

## **СТАНОВИЩЕ**

**от проф. д-р Пламен Стоянов Божинов, дм, дмн**

**Медицински университет – Плевен, Научноизследователски институт,  
УМБАЛ „Медика“ – Русе, Клиничен институт по регенеративна медицина,  
невромодуляция и контрол на болката, Медицински център „Галилео“ –  
Плевен, Медицински център „Невроита“ – София**

**на дисертационен труд на д-р Васил Димитров Нанев за придобиване  
на образователна и научна степен „Доктор“ по научната специалност  
„Обща хирургия“ на тема „Проучване честотата и ролята на  
морфологичния и биологичен туморен хетерогенитет при карцином на  
млечната жлеза”**

Със заповед № 2869/14. 09. 2026 г. на ректора на МУ - Плевен, въз основа на решение на Факултетен съвет на ФЗГ (протокол № 15/ 10. 09. 2026) съм избран за вътрешен член на Научното жури на горепосочения дисертационен труд с научни ръководители: доц. д-р Страхил Асенов Страшилов, дм, и доц. д-р Иван Недков Иванов, дм, а на първото заседание съм определен за изготвяне на становище и председател на научното жури.

### **Актуалност и обща характеристика**

Дисертационният труд разглежда клинично значим проблем: възможността ограничената диагностична биопсия да не представи всички морфологични и имунофенотипни компоненти на карцинома на млечната жлеза и последиците за оценката на терапевтичния отговор. Темата свързва хирургичната диагностика, клиничната патология и системното онкологично лечение. Оценявам положително тази насоченост, като разглеждам получените резултати в границите на ретроспективния дизайн и обема на изследваните подгрупи.

Трудът е представен на 145 страници с литературен обзор, цел и пет задачи, материали и методи, резултати, обсъждане, изводи, приноси и приложения. Според автореферата съдържа 2 диаграми, 16 фигури, 36 таблици и 4 приложения, а библиографията включва 358 източника. Докторантът е зачислен към катедра „Сестрински хирургични грижи“, Факултет „Здравни грижи“ на МУ - Плевен. Литературният обзор обхваща пространствения и времевия

хетерогенитет, туморната микросреда, биомаркерите и механизмите на терапевтична резистентност.

### **Цел и методологичен подход**

Поставените цели са да се установи ролята на туморния хетерогенитет при диагностицирането на пациенти, подходящи за неoadювантна химиотерапия, и при определянето на последващия терапевтичен подход. Изследването е ретроспективно, с посочен период 2016-2021 г., и включва 110 пълнолетни пациенти, от които 108 жени и двама мъже. Хетерогенитет е установен при 12 пациенти; за част от сравнителните анализи е подбрана контролна група от 12 случая без установен хетерогенитет. Описани са и два допълнителни клинични казуса без неoadювантна терапия.

Използвани са хистологично и имунохистохимично изследване, оценка на ER, PgR, HER2, Ki-67 и caspase-3, сравнение на диагностичната биопсия с оперативния материал, оценка на терапевтичния отговор по Sataloff и анализ на преживяемостта чрез Kaplan-Meier и log-rank тест. Етичната документация включва решение № 707-КЕНИД/03.06.2022 г., представено в приложение 3 на дисертацията. Посочен е проект № 6/2022 на МУ - Плевен с главен изследовател доц. д-р Милена Карчева, д.м.; участието на дисертанта е отразено и в отделния списък с проекти.

### **Резултати и научна стойност**

В изследваната извадка честотата на установения хетерогенитет е 12/110, или 10,91%. Пациентите с хетерогенни тумори са по-млади: средна възраст 50,58 спрямо 60,26 години, при посочено  $p=0,0177$ . Наблюдава се и по-честа мултифокалност. Тези резултати характеризират конкретната клинична серия и не представляват популационна оценка за всички пациенти с рак на гърдата в България.

Особено полезно е наблюдението, че дебелоиглената биопсия установява хетерогенитет при 3 от общо 12 случая, а оперативният материал - при 11. Това показва ограничението на тъканното пробовземане и необходимостта от съпоставяне на образната находка с морфологията и биомаркерния профил. Представените клинични примери и микрофотографии онагледяват различията между отделните компоненти и възможното им нееднакво повлияване от лечението.

Изследването на Ki-67 и caspase-3 добавя данни за връзката между пролиферативната и апоптотичната активност и терапевтичния отговор. Резултатите подкрепят по-нататъшно проучване на caspase-3, но не установяват самостоятелно валидиран тест за избор на терапия. Не е установена статистически значима разлика между двете сравнявани групи в общата преживяемост ( $p=0,7541$ ) и преживяемостта без заболяване ( $p=0,9578$ ). При малкия брой пациенти тези отрицателни резултати не доказват равностойна прогноза.

### **Оценка на приносите**

Приемам като обосновани приноси описанието на морфологичния и имунофенотипния хетерогенитет в конкретна българска клинична серия, съпоставката между биопсичен и оперативен материал и поставянето на практически въпроси за оценка на отделните туморни компоненти. Предложеният диагностичен и терапевтичен алгоритъм има стойност като основа за последващо проспективно валидиране.

Формулировката „първото комплексно изследване“ изисква уточняване на географския и методологичния обхват. Твърдението за честота, валидна за българската популация, следва да се ограничи до изследваната серия. Необходимо е също да се разграничават имунохистохимично определените сурогатни подтипове от подтиповете, установени чрез генна експресия. Предложението за динамична преоценка на биомаркерите е практически уместно, но конкретните терапевтични решения трябва да се съобразяват с клиничния контекст и валидираните онкологични препоръки.

### **Методологични ограничения и конкретни бележки**

На първо място е необходимо еднозначно определение на хетерогенитета. В текста се обсъждат смесени хистологични компоненти в един тумор, различни фокуси и синхронни двустранни карциноми. Тези ситуации трябва да бъдат разграничени, с ясно посочена единица на анализа. Класифицирането на случаи като хетерогенни въз основа на посттерапевтичния резектат може да повлияе и сравнението на терапевтичния отговор, защото възможността за установяване на хетерогенитет зависи от наличието на остатъчна тъкан.

Контролната група е малка и начинът на подбор се нуждае от по-ясно описание. Съпоставимостта следва да обхваща изходен стадий, нодален статус, сурогатен подтип и проведено лечение. Трябва да се обяснят различните знаменатели в анализите на биомаркерите: например 105 случая за caspase-3 и 89 случая за

терапевтичен отговор в таблица 20. За преживяемостта са необходими ясно определени крайни точки, срок на проследяване, брой събития и правила за цензуриране.

Посочените чувствителност 25% и специфичност 100% за дебелоиглената биопсия трябва да се тълкуват предпазливо. Референтният показател е съставен от резултатите на самата биопсия и резектата, което въвежда зависимост между оценявания тест и референтния стандарт. Следователно 100% специфичност не представлява независима валидация на диагностичната точност. Разликите преди и след лечение могат да отразяват както тъканна нерепрезентативност, така и терапевтична селекция.

Налице са несъответствия, които изискват корекция. На с. 58 промяната на молекулярния подтип между групите е отчетена като незначима при  $p=0,0577$ , докато на с. 103 се характеризира като сигнификантно по-честа. На стр. 75 е написано, че няма значима зависимост за caspase-3 при HER2-позитивните случаи, при посочено  $p=0,0372$ . Изборът на тест е съществен: повторното изчисление върху публикуваната таблица 30 дава двустранно  $p\approx 0,0768$  с точния тест на Fisher. В таблица 20 позитивните за caspase-3 са 7 от 18 отговорили случая, или 38,9%, което не съответства на твърдението „повече от половината“. Тези проверки използват публикуваните агрегирани данни.

При малки очаквани честоти са необходими точни статистически методи, а при множеството сравнения - ясно разграничаване на основните от проучвателните анализи. Ефектите следва да се представят с доверителни интервали. Обединяването на пълен и почти пълен патологичен отговор по Sataloff трябва да се отличава от стриктно дефинирания пълен патологичен отговор, с посочване на статуса на инвазивния тумор и лимфните възли.

Изводът, че изследването потвърждава апоптоза-индуцирана пролиферация, надхвърля доказателствата от наблюдателния дизайн; описаното сравнение между Ki-67 и caspase-3 е незначимо при  $p=0,1842$ . Получените асоциации не установяват причинен механизъм. Аналогично липсата на значима разлика в преживяемостта не доказва липса на прогностично влияние. Броят на хетерогенните случаи, описанието на пълния отговор и списъците с публикации трябва да бъдат уеднаквени между дисертацията и двата автореферата.

### **Публикационна дейност и лично участие**

В предоставения отделен списък са включени пет публикации в пълен текст: две оригинални изследвания и три клинични случая. Д-р Нанев е първи автор в

четири и втори автор в една публикация. Тематичната им връзка с дисертацията е ясна. Публикационната активност подкрепя положителната оценка за участие в изследователска работа, но авторската позиция сама по себе си не определя обема на личния принос към подбор на пациенти, лабораторни изследвания, статистически анализ и подготовка на ръкописи.

Необходимо е библиографско уеднаквяване: на с. 141 на дисертацията са изброени три публикации във връзка с труда, а статията на Milev и съавтори е отнесена към публикации извън неговото съдържание. Отделният списък включва тези четири труда и клиничния случай в Medicina от 2022 г. Това различие следва да бъде обяснено при представяне на публикационните резултати.

### **Заклучение:**

Дисертационният труд представлява клинично насочено изследване с научна и практическа стойност, особено по отношение на тъканната репрезентативност и оценката на различните туморни компоненти. Оценявам положително актуалността, събрания материал, морфологичната документация и публикационната реализация. Същевременно някои изводи и заявени приноси са по-категорични, отколкото позволяват представените данни.

**В заключение, представения дисертационен труд е оригинален и актуален, съдържа съществени научни приноси и отговаря на институционалните и национални критерии, за присъждане на образователната и научна степен „доктор” на д-р Васил Димитров Нанев по докторска програма „Обща хирургия“.**

**На основание чл.59 от ЗЗЛД**

12. 10. 2026 г.

проф. д-р Пламен Божинов, дм, дмн



# **STATEMENT**

**by Prof. Plamen Stoyanov Bozhinov, MD, PhD, DSc**

**Medical University – Pleven, Research Institute,**

**UMHAT "Medica" – Ruse, Clinical Institute for Regenerative Medicine,**

**Neuromodulation and Pain Control, "Galileo" Medical Center – Pleven, "Neurovita"**

**Medical Center – Sofia**

Regarding the doctoral thesis of Dr. Vasil Dimitrov Nanev for the acquisition of the educational and scientific degree "Doctor" (PhD) in the scientific specialty "General Surgery" on the topic: "Study of the Frequency and Role of Morphological and Biological Tumor Heterogeneity in Breast Carcinoma"

By Order No. 2869/14.09.2026 of the Rector of the Medical University - Pleven, based on a decision of the Faculty Council of the Faculty of Health Care (Protocol No. 15/10.09.2026), I have been selected as an internal member of the Scientific Jury for the aforementioned doctoral thesis, under the academic supervision of Assoc. Prof. Strahil Asenov Strashilov, MD, PhD, and Assoc. Prof. Ivan Nedkov Ivanov, MD, PhD. At the first meeting, I was appointed to draft the official statement and elected as the Chairman of the Scientific Jury.

## **Relevance and General Characteristics**

The doctoral thesis addresses a clinically significant issue: a limited diagnostic biopsy may fail to capture all morphological and immunophenotypic components of breast carcinoma, with implications for evaluating therapeutic response. The topic bridges surgical diagnostics, clinical pathology, and systemic oncological treatment. I evaluate this orientation positively, while considering the results within the limitations of the retrospective design and the size of the studied subgroups. The work is 145 pages and includes a literature review, an aim and five objectives, materials and methods, results, discussion, conclusions, contributions, and appendices. According to the extended abstract (autoreferat), it includes 2 diagrams, 16 figures, 36 tables, and 4 appendices, and the bibliography lists 358 sources. The doctoral candidate is enrolled in the Department of Nursing Surgical Care, Faculty of Health Care at the Medical University - Pleven. The literature review encompasses spatial and temporal heterogeneity, the tumor microenvironment, biomarkers, and the mechanisms of therapeutic resistance.

## **Aim and Methodological Approach**

The objectives are to determine the role of tumor heterogeneity in identifying patients suitable for neoadjuvant chemotherapy and in defining the subsequent therapeutic approach. The study is retrospective, covering the period 2016–2021, and includes 110 adult patients, 108 women and two men. Heterogeneity was identified in 12 patients; for a portion of the comparative analyses, a control group of 12 cases without established heterogeneity was selected. Two additional clinical cases without neoadjuvant therapy are also described.

The methodologies employed include histological and immunohistochemical examination; evaluation of ER, PgR, HER2, Ki-67, and caspase-3; comparison of the diagnostic biopsy with the surgical specimen; evaluation of therapeutic response according to the Sataloff system; and survival analysis using the Kaplan-Meier method and the log-rank test. The ethical documentation includes Decision No. 707-KENID/03.06.2022, presented in Appendix 3 of the dissertation. Project No. 6/2022 of the Medical University - Pleven is indicated, with Assoc. Prof. Milena Karcheva, MD, PhD, as the principal investigator; the dissertation candidate's participation is also reflected in a separate list of projects.

## **Results and Scientific Value**

In the study sample, the frequency of established heterogeneity was 12/110, or 10.91%. Patients with heterogeneous tumors were younger, with a mean age of 50.58 years compared with 60.26 years ( $p=0.0177$ ). A higher frequency of multifocality was also observed. These results characterize this specific clinical series and do not represent a population-wide assessment of all breast cancer patients in Bulgaria.

Particularly useful is the observation that core needle biopsy identified heterogeneity in 3 of 12 cases, whereas the surgical specimen did so in 11 cases. This demonstrates the limitations of tissue sampling and emphasizes the need to correlate imaging findings with morphology and biomarker profiles. The clinical examples and microphotographs illustrate differences among components and their potentially unequal responses to treatment.

The investigation of Ki-67 and caspase-3 provides data on the relationship between proliferative and apoptotic activity and therapeutic response. The results support further study

of caspase-3 but do not establish an independently validated test for therapy selection. The two groups showed no statistically significant difference in overall survival ( $p=0.7541$ ) or disease-free survival ( $p=0.9578$ ). Given the small number of patients, these negative results do not prove an equivalent prognosis.

### **Evaluation of Contributions**

I accept as justified contributions the description of morphological and immunophenotypic heterogeneity in a specific Bulgarian clinical series, the comparison of biopsy and surgical materials, and the formulation of practical questions regarding the evaluation of distinct tumor components. The proposed diagnostic and therapeutic algorithm is valuable as a foundation for subsequent prospective validation.

The formulation "the first comprehensive study" requires clarification of its geographical and methodological scope. The claim regarding a frequency valid for the Bulgarian population should be restricted to the studied series. It is also necessary to differentiate immunohistochemically determined surrogate subtypes from subtypes established through gene expression profiling. The proposal for dynamic re-evaluation of biomarkers is practical, but specific therapeutic decisions must align with the clinical context and validated oncological guidelines.

### **Methodological Limitations and Specific Remarks**

First, an unambiguous definition of heterogeneity is required. The text discusses tumors with mixed histological components, distinct foci, and synchronous bilateral carcinomas. These scenarios must be differentiated, with a clearly stated unit of analysis. Classifying cases as heterogeneous based on the post-therapeutic resected specimen may also affect comparisons of therapeutic response, as establishing heterogeneity depends on the presence of residual tissue.

The control group is small, and the selection method needs a clearer description. Comparability should include the baseline stage, nodal status, surrogate subtype, and the treatment administered. The differing denominators in the biomarker analyses must be explained: for instance, 105 cases for caspase-3 and 89 for therapeutic response in Table 20. For survival

analysis, clearly defined endpoints, follow-up duration, number of events, and censoring rules are required.

The stated sensitivity of 25% and specificity of 100% for the core needle biopsy must be interpreted cautiously. The reference indicator includes both the biopsy results and the resected specimen, introducing dependence between the test and the reference standard. Consequently, 100% specificity does not independently validate diagnostic accuracy. Differences before and after treatment may reflect tissue non-representativeness and therapeutic selection.

There are discrepancies that require correction. On page 58, the change in molecular subtype between groups is reported as insignificant ( $p=0.0577$ ), whereas on page 103 it is described as significantly more frequent. On page 75, caspase-3 shows no significant correlation in HER2-positive cases, with  $p=0.0372$ . The choice of test is essential: a recalculation based on the published Table 30 yields a two-tailed  $p\approx 0.0768$  using Fisher's exact test. In Table 20, 7 of 18 responding cases are caspase-3 positive (38.9%), which does not correspond to the statement "more than half". These verifications use the published aggregated data.

With small expected frequencies, exact statistical methods are required, and given multiple comparisons, a clear distinction must be made between primary and exploratory analyses. Effects should be presented with confidence intervals. The pooling of complete and near-complete pathological responses, as proposed by Sataloff, must be distinguished from a strictly defined pathological complete response, with a specification of the status of the invasive tumor and the lymph nodes.

The study's conclusion that apoptosis-induced proliferation exceeds the evidence provided by the observational design; the described comparison between Ki-67 and caspase-3 is insignificant ( $p=0.1842$ ). The observed associations do not establish a causal mechanism. Similarly, the absence of a significant difference in survival does not prove a lack of prognostic influence. The number of heterogeneous cases, the description of the complete response, and the publication lists must be aligned between the dissertation and the two extended abstracts.

### **Publication Activity and Personal Participation**

The separate list includes five full-text publications: two original studies and three clinical cases. Dr. Nanév is the first author on four and the second author on one publication. Their thematic connection to the dissertation is clear. The publication activity supports a positive evaluation of participation in research work, but the authorship position itself does not

determine the extent of personal contribution to patient selection, laboratory studies, statistical analysis, and manuscript preparation.

Bibliographic alignment is necessary: on p. 141 of the dissertation, three publications related to the work are listed, while the article by Milev and co-authors is cited in a separate list outside the dissertation's content. The separate list includes these four works and the clinical case in Medicina from 2022. This discrepancy should be explained during the presentation of the publication results.

### **Conclusion**

The dissertation thesis is a clinically oriented study with scientific and practical value, particularly regarding tissue representativeness and the evaluation of various tumor components. I positively evaluate its relevance, the collected material, the morphological documentation, and the publication. At the same time, some conclusions and claimed contributions are more categorical than the presented data allow.

**In conclusion, the dissertation presented is original and relevant, contains significant scientific contributions, and meets the institutional and national criteria for awarding the educational and scientific degree "Doctor" (PhD) to Dr. Vasil Dimitrov Nanev in the doctoral program "General Surgery".**

**На основание чл.59 от ЗЗЛД**

**12.10.2026**

**Prof. Plamen Bozhinov, MD, PhD, DSc**

