**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: **„ МОРФОЛОГИЧНА И ИМУНОХИСТОХИМИЧНА СРАВНИТЕЛНА ХАРАКТЕРИСТИКА НА ТУМОРИТЕ НА ЩИТОВИДНАТА ЖЛЕЗА“**

**на д-р Доротея Василева Малинова, 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 № 22/08.04.2019 г. и със заповед № Р-109-167/13.05.2019г. на Ректора на МУ-Варна, съм избрана за външен член на Научното жури, а на основание Протокол № 1 /20.05.2019 г., съм определена за официален рецензент по процедура за придобиване на образователна и научна степен „*Доктор“* с кандидат д-р Доротея Василева Малинова 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 Доротея Василева Малинова е родена на 26.05.1987 год. в гр. Варна. Завършва средното си образование през 2006 год. в 8 СОУПЧЕ „Ал.Сергеевич Пушкин“ –гр. Варна с първи език- английски и втори –руски език. През 2006 год. е приета за студентка в МУ „Проф. д-р Параскев Стоянов“-Варна, където през 2012 год. придобива образователно-квалификационна степен „магистър“по специалността „Медицина“.

 След завършване на университетското си обучение, още същата /2012/ година започва специализация по Обща и клинична патология в Катедрата по „Обща и клинична патология, съдебна медицина и деонтология“ при МУ-Варна, а от 2013 год., и до настоящия момент работи като асистентка в Катедрата, и лекар-ординатор в Клиниката по „Обща и клинична патология“ при УМБАЛ „Св.Марина“-Варна. През м. май 2016 год. 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. Придобива специалност по Обща и клинична патология през м юли 2017 год.

 Д-р Малинова има над 5 години трудов стаж като асистeнт-преподавател по специалността „Обща и клинична патология“. Участва активно в преподаването на дисциплината на българските и чуждестранни студенти от всички специалности в МУ-Варна /„Медицина“, „Дентална медицина“ и „Фармация“/, на студентите от специалностите „Медицински сестри“ и „Акушерки“, и на обучаващите се в МК към МУ-Варна лаборанти и фармацевти.

 Д-р Малинова има завършени със сертификат участия в 8 квалификационни курса, вкл. „Педагогически основи на академичното преподаване“ 2013 г., Варна, „Обучение за работа с платформа за електронно обучение“ 2014 год- Варна и др., както и 4 участия в Европейското училище по патология през год. 2015-2019, посветени на гинекологичната патология, тиреоидните карциноми, невроендокринни неоплазии и карцинома на гърдата. Дисертантката има участие в 16 научни статии, публикувани в наши и чужди списания,като 3 от тях са по темата на дисертацията й. С научни доклади, постери и др. д-р Малинова се е представила в 7 национални, и 8 -с международно участие прояви. За отличен успех на випуск 2012 год. в МУ-Варна,тя е получила грамота от БЛС. Професионалните й и научни интереси са в областта на невроендокринната и патологията на щитовидната жлеза и молекулярната биология.

 Д-р Малинова владее на много добро ниво английски и руски език и има изключително добра компютърна грамотност; членува в БЛС и Българското научно дружество по патология .

 **Актуалност и значимост на темата**

 Дисертационният труд на д-р Малинова е резултат от задълбочени и системни морфологични проучвания и изследвания на актуален, със съществено социално и практическо значение проблем, посветен на туморите на щитовидната жлеза. Макар и не често срещани /около 1% от всички малигнени тумори/, те се характеризират със специфични морфологични особености, които създават сериозни терапевтични проблеми, изискващи стриктното им клинико-морфологично разпознаване, с оглед поставянето на точна и адекватна диагноза. Въпреки сниженият леталитет от карцином на щитовидната жлеза през последните 10-15 години, дължащ се преди всичко на подобрените диагностика и лечение, в около 8-10% от случаите настъпва летален изход, най-често свързан с рецидив или прогресия на заболяването. Това от своя страна е предпоставка за търсенето на фактори, влияещи върху развитието на ангиогенезата, апоптозата и прогресията на щитовидните неоплазии, както и за интерпретиране на все още неглижираната роля на фоновите заболявания при различните хистологични видове неоплазми, и на морфологичните промени в тумора и в околната нетуморна тъкан, които също могат да играят съществена роля в туморния процес. Ето защо, недостатъчно проучените въпроси, свързани с морфологичната диагностика и биологичното поведение на щитовидните тумори, 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 системно проучване, свързано с щитовидните неоплазми, на които д-р Малинова е посветила дисертационния си труд. В тази връзка идентифицирането и използването за изследване на нови биомаркери, както и прецизирането на морфологичните туморни характеристики, биха допринесли до голяма степен за подобряване на диагнозата, с прилагане на комплексен индивидуален подход и възможност за по-широка достъпност на адекватна, прицелна терапия. Понастоящем много нови молекули, участващи в процесите на неоангиогенеза, апоптоза и др. са обект на засилен интерес, насочен и към туморите на щитовидната жлеза. В този аспект особено внимание заслужават апоптотичните протеини, ролята на които при тези тумори е все още слабо и недостатъчно проучена.

 Използваният от д-р Малинова достатъчен по обем материал, умело подбраните прогностични морфологични характеристики на щитовидните карциноми, и приложението на адекватни ИХХ-методики, влючващи панел от биомаркери, дават голяма възможност за определяне на критерии, позволяващи разграничаването на доброкачествените от злокачествени тумори, и извеждане на съществени изводи относно биологичното поведение и евентуалната прогресия в развитието на щитовидните карциноми.

 **Структура на дисертационния труд**

 Дисертационният труд на д-р Малинова е правилно структуриран, с издържан научен стил и терминология; изграден е върху материал и методики с висока степен на достоверност. Дисертацията е написана на 156 стандартни страници и е богато онагледена с 49 фигури и 25 таблици. Разпределението по раздели е както следва: титулна страница, съдържание и използвани съкращения-5 стр.; въведение 3 стр.; литературен обзор 35 стр.; цел и задачи 2 стр.; материал и методи 11 стр.; резултати и обсъждане 72 стр.; заключение- 2 стр.; изводи и приноси 4 стр.; списък с публикации и участия в научни форуми- 1 стр.; библиография 21 стр., включваща общо 190 източника- 5 на кирилица и 185 на латиница. От тях 49 /26,25% / са публикувани през последните 5 години, а общо 88 /46,3%/ - през последните 10 години. Към дисертационния труд има приложени 3 публикации в пълен текст, свързани с разработваната тема, и три участия в научни конференции с отпечатани резюмета.

 **Оценка на литературния обзор**

 Литературният обзор е представен в 5 глави, отнасящи се до: 1. Клинико-морфологична характеристика на туморите на щитовидната жлеза; 2.Стадиране на тиреоидните карциноми; 3. ИХХ-маркери при изследването на тиреоидните карциноми; 4. Апоптотични протеини и ролята им като маркери в диагностиката на тиреоидните карциноми и 5. Фонови заболявания на щитовидната жлеза- ХЛТ и нодозна струма.

 От направения обзор на литературата проличава много добрата осведоменост на дисертантката при запознаването с постиженията в световната наука, отнасящи се до щитовидните тумори. Това й дава възможност за правилна оценка на въпроси, касаещи класификационни проблеми, морфологията, биологичното поведение, имунохистохимичния и молекулярно-генетичен профил на тиреоидните карциноми.

 Първата глава от литературния обзор д- р Малинова е посветила на клинико-морфологичната характеристика на туморите на щитовидната жлеза. Те са подробно представени, като се посочва, че верифицирането им е на базата на СЗО-класификацията от 1989 год, с последна ревизия от 2017 год. Заслужено внимание е отделено на фоликуларния аденом и редките му варианти / вкл. и обособения в самостоятелна категория „хиалинизиращ трабекуларен тумор“/, както и на капсулната и васкуларна инвазия при фоликуларния карцином, даващи основание на авторите да приемат наличието им за класифициране на тумора като малигнен / приложена е много добра илюстрация чрез фиг.2 и фиг.3/. Съществен момент, отбелязан от д-р Малинова, е наличието на затруднение, а понякога и невъзможност за хистологично различаване на тумора, поради което в тези случаи като единствен критерий за малигненост се приема степента на туморна инвазия. Посочено е отделянето в класификацията на онкоцитните неоплазми в самостоятелна група, поради уникалния им молекулярен профил и биологично поведение. Основателно голямо внимание е отделено на папиларния тиреоиден карцином, на който се падат 80% от всички тиреоидни карциноми. Описани са вариантите на тумора, както и критериите за морфологична диагноза. Нова категория, включена в 4-тото издание на СЗО, е „неинвазивната фоликуларна тиреоидна неоплазия с нуклеарни характеристики на папиларен карцином“.

 Подробно е разгледан медуларният карцином, причислен към групата на невроендокринните тумори. Изброени с кратко описание са в графа „други“ тумори- лимфоми, плоскоклетъчни карциноми и др.

 В коментар д-р Малинова посочва факта, че диагнозата на тиреоидните карциноми е морфологична, и се основава на точно определени хистологични критерии, вкл. такива, изискващи ИХХ- изследване, при което откриването и прилагането на подходящи маркери за диагностика има решаващо значение за разграничаването на доброкачествени от злокачествени щитовидни тумори.

 В отделна глава са разгледани принципите за стадиране и градиране на карциномите на базата на три основни пункта- размер на тумора, разпространение в регионалните лимфни възли и далечните метастази, като наред с това е приложена и схемата за стадиране според възрастта на пациента- на, под и над 55 год; засегнатите пациенти на възраст 55 или-малко години / I-ва степен, без метастази / имат по-добра прогноза, отколкото пациентите на възраст над 55 год.и с далечни метастази / II степен /. Степените са определени по 8-то издание на AJCС системата, прилагана от 01.01.2018г.

 Задълбочено са разгледани редица ИХХ-биомаркери, с оглед тяхното приложение в диагностиката, диференциалната диагноза и прогноза при тиреоидните тумори. Като такива са изредени и описани ИХХ-маркерите тиреоглобулин, калцитонин, фибронектин, галектин 3; НВМЕ-1, р53; циклин D, и се изтъква ролята им като потенциални биомаркери при тези тумори. Обосновано дисертантката насочва вниманието си към СК19- един от най-често използваните маркери в диагностиката на щитовидните тумори, като посочва различията, наблюдавани в експресията му при папиларния карцином / дифузна / и при фоликуларните аденоми и карцином- слаба огнищна или липсваща. Д-р Малинова акцентира върху много важния момент, че при всички случаи резултатите от ИХХ- изследването трябва задължително да се интерпретират в контекста на тeзи от хистологичната находка.

 Описвайки маркерите, прилагани при определяне на неоангиогенезата в туморната строма, д-р Малинова се спира на СD34, даващ информация за туморната ангиогенеза, а оттам и възможност за определяне на различния тип кръвоснабдяване при карциноми, аденоми, нодозна струма и тиреоидити.Същевременно се подчертават ролята и значението на ангиогенезата при туморите като прогностичен фактор по отношение на тяхното развитие.

 Накратко е представена информация за някои онкогени, като RET- протоонкогена, RET/PTС онкогена, мутациите в BRAF – и RAS-гените и др. хромозомни пренареждания, откриването на които може да играе роля в диагностиката и прогнозата на тиреоидните карциноми. Базирайки се на литературни данни, д-р Малинова обаче посочва, че визираните онкогени и мутации не са достатъчно специфични, за да се използват самостоятелно в диагностиката на доброкачествените и злокачествени тумори.

 Обръщайки специално внимание на апоптозата, играеща значителна роля при оцеляването на неоплазмите, д-р Малинова посочва, че литературните данни за ролята на някои апоптотични протеини, и в частност Вах- проапоптотичен и Всl2-антиапоптотичен протеин са недостатъчни и противоречиви, като това се отнася и за връзката им с други маркери, налагаща провеждане на изследвания, които биха дали допълнителна информация относно преценката на биологичното поведение и прогноза при щитовидните тумори.

 В обзора е направен преглед на фоновите заболявания при различните видове тумори на щитовидната жлеза, а именно- хроничен лимфоцитарен тиреоидит/ХЛТ/и нодозна струма/НС/, които играят важна роля в тяхното развитие и поведение. Проследена е връзката на тиреоидита на Хашимото с папиларния тиреоиден карцином. По литературни данни ролята на лимфоцитите в туморния процес може да бъде двузначна: лимфоцити от перитуморния възпалителен инфилтрат да „помагат“ на тумора, т.е., съществува толеранс между лимфоцитите и тумора; възможно е обаче лимфоцитите при автоимунните тиреоидити да се „борят“срещу туморните клетки. По отн. на нодозната струма, данните от литературата сочат, че тя представлява рисков фактор за развитие на щитовиден карцином.

 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 способността на дисертантката да дискутира и анализира богатата научна информация.

 Д-р Малинова завършва обзора с 3 извода от литературната справка, които се отнасят до това, че: 1. Адекватната диагноза на щитовидните тумори има решаваща роля за определяне на подходяща терапия; 2. Трудностите при цитологичната и хистологична диагноза на добре диференцираните тумори, особено тези с фоликуларен строеж, представляват предизвикателство за патолозите; 3. Значителна е ролята на ИХХ- изследванията, вкл. търсенето на определени протеини в туморните клетки, отговорни за туморната прогресия и метастазиране. Комбинацията от изброените пунктове, и най-вече използването на подходящ ИХХ-панел от биомаркери, биха допринесли както за подобряване разграничаването на хистологичните варианти, така и при диагностиката и лечението на щитовидните тумори, на които д-р Малинова е посветила дисертационния си труд.

 **Цел и задачи**

 Целта на дисертационния труд „ **Морфологична и имунохистохимична сравнителна характеристика на туморите на щитовидната жлеза**“ – „да се проучи диагностичната и прогностична стойност на морфологичните характеристики и ИХХ-експресия на СК19, съдовия ендотелен маркер СD34, проапоптотичния Вах протеин и антиапоптотичния Всl2 протеин при доброкачествени и злокачествени тумори на щитовидната жлеза“, 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. Определяне относителния дял на доброкачествените и злокачествени тумори на щитовидната жлеза за 5-тодишен период/2013-2017 год/; 2. Проучване и сравняване морфологичните промени в туморната и извънтуморна тъкан при доброкачествените и злокачествени тумори; 3. Изследване и сравняване ИХХ- експресия на СК19 при тиреоидни неоплазми и в нетуморна тъкан на щитовидната жлеза; 4. Имунохистохимично определяне чрез маркера СD34 васкуларизацията на туморната и околната на тумора тъкан и сравняване на МВП в двете лоскализации; 5. Проучване и сравняване на ИХХ-експресия на Вах в туморната и нетуморна тъкан и 6. Оценка на ИХХ- реакция на Ат Всl2 при щитовидни тумори и сравняване на експресията с тази от околната на туморите тъкан.

 **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. В дисертацията обект на проучването са биопсични материали от архива на Клиниката по обща и клинична патология при УМБАЛ „Св.Марина“-Варна. Оперираните в УМБАЛ „Св. Марина“-Варна пациенти са разделени в 3 групи: **Първа група**- 607 неселектирани пациенти с хемитиреоидектомия или радикална тиреоидектомия с нетуморни и туморни заболявания на щитовидната жлеза за 5-год период / 2013-2017 год/; **Втора група**- 122 селектирани пациента с доброкачествени и злокачествени щитовидни тумори- 41 фоликуларни, и 9 онкоцитарни аденома, 55 папиларни, 4 фоликуларни, 3 медуларни и 6 онкоцитнарни карцинома; при всички са определяни големина на тумора, наличие на калцификати, наличие на капсула, наличие на тиреоидит; некроза, фиброза и кръвоизливи; **Трета група**- представена от 40 парафинови блокчета с тиреоидни карциноми, върху които е извършено ИХХ-изследване / съотв.25 папиларни,10 фоликуларни и 5 онкоцитарни карцинома/; 25 блокчета от аденоми/ 15 фоликуларни и 10 онкоцитарни /; 10 блокчета – служещи за контроли, с нетуморни лезии.

В разработката дисертантката е подбрала и 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 4 антитела: СК19, СD34 и Всl2 на фирма „DAKO“ и Вах на фирма „Skytex“. Анализът е извършван с помощта на mini KIT high Ph DAKO K8024 при стандартни протоколи. При провеждането на ИХХ- реакциите са спазени всички елементи на методиката, вкл. технологична дисциплина, описание локализация на експресията /ядрена, мембранна, цитоплазмена /, 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, имунохистохимичния протокол, произхода на използваните антитела и визуализиращата система.

 Оценка на експресията на СК19 е извършвана чрез изследване на 10 полета от всеки материал на увел./10х40/; използван е полуколичествен метод / тристепенна скала / при отчитане интензивността на реакцията, и % на позитивни туморни клетки /<5%; 5-25%] 25-75% и над > 75%; общият скор е определян по съответна формула;

 -експресия на СD34; маркерът е използван за определяне на микроваскуларната плътност по метода на Jebreel et al.

 - експресия на Вах и Всl2 и определяне на Н-score им. Позитивността и на двата маркера е оценена полуколичествено по метода на Gupta A. et al. Интензивността на експресия и % на позитивни клетки са определяни по 4-степенна скала и изчислени по формула, в диапазон от 0-300.

 Получените резултати са обработени чрез богат набор от статистически методи за анализ на данните- **дисперсионен** анализ /ANOVA/ за оценка влиянието на даден фактор; **вариационен** анализ-за изследване на количествените характеристики на показателите; **корелационен** анализ- за оценка зависимостта между изследваните показатели чрез непараметричен тест и коефициент на Спиърман и Пиърсън; **сравнителен** анализ/ оценка на хипотези /, **определяне на диагностична стойност на показател/маркер** чрез величините: ППС; НПС; сензитивност /SN/; специфичност /SP/; диагностична точност /DA/; **графичен и табличен метод** за изобразяване на получените резултати. Обработката на данните е осъществена чрез използването на статистически софтуерен пакет IBM SPSS for Windows v. 20,0.

 **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 6 основни 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 Малинова да направи значими по своята същност изводи и заключения. В обсъждането им тя аргументирано излага съвременните научни познания по разглежданите въпроси, придружени от съответно тълкуване. Резултатите са онагледени в изключително прегледен и добре оформен табличен вид и с качествени цветни фигури. Изложението на получените данни и тяхното обсъждане заслужават особено внимание и висока оценка със своето адекватно структуриране и логическа последоватерност, израз на познаването на проблемите и умението на авторката да борави добросъвестно с научната информация, да я интерпретира критично и да прави съпоставка с данните от литературата, като същевременно изказва собствено мнение по дискутираните въпроси**.**

 Обединените в групи резултати се отнасят до: 1. Клинико-морфологична характеристика на пациентите, оперирани по повод заболяване на щитовидната жлеза и относителен дял на неопластичните процеси за петгодишен период; 2. Морфологична характеристика на доброкачествените и злокачествени тумори на щитовидната жлеза; 3. Експресия на СК19 при туморни и нетуморни заболявания на щитовидната жлеза; 4. Микроваскуларна плътност при туморни и нетуморни лезии на щитовидната жлеза; 5. Експресия на Вах при туморни и нетуморни заболявания на щитовидната жлеза и 6. Експресия на Всl2 при туморни и нетуморни заболявания на щитовидната жлеза.

 По отн.клинико-морфологична характеристика на пациентите, оперирани по повод заболяване на щитовидната жлеза и относителен дял на неопластичните процеси за 5-годишен период, получените резултати показват, че относителният дял на пациентите с туморни заболявания е 49,60% от общия брой пациенти с хемитиреоидектомия и радикална тиреоидектомия. Процентно женският пол е засегнат в много по-голяма степен при сравнение с мъжкия пол при всички групи заболявания /отн. ж:м е 88,50/11,50%/. Най-уязвима е възрастовата група от пациенти между 41-60 год. Сред неоплазмите най-висока е честотата на папиларния карцином -141 случая / 23,20%/, следван от фоликуларния карцином -112 случая / 18,50%/. Съществува статистически значима разлика между възрастта и вида на тумора, като с най-голям отн. дял са щитовидните карциноми във възрастовата група 31-40 год /29,30%/, докато честотата на аденомите е по-висока във възрастовата група 41-50 год. / 30,10%/. Проследяването на възможния риск за развитие на карцином при наличие на ХЛТ показва асоцииране на огнищния ЛТ с повишен риск от развитие на карцином и на аденом на щитовидната жлеза. Що се касае до тиреоидита на Хашимото, то той представлява рисков фактор само за тиреоидния карцином. В сравнение с нодозната струма, ХЛТ носи по-висок риск за развитие на карцином на щитовидната жлеза - в 10,17% от случаите пациентите с карцином са имали като фон ХЛТ. **Т-стадият** на карциномите показва зависимост от фоновото заболяване. В проучването е установено, че повечето от туморите с р-ри под 1,0 см и в Т1а стадий имат като фоново заболяване ХЛТ, докато при пациенти без ХЛТ по-голямата част от туморите са с размер над 1,0 см, и са в Т1b или Т2 стадий. Лимфоцитарен тиреоидит обикновено се наблюдава при пациенти с ПК, МК и ФК, и липсва при онкоцитния карцином. При проведеното изследване прави впечатление силната зависимост между наличието на фоново заболяване и риска от метастази, като последният е значително повишен при нодозна струма. Фоновото заболяване дава отражение в/у N-стадия- в повечето от случаите при ХЛТ липсват метастази, докато при пациентите без ХЛТ често се откриват такива в регионалните лимфни възли. Смята се, че лимфоцитните инфилтрати, разположени в паренхима на жлезата при тези заболявания, може да играят протективна роля по отн. развитието на метастази. В коментар и на базата на данните от литературата, в които все още има ненапълно изяснени пунктове, д-р Малинова прави предположение, че в тези случаи най-вероятно значение има характерът на клетъчния инфилтрат- дали е иницииран от тумора /вид антитуморна, протективна защита/ или има връзка с продуцирани клетъчни медиатори с протоонкогенно действие. Може да се окаже, че тумор-инфилтриращите лимфоцити /ТИЛ/ „служат“ на тумора – т.е., м/у тях и карцинома има толеранс, докато лимфоцитите при автоимунните заболявания атакуват туморните клетки, а активността им може да бъде стимулирана, с оглед унищожаване на туморните клетки.

 Получените при ретроспективното изследване върху 122 пациента резултати, с проследяване морфологичната характеристика на доброкачествените и злокачествени тумори на щитовидната жлеза показват, че женският пол и фертилната възраст определено са рискови фактори за развитието на карциноми. Аденомите на щитовидната жлеза са с размери над 2,0 см, имат интактна капсула и рядко се съпътстват от фиброзни промени в паренхима. Карциномите често се развиват на фона на ХЛТ, капсулата е нарушена, липсва колоид във фоликулите, има калциеви отлагания и фиброзни промени в паренхима, които представляват повишен риск за развитието на метастази. Малките по размер карциноми / под 2,0 см / обикновено са папиларни, докато тези над 2,0 см по-често са онкоцитни.

 В проучването е установена статистически значима разлика по отн. на фоновите заболявания и развитието на карциноми и аденоми; 52,10% от карциномите са на фона на ЛТ, а 73,60% от аденомите- на фона на нодозна струма. Липсата на фиброза може да послужи за разграничаване на доброкачествените от злокачествени тумори в 81%, с ДС 69%. Статистически силна зависимост има между фиброзата в тумора и развитието на метастази при тиреоидния карцином. Дисертантката обръща специално внимание на това, че при щитовидните карциноми все още фиброзата е слабо проучена, което изисква задълбочаване на изследванията в тази насока.

 В проведеното ИХХ- изследване, отнасящо се до маркера СК19 при туморните и нетуморни заболявания на щитовидната жлеза, се установява експресия предимно при малигнените тумори. По-висока е експресията на СК19 при папиларния, в сравнение с фоликуларния карцином. Маркерът СК19 може и трябва да бъде използван при разграничаване на ФВПК от ФА и ФК, като обаче не помага за разграничаването на ФА от ФК. Негативна е експресията на СК19 при онкоцитни тумори, докато онкоцитите при ХЛТ винаги дават позитивна цитоплазмена експресия. Д-р Малинова отбелязва интересния факт, че онкоцитите при тиеоидит на Хашимото показват дифузна и умерена експресия във всички участъци с метапластичен епител. т-е., метапластичните и туморните клетки са с еднаква морфология при оцветяване с ХЕ, но се различават имунофенотипно при ИХХ –реакция. Дисертантката посочва, че експресията на СК19 е с висока чувствителност, но с ниска специфичност- т-е., само въз основа на позитивната експресия не може да де определи малигнен или бенигнен е туморът. Заслужаващ внимание момент е този, отнасящ се до разграничаването на ФВПК /със 100% чувствтвителност/от ФА- т.е. при липса на СК19 експресия диагнозата ФВПК е малко вероятна!

 В заключение д-р Малинова посочва, че получените при разработката резултати относно експресията на СК19 има диагностична стойност при папиларния карцином но само в случаите, когато реакцията е дифузна и интензивна. Фоликуларните и онкоцитни неоплазми /аденоми и карциноми/в проведеното изследване, подобно на тези от сходни проучвания, се характеризират с липсваща или слаба, и почти винаги огнищна експресия на маркера. Интензивната цитоплазмена оцветка за СК19 при тумори с фоликуларен строеж изисква допълнително морфологично изследване за търсене на типичните за ПК ядрени характеристики. Въз основа на получените резултати от разработката и данните от литературата, д-р Малинова прави извода, че са необходими допълнителни проучвания с цел изясняване възможността появата на онкоцити при ХЛТ да е пренеопластично състояние, което се асоциира с папиларния карцином.

 Ендотелният маркер СD34 е много подходящ, и може да бъде използван при определяне на МВП за ДД на щитовидните тумори. Най-ниска МВП се установява при ПК**,** като съдовата мрежа в тумора е устроена под формата на „сито“. ФА и ОА са с по-висока МВП и съдовата мрежа е тип „цвете“. МВП е най- значителна при ОК и ФК с различно устроена, без характерни черти съдова мрежа и наличие на съдове с дебели стени в стромата на туморите. Авторката установява интересна, обратно пропорционална зависимост между МВП и експресията на СК19- в 26,7% от случаите ниската МВП е свързана с повишена СК19 експресия. Направеният сравнителен анализ на МВП при различните тумори, както и при сравняване на нетуморни с туморни заболявания показва различия по отн. МВП м/у папиларния карцином и останалите тумори.

 Ролята на Вах- експресията при диагностициране на щитовидните тумори е слабо проучена, а данните от литературата са противоречиви. В дисертационния си труд д-р Малинова проследява експресията на Вах при 65 пациента- 10 с ПК, 15 с ФВПК, 10 с фоликуларен, 5 с ОК, при 15 ФА и 10 с онкоцитарен аденом. Установява се висока експресия при ПК и особено при ФВПК / 88,33%/, където чувствителността е висока / 87,50%/, но със ниска специфичност / 48,00%/-факт, който дава възможност да се направи извод, че не е възможно само по данните от експресията на Вах да се разграничат аденоми от карциноми.Най-слабо Вах се експресира при ФА. ППС и НПС показват точност на маркера в над 70% от случаите. Получените резултати дават основание да се приеме, че Вах има висока диагностична стойност по отн. на карциномите и аденомите /72,30%/. При проследяване на връзката между Вах-експресията и тази на СD34, се установява обратно пропорционална, слаба до умерена зависимост, докато м/у експресията на Вах и СК19 съществува умерена правопропорционална зависимост. Най-висок % на позитивни клетки е установен при ПК, и то предимно при ФВПК 88,33%, а най-нисък- при ФА /19%/. Сигнификантни различия се наблюдават м/у Н-скора при туморите- най-висок е при ПК /152,33/, а най-нисък при ФА /20,00/. Комбинацията от СК19 и Вах при разграничаване на ФВПК от ФК и ФА показва в 100% специфичност на маркерите- т.е., едновременно отрицателната или слаба фокална експресия „отхвърля“ тумора като ПК; комбинацията обаче не помага при разграничаване м/у фоликулен карцином и аденом. Съществен извод, произтичащ от получените резултати дава основание да се предположи, че при папиларния карцином, поради дифузната експресия на Вах, клетките придобиват проапоптотичен фенотип- оттам и по-добрата прогноза на тези тумори. По литературни данни липсата на Вах се асоциира с понижен оттовор на лечение и понижена преживяемост.

 По отн. експресията на маркера Всl2 при туморни и нетуморни заболявания на щитовидната жлеза, получените от дисертационния труд данни показват дифузна или фокална експресия в туморните клетки, с умерена или ниска / до липсваща/ интензивност на реакцията. При ПК има умерена и дифузна експресия; с умерена, предимно дифузна експресия се отличават ФК и онкоцитните тумори/ аденоми и карциноми /. Липсва зависимост между морфологичните показатели, възраст, пол, размер на тумора и фоново заболяване. При сравняване на Н-score в туморна и нетуморна тъкан се вижда, че по-високи са стойностите в нетуморната тъкан /в 89,70% от случаите/, където H score е над 290. Най-висок е скорът в туморната тъкан при ФВПК /182,66/, а най-нисък-при ФА / 110,0/; най-високи стойности в околния паренхим има при онкоцитния карцином /294/, а най-нисък-при ПК /275/.

 Правопропорционална, умерена зависимост има м/у експресията *на* Всl2 и Вах. В изследването се установява, че проапоптотичният протеин Вах липсва в нетуморния фоликуларен епител, а антипроапоптотичния протеин Всl2 се експресира интензивно в същите клетки. Вах-експресия се установява при ПК; фоликуларните и онкоцитарни карциноми експресират умерено и предимно дифузно Всl2, докато при тях Вах-експресията е слаба към умерена, фокална до липсваща- т.е, превалират антиапоптотичните протеини. В проведеното от д-р Малинова изследване проапоптоничният протеин Вах липсва в нетуморния фоликуларен епител, докато Всl2 се експресира от тиреоцитите. Авторката предполага, че в нормалната щитовидна тъкан, НС и ЛТ, повишената експресия на ВСl2 инхибира апоптозата. По отн. на туморите, ПК показват снижена Всl2 експресия в туморните клетки в сравнение с околния нетуморен паренхим, и съотв. повишение на Вах спрямо нетуморната тъкан. Така че, при ПК / класически и ФВПК / преобладава проапоптотичният фенотип; ОК и ФК са с умерена експресия на Всl2 и слаба/липсваща експресия на Вах-т.е, преобладава антиапоптотичният фенотип. Експресията на апоптотичните протеини продължава да бъде обект на изследване, като Всl2 и Вах може да се окажат подходящи маркери при разграничаване на тиреоидните лезии и в търсенето на подходящи медикаменти. Повишената експресия на Вcl2 в туморните клетки при различните неоплазми се свързва с резистентност на химиотерапевтични агенти, а липсата на Вах в туморните клетки се асоциира с понижен отговор към тях и и снижена преживяемост.

 В кратко заключение, завършващо дисертационния труд, д-р Малинова изброява основните пунктове в разработката и постигнатите резултати, като същевременно отбелязва необходимостта от включване на изследвания, целящи определяне влиянието на нови протеини- самостоятелно и в комбинация, участващи в различни етапи от развитието на туморния процес, с оглед възможност за провеждане на адекватна,най-вече прицелна терапия.

 **Изводи:** От проведеното изследване са оформени 9 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 Малинова е формулирала 7 приноса на дисертационния труд, разпределени в две групи: **Два научни приноса с оригинален характер:** А.Осъществена е комплексна морфологична и ИХХ-оценка на туморни и нетуморни заболявания на щитовидната жлеза; Б. Извършен сравнителен и обобщен анализ на процесите на апоптоза, васкуларизация, и експресия на СК19 при доброкачествени и малигнени неоплазми на щит. жлеза; **Пет научни приноса с приложен характер**, като най-съществен сред тях е отнасящият се до изработване на диагностичен алгоритъм за тумори с фоликуларен строеж.

 Представени са 3 научни публикации, свързани с темата на дисертационния труд, отпечатани 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 66 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 изводите от разработката.

 **Заключение:**

 Дисертационният труд на д-р Доротея Василева Малинова е резултат от много добре планирано и задълбочено проучване, третиращо един актуален проблем, отнасящ се до възможностите за изграждане и подобряване диагностиката на туморите на щитовидната жлеза, решаването на който би имал 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 добре издържан научно-литературен език и е онагледена по най-добър начин с таблици и цветни снимки с високо качество.

 Получените резултати и приносите в дисертационния труд на д-р Малинова отговарят на всички изисквания на ЗРАСРБ, Правилника за неговото прилагане и Правилника на МУ-Варна. Дисертационният труд показва, че д-р Малинова притежава задълбочени 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 Доротея Василева Малинова по научната специалност „Патоанатомия и цитопатология“

06.06.2019 Рецензент: доц. д-р Екатерина Боянова Софтова-Златарова, дм

гр. Варна