

## СТАНОВИЩЕ

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

специалност патология и цитопатология, МЦ „СИТИ ЛАБ“ ЕООД-Варна

### относно защита на

дисертационен труд на д-р Невена Желязкова Янулова, докторант в редовна форма на обучение в докторска програма „Патологоанатомия и цитопатология“ към Катедра по „Обща и клинична патология, съдебна медицина и деонтология“ при МУ-Варна, за присъждане на образователна и научна степен „Доктор“ в област на висше образование 7. Здравеопазване и спорт, професионално направление 7.1. „Медицина“, научна специалност „Патологоанатомия и цитопатология“

на тема „Апоптоза и некроптоза при бъбречноклетъчен карцином“

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

Съгласно зап. № Р-109-357/25.10.2024 г. на Ректора на МУ-Варна проф. д-р Димитър Райков, дмн, предвид доклад с вх. № 102-2657/04.10.2024 год. от доц. д-р Деян Л. Дженков, д.м, Р-л Катедра по „Обща и клинична патология, съдебна медицина и деонтология“ с решение на ФС по протокол № 28/14.10.2024 г. и доклад с вх. № 103/6909 от 22.10.2024 г. от проф. д-р Йото Йотов, дмн, Декан на ф-т „Медицина“ в МУ-Варна на основание чл. 24 ал.6 и чл. 30 ал.3 от ППЗРАСБ, чл. 68, ал. 1 от Правилника за развитие на академичния състав в МУ-Варна, д-р Янулова, докторант в редовна форма на обучение в докторска програма „Патологоанатомия и цитопатология“, професионално направление 7.1., зачислена със заповед № Р-109-444/28.10.2020 г. от Ректора на МУ-Варна, е отчислена с право на защита / по предложение на доц. Деян Л. Дженков, д.м, Р-л Катедра/ извадка от протокол № 425/03.10.2024 .от Катедрен съвет на Катедрата по „Обща и клинична патология“ при МУ-Варна/. Съгласно същата заповед Р-109-357/25.10.2024 г. съм избрана за външен член на НЖ, а на основание Протокол № 1/04.11.2024 г. съм определена да изготвя становище /на български и английски език/ по процедура за придобиване на ОНС „ДОКТОР“ с кандидат д-р Невена Желязкова Янулова в Медицински Университет- Варна.

Докторантката е положила успешно изпити за докторантски минимум / на 25.02.2024 г. и за чужд език /на 01.- 02.10.2020 год. ниво В1 CEFR/. За конкурса д-р Янулова е

представила на хартиен и електронен носител комплект материали, включващи необходимите документи в съответствие с изискванията на Закона за развитие на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ), Правилника за приложението му и ПРАС в МУ-„Д-р Параскев Стоянов“- Варна.

### **Кратки биографични данни и кариерно развитие на докторантката**

Д-р Невена Желязкова Янулова е родена на 21.02.1987 год. в гр. Добрич. Средното си образование /в периода м. 09.2001- м. 05.2006 г./ с профил „Биология и химия“ е завършила в Природо-математическата гимназия “Иван Вазов“- гр. Добрич. През 2007 год. д-р Янулова е приета за студентка в МУ „Проф. д-р Параскев Стоянов“- Варна, където през 2013 г. завършва висшето си образование по „Медицина“. С протокол № 622/10.09.2013г. на Държавна изпитна комисия д-р Янулова придобива професионална квалификация **МАГИСТЪР-ЛЕКАР** /диплома серия МУВ, № 001588, рег. № 002.386/06.11.2013 г./. От м.07.2014- 06.2018 год. д-р Янулова е специализант по „Обща и клинична патология“ в база за специализация УМБАЛ „Св.Марина“- Варна. Считано от 01.януари 2019 год., след успешно положен държавен изпит, на д-р Янулова ѝ се признават правата на специалист по „Обща и клинична патология“./рег. № 022568/01.март 2019, серия МУВ-2019, № 4090. От м.12.2013-до м.06.2014 г. д-р Янулова работи като лекар-ординатор в отделение по патология при МБАЛ- Добрич, а от м. 09.2015 до 09.2018 год. е хоноруван асистент в Катедрата по обща и клинична патология. От м.04.2019 год. е лекар- асистент в Клиниката по Обща и клинична патология, а през периода 09.2019- 03.2020 год. работи като асистент по заместване в Катедрата по патология. През м.03. 2020 год. след конкурс д-р Янулова е назначена за редовен асистент в Катедрата по „Обща и клинична патология, съдебна медицина и деонтология“ в МУ - Варна.

Като докторант и специализант д-р Янулова взема активно участие както в научно-изследователската, така и в диагностичната-биопсична и аутопсионна дейност на Клиниката и Катедрата по патология при МУ и УМБАЛ- Варна. Д-р Янулова има общо 9 години преподавателски стаж като асистент / на хонорар, по заместване и редовен/. Научните ѝ интереси са насочени основно към ендокринната и бъбречна туморна патология. В стремеж непрекъснато да повишава квалификацията си, д-р Янулова е вземала активно участие в редица престижни научни прояви – конгреси, конференции, и др., проведени у нас. За периода от 2017 г. до 2023 год. тя е участвала като автор в

колектив в два Национални конгреса и две национални конференции, проведени у нас, представяйки общо 8 постера и доклад на теми от областта на туморната патология, включващи бъбречни, пигментни и др. туморни лезии. Дисертантката има 2 публикации с IF в реферирани издания – една в „Cureus“ 2021 г. и една във „Folia medica“ от 2018 г.

Д-р Янулова е член е на БЛС и на БДП. Владее на много добро ниво писмено и говоримо английски език, има добра компютърна грамотност и комуникационни умения, придобити по време на работата ѝ като специализант и асистент по патология. Притежава добре координирани организационни умения, позволяващи ѝ бърза адаптация, презентационни умения, умения за работа в екип и владее на офис- пакет.

Д-р Янулова е участвана активно при разработване на три проекта по фонд „Наука“ към МУ-Варна, на теми, отнасящи се до:

1. „Предиктивна и прогностична роля на ИХХ- експресия на апоптозо-индуциращ фактор /AIF/ и на RIPK3- маркер за некроптоза при БКК“, МУ-Варна, Фонд „Наука“ 2021 год;
2. „Изследване нива на експресия на ИХХ-маркер за апоптоза и некроптоза при базоцелуларен и спиноцелуларен карцином“; Фонд „Наука“ 2021 г. МУ-Варна;
3. „РН/-/ миелопролиферативни неоплазми- морфологична и имунохистохимична характеристика“ - фонд „Наука“ 2016 г. МУ-Варна.

#### **Актуалност и значимост на темата**

Темата на дисертационния труд на д-р Янулова, отнасяща се до възможностите за диагностика и лечение на бъбречноклетъчния карцином /БКК/ не престава да бъде актуална и с изключително голяма социална значимост, като се има предвид, че този особен по произход и начин на протичане карцином продължава да бъде една от основните причини за загуба на трудоспособност и за смъртен изход най-вече при пациентите от мъжки пол. БКК не е сред често срещаните се тумори при човека. Въпреки това, понастоящем се наблюдава непрекъсната тенденция за нарастване броя на заболялите, като през последните 50 години честотата му се е повишила повече от 2 пъти. По данни на GLOBOCAN през 2020 г. БКК е бил причина за настъпване на смърт при около 180 000 случая в света. Тенденцията за повишаване на заболяемостта е особено изразена сред жителите на Европейските страни и сред по-младите индивиди. В

България по данни на НРР-София, за 2016-2017 год. бъбречните тумори са се класирали на осмо място сред мъжете .През 2017 год. при тях са диагностирани 474 нови случая, като 91 от заболялите са били на възраст 65-69 год. При жените са регистрирани 244 случая, от които 46 във възрастовата група 70-74 год. За област Варна през същата година са диагностицирани 55 нови случая при двата пола. Наблюдавана е тенденция за повишена заболяемост от БКК на 100 000 души за периода 1980- 2016 год, като при мъжете повишението е от 2,1 за 1980 г. до 8,4 за 2017 г.; при жените - от 1,4 на 3,8.

Наличието на все още недостатъчно проучени въпроси, свързани с морфологичната характеристика и биологичното поведение на БКК налагат провеждане на системни клиничко-морфологични и ИХХ- изследвания, които биха помогнали за определяне терапевтичния подход при всеки един от случаите. В този аспект изясняването на прогностичната и предиктивна роля на RIPK3 и AIF /маркери за клетъчна смърт некроптоза и апоптоза / може да допринесе за разкриване на нови сигнални пътища и разработване на нови терапевтични стратегии, още повече като се има предвид, че в литературата има само оскъдни данни за изследване на некроптозата в експериментални условия, и липсват такива за изследване при хора. Много от проблемите, свързани с клиничните прояви и морфологичната диагностика на БКК не са напълно изяснени, дори в част от случаите са с противоречив характер, а това налага търсене на други възможности за диагностика и приложение на новоразработени молекули с потенциал за туморни маркери и провеждане на таргетна терапия. В този аспект темата на представения научен труд е актуална и дисертационна, а проблематиката и съдържанието - многоаспектни- факт, налагащ изискване за компетентност от изпълнителя и достатъчен, богат изследователски опит при разрешаването на поставените задачи-проблем, с които д-р Янулова се е справила блестящо.

### **Структура на научния труд**

Представеният дисертационен труд е написан на 169 страници и е във вид и обем, отговарящи на изискванията на ЗРАСРБ и Правилника на МУ-Варна. Трудът е онагледен с 80 таблици и 65 фигури и включва следните части: Титулна страница /1 стр/; Съдържание /3 стр/; Въведение (2 стр.), Използвани съкращения /1 стр/; Литературен обзор (49 стр.), Цел и задачи (1 стр.), Материали и методи (8 стр.), Резултати и обсъждане /80 стр/; Изводи (2 стр.), Заключение (2 стр.), Приноси (1 стр.), Списък на публикациите, свързани с дисертационния труд (1 стр.), и Използвана литература (20 стр.).

Библиографската справка включва 266 източника, от които 5 са на кирилица и 261- на латиница.

Литературният обзор впечатлява с извършения задълбочен анализ на достъпната литература и показва много добрата осведоменост на д-р Янулова по разработената тема.. Представените в достъпен и обобщен вид данни от обзора показват уменията на авторката не само да прави анализ на литературните източници, но и да обръща внимание на съществуващите по някои пунктове спорни въпроси. При структурирането на обзора д-р Янулова е насочила вниманието си към проблеми, свързани с епидемиология, етиология /с генетична предиспозиция/ и най-вече с трите рискови фактори- затлъстяване, хипертония и тютюнопушене. Като рисков фактор се приема и предшестващо бъбречно заболяване- най-често поликистоза; представена е морфологична- макроскопска характеристика на БКК, както и имащата най-голямо значение за практиката нова, актуализирана хистопатологична класификация на СЗО от 2022 год; направен е преглед на прогностичните фактори при БКК; представени са видовете степен на диференциация, TNM-стадиране; туморната некроза-с акцент върху прогностичната ѝ роля; микроваскуларна инвазия; голямо внимание е отделено при разглеждане формите на клетъчната смърт: апоптоза-със сигналните пътища и морфологичната ѝ характеристика; апоптозо-индуциращ фактор /AIF/ и експресията му при малигнени тумори; некроптоза-сигнални пътища и механизми за осъществяването ѝ; роля на свързания с некроптозата маркер RIPK3 в онкогенезата; заключение.

В заключението, завършващо литературния обзор, д-р Янулова убедено поставя акцент върху налагащата се необходимост от провеждане на допълнителни проучвания, отнасящи се до взаимодействията между маркерите AIF и RIPK3 и някои от факторите на околната среда, развиващи се при туморна прогресия и метастазиране. Авторката подчертава значимата роля, с помощта на която тези изследвания биха допринесли за изясняване на съществуващите при БКК зависимости с някои неблагоприятни клиничко-морфологични параметри.

**Цел и задачи:** Целта на настоящото изследване е „Да се проучи имунохистохимичната експресия на маркера за апоптоза / AIF/и маркера за некроптоза /RIPK3/ при пациенти с бъбречноклетъчен карцином и да се определи прогностичната им стойност. За постигането на тази цел дисертантката си е поставила 6 задачи, отнасящи се до: 1. Проучване и сравняване на клиничко-морфологичните характеристики във връзка



с преживяемостта на селектираните пациенти с БКК; 2. Определяне ИХХ- експресия на AIF в туморната тъкан на БКК и сравняването ѝ с тази от съседната нетуморна тъкан; 3. Извършване на полуколичествена оценка на ИХХ-експресията на RIPK3 в туморната тъкан на БКК и сравняването ѝ със съседната нетуморна тъкан; 4. Оценка на ИХХ- експресията на AIF и RIPK3 в метастатичните лезии на селектираните случаи с хистологично верифицирани метастази и сравнение с експресията им в първичния тумор; 5. Изследване ИХХ- експресията на AIF и RIPK3 във връзка с клиничко-патологичните характеристики на пациентите с БКК- пол, възраст, туморен стадий, хистологичен вид; степен на диференциация, туморна некроза; ТИЛ и съдова инвазия; 6. Анализ на маркера за апоптоза AIF и маркера за некроптоза RIPK3 във връзка с преживяемостта на пациентите и определяне прогностичната им роля при БКК.

### **МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ:**

1. Обект на настоящето проучване са 80 пациента с БКК, разпределени в 3 групи: I-ва група: 20 пациенти с диагноза ПК на бъбрек; II група- 21 пациенти с диагноза ХК на бъбрек и III-та група- 39 пациенти с диагноза СКК на бъбрек. Всички пациенти са оперирани в УМБАЛ „Св. Марина“ – Варна, като са оценени следните хистологични показатели: хистологичен тип, присъствие и площ на ТН, ТПs, съдова инвазия и степен на диференциация при СКК и ПК. Определен е TNM стадия, като при 15 от пациентите има хистологично верифицирани далечни метастази. Нивата на ИХХ-експресия на AIF и RIPK3 са анализирани при трите групи пациенти и при 14 хистологично верифицирани далечни метастази. Материалната база за реализиране на дисертационния труд е Катедрата по „Обща и клинична патология, съдебна медицина и деонтология“ при МУ- Варна, като е използвана и информация от електронната база данни „MultiLab“ на УМБАЛ „Св. Марина“ - Варна.

В разработката д-р Янулова е подбрала и включила:

**1. Рутинни хистологични методи-** от всеки туморен резектат са изследвани 3-4 материала, съдържащи туморен паренхим, участък с некроза и съседна нетуморна тъкан. Материалите са обработвани по стандартния парафинов метод, като срези с дебелина 5 микрометра са оцветявани с хемалаун-еозин за оценка на промените в първичния тумор и метастазите. За целите на проучването са определяни съответните клиничко-морфологичните параметри.

**2. Специфични методи на изследване,** включващи индиректен имунопероксидазен метод за имунохистохимичен анализ с количествена оценка, осъществени с помощта на mini KIT high Ph DAKO K 8024. Използваните антители, реактивите за оцветяване и работните концентрации са представени в табл.1. Подробно са описани стъпките в подготовката на биопсичните материали за ИХХ- изследване- ИХХ-протокол, произход на използваното анти тяло и визуализираща система. Оценката на ИХХ-експресията е направена, като са изследвани 10 полета на най-голямо увеличение /x400/ за всеки отделен случай. ИХХ-експресия на AIF/RIPK3 е оценявана полуколичествено чрез използване на H-score върху тъканни срези, като в интервал от 0 до 300 са определяни интензивността на цитоплазмената, съотв. ядрената експресия за всяка клетка от туморната и нетуморна тъкан, и процентът на позитивните клетки за всеки отделен интензитет. На финала H-score е изчисляван посредством съответната за целта формула. При провеждане на ИХХ- реакциите са спазени всички елементи на методиката, включително и технологичната дисциплина. Критериите за позитивност са точно формулирани при отчитане на резултатите, които са обработени чрез набор от съвременни статистически методи за анализ на данните, напълно отговарящи на поставените цел и задачи. При обработката е използван статистически софтуерен пакет IBM SPSS ver.21, а графиките са построени в Microsoft Excel for Windows.

**Резултати:** От прегледа на получените резултати се вижда, че най-голям е броят на пациенти с БКК във възрастовата група 60-69 год. Средната възраст на болелите е 62,8 г, като най-младият е бил на 28 г., а най-възрастния- на 81 год. За статистическа обработка пациентите са разделени в три групи: I гр.<44- 4 случая; II гр.45-64 г- 40 случая и III гр.-> 65г.- 36 случая. Хистологичната находка при 39 от случаите е с вид на СКК/48,8%/; 20 /25%/са с ПК и 21 /26,2%/ са с ХК. Преобладава засягането на мъжкия пол-56мъже и 24 жени; съотн.м:ж 2:1. В подробна таблица е представена клиничко-морфологичната характеристика на изследваните 80 пациенти според съответните показатели. Степента на диференциация е определяна с помощта на ISUP- системата от 2022 год. при СКК и ПК с вариация от G1- до G4; не е определяна степен на диференциация при ХК., поради липса на прогностична стойност/СЗО 2022 г./ при този вариант. Според локализацията на тумора при 42 пациента той е бил в левия бъбрек и при 38- в десния. При отчитането на ТИЛ в туморната тъкан се установява, че те липсват при 50 случая, при 21 са слабо изразени при 9- умерено изразени и липсват /0%/. При 33 от пациентите е установена LVI в разнокалибрени съдове и липсваща при 47 пациенти.



Според Т-стадия случаите са разпределени както следва: 35 сл. в стадий Т1; 14 сл. в Т2, 26 сл. в Т3 и 5 сл. в Т4. Анализът на N- стадия показва, че при 52 случая няма хист. изследвани л. възли, при 19 няма метастази /N0/и в 9 случая има метастази /N1/; по отн. на М-ст. с Мо са три, с М1- 15 и с Мх-62 случая.

Резултатите от проведеното в представения дисертационен труд изследване са най-значителната част от труда на д-р Янулова, и демонстрират задълбоченост и опит за максимална обективност на автора. Анализът им е проведен на много добро методично ниво, което е позволило на д-р Янулова да направи съответните изводи и заключения от разработката. Получените при проучването резултати са представени в подходящ вид, онагледени с множество с изключително добро качество фигури и таблици. В обсъждането д-р Янулова последователно представя и коментира резултатите, получени от проведеното в дисертационния труд собствено изследване, като наред с това прави сравнение с резултатите, публикувани в литературата от други автори за подобни изследвания. Едновременно със сравняването на собствените, и получените резултати от проучванията на други, чуждестранни и наши автори, д-р Янулова прави обстоен анализ на сходствата и различията в посочените данни, като обсъжда и възможните причини за съществуващи евентуални несъответствия между тях. В този аспект критичният анализ на научната информация по проблема, в контекста на получените от д-р Янулова резултати показва задълбочените познания на дисертантката по разработената тема. От проведеното значително по мащаб изследване произлизат 18 извода, които отговарят на поставените цел и задачи, формулирани са много добре и представляват логичен завършек от получените резултати; приемам ги без забележки във вида, в който са написани. Сред изводите с особена значимост се открояват тези с №№ 1, 3, 5, 6, 7, 10, 11, 13, 15, 17 и 18. Д-р Янулова е представила **приносите** на дисертационния труд в две групи: Приноси с оригинален характер- това са двата научни приноса, отнасящи се до 1. Осъществен комплексен клинично-морфологичен и ИХХ-анализ на БКК във връзка с преживяемостта на пациентите, и 2.Оценени имунохистохимично чрез AIF и RIPK3 процеси на апоптоза и некроптоза като прогностични и предиктивни маркери. Пет научни приноса са с практическо-приложен характер, като особено значими сред тях са тези с № 1, 2, 4 и 5, отнасящи се до: 1.Оценено значение на основните клинично-морфологични показатели- възраст, площ на туморната некроза и съдовата инвазия като прогностични фактори за намалена преживяемост при пациенти с БКК; 2. Потвърден морфологичен профил на авансирания БКК по отн. степен

на диференциация, туморна некроза, инфилтрация с ТИЛ, и оценен риск от настъпване на смърт; 4. Съществуваща връзка между цитоплазмената експресия на AIF при БКК и LVI по отн. авансирането на тумора; 5. Оценена ролята на цитоплазмената експресия на RIPK3 при БКК за туморната диференциация и появата на LVI. Впечатляващ е обемът от данни, които д-р Янулова интерпретира при проведения подробен анализ, отнасящ се до установените зависимости м/у клинично-морфологичните показатели, цитоплазмената и ядрена експресия на изследваните маркери /RIPK3 и AIF преживяемостта на пациентите.

#### **Публикации по темата на дисертационния труд:**

Д-р Янулова е представила две пълнотекстови научни публикации, свързани с темата на дисертационния труд и публикувани 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 изисквания. Написан е на 67 страници, онагледен е с 31 фигури и 15 таблици, и представя пълно, точно и адекватно дисертационния труд по отн. структура, резултати и изводите от разработката.

В заключение, представеният дисертационен труд представлява задълбочено проучване, „хвърлящо светлина“ върху проблемите, свързани с развитието на БКК. Получените резултати и направените изводи са полезни не само за клиничната практика, но имат и значителна научно-теоретична стойност. Представеният труд показва, че д-р Янулова притежава задълбочени теоретични знания и умения по научната специалност „Патологоанатомия и цитопатология“, като демонстрира качества за самостоятелно провеждане на научни изследвания. Получените резултати и приносите в дисертационния труд напълно отговарят на всички изисквания на ЗРАСРБ, Правилника за неговото прилагане и Правилника на МУ-Варна. Имайки предвид начина, по който е разработана дисертационната тема, направените изводи и приносите, убедено давам своята +/- оценка на представения труд, като препоръчвам на членовете на уважаемото Жюри да присъдят образователната и научна степен „доктор“ на д-р Невена Желязкова Янулова по научната специалност „Патологоанатомия и цитопатология“.

19.12.2024 г.  
гр. Варна

Член на Научното жури доц. д-р Екатерина Софтова, д.м.

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