

РЕЦЕНЗИЯ

**от проф. д-р Ангел Атанасов Ангелов, д. м. н. –
специалност “Патологоанатомия и цитопатология”, МЦ “Света Анна
ЕООД гр. Варна**

**на дисертационен труд за придобиване на
образователна и научна степен „ДОКТОР“ по област на висше
образование 7. Здравеопазване и спорт, професионално
направление 7.1. Медицина по научната специалност
“Патологоанатомия и цитопатология” Шифър 03.01.03
на тема:**

„СРАВНИТЕЛЕН МОРФОЛОГИЧЕН И ИМУНОХИСТОХИМИЧЕН АНАЛИЗ НА БЕНИГНЕНИ И МАЛИГНЕНИ ЕПИТЕЛНИ ТУМОРИ НА ДЕБЕЛОТО ЧЕРВО”

**на д-р Недялка Тодорова Згурова
докторант на самостоятелна подготовка
към Катедра по обща и клинична патология, съдебна медицина и
деонтология,
Факултет „Медицина” при Медицински университет – Варна
Научен ръководител: Проф. д-р Мария Ангелова Цанева, д.м.
Научен консултант: Доц. Милка Христова Георгиева, д.б.**

Със заповед N: P-109-155 / 18.05.2020 г. на Ректора на МУ Варна съм избран за член на научното жури и съответно на основание на Протокол № 1 от 02.06.2020 г. на Научното жури съм определен за официален рецензент по процедурата за придобиване на образователната и научна степен „доктор” с кандидат д-р Недялка Тодорова Згурова.

Кратки данни за професионалното развитие и квалификацията на докторантката:

Д-р Недялка Згурова е родена през 1987 г. Завършила е МУ „Проф. д-р Параскев Стоянов” – Варна през 2011 г. От 2012 година до настоящия момент е асистент в Катедрата по патология – МУ – Варна и лекар в МБАЛ „Света Марина” - Варна. От 2017 г. има придобита специалност по обща и клинична патология. Владее английски и немски езици (според самооценка - ниво B1). Компютърна грамотност – MS Word, MS Exel, интернет. В продължение на години разработва проблемите на туморната патология на дебелото черво. Дисертационният й труд е резултат на задълбочени морфологични изследвания и търсения за изучаване на

факторите определящи възникването и прогресията на доброкачествените и злокачествени епителни тумори на дебелото черво.

Актуалност и значимост на темата:

Туморите на дебелото черво заемат едно от централните места в човешката патология и през последните десетилетия се наблюдава постоянно нарастване на честотата им. За ефективната им превенция и лечение е от съществено значение изясняването и познаването на ролята на типовете на увреждане на генома водещи до възникване на колоректален карцином (КРК). Пътищата на колоректалната канцерогенеза са различни при *de novo* възникващите карциноми и при тези, които са резултат на малигнизация на предшестващи аденоматозни полипи. Те включват хромозомна или микросателитна нестабилност и епигенетични нарушения в резултат от хиперметилация на промоторните зони на различни гени. Това обуславя хетерогенността на тези тумори, което е в основата и на различното им биологично поведение.

Дисертационният труд на д-р Недялка Тодорова Згурова е посветен на изясняване на ролята на някои тумор супресорни протеини и онкопротеини при доброкачествени и злокачествени тумори на дебелото черво. Той е илюстрация на новите тенденции в съвременната патология за търсене и определяне на различни фактори и пътища влияещи върху възникването, прогресията и метастатичния потенциал на злокачествените тумори. Известните резултати от клиничко-морфологични и имунохистохимични изследвания на КРК са противоречиви. Това се отнася до голяма степен за стратификацията на риска за възникване на КРК въз основа на определяне ролята на различните протеини участващи в стъпаловидния процес на неопластичната трансформация в дебелото черво.

Разнообразният биопсичен материал и умело подобрите молекулярни маркери участващи в колоректалната канцерогенеза, които са обект на настоящето проучване, позволяват да бъдат направени съществени приноси относно възникването, прогресията и биологичното поведение на КРК.

Структура на дисертационния труд:

Дисертационният труд на д-р Недялка Тодорова Згурова е оформен според изискванията на 138 страници и е онагледен с 16 таблици и 67 фигури. Дисертацията е с добре балансирана структура и включва съдържание (4 стр.), използвани съкращения (1 стр.), въведение (1 стр.), литературен обзор (28 стр.), цел и задачи (1 стр.), материал и методи (5 стр.), собствени резултати (47), дискусия (17 стр.), заключение (1 стр.), изводи и приноси (2 стр.) и литература (30 стр.).

Библиографията съдържа общо 345 източника, от които 6 на кирилица и останалите на латиница. От тях 15 % са публикувани през последните 5 години, а общо 40 % през последните 10 години.

Авторефератът е с обем 47 стр. в него са включени 18 фигури и 3 таблици. Той е добре структуриран и илюстриран. Отразява достатъчно добре съдържанието на дисертационния труд.

Литературен обзор:

Литературният обзор е структуриран в 6 глави и показва добра осведоменост на докторантката по темата. По обем и съдържание е достатъчен за въвеждане в проблема. Написан е стегнато с ясен език. В първите четири глави накратко са разгледани епидемиологията, етиологията, рисковите фактори и морфологичната характеристика на доброкачествените новообразувания на дебелото черво и на колоректалния карцином. Специално внимание се обръща на фенотипния профил на предшестващите промени в дебелочревната лигавица и значението им за колоректалната канцерогенеза и на морфологичната характеристика на различните аденоматозни полипи на дебелото черво.

На последните две глави (5 и 6) се пада повече от половината от обема на обзора. Те са посветени на молекулно-генетичните нарушения при КРК и на основните гени участващи в канцерогенезата на дебелото черво. Проблеми, които касаят същността на дисертационния труд. Направен е подробен и критичен анализ на пътищата на колоректалната канцерогенеза. Подчертава се, че възникването и прогресията на КРК е многоетапен процес на увреждане на генома по три основни механизма: хромозомна нестабилност, микросателитна нестабилност и фенотип на метилиране на CpG острови (CpG island methylator phenotype, CIMP). Разгледани са и останалите по-редки пътища на канцерогенеза. Изтъква се, че данните за значението на гените KRAS, TP53 и 18q като прогностични маркери са противоречиви. Обръща се внимание на факта, че карциномите, в различните отдели на дебелото черво – проксимални / дистални, дясна / лява половина, показват съществени различия по отношение пътища на канцерогенеза, морфология и биологично поведение. Факт даващ основание да се търсят зависимости от промените в едни или други молекулярни маркери и възможности за откриване на нови прогностични и предикативни фактори и пътища за профилактика и лечение на КРК. Акумулирането на аберантно ДНК метилиране, водещо до епигенетична нестабилност, е относително често при аденоми и карциноми на дебелото черво. Във връзка с това се обръща внимание на предположението, че при CIMP позитивните тумори има активиран BRAF ген.

Интерес представлява хипотезата на K. W. Kinzler и B. Vogelstein (**K. W. Kinzler и B. Vogelstein. Landscaping the Cancer Terrain. *Science* 15**

May 1998: Vol. 280, Issue 5366, pp. 1036-1037) от 1998 г. за ролята на абнормната микросреда и ефекта на landscaping гените като SMAD4, които имат индиректен ефект върху неопластичната трансформация на епителните клетки чрез клетъчната микросреда, действайки върху околните стромални клетки. На стр. 27 д-р Згурова дискутира този проблем като цитира горепосочените автори и годината публикацията им 1998. Изненадващо същата статия не фигурира в списъка на използваната литература. Под № 161 фигурира друга статия на голям колектив с първи автор К. W. Kinzler от 1991 г. на различна тема. Освен това докторантката пише „*Епителните клетки, които претърпяват неопластична трансформация произлизат от стромата.*” Във въпросната статия няма подобно твърдение. Тук за сравнение включвам абзаца за *Landscaper defects* от статията, както е в оригинал:

„*Landscaper defects.* Patients with juvenile polyposis syndrome (JPS) and ulcerative colitis (UC) develop hamartomatous polyps in which the proliferating defective population of cells appears to be derived from the stroma. Consequently, the epithelial cells associated with the polyps are more likely to undergo neoplastic transformation, as a result of an abnormal microenvironment. Likewise, the initially normal epithelial cells associated with the inflammatory process of UC are at increased risk of neoplastic transformation.” Не е цитиран друг литературен източник. Не е ясно това твърдение на авторката ли е или е на друг автор, който е пропуснат.

По-долу в текста пише: „*Това предположение се оспорва от други автори...*”, но такива не се посочват.

В последната глава е направен преглед на основните гени участващи в канцерогенезата на дебелото черво и се обосновава необходимостта от тяхното изследване при прекурсорни лезии и при КРК с оглед оптимизиране факторите на риска за възникване и на биологично поведение на КРК. На основата на концепцията за възникване на канцерогенно поле („*field carcinogenesis /cancerization / effect /defect*”) се изказва хипотезата за генетични промени в околната непроменена лигавица свързани с прогресията на туморния процес.

В кратко заключение, което не е оформено в отделна глава, се посочват съществуващите неясноти и противоречия по отношение дискутирания проблем. Убедително се обосновава необходимостта от продължаване на проучванията с оглед профилактиката, стратифициране на риска, класифициране на КРК въз основа на молекулярните механизми на туморогенезата и разширяване на възможностите за персонализирана терапия.

Цел и задачи:

Д-р Згурова формулира основната цел на дисертационния си труд като логично продължение на заключението направено въз основа на литературния обзор, а именно „да се проучи имунохистохимичната

експресия на тумор супресорните протеини APC, p53, SMAD4, MSH2 и онкопротеина BRAF при бенигни и малигни епителни тумори на дебелото черво във връзка с клинично-морфологичните показатели и да се изясни ролята им в туморната инициация и прогресия.”.

За постигането на тази цел са поставени 7 основни задачи, които уточняват пътищата за реализирането ѝ. Те са правилно формулирани и изпълними.

Материал и методи:

Изследваният материал от 69 хирургични и щипкови биопсии е задоволителен, но изследването на по-голям брой случаи би допринесло за по-голяма достоверност на получените резултати. Той е разпределен в четири групи: контролна група, несинхронни аденоми, синхронни/метахронни аденоми и последната група КРК със синхронни/метахронни аденоми.

За осъществяване на проучването са използвани адекватни морфологични и имунохистохимични и статистически методи. Патоморфологичната оценка на аденомите и КРК е осъществена по предварително определени критерии относно размера, локализацията, хистологичния вид и морфологичните белези на дисплазия.

Имунохистохимичното изследване е осъществено с използване на индиректен имунопероксидазен метод с помощта mini KIT high Ph Dako K8024. Изследвани са 5 моноклонални антители: Anti-APC, Anti-BRAF, Anti-SMAD4, Anti-MSH2 и Anti-p53. В първата, третата и четвърта групи са изследвани всички гореизброени антители, а във втората група само APC и BRAF. Не е посочена причината за това.

Методите за оценка и отчитане на имунохистохимичната експресия на отделните антители имат ключово място и определят достоверността на резултатите. В настоящето проучване отчитането е правено само в полета с най-висока интензивност, като останалите зони не са вземани под внимание. Не е дадена обосновка на този избирателен подход. Степента на интензивност е отчитана визуално в четиристепенна скала – 0, 1, 2, 3. Относителният дял на позитивните клетки е отчитан полуколичествено в проценти спрямо общия брой клетки в 5 категории – 0, 1, 2, 3, 4 (А не 4 както е отбелязано в дисертацията!). Стъпката между отделните категории с изключение на първата е 25 %. За формиране на общия скор е предпочетено произведението, а не сбора от получените стойности за интензивност и пропорция (% позитивни клетки). Тук също не е обоснован предпочетеният подход. Независимо от тези бележки приемаме, че получените резултати са отчетени правилно и са достоверни.

За интерпретация на получените данни е направен статистически анализ с използване на софтуерен пакет STATISTICA 10.0. Приложени са

дескриптивен анализ, тест на Стюдънт, дисперсионен анализ и логистичен регресионен анализ. Приложените статистически методи са адекватни за използваните цели.

Резултати и дискусия:

Разделът „Резултати” е представен в шест основни глави. Те са адекватно структурирани и следват логическата последователност определена от поставената цел и задачи за изпълнение. По същия начин е оформена и дискусията. Заключениеето е кратко и общо без да се основава достатъчно ясно на получените резултати.

В първата глава е представена клиничко-морфологичната характеристика на пациентите от втора, трета и четвърта групи. Във всяка от следващите пет глави са представени резултатите от имунохистохимичното изследване на отделните антитела със сравнителна оценка между отделните групи.

Дискусията следва същия ред, по който те са първоначално представени. Тя включва пет основни раздела съответстващи на петте изследвани антитела и кратко заключение.

Най-съществените резултати могат да бъдат резюмирани по следният начин:

Не се установява съществена разлика в експресията на тумор супресорния протеин APC между отделните хистологични типове аденоми. Високи стойности на общия скор на APC се наблюдават при аденоми с по-големи размери, наличие на вилозна компонента и локализация в дясната половина на колона. Чрез логистичен регресионен анализ, се доказва, че при КРК ниската експресия на APC е свързана с увеличаване риска за метастази в лимфните възли. Установява се значима разлика в proportion score (% на клетки с експресия) на APC между несинхронните и синхронните/метахронни аденоми, както и между синхронните/метахронни аденоми и КРК. В заключение от получените резултати д-р Згурова стига до извода, че APC участва не само в ранните стадии на колоректалната канцерогенеза, но и повишава метастатичния потенциал на КРК.

По отношение на p53 се открива достоверна зависимост на интензивността на реакцията и процента на позитивните клетки от размера, локализацията и хистологичния тип на аденомите. Тя е по-висока при аденоми с по-големи размери, с вилозна компонента и локализация в десния колон. Не се установява зависимост между експресията на p53 и клиничко-анатомичните показатели и TNM стадия при КРК. Същевременно общия скор на p53 при КРК е по-висок в сравнение с контролната група и групата на синхронни/метахронни аденоми. Основният извод е, че експресията на p53 в епителните клетки на аденоматозните полипи на

дебелото черво е предиктивен фактор по отношение прогресията на същите.

Интензивността на експресията и общия скор на SMAD4 протеина при аденомите, подобно на APC и p53, показва зависимост от размерите, наличието на вилозна компонента и локализацията в дясната половина на колона. По отношение на КПК най-същественото е, че се намира нисък общ скор на SMAD4 в 85 % от случаите. Също така липсва значима разлика в общия скор между четирите изследвани групи. Тук авторката правилно предпазливо интерпретира получените резултати, като изтъква, че липсата на зависимост между SMAD4 и TNM стадия вероятно се дължи на малкия брой случаи с КПК.

Резултатите от изследването на MSH2 показват подобно на останалите антители (APC, p53 и SMAD4) по-високи стойности на общия скор при аденоми с по-големи размери локализиращи в дясната половина на колона, които имат вилозна компонента. При КПК по-висок процент на експресия на SMAD4 се наблюдава при локализация на карцинома в лявата половина на колона в сравнение с дясната.

Представява интерес високият процент на експресия на BRAF в контролната група (83,33 %), почти колкото при КПК (80,95 %). Това на пръв поглед може да предизвика недоумение. Докторантката обаче изказва предположение, че това *«би могло да се разглежда като ранно събитие в колоректалната канцерогенеза, което възниква във видимо непроменена колоректална лигавица в съседство на синхронните/метахронни аденоми»*. Предположението е оригинално, но е необходимо да бъде подкрепено от допълнителни изследвания. Установява се по-висока експресия на BRAF протеина при тубуловилозните в сравнение с тубуларните аденоми от втората група (несинхронни аденоми). В третата група значимо по-висока експресия се установява само при аденоми с по-големи размери. По отношение на КПК не се откриват значими разлики в експресията на BRAF в зависимост от клинично-анатомичните показатели и TNM стадия. Сравнителната оценка на експресията на BRAF е представена текстуално твърде неясно. Сравняват се по отделно интензивност и proportion score между отделните групи. Статистически значима зависимост се установява само между несинхронните аденоми и КПК, където експресията е по-интензивна. Направен е опит чрез логистичен регресионен анализ да се установи корелация между експресията на BRAF и NM стадия на КПК. Установява се права корелационна зависимост между експресията на BRAF и появата на метастази в лимфните възли. Според изложението *„моделът е прогнозиран с точност 92,85 % присъствието на метастази и липсата им в 57,14 % от случаите”*. Считам, че броят на изследваните 21 случая с КПК (от които само 6 с метастази) не позволява да се правят окончателни изводи за достоверността на модела. Тези резултати

могат да се считат за предварителни. Необходима е верификация върху значително по-голям брой случаи.

Изводи:

Въз основа на представените резултати са направени 12 изводи. Те отговарят на поставената цел и задачи. Добре са формулирани и логично изведени от получените резултати. Приемам ги така, както са представени.

Приноси:

Приемам научните приноси с оригинален характер, а именно: Направена е комплексна и сравнителна клиничко-морфологична и имунохистохимична характеристика на трите основни групи несинхронни, синхронни/метахронни аденоми и КРК като за целта е използван панел от пет антители.

Бих добавил като оригинален принос очертаването като обособена клиничко-анатомична група аденомите и карциномите локализиращи в дясната половина на колона. Това е от практическо значение, защото карциномите с тази локализация често се откриват късно и обикновено имат лоша прогноза. Препоръчително е понататъшните проучвания да се задълбочат в тази насока.

Считам, че приносите с научноприложен характер след допълнителни изследвания върху по-голям материал и адекватно тестване могат да намерят приложение в практиката.

Критични бележки:

1. Откриват се несъответствия между цитираните в обзора автори и списъка на използваната литература. В текста на обзора се откриват твърдения, които не са подкрепени от съответни литературни източници (По-подробно вижте на стр. 4 първи абзац от рецензията)
2. В раздела материал и методи никъде не отбелязано как е събран материала: проспективно от автора или ретроспективно с изследване на парафинови блокчета от архивен материал, както и от кои години е материалът. Тези данни са от съществено значение при цялостната оценка на дисертационния труд.
3. Неправилно се използва израза „площ на експресия” вместо процент на позитивни клетки, или както е прието proportion score.
4. Фиг. 1 и 2 са нечетливи и не допринасят с нищо за илюстрация на текста.
5. На много места в текста са изпуснати букви или цели думи. Например на стр. 22 втори абзац (6 ред) „Лигавицата на дебелото (?)

съдържа...” На места няма съгласуване по род като напр. на стр. 88 „Клетъчния делене”. Четящият остава с впечатление, че окончателното оформяне на дисертационния труд е направено набързо и небрежно.

Публикации и научни съобщения във връзка с дисертационния труд:

Във връзка с дисертационния труд д-р Згурова представя три пълнотекстови публикации в сборници от участия в научни форуми. Във всички тях докторантката е първи автор. Научната активност е достатъчна според изискванията.

Заключение:

Дисертационният труд на д-р Недялка Тодорова Згурова представлява научно изследователска разработка посветена на един от актуалните проблеми от туморната патология, а именно, изясняване на ролята на различни тумор супресорни протеини и онкопротеини във възникването, прогресията и биологичното поведение на колоректалния карцином. Той е резултат на добре планирано проучване. Оригинален е като замисъл и добре изпълнен. Той е нейно лично дело и демонстрира добра литературна осведоменост и умение за интерпретация на резултатите. Направени са оригинални приноси, които са основа за по-нататъшно проучване на проблема. Отправените критични бележки не намаляват стойността на работата, те са по-скоро насочени към необходимостта от по-голяма прецизност при изпълнението на бъдещи научно изследователски проекти на докторантката.

Дисертационният труд отговаря напълно на изискванията на Закона за развитие на Академичния състав на Република България и Правилника за развитие на Академичния състав на МУ – Варна за присъждане на образователната и научна степен „Доктор”. Това ми дава основание да дам моята положителна оценка и да предложа на уважаемото научно жури да гласува за присъждане на образователната и научната степен „Доктор” на д-р Недялка Тодорова Згурова.

08 юли 2020 г.

Рецензент:

Варна


проф. д-р Ангел Атанасов Ангелов, д. м. н.