

РЕЦЕНЗИЈА

НА ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА СО НАСЛОВ „КОРЕЛАЦИЈА НА МУТАЦИСКИОТ ПРОФИЛ И МИКРОСАТЕЛИТСКАТА НЕСТАБИЛНОСТ КАКО ПРОГНОСТИЧКИ БИОМАРКЕРИ ЗА КОЛОРЕКТАЛЕН КАРЦИНОМ И НЕГОВИТЕ КЛИНИЧКО-ПАТОЛОШКИ ПАРАМЕТРИ”, ПРИЈАВЕНА НА ФАКУЛТЕТ ЗА МЕДИЦИНСКИ НАУКИ, УНИВЕРЗИТЕТ „ГОЦЕ ДЕЛЧЕВ” – ШТИП

Со Одлука бр. 0206-585/6 донесена на 15.8.2025 год. на 103. седница на Наставно-научниот совет на докторски студии на Кампус 3 на Факултетот за медицински науки при Универзитет „Гоце Делчев” – Штип, формирана е Комисија за оценка и одбрана на докторската дисертација со наслов „Корелација на мутацискиот профил и микросателитската нестабилност како прогностички биомаркери за колоректален карцином и неговите клиничко-патолошки параметри” и на англиски јазик „Correlation of mutational profile and microsatellite instability as prognostic biomarkers for colorectal cancer and its clinico-pathologic parameters“, пријавена и изработена од кандидатката д-р Благица Крстеска, во состав:

- **вонр. проф. д-р Џенгис Јашар**, претседател;
- **проф. д-р Невенка Величкова**, член и интерен ментор;
- **вонр. проф. д-р Магдалена Богдановска-Тодоровска**, член и екстерен ментор;
- **вонр. проф. д-р Вања Филиповски**, член;
- **вонр. проф. д-р Катерина Кубелка-Сабит**, член.

Комисијата во горенаведениот состав го разгледа доставениот материјал и го поднесува следниов

ИЗВЕШТАЈ

1. **Анализа на трудот**

Докторската дисертација која е пријавена и доставена од страна на докторандот д-р Благица Крстеска, специјалист по патолошка анатомија, претставува оригинален труд, кој е во согласност со програмата на третиот циклус на студии на студиската програма: Базични и клинички науки во медицината. Истата е напишана на 126 страници, А4 формат, со вкупно 40 табели, 58 слики и 124 литературни цитати, најголем дел од нив публикувани во последните десет години. Содржината во трудот опфаќа осум поглавја, организирани по следниот редослед: *Вовед, Мотив на истражувањето, Цел на истражувањето, Материјал и методи, Резултати и дискусија, Заклучок и Користена литература*. Во понатамошниот тек од овој извештај е даден краток осврт за секое поглавје од докторската дисертација.

Во воведниот дел од трудот, докторандот д-р Благица Крстеска го објаснува основниот мотив за ова истражување, недвосмислено ги наметнува целите на истражувањето и ја објаснува општествената и научната оправданост за изработка на оваа тема, како и клиничкото значење на резултатите кои произлегуваат од истата. Докторандот д-р Крстеска елоквиентно ги евалуира и цитира досегашните истражувања и публикации поврзани со колоректалниот карцином (КРК), како трета најчеста малигна неоплазма во светот и втора

водечка причина за смрт асоцирана со карцином. Освен на досегашниот литературен преглед поврзан со темата, д-р Крстеска основниот концепт на истражувањето го базира и на своето досегашно професионално искуство и медицина базирана на докази. Имајќи предвид дека КРК по инциденца е на второ место кај жените по карциномот на дојка и на трето место кај мажите по карциномот на простата и белите дробови и истиот има различен молекуларен профил и клиничка прогноза, стадиумот на болеста заедно со останатите прогностички параметри и молекуларните тестирања се од клучна важност за избор на третманот и проценка на ризикот од рецидив на болест. Во овој дел докторандот ги нотира досегашните истражувања и објавени студии кои потврдуваат дека молекуларната патологија на КРК е хетерогена и вклучува генетски и епигенетски абнормалности. Ги опишува и евалуира двете патеки или механизми кои доведуваат до појава на КРК. Првата е APC (*adenomatous polyposis coli*)/ β -catenin патеката, која е активирана во класичната аденом-карцином секвенца. Втората е патеката на микросателитска нестабилност, која е асоцирана со дефекти во гените кои учествуваат во поправка на погрешно спарените бази во ДНК, што доведува до акумулација на мутации во микросателитските региони на геномот. Долгогодишното професионално искуство на д-р Крстеска, како и литературниот преглед, укажуваат дека КРК се третира со мултимодална терапија во прва линија, која вклучува хируршки третман, хемотерапија и радиотерапија. Имајќи предвид дека молекуларните генетски анализи се интегриран дел од планот за третман на КРК, изборот на системска терапија се базира на резултатите од молекуларните тестирања. Така, детекцијата на мутации на KRAS (Kirsten rat sarcoma) и NRAS (Neuroblastoma rat sarcoma) гените е мандаторна при изборот на *anti-EGFR* (*epidermal growth factor receptor*) терапијата, што е доволен и оправдан императив за ова истражување. Од тие причини, д-р Крстеска јасно и недвосмислено ја поставува главната цел на оваа докторска дисертација, а тоа е да се направи корелација на мутацискиот статус на КРК за најчестите мутации на KRAS, NRAS и BRAF (B Rapidly accelerated fibrosarcoma), потоа MMR (Mismatch repair) статусот, експресијата на PD-L1 (Programmed death-ligand 1) и HER2 (Human epidermal growth factor receptor 2) со клиничко-патолошките параметри (возраст, пол, големина на тумор, локализација на тумор, градус, лимфо-васкуларна инвазија, pT категорија, pN категорија, стадиум на болест) во прилог на негово рано дијагностицирање и подобар персонализиран третман на болеста.

Во делот **Материјал и методи** докторандот го објаснува дизајнот на студијата, во кој наведува дека станува збор за ретроспективно-проспективна студија која е изработена на одделот Лабораторија за хистопатологија и цитологија во Клиничка болница „Аџибадем Систина“. Студијата е во согласност со Правилникот на Комитетот за етички прашања при Факултетот за медицински науки во Штип и со Законот за заштита на личните податоци. Обработени се ткивни примероци од претходно обработен оперативен материјал од 152 пациенти со дијагностициран КРК. Од архивскиот материјал, одбрани се репрезентативни примероци од туморското ткиво за молекуларна анализа. Во хистопатолошките наоди, каде што се прецизирани полот и возраста на пациентите, направен е макроскопски опис на оперативниот материјал кој вклучува димензии на ресектатот, големина на туморот и негова локализација во однос на ресекционите маргини, останати и друг тип на лезии и број на

изолирани лимфни јазли. Микроскопскиот дел од извештајот вклучува: хистолошки тип на туморот, степенот на хистолошка диференцијација, нуклераниот градус, длабочината на туморската инвазија, лимфатична и венска инвазија и број на регионални лимфни јазли со присутни метастази. Стадиумот на болеста се одредува согласно со критериумите на TNM (Tumor, Node, Metastasis) класификацијата од UICC (*Union for International Cancer Control*). Пресеците од туморското ткиво се обработени во автоматизиран систем за имунохистохемија *Ventana BenchMark Ultra*. Користени се антитела од панелот за КРК. На парафинските пресеци од репрезентативно туморско ткиво се одредуваа мутации во Cobas z 480 апарат за автоматизирана амплификација и детекција на нуклеински киселини. Се користеа следните тестови по процедура од производителот: cobas KRAS Mutation test и NRAS/BRAF Mutation Test.

Во поглавјето **Резултати** д-р Крстеска систематски ги презентира резултатите од истражувањето сумирајќи ги најпрво според поставените и однапред утврдени цели на трудот. Анализирани се ткивни материјали од 152 пациенти со дијагностициран КРК, од кои 98 (64,47%) се машки, а 54 (35,53%) женски. Пациентите се на возраст од 34 до 89 години, просечната возраст е $68,4 \pm 11,3$ години, доминирале пациенти постари од 50 години, 137 (90,13%). Најголем број од случаите се со умерено диференирани аденокарциноми 75,66%. Анализата на колоректалните карциноми во однос на стадиумот на болеста потврдува дека дијагностицираните пациенти се најчесто во стадиум IIIВ (35,53%). Лимфатична инвазија најдена е кај 86,84% од туморите и венска инвазија кај 63,82% од туморите.

KRAS/NRAS мутации беа детектирани кај 47 (30,92%) пациенти, BRAF мутации кај 11 (7,24%) пациенти, додека dMMR (deficient mismatch repair) статусот, како сурогат маркер за микросателитска нестабилност, е утврден кај 15 (9,87%) пациенти. KRAS/NRAS мутациите не беа сигнификантно асоцирани со полот ($p=0,4$) и возраста ($p=0,83$).

Просечната возраст на KRAS/NRAS позитивните пациенти беше $66,7 \pm 10,6$ години, KRAS/NRAS негативните пациенти беа на просечна возраст од $68,0 \pm 12,1$ години, без статистичка сигнификантна разлика меѓу двете групи ($p=0,55$)

Метастази во регионалните лимфни јазли беа откриени кај 99 (65,13%) пациенти, 33 (70,21%) со KRAS/NRAS мутации, 66 (62,86%) пациенти без мутации, при што оваа разлика не била статистички сигнификантна. Пациентите од двете групи најчесто и подеднакво имале тумор дијагностициран со N1c категорија (21,28%), а потоа со N2b категорија (19,15% vs 17,14%). Далечни метастази имале 3 (6,38%) KRAS/NRAS позитивни и 9 (8,57%) KRAS/NRAS негативни пациенти, без статистички сигнификантна разлика. Сите пациенти со далечни метастази имале тумор во M1 категорија (4,26% и 4,76% соодветно, пациенти со и без KRAS/NRAS мутации во M1a; 2,13% и 3,81% соодветно, пациенти со и без KRAS/NRAS мутации во M1c категорија.

BRAF мутациите не биле сигнификантно асоцирани со полот ($p=0,475$) и возраста на пациентите ($p=1,0$). Машките пациенти биле застапени со 54,55% и 65,25%, соодветно во групите со и без мутации, женските со 45,45% и 34,75%, соодветно во групите со и без мутации. Просечната возраст на пациентите со BRAF мутации е $72,1 \pm 12,7$ години. Пациентите без мутации се

на просечна возраст од $68,5 \pm 11,3$ години; статистички несигнификантна беше разликата во просечната возраст на пациентите со/без BRAF мутации ($p=0,32$). BRAF мутацискиот статус беше сигнификантно асоциран со деснострани локализација на туморот ($p=0,01$), при тоа 54,55% пациенти со мутации, а 20,71% без мутации имале тумор во десниот колон; 45,45% пациенти со BRAF мутации и 79,29% без мутации имале тумор со локализација во левиот колон. BRAF мутациите биле сигнификантно асоцирани со повисок стадиум на болеста ($p=0,034$). Во групата без BRAF мутации туморот најчесто бил дијагностициран во стадиум IIIB (36,17%), следено со тумор во IIA стадиум (24,82%). Во поединечните компарации на стадиумите, како статистички сигнификантна се потврди почестата застапеност на тумори во IIA стадиум кај пациенти без BRAF мутации (24,82% vs 0%, $p=0,049$), и почестата застапеност на тумори во IVC стадиум кај пациентите со мутации (27,27% vs 2,13%, $p<0,0001$).

MMR статусот не бил сигнификантно асоциран со полот ($p=0,85$) и возраста на пациентите ($p=0,17$). Гранична статистичка сигнификантност беше најдена во различната дистрибуција на тумори со градус 1, 2 и 3, во зависност од MMR статусот ($p=0,054$). Умерено и лошо диференцираните тумори беа застапени со 53,33% и 46,67% соодветно, во групата dMMR тумори; додека со 78,1% и 18,25% соодветно, во групата pMMR тумори. MMR статусот е сигнификантно асоциран со локализација на туморот на десната страна ($p=0,00037$); кај 60% dMMR тумори и 19,12% pMMR тумори беше дијагностициран тумор на десната страна на колонот.

HER2 експресијата е најдена кај 36 односно 40% од метастатските случаи, додека PD-L1 експресијата е потврдена кај 17 (11,18%) пациенти, односно 19% од метастатските случаи. Просечната возраст на HER2 позитивни пациенти е $69,1 \pm 12,8$ години, HER2 негативните пациенти се на просечна возраст од $67,4 \pm 10,3$ години, без статистичка сигнификантна разлика меѓу двете групи ($p=0,47$). Не постои статистичка сигнификантна асоцијација меѓу HER2 статусот со лимфатични емболуси ($p=0,27$) и емболуси во венските крвни садови ($p=0,76$). PD-L1 експресијата не е сигнификантно асоцирана со полот ($p=0,38$) и возраста на пациентите ($p=0,64$). Просечната возраст на PD-L1 позитивните пациенти е $68,7 \pm 11,9$ години, PD-L1 негативните пациенти беа на просечна возраст од $67,9 \pm 11,3$ години; статистички несигнификантна беше разликата во просечната возраст на пациентите со/без PD-L1 експресија ($p=0,8$).

Во поглавјето *Дискусија*, кое се надоврзува на резултатите во докторската дисертација, докторандот симплифицирано и во континуитет ги компарира добиените резултати и заклучоци со досегашните публикувани студии на оваа тема, споредувајќи ги детално. Во последното поглавје *Заклучоци* детално се презентирани и сумирани сите елементи на истражувањето, согласно со поставените и детерминирани цели и претходно нотирани резултати од студијата. На крајот во поглавјето *Литература* следуваат библиографските податоци или референци, најголем дел од нив публикувани во последните десетина година.

2. Научен придонес

Врз база на статистички обработените и прикажани резултати од

истражувањето во оваа докторска дисертација може да го истакне следниот научен придонес и препораки кои се резултат на претходно споменатите заклучоци од студијата: КРК најчесто се дијагностицира во напреднат стадиум ППВ, односно метастатски КРК. Истиот има лоши прогностички параметри како лимфоваскуларна инвазија и висок градус. КРК е со доминантна локализација во левиот колон, најчесто во ректумот со висока фреквенција на KRAS/NRAS мутации. Овие KRAS мутации немаат сигнификантна корелација со стадиумот на болеста и Т, N, M категориите, ниту со градусот на туморот и лимфоваскуларната инвазија. Најголем дел од KRAS мутациите се потврдени кај тумори со локализација во левиот колон, додека BRAF мутациите покажаа сигнификантна корелација со локализација во десниот колон. Сигнификантна корелација со локализацијата на туморот во десниот колон покажаа и туморите со dMMR статус. BRAF мутациите сигнификантно корелираат со висока Т категорија на туморот, односно подлабока инвазија во сидот, како и со повисок градус G3 на туморот и повисок стадиум на болеста III или IV. BRAF мутациите немаат сигнификантна корелација со N, M категоријата на туморот и лимфоваскуларната инвазија. Позитивна експресија на HER2 нема сигнификантна корелација со Т, N, M категориите, градусот и лимфоваскуларната инвазија, како и BRAF мутациите и MMR статусот. Експресијата на HER2 е поврзана со локализација во левиот колон и KRAS мутации. Позитивна експресија на PD-L1 нема сигнификантна корелација со Т, N, M категориите, градусот и лимфоваскуларната инвазија, како и KRAS мутациите и MMR статусот. PD-L1 експресија над 50% е поврзана со локализација на туморот на десната страна, висок туморски градус и присуство на BRAF мутации. Оригиналниот придонес од оваа докторска дисертација е во прилог на потребата од рефлексно тестирање на:

- сите колоректални карциноми за одредување на MMR/MSI статусот;
- KRAS/NRAS и BRAF мутации кај метастатските случаи;
- HER2 експресија кај нересектибилните случаи.

Докторската дисертација е работена според Правилникот на трет циклус студии и во неа постои конзистентност на деловите во рамките на целиот труд. Добиените резултати статистички се обработени и презентирани на ефективен, концизен и разбирлив начин. Заклучоците се конкретни и самите по себе можат да бидат мотив за понатамошни истражувања и претклинички и клинички студии.

3. Исполнетост на законските услови за одбрана на докторатот

Кандидатката д-р Крстеска пред одбраната на докторската дисертација ги објавила следниве рецензирани научни трудови:

1. Krsteska, Blagica and Filipovski, Vanja and Kubelka-Sabit, Katerina and Jasar, Dzensis and Velickova, Nevenka (2025) [*Influence of Covid 19 on the diagnosis of colorectal cancer at clinical hospital Acibadem-Sistina in Skopje-study of 264 cases.*](#) Medicus, 30 (1). pp. 60-63. ISSN 1409-6366

2. Krsteska, Blagica and Filipovski, Vanja and Kubelka-Sabit, Katerina and Jasar, Dzensis and Bogdanovska Todorovska, Magdalena and Velickova, Nevenka (2025) [*Braf mutation in colorectal carcinoma is associated with tumor depth, location, grade and pd-l1 expression: single center experience.*](#) Academic Medical Journal, 5 (1). pp. 10-17. ISSN 2671-3853

3. Krsteska, Blagica and Filipovski, Vanja and Kubelka-Sabit, Katerina and Jasar, Dzensis and Bogdanovska Todorovska, Magdalena and Velickova, Nevenka (2024) [*PD-L1 expression in metastatic colorectal carcinoma*](#). *Archive of Oncology*, 30 (1S). p. 30. ISSN 0354-7310 eISSN: 1450-9520

4. Krsteska, Blagica and Filipovski, Vanja and Kubelka-Sabit, Katerina and Jasar, Dzensis and Bogdanovska Todorovska, Magdalena and Velickova, Nevenka (2025) [*Expression of HER2 and PD-L-1 in colorectal carcinoma-single center analysis*](#). *International Journal Knowledge*, 68 (4). pp. 373-378. ISSN 1857-923X

ЗАКЛУЧОК И ПРЕДЛОГ

Комисијата за оценка и одбрана детално ја разгледа докторската дисертација со наслов „**Корелација на мутацискиот профил и микросателитската нестабилност како прогностички биомаркери за колоректален карцином и неговите клиничко-патолошки параметри**“ и на англиски јазик „**Correlation of mutational profile and microsatellite instability as prognostic biomarkers for colorectal cancer and its clinicopathological parameters**“ и донесе заклучок дека истата претставува оригинален, самостоен, прецизно дефиниран и јасно оформен научен труд со систематски разработена проблематика и оригинални резултати. Докторската дисертација врз основа на содржината, обемот и постигнатото ниво на квалитет ги исполнува условите потребни за понатамошна нејзина презентација и одбрана. Врз основа на тоа, Комисијата има чест да му предложи на Наставно-научниот совет на докторски студии на Кампус 3 да ја прифати позитивната рецензија на докторската дисертација со наслов „**Корелација на мутацискиот профил и микросателитската нестабилност како прогностички биомаркери за колоректален карцином и неговите клиничко-патолошки параметри**“, пријавена и изработена од докторандот д-р Благица Крстеска и да одобри јавна одбрана на истата.

РЕЦЕНЗЕНТСКА КОМИСИЈА

Вонр. проф. д-р Џенгис Јашар, претседател, Факултет за медицински науки, Универзитет „Гоце Делчев“ – Штип, с.р.

Проф. д-р Невенка Величкова, член и интересен ментор, Факултет за медицински науки, Универзитет „Гоце Делчев“ – Штип, с.р.

Вонр. проф. д-р Магдалена Богдановска-Тодоровска, член и екстерен ментор, Медицински факултет, Универзитет „Св. Кирил и Методиј“ – Скопје, с.р.

Вонр. проф. д-р Вања Филиповски, член, Факултет за медицински науки, Универзитет „Гоце Делчев“ – Штип, с.р.

Вонр. проф. д-р Катерина Кубелка-Сабит, член, Факултет за медицински науки, Универзитет „Гоце Делчев“ – Штип, с.р.