

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 д-р Недялка Тодорова Згурова, докторант на самостоятелна форма на обучение към Катедра по „Обща и клинична патология, съдебна медицина и деонтология“; Факултет по медицина при Медицински Университет „Проф. д-р Параскев Стоянов“, Варна

НА ТЕМА: „СРАВНИТЕЛЕН МОРФОЛОГИЧЕН И ИМУНОХИСТОХИМИЧЕН АНАЛИЗ НА БЕНИГНИ И МАЛИГНИ ЕПИТЕЛНИ ТУМОРИ НА ДЕБЕЛОТО ЧЕРВО“

с научен ръководител проф. д-р Мария Ангелова Цанева, дм

С решение от заседание на ФС на Факултет „Медицина“ при МУ-Варна по протокол № 22/07.05.2020 г. и със заповед № Р-109-155/18.05.2019г. на Ректора на МУ-Варна, съм избрана за член на Научното жури, а на основание Протокол № 1 /02.06.2020 г., съм определена за официален рецензент по процедура за придобиване на образователна и научна степен **„Доктор“** с кандидат д-р Недялка Тодорова Згурова в МУ-Варна.

За конкурса кандидатката е представила на хартиен и електронен носител комплект от материали, включващи всички необходими документи в съответствие с изискванията на ЗРАСРБ, Правилника за приложението му и ПРАС в МУ-Варна, а именно: дисертационен труд, автореферат, биографични и професионални данни, административни документи, както и копия от публикации по темата на дисертацията.

Кратки биографични данни и професионално развитие на докторантката

Д-р Недялка Тодорова Згурова е родена на 11.01.1987 год. в гр. Смолян. Завършва средното си образование през 2005 год. в Природоматематическата гимназия „Васил Левски“ – Смолян с профил на обучение по биология и химия, и интензивно изучаване на английски език. През 2005 год. е приета за студентка в МУ „Проф. д-р Параскев Стоянов“-Варна, където през 2011 год. придобива образователно-квалификационна степен **„магистър“** по специалността **„Медицина“**.

След завършване на университетското си обучение, от 01.02.2012 год. е назначена като лекар-патолог в Клиниката по обща и клинична патология при УМБАЛ „Св. Марина“ Варна, а от 15.02.2013 год. след конкурс е избрана и за асистентка в Катедрата по „Обща и клинична патология, съдебна медицина и деонтология „ при МУ-Варна, където работи и до сега. От 01.08.2012 година е била специализант по Обща и клинична патология в Катедрата по „Обща и

клинична патология, съдебна медицина и деонтология“ при МУ-Варна и Клиниката по патология при УМБАЛ „Св.Марина“ Варна. Придобива специалност по „Обща и клинична патология“ през 2017 година.

Със заповед № Р-109-143/09.05.2016 год. на Ректора на МУ- Варна проф. д-р Кр. Иванов, д-р Згурова е зачислена като докторант за самостоятелна форма на обучение за придобиване на образователна и научна степен „Доктор“ към „Катедра по Обща и клинична патология, съдебна медицина и деонтология“ в МУ-Варна. Представен е протокол за успешно положен изпит за докторантски минимум. На основание решение от заседание на ФС при Факултет по Медицина към МУ-Варна, по протокол № 22/07.05.2020г. и с заповед № Р-109-155/18.05.2020 год. на Ректора на МУ-Варна, д-р Недялка Згурова е отчислена с право на защита.

Д-р Згурова има над 8 години трудов стаж като лекар, и над 7 години като асистент-преподавател по специалността „Обща и клинична патология“ в МУ Варна. Участва активно в преподаването на дисциплината на българските и чуждестранни студенти от специалностите по „Медицина“ и „Дентална медицина“ в МУ-Варна.

Д-р Згурова е участвала с научни доклади и постери в Национални конгреси и конференции, вкл: IX-та Национална конференция по антропология, Сф 2012г.; X-та Национална конференция по хематология Зл.пясъци, Варна, 2013г.; XI-и Национален Конгрес по патология, Шумен 2013г. и др. Притежава сертификати за участие в два квалификационни курса : „Black Sea Symposium for Young Scientists in Biomedicine“,2014г. Варна и Европейско училище по патология /ESCP/, 2016 год. Варна. Д-р Згурова има отпечатани 3 научни съобщения по темата на дисертацията ѝ. Професионалните ѝ и научни интереси са в областта на патологията на гастро-интестиналния тракт и молекулярната биология.

Д-р Згурова владее на Европейско ниво / единни европейски критерии за познания по езици/ английски език и на ниво B1- немски език. Има много добри компютърни умения и компетенции, работи с Windows Vista 7, MS Word, MS Excel и Internet. Членува в Българското научно дружество по патология .

Актуалност и значимост на темата. Колоректалният карцином е един от най-често развиващите се злокачествени тумори в човешкия организъм, нареждащ се сред водещите причини за заболяемост и смъртност в света, като заема 3-то място по честота и е на 4-то място като причина за смърт. Годишно в света се регистрират около 1,4 млн. нови случаи на заболяели, и приблизително 700 000 смъртни случаи, причинени от КРК. Независимо от напредъка, отбелязван при лечението на КРК, все още 5-годишната преживяемост в света и в Европа е ниска- съотв. 68,2 преживели /100 000 в света и 193,3 преживели на 100 000 население в Европа. В България се установява трайна тенденция за повишение на заболяемостта и смъртността, съотв. с 4,1% при мъжете и с 3,5% при жените. Тези недаващи успокоение данни поставят въпроси, отнасящи се до оценка на рисковите прекурсорни лезии на КРК и налагат все по-настойчиво необходимостта от търсене на нови пътища за адекватна диагностика и терапия, базирани на механизмите, определящи развитието на КРК. Поради това провеждането на системни проучвания и изследвания, касаещи определянето на

фенотипния профил, предшестваш развитие на КРК, изясняване ролята на генетичните нарушения в ранните етапи на коло-ректалната карциногенеза, и възможностите за разкриване на връзките м/у развитието на тумора и някои молекулярни и генетични фактори са не само оправдани, но и наложителни, тъй като биха допринесли за изработване на стратегии, отнасящи се до превенция, подобряване на диагнозата, прилагане на комплексен индивидуален подход с възможност за адекватна прицелна терапия на КРК, и евентуална преценка на прогнозата и изхода от заболяването. Всичко това определя актуалността на дисертационния труд на д-р Згурова, и е дало основание авторката да се заеме с нелеката задача по разработването и представянето в завършен вид проведените от нея проучвания, посветени на изключително важен, със съществено социално и практическо значение проблем. Използваният от докторантката достатъчен по обем материал, умело подбраните морфологични характеристики на доброкачествените и злокачествени епителни тумори на дебелото черво, и приложението на адекватни ИХХ-методики, дават голяма възможност за определяне на критерии, позволяващи разграничаването на тези тумори, и извеждане на съществени изводи относно биологичното поведение и прогресия в развитието на дебелочревните аденоми към карциноми.

Структура на дисертационния труд

Представеният дисертационен труд отговаря на изискванията на ФМ при МУ-Варна за структура и обем, написан е на 138 машинописни страници, на издържан научен стил и терминология, и е богат онагледен с 67 фигури и 16 таблици. Разпределението по раздели е както следва: титулна страница, съдържание и използвани съкращения-5 стр.; въведение 1 стр.; литературен обзор 28 стр.; цел и задачи 1 стр.; материал и методи 5 стр.; резултати 47стр.; дискусия 17 стр.; заключение- 1 стр.; изводи и приноси 2 стр.; списък на статии, свързани с дисертационния труд- 1 стр.; библиография 30 стр., включваща общо 345 източника, от които 6 на кирилица и 339 на латиница. От тях 65 /18,08% / са публикувани през последните 5 години, а общо 113 /32,46%/- през последните 10 години.

От направения обзор на литературата проличава много добрата осведоменост на д-р Згурова при запознаването с постиженията в световната наука, отнасящи се до доброкачествените и злокачествени тумори на дебелото черво. Това ѝ дава възможност за правилна оценка на въпроси, касаещи класификационни проблеми, морфологията, биологичното поведение, имунохистохимичния и молекулярно-генетичен профил на разглежданите лезии. Литературният обзор е написан с точен език и стил, като са анализирани резултатите от различните проучвания, в опит да се даде повече яснота на актуалния проблем. Висока оценка заслужават многостранното и задълбочено познаване на обсъжданите данни, както и способността на дисертантката да дискутира и анализира богатата научна информация.

Обзорът е представен на 28 стр., разпределен в 6 глави, отнасящи се до: 1. Епидемиология на КРК; 2. Етиология на КРК; 3. Морфологична характеристика на доброкачествените новообразувания на дебелото черво; 4. Морфологична характеристика и стадирание на КРК; 5. Молекулярно-генетични нарушения при КРК, вкл. фази на карциногенезата и пътища на колоректалната карциногенеза; 6. Основни гени, участващи в колоректалната карциногенеза.

Първата глава от обзора д-р Згурова е посветила на епидемиологията на КРК, като в сравнителен аспект е представила съществуващите литературни данни за честотата, заболяемостта и смъртността от КРК в света, Европа и в България. От изложеното се открояват три съществени момента- 1. Наличните данни за все още ниската 5-годишна преживяемост на болелите, независимо от напредъка в лечението на КРК; 2. Трайната тенденция в България към повишаване заболяемостта и смъртността; и 3. Многократно нарастващата честота на КРК с напредване на възрастта- докато под 30 год. възраст заболяват 4 на 100 000, при пациентите над 75год. стойностите се увеличават до 120 на 100 000!

Д-р Згурова е направила задълбочен преглед и анализ на етиологията и рисковите фактори, отговорни за развитието на КРК, като отбелязва разделянето на КРК в зависимост от етиологичните фактори на три форми- спорадична, фамилна и наследствена, с подробно описание на характеристиките на всяка една от тях. Авторката посочва, че от рисковите фактори на околната среда с най-голямо значение за развитието на КРК е диетата.

Извършен е подробен анализ на различните видове доброкачествени образувания на дебелото черво, с акцент върху хетерогенната група на хиперпластните полипи, до скоро неразглеждани като предракови заболявания, и понастоящем разделени в съвременната класификация на : хиперпластен полип, назъбен полип/аденом и традиционен назъбен аденом. Авторката се спира подробно при описанието на морфологичните критерии за категоризация на различните видове аденоми и съществуващия риск от малигнизация при всеки от тях. Подробно са описани и хистологичните типове на КРК съгласно класификацията на СЗО от 2010 год, както и критериите за типизация при отделните хистологични варианти на КРК. В таблица е представено pTNM- стадирането на КРК, съгласно 7-мата ревизия на класификацията на СЗО на КРК от 2010 год. Разгледани са принципите за стадиране и градиране на КРК на базата на трите основни пункта- размер на тумора, разпространение в регионалните лимфни възли и далечни метастази. Д-р Згурова отбелязва, че тази стадийна система се приема като най-важния предиктор за изхода на заболяването, давайки ценна информация за растежа на тумора и разпространението в лимфните възли и далечни органи.

С особено внимание д-р Згурова подхожда към разглеждане на молекулярно-генетичните нарушения при КРК, като посочва и 4-те фази на карциногенезата, представени за първи път през 1949 год. от Berenblum и Schubik , включващи инициация, промоция, конверсия и прогресия. Направено е описание на протоонкогените и туморсупресорните гени, участващи в канцерогенезата. Д-р Згурова отбелязва и откриването неотдавна на нова група гени- т.н. „мутаторни гени“, които също вземат участие в туморогенезата, отговаряйки за целостта на генома и за точността при предаване на наследствената информация.

Анализирайки молекулярните механизми на КРК, д-р Згурова се спира конкретно на трите основни пътя на колоректалната карциногенеза: път на хромозомна нестабилност, на микросателитна нестабилност и фенотип на метилирани CpG острови/CIMP/, и прави описание на честотата, локализацията, хистологичния тип, степента на диференциация, отговор на терапия и обща преживяемост при колоректалните карциноми, възникнали по съответния път.

В самостоятелна глава д-р Згурова прави преглед на основните гени, участващи в колоректалната канцерогенеза, като вниманието ѝ най-вече е насочено към: **протеин p53**, кодиран от ген TP53, със засилен напоследък интерес към изучаване на p53 мутацията на гена

като предиктивен маркер за малигнена трансформация при колоректалните аденоми; **APC-генът**, мутациите на който са обект на проучвания при колоректалните аденоми по отн. прогностичното им значение за развитието на КРК; **BRAF-генът**, мутации при който се появяват в ранен стадий от канцерогенезата на КРК, а наличието им е свързано с ниска преживяемост на пациентите. Накратко са описани и други гени, имащи отношение към канцерогенезата на КРК, а именно KRAS2, 18qLOH; TGF-betaRII и MMR-гени.

Д-р Згурова завършва обзора с интересен коментар по отн. на вече навлизащата в практиката концепция за „field carcinogenesis“ /“ field effect“, „field defect“ and „field cancerization“/, в основата на която е залегнало твърдението, че както видоизменената, така и нормалната мукоза притежават някои молекулярни характеристики, спомагащи за промоция на канцерогенезата. Докторантката изказва хипотезата, че в околната лигавица също настъпват генетични увреждания, водещи до прогресия на аденома към карцином. Предложените за провеждане в разработваната тема ИХХ-изследвания на протеини, участващи в колоректалната канцерогенеза, върху група от колоректални несинхронни аденоми, синхронни/метахронни аденоми и КРК, имат за цел потвърждаване на тази хипотеза чрез търсене на зависимост между молекулярните промени и клиничко-морфологичните характеристики на колоректалните аденоми и КРК. Тази зависимост може да послужи като прогностичен фактор за развитието на КРК, а някои молекулярни маркери могат да имат прогностична стойност по отношение развитието на метастази.

Цел и задачи

Целта на дисертационния труд „Сравнителен морфологичен и имунохистохимичен анализ на бенигнени и малигнени епителни тумори на дебелото черво“ – „да се проучи имунохистохимичната експресия на тумор-супресорните протеини APC, p53, SMAD4, MSH2 и онкопротеина BRAF при бенигнени и малигнени епителни тумори на дебелото черво във връзка с клиничко-морфологичните показатели и да се изясни ролята им в туморната инициация и прогресия“ е точно и ясно формулирана, конкретна и адекватна на дисертационната тема. Тя, и произтичащите от нея 7 задачи са правилно конструирани и изпълними и представляват логично продължение на литературния обзор, даващо възможност направените изводи от научната разработка да имат практическо приложение.

Задачите включват: Проучване клиничко-морфологичните характеристики на пациенти от контролна група, пациенти с несинхронни аденоми, синхронни/метахронни аденоми и КРК; проучване и сравнителен анализ на експресията на протеините APC, p53, SMAD4, MSH2 и BRAF в контролната група, в туморната тъкан на несинхронните аденоми, синхронни/метахронни аденоми и КРК; анализиране експресията на APC, p53, SMAD4, MSH2 и BRAF-протеините във връзка с туморния стадий.

Материал и методи на изследване. За целите на разработвания дисертационния труд е използван достатъчен по обем материал, необходим за статистическа обработка на данните и определяне на тяхната достоверност. В дисертацията обект на проучването са 69 хирургични и щипкови биопсични материали, разпределени в 4 групи: **Първа група**-контролна,

включваща нетуморна тъкан в съседство на синхронните/метахронни аденоми; **Втора група**- несинхронни аденоми- от 30 пациента с аденоматозни полипи, от които 10 тубуларни, 10 тубуло-вилозни и 10 вилозни аденоми; **Трета група**- 18 тъканни проби от синхронни/метахронни аденоми при пациенти с КРК /12 синхронни и 6 метахронни аденоматозни полипи/; **Четвърта група**- 21 КРК при пациенти със синхронни/метахронни аденоми; от групата са изключени пациенти с КРК, асоцииран с IBD.

В разработката дисертантката е подбрала и включила голям набор от адекватни за целите на изследването методи: **1.Рутинни хистологични изследвания** върху биопсичен материал, включващ: А. Щипкови полипектомии и щипкови биопсии от несинхронни и синхронни/метахронни полипи; Б. Чревен резектат с КРК. Всички материали са обработвани по стандартния парафинов метод и оцветявани с ХЕ за оценка на хистологичните промени. Подробно са описани използваните критерии за патоморфологична оценка на аденомите, включващи размер, локализация, хистологичен вид и степен на диференциация. Разпределението на аденомите в зависимост от локализацията е: **в десен колон**- туморни формации, разположени в цекум, колон десценденс, флексура хепатика, колон трансверзум и флексура лиеналис; в лява дебелочревна половина- туморни формации в колон десценденс, сигма и ректум. Патоморфологичната оценка на КРК включва локализация, размер на тумора, дълбочина на инвазия, степен на диференциация, наличие на метастази в лимфните възли и далечни органни метастази; разпределението в зависимост от локализацията на туморната формация е по същите критерии, описани при аденомите. И при двата вида- аденоми и карциноми са посочени точно критерии за категоризация на всеки параметър.

2. Специфични, имунохистохимични методи на изследване, с използван индиректен имунопероксидазен метод, чрез който е оценена експресията на 5 антитела: anti- APC; anti-p53; anti-SMAD4, anti-MSH2 и anti- BRAF. Антителата са производство на Neo Markers Santa Crus Biotechnology. Анализът е извършван с помощта на mini KIT high Ph DAKO K8024 при стандартни протоколи. При провеждането на ИХХ- реакциите са спазени всички елементи на методиката, вкл. стъпките в подготовката на биопсичните материали за ИХХ-изследване, технологична дисциплина, както и описание на локализация на експресията /ядрена, мембранна, цитоплазмена /, позитивна и негативна контроли и др., като критерии за позитивност са точно формулирани при отчитане на резултатите.

Имунохистохимичният анализ включва: **Пациенти от втора група с несинхронни аденоми**- при тях е определяно нивото на тъканната експресия на APC и BRAF- протеина; **на пациенти от трета, четвърта и първа /контролна / група** е определяно нивото на експресия на APC, p53, SMAD4, MSH2 и BRAF. Оценката на ИХХ-експресия е извършвана върху поле с най-висока интензивност, отчитана при увеличение 400 /10x40 / за всеки отделен случай. Използван е полуколичествен метод, като процентът на позитивните клетки е оценяван в 4 категории: 0 категория- от 0-5% площ; 1 категория- от 6-25% площ; 2 категория-26-50%, 3-та категория- 51-75% и 4-та категория- над 75% площ. Иинтензивността на реакцията е оценявана по четиристепенна скала- от 0-липсваща оцветка, до 3+ с тъмнокафява оцветка. Общият скор е изчисляван по формула, като стойности от 0-8 са определяни като ниски, а от 9-12- като високи.

Получените резултати са обработени чрез богат набор от статистически методи за анализ на данните, гарантиращи тяхната достоверност. Приложени са: **1. Дескриптивен анализ** – за представяне честотата на разпределение на анализирания признаци по групи; **2. Тест на Стюdent / t-критерий/** за две независими извадки; **3. Дисперсионен анализ /ANOVA/** за оценка влиянието на даден фактор; **4. Логистичен регресионен анализ**- създаване на адекватен статистически модел за оценка прогнозната вероятност за присъствие/отсъствие на метастази в зависимост от изследваните рискови фактори. Обработката на данните е осъществена чрез използването на статистически софтуерен пакет STATISTICA 10.0.

Резултати

Резултатите от проведеното в дисертационната разработка изследване са най-значителната част от труда и демонстрират опит за максимална обективност при боравенето на авторката с тях. Следвайки последователността на поставените задачи, д-р Згурова се спира първоначално на **клинико-морфологичната характеристика на пациентите с несинхронни, синхронни/метакхронни аденоми и КРК**, с проследяване на показателите пол, възраст, размер, разположение и степен на диференциация. При пациентите с несинхронни аденоми установената средна възраст е 64,73 год, преобладават тези от мъжки пол; болшинството от аденомите са с р-ри над 0,5 см / 23 пациента/ и с предимно левостранна локализация; по 10 са аденомите от тубуларен, тубуловилозен и вилозен хистологичен вид; 28 от аденомите са високо диференцирани, и само два- с ниска степен на диференциация.

При пациентите със синхронни/метакхронни аденоми средната възраст е 69,28 год, отново преобладават мъжете- 13 и 5 жени; средният размер на аденомите е 2,33 см, отново локализацията е левостранна. По отн. хистологичния вид, най-голям е броят на тубуларните аденоми /9/; високодиференцирани аденоми са 13, а 5 аденома са нискодиференцирани.

Средната възраст на пациентите с КРК е 69,28 год, 14 са мъже и 7- жени; левостранна локализация има при 15 случая, в дясно са локализиранни 6 аденома; всички са с умерена степен на диференциация. По отн. на стадия, 11 от КРК са в Т3 стадий, 6- в Т4 и 4 в Т2 стадий. В 13 от случаите/61,90%/ липсват метастази в л. възли, а в 15 /71,43%/липсват органни метастази. Проведеният статистически анализ показва права корелационна зависимост между размер на тумора и възрастта на пациентите-с увеличаване на възрастта се увеличава съответно и размера на тумора. Т-стадия на тумора корелира със статуса на лимфните възли- увеличената инвазия в стената на червото води до увеличен риск от поява на метастази.

Интересни резултати и зависимости се откриват при проследяване експресията на използваните при ИХХ-изследвания антитела, като за всяко Ат е направена оценка на площта на експресия, интензивност на експресия, общия скор и степен / ниска и висока/ на експресията на протеина. След описанието на данните при всяко едно от антителата е направен сравнителен анализ между експресията на Ат, оценена по четирите показателя, и съответните клинико-морфологични характеристики, като е търсена зависимост между тъканната експресия на Ат и наличието на лимфни и органни метастази, с оглед прогностичната стойност на тъканната експресия. В дискусията данните се сравняват с тези от литературните източници.

При проследяване експресията на APC-протеина в несинхронните аденоми се установява преобладаване на аденомите с изразена, интензивна експресия / в 17 е 3+/, и в 6 от аденомите-е 2+. Липсва статистически значима зависимост в експресията на протеина между различните хистологични типове аденоми и клинично-морфологичните параметри. Общият скор е нисък, без статистически значима разлика между него и клинично-морфологичните показатели.

В синхронните/метахронни аденоми липсва статистически значима зависимост процента на генна експресия, и размера, локализацията, хистологичният вид и степента на диференциация на аденомите. Интересно е да се отбележи обаче наличие на статистически значима зависимост между площта на експресия и степента на диференциация- установява се по-висока експресия на Ат при високодиференцираните аденоми. При отчитане на общия скор на експресия на APC се установява сигнификантна връзка с размера, локализацията и хистологичния вид на аденома. Високи стойности на общия скор се наблюдават при аденоми с по-големи размери, с преобладаване на вилозната компонента и локализация в дясната половина на колона.

Що се касае до резултатите, отнасящи се за експресията на APC в туморната тъкан на КРК се вижда, че липсва статистически значима разлика между интензивността на експресия и клинично-морфологичните показатели пол, възраст, размер, локализация и TNM стадий. Чрез проведения логистичен регресионен анализ обаче се установява обратно пропорционална зависимост /с достоверност 71,43% / между интензитета на експресия и наличието на метастази в лимфни възли, което може да се тълкува в аспект, че ниската експресия на Ат повишава риска от метастази в лимфните възли. Това дава основание на д-р Згурова да предположи и изкаже мнение, че APC-протеинът участва не само в ранните фази от развитието на карцинома, но е и рисков фактор за неговото метастазиране. Обратнопропорционална зависимост има и между общия скор и възрастта на пациентите с КРК. Експресията на протеина се понижава с увеличаване възрастта на пациентите, при статистически значима разлика.

Направената сравнителна оценка на интензитета и площта на експресия на APC между посочените до тук групи показва наличие на статистически значима разлика между площта на експресия на протеина м/у несинхронните и синхронни/метахронни аденоми, и между синхронните/метахронни аденоми и КРК.

При проследяване експресията на протеина p53 в контролната група, в туморната тъкан на синхронните/метахронни аденоми и КРК по съществени зависимости се отнасят до наличие на статистически значима разлика м/у интензитета на експресия и клинично-морфологичните характеристики размер, локализация и хистологичен вид при синхронните / метахронни аденоми. По-висока интензивност и по-висок процент на експресия има при по-големите аденоми, наличие на вилозна компонента, локализация в дясно и ниска степен на диференциация / при аденоми с по-висок процент на експресия/. Изследваният общ скор на експресия показва статистически значима разлика м/у него и клинично-морфологичните показатели размер, локализация и хистологичен вид на аденома. И тук по-високите стойности за общия скор са характерни за аденоми с по-големи размери, вилозна компонента и дясна локализация. Проведената сравнителна оценка на интензитета и площта на експресия на p53 показва статистически значима разлика м/у процентът на експресия на протеина p53 при КРК

спрямо синхронните/метахронни аденоми. По-висок е общият скор на експресия на p53 при КРК спрямо контролната група и тази на синхронните/метахронни аденоми. Изхождайки от това, че p53 има различна по площ и интензитет експресия в зони с умерена и тежка дисплазия, д-р Згурова предлага използването на тристепенната скала при определяне степента на диференциация. Подкрепено от данни в литературата е мнението на авторката, че акумулацията на p53 е предиктор за малигненост на колоректалните аденоми и за участие в карциномната туморна прогресия, особено в по-късните етапи от развитието на карцинома.

Експресия на протеина SMAD4 в туморната тъкан при синхронните/метахронни аденоми показва статистически значима разлика между интензивността на експресия и параметрите размер, локализация и хистологичен вид. Високата експресия се наблюдава при по-големи аденоми, десностранна локализация и наличие на вилозна компонента. Установява се статистически значима разлика между общия скор и параметрите размер, локализация и хистологичен вид на аденома.

Експресията на протеина SMAD4 в туморната тъкан на КРК не показва статистически значима разлика между интензитет, площ на експресия, общ скор на експресията и клинично-морфологичните показатели. Направената сравнителна оценка на експресията на SMAD4 м/у контролната група, туморната тъкан и синхронните/метахронни аденоми и КРК показва липса на статистически значима разлика между всичките изследвани групи.

Резултатите от проследената експресия на протеина MSH2 в контролната група, в туморната тъкан на синхронните/метахронни аденоми и КРК показват наличие на статистически значима зависимост м/у интензитета на експресия и показателите размер и локализация на аденома; по-висока е експресията при по-големи аденоми и десностранна локализация. Статистическа зависимост се наблюдава спрямо размера на аденома- по-висок е % на експресия при аденомите с по-големи размери. Отчетеният общ скор на експресия на протеина показва наличие на статистически значима разлика м/у общия скор и размера, локализацията и хистологичния вид на аденома.

В туморната тъкан на КРК не се установява статистически значима разлика м/у интензивност на експресия и клинично-морфологичните показатели пол, възраст, размер, локализация и TNM стадий. Липсва зависимост и при проведения логистичен регресионен анализ. По-висок процент на експресия се наблюдава при левостранна локализация на тумора. Сравнителната оценка показва статистически значима разлика между интензитета и площта на експресия на анти тялото при КРК при сравнение с контролната група.

Експресия на протеина BRAF. При несинхронните аденоми се установява по-висок процент на експресия в тубуло-вилозните спрямо тубуларните аденоми, като разликата е статистически значима. Експресията на протеина в туморната тъкан на синхронните/метахронни аденоми показва статистически значима разлика между размера на аденомите и интензивността на експресията на Ат- по-високата експресия е характерна за аденомите с по-големи размери. При проследяване експресията на Ат в туморната тъкан на КРК, не се установява статистически значима разлика между интензитета на експресия и клинично-морфологичните показатели пол, възраст, размер, локализация и TNM-стадия. Направената сравнителна оценка показва статистически значима разлика между интензивността, площта и общия скор на експресия м/у синхронните/метахронни аденоми и КРК. По-висок е % на Ат при синхронните/метахронни

аденоми при сравнение с несинхронните, като разликата е със статистическа значимост. Статистически значима разлика има и между процента на експресия на антитялото при КРК спрямо контролната група.

На базата на логистичен регресионен анализ се установява права корелационна зависимост м/у интензитета и площта на експресия на протеина BRAF и появата на метастази в лимфните възли. Увеличените интензитет и площ на експресия увеличават риска от поява на метастази. Установява се, че общият процент на коректно прогнозираните случаи на базата на % експресия на протеина чрез логистичен модел е 71,43%- т.е., моделът е прогнозирайл с точност 44,44% присъствието на метастази и липсата им в 91,67% от случаите. Обратна корелационна зависимост е установена между интензивността и площта на експресия на протеина и появата на органни метастази. С увеличаване интензитета и площта на експресия намалява риска от поява на метастази. На базата на интензивността на експресия на протеина чрез логистичния модел може да се прогнозира с точност от 85,71% М- стадия на КРК. Общият % на коректно прогнозирани случаи на базата на площ на експресия на Ат чрез логистичния модел е 80,71%- т.е., моделът е прогнозирайл с точност 92,85% наличието на метастази и липсата им в 57,14%.

Увеличената по площ експресия на BRAF рена при синхронните/метахронни аденоми и КРК означава, че BRAF участва активно в процеса на карциногенеза, вкл. в класическия път, характеризиращ се с последователност при многостъпалния процес аденом-карцином, като участието на протеина започва в ранните фази от развитието на конвенционалните аденоми и се проявява като късно събитие, свързано с авансирането на тумора.

В заключение трябва да се отбележи, че анализът на получените в разработката резултати е осъществен на добро методично ниво, което е позволило на д-р Згурова да направи съответните изводи и заключения. Прави впечатление вниманието, с която авторката търси зависимост между тъканната експресия и наличието на лимфни и органни метастази, с оглед оценка прогностичната стойност на тъканната експресия. Изложението на получените данни и тяхното обсъждане са структурирани адекватно и с логическа последователност, израз на умението на авторката да борави с научната информация.

Дискусия. В този раздел са анализирани подробно резултатите от собственото проучване, като се прави сравнение с посочените в литературата данни от изследванията на други автори. Д-р Згурова проявява критичност както при случаите на несъответствие, така и при съответствие между собствените и литературни данни. Добро впечатление прави фактът, че в изложението при дискусията д-р Згурова изказва свое лично мнение.

Изводи: От проведеното изследване са оформени 12 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 Згурова е формулирала 5 приноса на дисертационния труд, разпределени в две групи: **Три научни приноса с оригинален характер,** и **два научни приноса с практическо-приложен характер.** Приемам всички приноси без забележки, тъй като те са обективно отражение на получените при разработката на дисертационния труд резултати.

Във връзка с дисертационния труд дисертантката има 3 публикации- 2 отпечатани в наши и 1 в чуждо списание. Публикационната активност- брой на публикациите, тяхното съдържание и стойност отговарят на изискванията за представяне на резултатите от научните изследвания.

Авторефератът е изготвен в съответствие с приетите научни изискванията. Той е отпечатан на 47 страници, които включват всички основни части на дисертационния труд, таблици, фигури и снимки. Съдържанието на автореферата дава достатъчно добра и пълна представа за цялостния дисертационен труд, като отразява постигнатите резултати и направените изводи от разработката.

Заключение:

Дисертационният труд на д-р Недялка Тодорова Згурова е резултат от добре планирано и задълбочено проучване, третиращо актуален проблем, отнасящ се до възможностите за въвеждане на някои нови молекулярни маркери в диагностиката на доброкачествените и злокачествени тумори на дебелото черво. Теот своя страна биха помогнали и дали възможност да се проследят отделните етапи на многостъпалния процес на колоректалната карциногенеза, като се анализират молекулярните нарушения и риска от малигнизация на конвенционалните аденоми на базата на туморната експресия на различни тумор-супресорни протеини и онкопротеини. Смятам, че получените от изследването резултати при определяне на имунохистохимичния профил на колоректалния карцином биха могли да допринесат до голяма степен за изясняване на все още някои неясни моменти от биологичното поведение на тумора, което е от съществено значение за изработването на ефективни стратегии за превенция и терапия на пациентите с КРК, които могат да реализират значителен социално-икономически ефект. Трудът, който се откроява с добра литературна осведоменост и стил при интерпретацията на резултатите, е изцяло лично дело на дисертантката. Целта на разработката е постигната, поставените задачи са изпълнени. Изводите са точни, ясно формулирани и изчерпателни. Приносите имат не само научна, но и практическа стойност и представляват база за изпълнение на бъдещи научно-изследователски проучвания. Представените публикации и научни съобщения, в които д-р Згурова е първи автор отговарят на изискванията и са доказателство за водещата ѝ роля в проведените изследвания. Дисертацията е написана на издържан научно-литературен език и е много добре онагледена с таблици и цветни снимки.

Получените резултати и приносите в дисертационния труд на д-р Згурова отговарят на всички изисквания на ЗРАСРБ, Правилника за неговото прилагане и Правилника на МУ-Варна. Дисертационният труд показва, че д-р Згурова притежава необходимите теоретични знания и умения по научната специалност Патологична анатомия, като демонстрира качества за самостоятелно провеждане на научно изследване.

Поради гореизложеното, убедено давам своята **положителна оценка** на предложения дисертационен труд, като препоръчвам на уважаемите членове на Научното жури да присъдят образователната и научна степен **„Доктор“** на д-р Недялка Тодорова Згурова по научната специалност **„Патоанатомия и цитопатология“**

20.07.2020
Варна

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

.....
