлеза“ и през същата година в Падуа по проблемите на чернодробната трансплантация /, и 5 проведени в България през периода 2009-2012 год. Има 13 участия с презентации и постери / 11 представени в чужбина, съотв. в Италия и Швейцария, и две участия на симпозиуми и конференции в България, през 2011 и 2012 година/. Д-р Цветкова има три публикации по темата на дисертацията- едната е отпечатана в чуждестранно списание, и две- в България. За свои научни участия дисертантката има отличия и награди, съотв. II-ра награда на I-ви национален конкурс на тема „Генетично модифицирани организми“,2005 год, София, и Европейска награда за презентация „Промени в секрецията на мукус при НР-асоцииран хроничен гастрит“ през 2011 год, Варна.

Д-р Цветкова владее на ниво С1 английски и италиански език, и на А2- испански език. Има много добри компютърни умения и компетенции с инструментите на Microsoft Office. Професионалните ѝ и научни интереси са разностранни, като преди всичко са насочени в областта на патологията на млечната жлеза и молекулярната патология.

Д-р Цветкова е член на Lions Club Academica – Варна, член на „Клуб 7“- проект към Община Варна; участник в кампании за диагностика на диабет, за ранна диагностика на заболяванията на щитовидната жлеза; в анти-СПИН кампании, обучител на връстници за превенция на сексуално трансмисивни заболявания/.

Актуалност и значимост на темата

Дисертационният труд на д-р Цветкова е резултат от задълбочени и системни морфологични проучвания и изследвания на актуален, със съществено социално и практическо значение проблем, посветен на карцинома на млечната жлеза, и по-конкретно на тройно негативните карциноми, които са около 15% от всички карцинома на гърдата, характеризират се със специфични морфологични особености, имат най-агресивно поведение и се асоциират с риск от рецидив и развитие на метастази в срок от 3-5 години след диагностицирането им. Всичко това създава сериозни терапевтични проблеми, изискващи стриктно клинично-морфологично разпознаване, с оглед поставянето диагноза и провеждане на лечение. Известно е, че карциномът на гърдата е най-честият злокачествен тумор при жените, като по литературни данни през 2018 год. в света са заболели 2,1 млн жени и са починали

приблизително 522 000. Особено обезпокоителен е фактът, че смъртността от карцином на гърдата и усложненията му в България е почти 3х по-висока- 35,6/100 000, в сравнение с данните за света/ 12,9/100 000/. Тези, не вдъхващи оптимизъм обезпокоителни стойности налагат все по-упорито и настойчиво търсене на фактори, влияещи върху развитието и биологичния ход на туморния процес при КГ, още повече като се има предвид, че таргетните терапии, прилагани при хормоно и HER2 позитивните карциноми са неприложими при тройно негативния КГ. Ето защо, недостатъчно проучените въпроси, свързани с морфологичната диагностика и най-вече с биологичното поведение на видовете карциноми на млечната жлеза, както и противоречивите данни от литературата, отнасящи се до корелацията между резултатите от различните ИХХ-изследвания, молекулярния статус на тумора и прогностично-предиктивните му параметри, извеждат на преден план необходимостта от провеждане на системни изследвания, отнасящи се най-вече за тройно негативния карцином, на които д-р Цветкова е посветила дисертационния си труд.

Понастоящем обособен интерес будят тумор- инфилтриращите лимфоцити /TILs/, които, разположени около и сред туморния паренхим, играят съществена роля в имунния отговор на организма. Дисертантката обръща внимание на факта, че TILs могат да стимулират, или да инхибират имунния отговор срещу туморните клетки, като по този начин осигуряват подходяща микросреда за туморна пролиферация. Обект на засилен интерес понастоящем представляват отнасящите се към Т-клетъчната субпопулация цитотоксични CD8+ клетки и регулаторните FOXP3 клетки, чиято количествена и ИХХ-оценка би спомогнала за изясняване ефекта им върху имунния отговор, насочен срещу клетките на КГ. В този аспект особено внимание заслужават FOXP3, чието участие в борбата срещу туморните клетки все още не е напълно изяснено, а и данните от литературата по този въпрос са противоречиви. Поради този факт едно по-детайлно проучване на TILs и по-конкретно на CD8+ и FOXP3+, би допринесло за определяне на прогностичната и предиктивна им стойност, и предоставило възможност за разкриване на нови сигнални пътища и разработване на нови терапевтични подходи.

Използваният от д-р Цветкова достатъчен по обем материал, умело подобрите прогностични морфологични характеристики на мамарните карциноми, и приложението на адекватни ИХХ-методики, включващи различни биомаркери, дават възможност за определяне на критерии, и извеждане на съществени изводи, отнасящи се до биологичното поведение и прогнозиране вероятността от развитието на рецидив и метастази при тези карциноми.

Структура на дисертационния труд. Дисертационният труд на д-р Цветкова е правилно структуриран, с издържан научен стил и терминология. Изграден е върху материал и методики с висока степен на достоверност. Дисертацията е написана на 110 стандартни страници и е богато онагледена с 36 фигури и 13 таблици. Разпределението по раздели е както следва: титулна страница, съдържание, използвани съкращения и увод- 6 стр.; литературен обзор 34 стр.; цел и задачи 1 стр.; материал и методи 12 стр.; резултати 31стр. и дискусия-8 стр; изводи 1 стр., приноси 1 стр.; списък с публикации и участия в научни форуми- 1 стр.; литература 15 стр., включваща общо 156 източника, от които 4 на кирилица и 152 на латиница. От тях 29% са публикувани през последните 5 години, а общо 69,2%- през последните 10 години. Към дисертационния труд има приложени 3 публикации / една в чужбина, и 2 в България / в пълен текст, свързани с разработваната тема.

Оценка на литературния обзор

Литературният обзор е представен в две основни глави, отнасящи се до: 1. Карцином на млечната жлеза, с 5 подточки, включващи епидемиология на КГ; етиология и рискови фактори; молекулярна класификация на КГ; морфологична характеристика, стадиране, прогностични и предиктивни хистологични параметри и лечение на КГ. 2. Вторият раздел е посветен на туморната микросреда. От обзора на литературата проличава много добрата осведоменост на д-р Цветкова при запознаването ѝ с постиженията в световната наука, отнасящи се до туморите на млечната жлеза. Това ѝ дава възможност за правилна оценка на въпроси, отнасящи се до класификационни проблеми, морфологията, биологичното поведение, имунохистохимичния и молекулярно-генетичен профил на мамарните карциноми.

Заслужено внимание д-р Цветкова отдава на епидемиологията на КГ. Обезпокояващ е фактът, че през 2018 год. в света са диагностицирани 18,1 млн нови случаи на злокачествени заболявания, като през същата година починалите от тях са 9,6 млн. От новодиагностицираните случаи 23,4% са в Европа, а смъртността е 20,3% от общата смъртност в света. Карциномът на гърдата е най-честият злокачествен тумор при жените, като през 2018 год. от КГ за заболяли 2,1 млн жени, и са починали прикл. 522 000. Относителният дял на КГ сред жените е сравнително висок / 43,3/100 000/, на фона на други злокачествени заболявания. Подобна е тенденцията и при смъртността от КГ, като сред злокачествените заболявания при жените тя е най-висока / 12,9/100 000/. За България КГ е на първо място по честота и представлява 26,4% от всички злокачествени заболявания. Д-р Цветкова с основание отбелязва, че факт, бъдещ безпокойство, е сравнението, направено между заболеваемостта у нас, която е 108,1/100 000, при средна заболеваемост за Европа 94,2/100 000 жени, и средна заболеваемост за света 43,3/100 000. Смъртността от КГ в България е почти 3х по-висока- 35,6/100 000, докато в световен мащаб тя е 12,9/100 000. Пет-годишна преживяемост от КГ у нас е 72,8%, при средна за Европа 83,8%. Д-р Цветкова се спира накратко на съществуващата зависимост на честотата на КГ от расовата принадлежност, социално-икономическото развитие и индустриализацията на страните.

Обстойно в обзора са представени етиологичните и рискови фактори, благоприятстващи развитието на карцинома, като те са обединени в две основни групи: **1. Непроменливи-** възраст на пациентката, поява на първа менструация, възрастта, на която е настъпила менопаузата, брой бременности, раждания и фамилна обремененост. **2.Към променливите** рискови фактори спадат неправилно и неконтролирано приложение на заместителна хормонотерапия, прием на орални контрацептиви, както и фактори, свързани с нерационалното хранене и нарушената, или липсваща физическата активност, затлъстяването, връзката между развитието на КГ и метаболитния синдром и др. Д-р Цветкова отбелязва, че пикът от поява на КГ е м/у 65-69 години, като прави и обосновано обяснение на този факт, имащ връзка с удълженото на време за въздействие на ендокринните стимули върху мамарния епител и нарушеният баланс м/у онкогени и супресорни гени. Отбелязана е ключовата роля на генетичните мутации, особено при жени под 40 год. възраст, като най-чести са мутациите на гените BRCA1 и BRCA2. **В заключение д-р Цветкова посочва, че по принцип всеки излишък на естрогени в женския организъм води до повишен риск от развитие на КГ.**

Следващата част от обзора д-р Цветкова посвещава на молекулярната класификация на мамарния карцином, изградена въз основа на хистологичната структура на млечната жлеза. Подробно са описани със съответните им характеристики всеки един от петте субтипа,

застъпени в класификацията, а именно: Луминал А; Луминал В, субтип със свръхекспресия на HER2, ниска експресия на клаудин и базален субтип. Прецизно и задълбочено д-р Цветкова за всеки един от тях прави преглед, отнасящ се до участието и ролята, която имат съответно експресираният гени, пролиферативния индекс, вероятната прогноза и склонност към рецидив и метастази, както и възможността за прилагане на адекватна терапия. Известно е че сред изброените субтипове с най-лоша прогноза е базалният, който е агресивен, има ниска степен на клетъчна диференциация, висок пролиферативен индекс, дава ранни рецидиви и метастази. Д-р Цветкова допълва, че с оглед разработването на таргетна терапия, тройно-негативните тумори са категоризирани въз основа на молекулярното ниво в 6 подгрупи, а именно- basal-like 1 и 2; имуномодулаторен тип; мезенхимен, мезенхимен-стволоподобен и луминален андрогенен рецепторен субтип. При всеки един от тези субтипове са посочени гените, участващи в сигналните пътища на растеж, ангиогенеза, имунна стимулация, пролиферативен индекс и др, отбелязана е чувствителността към съответно терапия, както и най-честия хистологичен вид на карцинома, отнасящ се към съответния субтип. Интерес представлява луминалният андрогенен рецепторен субтип, при който се експресират гени, свързани с хормонални регулаторни пътища, синтез на стероиди, порфиринов и андроген/естрогенния метаболизъм; към този субтип се причислява апокриноклетъчният карцином. Все още обаче не са напълно изяснени всички ефекти, отнасящи се до действието на андрогените върху млечната жлеза, но се предполага, че те играят ключова роля в карциногенезата. Предлаганата от някои автори група на „четворно негативен“ КГ все още няма достатъчна подкрепа и не е навлязла в клиничната практика, въпреки че представлява насока, даваща нови възможности за съответно определяне на по-адекватна терапия.

4. Морфологична характеристика, стадий, прогностични и предиктивни хистологични параметри. В тази част д-р Цветкова прави преглед на класификациите на КГ, като основателно, с оглед съществуване на риск от развитие на КГ, разглежда и доброкачествените епителни промени в гърдата, разделени в три групи- непролиферативно заболяване на млечната жлеза /ФКБ- без риск от развитие на КГ/; пролиферативно заболяване без атипия/ с риск от развитие на КГ 5-6%; включва епителна хиперплазия, склерозираща аденоза, папилом и комплексна склерозираща аденоза/ , и пролиферативно заболяване с атипия- риск между 13-17%- тук спадат АДХ и АЛХ/. Внимание е отделено и на дукталния карцином in situ, с неговите хистологични варианти и съответната им морфологична характеристика. Обстойно са разгледани видовете инвазивни карциноми с подробна характеристика по отн. тяхната морфология, биологично поведение и прогноза, като тук са включени инвазивни NOS-дуктални карциноми, и специалните форми/ инвазивен лобуларен карцином, медуларен, метапластичен, муцинозен, тубуларен, апокринен /и др. Добре обосновано Д-р Цветкова представя принципите за стадиране и градиране на карциномите на базата на TNM-класификацията, включваща три пункта: размер на тумора, разпространение в регионалните лимфни възли и далечните метастази. Клиничният стадий, имащ значение за избора на терапия за всеки отделен пациент, се базира именно на трите параметра от TNM-класификацията.

Д-р Цветкова е направила подробно описание на „**Предиктивните и прогностични фактори,**“ даващи информация за риск от развитие на рецидив, метастази или смърт. Основателно внимание е отделено на класическите прогностични фактори - туморен размер, състояние на ЛВ, съдовата инвазия, хистологичен вариант и степен на клетъчна

диференциация. Отбелязана е зависимостта м/у размера на тумора и негативните лимфни възли по отн. преживяемостта, както и корелацията между броя на позитивни лимфни възли и риска от развитие на далечни метастази. Що се касае до определянето и значението на хистологичния вид, с по-лоша прогноза са инвазивният ДК NOS и метапластичният карцином, докато тубуларният, медуларният и муцинозен карциноми са с по-добра прогноза. Ниско диференцираните карциноми крият по-голям риск от поява на рецидиви и метастази; позитивните за AR карциноми са с по-добра прогноза, асоциират се с по-висока степен на диференциация и с по-нисък пролиферативен индекс. В коментар д-р Цветкова посочва, че на базата на описаните параметри понастоящем са изградени 2 клинични подхода за определяне на индивидуалната прогноза при КГ, а именно: NPI и Adjuvant Online. Първият включва статуса на ЛВ, размер на тумора и степен на диференциация; АО включват допълнително възрастта в момента на диагностицирането, рецепторен статус /ER, PR и HER2/ и придружаващи заболявания. Тези два клинични подхода се използват при изчисляването на 10 год. преживяемост, риск от рецидив и полза от прилагането на АХТ.

Прогностично-предиктивните фактори включват рецепторите ER, PR и HER 2, като се отбелязва, че повишената експресия на ER и PR има изразена предиктивна стойност и е с по-добра прогноза по отн. преживяемост и терапевтични резултати от лечението през следващите 3 години. HER2-също е прогностичен и предиктивен фактор, като обаче позитивната му експресия определя агресивността на тумора и склонността му към метастазиране.

5. Лечение на карцинома на гърдата.

Тук д-р Цветкова накратко се спира и прави преглед на основните методи за лечение на карцинома на гърдата, а именно: 1. Хирургичен; 2. Лъчетерапия; 3. Системна терапия- НАХТ / преди хирургичното лечение / и АХТ -след хирургичното лечение. Посочена е и обосновката за прилагането на всяка от съответните видове терапия, както и на медикаментите, използвани при системна хормонотерапия в случаите на ER+/+ тумори, и тези, използвани при HER2+/+ тумори. За тройно негативния КГ, се приема, че най- подходяща за лечение е системната химиотерапия- НАХТ и АХТ.

Вторият голям раздел от литературния обзор д-р Цветкова посвещава на туморната микросреда. Подробно са описани компонентите на средата, които чрез непрекъснато взаимодействие помежду си участват активно в имунния отговор на организма срещу тумора. За онагледяване Д-р Цветкова е използвала една много добра фигура, представяща туморната микросреда и имунните клетки, включващи се в протуморния и антитуморен имуен отговор.

Със засилен интерес и особено внимание дисертантката поставя акцент върху литературните данни от редица проучвания, отнасящи се до хетерогенната група на тумор-инфилтриращите лимфоцити / TILs/, като част от туморната микросреда. На базата на определени точни критерии за количественото им определяне в хистологични препарати, са изработени указания за оценка на TILs, която дава информация, позволяваща определяне имуногенността на тумора в клинична категория „горещ“, имуно активен, и „студен“, имуно неактивен. В туморната микросреда TILs имат имunosупресорна и имунорегулаторна функция, като активират CD8+ цитотоксични и CD4+ регулаторни Т- лимфоцити.

Д-р Цветкова отделя внимание на описание, отнасящо се до произхода и мястото за образуване на CD8, както и на механизмите, по които се осъществява смъртта на таргетните туморни клетки. Понастоящем се приема, че CD8+ могат да бъдат прогностичен фактор при повечето от КГ, като високата им експресия корелира с по-добрата преживяемост на пациентките. Т-регулаторните клетки се характеризират с експресия на CD4+, CD25+ и **FOXP3-протеин**, който се представя като транскрипционен фактор, упражняващ контролна роля върху активността на някои гени, отговорни за имунния отговор. Д-р Цветкова посочва, че чрез участието си в производството на Т-регулаторните клетки, FOXP3 е може би най-надеждният маркер за тях, въпреки, че все още не е напълно изяснена ролята, която той играе в развитието на имунния отговор. Така напр. данни от резултатите в проучвания, изучаващи FOXP3 като потенциален прогностичен маркер при тройно негативни КГ, отчитат позитивна корелация между високи нива на FOXP3 и туморен размер; от своя страна резултати от други проучвания показват позитивна корелация между повишен брой на FOXP3-клетките, локални лимфни метастази и лоша прогноза. Посочва се, че FOXP3+клетки се асоциират с по-добра преживяемост, т.е., все още няма единомислие по отношение ролята им в имунния отговор.

В заключение трябва да се отбележи, че литературният обзор е написан с точен език и стил, отразяващ умението на авторката за представяне на научната литература в определена проблемна област, като са анализирани резултатите от различните проучвания, в опит да се даде повече яснота на актуалния проблем. Висока оценка заслужават многостранното и задълбочено познаване на обсъжданите данни, както и стремежът на д-р Цветкова да дискутира и анализира богатата научна информация.

Цел и задачи. Целта на дисертационния труд „да се определи прогностична роля на TILs и молекулярните биомаркери CD8 и FOXP3 във връзка с клинично-патологичните показатели и обща преживяемост при пациенти с тройно негативни карциноми на гърдата“, е точно и ясно формулирана, конкретна и адекватна на дисертационната тема. Тя, и произтичащите от нея 6 задачи са правилно конструирани и изпълними и представляват логично продължение на литературния обзор, което дава възможност направените изводи от научната разработка да имат практическо приложение.

Задачите включват: 1. Анализ на клинично-морфологичните характеристики на пациентите с тройно-негативни КГ и изследване влиянието им върху общата преживяемост; 2. Анализ на свърхекспресията на TILs в туморната микросреда и връзката ѝ с клинично-морфологичните параметри и общата преживяемост на пациенти с тройно негативни КГ; 3. Анализ на експресията на CD8 в туморната микросреда и връзката ѝ с общата преживяемост при посочените пациенти; 4. Оценка на експресията на FOXP3 в туморната микросреда и връзката ѝ с клинично-патологичните параметри при пациентите; 5. Сравнителен анализ между нивата на експресия на TILs, CD8 и FOXP3 в туморната микросреда; 6. Разработване на интегриран клинично-морфологичен и имунохистохимичен профил за стратификация на риска при пациенти с тройно негативен КГ на базата на CD8 и FOXP3 позитивни стромални клетки.

Материал и методи на изследване

За целите на разработвания дисертационния труд е използван достатъчен по обем материал, необходим за статистическа обработка на данните и определяне на тяхната

достоверност. База за реализация на дисертационния труд са Отделението по патология в Падуа, Италия, и Онкологичният институт Венето, Падуа.

В дисертацията обект на проучването са биопсични материали от 244 пациентки с диагноза тройно негативен КГ, диагностициран в периода 2000-2014 год. в Онкологичен Институт Венето, Падуа. Диагнозата и стадият на пациентите са определяни след клинично, хистологично и образно изследване. На всички пациентки е проведена системна химиотерапия / НАХТ и/или АХТ/, и хирургична интервенция в IOV, Падуа, Италия. Хистологичният анализ е извършен върху: 1. Биопсичен материал от пациентки, подложени на НАХТ и хирургичен материал, получен след хирургичната интервенция, при наличие на резидуални туморни клетки, и 2. При пациентки, подложени на АХТ е изследван хирургичен материал, получен след оперативната интервенция/квадрантектomia или мастектомия на гърда/. Изследвани са по 5-6 биопсични материала от тумора на гърдата, и по 2-3 материала от околната на тумора тъкан. Биопсично изследване е проведено върху изпратените лимфни възли, и върху материали от всичките шест резекционни линии с оглед определяне радикалността на интервенцията.

В разработката дисертантката е включила голям набор от адекватни за целите на изследването методи- рутинни хистологични / с определяне на голям брой характеристики /, и специфични, имунохистохимични методи на изследване, с използван индиректен имунопероксидазен метод, чрез който е оценена експресията на 3 антители: MNF 116, CD8 и FOXP3 на фирма „Abcam.“ Анализът е извършван по стандартни протоколи. При провеждането на ИХХ- реакциите са спазени всички елементи на методиката, вкл. технологична дисциплина, описание локализация на експресията, позитивна и негативна 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, произхода на използваните антители и визуализиращата система. При поставянето на диагнозата е ползвана класификацията на карцинома на гърдата, публикувана от СЗО /2012 год./; степента на диференциация е определяна по точкова система, според стандартните критерии за оценка на трите туморни характеристики: наличие на тубули, ядрен полиморфизъм и брой митози. Стадият на тумора е определян на базата на публикуваните критерии на Италианската асоциация по медицинска онкология и в съответствие с 18-тото издание на системата за стадиране на КГ на Американския раков комитет. При всяка пациентка е извършена оценка на TILs, като е определян процентът на стромата, заета от лимфоцитите, с изключване на левкоцити, некротични зони и лимфоцити около CA in situ. Всички ИХХ-препарати са сканирани с HAMAMATSU C12740- дигитален скенер, и са съхранени в дигитален архив. Оцветените срези са анализирани с дигитален софтуер Visiopharm. Извършваният анализ включва строго определени стъпки, осъществени в три етапа, като в третия етап посредством специално приложение, с оглед оценката на изследваните параметри в експресията на CD8+ FOXP3+ се прави разграничаване на туморните и стромални клетки, базирано на позитивното оцветяване на епителните клетки за MNF 116, и липсата на експресия на MNF 116 в стромните клетки. Процедурата по подготовката на срезите, включваща тъканно подравняване, ръчно обозначаване на „зоната на интерес“ и разграничаването на туморните и стромни клетки чрез оценка експресията на приложения маркер за епителни клетки MNF 116, с оглед крайната оценка на експресията на CD8+ и FOXP3+, са представени на изключително добре онагледяващи процеса четири фигури.

Получените резултати са обработени чрез богат набор от статистически методи за анализ на данните: дескриптивен анализ- за определяне на статистически величини; Chi-square test- непараметричен тест за определяне на статистически значима разлика между очакваните стойности на една променлива, в зависимост от друга променлива; регресионен модел на Cox за изчисляване нивото на доверителност и относителен риск; Kaplan-Meier крива на преживяемостта, като за всеки период от време по формула е изчислявана вероятността за преживяване; Long rank test- използван за проверка на нулева хипотеза.

Резултати и обсъждане

Резултатите от проведеното в дисертационната разработка изследване са най-значителната част от труда и демонстрират задълбоченост и опит за максимална обективност на авторката. Представени са в 8 групи, като при описанието им е спазена последователността на поставените задачи. Анализът на резултатите е осъществен на много добро методично ниво, което е позволило на д-р Цветкова да направи съответни изводи. В обсъждането тя аргументирано излага и дава тълкуване на съвременните научни познания по разглежданите въпроси. Резултатите са онагледени в прегледен и добре оформен табличен и графичен вид и с цветните фигури с добро качество. Изложението на получените данни и тяхното обсъждане заслужават висока оценка за своето адекватно структуриране и логическа последователност, израз на познаването на проблемите и умението на авторката да борави добросъвестно с научната информация, изказвайки и собствено мнение по дискутираните въпроси.

Резултатите, отнасящи се до клинично-морфологичната характеристика на пациентките, оперирани по повод тройно негативен КГ показват, че от общо изследваните 244 жени, 138 са на възраст над 50, и 106- под 50 години, като средната възраст на жените е 53 години. Прави впечатление, че по литературни данни, за разлика от тройно негативните КГ, средната възраст на пациентите с КГ, показващи позитивна експресия на ER, PR и HER2 е статистически значимо по-висока/ 57,7г/. В зависимост от клиничния стадий в момента на поставяне на диагнозата, най-голям брой пациентки /120- 49,9%/ са диагностицирани във II стадий, следват тези в I стадий /79 жени, 32,4%/, и най-малко / 45 пациентки – 18,4%/ са в по-напредналия, III стадий. По отн. на мястото, отредено в проучването за пациенти в III-ти стадий, дисертантката установява различие с данните от литературата. В тях повечето автори приемат като логично втори по честота да е III-ия клиничен стадий. Д-р Цветкова свързва това несъответствие в стадийното разпределение с ползата от влезлите в действие скринингови програми, подобрените съвременни методи за диагностика и не на последно място- профилактиката на заболяването по отношение ранното му откриване. Що се касае до разпределението на хистологичните варианти в проучването, извършеният сравнителен анализ на тройно негативните КГ с другите субтипове показва, че луминал А и луминал В в по-голяма част от случаите са във II-и клиничен стадий, докато при HER2+ пациентки диагностицираните карциноми са най-често в трети III стадий. Според д-р Цветкова, по-честото откриване на този субтип в III-ти стадий се дължи на факта, че обикновено заболяването се диагностицира едва когато присъства симптоматично, а не в резултат на проведена скринингова мамография.

Най-честият хистологичен вариант, установен при тройно негативните КГ, е инвазивният дуктален карцином NOS / в 219 пациентки, 90,5%/, следват лобуларният- в 10-15% от КГ, и апокринният карцином, диагностицирани в х 8 пациентки, метапластичният /при 4 жени/ и

медуларният- в 3 пациентки/1,2%/ от тройно негативните КГ. За приемане на апокринния карцином като истински такъв, д-р Цветкова посочва, че е необходимо определянето на ИХХ-профила на стероидните рецептори ER-, PR- AR+.

Проследявайки степента на туморна диференциация, д-р Цветкова установява, че при тройно негативните карциноми преобладават тези с ниска степен на диференциация- 199 /87,7%/; и с висок пролиферативен индекс -над 30%, в 201 жени. Авторката изказва мнение, че по-агресивното поведение на тройно негативните карциноми най-вероятно се определя от нивото на тези показатели. Независимо от различните cut-off стойности при определяне на ниска и висока степен на пролиферация, резултатите показват, че процентът на Ki67+ позитивни клетки при тройно-негативните КГ е по-висок при сравнение с останалите молекулярни субтипове на КГ. Това дава основание на д-р Цветкова да предположи, че маркерът Ki67 е един от неблагоприятните прогностични при тройно негативните КГ. Базирайки се на клиничко-морфологичните характеристики, д-р Цветкова дава много точно определяне на профила при тройно негативните КГ, а именно, че това е карцином, който се диагностицира най-често във II-и клиничен стадий, в повечето случаи е инвазивен дуктален NOS, има ниска степен на диференциация и висока пролиферативна активност.

В дисертационния труд е извършен подробен анализ, отнасящ се до експресията на TILs, връзката ѝ с клиничко-морфологичните параметри и общата преживяемост при изследваните пациентки. С оглед избягване на субективната преценка при полуколичественото определяне плътността на TILs, CD8 и FOXP3+ Ly, в определянето им д-р Цветкова умело използва дигитален софтуер с възможност за оценка на много голям брой клетки от всеки пациент/ средно по над 200 000 клетки от хистологичен срез/, за кратко време/ 5-7 минути на препарат/. Най-голямото предимство на използвания дигитален софтуер е, че се извършва анализ само на предварително селектирани зони, с разделяне на туморния паренхим от стромата.

Определена на базата на cut-стойността, количествената оценка на TILs е 30%. Наблюдавана от авторката е по-висока, със статистическа достоверност DFS при високи нива на TILs, в сравнение с ниските им стойности, както и статистическа значимост между клиничния стадий и DFS. Подобно на данните от литературата, д-р Цветкова установява, че пациентки в първи и втори клиничен стадий имат по-добра DFS. Това, наред с липсата на позитивна корелация на TILs с високата степен на диференциация на КГ, ниската митотична активност и клиничен I-II стадий, дават основание на д-р Цветкова да се присъедини към мненията на други автори, предполагащи, че TILs са не само силен, но и самостоятелен прогностичен фактор. Освен това TILs имат и предиктивна стойност и са асоциирани с ефекта от проведената химиотерапия. В сравнение с другите молекулярни субтипове- луминал А, В и свръхекспресия на HER2+, тройно негативните карциноми имат по-високи стойности на TILs, което може да се свърже и с евентуално развитие на соматични мутации и последваща поява на нови антигени, индуциращи в организма имунен отговор срещу тумора.

Анализът на клиничко-морфологичните показатели и експресията на TILs показва наличие на статистическа значимост между високите стойности на TILs и възрастта на пациентките, като тези стойности са асоциирани с по-млада възраст/ под 50 год /. Интересен е резултатът, получен при сравнението на нивата на TILs и степента на туморна диференциация, който показва, че между високите нива на TILs и ниска степен на диференциация съществува обратна

корелация. Статистическа достоверна значимост има между високото съдържание на TILs и хистологичния вариант на тумора, като това се отнася за дуктален, медуларен и метапластичен карцином. Най-ниски нива на TILs са установени при лобуларен карцином. Високи нива на TILs корелират и с изразена, по-висока експресия на Ki67.

За cut-off стойност на CD8 в проучването е определена плътност 474, а за FOXP3 плътността е 57. Пациентите с високи стойности на CD8 са 30%, а с ниски стойности-70%. Съответни стойностите на FOXP3 са 49,6% и 50,4%. Получените в проучването резултати показват, че високата плътност на CD8 и FOXP3 корелира с по-млада възраст на пациентките, ниска степен на диференциация и висок пролиферативен индекс, както и с някои от хистологичните варианти / основно дуктален инвазивен NOS/. При анализ на експресията на CD8, FOXP3 и DFS се установява, че при висока плътност на двата показателя DFS е по-добра при сравнение с ниската им експресия, което определя CD8 и FOXP3 + клетки като самостоятелни прогностични фактори. Д-р Цветкова отбелязва, че по-добрата преживяемост на пациентите с висока плътност на CD8 може да се обясни с цитотоксичната им роля в имунния отговор на организма срещу тумора .

Експресия на FOXP3 във връзка с клинично-морфологичните показатели. Получената стойност за плътността на FOXP3 е 57. В литературата все още няма еднозначно мнение относно ролята на тези лимфоцити при тройно негативните карциноми. Има данни, в които се отбелязва наличие на негативен ефект на FOXP3 върху OS и DFS, и такива, че високите нива на FOXP3 корелират с по-ниска DFS. Авторката изказва мнение, че несъответствието между получените в проучването резултати , показващи, че високата плътност на FOXP3 клетки имат благоприятен ефект върху DFS, и данните от литературата, че ефектът е негативен, се дължат на различната методология при оценка на тези клетки. Има автори, които установяват висока концентрация на FOXP3+ лимфоцити в периферията на тумора и много ниска експресия в центъра на тумора. В настоящото проучване се наблюдава статистическа значимост между високата плътност на FOXP3 и по-младата възраст на пациентките. Обратна корелация се открива между високата плътност на FOXP3 и ниската степен на туморна диференциация. И тук има статистическа значимост между плътността на FOXP3 и хистологичния вид на тумора / дуктален, медуларен и метапластичен, както и позитивна корелация между високите нива на Ki67 с високи нива на експресия на FOXP3.

В заключение, въз основа на получените резултати , д-р Цветкова прави обобщението, че високите нива на TILs, CD8 и FOXP3 се асоциират с по-млада възраст, карциноми с ниска степен на диференциация и висок пролиферативен индекс. Високите нива на всички изследвани параметри показват статистически значима корелация и с някои от вариантите на мамарния карцином- дуктален NOS, медуларен и метапластичен. Липсва статистическа значимост между изследваните показатели и клиничния стадий на заболяването.

5. Сравнителен анализ между отделните изследвани показатели- TILs, CD8 и FOXP3.

От резултатите става ясно, че високите стойности на TILs имат силна позитивна корелация с висока плътност на CD8 и умерена корелация с плътността на FOXP3. Установена е също така и корелация между плътността на CD68 и тази на FOXP3.

6. Сравнителен анализ на преживяемостта без заболяване на изследваните пациенти , клинично-морфологичните параметри и TILs.

При направения сравнителен анализ чрез регресионния модел на Cox с една или множество променливи, д-р Цветкова установява статистически значима зависимост между клиничния стадий на болестта и преживяемостта без заболяване както и позитивна корелация между високите нива на TILs и преживяемостта без заболяване.

7. Анализът на OS и DFS на изследваните пациенти и cut-off експресията на CD8 и FOXP3 показва статистически значима зависимост между всички тествани параметри и CD8 и FOXP3 и изхода от заболяването. За изчисляване на DFS са използвани кривите на Kaplan-Meier. Установява се, че при пациентите с високи нива на експресия на CD8+ /плътност равна или по-голяма от 474/, имат статистически значимо по-висока 5-год. преживяемост в сравнение с преживяемостта на пациентите с ниска експресия на CD8. Пациенти с висока експресия на FOXP3+ / плътност \geq от 57/ имат статистически значима по-висока 5-год. преживяемост в сравнение с пациенти, при които се установява ниска експресия на FOXP3.

8 Интегрирани прогностични модели.

Извършени са анализи, оценяващи допълнителната прогностична информация, предоставена от стойностите на CD8 и FOXP3, добавена към съществуващ прогностичен модел, включващ стадий на тумора и TILs. От получените резултати се вижда, че FOXP3 и CD8+ , добавени поотделно към вече съществуващия прогностичен модел / стадий TILs/, добавят значима прогностична информация. Едновременното добавяне на CD8 и FOXP3 няма прогностична стойност.

В края на дискусията д-р Цветкова прави заключение-препоръка, в което се посочва необходимостта от бъдещи проспективни проучвания , насочени към изясняване на връзката между топографията на CD8+ и FOXP3+, OS и DFS, и приемането на консенсус за полуколичествена оценка на TILs, която да е приложима в диагностичната практика и да има предиктивна стойност.

Изводи: От проведеното изследване са оформени 5 извода, които отговарят на поставените цел и задачи, формулирани са добре и са логичен завършек от получените резултати. Приемам ги във вида, в който са представени, без забележки.

Приноси: Д-р Цветкова е формулирала 4 приноса на дисертационния труд, разпределени в две групи: **Два научни приноса с оригинален характер, отнасящи се до:** А.Осъществена комплексна клинично-морфологична и ИХХ-характеристика на имунната реакция при тройно-негативните карциноми на гърдата; Б. Извършен е количествен софтуерен анализ на TILs, CD8 и FOXP3 с оглед изясняване на прогностичната им стойност. **Два научни приноса с практическо-приложен характер:** А. Определен е профилът на пациентите с тройно негативен КГ; Б.Едновременно е анализирана експресията на TILs, CD8 и FOXP3 във връзка с клинично-морфологичните параметри при тройно негативните карциноми на гърдата.

Към дисертационния труд са представени 3 научни публикации, свързани с темата на дисертационния труд, една от които е отпечатана в чуждестранно, и две в наши списания.

Публикационната активност- брой на публикациите, тяхното съдържание и стойност отговарят на изискванията за представяне на резултатите от научните изследвания.

Авторефератът е изготвен в съответствие с приетите научни изискванията. Той е отпечатан на 60 страници, които включват всички основни части на дисертационния труд, таблици, фигури и снимки. Съдържанието на автореферата дава достатъчно добра и пълна представа за цялостния дисертационен труд, като отразява постигнатите резултати и направените изводи от разработката.

Заклучение:

Дисертационният труд на д-р Василена Росенова Цветкова е резултат от добре планирано и задълбочено проучване, третиращо актуален проблем относно клинично-морфологичните характеристики на тройно негативните карциноми на млечната жлеза и възможностите за определяне на някои предиктивни и прогностични маркери, имащи отношение към диагностиката и лечението на тези тумори. А решаването на проблема от своя страна би имало значителен социално-икономически ефект. Трудът, който се откроява с много добра литературна осведоменост и стил при интерпретацията на резултатите, е изцяло лично дело на дисертантката. Целта на разработката е постигната, поставените задачи са изпълнени. Изводите са точни, ясно формулирани и изчерпателни. Приносите имат не само научна, но и практическа стойност и представляват база за изпълнение на бъдещи научно-изследователски проучвания. Представените публикации и научни съобщения отговарят на изискванията. Дисертацията е написана на издържан научно-литературен език и е добре онагледена с таблици и цветни снимки.

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

Поради гореизложеното, напълно убедено давам своята **положителна оценка** на предложения дисертационен труд, като препоръчвам на уважаемите членове на Научното жури да присъдят образователната и научна степен „**Доктор**“ на д-р Василена Росенова Цветкова по научната специалност „Патоанатомия и цитопатология“

05.06.2020

Рецензент: доц. д-р Екатерина Боянова Софтова-Златарова, дм

гр. Варна

