

## РЕЦЕНЗИЯ

От Проф. д-р Константа Велинова Тимчева, д.м.

МБАЛ „Надежда“, София

ОТНОСНО: Дисертационен труд от Доц. д-р Савелина Поповска, д.м

На тема: **„Клинико-морфологични и фенотипни аспекти на тройно негативните карциноми на гърдата”** за придобиване на научна степен „доктор на медицинските науки”

Научен консултант: Vincenzo Eusebi

Област на висше образование: 7.1. Здравопазване и спорт

Професионално направление: 7.1 Медицина

Научна специалност: 03.01.03 „Патоанатомия и цитопатология”

Представеният за рецензиране дисертационен труд е предназначен за обсъждане от научно жури, определено със Заповед № 2653/03.12.2014 г. на Ректора на Медицински Университет – Плевен и Решение на Академичния съвет (Протокол № 19/02.12.2014 г).

Рецензията е изготвена съобразно изискванията на:

- Закона за развитие на академичния състав в Република България;
- Правилника за прилагане на ЗРАСРБ;
- Правилника за развитие на академичния състав в МУ-Плевен и специфичните изисквания за придобиване на научната степен „Доктор на науките”

За по-голяма прегледност рецензията е структурирана в 8 части, съдържащи последователно биографична справка за кандидата, характеристика на структурата на дисертацията, собствени резултати, приноси на научния труд, оценка на автореферата, достойнства на научния труд, оценка на научната продукция на кандидата, свързана с дисертационния труд и заключение.

## **I. Биографична справка за кандидата**

Доц. Савелина Поповска е завършила Медицинския факултет на МУ Плевен, специалност „Медицина” през 1988 г. От 1993 г има специалност „Патологична анатомия и цитопатология”.

През 2001 г придобива образователната и научна степен „доктор” след защита на докторска дисертация на тема „Първична химиотерапия при РМЖ - клиничко-морфологични паралели и влияния върху апоптозата, пролиферацията и експресията на някои онкопротеини”.

От 2006 г е доцент към МУ – Плевен, катедра Патоанатомия. От 2008 – 2013 г е ръководител на катедра Патоанатомия, от м. 02.2013 г е заместник ректор по Европейска интеграция и международно сътрудничество към МУ Плевен.

Високият професионализъм на доц. Поповска освен на лични качества, се дължи и на периодичните квалификационни курсове и специализации, които тя провежда, а именно: Европейската програма "Леонардо" по проект за усъвършенстване на преподавателските умения на асистентите, включени в преподаване на чуждестранни студенти на английски език- Saint George International Language Center – Лондон, Великобритания, (2001); Специализация по Патология и Цитопатология в Центъра за проучване на рака - Тел Авив, Израел (2001/2002 г.); Специализация за FISH, CISH и техника на тъканни микрочипове в Центъра по Молекулярна Патология, Институт по Патология към Медицински Университет - Базел, Швейцария (2004 г.); Специализация за FISH техника и имунохистохимично проучване на тройно негативните тумори на гърдата - Япония (2007-2008 г, 2009); Специализация за рак гърдата - Катедра Патоанатомия, Болница Белария, Болоня, Италия (2010); Европейско училище по Молекулярна Патология на гърда - Пиза, Италия (2011); Експертен професионален курс за международна стандартизация за HER 2 в областта на патология на гърда и стомах, ТАРГОС, Германия (2013); Европейско Училище по Молекулярна Патология - Грац, Австрия (2013).

Учебно-преподавателската дейност на доц. Поповска е свързана с обучение на български и англоговорящи студенти като доцент по патоанатомия и ръководител на Катедра по патоанатомия.

## 2. Характеристика на представения за рецензиране дисертационен труд

Дисертационният труд е представен върху 363 стр. и е с класическа структура: „Литературен обзор” - 81 стр, „Цел и задачи”, „Материал и методи” – 24 стр., „Собствени проучвания и резултати” – 195 стр, „Изводи и препоръки” – 12 стр. Дисертационният труд съдържа 133 фигури, 21 таблици. Цитирани са 644 литературни източника, от тях 7 на кирилица и 637 на латиница, от последните 10 години са 78% от цитиранията – 501 на брой.

Един от най-проблемните агресивни подтипове РМЖ е тройно негативният карцином на млечната жлеза. През последното десетилетие той е обект на интензивно изследване в различни аспекти, тъй като засяга предимно млади жени, възможностите за терапевтично повлияване са ограничени поради липсата на специфичен таргет за лечение, усложненията – локални рецидиви и далечни метастази настъпват в кратки срокове след поставяне на диагнозата.

Дисертационният труд на доц. Поповска е посветен именно на този проблемен и в много отношения дискутабилен подтип РМЖ. Това е вторият дисертационен труд в страната върху ТНКМЖ, и първият, посветен на клинично-морфологичните и фенотипни аспекти на това заболяване.

В **литературния обзор** задълбочено се обсъждат проблеми, като хетерогенност на карцинома на гърдата – видове класификации на рака на млечната жлеза, разгледани са морфологичната и молекулярно-генетична класификация, сурогатните методи за дефиниране на субтиповете рак на гърдата, както и основни характеристики на базалоидния карцином: молекулярна характеристика, епидемиологични и хистопатологични аспекти, дефиниция и морфологична, биологична и клинична характеристика на тройно негативния карцином на млечната жлеза, имунофенотипизиране, взаимозаменяемост с базалоиден карцином, молекулярни субтипове ТНКГ, отделено е място и за фамилен карцином на млечната жлеза. Разгледани са определени морфологични субтипове КГ и обуславящите ги генетични мутации: лобуларен, секреторен, адено-кистичен, метапластичен. Подобавачо място е отделено на молекулярно-генетичната класификация на Рогои и съавт., публикувана през 2000 г. Различните групи карциноми на гърдата се характеризират с различни молекулярни и генетични алтерации, които са възможност за тяхното специфично терапевтично повлияване.

Определянето на генетичния експресионен профил в ежедневната клинична практика е невъзможно поради високата цена. Затова авторът се спира на сурогатен имунохистохимичен панел от маркери – достъпен и широко прилаган, даващ информация какъв да бъде правилният терапевтичен подход при конкретния болен. Те включват определяне на няколко показателя: ER, PR, HER2-свърхекспресия, Ki-67, базални цитокератини, EGFR. Авторът се спира и на основните терапевтични подходи при различните подтипове РГ, препоръчани от най-голямата конференция, посветена на ранния рак на млечната жлеза – тази в Ст. Гален, Швейцария.

Логично най-широко място в литературния обзор е отделено на базалния и ТНКГ: въз основа на какви панели от маркери се дефинират, генетични алтерации, установени с микрочипове, дефиниция въз основа на ИХХ сурогатен метод (негативни хормонални рецептори и HER2, позитивни цитокератини CK5/6 и EGFR). Базален фенотип може да имат и някои HER2-позитивни карциноми, както и луминални субтипове. Характерни за базалния фенотип са мутациите на TP53 и BRCA1. В морфологично отношение повечето от базалните карциноми са ниско диференцирани инвазивни дуктални, по-рядко срещани са аденокистичен, мукоепидермоиден и метапластичен. Обръща се внимание на характерните биологични и клинични особености на ТНКГ – засягане на по-млади жени, по-често метастазиране във висцерални органи, висока чувствителност към цитостатично лечение, но по-кратка преживяемост от тази при хормонално чувствителните карциноми. През 2011 г. Lehmann и съавт. класифицират ТНКГ в 5 подтипа: базално-подобен 1 и 2, имуномодулаторен тип, мезенхимен и луминален AR позитивен. Всеки подтип се характеризира с експресия на определени генетични маркери, което още веднъж подчертава хетерогенността на този вид тумори. Отредено е широко място на маркерите за базален фенотип: кавеолин 1, TP53, E и P-кадхерин, c-Kit, циклини, EGFR, AR.

Генетичната предиспозиция е обусловена от мутации на BRCA1 и 2 гените, като измененията в тях са отговорни за около 40% от случаите на фамилен рак на млечната жлеза.

Освен задълбочената информация от съвременни литературни източници, приятно впечатление в литературния обзор прави лекотата, с която се интерпретират данните по една тежка и обемна материя, изводите след всяка подтема, което придава завършен вид на изложението. Такъв подход е постижим единствено от задълбочен учен, запознат в детайли с представяния проблем.

**Целта** на дисертационния труд е проучване на тройно негативния карцином на гърдата (ТНКГ) –неговите клиничко-морфологични характеристики и фенотипни аспекти.

**Задачите**, които си поставя кандидатът, са пряко свързани с тази цел и са 8 на брой: да се анализират честотата и клиничко-патологичните характеристики на пациентки с ТНКГ и да се сравнят параметрите с тези на контролна група от не-тройно негативни карциноми на млечна жлеза; да се сравни общата преживяемост на пациентите с ТНКГ и контролната група; да се опишат морфологичната находка и хистопатологичните характеристики на ТНКГ; да се изследват преканцерозните лезии в групата на ТНКГ; да се анализират промените в нетуморната тъкан при ТНКГ и да се опишат морфологични аспекти на прогресията на ТНКГ; да се проучи лимфно-съдовата васкуларизация на първичния тумор при ТНКГ и се сравни с контролна група от ИХХ определени субтипове карциноми на гърда; да се проучи имунофенотипа на ТНКГ в зависимост от моделите на експресия на базални и луминални цитокератини, експресия на базални биомаркери и маркери за мезенхимна и миоепителна диференциация; да се определят характеристиките на ТНКГ по отношение на експресията на тумор супресорния ген p53, Cyclin E1, пролиферативен статус на първичния тумор и AR.

Изследвани са достатъчен брой болни - общо 498 с карцином на млечната жлеза, диагностицирани, оперирани, лекувани и диспансеризирани в УМБАЛ-Плевен за периода 2012-2014 г. От тях 421 случая са с не-тройно негативни карциноми на гърдата и 77 случая са карциноми на гърдата с тройно негативен фенотип. Кохортата на последната група е обогатена с 20 външни, консултативни случаи, които са подробно анализирани морфологично и са интерпретирани в контекста на степен на диференциация, наличие на преканцерозни лезии и характеристики на метастатични модели. Групите с ТНКГ и контролната група са добре балансирани като характеристики на включените болни, съобразно 7 включващи и 8 изключващи критерия. Определяни са възрастта на пациентките, стадият на заболяването, големината на първичния тумор, степента на хистологична диференциация на тумора/ степен на малигненост-G, статусът на изследваните лимфни възли, хистологичния вид и субтип на първичния тумор.

В „**Материал и методи**“ подробно са описани методите за определяне на отделните маркери, съобразени със съвременните световни стандарти за това, границите за отчитане на положителен резултат, определяне на специфични особености, като лимфно-съдова инвазия, лимфно-съдов васкуларитет, лимфно-съдова плътност и пролиферативен индекс на ТНКГ. Използван е богат набор от статистически методи за оценка на получените резултати: честотен анализ, графичен анализ, методи за проверка на

хипотезите и др., проведени с помощта на софтуерния продукт Statgraphics plus 2.0.

### 3. Собствени резултати

#### Параметри, характерни за групата проследени болни с ТНКГ

Честотата на ТНКГ е сравнително ниска - 15.4% за УМБАЛ „Г. Странски“ за 3-годишен период на проследяване и 9.4% в национален мащаб, по данни на НРР. Морфологично преобладават инвазивните дуктални карциноми, по-рядко срещани са лобуларните и медуларни карциноми с характеристика на ТНКГ. Характерната поява на заболяването в по-млада **възраст** се отчита и при тази проследена група болни, без да се достига статистическа значимост за този показател.

Не се установява статистически значима корелация между **размера на тумора и ангажирането на регионални лимфни възли**. Повечето ТНКГ са били N0, но с по-голям размер на първичния тумор, в сравнение с не-ТНКГ, както и с по-ниска степен на диференциация, което съвпада напълно с известните данни от литературата за тази характеристика на тумора.

**Средната обща преживяемост** за болните с ТНКГ е по-кратка с 16 месеца в сравнение с тази на контролната група – 68 срещу 84 месеца.

Изследването на общата преживяемост за периода след 5-та година установява статистически значима разлика между двете групи болни – 22 месеца за ТНКГ срещу 32 месеца за контролната група.

Интересен факт е, че ако преживеят петата година, след това болните с ТНКГ имат по-добра преживяемост от контролната група. Този факт потвърждава нашите клинични наблюдения и не може да бъде обяснен с научните данни, с които разполагаме до момента. Очевидно съществуват твърде много непознати механизми за прогресия на заболяването, различни за отделните субтипове КМЖ.

Подчертана е тенденцията за висцерално **метастазиране**, вкл. в главния мозък – данни, които корелират с тези в литературата.

По отношение на **морфологичната характеристика**, най-чест представител в групата на ТНКГ е високостепенният инвазивен карцином с централна некроза, избутващ растеж и фиброзна пролиферация в стромата, което съвпада с литературните данни. Лимфоцитната инфилтрация, характерна за базалния карцином, се среща в около 10% от изследваните ТНКГ (стромална и интраепителна). Според някои автори тази инфилтрация е независим прогностичен фактор за обща преживяемост и преживяемост, свободна от рецидиви.

Т.н. специални типове ТНКГ са представени чрез отделни клинични случаи, рядко срещани, но важни за клиничната практика: инвазивни

карциноми с медуларна характеристика, метапластични, невроендокринни, лобуларен, аденокистичен.

Изложена е и информация за преканцерозните лезии в кохортата на ТНКГ. Всички представени собствени данни на редки морфологични варианти са добре онагледени с резултатите от изследваните маркери, придружени с богата литературна справка и интерпретация на получените резултати.

**Прогресия на заболяването** е установена при около 40% от проследените болни – локални рецидиви при 19.58% и далечни метастази – при 20.61%. Поради ниската степен на диференциация, в стадий на метастазиране тези тумори могат да имитират първичен тумор в съответния орган – авторът описва два подобни клинични случая с рядка предилекция за метастазиране – дебело черво и перипаркреасна тъкан, последната съпроводена с механичен иктер. Най-кратка преживяемост имат болните с мозъчни метастази, както и с плеврални и чернодробни метастази.

Проучен е **имунофенотипа на ТНРГ** в зависимост от експресията на цитокератини, базални биомаркери и маркери за мезенхимна и миеоепителна диференциация. Доказано е, че експресията на СК5 може да бъде хомогенна (базален тип) или хетерогенна (базолуминален тип). СК 14 и 17 са с по-ниска чувствителност и специфичност за определяне на базален фенотип. Vimentin често се експресира в туморните клетки при базалоидни тумори. Caveolin-1 експресията е характерна за базалните ТН карциноми. P53 се позитивира при 50.33% от болните с ТНКГ, Циклин Е1 в 45.07% от изследваните болни, като е установена статистическа значимост при експресията на двата маркера. Сред ТНКГ превалят тези с висока пролиферативна активност, съответно висок Ki 67. Експресия на андрогенни рецептори е установена при 40.84% от изследваните болни с ТНКГ. Повечето от тях са с небазален фенотип. Изследвани са общо 20 маркера с различна прогностична и предиктивна стойност, като за целта са използвани 18 антители, CISH и FISH методи.

Глава 5 на дисертационния труд е посветена на **изводи, практически послания и препоръки**. Подчертава се значението на СК 5, p-cadherin, Caveolin-1 и EGFR за определяне на ТНКГ като такива с базален фенотип, както и на отдиференциране на т.н. „специални” типове ТНК, с оглед правилно определяне на необходимостта от терапия.

От съществено значение е т.н. „**Практически алгоритъм за морфологична диагностика на ТНК**”, съпътстван от графично изобразена последователност на стъпките за качествена диагностика. Дефинирана е водещата роля на патолога в идентифицирането на ТНКГ, точното им диагностициране и селекция на пациенти, подходящи за генетично изследване.

#### **4. Приноси на научния труд**

Научната разработка на доц. Поповска е първият задълбочен научен труд у нас, посветен на клинично-морфологичните особености на ТНКГ.

Авторът подчертава 11 приноса с научно-теоретичен характер. От най-съществено значение е предложеният интегративен, мултидисциплинарен подход в диагностиката, предикцията и определяне на прогнозата на ТНКГ с подчертаване на базисната роля на класическата морфология в диагностиката на ТНКГ. Авторът представя и собствена хипотеза за произход на ТНКГ от незрели прогениторни клетки въз основа на експресията на определени биомаркери.

Приносите с научно-практически характер са 8 на брой, най-важните от които са определяне на панел от биомаркери за диагностика на базален тип ТНКГ, дефиниране на диагностични критерии за диагностика на т.н. специални типове ТНКГ, както и детайлизиран практически алгоритъм за морфологична диагностика на ТНКГ.

#### **5. Автореферат на дисертационния труд „Клинично-морфологични и фенотипни аспекти на тройно негативните карциноми на гърдата”**

Авторефератът, изложен на 88 стр, представя в сбит вид цялата информация върху целта, задачите, материалите и използваните методи, както и собствените резултати на автора, съдържащи се в дисертационния труд. Той също е перфектно онагледен, в табличен вид са представени използваните антители, както и изследваните биомаркери. Детайлно са представени резултатите от изследването на различните патоморфологични и фенотипни особености на ТНКГ. В графичен вид е представен практическият алгоритъм за морфологична диагностика на тези тумори. Отредено е място на научно-теоретичните и научно-практически приноси на научния труд.

#### **6. Достойнства на дисертационния труд**

Непрекъснато нарастващата заболяемост от рак на млечната жлеза, засягането на все по-млад контингент жени в трудоспособна възраст, определят заболяването като социално значимо. В света ежегодно се диагностицират около 1.7 млн нови случаи при жени, като това представлява една четвърт от всички злокачествени заболявания при жените. Увеличаването на заболяемостта е с 3.1% средногодишно за периода 1980 – 2010 г. Изключение правят високоразвити държави като САЩ, Канада, Обединеното кралство, Франция, Австрия, Норвегия, където се наблюдава стабилизиране или намаляване на заболяемостта,



свързано с действащия скрининг в тези страни, както и с ограничаване на приема на хормонални препарати в менопауза.

Познанията върху това заболяване се задълбочиха в насока молекулярно-генетични изследвания от началото на настоящето хилядолетие. Крайъгълен камък за изследвания в нова насока е молекулярно-генетичната класификация на карцинома на млечната жлеза, публикувана през 2000г.(Perou С.).

Хетерогенността на заболяването се определя като многообразие от подтипове с определена биологична характеристика, различаващи се по прогноза, агресивност, фамилност, чувствителност към лекарствено лечение, вкл. съвременни таргетни медикаменти. Във фаза на предклинични изпитвания са лекарствени продукти, насочени към PI3K/mTOR, CDK 4/6 и други сигнални клетъчни пътища.

С усета на опитен задълбочен учен със сериозен практически опит, доц. Поповска се насочва към проблем, неразработван системно досега и изключително актуален поради липсата на адекватни таргети и лошите лечебни резултати - ТНKG. За първи път у нас в детайли е изследван внушителен по обем контингент болни с ТНKG - тригодишен материал, събран в УМБАЛ „Г. Странски“.

Авторът прилага разнообразни най-съвременни диагностични методи, дава практически насоки, полезни за практикуващите патоморфолози за отдиференциране на особени типове ТНKG, обръща внимание върху специфични имунохистохимични и морфологични особености на тези тумори, разработва практически алгоритъм за морфологична диагностика на ТНKG. Научният труд е перфектно онагледен. Уместно е да се популяризира и да служи като практическо ръководство – атлас за лекари – патоморфолози.

Теоретичните и практически приноси на научния труд са неоспорими.

## **7. Оценка на научната продукция на кандидата, свързана с дисертационния труд**

Доц. Поповска прилага списък с участие в написването на 6 учебни помагала и книги като съавтор, 17 статии в периодични издания, от тях 3 в чуждестранни и 14 в български. Участията с резюмета в чужбина са 6, у нас – 15. Кандидатът е участвал в разработването на 6 научни проекта, при 4 от които е водещ изследовател, в два – методичен ръководител.

Общият IF е 19.195, индивидуалният 4.407

Авторът прилага списък с 83 цитирания на свои научни трудове.

## **8. Заключение**

Дисертационният труд на доц. Поповска е посветен на изключително актуална тема. Кандидатът си е поставил ясни, добре дефинирани цели и задачи, които за реализирани добросъвестно, аргументирано и задълбочено. Направените теоретични изводи и препоръки с практическа насоченост са коректни и обосновани. Докторантът демонстрира умения за задълбочен и аргументиран анализ, обобщения и критично мислене. Авторефератът съответства на съдържанието на дисертационното изследване. Самооценката за научните приноси е точна и отговаря на действителните приноси на дисертанта. Доц. Поповска има сериозни научни публикации по темата на дисертацията, представени на национални и международни форуми, публикувани в значими издания и признати издателства. Рецензираната дисертация представлява творческо постижение, което като тематика, теоретични обобщения, изводи и препоръки има своето безспорно значение за теорията и практиката в областта на съвременната патоморфологична диагностика. Анализът на представения от доц. Поповска научен труд, богатата и научна продукция, я разкриват като задълбочен зрял учен-новатор, прекрасен професионалист, способен да разрешава сложни проблеми, свързани както с пряка диагностична дейност, така и с организирането и провеждането на научно-изследователска, преподавателска и организационна дейност.

**Всичко това ми дава основание да предложа на уважаемите членове на научното жури да присъдят на доц. д-р Савелина Любенова Поповска, д.м. научната степен „доктор на медицинските науки“ по научна специалност 03.01.03 „Патологоанатомия и цитопатология“ в катедра „Патологоанатомия“ към ФМ, МУ- Плевен.**

**04.12.2014**

**Рецензент:**

**Проф. д-р К.В.Тимчева, д.м.**