

РЕЦЕНЗИЯ

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

специалност патологоанатомия и цитопатология, МЦ „Сити Лаб“ ЕООД

ОТНОСНО ЗАЩИТА

НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

на д-р ПЛАМЕН ПЕТРОВ ВАСИЛЕВ, 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, по процедура за присъждане на образователната 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 БАЗОЦЕЛУЛАРЕН И СПИНОЦЕЛУЛАРЕН КАРЦИНОМ НА КОЖА“

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

Съгласно зап. № Р- 109-427 от 06.10.2025 на Ректора на МУ-Варна Проф. д-р Димитър Райков, д.м.н., предвид доклад с вх. №102/2240/19.09.2025 г от Доц. д-р Деян Людмилов Дженков, д.м., Ръководител катедра „Обща и клинична патология, съдебна медицина и деонтология“, с решение по протокол № 46/29.09.2025 г. на ФС и доклад с вх. № 103/6377/30.09.2025 г. от Проф. д-р Йото Трифонов Йотов, д.м., Декан на ФМ, на основание чл. 24 ал. 6 и чл. 30 ал. 3 от ППЗРАСРБ, чл. 68, ал. 1 от Правилника за развитие на АС в МУ- Варна е отчислен с право на защита д-р Пламен Петров Василев, докторант в редовна форма на обучение в докторска програма „Патологоанатомия и цитопатология“, проф. направление 7.1. “Медицина“, зачислен със зап. № Р-109-488/04.11.2020 год. Съгласно зап. № Р 109-427/06.10.2025 г. на Ректора на МУ-Варна съм избрана за външен член на НЖ, а на основание протокол № 1/14.10.2025 г. съм определена да изготвя рецензия по процедура за придобиване на образователната и научна степен „Доктор“, от д-р Пламен Петров Василев.

За конкурса докторантът е представил на хартиен и електронен носител комплект от необходимите документи в съответствие с изискванията на ЗРАСРБ, Правилника за приложението му и ПРАС в МУ-Варна, вкл. дисертационен труд, автореферат, биографични данни, административни документи, протокол от 25.02.2022 г. за успешно положен изпит по докторантски минимум /обща оценка мн. добър 5,34/ и протокол от изпит за чужд език на 20.05.2021 г. /с резултат - издържал/.

Кратки биографични данни и кариерно развитие на докторанта

Д-р Пламен Петров Василев е роден на 13.10.1974 г. в град Бургас. За периода от 1989 - 1992 г. д-р Василев учи, и завършва средното си образование в гр. Бургас, в СОУ „Георги Сава Раковски“, с профил „свободно избираема професия“, към който са включени избраните предмети „биология и химия.“ През 1994 г. д-р Василев е приет за студент в МУ-София, където през 2000 год. завършва висшето си образование, придобивайки образователно-квалификационна степен „Магистър“ по специалността „Медицина“, професионална квалификация магистър - лекар - МУ-София, серия МУС, № 009778, рег. № 6918/13.11.2000 г. След успешно положен Държавен изпит, считано от 01 януари 2011 г, д-р Василев придобива права на специалист по „Клинична лаборатория“ /свидетелство за призната специалност с рег. № 015832/31.01.2011 г, серия МУВ – 2011, № 3038. С протокол № 4 от 05.03.1015 г. придобива професионална квалификация по специалност „Здравен мениджмънт“ /свидетелство с рег. № 2015009/16.03.2015, Серия С 2005/. Успешно преминава курс на обучение по „Медицинска педагогика“ /удостоверение с рег № 3559/17.10.2016 г/. За времето от 2013-2017 г. д-р Василев е специализант по „Обща и клинична патология“ в база за специализация УМБАЛ „Св. Марина“ - Варна. Считано от 01 януари 2019 г., след успешно положен Държавен изпит, д-р Василев придобива права на специалист по „Обща и клинична патология“ /свидетелство за призната специалност с рег. № 022569/01 март 2019 г., серия МУВ - 2019, № 4091/.

Като докторант и специализант д-р Василев участва активно в осъществяваните дейности в Клиниката и Катедрата по патология при МУ и УМБАЛ „Св. Марина“- Варна. Научните интереси на докторанта са насочени основно към дерматопатология, вкл. малигнените, немеланомни неоплазми на кожата, невроендокринната патология, заболявания на щитовидната жлеза, женската полова система, интраоперативна диагностика, овариални тумори, колоректален карцином и др. Д-р Василев притежава дипломи, сертификати и удостоверения за участия в поредица от курсове, семинари, обучения /включително езикови на различни нива/ и др., основната част от които са в области от гинекологичната патология, патология на щитовидната жлеза, тумори на млечната жлеза и др. В периода 2005-2010 год. д-р Василев е специализант в МУ „Д-р Параскев Стоянов“- Варна и УМБАЛ Бургас АД и след придобиване на специалност работи като лекар специалист „Клинична лаборатория“ в МБАЛ „Велики Преслав“ ЕООД, ДКЦ „Св. Ив.Рилски“- Варна, МЦ „Св. Стилиян“- Варна. През 2013-2017 г. д-р Василев е специализант по „Обща и клинична патология“ в МУ „Д-р Параскев Стоянов“- Варна и УМБАЛ „Св.Марина“ – Варна, а в периода 11.2021 - 10.2025 год. е редовен докторант, зачислен в Докторска програма „Патологоанатомия и цитопатология“. От м. 10.2023 г, заема длъжността „лекар по Обща и Клинична патология“ в УМБАЛ Бургас АД, с основни дейности хисто-, цитопатология и аутопсионна дейност.

Д-р Василев членува в БЛС и БДП, владее на добро ниво - четене, писане и разговорна реч английски език, притежава сертификат за проведен обучителен курс по немски език St.B1. Докторантът има много добри технически умения и компетенции, работи с компютри със специфично оборудване.

Актуалност на проблема

От наличните в литературата данни, при голяма част от малигнените неоплазми предвид съществуващата склонност към прогресия и метастазиране, е от особена важност определянето на правилен подход и терапевтично поведение, както за провеждането на адекватна терапия, така и за проследяване на срока на преживяемост на засегнатите пациенти. Този факт от своя страна обуславя налагащата се необходимост от разширяване на проучванията, отнасящи се до биологичното поведение на тумора, а оттам и последващата възможност за разкриване на голяма част от молекулярните механизми, играещи важна роля при активирането на метастатичния потенциал на съответния карцином. Въпреки непрекъснатия стремеж към разработване на нови молекулни маркери и фактът, че съвременната медицина предлага нови прогностични критерии с възможност за приложение в клиничната практика, определящи до голяма степен евентуалния риск от рецидив, преживяемостта на пациента и провежданата адекватна терапия за активно лечение, все още склонността на туморите към метастазиране е неопределена поради факта, че специфичната ѝ роля не е универсална, а варира в зависимост от биологичната характеристика или туморната микросреда за всеки различен тип карцином. С оглед определяне поведението на туморите, непрекъснато и насочено се търсят подходящи маркери, допринасящи за изясняването на туморната биология. Понастоящем много нови молекули, участващи в процеса на онкогенезата са обект на изследване при различни неоплазии, вкл. при базоцелуларен и плоскоклетъчен карцином. Определянето на маркери за прогнозиране на биологичното поведение на тези тумори би допринесло и дало тласък за по-добро проследяване на развитието им. Настоящото изследване е насочено към определяне на предиктивната и прогностична стойност на експресията на RIPK3 и CASP-3 от туморните клетки при карциноми с различна характеристика и диференциация. Провеждането на изследването е актуално, иновативно и с възможност за търсене на нови терапевтични стратегии и прогнози в хода на заболяването.

Базалноклетъчният карцином е най-честият рак на кожата-честота около 2 000/ 100 000 души население, с тенденция за нарастване при индивиди на възраст над 50 год. Карциномът се характеризира с бавен растеж, рядко развитие на метастази и завършване на жизнения път с „летален“ край при по-малко от 0,1% от пациентите. Спрямо анатомичното разпределение на тумора, най-голям е процентът на засегнатите области от шия и глава /85%/, на второ място се нареждат туморите, развиващи се в кожата от областите на торса и крайниците /15%/ и на последно място е кожата от областта на гениталиите. Като важни етиологични фактори, отговорни за появата на кожно увреждане се отбелязват контакти с

арсен, катран, свръхекспресия на слънчева светлина, йонизираща радиация, понижен локален имунен статус и др. Освен изброените причинители, важна роля за развитието на тумора играе цветът на кожата, като по-светлата кожа е по-податлива за появата на БЦК /базалноклетъчен карцином/. Мъжете са 2х по-често засегнати от жените в съотношение 2:1. По литературни данни ракът на кожата е най-често диагностицираният тумор сред кожните тумори в САЩ - приблизително 80% от засегнатите индивиди са били с БЦК и 20% с ПКК.

Плоскоклетъчният карцином е вторият по честота рак на кожата при бели индивиди, като обикновено честотата му нараства обикновено след 50 годишна възраст. 2-3х по-често се наблюдава при мъже на възраст около 70 години. Туморът има бавен растеж и рядко метастазира, като в 0,5% от случаите съществува вероятност от локална деструкция на тъканите. Установено е, че най-висока честота на плоскоклетъчен карцином на кожата се наблюдава в Австралия. Интересен факт, отбелязан в литературата, сочи за ежегодното диагностициране на около 1 млн. души в САЩ с плоскоклетъчен карцином на кожата. Етиологичните фактори, отговорни за развитието на този вид злокачествен тумор са до голяма степен сходни с причиняващите БКК - УВ - радиация, локална имunosупресия, йонизиращо лъчение, както и действие на химически канцерогени - смоли, катран, арсен и други индустриални препарати. Роля в етиологията на тумора играе и инфекцията с HPV от различни типове /5, 8, 9, 16 и др./ При хора със светла кожа - фототип I и II, както и при руси и червенокоси индивиди съществува по-голям риск от развитието на плоскоклетъчен карцином. У нас злокачествените тумори на кожата са едни от най-често срещаните злокачествени заболявания в България. През 2011 г. са диагностицирани 4783 нови случая от двата пола, като 13 души на ден заболяват от карцинома и честотата нараства с напредването на възрастта - най-засегната е групата на възраст 80-84 год. След 2000 г. се наблюдава устойчива тенденция за нарастване на заболяемостта и смъртността. С годишен темп на растеж от 10% се очаква БЦК да надмине всички останали злокачествени неоплазми.

Определянето на основните хистологични варианти на плоскоклетъчния и базоцелуларен карцином се основава на класификацията на СЗО от 2018 год., отнасяща се за кожните тумори, ревизирана през 2023 год. Хистологичната класификация представя вариантите на БЦК - с нисък риск /повърхностен, нодуларен, инфундибулокистичен, фиброепителиален/ и с висок риск /базосквамозен, базалноклетъчен карцином със саркоматоидна диференциация, инфилтриращ, склерозиращ (морфеа-тип), микронодуларен/. Понастоящем, по аналогия с други туморни неоплазми, лечението и прогнозата при пациентите се определя от стадия, хистологичния субтип и степента на туморна диференциация.

За основен механизъм на индуцирана от химиотерапевтични препарати клетъчна смърт се смята **включването на апоптозата**. Известно е, че някои клетки имат вродена или придобита резистентност към проапоптотични стимули. В тези случаи чрез индукция на неапоптотична клетъчна смърт могат да се осигурят алтернативни пътища за отстраняване

на устойчивите на апоптоза туморни клетки. Ето защо, понастоящем потенциална стратегия за подобряване на антитуморната терапия е свързана с насочването към алтернативни пътища на клетъчната смърт. **Апоптозата** е процес на програмираната клетъчна смърт, която се активира от външен апоптозен път чрез рецепторите на смъртта върху клетъчната мембрана и от вътрешен път, който се задейства на нивото на митохондриите в резултат на вътрешни увреди. Апоптозата се иницира чрез активиране на няколко цистеинови протеази наречени „каспази“, като процесът започва с активиране на каспази 8 и 9, които генерирайки сигнален път потенцират клетъчна смърт с участието на каспаза-3 като „централен играч“. **Некроптозата** е сравнително нова форма на програмираната клетъчна смърт, която се стимулира чрез класическите рецептори на клетъчната смърт, идентични с тези на външния път на апоптозата. Медирана е от рецептор-взаимодействащите протеинкинази RIPK1 и RIPK3, участващи във формирането на комплекс, наречен „некрозома“, в който чрез каскадно фосфорилиране се повлиява пропускливостта на клетъчната мембрана. Некроптозата се съпровожда от възпалителна реакция, като за разлика от апоптозата, ядрата на некротичните клетки остават интактни. **Индукцирането на некроптоза при дефектна апоптоза е потенциална терапевтична стратегия.**

Структурата на дисертационния труд отговаря на изискванията на ЗРАСРБ и правилника на МУ-Варна. Написан е на 139 страници и е онагледен с 66 таблици и 35 фигури. Литературната справка включва 355 източника, от които 6 на кирилица и 349 на латиница. Разпределението по раздели е както следва: титулна страница - 1, съдържание и използвани съкращения - 4, въведение - 2, литературен обзор - 53, цел и задачи - 1, материал и методи - 5, резултати и обсъждане - 43, изводи - 1, приноси - 1, библиография - 21 страници.

Литературния обзор е изчерпателен и актуален, насочен към обстойно разглеждане на епидемиологията на малигнените кожни неоплазми, разпределението им по пол, генетична предразположеност, с разглеждане на 9 синдрома свързани с посочените тумори, рисковите фактори, съвременната класификация на СЗО от 2017 г и актуализирането ѝ от 2023 г. Отделно са разгледани процесите на апоптоза и некроптоза, медиран от Caspase-3 и RIPK3, които играят важна роля при развитието на малигнените кожни неоплазми.

Цел на настоящото изследване е да се проучи ИХХ-експресия на маркера за апоптоза Caspase-3 и маркера за некроптоза RIPK3 при пациенти с БЦК и ПМК на кожата, и да се определи предиктивната им стойност.

Във връзка с поставената цел са формулирани точно и ясно 7 задачи, както следва:

1. Проучване на клинично-морфологичните характеристики при пациентите с БЦК и ПМК.
2. Проучване нивото на ИХХ-експресия на Caspase-3 в туморната тъкан на БЦК и ПМК.
3. Сравняване на ИХХ-експресията на Caspase-3 в туморната тъкан на плоскоклетъчен и базоцелуларен карцином със съседната нетуморна тъкан.

4. Анализиране експресията на Caspase-3 във връзка с клинично-морфологичните показатели: пол и възраст на пациентите с БЦК и ПКК, TILs, туморна некроза, степен на диференциация, размер и локализация на тумора.
5. Проучване нивото на ИХХ-експресията на RIPK3 в туморната тъкан на двата карцинома.
6. Сравняване ИХХ-експресията на RIPK3 в туморната тъкан на двата карцинома на кожата със съседната нетуморна тъкан.
7. Анализ на експресията на RIPK3 във връзка с изброените по-горе клинично-морфологични показатели-възраст и пол на пациентите, TILs, туморна некроза, рискова група, степен на диференциация и локализация на тумора.

Задачите са добре обосновани и постижими, като съответстват напълно на поставената изследователска цел.

Материал и методи: Дисертационният труд е реализиран в Катедрата по Обща и клинична патология, съдебна медицина и деонтология към МУ-Варна и в ДКЦ „Св. Марина“ ЕООД и включва материали от 91 пациента.

1. Проведени са рутинни изследвания, включващи изработването на стандартни хистологични препарати.
2. Проведени са имунохистохимични методи на изследване с използване на индиректен имунопероксидазен метод за ИХХ анализ с помощта на mini KIT high Ph DAKO K8024. Използваните реактиви, антитела и работни концентрации са представени в таблици 4 и 5. Описан е протокола за подготовка на биопсичните материали за ИХХ и метода за отчитане на експресията на Caspase-3 и RIPK3 и използваната формула. Приложените статистически методи включват дескриптивен анализ, тест на Стюdent (t-критерий) за две независими извадки, дисперсионен анализ (ANOVA).

Постигнатите резултати от изследването, имащи теоретична и/или приложна насоченост са представени както следва:

За период от 7 години /2015-2021/ е извършено проучване, обхващащо общо 91 пациента, от които 46 са били с данни за БЦК и 45 с данни за плоскоклетъчен карцином. Средната възраст на пациентите е била $58,3 \pm 14,47$ г, средна възраст на тези с БЦК е била $56,5 \pm 13,5$ г, а средната възраст на пациентите с ПКК е била $60,2 \pm 15,32$ г. Разпределени по пол пациентите са както следва: 45 /49,5%/ мъже и 46 /50,5%/ жени. С плоскоклетъчен карцином при мъжете са 25 пациенти /55,6%/, а 20 /44,5%/ с базоцелуларен карцином. От проучените 46 пациента с базоцелуларен карцином 24 /52,17%/ са с нодуларен субтип, 10 /21,74%/ със суперфициален тип, 7 /15,22 %/ с фиброепителен субтип и 5 /10,87 %/ с микронодуларен тип. От проучените 45 пациента с плоскоклетъчен карцином, 33 /73,33%/ са с конвенционален субтип, 5 /11,11%/ с верукозен субтип и 7 /15,56%/ с кератоакантома-подобен карцином. В проучването е установено, че базоцелуларният карцином се среща по-често при жените, като съотношението е 1,3:1, а плоскоклетъчният карцином се среща по-често при мъже, в

съотношение 1,25:1. Установено е, че в групата на пациентите със степен на диференциация G1 са включени 30 /66,67%/ пациенти с плоскоклетъчен карцином и 34 /73,91%/ с базоцелуларен карцином. В групата на G2 са включени 15 /33,33%/ от пациентите с плоскоклетъчен карцином и 12 от пациентите /26,09%/ с базоцелуларен карцином. В зависимост от Т-стадия на тумора е установено, че карциномите се разпределят както следва: 43 от пациентите с плоскоклетъчен карцином /95,56%/ са в стадий T1 и 2 /4,44%/ в стадий T2. От пациентите с базоцелуларен карцином 46 /100%/ от случаите са в стадий T1. Според локализацията на тумора е установено, че 2 /4,44%/ от ПКК са в областта на шията, в областта на главата са 31 /68,89%/ от ПКК и 37 /80,43% от БЦК. В областта на трункуса са установени 3 /6,67%/ от ПКК и 4 /8,7%/ от БЦК. По крайниците са локализирани 8 /17,78%/ от ПКК и 2 /4,35%/ от БЦК, а в областта на гениталиите е един ПКК /2,22%/ и 3 са /6,52%/ БЦК. При хистологичното изследване на случаите с ПКК и БЦК е определяна липсата или присъствието, съответно площта на туморна некроза. При 8 /17,78%/ от ПКК и при 5 /10,87%/ от БЦК е установена некроза до 10% от площта на тумора, а некроза между 10-30% е установена при 3 /6,67%/ от ПКК. За всеки отделен случай е отчетено наличието на TILs в туморната тъкан, установена е липса при 15 /33,33%/ от ПКК и при 18 /39,13%/ от БЦК, слабо изразени TILs - при 22 /48,89%/ от ПКК и при 16 /34,78%/ от БЦК, умерено изразени - при 8 от ПКК /17,78%/ и при 12 /26,09%/ от БЦК. Проведено е насочено изследване с оглед наличие на лимфо-васкуларна инвазия, но такава не е открита в нито един от препаратите.

Резултати от имунохистохимични изследвания

1. Експресия на Caspase-3 - маркера за апоптоза при:

1.1. Базоцелуларен карцином /БЦК/

В туморната тъкан на карцинома установената цитоплазмена експресия на Caspase-3 е $20,20 \pm 60,44$, като минималната стойност е 0, а максималната е 300, в съседната нетуморна тъкан средните стойности на цитоплазмената експресия са $18,022 \pm 37,12$, като не е установена статистически значима разлика между нивата на цитоплазмената експресия в туморната и съседната нетуморна тъкан. Ядрената експресия на Caspase-3 в туморната тъкан при БЦК е $17,87 \pm 56,74$ при минимална стойност 0 и максимална 293. В съседната нетуморна тъкан средните стойности на ядрената експресия са $18,27 \pm 44,35$, като не се установява статистически значима разлика между нивата на ядрената експресия в туморната и съседната нетуморна тъкан. Ядрената и цитоплазмена експресия на Caspase-3 в туморната тъкан не показват зависимост от пола на пациентите / $p=0,137$ за цитоплазмената и $p=0,160$ за ядрената експресия/. Ядрената и цитоплазмена експресия на Caspase-3 не се асоциира с локализацията на тумора. Липсва статистически значима разлика между ядрената и цитоплазмена експресия на Caspase-3 в туморната тъкан на базоцелуларния карцином при високорисковите /микронодуларен/ и нискорисковите /нодуларен, суперфициален и фиброепителен/ субтипове / $p=0,412$ за цитоплазмената и

$p=0,323$ за ядрената експресия /. Не се установява статистически значима разлика между ядрената и цитоплазмена експресия на Caspase-3 в туморната тъкан на БЦК спрямо степента на инфилтрация с TILs в туморната тъкан $/p=0,549$ за цитоплазмената и $p=0,580$ за ядрената експресия/. Не се установява статистически значима разлика между ядрената и цитоплазмена експресия на изследвания маркер спрямо наличието и липсата на некрози в тумора $/p=0,434$ за цитоплазмената и $p=0,461$ за ядрената експресия/.

1.2. Експресия на маркера за апоптоза Caspase-3 при ПКК

Средните стойности на цитоплазмената експресия в туморните клетки на ПКК са по-високи спрямо стойностите в нетуморната тъкан, като установената разлика е със статистическа значимост, а при ядрената експресия по-високи стойности са установени в нетуморната тъкан, но без статистически значима разлика между експресията в туморната и нетуморна тъкан $/p=0,579/$. Липсва статистически значима разлика в средните стойности на цитоплазмена и ядрена експресия на Caspase-3 в туморната тъкан на плоскоклетъчния карцином спрямо пола на пациента $/p=0,167/$. Липсва статистически значима разлика в средните стойности на цитоплазмената и ядрена експресия на Caspase-3 в туморната тъкан на плоскоклетъчния карцином в зависимост от локализацията на тумора $/p=0,126$ за цитоплазмената и $p=0,805$ за ядрената експресия/. Не се установи статистически значима разлика в средните стойности на цитоплазмена и ядрена експресия на Caspase-3 в туморните клетки на плоскоклетъчен карцином при различните хистологични типове: конвенционален, верукозен и кератоакантома-подобен карцином $/p=0,389$ за цитоплазмената и $p=0,449$ за ядрената експресия/. При проследяване зависимостите между експресията на Caspase-3 в туморната тъкан на плоскоклетъчен карцином и степента на туморна диференциация се установява статистически значима разлика - при ниска степен на клетъчна диференциация, цитоплазмените и ядрени стойности на маркерна експресия са по-високи в сравнение с по-висока степен на диференциация $/p=0,007$ за цитоплазмената и $p=0,000066$ за ядрената експресия/. Не се установява статистически значима разлика между експресията на Caspase-3 в туморната тъкан на плоскоклетъчния карцином спрямо степента на изразеност на инфилтрация с TILs в тумора $/p=0,059$ за цитоплазмената и $p=0,910$ за ядрената експресия/. Не се установява статистически значима разлика в средните стойности на цитоплазмената и ядрена експресия на Caspase-3 в туморната тъкан на плоскоклетъчен карцином във връзка с наличието на туморна некроза $/p=0,541$ за ядрената и $p=0,585$ за цитоплазмената експресия/.

2. Експресия на RIPK3, маркер за некроптоза

2.1. Експресия на RIPK3 при базоцелуларен карцином

При проведеното изследване се установява, че средните стойности на цитоплазмена експресия на RIPK3 в туморната тъкан на базоцелуларен карцином $/121,72 \pm 98,66/$ са по-високи в сравнение със средните стойности в съседната, непроменена тъкан, като разликата е статистически достоверна $/p=0,0007/$. Средните стойности на нуклеарна експресия $/117,56 \pm 109,12/$ на маркера в туморната тъкан на базоцелуларен карцином са по-високи от

средните стойности на нуклеарната експресия в нетуморна тъкан $/101,04 \pm 77,09/$, като липсва статистически значима разлика $/p=0,305/$. Средните стойности на цитоплазмената и ядрена експресия на RIPK3 са по-високи при хистологичните субтипове с висок риск /каквото е микронодуларният субтип/ при сравнение с тези с нисък риск /нодуларен, суперфициален и фиброепителен субтип/, като разликата е статистически значима /за цитоплазмената експресия $p=0,048$, за нуклеарната експресия $p=0,047/$. При умерено изразена инфилтрация с TILs в туморната тъкан на базоцелуларен карцином, цитоплазмената експресия на RIPK3 е по-висока в сравнение с експресията при ниска степен на инфилтрация и при липса на инфилтрация. Подобна зависимост е намерена и при ядрена експресия на маркера $/p=0,025/$. При наличието на туморна некроза средните стойности на цитоплазмена $/225,20 \pm 78,83/$ и ядрена експресия на RIPK3 $/243,60 \pm 68,11/$ в туморната тъкан на базоцелуларния карцином са по-високи в сравнение със случаите, при които тя липсва. Средните стойности при липса на некроза за цитоплазмената експресия са $109,10 \pm 93,95$ и $103,41 \pm 105,32$ за ядрената, като разликите са статистически значими /съответно $p=0,011$ и $p=0,006/$. Липсва статистически значима разлика между пол и ядрена и цитоплазмена експресия на RIPK3 в туморната тъкан на базоцелуларен карцином $/p=0,347$ за цитоплазмената и $p=0,420$ за ядрената експресия/. Не се установява статистически значима разлика между ядрената и цитоплазмена експресия на RIPK3 в туморната тъкан на базоцелуларен карцином в зависимост от локализацията на тумора $/p=0,661$ за цитоплазмената, и $p=0,661$ за ядрената експресия/.

2.2. Експресия на RIPK3 при плоскоклетъчен карцином

Средните стойности на цитоплазмената и ядрена експресия на RIPK3 в туморна тъкан от ПКК са по-високи в сравнение със средните стойности на цитоплазмената и ядрена експресия в съседна, туморно непроменена тъкан, като и в двата случая има статистически значима разлика $/p=0,000010$ за цитоплазмената и $p=0,000055$ за ядрената експресия. Липсва статистически значимо различие в средните стойности на цитоплазмена и ядрена експресия спрямо пола в съседна, туморно непроменена тъкан $/p=0,384$ за цитоплазмената, и $p=0,429$ за ядрената експресия/. Не се установява статистически значима разлика в средните стойности на цитоплазмената експресия на RIPK3 в туморната тъкан на плоскоклетъчен карцином при различни локализации на тумора. Ядрената експресия на маркера в туморните клетки на плоскоклетъчен карцином, локализиран в областта на главата е по-висока в сравнение с карциноми локализирани по крайниците, като разликата е статистически значима. Липсва статистически значима разлика в средните стойности на цитоплазмена и ядрена експресия в туморната тъкан на различните хистологични типове плоскоклетъчен карцином: конвенционален, верукозен, кератоакантома-подобен $/p=0,103$ за цитоплазмената и $p=0,246$ за ядрена експресия. Не се установява статистически значима разлика в средните стойности на цитоплазмената и ядрена експресия на маркера според степента на туморната диференциация $/p=0,479/$ за цитоплазмена и $p=0,298$ за ядрената експресия. В туморната тъкан на плоскоклетъчния карцином средните стойности на

цитоплазмената и ядрена експресия на RIPK3 са по-високи при изразената степен на TILs инфильтрация в сравнение с ниската им степен на изразеност, като разликата е статистически достоверна $/p=0,000068$ за цитоплазмената и $p=0,006298$ за ядрената експресия/. Средните стойности на цитоплазмената експресия на маркера в туморна тъкан от плоскоклетъчен карцином не показва зависимост от присъствието или липсата на некроза $/p=0,063/$. Нуклеарната експресия на RIPK3 в туморна тъкан от плоскоклетъчен карцином е по-висока при по-голяма площ на некрозата, като разликата е статистически достоверна $p=0,05/$.

Получените резултати от проведеното изследване имат значителен потенциал за приложение в науката и в клиничната практика, особено като се има предвид значението на правилно определените подход и поведение, с възможност за приложение на нови прогностични маркери, позволяващи целенасочено терапевтично вмешателство. Анализът на резултатите за експресията на двата маркера: за апоптоза и некроптоза във връзка с хистологичната характеристика, диференциация и туморен стадий очаквано би допринесъл за прогнозиране хода на заболяването и би дал възможност за откриване на нови сигнални пътища за терапевтично повлияване. От своя страна изясняването на сигнални молекулярни пътища би предоставило необходимата информация за верифициране на възможни таргетни молекули за терапия, както и за получаване на данни, необходими за оценка на прогнозата при пациенти с кожен карцином.

В глава „Резултати и обсъждане“ последователно са разгледани собствените резултати и са сравнени с проучванията на редица автори, като са анализирани сходствата и различията в посочените данни.

Д-р Василев прави 16 добре обосновани **извода** в дисертацията си. Като най-важните от тях са:

- Цитоплазмената и нуклеарна експресия на Caspase-3 в туморната тъкан на БЦК и ПКК не корелира с възрастта на пациентите.
- При БЦК и ПКК цитоплазмената и нуклеарна експресия на апоптотичния протеин не показва зависимост от пола, площта на туморната некроза, TILs в туморната тъкан и от локализацията на тумора.
- С увеличаване на възрастта се повишава цитоплазмената експресия на RIPK-3 в туморната тъкан на пациенти с ПКК.
- При БЦК цитоплазмената и нуклеарна експресия на RIPK-3 е по-висока при високорисковите в сравнение с нискорисковите хистологични варианти. При ПКК липсва зависимост на експресията на RIPK-3 спрямо хистологичния вариант за двете локализации на антитялото.
- Умерено и нискодиференцираните карциноми са с по-високи стойности на цитоплазмена и нуклеарна експресия на Caspase-3 в сравнение с вискодиференцираните ПКК.

Постигнатите и описани в разработения дисертационен труд научни резултати имат значима теоретична и приложна насоченост с **приноси** с оригинален характер, отнасящи се до: 1. Осъществяване на комплексна клинично-морфологична и ИХХ-характеристика на

апоптозата и некроптозата при пациенти с ПМК и БМК. 2. Извършване на анализ на получените резултати на нивата на ИХХ-експресията на CASP-3 и RIPK3 с оглед изясняване на връзката им с клинично-морфологичните параметри. Научните приноси с практическо-приложен характер са 8, изразяващи се в осъществяване на анализ на двата маркера във връзка с клинично-морфологичните показатели, съпоставка и определяне на прогностичната им стойност при ПМК и БМК.

Публикации по темата на дисертационния труд

Д-р Василев е представил две публикации във връзка с дисертационния труд:

1. Пламен Василев, Илко Бакърджиев - „Експресия на маркерите за апоптоза и некроптоза каспаза-3 и взимодействаща с рецептора протеин-киназа 3 при злокачествени неоплазми“; Варненски медицински форум, т.12,2023, брой1, МУ-Варна, /122-133/
2. Пламен Василев - „Актуализация на класификацията на плоскоклетъчния кожен карцином; МУ-Варна; Варненски медицински форум, т.12, 2023; брой 2, / 25-38/

Авторефератът е написан на 91 страници и представлява кратко, но изчерпателно представяне на дисертационния труд.

В **заключение** дисертационния труд на д-р Пламен Петров Василев представлява задълбочено проучване върху проблемите свързани с диагностиката и прогнозата за развитие на най-често срещаните кожни злокачествени тумори БМК и ПМК. Получените резултати и направените изводи са полезни за практиката. Необходимо е допълнително проучване на по-големи групи пациенти, както и интегриране на данни от геномни анализи. Предлагам на уважаемите членове на научното жури да гласува положително за присъждането на д-р Пламен Василев на ОНС „ДОКТОР“ по научна специалност „Патологоанатомия и цитопатология“.

18.11.2025 г.
Варна

Доц. д-р Екатерина

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