



Медицински Университет - Плевен
Факултет "Медицина"
Катедра "Акушерство и гинекология"

д-р Ева Петрова Цонева

Връзката на ROMO1 с генезата на карцинома на маточната шийка

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

Докторска програма: „Акушерство и Гинекология“

Плевен 2026

Съдържание	СТР.
I. Въведение	7
III. Цел и задачи	9
1. Цел на изследването.....	9
2. Задачи.....	9
IV. Материали и методи	10
1. Качествен метод.....	10
2. Морфологичен метод.....	14
3. Статистически метод.....	16
V. Резултати	18
VI. Дискусия	26
VII. Заключение	29
VIII. Изводи	31
IX. Приноси на дисертационния труд	33
X. Публикации , участия в научни форуми, курсове и проекти свързани с дисертационния труд	35
XI. Апендикси	38

Дисертационния труд съдържа 128 стандартни страници и е структуриран в следните раздели: Въведение, Литературен обзор, Цел и задачи, Материали и Методи, Резултати, Дискусия, Заключение, Изводи, Приноси на дисертационния труд, Публикации, участия и форуми свързани с дисертационния труд, Апендикси и Библиография. Работата е илюстрирана с 20 фигури и 4 таблици. Включено е само едно приложение в раздел “Апендикси”. Библиографския списък включва 96 литературни източника.

Във връзка с дисертационния труд са направени 3 пълнотекстови публикации и 4 научни съобщения (постери) на европейски форуми.

Дисертационния труд е одобрен и насочен за публична защита от разширен Катедрен съвет на катедра “Акушерство и Гинекология”, факултет “Медицина”, при МУ- Плевен и въз основа на заповед на Ректора №1087/31.03.2026г. пред научно жури в състав:

Председател: чл. кор. проф. Славчо Томов, д.м.н

Членове: чл. кор. проф. Славчо Томов, д.м.н

проф. Явор Корновски, д.м.н

проф. Мария Ангелова, д.м.н

доц. Лъчезар Танчев, д.м

доц. Иван Иванов, д.м

Официални рецензенти: проф. Явор Корновски, д.м.н

доц. Иван Иванов, д.м

Материалите по защита са публикувани в сайта на МУ- Плевен
<http://www.mu-pleven.bg/index.php/bg/>

Използвани съкращения в текста

АС – аденокарцином

Akt – протеин киназа В

ASC – аденосквамозен карцином

CAF – карцином-асоциирани фибробласти

CIN – цервикална интраепителна неоплазия

СТ – компютърна томография

Drp1 – dynamin-related protein 1

EGFR – рецептор за епидермален растежен фактор

E2F – транскрипционен фактор Early region 2

EMT – епително-мезенхимен преход

FIGO – Международна федерация по акушерство и гинекология

FR – свободни радикали

GLUT1/4 – глюкозни транспортери 1/4

GSH – глутатион

HIF-1 α – хипоксия-индуцируем фактор 1 α

HLA – човешки левкоцитен антиген

HMA – хексаметилен амилорид

HPV – човешки папиломен вирус

IHC – имунохистохимия

LSIL – нискостепенна плоскоклетъчна интраепителна лезия

LVSI – лимфоваскуларна инвазия

MDSC – миелоид-деривирани супресорни клетки

MFN1 – mitofusin 1

MFN2 – mitofusin 2

MRI – магнитно-резонансна томография

mTOR – механистична мишена на рапамицин

OMA2 – oocyte maturation defective protein 2

OPA1 – optic atrophy 1 protein

PD-1 – рецептор за програмирана клетъчна смърт 1

PD-L1/L2 – лиганд на рецептора за програмирана клетъчна смърт 1/2

PET – позитронно-емисионна томография

PI3K – фосфоинозитид 3-киназа

PKM2 – пируват киназа M2

pRb – ретинобластомен протеин

ROMO1 – модулатор на реактивните кислородни видове 1

ROS – реактивни кислородни видове

SCC – плоскоклетъчен карцином

SCO2 – синтез на цитохром С оксидаза 2

SGLT – натрий-глюкозни котранспортери

TAM – тумор-асоциирани макрофаги

TGF- β – трансформиращ растежен фактор β

TIGAR – TP53-индуциран регулатор на гликолизата и апоптозата

VEGF – съдов ендотелен растежен фактор

VHL – туморен супресор Von Hippel–Lindau

WHO – Световна здравна организация

РМШ- рак на маточната шийка

КМШ- карцином на маточната шийка

I. Въведение

Ракът на маточната шийка остава едно от най-значимите злокачествени заболявания при жените в световен мащаб, въпреки наличието на ефективни средства за първична и вторична профилактика. Заболяването е тясно свързано с персистираща инфекция с високорискови типове човешки папиломен вирус (HPV), която представлява необходима предпоставка за развитието на цервикална интраепителна неоплазия (CIN) и последваща инвазия. Въпреки доказаната причинно-следствена връзка между HPV и карцинома на маточната шийка, прогресията към високостепенна дисплазия и инвазивно заболяване се наблюдава само при част от заразените жени, което предполага участие на допълнителни молекулни и клетъчни механизми.

Съвременните изследвания показват, че вирусните онкопротеини E6 и E7 не само нарушават клетъчния цикъл чрез инактивация на p53 и pRb, но и индуцират значими промени в клетъчния метаболизъм, митохондриалната функция и редокс-хомеостазата. В този контекст оксидативният стрес се разглежда като важен медиатор между вирусната персистенция, хроничното възпаление и геномната нестабилност, които подпомагат прогресията от предракови лезии към инвазивен карцином.

Въпреки високата чувствителност на съвременните скринингови методи, включително HPV тестване, цитология и колпоскопия, тяхната специфичност за клинично значими лезии остава ограничена. Това налага необходимостта от допълнителни биомаркери, които да отразяват активната туморна трансформация и да подпомогнат по-прецизното стратифициране на риска при HPV-позитивните пациентки.

В този контекст нараства интересът към митохондриално-свързани маркери и регулатори на редокс баланса. Един от потенциалните кандидати е ROMO1 (Reactive Oxygen Species Modulator 1) – протеин на вътрешната митохондриална мембрана, участващ в регулацията на продукцията на свободни радикали и поддържането на митохондриалната функция. Данни от други неоплазии показват връзка между повишена експресия на ROMO1 и туморна прогресия, но ролята му при HPV-асоциирани тумори остава недостатъчно изяснена.

Настоящият дисертационен труд е насочен към изследване на експресията на ROMO1 като потенциален биомаркер в цервикалната неоплазия. Чрез имунохистохимичен анализ на нормална цервикална тъкан, преканцерозни лезии (CIN) и инвазивен карцином се цели да се определи експресионният профил на ROMO1, да се оценят връзките му с клинично-патологични характеристики и да се постави маркерът в контекста на HPV-индуцирания оксидативен стрес и митохондриалната дисфункция.

Получените резултати допринасят за по-доброто разбиране на ролята на редокс-медираните механизми в цервикалната канцерогенеза и поставят основа за бъдещи изследвания, насочени към валидиране на ROMO1 като диагностичен или прогностичен биомаркер.

III. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

1. Цел на изследването

Базирайки се на литературните данни за клиничко-епидемиологичната значимост на РМШ, си поставихме за цел да изследваме нивата на експресия на ROMO1 в здрави, предракови и ракови тъкани, да установим връзката между нивата на експресия на ROMO1 и някои патологоанатомични характеристики при пациенти с рак на маточната шийка, както и да открием най-подходящия статистически значим метод за оценка на експресията на биомаркера.

2. Задачи

За изпълнение на основната цел си поставихме следните задачи:

2.1 Да се установят нивата на експресия на ROMO1 в нормални, предракови и ракови тъкани.

2.2 Да се открие най-подходящия, статистически значим метод за оценка на експресията на биомаркера

2.3 Да се установи има ли връзка между нивата на експресия на ROMO1 и степента на дисплазия

2.4 Да се сравнят нивата на експресия на биомаркера с някои клиничко-патологични характеристики на пациентите- хистологичен тип,размер на тумора, грейдинг, лимфоваскуларна инвазия, N статус, FIGO стадий.

IV. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

1. Качествен метод

Проведен е ретроспективен анализ на архивни хистологични материали и клинични данни.

Пациенти

В изследването са включени 205 пациентки с морфологично доказан инвазивен карцином на маточната шийка, групирани в три хистологични подтипа: плоскоклетъчен карцином (SCC), аденокарцином (AC) и аденосквамозен карцином (ASC). За сравнителен анализ са включени също 41 случая на преканцерозни лезии (CIN) и 30 проби от нормална цервикална тъкан.

Всички случаи са диагностицирани в Клиниката по онкогинекология към Медицински университет – Плевен в периода 2015–2024 г. Поради включването на всички налични случаи за посочения период не е извършвано предварително изчисление на размера на извадката.

Демографските и клинично-патологичните данни (възраст, FIGO стадий, T стадий, нодален статус, хистологичен тип, степен на диференциация и наличие на лимфоваскуларна инвазия – LVSI) са извлечени от електронната база данни на лечебното заведение.

Проучването е част от научноизследователски проект

„MeMoMi: Механизми на модулиране на имунния отговор в тумора и

неговата микросреда за дефиниране на прогностични групи и оптимизиране на лечебния алгоритъм при пациенти с карцином на маточната шийка“ (МУ – Плевен).

Проектът е одобрен от Етичната комисия към МУ – Плевен (№656/29.06.2021). Данните са анализирани в обобщен и анонимизиран вид.

CIN лезиите са категоризирани като:

- **LSIL (CIN I)** – дисплазия до 1/3 от епитела
- **HSIL (CIN II/III)** – дисплазия над 1/3 от епитела

Инвазивните карциноми са оценени по:

- хистологичен подтип (SCC, AC, ASC)
- степен на диференциация (G1–G3)
- нодален статус (N0/N1)
- наличие на лимфоваскуларна инвазия (LVSI)

Стадирането е извършено съгласно FIGO 2018.

1.1. Характеристики на пациентите

Характеристиките на пациентите са представени в Таблица 1.

Характеристика	Брой	%
Здрава тъкан	30	100
Преканцерозна тъкан	41	100
LSIL	6	14.6
HSIL	35	85.4
Възраст		
>50	106	51.7
≤50	99	48.3
T стадий		
T1b1	68	33.17
T1b2	82	40
T1b3	26	12.6
T2A	20	9.75
T2B	9	4.39

№ стадий		
N0	152	74.14
N1	53	25.85
FIGO стадий		
FIGO I	138	67.3
FIGO II	14	6.82
FIGO III	53	25.85
Хистология		
AC	50	24.4
ASC	18	8.78
SCC	137	66.8
G		
G1	50	24.39
G2	101	49.26
G3	54	26.34
ЛВИ		
Да	47	22.92
Не	158	77.1
Общ брой	205	100

2. Морфологичен метод

2.1 Хистологично изследване

Тъканните проби са фиксирани в 10% буфериран формалин, включени в парафин и нарязани на срезове с дебелина 2–5 µm. След рутинно оцветяване с хематоксилин и еозин (H&E) препаратите са анализирани под светлинен микроскоп от патолог.

Туморите са класифицирани и градиращи съгласно стандартните патологични критерии. Стадирането е извършено по **TNM (AJCC/UICC)** и **FIGO 2018**.

2.2 Имунохистохимично изследване

Имунохистохимичното оцветяване е проведено върху формалин-фиксирани, парафин-включени тъканни срезове (3 µm). Използвана е автоматизирана система **AutostainerLink 48 (Dako, Denmark)**.

След депарафиниране и антигенно възстановяване с цитратен буфер (pH 6) срезове са инкубирани с първично моноклонално антитяло срещу **ROMO1 (clone OT12C12, Abcam)** в разреждане 1:150. Детекцията е осъществена чрез полимерната система **EnVision FLEX (Dako)** и визуализирана с **DAB хромоген**.

Всички процедури са проведени съгласно протоколите на производителя.

2.3 Оценка на експресията на ROMO1

Тъканните срезове са оценявани микроскопски при ниско и високо увеличение. Анализирани са:

- интензитет на оцветяване
- процент позитивни туморни клетки
- локализация на експресията

Поради липса на утвърден стандарт за ROMO1 са използвани три полуколичествени метода:

- **H-score**
- **Allred score**
- **Combined score**

H-score

H-score е изчислен по формулата:

H-score = (% клетки със слаб интензитет ×1) + (% клетки с умерен интензитет ×2) + (% клетки със силен интензитет ×3)

Получените стойности варират от **0 до 300**.

Въз основа на пилотно изследване при 75 пациенти H-score показва по-висока статистическа чувствителност в сравнение с останалите системи. Поради това финалният анализ на ROMO1 експресията в настоящото проучване е извършен чрез H-score.

Оценка в нормална тъкан и CIN

При нормална тъкан и CIN лезии експресията на ROMO1 е оценявана качествено, чрез определяне на интензитета и разпространението на позитивността в различните слоеве на епитела, тъй като липсва дефинирана туморна площ.

3. Статистически метод

Анализиране на събраните и обобщени данни, с приложение на подходящи за целта параметрични и непараметрични статистически тестове.

3.1 Статистически анализ, приложен в настоящето изследване

Всички статистически анализи бяха извършени в средата R (версия 4.5.0, 2024; R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria). Графичното представяне на резултатите беше осъществено с пакетите ggplot2 (версия 3.5.2) и ggpubr (версия 0.6.1) за R. За ниво на значимост, при което се отхвърля нулевата хипотеза бе прието $p < 0.05$.

Приложени са следните методи:

1. Дескриптивен анализ – ROMO1 H-score и клинично-патологичните характеристики (Т стадий, N стадий, хистологичен подтип и наличие на лимфоваскуларна инвазия – LVSI) бяха представени в табличен вид чрез честотно разпределение и контингентни таблици.

2. Сравнителен анализ – за оценка на връзката между ROMO1 H-score и категорийни променливи (Т стадий, N стадий, хистологичен подтип, LVSI) беше приложен χ^2 (хи-квадрат) тест.

3. Анализ на количествени показатели – сравнението на възрастта между групите според нивото на ROMO1 H-score беше извършено чрез двустранен t-тест.

4. Графичен анализ – визуализацията на резултатите беше осъществена чрез графики, генерирани в средата R.

V. Резултати

Задача 1. Да се установят нивата на експресия на ROMO1 в нормални, предракови и ракови тъкани

Резултати от имунохистохимичния анализ

При нормалния цервикален епител ROMO1 показва базална експресия с висока интензивност, ограничена само до най-долния слой на многослойния плосък епител. В нито една от изследваните нормални проби (0/30) не се установява позитивност в надбазалните клетъчни слоеве, което показва, че в здравата шийка ROMO1 практически не се експресира извън базалните клетки.

За разлика от нормалната тъкан, при всички анализирани преканцерозни лезии (CIN, n = 41) се установява положителна ROMO1 експресия в слоевете на диспластичните клетки. При LSIL (CIN I) позитивността обхваща предимно долната една трета от епитела, при HSIL (CIN II) – приблизително долните две трети, а при HSIL (CIN III) – почти цялата дебелина на епителния слой. Така с повишаване степента на дисплазия площта на ROMO1-позитивните клетки прогресивно нараства.

Задача 2. Да се открие най-подходящия статистически значим метод за оценка на експресията на биомаркера

В пилотно проучване при 75 пациентки са сравнени H-score и Allred score. И двата метода отчитат статистически значимо по-високи нива на ROMO1 при FIGO I спрямо FIGO II и FIGO III. H-score обаче показва по-висока дискриминативност, изразена чрез по-силни статистически асоциации между FIGO групите (напр. FIGO I vs FIGO II: $p = 0.00012$; FIGO I vs FIGO III: $p = 0.0008$), в сравнение с Allred score.

Допълнителен аргумент в полза на H-score е установената чрез него статистически значима разлика между пациентки със и без лимфни метастази ($p = 0.033$). Поради по-високата чувствителност и по-доброто отразяване на туморната хетерогенност, финалната оценка на ROMO1 в настоящото изследване е проведена само чрез H-score.

Задача 3. Да се установи има ли връзка между нивата на експресия на ROMO1 и степента на дисплазия.

Имунохистохимичният анализ на плоскоклетъчните интраепителни лезии показва 100% експресия на ROMO1 в супрабазалните слоеве на абнормните клетки във всички изследвани CIN случаи. Експресията е дифузна, с умерен до силен интензитет, и е ограничена до участъците с дисплазия.

При LSIL/CIN I ROMO1 се експресира в клетки, засягащи приблизително една трета от дебелината на епитела. При HSIL/CIN II експресията обхваща една трета до две трети от епителната дебелина, а при HSIL/CIN III – повече

от две трети, като оцветяването е интензивно и разпространено в почти целия засегнат епителен слой.

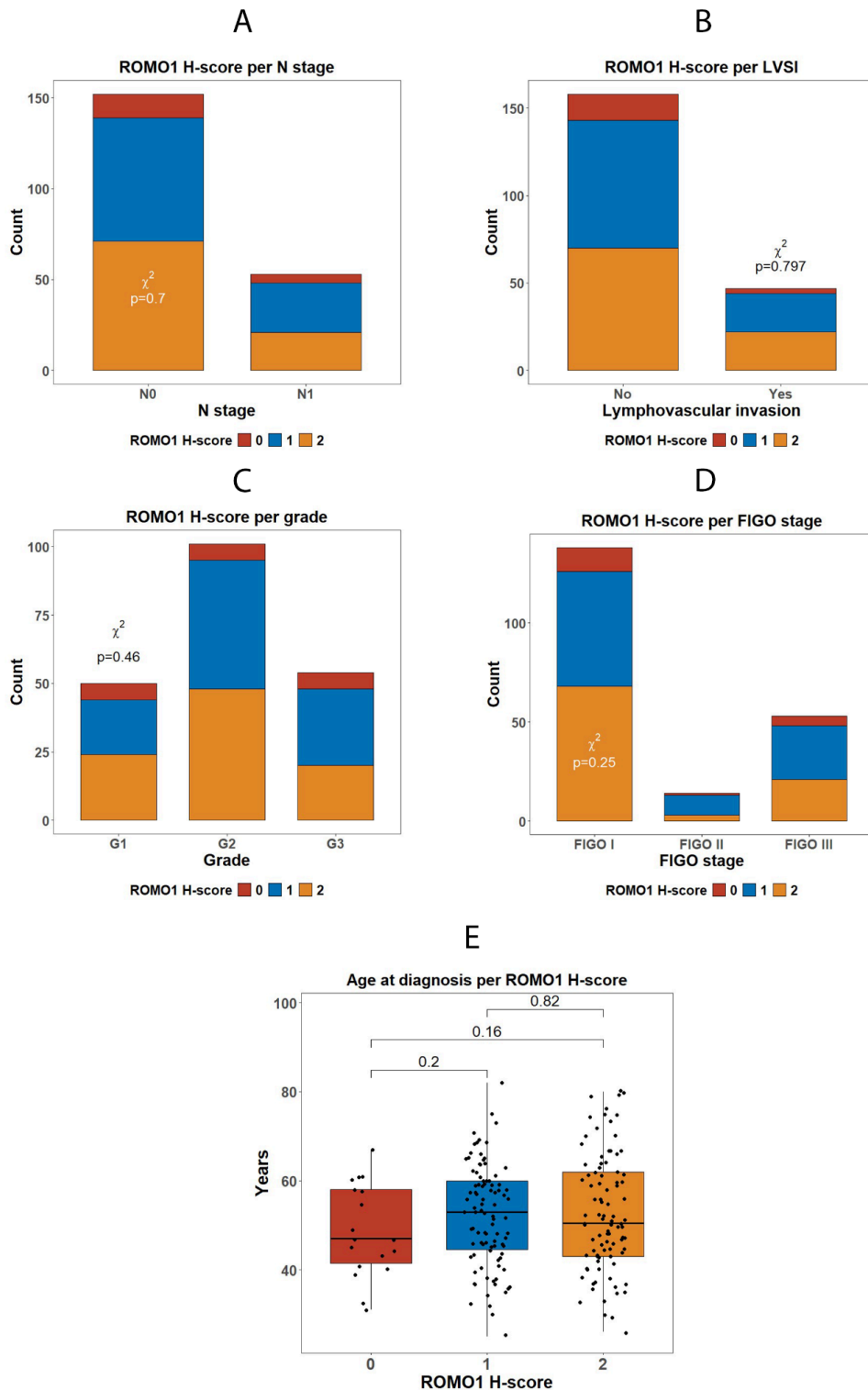
Задача 4. Да се сравнят нивата на експресия на биомаркера с някои клинично патологични характеристики на пациентите-грейдинг, хистологичен тип, FIGO стадий, N статус, T стадий, лимфоваскуларна инвазия.

При инвазивния карцином на маточната шийка ROMO1 експресията показва изразена хетерогенност – наблюдават се случаи с отрицателно, слабо и силно имунооцветяване. В повечето тумори ROMO1 е позитивен в различна степен, което предполага, че оксидативният дисбаланс е честа характеристика на цервикалния карцином.

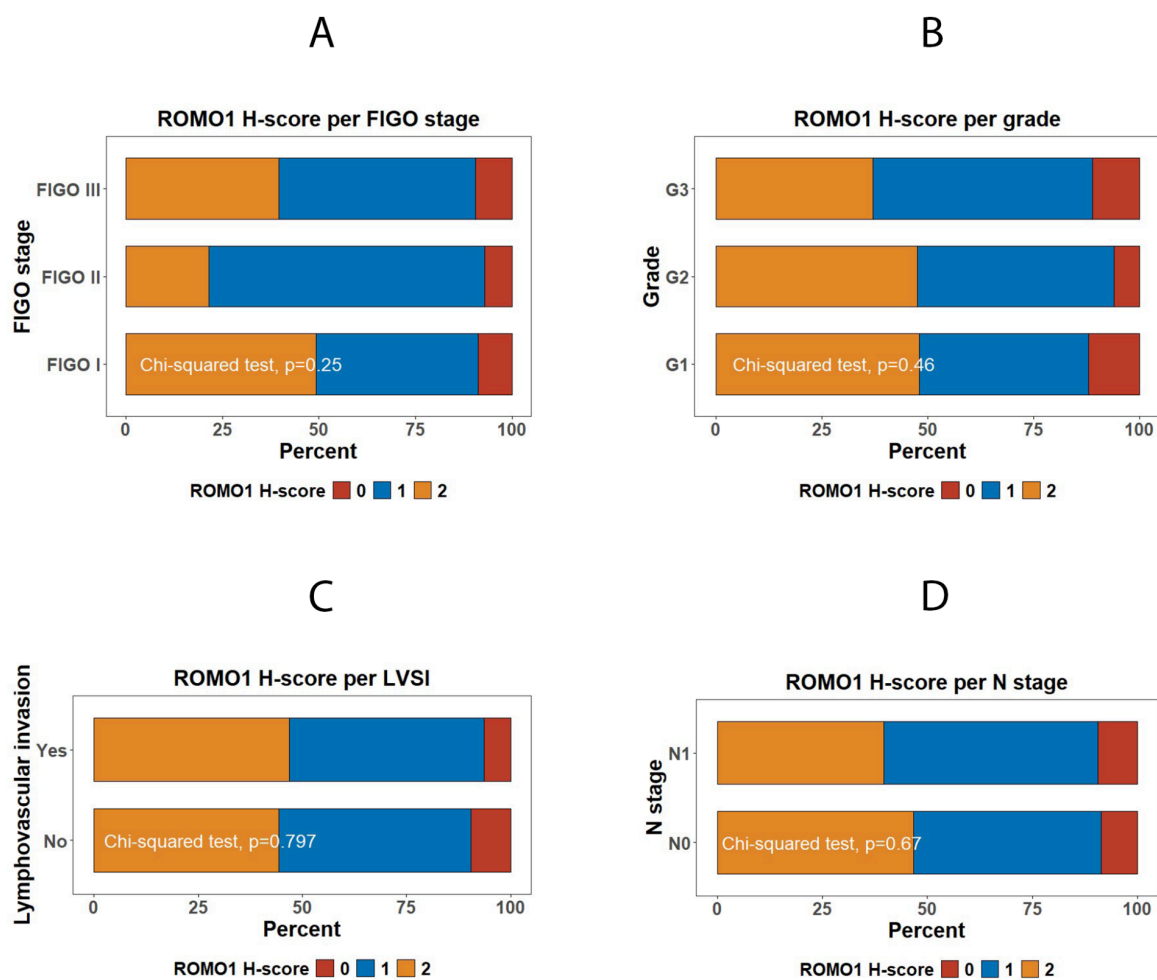
Не се установява статистически значима връзка между ROMO1 експресията и FIGO стадия, туморния грейд, наличието на лимфоваскуларна инвазия, нодалния статус или възрастта на пациентките ($p > 0.25$ за всички показатели). Висока ROMO1 експресия се среща във всички подгрупи на тези параметри, което показва, че повишеният оксидативен стрес е обща характеристика на заболяването, независима от традиционните прогностични фактори (Фигура 1 и 2).

Установени са обаче две статистически значими зависимости (Фигура 3). Първо, ROMO1 експресията варира според хистологичния тип на тумора ($p = 0.02$), като плоскоклетъчният карцином (SCC) показва най-висока експресия, следван от аденосквамозния карцином (ASC), докато при аденокарцинома (AC) тя е най-ниска.

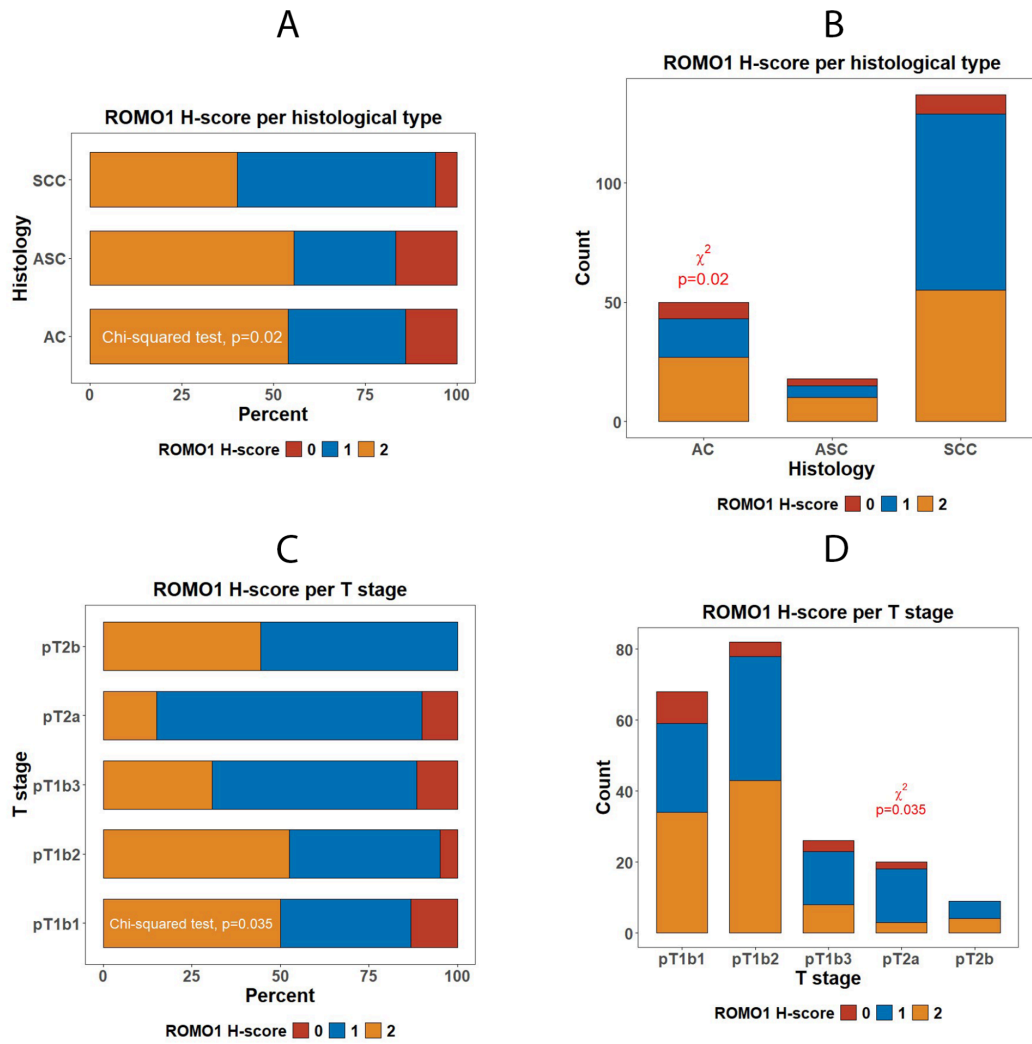
Второ, установена е значима обратна зависимост между ROMO1 експресията и размера/локалната инвазия на тумора (pT стадий; $p = 0.035$). По-високи нива на ROMO1 се наблюдават по-често при по-ранни локални стадии, докато при по-напреднали тумори експресията намалява. Например, при pT1b2 тумори 52% от случаите са с висока ROMO1 експресия, докато при pT2a това се установява само в 11% от случаите.



Фигура 1. Асоциация на експресията на ROMO1 с кликопатологични характеристики и възраст на пациентите при инвазивен цервикален карцином



Фигура 2. Асоциация на експресията на ROMO1 с кликопатологични характеристики при инвазивен цервикален карцином.



Фигура 3. Разпределение на експресията на ROMO1 по хистологичен подтип и стадий на първичния тумор при инвазивен карцином на маточната шийка.

В обобщение, резултатите ясно очертават модел на нарастване и последващо намаляване на експресията на ROMO1 при прогресията на цервикалния карцином. В ранните предракови стадии (CIN I–III) ROMO1 показва 100% експресия в сравнение с нормалния епител, което подсказва засилено присъствие на оксидативен стрес още при преканцерозните изменения. С прогресията към инвазивен карцином ROMO1 продължава да се експресира, но най-високи нива на експресия се наблюдават в по-ранните стадии на инвазия (напр. FIGO I) и впоследствие тенденциозно спадат в по-напредналите стадии . Тези данни предполагат, че ROMO1 отразява ролята на оксидативния стрес в ранните етапи на туморното развитие.

VI. Дискусия

Настоящото проучване е първото, доколкото ни е известно, което изследва имунохистохимично експресията на ROMO1 в хистологично верифицирани проби от нормална маточна шийка, преканцерозни лезии и инвазивен цервикален карцином. Получените резултати очертават ясен експресионен профил на маркера в хода на цервикалната неоплазия.

В нормалния цервикален епител ROMO1 е практически ограничен до базалния слой, докато при всички преканцерозни лезии се установява дифузна позитивност в диспластичните клетки. Това показва, че още в ранните етапи на HPV-индуцираната трансформация се активира изразен редокс-дисбаланс, отразен чрез повишена експресия на ROMO1.

При инвазивния карцином експресията на ROMO1 е хетерогенна. Не се установява статистически значима връзка с FIGO стадий, грейдинг, лимфоваскуларна инвазия, нодален статус или възраст. Установени са обаче две значими зависимости – по хистологичен подтип и по pT стадий. Плоскоклетъчният карцином показва по-висока експресия в сравнение с аденокарцинома и аденосквамозния карцином, което вероятно е свързано с по-тясната му асоциация с HPV и с характерната му еволюция през CIN. Освен това по-висока ROMO1 експресия се наблюдава по-често в по-ранните локални стадии, докато при по-напреднала инвазия тя намалява.

Тази динамика се различава от наблюдаваното при редица HPV-негативни тумори, като белодробен, хепатоцелуларен и колоректален карцином, при които повишената ROMO1 експресия се асоциира с напреднало заболяване и неблагоприятна прогноза. Данните от настоящото изследване предполагат, че

при цервикалния карцином ROMO1 има различно, контекст-зависимо поведение.

На тази основа може да бъде предложен двуфазен модел на поведение на ROMO1 в HPV-асоциираната цервикална канцерогенеза. В ранните етапи на HPV инфекцията вирусните онкопротеини E6 и E7 индуцират оксидативен стрес, митохондриална дисфункция и метаболитно препрограмиране. В този контекст ранната индукция на ROMO1 вероятно представлява адаптивен отговор, който подпомага преживяемостта на клетките в условия на повишен оксидативен товар. С напредването на заболяването, натрупването на генетични и епигенетични промени, HPV интеграцията и задълбочаването на митохондриалната дисфункция вероятно водят до пренастройка на редокс регулацията и редукция на ROMO1 експресията.

Това наблюдение е в съответствие със съвременните представи за ROMO1 като молекула с двойна функция – регулатор на реактивните кислородни видове и митохондриален катионен канал, участващ в поддържането на митохондриалната хомеостаза. Следователно ROMO1 не следва непременно линеен модел на повишаване с туморната прогресия, а по-скоро отразява динамичното състояние на клетъчния редокс баланс.

От клинична гледна точка ROMO1 има потенциал като допълнителен диагностичен маркер, тъй като е практически отрицателен в нормалния епител и ясно позитивен в диспластичните и неопластичните клетки. Това би могло да подпомогне морфологичната оценка на трудни или гранични случаи. От терапевтична гледна точка маркерът и свързаните с него редокс-пътища откриват възможности за бъдещи изследвания, насочени към модулиране на митохондриалната функция и оксидативния стрес.

Настоящото изследване има и някои ограничения. Използваният имунохистохимичен метод дава полуколичествена оценка и не съществува общоприета стандартизация за ROMO1. Проучването е едноцентрово, а липсата на достатъчно дългосрочно проследяване не позволява категорична оценка на прогностичната стойност на маркера. Освен това не са анализирани директно вирусни параметри като E6/E7 активност и HPV интеграционен статус. Независимо от това, резултатите предлагат нова перспектива върху HPV-индуцираната канцерогенеза и очертават ROMO1 като важен компонент от нейната биология.

VII. Заключение

Настоящият дисертационен труд обобщава и интегрира получените резултати, посветени на ролята на ROMO1 в контекста на HPV-асоциираната цервикална канцерогенеза, като поставя акцент върху връзката между оксидативния стрес, митохондриалната дисфункция и прогресията от преканцерозни лезии към инвазивен карцином.

Основният извод е, че ROMO1 представлява динамичен маркер по спектъра „нормален епител → CIN → инвазивен карцином“. В нормалната цервикална тъкан ROMO1 е с минимална/ограничена експресия, докато при преканцерозните лезии (LSIL/HSIL; CIN I–III) наблюдаваме, че с напредването на CIN стадия, интензивността на експресия на маркера се повишава. Това подкрепя концепцията, че оксидативният стрес е ранен и задължителен компонент на HPV-индуцираната трансформация. При инвазивния карцином ROMO1 демонстрира изразена хетерогенност, като се запазва тенденция към по-високи нива в по-ранните локални стадии, а при напредване на локалната инвазия се установява тенденция към спад на високата експресия. Този модел е важен, тъй като се различава от наблюденията при редица не-HPV-свързани тумори,

където повишеният ROMO1 по-често се асоциира с напреднала болест и неблагоприятна прогноза.

Методологично, трудът утвърждава H-score като най-подходящ полуколичествен подход за оценка на ROMO1 в тъкан, тъй като комбинира интензитет и процент позитивни клетки и осигурява по-висока чувствителност за улавяне на клинично релевантни разлики. На база на тази валидираща стъпка, финалните резултати са формулирани последователно само чрез H-score, което гарантира сравнимост и устойчивост на анализа.

От научна гледна точка, настоящият труд предлага хипотеза на интегративен модел, при който ROMO1 участва в ранен адаптивен отговор към HPV-индуцирания оксидативен стрес, докато при туморна еволюция настъпва пренастройка на редокс регулацията, при която ROMO1 може да бъде потиснат, което улеснява клетъчната увреда и поддържа прогресията на тумора. Това открива реални перспективи за бъдещи изследвания, които биха оценили прогностичната стойност на ROMO1 чрез проспективни пациентски кохорти с проследяване.

В заключение, резултатите подкрепят тезата, че ROMO1 е важен компонент на HPV-асоциираната цервикална канцерогенеза и че неговата експресия носи значима биологична и потенциална диагностична информация. Трудът поставя основа за последващо валидиране на ROMO1 като маркер в по-широки и проспективни серии и за изясняване на молекулярните механизми, които определят неговото специфично, двуфазно поведение при карцинома на маточната шийка.

VIII. Изводи

1. ROMO1 демонстрира отчетливо различен експресионен профил по спектъра нормална цервикална тъкан → SIL/CIN → инвазивен карцином, което подкрепя участието му в HPV-асоциираната редокс-дисрегулация и ранната туморна трансформация.

2. На база методологично сравнение, H-score се утвърждава като най-подходящият полуколичествен метод за оценка на ROMO1, тъй като комбинира интензитет и процент позитивни клетки и показва по-висока чувствителност за клинично релевантни различия. Поради тази причина в настоящото дисертационно изследване финалните анализи и интерпретации на ROMO1 експресията са базирани само на H-score, без включване на паралелни скоринг системи (Allred/Combined), с цел методологична последователност и сравнимост на резултатите.

3. ROMO1 H-score не показва статистически значима асоциация с редица клинично патологични показатели (грейдинг, лимфоваскуларна инвазия, нодален статус, FIGO stage) в рамките на изследваната кохорта.

4. При инвазивния карцином на маточната шийка ROMO1 експресията е хетерогенна, като се наблюдават случаи с отрицателно, ниско и високо ниво на имунооцветяване, което отразява различна степен на активиране/компенсация на оксидативния стрес между туморите.

5. Наблюдава се значима зависимост на ROMO1 експресията от хистологичния подтип, като SCC демонстрира по-честа и по-висока експресия спрямо AC и ASC.

6. Установява се значима вариабилност на ROMO1 спрямо pT стадия (размера на тумора), като по-високи нива се срещат по-често при по-ранни локални стадии и намаляват при по-напреднали, което подкрепя модел на ранно активиране и последващо редуциране на ROMO1 с прогресията на локалната инвазия.

7. Резултатите очертават основа за бъдещи изследвания, насочени към: (i) свързване на ROMO1 с вирусни параметри (E6/E7 активност, статус на интеграция), (ii) директно измерване на ROS/митохондриална функция спрямо ROMO1, и (iii) оценка на

прогностичната стойност на ROMO1 в проспективни серии с проследяване.

IX. ПРИНОСИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

Приноси с научно-практичен и/или оригинален характер

1. Описан и верифициран е експресионният профил на ROMO1 по спектъра нормална цервикална тъкан → CIN → инвазивен карцином, което осигурява приложима рамка за интерпретация на ROMO1 при рутинна ИХС диагностика.

2. Методологично е валидиран H-score като оптимален полуколичествен метод за оценка на ROMO1 спрямо алтернативни скоринг системи, и е въведена последователна практика за финално оценяване само чрез H-score.

3. Установени са статистически значими зависимости на ROMO1 от хистологичния тип и T стадия при инвазивен цервикален

карцином (SCC vs AC/ASC; pT), което подпомага по-прецизно клинично-патологично профилиране на туморите.

Приноси с научно-теоретичен характер

1. Предложен е интегративен модел за ролята на ROMO1 в HPV-асоциираната цервикална канцерогенеза, който свързва вирусно-индуцирания оксидативен стрес, митохондриалната дисфункция и динамиката на ROMO1 експресията.

2. Формиран и аргументиран е „двуфазен“ модел на поведение на ROMO1 – силна експресия в преканцерозата и ранната инвазия (адаптивен редокс-отговор), с тенденция към редуциране при прогресия към локалната инвазия – специфичен за HPV-свързани неоплазми и различен от редица HPV- отрицателни тумори.

3. Изведена е концепцията, че ROMO1 отразява ранна редокс-адаптация, а не е просто класически маркер за авансирал стадий, което обяснява липсата на стабилни асоциации с FIGO, грейдинг, ЛВИ, нодален статус и възраст в рамките на изследваната

кохорта.

4. Определени са проверими хипотези и приоритетни направления за бъдещи изследвания, включително връзка на ROMO1 с вирусни частици (E6/E7 активност, интеграция), функционални корелации с ROS/митохондриална функция и проспективна оценка на прогностичната му стойност.

X. Публикации , участия в научни форуми, курсове и проекти свързани с дисертационния труд

1) Публикации на научни резултати в пълнотекстови статии и/или доклади свързани с дисертационния труд:

1. Tsoneva E., Dimitrova P. D., Metodiev M., Shivarov V., Vasileva-Slaveva M., Yordanov A. “The effects of ROMO1 on cervical cancer progression”, *Pathol Res Pract*, Vol. 248, 2023:154561 (ISSN 0344-0338), Online (ISSN 1618-0984) – DOI: 10.1016/j.prp.2023.154561.

2. Tsoneva E., Damyanova P., V. Metodiev M., Shivarov V., Vasileva-Slaveva M., Gorcheva Z., Ivanova Y., Kornovski Y., Kostov S., Slavchev S., Nikolova M., Yordanov A., Watrowski R. “ROMO1 as a Diagnostic Biomarker in Cervical Neoplasia: Evidence from Normal, Pre-Invasive, and Invasive Lesions”, *Diagnostics (Basel)*, Vol. 16, No. 1,

2025:24 (EISSN 2075-4418), DOI: 10.3390/diagnostics16010024.

3. Tsoneva E., Yordanov A. “HPV Oncoproteins and Mitochondrial Reprogramming: The Central Role of ROMO1 in Oxidative Stress and Metabolic Shifts”, *Cells*, Vol. 14, No. 20, 2025:1629 (EISSN 2073-4409), DOI: 10.3390/cells14201629.

2) Участия в научни форуми свързани с дисертационния труд

1. 07.03.-10.03.2024 European society of gynaecological oncology (ESGO), Барселона, Испания

-Tsoneva E., Yordanov A., Kostov S., Ivanova Y., Kornovski Y., Slavchev S., Hasan I., Vasileva-Slaveva M., Shivarov V., Dimitrova P. D., Karakadieva K. “Exploring the prognostic relevance of ROMO1 expression and its association with histological type and lymph node status in cervical cancer”, poster abstract in *Int J Gynecol Cancer*, 2024; S1048-891X(24)06505-8. Постер

- Tsoneva E., Yordanov A., Kostov S., Ivanova Y., Kornovski Y., Slavchev S., Hasan I., Vasileva-Slaveva M., Shivarov V., Dimitrova P. D. “Infiltration by FOXP3⁺ Tregs in cervical cancer is dependent on histological subtype”, poster presentation at ESGO 2024 – European Society of Gynaecological Oncology Congress, Barcelona, Spain, 2024. Published as a poster abstract in *International Journal of Gynecological Cancer*, 2024; S1048-891X(24)07392-4. Постер

2. 26.02-28.02.2026 European society of gynaecological oncology (ESGO), Копенхаген, Дания

-Tsoneva E., Yordanov A., Kostov S., Vasileva-Slaveva M., Shivarov V., Metodiev M., Damyanova P. “ROMO1 expression defines an oxidative

stress-driven window in HPV-induced cervical carcinogenesis”, poster abstract accepted for presentation at ESGO 2026 – European Society of Gynaecological Oncology Congress, 2026. To be published in International Journal of Gynecological Cancer. Постер

3. 18.03.-21.03.2026 EUROGIN, Виена, Австрия

-Tsoneva E., Yordanov A., Kostov S.“Early up-regulation of ROMO1 in cervical intraepithelial neoplasia: evidence of HPV-driven oxidative stress in precancerous lesions”, poster presentation, Cervical Neoplasia section, EUROGIN Congress, 18–21 March 2026.

3) Участие в научни проекти

1. МеМоМи: Механизми на Модулиране на имунния отговор в тумора и неговата Микросреда за дефиниране на прогностични групи и оптимизиране на лечебния алгоритъм при пациенти с карцином на маточната шийка. КП-06-ПН-43/28

XI. Апендикси



COPYRIGHT PERMISSION FORM

Title(s) of the Image(s): Terese Winslow LLC owns the copyright to the following image(s):

Title(s) of illustration(s): Cervical Changes, Stages IA1 and IA2 Cervical Cancer, Stages IB1 and IB2, IB3 Cervical Cancer, Stage IV Cervical Cancer

Description of the Work: Terese Winslow LLC hereby grants permission to reproduce the above image(s) for use in the work specified:

Dissertation title: Connection of ROMO1 with cervical cancerogenesis

University: Medical University Pleven, Bulgaria

Digital Object Identifier (DOI) and Journal ISSN, if available: n/a

License Granted: Terese Winslow LLC hereby grants limited, non-exclusive worldwide print and electronic rights only for use in the Work specified. Terese Winslow LLC grants such rights "AS IS" without representation or warranty of any kind and shall have no liability in connection with such license.

Restrictions: Reproduction for use in any other work, derivative works, or by any third party by manual or electronic methods is prohibited. Ownership of original artwork, copyright, and all rights not specifically transferred herein remain the exclusive property of Terese Winslow LLC. Additional license(s) are required for ancillary usage(s).

Credit must be placed adjacent to the image(s) in the following format:

© (copyright year as seen on the illustration) Terese Winslow LLC, U.S. Govt. has certain rights

Permission granted to:

Name: Eva Tsoneva

Mailing address: Sveta Troitsa, Sofia, Bulgaria

Email address: dretsoveva@gmail.com

Phone number: +359889631779

Signature _____ *Eva Tsoneva* _____ Date 24.01.2026

Name

Signature _____ *Terese Winslow* _____ Date January 26, 2026

Terese Winslow, CMI, Member

Terese Winslow LLC, Medical Illustration

714 South Fairfax Street, Alexandria, Virginia 22314

(703) 836-9121

terese@teresewinslow.com

www.teresewinslow.com

