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 рецензироване 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 научна 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


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 тъкани 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, Болона, 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 рецензирани 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 цитираната – 501 на брой.

Една от най-проблемните агресивни подтипове РМЖ е тройно негативният карцинوم на млечната жлеза. През последното десетилетие той е обект на интензивно изследване в различни аспекти, тъй като засяга предимно млади жени, възможностите за терацевично 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 докт. Поповска е посветен именно на този проблем и в много отношения дискутиран подтип РМЖ. Това е вторият дисертационен труд в страната върху THKCMЖ, и първият, посветен на клинико-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, взаимозависимост с базалоиден карцином, молекулярни субтипове THKГ, отделено е място и за фамилните карциноми на млечната жлеза. Разгледани са определени морфологични субтипове КГ и обуславящите ги генетични мутации: лобуларен, секреторен, адено-кистичен, метапластичен. Подобавано място е отделено на молекулярно-генетичната класификация на Perou и съвт., 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.
Определено 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-свързехексресия, 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 THKГ: 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 цитокератин 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 диференцирана инвазивна дуктална, по-рядко срещани са аденоюкичичен, мукоепидермоиден и метапластичен. Обръща се внимание на характерните биологични и клинични особености на THKГ – 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 съвт. класифицират THKГ в 5 подтипа: базално-подобен 1 и 2, имуномодуляторен 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. Определено е широко място на маркерите за базален фенотип: кавеолин 1, TP53, E и Р-кадхерин, c-Kit, циклини, EGFR, AR.

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

Освен задълбочената информация от съвременнни 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 изложенето. Такъв подход е постижим единствено от задълбочен учени, запознат в детайли с представяния проблем.
Целта на дисертационния труд е проучване на тройно негативния карцином на гърдата (ТНКГ) – неговите клинико-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 клинико-патологичните характеристики на пациентки с ТНКГ и да се сравнят параметрите с тези на kontrolна група от не-тройно негативни карциноми на млечна жлеза; да се сравнат общата преживяемост на пациентите с ТНКГ и kontrolната 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 kontrolна група от IХХ определени субтипове карциноми на гърда; да се проучи имунофенотипа на ТНКГ в зависимост от модели на експресия на базалин и луминални цитокератини, експресия на базаляни биомаркери и маркери за мезенхима и миоепителна диференциация; да се определят характеристиките на ТНКГ по отношение на експресията на тумор суперсърния 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 kontrolната група са добре балансиранi 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-съдов инвазия, лимфно-съдов васкуларитет, лимфоносъдов пълтност 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 свързва напълно с известните данни от литература за тези характеристики на тумора.

Средната обща преживяемост за болниите 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 болниите 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 разполагахме до момента. Очевидно съществуват твърде много непознати механизми за прогресия на заболяването, различни за отделните субтипове КМЖ.

Подчерчаната 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 стromата, което съпровожда с литературните данни. Лимфоцитната инфильтрация, характерна за базалния карцином, се среща в около 10% от изследваните ТНКГ (стомална и интраепителна). Според някои автори тази инфильтрация 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, невроэпидерминни, лобуларен, аденокистичен.
Изложена е и информация за преканцерозните лезии в кохортата на ТНКГ. Всички представени собствени данни на редки морфологични варианти са добре охарактеризирани от изследванияте 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 метасти — 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 редка предиличка за метастазиране – дебело черво и перипаркреасна тъкан, последната съпроводена с механичен иктер. Най-кратка преживяемост имат болни с мозъчни метастизи, както и с плеврални и чернодробни метастизи.
Проучен е имунофенотипа на ТНРГ в зависимост от експресията на цитокератини, базални биомаркери и маркери за мезенхимна и миоепителна 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 TH карциноми. P53 се позитивира при 50.33% от болни с ТНКГ, Циклин E1 в 45.07% от изследваните болни, като е установена статистическа значимост при експресията на двата маркера. Сред ТНКГ превалират 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 прогнозична и предиктивна стойност, като за целта са използвани 18 антитела, 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 ТНКГ“, 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 клинико-морфологичните особености на ТНКГ. Авторът подчертава 11 приноса с научно-теоретичен характер. От най-съществено значение е предложението интегративен, мултидисциплинарен подход в диагностиката, предикциите 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.

Приносят 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 детайлизират практически алгоритъм за морфологична диагностика на ТНКГ.

5. Автореферат на дисертационния труд „Клинико-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 огледен, в табличен вид са представени използваните антитела, както и изследваните биомаркери. Детайлно са представени резултатите от изследването на различните патоморфологични и фенотипни особености на ТНКГ. В графичен вид е представен практически 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 диагнозицират 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, върху което се наблюдава стабилизиране или намаляване на заболяемостта,
свързано с действията възниква в тези страни, както и с ограничаване на приема на хормонални препарати в менопауза.

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

Хетерогенността на заболеването се определя като многообразие от подтипове с определена биологична характеристика, различаващи се по прогноза, агресивност, фамилиност, 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, неразработан системно досега и изключително актуален поради липсата на адекватни таргети и лошите лечебни резултати - ТНКГ. За първи път у нас в детайли е изследван внушителен по обем контингент болни с ТНКГ - тригодишен материал, събрани в УМБАЛ „Г. Страндски“.

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

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 проекти, 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. Докторанът 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 оттоваря 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 дисерация 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.

Всячко 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.