

РЕЦЕНЗИЯ

от проф. Николай Димитров Хаджиолов, д.м.н.

на дисертационен труд на тема

Морфологични и имунохистохимични аспекти от  
антитуморния имунен отговор при различни  
субтипове карцином на гърда

на д-р Полина Дамянова Димитрова

за придобиване на образователната и научна степен „ Доктор „

Научна специалност „ Патологоанатомия и цитопатология „

Научен ръководител проф. д-р Савелина Любенова Поповска, д.м.н.

Д-р Полина Димитрова е асистент към Катедра Патологоанатомия, МУ - Плевен и лекар-асистент в отд. Обща и клинична патология- УМБАЛ „ Г. Странски „- Плевен от 2018 г. През 2018 г. придобива специалност Обща и клинична патология.

Представеният дисертационен труд отговаря на изискванията за оформяне, написване и онагледяване. Структуриран е според изискванията и разпределението включва: съдържание и използвани съкращения- 8 стр., въведение- 1 стр., литературен обзор- 80 стр., цел и задачи- 2 стр., материали и методи- 10 стр., резултати- 53 стр., обсъждане- 15 стр., изводи- 6 стр., приноси- 1 стр., приложения, публикации, участие в научни форуми, курсове и проекти- 8 стр., библиография-22 стр.- цитирани са 293 източника на латиница и 2 на български език.

Въведението насочва директно към целта на научния труд и събужда интерес към темата на дисертацията.

Литературният обзор включва описание и характеристики на изследваните патологични процеси. Понастоящем съществуват противоречиви данни за ролята на тумор-инфилтриращите лимфоцити /ТИЛ / в локалния антитуморен имунитет и на значението им за прогнозата при пациенти с карцином на гърдата. Не е напълно изяснен и ефекта от взаимодействието на ТИЛ с туморните клетки, както и за значението на имунните „checkpoint“ пътища в регулацията на имунния отговор /ИО /. Сложността на проблема се дължи на хетерогенността на първичния тумор, на нееднородния клетъчен състав на възпалителния инфилтрат, нееднаквото разпределение на имунните клетки в различните области на тумора, както и при отделните подвидове рак на млечната жлеза /РМЖ /. Различните групи РМЖ, вкл. дефинираните молекулярни типове Luminal A&B, базален /тройно негативен /ТН / и Human epidermal growth factor receptor 2 /Her 2 / обогатен, се характеризират с различни молекулярни и генетични алтерации, имат различна прогноза и отговор към терапия. Ролята на молекулите CTLA-4 и PD-1 /PD-L1, участващи в инхибиторните имунни клетъчни пътища и в процеса на програмираната клетъчна смърт не е добре проучена при различните подвидове РМЖ.

От направените изводи и обобщения в края на литературния обзор, логично следва поставената цел и произлизащите от нея 6 поставени задачи, които са ясно и точно формулирани.

Използваният клиничен материал е достатъчен за получаване на статистически достоверни резултати. Използваните методи са съвременни и приложими в рутинната практика на патолога. Дисертантката показва, че владее описанието и интерпретирането на резултатите, като особено внимание е отделено на имунохистохимичните техники и използваните в научния труд антители. Описани са и използваните параметрични и непараметрични статистически тестове.



Получените собствени резултати са изложени в стандартни страници, онагледени с таблици, фигури и микроскопски снимки с добро качество и на подходящи увеличения. Описанието на резултатите е структурирано според поставените задачи в 11 групи.

В обобщение на данните от литературния обзор и резултатите от проучването на д-р Полина Димитрова може да се каже, че ИО при РМЖ е комплексен и не напълно проучен. Отделните компоненти на имунната система показват хетерогенно разпространение в туморите / в стромата и в паренхима / и имат различно участие при хистологичните и молекулярни субтипове РМЖ. Д-р Димитрова предлага комплексен подход с отчитане на няколко имунни фактора- % ТИЛ, В, Т и субтипове Т лимфоцити, както и checkpoint молекулите PD-L1 и CTLA4. Определянето на базален фенотип при РМЖ би допълнил значимостта на резултатите от проучваните имунологични компоненти. Клиничното валидиране и стандартизиране на подхода би могло да позволи по-точното прогнозиране, както и персонализираното лечение при болни с РМЖ.

Някои от по-важните направени изводи в дисертационния труд са:

1. ТН и HER2 позитивен РМЖ са по-имуногенни подтипове в сравнение с луминалните, но се установява субпопулация и при LuminalB варианта, с изразен антитуморен ИО.
2. CD3+ Т-клетъчно медирианият имунитет е водещ в антитуморния отговор при РМЖ, а хуморалният CD20+В-клетъчен е по-слабо разпространен.
3. Стромата е предпочитано място за инфилтрация от повечето видове лимфоцити (CD20+ В, CD3+ Т, CD8+ цитотоксични и FoxP3+ регулаторни), независимо от тяхната концентрация и субтип РМЖ, в който се установяват.
4. Високата концентрация на ТИЛ се свързва с неблагоприятни епидемиологични и клинично-патологични прогностични фактори.
5. Високата степен на инфилтрация с регулаторни FoxP3+ Т - клетки в стромата се свързва с негативна прогноза.
6. Инхибиторните механизми имат различно участие при молекулярните субтипове РМЖ, като ТНРМЖ (при който най-

често се установяват и базално-подобен субтип неоплазми) е предпочитан субтип за включване на checkpoint супресорните пътища – с участие в главна роля на PD-L1, а второстепенна – на CTLA-4 молекулата.

Приносите на дисертационния труд на д-р Полина Димитрова са с оригинален и научно-практичен характер. По съществените са:

1. За първи път у нас са проучени фактори на ИОпри всички сурогатни молекулярни типове РМЖ.
2. За първи път в България е извършен компютърно-асистиран морфометричен анализ на субтиповете лимфоцити.
3. За първи път у нас и в чужбина при отделните сурогатни субтипове РМЖ е направена комплексна оценка на имунните фактори: ТИЛ, основни субтипове лимфоцити и главни инхибиторни имунни „checkpoint“ молекули, в допълнение с определяне на агресивен базален фенотип.
4. Приложена е методика за определяне на ТИЛ подвидове, базален фенотип и някои инхибиторни имунни молекули при РМЖ в патологичната диагностична практика.

Д-р Полина Димитрова има 3 пълнотекстови статии във връзка с дисертационния труд- една в J.Biomed.Clin.Res. и две в AkusherstvoiGinekologiya. Д-р Димитрова има участие в 6 специализирани курса във връзка с темата на дисертационния труд и 4 участия в научни проекти пряко свързани с дисертационния труд.

Като заключение на всичко изложено в рецензията смятам, че темата на дисертацията, обемът на работата, изследваният биопсичен материал, използваните методи, получените резултати и техния анализ и направените изводи отговарят напълно на изискванията за присъждане от Уважаемото Научно жури на образователната и научна степен „ Доктор „ на д-р Полина Дамянова Димитрова.

София, 17.10.2022 г.

Проф. д-р Николай Д. Хаджиолов, д.м.н.

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'N. D. Hadzhiolov', written in a cursive style.



# **Review**

**By Prof. Dr. Nikolay Hadzhiolov, M.D., Ph.D., DSc**

**of a dissertation with topic**

**„Morphological and immunohistochemical aspects of the antitumor immune response in different subtypes of breast cancer“**

**of Dr Polina Damyanova Dimitrova**

**- for the acquisition of the educational and scientific degree "Doctor"**

**Scientific specialty "Pathology and cytopathology"**

**Research supervisor Prof. Dr. Savelina Ljubenova Popovska, M.D., Ph.D., DSc**

Dr. Polina Dimitrova is an assistant at the Department of Pathology, Medical University - Pleven and assistant-physician in the department "General and clinical pathology" - University hospital "G. Stranski" - Pleven since 2018. In 2018, she acquired a specialty in General and Clinical Pathology.

The submitted dissertation meets the requirements for formatting, writing and illustration. It is structured according to the requirements and the distribution includes: content and abbreviations used - 8 pages, introduction - 1 pages, literature review - 80 pages, aim and tasks - 2 pages, materials and methods - 10 pages, results - 53 pages, discussion - 15 pages, conclusions - 6 pages, contributions - 1 pages, applications, publications, participation in scientific forums, courses and projects - 8 pages, bibliography - 22 pages - 293 sources in Latin and 2 in Bulgarian.

The introduction points directly to the purpose of the scientific work and arouses interest in the topic of the dissertation.

The literature review includes a description and characteristics of the studied pathological processes. Currently, there are conflicting data on the role of tumor-infiltrating lymphocytes / TILs / in local antitumor immunity and their significance for prognosis in patients with breast cancer /BC/. The effect of the interaction of TILs with tumor cells, as well as the importance of immune "checkpoint" pathways in the regulation of the immune response /IR/, is not fully understood. The complexity of the problem is due to the heterogeneity of the primary tumor, the heterogeneous cellular composition of the inflammatory infiltrate, the unequal distribution of immune cells in the different areas of the tumor, as well as in the individual subtypes of breast cancer. The different groups of BC, incl. the defined molecular types Luminal A& B, basal / triple negative / TN / and Human epidermal growth factor receptor 2 / Her 2 / enriched, are characterized by different molecular and genetic alterations, have different prognosis and response to therapy. The role of cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4 /CTLA-4/ and Programmed cell death ligand 1/2 /PD-1/PD-L1/ molecules involved in inhibitory immune cell pathways and in the process of programmed cell death is not well studied in different subtypes of BC.

From the conclusions and summaries made at the end of the literature review, the set goal and the 6 set tasks arising from it logically follow, which are clearly and precisely formulated.

The clinical material used is sufficient to obtain statistically reliable results. The methods used are modern and applicable in the pathologist's routine practice. The dissertation student shows that she knows how to describe and interpret the results, with special attention being paid to immunohistochemical techniques and the antibodies used in the scientific work. The parametric and non-parametric statistical tests used are also described.

The obtained proprietary results are presented in standard pages, illustrated with tables, figures and microscopic photographs of good quality and at appropriate magnifications. The description of the results is structured according to the tasks in 11 groups.

In summary of the data from the literature review and the results of the study by Dr. Polina Dimitrova, it can be said that the immune response in breast cancer is complex and not fully studied. The individual components of the immune system show a heterogeneous distribution in the tumors / in the stroma and in the parenchyma / and have different involvement in the histological and molecular subtypes of BC. Dr. Dimitrova offers a complex approach for reporting of several immune factors - % TIL, B, T and subtypes of T



lymphocytes, as well as the checkpoint molecules PD-L1 and CTLA4. The determination of a basal phenotype in BC would add to the significance of the results of the studied immunological components. Clinical validation and standardization of the approach could allow more accurate prediction as well as personalized treatment in patients with BC.

Some of the more important conclusions made in the dissertation are:

1. TN and HER2 positive BC are more immunogenic subtypes compared to luminal, but a subpopulation is also found in the Luminal B variant, with a pronounced antitumor IR.
2. CD3+ T-cell-mediated immunity is leading in the antitumor response in BC, and humoral CD20+B-cell is less widespread.
3. The stroma is a preferred site for infiltration by most types of lymphocytes (CD20+ B, CD3+ T, CD8+ cytotoxic and FoxP3+ regulatory), regardless of their concentration and the subtype of BC in which they settle.
4. High TILs concentration is associated with unfavorable epidemiological and clinicopathological prognostic factors.
5. A high degree of infiltration with regulatory FoxP3+ T - cells in the stroma is associated with a negative prognosis.
6. Inhibitory mechanisms have a different role in the molecular subtypes of breast cancer, such as TNBC (in which basal-like subtype of neoplasms are most often found) is a preferred subtype for the inclusion of checkpoint suppressor pathways - with PD-L1 playing a major role, a secondary – of the CTLA-4 molecule.

The contributions of Dr. PolinaDimitrova's dissertation have an original and scientific-practical nature. The most important are:

1. For the first time in our country, IR factors were studied in all surrogate molecular types of breast cancer.
2. For the first time in Bulgaria, a computer-assisted morphometric analysis of lymphocyte subtypes was performed.
3. For the first time in our country and abroad, a complex evaluation of the immune factors was made for individual surrogate subtypes of BC: TILs, main subtypes of lymphocytes and main inhibitory immune "checkpoint" molecules, in addition to determining an aggressive basal phenotype.

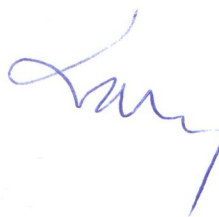


4. A methodology for determining TILs subtypes, basal phenotype and some inhibitory immune molecules in breast cancer in pathological diagnostic practice is applied.

Dr. PolinaDimitrova has 3 full-text articles related to her dissertation - one in J.Biomed.Clin.Res.and two in AkusherstvoiGinekologiya.Dr. Dimitrova participated in 6 specialized courses related to the topic of the dissertation and 4 participations in scientific projects directly related to the dissertation.

As a conclusion to everything stated in the review, I believe that the topic of the dissertation, the scope of the work, the biopsy material studied, the methods used, the results obtained and their analysis and the conclusions made fully meet the requirements for awarding by the Respected Scientific Jury the educational and scientific degree "Doctor" of Dr. PolinaDamyanovaDimitrova.

Sofia, 17.10.2022Prof. Dr. NikolayHadzhiolov, M.D., Ph.D., DSc

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'Lamy', is located in the lower right quadrant of the page.