



**Рецензия**

**от**

**Доц. д-р Иван Недков Иванов д.м.**

**Катедра Патологоанатомия, МУ-Плевен**

**Относно дисертационен труд**

**за придобиване на образователна и научна степен**

**„Доктор”**

Професионално направление: 7.1. Медицина, по научна специалност  
„Патологоанатомия и цитопатология“,

код 03.01.03.

**на д-р Полина Дамянова Димитрова,**

**на тема**

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

Съгласно решение от заседание на Академичен съвет към МУ - Плевен и заповед №2952/28.09.2022г. на Ректора на МУ-Плевен съм избран за вътрешен член на Научното жури. На основание Протокол № 1/29.09.2022 от първо заседание на научното жури, съм определен за официален рецензент по процедурата за придобиване на образователна и научна степен „Доктор“ на кандидата д-р Полина Дамянова Димитрова.

#### **Кратки биографични данни**

- Д-р Полина Дамянова е родена на 22.12.1986 г. в гр. Луковит, обл. Ловеч.
- През 2005 г. завършва средно образование в СОУ „Васил Левски“ – гр. Ябланица, обл. Ловеч.
- През 2013 година с отличен успех завършва висше медицинско образование в МУ - Плевен.
- В периода 11.2013 - 11.2017 е специализант по Обща и клинична патология към Медицински университет – Плевен.
- От 01.06.2018 придобива специалист по Обща и клинична патология.
- За периода 09.2015 – 06.2018 е хоноруван преподавател.

- От 06.2018 година е назначена за асистент към катедра Патологоанатомия на МУ – Плевен.
- От 07.2018 - до момента работи като лекар-асистент към Отделение по обща и клинична патология към УМБАЛ „Г. Странски“, Плевен.
- След проведен конкурс и заповед № 863/29.03.2019 г. на Ректора на МУ - Плевен е зачислена в редовна докторантура по „Патологоанатомия и цитопатология“ към катедра „Патологоанатомия“ – МУ - Плевен.
- За периода на докторантурата има участва в редица национални и международни конгреси, конференции, курсове и научни проекти.

#### **Обща оценка на дисертационния труд**

Представеният дисертационен труд е със структура, в обем и вид съгласно законовите изисквания и изискванията на правилника на МУ-Плевен. Дисертационният труд е написан на 206 стандартни машинописни страници, съответно 81 страници представят въведение и обзор на литературата по темата, 2 страници- цели и задачи, 10 страници - материали и методи и 74 страници са посветени на собствени резултати, дискусия и изводи. Дисертационният труд е онагледен с 27 таблици, 41 фигури и 4 приложения. Книгописът включва общо 295 източника, от които 3 на кирилица и 292 на латиница. Авторефератът е оформен съгласно общоприетите изисквания.

**По темата на дисертационния труд.** Дисертационният труд проучва задълбочено някои от морфологичните и имунохистохимични аспекти на антитуморния имунен отговор при различни субтипове карцином на гърдата, като подробно е описан и анализиран състава, количеството и разпределението на туморинфилтриращите лимфоцити. Проучена е експресията на PD-L1 и CTLA-4 в туморните и имунни клетки (свързани с туморите). Проучваните параметри са в контекста на демографските, епидемиологични и клинично-патологични характеристики на изследваната популация пациенти.

Разглежданата тема е социално значима с оглед на епидемиологичните данни за честотата и смъртността от рак на гърдата, както в световен мащаб, така и в Европа и у нас. В литературния обзор твърде обстойно и нагледно са представени честотата и повъзрастовата смъртност от рак на гърдата по региони и държави, като е акцентирано

на водещото място на карцинома на гърдата като причина за смърт, настъпила от онкологични заболявания при жените в България.

Литературният обзор е обширен, подробен и изчерпателен, съставляващ около ¼ от обема на дисертационния труд. Той е организиран в отделни логически сегменти – («имунитет и рак», „епидемиологични данни при карцином на гърда“, „биологични субтипове карцином на гърда“, „антитуморен имунен отговор, представен от тумор – инфилтриращи лимфоцити и третични лимфоидни структури“, „Инхибиторни “checkpoint” молекули - PD-L1 и CTLA-4“, „Имунотерапия и ролята ѝ при КГ/карцином на гърдата/“), завършващи с кратко, критично обобщение на автора. Литературният обзор е базиран на достатъчен брой съвременни източници.

### Цел и задачи

Целта е дефинирана ясно – да бъдат проучени някои морфологични и имунохистохимични аспекти от антитуморния имунен отговор при различни субтипове РМЖ, което е в съответствие с темата на дисертационния труд. За постигането на целта са поставени 6 основни задачи, свързани с установяване и анализ на епидемиологични и клинично-патологични показатели на изследваната популация, установяване на състава на туморинфилтриращите лимфоцити и тяхното разпределение при случаи с карцином на гърдата, проучване на експресията на PD-L1 и CTLA-4 при туморните и туморасоциираните лимфоцити, търсене на корелации между изследваните показатели и създаване на алгоритъм за оценка на туморасоциираните лимфоцити в рутинната практика, както и проучване на прогностичната стойност на туморасоциираните лимфоцити и позитивността за имунните ”checkpoint” молекули при изследваната популация карциноми на гърдата.

### Пациенти и методи

В дисертационния труд са включени изследвания върху 100 пациенти с морфологично доказани първични инвазивни мамарни карциноми, които са стратифицирани в четири категории молекулярни сурогатни субтипа (Луминален А, луминален В- подобни, HER2-позитивен и тройно негативен). Случаите са подбрани на произволен принцип от архивите на УМБАЛ “Г. Странски“ -Плевен, на база

включващи и изключващи критерии. Изследваните пациенти са включени в 4 научно-изследователски проекта - три финансирани от МУ-Плевен и един финансиран от Оперативна програма „Наука и образование за интелигентен растеж“ и Европейския фонд за регионално развитие. При работата по дисертационния труд са използвани редица класически и съвременни методи, включително хистологичен и имунохистохимичен. Отчитането и интерпретацията на имунооцветяванията е в съответствие с утвърдени протоколи и методики. Статистическите методи да правилно подбрани, приложени посредством софтуерен продукт, като са изследвани репрезентативен брой случаи.

### Резултати и дискусия

Резултатите в дисертационния труд са обстойно описани и добре онагледени с фигури и таблици. Анализирани са параметрите на изследваната популация, като в изследваната популация прави впечатление преобладаването на жени на възраст между 50 и 79 години. Прави впечатление също ниската кумулативна преживяемост при пациентите тумори от HER2 групата, спрямо пациенти с тумори с Луминален А, луминален В- подобни, HER2-позитивни и тройно негативни тумори. Интересен и важен акцент от оценката на антитуморния имуноен отговор е факта, че при значителна част от изследваните тумори (89%) се наблюдават тумор инфилтриращи лимфоцити  $\leq 50\%$ . Към тези тумори спадат всички тумори от Луминален А тип, следвани от 96% от Луминален В субтип. От друга страна от туморите с тумор инфилтриращи лимфоцити  $> 50\%$  най-висок процент -24% се наблюдава при HER2 субтипа, следвани от имащите тройно негативен субтип - 16%.

Настоящото проучване установява липса на PD-L1 при туморните клетки при 93% от случаите в цялата извадка, като позитивен резултат с ниска експресия е установен при 6%. Позитивните случаи са от групата с тройнонегативен фенотип - 20%, като в тази група се наблюдава и случай с висока PD-L1 експресия при туморните клетки.

Друг интересен акцент е установената тенденция относителният дял на пациентите с туморинфилтриращи лимфоцити  $>50\%$  да бъде значимо по-висок при имащите метастази в лимфни възли, докато относителният дял на пациентите с туморинфилтриращи лимфоцити  $\leq 50\%$  да бъде по-голям при пациенти, нямащи метастази в лимфните възли в аксилата. Резултатите показват сигнификантно влияние

на туморинфилтриращите лимфоцити върху кумулативната преживяемост, като при туморите с туморинфилтриращи лимфоцити >50% тя е значително по-ниска.

Извършеният обстоен сравнителен анали на показателите свързани с антуморния имунен отговор изследваните клинични и морфологични параметри и категории показват редица правдоподобни корелации с потенциално клинично значение.

Изводите са правдоподобни, добре аргументирани и логични по своята същност. Последните обаче са твърде обширни и многобройни, написани на четири печатни страници. Това разбира се, не променя тяхната значимост.

Кандидатът дефинира 4 приноса с **научно-практичен и/или оригинален характер и 4 приноса с научно-теоритичен характер, които имат своята значимост и приемам.**

### **Заклучение**

В заключение, представеният дисертационен труд в своята цялост представлява оригинална научна разработка, посветена на актуален медицински проблем. Разработката е на добро методично ниво. Разгледани са редица важни аспекти на туморинфилтриращите лимфоцити при карцинома на гърдата в контекста на тяхната морфологична, имунохистохимична характеристика и клиничен смисъл. Разработен е комплексен подход за имунохистохимично определяне на прогностично значими фактори при отделните сурогатни молекулярни субтипове карцином на гърдата. Считаю, че предоставения дисертационен труд е дисертабилен, допълващ и разширяващ съвременните познания в областта на противотуморния имунитет при карцинома на гърдата.

14.10. 2022г.  
гр. Плевен

Доц. д-р Иван Иванов д.м. ....



## ***Statement***

***By Assoc. prof. Ivan Nedkov Ivanov M.D., Ph.D.***

***Department of Pathology***

***MU- Pleven***

***Concerning PhD thesis in***

Professional field:

7.1. Medicine, scientific specialty "Pathology and cytopathology",

code 03.01.03.

***of***

***d-r Polina Damianova Dimitrova with topic***

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

According to the decision of the meeting of the Academic Council at the MU - Pleven and order No. 2952/28.09.2022. of the Rector of MU-Pleven, I was elected as an internal member of the Scientific Jury. On the basis of Protocol No. 1/29.09.2022 of the first meeting of the scientific jury, I have been selected as an official reviewer for the procedure for the acquisition of PhD degree of the candidate Dr. Polina Damyanova Dimitrova.

Brief biographical data

- Dr. Polina Damyanova was born on 22.12.1986 in the town of Lukovit, region Lovech.
- In 2005, she graduated from high school "Vasil Levski" - town of Yablanitsa, region Lovech.
- In 2013, she graduated with excellent mark from higher medical education at MU - Pleven.
- In the period 11.2013 - 11.2017 she specialized in General and Clinical Pathology at the Medical University – Pleven.
- From 01.06.2018 she became a specialist in General and Clinical Pathology.
- For the period 09.2015 - 06.2018 she was a part-time teacher.
- Since 06.2018, she has been appointed as an assistant at the Department of Pathology of the MU – Pleven.
- From 07.2018 - until now, she works as a doctor-assistant at the Department of General and Clinical Pathology at UMBAL "G. Foreign", Pleven

- With order No. 863/29.03.2019 of the Rector of MU - Pleven, she was enrolled in a regular doctoral course in "Pathology and cytopathology" at the Department of "Pathology" - MU - Pleven.
- During the period of Ph D studies, she participated in a number of national and international congresses, conferences, courses and scientific projects.

### **General evaluation of the dissertation work**

The presented thesis is structured, in volume and type according to the legal requirements and the requirements of the regulations of MU-Pleven. The thesis is written on 206 standard typewritten pages, respectively 81 pages present an introduction and review of the literature on the topic, 2 pages - aim and tasks, 10 pages - patients and methods and 74 pages are dedicated to own results, discussion and conclusions. The thesis is illustrated with 27 tables, 41 figures and 4 supplements. The bibliography includes a total of 295 sources, of which 3 are in Cyrillic and 292 are in Latin. The abstract is submitted according to generally accepted requirements.

### **On the topic of the dissertation.**

The dissertation investigates thoroughly some of the morphological and immunohistochemical aspects of the antitumor immune response in different subtypes of breast carcinoma, describing and analyzing the composition, amount and distribution of tumor-infiltrating lymphocytes in details. The expression of PD-L1 and CTLA-4 in tumor and immune (tumor-associated) cells is studied. The evaluated parameters are in the context of the demographic, epidemiological and clinicopathological characteristics of the studied patient population.

The topic under consideration is socially significant in the context of the epidemiological data on the incidence and mortality from breast cancer, both worldwide, in Europe and in Bulgaria in particular. In the literature review, the frequency and age adjusted mortality from breast cancer by region and country are presented very thoroughly and clearly, emphasizing the leading role of breast carcinoma as a cause of death from oncological complications in women in Bulgaria.

The literature review is extensive, detailed and comprehensive, making up about  $\frac{1}{4}$  of the

volume of the thesis. It is organized into separate logical segments - ("immunity and cancer", "epidemiological data in breast carcinoma", "biological subtypes of breast carcinoma", "antitumor immune response presented by tumor - infiltrating lymphocytes and tertiary lymphoid structures", " Inhibitory "checkpoint" molecules - PD-L1 and CTLA-4", "Immunotherapy and its role in BC /breast cancer/"), ending with a short, concise summary of the author. The literature review is based on a sufficient number of contemporary sources.

### Purpose and tasks

The goal is clearly defined - to study some morphological and immunohistochemical aspects of the antitumor immune response in different subtypes of breast cancer, which is in accordance with the topic of the thesis. To achieve the defined goal, 6 main tasks have been set, related to the identification and analysis of epidemiological, clinical and pathological indicators of the studied population, establishing the composition of tumor-infiltrating lymphocytes and their distribution in cases with breast carcinoma, studying the expression of PD-L1 and CTLA-4 in tumor and tumor-associated lymphocytes, searching for correlations between the investigated indicators and creating an algorithm for evaluating tumor-associated lymphocytes in routine practice, as well as a study of the prognostic value of tumor-associated lymphocytes and positivity for immune "checkpoint" molecules in the established population of breast carcinomas.

### Patients and methods

The thesis included studies on 100 patients with morphologically proven primary invasive breast carcinomas, which were stratified into four categories of molecular surrogate subtypes (luminal A, luminal B-like, HER2-positive and triple-negative. The cases were randomly selected from the archives of UMBAL "G. Stranski" -Pleven, on the basis of inclusion and exclusion criteria. The examined patients were included in 4 research projects - three funded by MU-Pleven and one funded by the Operational Program "Science and Education for Intelligent Growth" and the European Fund for regional development.

A number of classic and modern methods, including histological and immunohistochemical, were used in the work on the thesis. The evaluation and interpretation of the immunostains



was in accordance with established protocols and methods. The statistical methods were properly selected, applied through a software product, and were carried out on representative number of cases.

## Results and discussion

The results in the thesis are thoroughly described and well illustrated with figures and tables. The parameters of the studied population were analyzed, and in the studied population the predominance of women between the ages of 50 and 79 makes an impression. Also noteworthy is the low cumulative survival in patients with tumors of the HER2 group compared to patients with tumors with Luminal A, Luminal B-like, HER2-positive and triple-negative tumors. An interesting and important highlight of the evaluation of the antitumor immune response is the fact that a significant proportion of the tumors examined (89%) showed tumor infiltrating lymphocytes  $\leq 50\%$ . These tumors include all tumors of the Luminal A type, followed by 96% of the Luminal B subtype. On the other hand, of the tumors with tumor infiltrating lymphocytes  $> 50\%$ , the highest percentage -24% was observed in the HER2 subtype, followed by those having the triple negative subtype - 16%. The present study found an absence of PD-L1 in tumor cells in 93% of cases in the entire sample, with a positive result with low expression found in 6%. The positive cases are from the group with a triple-negative phenotype - 20%, and in this group there is also a case with high PD-L1 expression in the tumor cells. Another interesting highlight is the established tendency for the relative share of patients with tumor-infiltrating lymphocytes  $>50\%$  to be significantly higher in those with lymph node metastases, while the relative proportion of patients with tumor-infiltrating lymphocytes  $\leq 50\%$  was greater in patients without axillary lymph node metastases. The results demonstrate a significant influence of tumor-infiltrating lymphocytes on cumulative survival, and in tumors with tumor-infiltrating lymphocytes  $>50\%$  it is significantly lower. The comprehensive comparative analysis of the indicators related to the antitumor immune response, the studied clinical and morphological parameters and categories showed a number of plausible correlations with potential clinical significance.

The conclusions are plausible, well-defined and logical in nature. The latter, however, are too extensive and numerous, written on four printed pages. This, of course, does not change their importance. The candidate defines 4 contributions of a scientific-practical and/or original nature and 4 contributions of a scientific-theoretical nature, which have their significance and I accept.

Conclusion In conclusion, the presented thesis in its entirety represents an original scientific work dedicated to a significant medical problem. The thesis is executed at a good methodical level. A number of important aspects of tumor-infiltrating lymphocytes in breast carcinoma are reviewed and examined in the context of their morphological, immunohistochemical characteristics and clinical significance. A complex approach has been developed for immunohistochemical determination of prognostically significant factors in individual surrogate molecular subtypes of breast cancer. I believe that the provided thesis is defensible, complementing and expanding modern knowledge in the field of antitumor immunity in breast carcinoma.

14.10. 2022

Assoc. prof. D-r Ivan Ivanov, M.D., Ph.D.

.....  
Pleven

