

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: „ПРЕДИКТИВНИ И ПРОГНОСТИЧНИ МОРФОЛОГИЧНИ ФАКТОРИ ПРИ УРОТЕЛЕН КАРЦИНОМ НА ПИКОЧНИЯ МЕХУР“

на д-р Христо Бойчев Попов, докторант на самостоятелна подготовка

към Катедра по „Обща и клинична патология, съдебна медицина и деонтология“,

Факултет „Медицина“ при Медицински Университет- гр. Варна

Научен ръководител: проф. д-р Петър Иванов Генов, дм

С решение от заседание на ФС на Факултет „Медицина“ при МУ-Варна по Протокол № 23/29.05.2020 г. и със заповед № Р-109-203/04.06.2020г. на Ректора на МУ-Варна, съм избрана за външен член на Научното жури, а на основание Протокол № 1 /08.06.2020 г., съм определена за официален рецензент по процедура за придобиване на образователна и научна степен „Доктор“ с кандидат д-р Христо Бойчев Петров в Медицински Университет -Варна.

За конкурса кандидатът е представил 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 докторанта

Д-р Христо Бойчев Попов е роден на 19.09.1986 год. в гр. Провадия. Завършва средното си образование през 2005 год. в СОУ „Д.Благоев“ -гр. Провадия, с профилирана подготовка по математика, химия, биология и информатика. През 2005год. е приет за студент в МУ „Проф. д-р Параскев Стоянов“-Варна. Завършва висшето си образование през 2011 год. с образователно-квалификационна степен „магистър“ по специалността „Медицина“. От 03.10.2011 год. е назначен като лекар в Клиниката по обща и клинична патология към УМБАЛ „Св. Марина“-Варна, а от 09.02.2012 год. е избран за асистент в Катедрата по обща и клинична патология, съдебна медицина и деонтология към Факултет по медицина при МУ-Варна. От 01.06.2017 год. д-р Попов има призната специалност по „Обща и клинична патология“. Към настоящия момент той има над 8 години стаж по специалността.

Със заповед № Р-109-213/ 06.11.2014 год. на Ректора на МУ-Варна, и решение на ФС при Факултет по медицина, д-р Попов е зачислен 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. Представен е протокол за успешно положен изпит за докторантски минимум.

Д-р Попов притежава удостоверения за проведени две индивидуални обучения във ВМА-София на тема „Морфология и диагностика на бъбречните заболявания“ през 2014 год. и „Нефропатология“ през 2015 год. Има удостоверение за обучител след участие в курс „Педагогическа квалификация на обучители от лечебни заведения“ през 2012 год, както и сертификати за участие в квалификационен курс „Педагогически основи на академичното преподаване“, и за участие в Европейското училище по патология през м. май 2018 год. на тема „Заболявания на уринарната система и мъжкия генитален тракт“. Докторантът е участвал в проект на тема „Прогностични и предиктивни фактори при карциноми на отделителната система“, одобрен и финансиран от МУ-Варна, научна сесия 2015 год. Д-р Попов е представил три статии и две участия от конференции по темата на дисертацията. Освен статиите, свързани с дисертационния му труд, има над 10 публикации, реферирани в световни бази данни Scopus и Web of Science.

Д-р Попов ползва английски и френски език. Има отлична компютърна грамотност-хардуер и софтуер, както и сертификат от 2015 год. за работа с „Autosteiner link 48 System“. Професионалните му и научни интереси са разностранни, като преди всичко са насочени в областта на морфологичната диагностика на заболяванията на отделителната система, и на молекулярната патология. Д-р Попов е член на Българското дружество по патология.

Актуалност и значимост на темата

Карциномът на пикочния мехур е изключително коварно неопластично заболяване, протичащо дълго време без оплаквания. Сред хетерогенната група на злокачествените тумори, той е деветият най-често срещан рак в света. Засяга предимно мъжете, като по данни на СЗО за 2018 год. е на 6-то място по заболяемост, и на девето място като причина за смърт сред злокачествените тумори. Според данните на Българския национален раков регистър за 2015 год. карциномът на пикочния мехур у нас е бил на 4-то място по честота при мъжете /8,2% от злокачествените заболявания при тях, докато при жените този процент е много по-нисък- 2,7%/. През последните 10-15 години честотата на уротелния карцином в световен мащаб непрекъснато нараства, като най-уязвими са индивиди във възрастовата група 65-80 години. Въпреки приложеното лечение, при много от случаите петгодишната преживяемост на болелите е под 50%. Това създава сериозни терапевтични проблеми, изискващи по-задълбочено клиничко-морфологично проучване, отнасящо се до прогнозиране поведението на карцинома с оглед профилактиката, а там, където рецидивите и метастатичната болест са вече факт- с цел повишаване преживяемостта на болните. С особена важност това се отнася за случаите с ранно развитие на карцинома, когато все още не са настъпили рецидиви, което, заедно с проведеното адекватно лечение би довело до увеличаване шансовете за благоприятен изход. Недостатъчно проучените въпроси, свързани с морфологичната диагностика и най-вече с биологичното поведение на карцинома на пикочния мехур, както и все още някои противоречиви данни от литературата, отнасящи се до корелацията между резултатите от морфологичните изследвания и някои прогностично/предиктивни параметри, вкл. експресията на маркери като GATA3, gr130, FGF2, CK20 и др., извеждат на преден план необходимостта от

системни и задълбочени клинично-морфологични и имунохистохимични изследвания. Всичко това определя актуалността и социално-икономическата значимост на проблема, насочен както към откриването на нови прогностични и предиктивни фактори, така и към изясняване на ролята, която играят туморната микросреда и паренхим в неопластичната прогресия, и дава основание за провеждане на настоящето проучване, на което д-р Попов е посветил дисертационния си труд. Използваният от докторанта достатъчен по обем материал, умело подобрите прогностични морфологични характеристики на уротелния карцином, и приложението на адекватни ИХХ-методици, 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 Попов е правилно структуриран, с издържан научен стил и терминология. Написан е на 119 стандартни страници и е богато онагледена с 31 цветни фигури и 22 таблици. Разпределението по раздели е както следва: титулна страница, съдържание и използвани съкращения -6 стр.; въведение-3 стр.; литературен обзор 27 стр.; цел и задачи 1 стр.; материал и методи 9 стр.; резултати 38 стр.; обсъждане 9 стр.; изводи 1 стр., приноси 1 стр.; списък с публикации и участия в научни форуми-1 стр.; литература 23 стр., включваща общо 256 заглавия, от които 1 на кирилица и 255 на латиница. От тях приблизително 1/3 / 29,3% / са публикувани през последните 10 години, като има и три цитирани статии от настоящата 2020 година. Към дисертационния труд са приложени 3 публикации в пълен текст /2 отпечатани в български литературни източници, и една в чуждестранно списание/, свързани с разработваната тема.

Оценка на литературния обзор

Литературният обзор е структуриран в раздели, отнасящи се до: 1. Епидемиология и етиология- честота и рискови фактори; 2. Диагностични алгоритми; 3. Прогностични и предиктивни фактори, произлизащи от туморния паренхим; 4. Фактори, произлизащи от туморната строма и молекулярни фактори, произлизащи от туморния паренхим; 5. Молекулярна патология на уротелния карцином. В обзора на литературата проличава много добрата осведоменост на д-р Попов при запознаването му с постиженията в световната наука, отнасящи се до карцинома на пикочния мехур.

Заслужено внимание д-р Попов отделя на епидемиологията на карцинома. Сравнявайки данни за честотата и смъртността в света, Европа и България, авторът посочва данните на СЗО за 2018 год., според които общата заболяемост от уротелен карцином в света е 10,1 на 100 000 за мъжете и 2,5 на 100 000 за жените, а общата смъртност е съотв. 4,0 на 100 000 за мъжете и 1,1 за жените. Съотношението на засегнатите мъже : жени е 5:1. В България заболяемостта / средна за мъже и жени / е била 12,1 на 100 000 души. Прави впечатление, че най-ниска заболяемост е установена сред населението на азиатските страни /< 2,6 на 100 000/.

Обстойно в обзора са представени етиологичните и рискови фактори, благоприятстващи развитието на карцинома, обединени в две основни групи: 1. Фактори от околната среда- с открояващи се тютюнопушене и професионална експозиция на карциногени / ароматни амини, полициклични въглеводороди, начин на хранене и др.; и 2. Генетични фактори.

Следващата част от обзора д-р Попов е посветил на диагностичните клинични признаци и симптоми, методите за изследване и възможностите, които предоставя вземането на материал за биопсия, с оглед осигуряване на информация за оценка на рисковите фактори по относително рецидив, прогресия и отговор на лечението. Описани са критериите, по които се извършва разделянето на туморите на неинвазивни и инвазивни, категоризирането на неинвазивните карциноми, означени с Tis, Ta и T1, разпределението на туморите на такива с нисък и с висок малигнен потенциал и съответно съществуващия риск от настъпване на локален рецидив. Авторът представя последната хистологична класификация на карцинома на пикочния мехур и се спира на различните модели на туморен растеж /нодуларен, трабекуларен и инфилтративен/, които имат прогностично значение, като същевременно посочва задължителните и допълнителни препоръки за морфологична оценка на тумора.

Д-р Попов прави подробен коментар на публикуваната от CSCO/ISUP 2004 /2016 год. класификация на неинвазивните уротелни карциноми, чийто основен принос е в подробното хистологично описание на различните степени на диференциация, като е дадена характеристика съответно на PUNLMP, групата на low grade и на high grade папиларен уротелен карцином. Представен е и най-широко използваният модел за стадиране на карциномите /осмото издание на pTNM-класификацията от 2018 год./, илюстриран схематично чрез подходяща фигура.

Авторът отделя специално внимание на важността и голямото значение, които имат описанието на дълбочината и степента на туморна инвазия в l. propria /pT1/, muscularis propria /pT2/ или в перивезикалните тъкани и съседни органи/ pT3 и pT4/, като посочва, че интерпретацията им е предиктивен и прогностичен метод, изискващ задължителното отбелязване на дълбочината на инвазията т.е., дали тя е в m. mucosae или в m. propria.

Значителна част от обзора д-р Попов посвещава на туморната микросреда, като прави подробно описание на всеки един от факторите, произлизащи от туморната строма /фибробласти и миофибробласти, неутрофилни левкоцити, еозинофилни левкоцити, тумор-асоциирани тъканни мастоцити TATM /, и на тези, произлизащи от туморния паренхим; разгледани са сложните взаимоотношения между тях, и е обоснована необходимостта от извършване на проучване, с цел изясняване ролята им в туморното рецидивирание и прогресия. Литературният обзор завършва с кратко изложение на въпросите, отнасящи се до молекулярната патология на уротелния карцином.

В заключение трябва да се отбележи, че литературният обзор е написан на много добър, граматически издържан български език. Проличават уменията на д-р Попов за представяне на научната литература в определена област, и способността му да обсъжда, анализира и дискутира резултатите от различните проучвания, в опит да се даде повече яснота по изследваните актуални проблеми.

Цел и задачи. Целта на дисертационния труд : „Да се анализират и съпоставят ИХХ-характеристики на уротелния карцином на пикочния мехур с оглед откриването на критерии и белези с прогностично и предиктивно значение“, е точно и ясно формулирана, конкретна и адекватна на дисертационната тема. Тя, и произтичащите от нея 5 задачи са правилно конструирани и изпълними и представляват логично продължение на литературния обзор.

Формулираните 5 задачи се отнасят до: Проучване и анализиране на уротелните карциноми в стадий pTa и pT1 за 5-годишен период във връзка с клинично-морфологичните характеристики / пол, възраст, преживяемост до настъпване на локален рецидив, диференциация и стадий/; 2. Проучване и съпоставяне на клинично-морфологичните показатели между рецидивизиращите и нередицидивиращи УК на пикочния мехур; 3. Полуколичествен и количествен анализ на TATE и TATM във връзка с клинично-морфологичните показатели на рецидивизиращите и нередицидивиращи УК; 4. Оценка и сравняване ИХХ-експресията на FGF2 в туморната строма при инвазивни и неинвазивни УК; 5. Изследване на ИХХ- експресия на CK20, GATA3 и gp130 в туморния паренхим.

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 Клиниката и Катедрата по обща и клинична патология при УМБАЛ „Св. Марина“ и МУ-Варна. Обект на проучването са 163 пациента с папиларен уротелен карцином на пикочния мехур в стадий pTa и pT1, разпределени в две групи: Първа група- 95 пациента с УК без данни за ендоскопски рецидив в продължение на 5-год. период / 2007-2011 год/ след поставяне на диагнозата/ контролна група /и втора група- 68 пациента, с диагноза УК, с хистологично доказан рецидив за петгодишен период / 2007-2011г/ след поставяне на първоначалната диагноза. При двете групи са анализирани следните морфологични показатели: хистологичен тип, степен на диференциация и стадий на тумора.

В разработката дисертантът е включил голям набор от адекватни за целите на изследването методи, а именно: **1.Рутинни хистологични методи** за анализиране на морфологичните показатели хистологичен тип, степен на диференциация и стадий на тумора. Използваните фиксирани в 10% неутрален формалин материали са обработени по парафиновия метод, а срезите с дебелина 4 микрона са оцветени с ХЕ за оценка на промените в туморните строма и паренхим; **2.Специфични, хистохимични методи**, включващи полуколичествен и количествен метод за оценка на TATE и TATM върху препарати, оцветени с ХЕ, Гимза и толуидиново синьо /рН 2,5/, и **имунохистохимични методи на изследване**, с използван индиректен имунопероксидазен метод за ИХХ- анализ с помощта на mini KIT high Ph DAKO K8024, чрез който е оценена експресията на 4 антители: FGF2, GATA3, gp130 и CK20. 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 част от използваните антители, и визуализиращата система. Препаратите са сканирани с апарат Leica Aperio ScanScope AT2 device, с последващи анализи на сканираните образи с ImageScope V12.1.0.5029/Aperio/. Имунохистохимичната експресия д-р Попов е оценявал с помощта на H-score върху тъканни проби, като са определяни интензивността на експресията за всяка клетка в различни полета, а броят на позитивните клетки е оценен полуколичествено по приложена схема; H-скорът е изчислен по съответна формула.

Получените резултати са обработени чрез богат набор от статистически методи за анализ на данните: Дескриптивен анализ- за определяне на статистически величини; Кростабулация и Хи-квадрат при търсене на значими разлики; Корелационен анализ за оценка на зависимостта

между изследваните показатели; Анализ на преживяемостта до настъпване на рецидив чрез Kaplan-Meier test; Сравнителен анализ t-test Student, s; ROC Curve-графичен анализ за определяне ролята на точността и специфичността за предвидимост на определени показатели. Графичното и таблично изобразяване на статистическите данни е осъществено с помощта на Microsoft Office 2016.

Резултати и обсъждане

Резултатите от проведеното в дисертационната разработка изследване, наред с последващото обсъждане, представляват най-съществената и значителна част от дисертационния труд на д-р Попов, като демонстрират задълбоченост и опит за максимална обективност на автора. Следвайки поставените задачи, д-р Попов започва изложението им с аргументирано и системно представяне на резултатите от собствено проучване, анализирайки клинично-морфологични показатели възраст, пол, диференциация и стадий на тумора във връзка със свободната от рецидив преживяемост на пациентите с уротелен карцином на пикочния мехур, и сравнявайки ги с данните от литературата. При това много добре проличава умението на автора да борави добросъвестно с научната информация, изказвайки и собствено мнение по дискутираните въпроси.

Установената средна възраст на заболялите пациенти е 65,92 год. Сред тях най-голям е процентът на пациенти в групата 61-70 години / 35,3%/, а най-малък /1,5%/е този в групата 31-40 години. Доминират пациентите от мъжки пол / 119 /, а жените са значително по-малко на брой /44/. Сред заболялите преобладават тези с карцином в стадий pTa. По отношение степента на диференциация на уротелния карцином, по-голямата част са оценени като low grade /107/, докато пациентите с high grade степен на диференциация са 56.

Поради факта, че изследваните материали от трансуретрални резекции в голям процент от случаите не позволяват категоричното определяне на туморния стадий / pTa или pT1/, д-р Попов си позволява да раздели пациентите на две групи-с инвазивни и неинвазивни тумори, а според биологичното им поведение- на рецидивиращи и нересидивиращи тумори. Проследени са съответно клинично-морфологичните характеристики / възраст, пол, стадий и степен на диференциация/при двете групи пациенти. Д-р Попов насочва вниманието към факта, че използваният статистически анализ за преживяемост / Kaplan—Meier test / с оглед преценяване прогностичното значение на стадия на тумора доказва категорично прогностичното значение на инвазивните уротелни тумори /стадий pT1/ по отн. настъпването на рецидив, като времето до настъпването е много по-кратко / 8,12 месеца / в сравнение с това на групата от пациенти, при които туморът е в стадий pTa / 11,53 месеца /. При проследяване степента на диференциация и вероятността от настъпване на рецидив, същият тест показва, че тумори с low gr. диференциация имат по-продължителен свободен, без локален рецидив период на преживяване / 11,44 месеца /при сравнение с пациентите от групата с high gr.диференциация, чиято преживяемост до настъпването на локален рецидив е по-ниска / 8,8 месеца /.Подобна зависимост показва и проведеният корелативен анализ по Спирман- т.е., вероятността за локален рецидив е по-голяма при пациенти с УК с high grade, отколкото при пациенти с low grade диференциация на тумора.

Анализът м/у променливите възраст и стадий, възраст и диференциация, стадий и пол и диференциация и пол показва, че липсва статистически значима разлика между пациентите с настъпил рецидив и тези без развит се рецидив, докато статистически значимият Хи-квадрат

анализ между променливите стадий и диференциация показва, че процентната разлика в двете групи пациенти – с локален рецидив и тези без рецидив не е случайна, а значима – т.е., би показала сходно разпределение и в бъдеще. Между същите променливи е установена и статистически значима, права корелационна зависимост при рецидивиращите и нередидивиращи тумори, като и при двете групи преобладават туморите в стадий pTa и low gr. степен на диференциация. При разпределение на пациентите по клинично-морфологични показатели и месеците до настъпване на рецидив, авторът установява, че най-голям / 33 / е броят на пациентите с настъпил локален рецидив до 6 месеца, а най-малко /14/ са пациентите с развил се рецидив след повече от 12 месеца от появата на първичния тумор.

Д-р Попов прави задълбочен анализ на туморната строма, като последователно изследва TATE, TATM и FGF2- позитивните клетки във връзка с клинично-морфологичните показатели. Анализът на TATE показва, че при УК без настъпил рецидив броят на еозинофилите варира от 0 до 18,63 клетки на кв.мм, докато при рецидивиращите тумори вариращият брой е от до 37,69 кв.мм. В резултатите са показани и месеците до настъпването на рецидив, като най-рано събитието настъпва след един месец, а най-късно-след 48 месеца. Извършеният количествен анализ на интра и перитуморно разположените Ео-левкоцити с Mann-Whitney test показва, че има значителна разлика в броя на TATE в стромата на първичните тумори при пациенти и от двете групи в стадий pTa и pT1, като той варира от пълна липса, през умерено изразена, до висока плътност на Ео левкоцити. Количествената оценка на TATE в туморната строма и направеният ROC Curve анализ на двете групи пациенти показват, че статистически значимо по-изразена е TATE в първичното огнище на УК, при които има тенденция за рецидив. От кривите на Kaplan- Meier обаче проличава липсата на статистическа значима разлика между броя на еозинофилите в стромата и времето, свободно от рецидив / преживяемост без настъпил локален рецидив /. Високата статистическа достоверност между плътността на еозинофилите в стромата и настъпването на туморен рецидив, дава основание на д-р Попов да препоръча в случаите, когато при първична ендоскопска биопсия на УК се установява наличие на висок брой на еозинофили / над 5,17 брой/кв.мм, да се приеме, че съществува по-голям риск от развитие на локален рецидив.

При определяне броя на TATM в интра и перитуморната строма, д-р Попов установява вариации при двете групи пациенти- при УК без настъпил рецидив броят им се движи от 0--9,00 на кв.мм, а при рецидивиращите тумори броят варира от 0- 30,70 на кв.мм. Отбелязано е и времето до настъпването на рецидив, като най-рано той е настъпил един месец след диагностицирането на тумора, а най-късно - след 48 месеца. Полуколичественият анализ на интра и перитуморните мастоцити показва, че има значима разлика в броя им при рецидивиращите и нередидивиращи папиларни УК / Хи квадрат =13,49/. По същия начин количественият анализ с Mann-Witney test сочи, че има значителна разлика в броя на TATM в стромата на първичните тумори при пациентите от двете групи в стадий pTa и pT1. Количествената оценка на TATM и направеният ROC Curve показват, че по-голям е броят на мастоцити в първичното огнище на уротелни карциноми, които са с тенденция да рецидивират, като е установена статистическа значимост между броя на мастоцитите и вероятността от настъпването на рецидив. За разлика от тези резултати, кривите на Kaplan- Meier показват, че няма значителни различия в преживяемостта без настъпил локален рецидив между пациентите с голям брой, и тези с по-малък брой мастоцити в туморната строма, както и липсва значима разлика между броя на TATM и месеците до настъпване на локален рецидив. Проведеният ROC

Curve анализ обаче показва наличие на изразена статистическа значимост между броя на ТАТМ и вероятността от настъпване на рецидив. Все още липсващото задоволително обяснение за механизма на действие, което имат повишеният брой мастоцити в стромата на рецидивиращите карциноми, налага допълнителни изследвания в тази насока, с оглед изясняване на месата и ролята им на евентуални фактори, стимулиращи ангиогенезата, такива, участващи в директно активиране на цитотоксичните лимфоцити, или предизвикващи апоптоза на ендотелните клетки.

Интересен момент от разработката представлява проследената от д-р Попов цитоплазмената експресия на FGF2 в пери и интратуморните фибробласти, и в ендотелните клетки, тапициращи стените на кръвоносните съдове. Дисертантът установява различия в нивата на експресия на FGF2 между двете групи уротелни карциноми в стадий pTa и pT1. Прави впечатление резултатът от проведенния ROC Curve анализ, който показва, че високите нива на експресия на FGF2 в стромата се свързват с нисък потенциал на уротелните карциноми за инфильтрация в субмукозата, при висока статистическа значимост.

След анализа и оценката на изследваните прогностични и предиктивни фактори, произлизащи от туморната строма, д-р Попов прави анализ и на изследваните фактори от туморния паренхим – съотв. транскрипционния фактор GATA3, интрацитоплазмения цитокератин CK20 и сигнал-индуциращия рецепторен протеин gp130.

Проведеното ИХХ- изследване показва различия в нивата на експресия на GATA3 в ядрата на туморните клетки между групите на рецидивиращи и нередицидивиращи уротелни карциноми. ROC Curve анализът установява наличие на връзка между високите нива на ядрена експресия на GATA3 с вероятност за повишен риск от настъпване на локален рецидив при УК. Не се установява статистически значима разлика между GATA3 и изследваните клинично-патологични показатели. Кривите на Kaplan-Meier не показват съществени различия между пациентите с нива на експресия над cut off 155 за GATA3 и преживяемостта без настъпил рецидив при сравнение с тези, имащи ниски нива на експресия. Резултатите отчитат липса на статистически значима разлика в преживяемостта, въпреки че има по-голяма, но статистически незначима разлика в преживяемостта при пациенти с експресия на GATA3 с експресионни нива под cut off 155. Получените резултати от проучването дават основание да се предположи, че повишените нива на експресия на GATA3 корелират с повишен риск от настъпване на локален рецидив, но не могат да определят времето до настъпването му. Д-р Попов отбелязва, че от една страна данни от литературата сочат, че не се установява ядрена експресия при нередицидивиращите карциноми, докато при рецидивиращите експресията е интензивна, със статистическа значимост. Същевременно обаче има и данни, показващи, че повишените нива на GATA3 играят негативна роля по отн. степента на диференциация, стадия и прогнозата. Тук авторът се присъединява към мненията на някои автори, които, търсят обяснение за тези разнопосочни резултати в различната хистогенеза и регулаторни механизми на туморите, свързани с експресията на GATA3 от туморните клетки, като смятат, че е възможно тази експресия да се дължи на епително-мезенхимната трансформация на туморната микросреда, предполагаща повишена склонност към инвазия, локален рецидив и метастази.

Оценявайки експресията на CK20, и резултатът от ROC Curve анализа, д-р Попов стига до извода, че има връзка м/у установяващите се високи нива на цитоплазмена експресия на CK20, и туморите с low grade степен на диференциация, докато при уротелните карциноми с high grade

диференциация експресията на CK20 е силно редуцирана, или напълно липсва, и то при висока статистическа достоверност. За разлика от данни на други автори, при получените от д-р Попов резултати не се установява статистически значима разлика между нивата на CK20 и времето до настъпването на рецидив. Това дава основание на автора да изкаже мнение, че вариациите, установени в експресията на CK20 при уротелните карциноми не позволяват категоричното ѝ определяне като диагностичен, прогностичен и предиктивен техен маркер.

Проследената експресия на gr130 показва различия в двете групи уротелни карциноми с различна степен на диференциация – липсва експресия при low grade и е интензивна експресията при high grade уротелен карцином. Въпреки този резултат, от извършения ROC Curve анализ се вижда, че при оптимални гранични стойности на цитоплазмена експресия на gr130 от туморните клетки, не се установява връзка между експресионните нива и клинико-морфологичните показатели. Предполагамата от някои автори връзка между експресията на gr130 и агресивността на тумора не намира потвърждение в получените от д-р Попов резултати, което налага продължаване и задълбочаване на изследванията в тази насока.

В заключение, въз основа на получените в разработката резултати, показващи, че увеличеният брой еозинофили и мастоцити в туморната строма, позитивната експресия на GATA3 в ядрата на туморните клетки, и наличието на статистическа значимост между експресията на FGF2 и инвазивната способност на тумора, са белези в първичния тумор, които статистически предопределят по-високия риск от ранно локално рецидивирание, даващи основание на д-р Попов да предложи изграждане на общ профил на редивирация уротелен карцином, включващ изброени първостепенни, и допълнителни критерии, и подкрепен от фигура, представяща морфологичния вариант на този профил.

Изводи: От проведеното изследване са оформени 8 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 Попов е формулирал 8 приноса на дисертационния труд, разпределени в три групи: Три **научни приноса с оригинален характер, отнасящи се до:** А. Осъществена морфологична оценка на голяма група карциноми, интерполирани спрямо склонността към локален рецидив; 2. Доказана зависимост между плътността на ТАТЕ, мастоцитите и настъпването на локален рецидив. 3. Предложен е примерен морфологичен профил на рецидивирация уротелен карцином.

Два научни приноса са с потвърдителен характер: 1. Потвърдена е връзката м/у стадий, степен на диференциация и по-ранното настъпване на рецидив; 2. Потвърдено е значението на експресията на FGF2 и стадия на инвазивност.

Три от приносите са с научно-приложен характер, отнасящи се до това, че: А. Позитивната експресия на CK20 не може да бъде използвана като категоричен хистогенетичен маркер; Б. Потвърдена е връзката между високата експресия на CK20 и low grade степен на диференциация на тумора; В. Експресията на GATA3 от УК се свързва с настъпването на локален рецидив, но не може да бъде категоричен хистогенетичен маркер за произход на тумора.

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. И в трите публикации д-р Попов е на първо място като водещ автор.

Авторефератът е изготвен в съответствие с приетите научни изискванията. Той е отпечатан на 74 страници, включващи всички основни части на дисертационния труд, вкл.таблици и фигури. Съдържанието му дава достатъчно пълна представа за цялостния дисертационен труд, като отразява постигнатите резултати, направените изводи и приносите от разработката.

Критични бележки:

1. В съдържанието и описанието на резултатите към „Предиктивни и прогностични фактори“ са повторени „произлизащи от туморната строма“, вместо на второ място да е посочено „произлизащи от туморния паренхим“;
2. В раздела „Материал и методи“ не са отбелязани всичките фирмите-производителки, от които са закупени антителата
3. В 7-ми извод не е посочено кои нива от експресията на CK20 корелират с low gr. ст. на УК.

Заклучение:

Дисертационният труд на **д-р Христо Бойчев Попов** е представен в завършен и добре структуриран вид, написан е на издържан научно-литературен език и е резултат от задълбочено проучване, третиращо актуален проблем, отнасящ се до клинично-морфологичните характеристики на уротелните карциноми и възможностите за определяне на някои предиктивни и прогностични маркери, имащи отношение към диагностиката и лечението на тези тумори. Трудът, който се откроява с много добра литературна осведоменост и стил при интерпретацията на резултатите, е изцяло лично дело на докторанта. Целта на разработката е постигната, поставените задачи са изпълнени. Изводите с малки изключения са точни и ясно формулирани. Приносите имат не само научна, но и практическа стойност и представляват база за изпълнение на бъдещи научно-изследователски проучвания. Резултатите са онагледени в прегледен и добре оформен табличен и графичен вид и с цветни фигури с много добро качество. Представените публикации и научни съобщения отговарят на изискванията.

Получените резултати и приносите в дисертационния труд на д-р Попов отговарят на всички изисквания на ЗРАСРБ, Правилника за неговото прилагане и Правилника на МУ-Варна. Дисертационният труд показва, че д-р Попов притежава необходимите теоретични знания и умения по научната специалност Патологична анатомия, като демонстрира качества за самостоятелно провеждане на научно изследване. Независимо от критичните ми забележки, имайки предвид отговорността, с която д-р Попов е пристъпил към разработване на темата, постигнатите резултати, направените изводи и безспорните приноси, давам своята **положителна оценка** на предложения дисертационен труд, като заявявам пред уважаемите членове на Научното жури, че гласувам „ЗА“ /положително / присъждането на ОНС „Доктор“ на д-р Христо Бойчев Попов по научната специалност „Патоанатомия и цитопатология“.

14.07.2020
Варна

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

