

РЕЦЕНЗИЯ

ПО КОНКУРС ЗА ОНС „ДОКТОР“ Протокол №1/04.11.2024г

**В МУ-ВАРНА, КЪМ КАТЕДРА „ОБЩА И КЛИНИЧНА ПАТОЛОГИЯ, СЪДЕБНА
МЕДИЦИНА И ДЕОНТОЛОГИЯ“, ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНА**

От Доц. д-р Силвия Николаева Генова, дм,

Катедра „Обща и клинична патология“

МУ-Пловдив

на дисертационен труд за придобиване на образователна и научна степен „Доктор“

Заповед № Р-109-357/ 25.10.2024 г. по процедура за придобиване на ОНС „доктор“ по
докторска програма научна специалност 7. Здравеопазване и спорт,

Професионално направление 7.1. Медицина;

Докторска програма *„Патологоанатомия и цитопатология“*, шифър 03.01.03

Автор: д-р Невена Желязкова Янулова

Форма на докторантурата: редовна подготовка

Катедра: „Обща и клинична патология, съдебна медицина и деонтология“, МУ-Варна

Тема: *АПОПТОЗА И НЕКРОПТОЗА ПРИ БЪБРЕЧНОКЛЕТЪЧЕН КАРЦИНОМ*

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

„Обща и клинична патология, съдебна медицина и деонтология“, МУ-Варна

1. Общо представяне на процедурата и докторанта

Представеният комплект материали на хартиен /електронен носител е в съответствие с
Представеният комплект материали на хартиен /електронен носител е в съответствие с Чл. 70
(1) от Процедура за придобиване на ОНС „доктор“ в МУ – Варна; Правилник за развитие на
академичния състав на МУ-Варна от 08.07.2024 г. и включва всички необходими
документи.

Докторантът е приложил две пълнотекстови публикации в рецензирани списания,
където е първи автор.

2. Кратки биографични данни за докторанта

Д-р Невена Желязкова Янулова придобива магистърска степен по Медицина през 2013
г. МФ на Медицински университет „Проф. Д-р Параскев Стоянов“ гр. Варна. От 2020 г. е
редовен асистент към Катедрата по Обща и клинична патология, съдебна медицина и

деонтология, МУ „Проф. д-р Параскев Стоянов” гр.Варна. От 2020 докторант на редовна подготовка.

Д-р Янулова придобива специалност по Обща и клинична патология през 2019 г. Участвала е в три научни проекта със значителен научен принос. Владее английски език, писмено и говоримо.

3. Актуалност на тематиката и целесъобразност на поставените цели и задачи:

Темата на дисертационния труд е актуална и не повтаря други проучвания у нас във връзка с експресия на маркера за апоптоза (Апоптозо Индуциращ Фактор- AIF) и некроптоза (RIPK3) при Бъбречноклетъчни Карциноми (БКК) .

Дисертационният труд съдържа 169 стандартни страници и е онагледен с 80 таблици и 65 фигури. Литературната справка включва 266 литературни източника, от които 5 на кирилица.

БКК представлява повече от 80% от злокачествените образувания на горните пикочни пътища и 3% от всички малигнени тумори. Отличават се два възрастови пика на повишена заболеваемост-около 40 годишна възраст и в интервала между 50 и 70 години. Приблизително 40% от пациентите с този карцином умират поради прогресия на заболяването, а некроптозата играе ключова роля в множество аспекти на туморната биология, онкогенеза, туморни метастази и туморен имунитет. БКК се характеризира с неконтролирана клетъчна пролиферация, липса на клетъчна смърт и силна резистентност на конвенционална химиотерапия. В тази насока считам, че избраната тема е актуална и може да осигури базисни резултати за туморна терапия и ефективно регулиране на некроптозата в БККи.

Докторантката разглежда различните форми на клетъчна смърт с морфологични белези на некроза, която се регулира по програмиран начин чрез определени пътища за сигнално предаване. За да се разбере молекулярният механизъм на некроптозата, болшинството от проучванията са насочени към изследване на тумор некротизиращия фактор алфа (TNF α), рецептор взаимодействащата протеин киназа 3 (RIPK3) и каспаза-8, както и молекулярните пътища за активиране и деактивиране и взаимодействие между компонентите на некроптозата в клетката. Преминаването на некроптотични сигнални компоненти през ядрото е механизъм за регулиране на образуването на цитозолна некрозома и форма на регулиране на некроптотичната клетъчна смърт, а инхибирането на клетъчната смърт е отличителен белег на малигнените тумори.

В представеният ми дисертационен труд докторантката проучва за първи път в нашата страна апоптозата и некроптозата, ядрената и цитоплазмена експресия на AIF и RIPK3 при карциноми бъбрека и прави обширен анализ на експресията на маркера за некроптоза в туморните клетки съобразно хистологичния вид на тумора, Т-стадия на туморите, T1L, метастазите, клиничните данни и преживяемостта на пациентите с БКК.

4. Познаване на проблема

Въведението представя проблемите свързани с Бъбречно-клетъчния карцином (БКК), етиология, патогенеза и основните терапевтични методи при пациенти с карциномите на бъбрека, като умело насочва към нерешените научни, диагностични и прогностични проблеми по тематиката. Литературният обзор е изключително подробно представен на 50 страници, онагледен с 12 адаптирани фигури и показва богата литературна справка и задълбочено познаване на проблематиката.

Литературният обзор започва с епидемиология, етиология и рискови фактори за развитието на карцинома на бъбрека. Разгледани са фамилната обремененост; индивидуалните особености; генетична предиспозиция, като са представени най-новите данни за наследствени синдроми, при които се развиват тумори на бъбреците в по-ранна възраст и необходимостта от молекулярно-генетичен анализ. Изведени са новите генетично свързани синдроми с BRCA1-свързаният протеин-1 (BAP1) ген предразполагащ към ранно развиващ се фамилен БКК, Синдромът на наследствената лейомиоматоза и БКК, Наследственият папиларен карцином на бъбрека, Хамартомният туморен синдром PTEN .

Д-р Янулова акцентира върху новата хистопатологична класификация на туморите на бъбрека, която е актуализирана през 2022 г. От Световната здравна организация (СЗО), диагностиката на която се базира на светлинната микроскопия, имунохистохимичните изследвания и възможните, асоциирани, основни молекулярни промени. Класификациите са онагледени с таблици, което спомага за точната и бърза ориентация в тематиката, а по-нататък докторантката използва новите класификационни подходи за разработване на докторския си труд.

Прогностичните и предиктивни фактори, както и степен на диференциация в съответствие със *СЗО, 2022 год. според Класификация на туморите на Световната здравна организация/ Международното дружество по урологична патология (WHO/ISUP)* са обсъдени на 15 страници, като са включени и агресивните варианти: като БКК със саркоматоидна и рабдоидна диференциации. Подробно е представено TNM стадирането, след което докторантката преминава към туморната некроза и апоптоза, като отбелязва, че

присъствието или отсъствието на туморна некроза при БКК задължително трябва да бъде включено в рутинния отговор на патолога като прогностичен фактор.

На 13 страници са разгледани основните пътища за осъществяване на апоптозата, външен и вътрешен път на апоптоза, морфологична характеристика на апоптозата, апоптозо-индуциращият фактор, данни за съществуването на алтернативни сигнални пътища, които инициират асоциирани с програмираната клетъчна смърт събития. Един от тези пътища е каспаза-независим и е медиран от апоптозо-индуциращия фактор (AIF). При БКК се установява, че имунохистохимичната експресия на AIF в туморната тъкан е понижена в 84% от случаите и това понижение е свързано с делеция на AIF и метилиране на неговия промотор.

За да се обясни механизмът на TNF α индуцираната некроптоза и рецептор-взаимодействащите протеини и клетъчните пътища включващи некроптоза, обясненията в текста са онагледени с 5 подробни фигури, които спомагат да се разбере ролята на RIPK3 в онкогенезата. RIPK3 участва също и в процесите на растеж и прогресия на неоплазмите. Установени са четири основни механизма, чрез които RIPK3 може да стимулира туморния растеж. RIPK3 участва също и в процесите на растеж и прогресия на неоплазмите. Докторантката разглежда проявите на RIPK1, RIPK3 и MLKL в различни туморни тъкани като: Коло-ректален карцином, панкреатичен карцином, простатен карцином, недребноклетъчен карцином на белия дроб, карцином на гърдата, малигнен меланом и остра миелоидна левкемия, като оценя поотделно постигнатите резултати и умело преминава към поставянето на конкретни цели за настоящият дисертационен труд.

Анализът на литературния обзор е обсъден като заключение и отбелязва, че данните за влиянието на некроптозата при развитието и прогресията на БКК са твърде оскъдни и нараства необходимостта от нови и различни стратегии за терапия на неповлияващите се от класическата терапия случаи при БККи. Туморните клетки на бъбречния карцином са устойчиви на вътрешния и външен път на апоптозата, която може да се осъществи и по друг, алтернативен път, който е каспаза-независим и участник в него е AIF. Ролята на AIF при БКК е слабо проучена и са необходими допълнителни изследвания, поради което той е обект на настоящото проучване. Докторантката отбелязва необходимостта от допълнителни задълбочени проучвания върху ролята на RIPK3 по отношение развитието на туморите, прогресията, метастазите, възникването на рецидиви, както и на анти-туморния имунитет при БКК, а също и на корелацията ѝ с клинично-морфологичните показатели.

Цел и задачи: Целта е формулирана ясно и точно, а именно проучване на имунохистохимичната експресия на маркера за апоптоза, apoptosis-inducing factor (AIF) и

маркера за некроптоза, Receptor-interacting protein kinase 3 (RIPK3) при пациенти с бъбречноклетъчен карцином и определяне на прогностичната им стойност.

Определените 6 задачи значително надхвърлят по обем поставената цел. Докторантката залага да проучи апоптозата AIF и некроптозата RIPK3 както в туморната, така и в съседната нетуморна тъкан, в метастатични лезии и да направи сравнителен анализ на получените резултати. В Задачите 5 и 6 се залага да се сравнят маркерите AIF и RIPK3 с клинично-патологичните показатели: пол, възраст, стадий на тумора, хистологичен вид, степен на диференциация, туморни некрози, тумор-инфилтриращи лимфоцити, съдовата инвазия, преживяемост на пациентите, както и да се определи прогностичната им роля при бъбречния карцином.

5. Методика на изследването

Ретроспективно са включени общо 80 пациенти, разпределени в 3 групи по хистологичен вид (ПК-папиларен карцином, ХК-хромофобен карцином и СКК). Използваният в проучването материал е достатъчен за получаване на статистически достоверни резултати. Пациентите от подбраните случаи, са биопсирани и/или оперирани в УМБАЛ „Св.Марина“ – Варна. Методите на изследване са съвременни и тяхното отчитане, описание и коментари показват, че дисертантът умело си служи с тях.

Ясно и точно са определени критериите на стадиране, степен на диференциация, площ на некрозата, интензитет на TILs и критерии за оценка в туморите. Избраната методика на изследване позволява постигане на поставената цел и получаване на адекватен отговор на задачите, решавани в дисертационния труд. Имунохистохимичната експресия на AIF е оценена полуколичествено чрез използване на H-score (histo-score) върху тъканни срезове и оценка на ядрената експресия на RIPK3. Процентът на позитивните клетки за всеки отделен интензитет е пресметнат, като H-score е изчислен посредством формула.

Статистически методи: Обработката и анализът на данните са извършени със статистическия пакет IBM SPSS ver. 21, а графиките са построени в Microsoft Excel. Трябва да се отбележи изключително добрата и подробна статистическа обработка на материалите, което дава достоверност на получените резултати, напълно отговарящи на поставената цел и даващи възможност за статистическа обработка. Резултатите са представени в обобщен вид в таблици и са илюстрирани с подходящи графики: тип бокс плот, стълбовидни графики, изчислени са и кривите на преживяемост. Избраната методика на изследване позволява постигане на поставената цел и получаване на адекватен отговор на задачите, решавани в дисертационния труд.

По резултати и обсъждане: Глава Резултати е представена на 79 стандартни страници, онагледени с 52 фигури и 70 таблици. Веднага прави впечатление изключително подробното и задълбочено представяне и онагледяване на проведените изследвания.

Получените от д-р Янулова резултати, са отлично обяснени и онагледени, коректно описани, логически подредени и придружени от добре структурирани таблици, фигури и снимки. Качеството на снимковия материал по отношение на рутинното микроскопско и имунохистохимично изследване мога да определя като отлично. По поставените задачи на дисертационния труд са определени цитоплазмената и ядрената експресии на AIF и RIPK3 в туморната и нормалната тъкани на всичките 80 пациенти. Средната стойност на цитоплазмена експресия на RIPK3 е определена чрез H-score.

По някои от статистически значимите резултати на д-р Янулова се установява зависимост между Т стадия и тумор-инфилтриращи лимфоцити. Статистически значима зависимост докторантката установява между степента на разпространение на туморните некрози (ТН) и хистологичния вариант на БКК. При настоящото проучване преобладават СКК и ПК с ТН. Присъствието на ТН е независим предиктор за общата преживяемост при пациентите със СКК и ПК. Др Янулова установява, че около една пета от пациентите без метастази в регионалните лимфни възли (N0) имат некроза над 30%. В десният бъбрек се наблюдават повече случаи с некроза, над 30%, в сравнение с левия. Във връзка с пола на пациентите при почти 92% от туморите в женския пол няма TILs, докато при мъжкия пол този дял е 50%.

Д-р Янулова установява, че при авансирал бъбречноклетъчен карцином (Т3 и Т4 стадий) туморите показват по-ниска степен на диференциация, по-голяма по площ некроза, по-висок интензитет на TILs и имат по-висок риск от настъпване на смърт в сравнение с по-ранните стадии на карцинома .

Туморната некроза по-често се среща при папиларния бъбречноклетъчен карцином, отколкото при хромофобния му вариант. От клинико-морфологичните показатели голямата по площ туморна некроза корелира с лимфоваскуларната инвазия.

При липса на съдова инвазия преживяемостта на пациентите с бъбречноклетъчен карцином е по-висока в сравнение с пациентите при които тя присъства.

Преживяемостта на пациентите с бъбречноклетъчен карцином намалява с увеличаване на възрастта на пациентите и на площта на туморната некроза. Тя е по-продължителна при мъжкия в сравнение с женския пол.

По задачи 2 и 3 по отношение на експресията на AIF докторантката не открива статистически значима разлика в цитоплазмения интензитет на AIF в туморната и

нетуморната тъкани на бъбречноклетъчния карцином, като експресията на AIF в цитоплазмата на туморните клетки е по-висока в сравнение с ядрената експресия.

Д-р Янулова не установява корелация на нуклеарната експресия на AIF при бъбречноклетъчен карцином с никой от изследваните клинично-морфологични показатели: възраст, пол, хистологичен вариант, степен на диференциация на карцинома, туморна некроза, TILs, съдова инвазия, T, N и M стадия, локализацията на тумора и преживяемостта на пациентите. В цитоплазмата на папиларния бъбречноклетъчен карцином, експресията на апоптозо-индуциращия фактор е по-висока от тази на светлоклетъчния вариант, като разликата е статистически значима. Експресията на AIF в цитоплазмата на туморните клетки при T1 стадий е по-висока в сравнение с T3 стадия, което също се явява прогностичен фактор.

По отношение на RIPK3 в цитоплазмата на туморните клетки д-р Янулова установява, че той намалява в сравнение със съседната нетуморна тъкан. Цитоплазменото ниво на RIPK3 в туморните клетки е по-високо в сравнение с ядреното съдържание.

Правилният избор на използваните статистически методи допринася за коректността на направените изводи. Всеки резултат е придружен с обяснение и статистически изводи.

6. Характеристика и оценка на дисертационния труд

Докторантката прави подробен сравнителен анализ на цитоплазмената и ядрена експресия на RIPK3 AIF и некроптозата RIPK3 както в туморната, така и в съседната нетуморна тъкан, в метастатичните лезии и прави сравнителен анализ на получените резултати в зависимост от възрастта на пациентите, хистологичния вид на тумора, T-стадия на туморите, метастазите, и преживяемостта на пациентите с БКК. Проведените изследвания и изпълнените резултати напълно отговарят на поставените задачи. Направен е паралел между данните в литературните източници, световния опит и постигнатите собствени резултати. Обсъждането е на много добро ниво, с ясен и точен научен и статистически език и стил. Използвани са 266 литературни източника, от които 5 са от български източници, като е отразен и опитът на наши проучвания в областта на некроптозата при карциноми на гърдата, простатни и колоректални карциноми.

7. Приноси и значимост на разработката за науката и практиката.

Формулирани са 18 извода, 2 научни приноса с оригинален характер и 5 научни приноса с практическо-приложен характер. Изводите са въз основа на статистическата корелация на изследваните случаи и практическата интерпретация на резултатите според поставените задачи. По отношение на приносите докторантката за първи път в България

определя прогностичната и предиктивна стойност на AIF и RIPK3 при пациенти с БКК. Оценени са имунохистохимично чрез AIF и RIPK3 процесите на апоптоза и некроптоза като прогностични и предиктивни маркери.

За първи път се прави комплексен клинико-морфологичен и имунохистохимичен анализ на AIF и RIPK3, във връзка с основните клинико-морфологични показатели като възраст, площ на туморната некроза и съдовата инвазия като прогностични фактори за намалена преживяемост при пациенти с БКК.

Потвърден е морфологичният профил на авансиращия бъбречноклетъчен карцином по отношение на степента на диференциация, туморната некроза, инфилтрацията на TILs и е оценен рискът от настъпването на смърт. Докторантката доказва, че цитоплазмената експресия на AIF при бъбречноклетъчен карцином има отношение към лимфоваскуларната инвазия и авансиране на тумора.

Един от значимите оригинални приноси на проучването е комплексният клинико-морфологичен и имунохистохимичен анализ на бъбречноклетъчния карцином във връзка с преживяемостта на пациентите.

Основно постижение на научния труд е формулиране и обосновка на нова хипотеза по отношение на ролята на апоптозата и некроптозата при БКК. Д-р Янулова доказва с нови средства съществени нови страни в съществуващия научен проблем. Получените нови факти доказват ролята на AIF и RIPK3 в прогресията и преживяемостта на БКК и дават перспективи за развитие на проучванията в тази област.

8. Преценка на публикациите по дисертационния труд. Д-р Янулова представя две пълнотекстови публикации в рецензирани списания, където е първи автор.

10. Автореферат. Авторефератът е написан на 67 страници и е изработен според изискванията, включва основни части на дисертацията, необходимия обем таблици, фигури и снимки. Съдържанието на автореферата дава отлична представа за цялостния дисертационен труд и отразява основните резултати, изводи и приноси.

11. Критични забележки и препоръки

Нямам критични забележки към оформянето на дисертационния труд, към проведеното изследване и предоставения комплект материали.

12. Лични впечатления

От така представения дисертационен труд, считам, че д-р Янулова самостоятелно е разработила темата, а показаните резултати я определят като отговорен, старателен и последователен млад учен, който много добре борави с научни източници и факти, умее да анализира, съпоставя и обобщава получените резултати, има аналитично и практично

мислене. Видно е, че д-р Янулова показва завидна последователност и амбиция да работи в областта на науката и да се развива в избраното професионално направление.

13. Препоръки за бъдещо използване на дисертационните приноси и резултати.

Препорачвам големият брой резултати в настоящият труд да бъдат публикувани в списания и изнесени на национални и международни форуми, както и използване на данните, резултатите и обобщаване на литературата в монографичен труд.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В заключение искам да кажа, че е направено огромно проучване, дори надвишаващо стандартните изисквания за докторантски труд. Дисертационният труд съдържа научни, научно-приложни и приложни резултати, които представляват оригинален принос в науката и отговарят на всички изисквания на Закона за развитие на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ), Правилника за прилагане на ЗРАСРБ и Правилника на МУ - Варна. Предоставените материали и дисертационни резултати напълно съответстват на специфичните изисквания, приети във връзка с Правилника на МУ – Варна за приложение на ЗРАСРБ.

Дисертационният труд показва, че докторантката Д-р Янулова **притежава** задълбочени теоретични знания и професионални умения по научна специалност 7. Здравеопазване и спорт, професионално направление 7.1. Медицина; като **демонстрира** качества и умения за самостоятелно провеждане на научно изследване. Въз основа на гореизложеното, убедено давам своята **положителна оценка** за проведеното изследване, представено от рецензираните по-горе дисертационен труд, автореферат, постигнати резултати и приноси, и **предлагам на почитаемото научно жури да присъди образователната и научна степен 'доктор'** на Д-р Янулова в докторска програма по „Патологоанатомия и цитопатология“ и призовавам **останалите членове на почитаемото научно жури също да гласуват положително.**

03.12.2024. г.

Рецензен

Заличено на основание чл. 5,
§1, б. „В“ от Регламент (ЕС)
2016/679

Доц. Д-р Силвия Генова, дм

(ак. дл., име и фамилия, н. ст.)