

РЕЦЕНЗИЯ

от

проф. д-р Веселин Т. Беловежков, дм

Ръководител на Катедра по обща и клинична патология, МУ - Пловдив
въз основа на заседание на Академичния съвет на МУ – Плевен (Протокол № 8) и на
заповед на Ректора на МУ – Плевен № 4789 / 16.12.2025

Относно дисертационен труд на тема:

„Мускулно - инвазивен карцином на пикочния мехур - морфологични и
имунохистохимични характеристики с фокус върху прогностични и
предиктивни биомаркери“

за присъждане на ОНС «доктор» по научна специалност: „Патологоанатомия и
цитопатология“ Професионално направление 7.1. Медицина, Област на висше
образование 7. Здравеопазване и спорт

с автор д-р Елица Петрова Краевска

Докторант, редовна форма на обучение към Катедра „Патологоанатомия“, МУ – Плевен
и научен ръководител проф. д-р Савелина Поповска, дмн

Карциномът на пикочния мехур (КПМ) заема девето място по честота в световен
мащаб за 2022 година. При мъже той се среща 4 пъти по-често в сравнение с жените,
което му отрежда шесто място сред най-често срещаните ракови заболявания при
силния пол. Туморът показва значителна географска вариабилност. В развитите страни,
в САЩ, в Европа, карциномът на пикочния мехур е сред най-често срещаните
злокачествени заболявания.

Социалната значимост на карцинома на пикочния мехур (КПМ) се изразява не само
чрез високата заболяемост и смъртност, но и чрез загубата на качество на живот.
Заболяването заема петнадесето място водещо до инвалидизация. Тези данни
подчертават необходимостта от разработване на нови диагностични и терапевтични
подходи, както и стратегии за превенция на КПМ.

Това дава основание да кажем, че темата на настоящата работа е извънредно
актуална.

Дисертационният труд включва 202 стандартни страници, от които 158 основен
текст (Въведение- 2 стр., Литературен обзор – 39 стр., Цел и задачи – 1 стр., Материали
и методи – 10 стр., Резултати и обсъждане - 89 стр., Изводи, приноси, нови
хипотези/предложения и заключение – 8 стр.) Литературната справка обхваща 221
източници от които 1 на кирилица и 200 на латиница, като 178 от тях са от последните

10 години. Дисертацията съдържа 14 фигури, 14 таблици, 17 микрофотографии и 1 приложение).

В литературния обзор изчерпателно са описани етиологичните фактори – влиянието на канцерогенни вещества като арсен и индустриални химикали, наличието или отсъствието на определени микроелементи в питейната вода, тютюнопушенето – един от основните рискови фактори за карцином на пикочния мехур и неговата честота. Подчертана е ролята на генетичните промени, които играят ключова роля в патогенезата.

По-нататък в работата е посочено е, че основни за установяването на диагнозата процедури са цистоскопията и биопсията, а терапевтичните методи – ТУР и, при мускулно-инвазивните форми, радикална цистектомия. Последната е хирургична процедура, свързана със значителни хирургически разходи, понякога със следоперативна заболяемост и смъртност. Медикаментозната терапия също играе ключова роля в лечението. Инхибиторите на тирозин киназата (като тези, насочени към FGFR) и имунотерапевтичните агенти са обещаващи, но тяхната висока цена представлява сериозно предизвикателство за здравните бюджети.

Налага се и заключението, поради горепосочената причина, че важно място заема определянето на прогностичните и предиктивни биомаркери при КПМ, което би било от съществено значение за оценката на клиничния ход на заболяването и определянето на подходящи терапевтични стратегии. Отбелязва се, че такива са PD-L1, мутации в ДНК-репарационните гени, ERCC1 и ERCC2 (excision repair cross-complementing protein 1 и 2), FGFR мутация, EGFR експресия или мутация, HER2 експресия, PARP експресия и циркулираща туморна ДНК (ctDNA). Наред с това се счита, че значение има и определянето на видовете субтипове на уротелен карцином, които играят ключова роля както в диагностиката, така и в прогностичната оценка и лечението. Субтип означава уротелен произход (и ИХХ-профил), но различна морфология от тази на конвенционален уротелен карцином, например: микропапиларен УК, микрокистичен УК, саркоматоиден УК, плазмочитоиден УК, светлоклетъчен УК, обогатен с липиди УК, гнезден УК, лимфоепителиома-подобен УК или гигантоклетъчен, които се срещат в около 20-30 %.

Подчертава се, че молекулярното типизиране е друг независим предиктор при карцинома на пикочния мехур. То е ключово за разбиране на сложните генетични взаимодействия, които влияят на биологията и клиничното поведение на заболяването. Съвременните методи за класификация позволяват разделяне на туморите на различни молекулярни категории, включително луминални и базални, които демонстрират специфични молекулярни профили, различия в прогностичните характеристики и терапевтичния отговор.

Изтъкнато е, че използването на имунохистохимия като сурогат за основните молекулярни варианти (луминален и базален), аналогично на употребата ѝ при рака на гърдата е релевантен метод за оценка, приложим във всяка лаборатория разполагаща с основен набор от имунохистохимични антитела.

Развитието на молекулярната класификация на уротелния карцином предоставя нови перспективи за разбирането на биологията на това заболяване и неговото

клинично управление. Идентифицирането на различни молекулярни варианти, като базален, луминален и др., разкрива специфични генетични и протеинови профили, които корелират с клиничните характеристики и терапевтичния отговор.

На финала на обзора са направени редица изводи, които може да бъдат резюмирани така : КППМ е социално значимо заболяване с тенденция за все по-бързо увеличаване, субтиповете му трябва да бъдат разпознавани и описани в патологичния отговор, молекулярните варианти могат да бъдат приблизително определени с методите на имунохистохимията, и, много важно - за да се достигне до прецизна диагностика и персонализирана терапия, трябва да се обединят класическата (хистологичната) и молекулярна класификация; уточняването на HER2-статуса при пациентите с КППМ би добавило прогностична и предиктивна стойност, експресията на p16 при също може да се ползва като прогностичен биомаркер.

Въз основа на тази информация логично е формулирана целта, която намирам за правилно формулирана - да се проучи морфологичната характеристика на мускулно-инвазивния карцином на пикочния мехур и да се дефинират молекулярните варианти, съгласно консенсусната молекулярна класификация, с помощта на сурогатни имунохистохимични маркери, както и да се проучи експресията на HER2 протоонкогена и да се потърси корелация с различните морфологични субтипове и молекулярни варианти.

За реализирането на тази цел уместно са поставени следните задачи : определяне на честотата на различните хистологични субтипове МИКППМ, определяне на молекулярния вариант на различните хистологични субтипове, чрез методите на ИХХ, изследване на корелация между класическата (хистологична) и молекулярната класификация, определяне на HER2-експресията при различните хистологични субтипове и молекулярни варианти и експресията на p16 при различни молекулярни варианти извън групата на базалния молекулярен вариант.

За решаване на тези задачи е използван достатъчен биопсичен материал - на 100 последователни пациенти с хистологично доказан мускулно-инвазивен карцином на пикочния мехур, на които е извършена радикална цистектомия или трансуретрална резекция (ТУР) в Клиника по урология на УМБАЛ „Света Марина“, гр. Плевен за 4-годишен период. Изследванията са извършени на конвенционални хистологични препарати и на такива с ИХХ имуномаркиране извършени на DAKO – имуностейнер, Link 48, използвани са и статистически методи.

Получените резултати сочат, че в 66% от случаите на УК показват различна морфология или дивергентна диференциация, като най-чести сред тях са: уротелен карцином с плоскоклетъчна диференциация – 17%, саркоматоиден УК – 5%, дребноклетъчен карцином – 5%, микропапиларен УК – 4%, уротелен карцином с жлезиста диференциация – 3%, плазмоцитоиден субтип – 3%, слабодиференциран (анапластичен) уротелен карцином – 3%, и гнезден субтип – 2%, че молекулярните субтипове уротелен карцином са базален – 33%, луминален папиларен – 24%, луминален нестабилен – 16%, базолуминален – 9%, двойно-негативен с невроендокринна морфология – 6%, двойно-негативен, богат на строма – 2% и луминален неуточнен – 10%., че познаването на честотата и характеристиките на всеки молекулярен вариант, тъй като някои от тях имат различна прогноза и чувствителност

към лечение – например, базалните и строма-обогатените тумори, типично показват по-добър отговор на химиотерапия и имунотерапия, че луминалните папиларни карциноми имат по-добра прогноза при приложение на FGFR-инхибитори или цистектомия и дават слаб отговор към ХТ. Установява се, че има корелацията между хистологичната и молекулярната класификация на уротелния карцином, което показва ясно изразени тенденции. Луминалните молекулярни варианти обхващат предимно тумори с папиларни и други по-редки субтипове (включително микропапиларен, гнезден, плазмацитоиден), докато базалният вариант обхваща тумори с плоскоклетъчна диференциация и значима част от саркоматоидните. Невроендокринните карциноми формират отделен молекулярен клас. Тези модели се подкрепят както от големи транскриптомни проучвания, така и от резултатите на настоящата работа, където връзките папиларен-луминален и сквамозен-базален са очевидни.

Намира се, че съпоставянето на данните подкрепя съществуването на стабилни модели: папиларните/луминални и сквамозните/базални “оси”, които са гръбнакът на класификацията на карцинома.

При изследване на HER2 експресията се доказва, че свръхекспресия е по-характерна за луминални варианти на КППМ – по-специално папиларни и микропапиларни – докато базалните и диференцирани към други посоки (саркоматоидни) тумори рядко я проявяват. При останалите видове 25% от случаите са с висока HER2 експресия (3+ по имунохистохимия) и допълнителни 22% са 2+ (умерена, непотвърдена експресия). Отрицателни (0) са 31%.

За профилът на p16 (CDKN2A) експресията, който представлява ценен молекулярен отпечатък на всеки от консенсусните варианти на пикочния мехур се установява, че са налице фундаментални различия в туморогенезата им. Съпоставянето на конкретни случаи с публикуваните вече данни подпомага по-доброто им разбиране и потенциално дава шанс за по-прецизна терапевтична насоченост.

Въз основа на получените резултати и умело приложената към тях дискусията, показваща добро познаване на материята, са направени закономерно следните заключения, които считам за правилно формулирани : че работата предоставя детайлно количествено описание на честотата на различните хистологични субтипове при МИКППМ , че демонстрира практически подход за консенсусна молекулярна класификация на МИКППМ чрез избран имунохистохимичен панел и потвърждава възпроизводимостта на тази класификация, че отчита съществуването на хибридна базолуминална категория тумори с особен имунофенотип, че установява честотата на HER2 свръхекспресия при МИКППМ и нейната тясна връзка с луминалния път, което има директно клинично значение, че анализира експресията на p16 като маркер за статуса на RB1 и показва неговата стойност при разграничаване на вариантите, че интегрира морфологичните и молекулярни данни в ясни алгоритми. Това без съмнение би съдействало за подобряване на диагностиката и лечението на пациентите с рак на пикочния мехур, което е важно за практическата дейност на работещи в тази сфера на медицината.

Дисертационният труд позволява да се направят следните оригинални научно-теоретични и научно-практически приноси, както са ги изложили авторите : изясняване на морфологичния спектър на МИКППМ в българска кохорта, въвеждане на

имунохистохимично-базирана класификация, идентификация на базо-луминален (двойно-позитивен) вариант, проучване на her2 статуса при инвазивен карцином на мехура, анализ на p16 като маркер за RB1-статус, цялостна корелация между хистологичните и молекулярните характеристики на всеки тумор, оформяне на локална популационна база данни. Това прави дисертационният труд значима крачка към интегриране на класическата патология със съвременните молекулярни методи.

Основните резултати от дисертационния труд са обобщени и представени в 2 научни публикации реферирани и индексирани в PubMed, Web of science и Scopus с SJR Q1 и IF. И в двете публикации д-р Краевска е първи автор, тя участва като съавтор и в още една публикация. По темата са представени и 3 съобщения в научни форуми в България.

На основание на по-горе изложеното считам, че дисертационният труд изпълнява всички необходими изисквания на Закона за развитието на академичния състав в Република България и на Правилника на МУ – Плевен и затова ще гласувам да бъде присъдена образователната и научна степен „Доктор“ по докторска програма „Патологоанатомия и цитопатология“ Професионално направление 7.1. Медицина на д-р Елица Петрова Краевска, а и си позволявам да предложа и на останалите членове на научното жури да гласуват положително.

На основание чл.59 от ЗЗЛД

05.01.2026 г.

проф. д-р В. Беловежков, дм

REVIEW

by

Prof. Dr. Veselin T. Belovezhkov, MD, PhD

Head of the Department of General and Clinical Pathology, Medical University of Plovdiv

Based on a meeting of the Academic Council of Medical University – Pleven (Protocol No. 8) and on the Rector's Order of Medical University – Pleven No. 4789 / 16 Dec 2025

Regarding the doctoral dissertation entitled:

“Muscle-invasive carcinoma of the urinary bladder: morphological and immunohistochemical characteristics with a focus on prognostic and predictive biomarkers”

regarding the procedure for occupying the academic position “Doctor” (PhD) in the scientific specialty “Pathological Anatomy and Cytopathology”, Professional Field 7.1 Medicine, Area of Higher Education 7 Health and Sports

Author: Dr. Elitsa Petrova Kraevska

PhD candidate (full-time), Department of “Pathological Anatomy”,
Medical University – Pleven

Scientific supervisor: Prof. Dr. Savelina Popovska, MD, DMS.

Bladder carcinoma (BC) ranks ninth in global incidence for the year 2022. In men, it occurs four times more frequently than in women, placing it sixth among the most common malignancies in males. The tumor demonstrates marked geographic variability. In developed countries—such as the USA and Europe—bladder carcinoma is among the most common malignant diseases.

The social significance of bladder carcinoma (BC) is expressed not only by high morbidity and mortality, but also by loss of quality of life. The disease ranks fifteenth as a cause leading to disability. These data underline the need to develop new diagnostic and therapeutic approaches, as well as prevention strategies for BC.

This provides grounds to state that the topic of the present work is exceptionally relevant.

The dissertation comprises 202 standard pages, including 158 pages of main text (Introduction—2 pp.; Literature Review—39 pp.; Aim and Objectives—1 p.; Materials and Methods—10 pp.; Results and Discussion—89 pp.; Conclusions, Contributions, New Hypotheses/Proposals and Final Conclusion—8 pp.). The bibliography includes 221 sources, of which 1 is in Cyrillic and 200 in Latin script, with 178 published within the last 10 years. The dissertation contains 14 figures, 14 tables, 17 microphotographs, and 1 appendix.

In the literature review, etiological factors are described comprehensively: the influence of carcinogenic substances such as arsenic and industrial chemicals; the presence or absence of certain trace elements in drinking water; tobacco smoking—one of the main risk factors for bladder carcinoma—and its prevalence. The role of genetic alterations, which play a key role in pathogenesis, is emphasized.

Further in the dissertation it is stated that the principal procedures for establishing the diagnosis are cystoscopy and biopsy, while therapeutic methods include transurethral resection (TUR) and, in muscle-invasive forms, radical cystectomy. The latter is a surgical procedure associated with considerable operative costs and, at times, with postoperative morbidity and mortality. Pharmacotherapy also plays a key role in treatment. Tyrosine kinase inhibitors (including those targeting FGFR) and immunotherapeutic agents are promising, but their high cost represents a serious challenge for healthcare budgets.

Consequently, an important role is assigned to determining prognostic and predictive biomarkers in BC, which would be essential for assessing the clinical course of disease and for selecting appropriate therapeutic strategies. It is noted that such biomarkers include PD-L1, mutations in DNA repair genes, ERCC1 and ERCC2 (excision repair cross-complementing protein 1 and 2), FGFR mutations, EGFR expression or mutation, HER2 expression, PARP expression, and circulating tumor DNA (ctDNA).

In addition, it is considered important to identify the histological subtypes of urothelial carcinoma, which play a key role in diagnosis, prognostic assessment, and treatment. “Subtype” denotes urothelial origin (and an immunohistochemical profile) but a morphology different from that of conventional urothelial carcinoma, for example: micropapillary UC, microcystic UC, sarcomatoid UC, plasmacytoid UC, clear cell UC, lipid-rich UC, nested UC, lymphoepithelioma-like UC, or giant-cell variant—encountered in approximately 20–30%.

It is emphasized that molecular typing is another independent predictor in bladder carcinoma. It is key to understanding the complex genetic interactions that influence disease biology and clinical behavior. Modern classification methods allow tumors to be stratified into different molecular categories, including luminal and basal types, which demonstrate specific molecular profiles, differences in prognostic characteristics, and therapeutic response.

It is also highlighted that the use of immunohistochemistry as a surrogate for the main molecular variants (luminal and basal), analogous to its use in breast cancer, is a relevant assessment method applicable in any laboratory equipped with a basic immunohistochemical antibody panel.

The development of molecular classification of urothelial carcinoma provides new perspectives for understanding the biology of this disease and its clinical management. Identification of different molecular variants—basal, luminal, and others—reveals specific genetic and protein profiles that correlate with clinical characteristics and therapeutic response.

At the end of the review, several conclusions are drawn, which can be summarized as follows: bladder carcinoma is a socially significant disease with a tendency toward increasingly rapid growth in incidence; its subtypes should be recognized and described in the pathology report; molecular variants can be approximated using immunohistochemical methods; and—very importantly—achieving precise diagnosis and personalized therapy requires integration of classical (histological) and molecular classification. Clarification of HER2 status in BC patients would add prognostic and predictive value, and p16 expression may also be used as a prognostic biomarker.

Based on this information, the aim is logically formulated and, in my view, correctly defined: to study the morphological characteristics of muscle-invasive bladder carcinoma and to define molecular variants according to the consensus molecular classification using surrogate immunohistochemical markers; additionally, to study HER2 proto-oncogene expression and seek correlation with different morphological subtypes and molecular variants.

To achieve this aim, the following tasks are appropriately set: determination of the frequency of different histological subtypes of muscle-invasive bladder carcinoma; determination of the molecular variant of different histological subtypes by immunohistochemistry; evaluation of correlation between classical (histological) and molecular classification; determination of HER2 expression across different histological subtypes and molecular variants; and assessment of p16 expression in different molecular variants outside the basal molecular group.

To address these tasks, adequate biopsy material was used: 100 consecutive patients with histologically confirmed muscle-invasive bladder carcinoma who underwent radical cystectomy or transurethral resection (TUR) at the Urology Clinic of University Hospital “St. Marina”, Pleven, over a 4-year period. Studies were performed on conventional histological slides and immunohistochemically stained preparations using a DAKO immunostainer (Link 48). Statistical methods were also applied.

The results indicate that in 66% of urothelial carcinoma cases a different morphology or divergent differentiation is present. The most frequent among these are: urothelial carcinoma with squamous differentiation—17%; sarcomatoid UC—5%; small-cell carcinoma—5%; micropapillary UC—4%; urothelial carcinoma with glandular differentiation—3%; plasmacytoid subtype—3%; poorly differentiated (anaplastic) urothelial carcinoma—3%; and nested subtype—2%.

The molecular subtypes of urothelial carcinoma are reported as: basal—33%; luminal papillary—24%; luminal unstable—16%; basoluminal—9%; double-negative with neuroendocrine morphology—6%; double-negative, stroma-rich—2%; and luminal, not otherwise specified—10%. Knowledge of the frequency and characteristics of each molecular variant is important, because some have different prognosis and sensitivity to treatment—for example, basal and stroma-rich tumors typically show better response to chemotherapy and immunotherapy, whereas luminal papillary carcinomas have a better prognosis with FGFR inhibitors or cystectomy and show a weak response to chemotherapy.

A correlation between histological and molecular classification of urothelial carcinoma is demonstrated, revealing clear trends. Luminal molecular variants predominantly include papillary and other rarer subtypes (including micropapillary, nested, plasmacytoid), whereas the basal variant includes tumors with squamous differentiation and a significant proportion of sarcomatoid tumors. Neuroendocrine carcinomas form a separate molecular class. These patterns are supported by large transcriptomic studies and by the results of the present work, where the papillary–luminal and squamous–basal associations are evident.

It is found that comparison of data supports the existence of stable models: papillary/luminal and squamous/basal “axes”, which constitute the backbone of bladder carcinoma classification.

Regarding HER2 expression, it is shown that overexpression is more characteristic of luminal variants of bladder carcinoma—particularly papillary and micropapillary—whereas basal and tumors with divergent differentiation (e.g., sarcomatoid) rarely exhibit it. In the remaining types, 25% of cases show high HER2 expression (3+ by immunohistochemistry) and an additional 22% are 2+ (moderate, unconfirmed expression). Negative (0) cases comprise 31%.

For the p16 (CDKN2A) expression profile—representing a valuable molecular “fingerprint” of each consensus bladder variant—it is established that fundamental differences in tumorigenesis are present. Comparison of specific cases with already published data supports better understanding and potentially provides an opportunity for more precise therapeutic targeting.

On the basis of the obtained results and the skillfully conducted discussion, demonstrating good command of the subject, the following conclusions—considered correctly formulated—are drawn: the work provides a detailed quantitative description of the frequency of different histological subtypes in muscle-invasive bladder carcinoma; it demonstrates a practical approach for consensus molecular classification of muscle-invasive bladder carcinoma through a selected immunohistochemical panel and confirms the reproducibility of this classification; it documents the existence of a hybrid basoluminal category of tumors with a distinct immunophenotype; it establishes the frequency of HER2 overexpression in muscle-invasive bladder carcinoma and its close association with the luminal pathway, with direct clinical significance; it analyzes p16 expression as a marker of RB1 status and demonstrates its value in discriminating variants; and it integrates morphological and molecular data into clear algorithms. This would undoubtedly contribute to improving the diagnosis and treatment of patients with bladder cancer, which is important for practical medical work in this field.

The dissertation enables identification of the following original scientific-theoretical and scientific-practical contributions as presented by the authors: clarification of the morphological spectrum of muscle-invasive bladder carcinoma in a Bulgarian cohort; introduction of an immunohistochemistry-based classification; identification of a basoluminal (double-positive) variant; investigation of HER2 status in invasive bladder carcinoma; analysis of p16 as a marker of RB1 status; comprehensive correlation between histological and molecular characteristics of each tumor; and creation of a local population-based database. This makes the dissertation a significant step toward integrating classical pathology with modern molecular methods.

The main results of the dissertation have been summarized and presented in two scientific publications, peer-reviewed and indexed in PubMed, Web of Science, and Scopus, with SJR Q1 and impact factor. In both publications, Dr. Kraevska is first author; she also participates as co-author in one additional publication. The topic has also been presented in three communications at scientific forums in Bulgaria.

Based on the above, I consider that the dissertation meets all necessary requirements of the Act on the Development of Academic Staff in the Republic of Bulgaria and the regulations of Medical University – Pleven. Therefore, I will vote in favor of awarding the educational and scientific degree “Doctor” (PhD) in the doctoral program “Pathological Anatomy and Cytopathology”, Professional Field 7.1 Medicine, to Dr. Elitsa Petrova Kraevska, and I allow myself to recommend that the other members of the scientific jury also vote positively.

На основание чл.59 от ЗЗЛД

05 Jan 2026

Prof. Dr. V. Belovezhkov, MD, PhD