**РЕЦЕНЗИЯ**

**от доц. д-р ЕКАТЕРИНА БОЯНОВА СОФТОВА-ЗЛАТАРОВА, дм,**

**специалност „Патоанатомия и цитопатология“; МЦ „Сити Лаб“ -ЕООД**

**гр. Варна**

**ОТНОСНО:** Защита на дисертационен труд по процедура за присъждане на образователна и научна степен **„ДОКТОР“** в област на висше образование 7. Здравеопазване и спорт, професионално направление 7.1. Медицина, по научната специалност „Патологоанатомия и цитопатология“, шифър 03.01.03

НА ТЕМА: **„ ЕКСПРЕСИЯ НА ТРАНСКРИПЦИОНЕН ФАКТОР ZBTB20 В ГЛИАЛНИ ТУМОРИ НА ЦЕНТРАЛНАТА НЕРВНА СИСТЕМА“**

**на д-р Деян Людмилов Дженков, докторант на самостоятелна подготовка**

**към Катедра по „Обща и клинична патология, съдебна медицина и деонтология“,**

**Факултет „Медицина“ при Медицински Университет- гр. Варна**

С решение от заседание на ФС на Факултет „Медицина“ при МУ-Варна по протокол № 16/10.12.2018 г. и със заповед № Р-109-665/18.12.2018г. на Ректора на МУ-Варна , съм избрана за външен член на Научното жури, а на основание Протокол № 1/12.02.2019 г. съм определена за официален рецензент по процедура за придобиване на образователна и научна степен „*Доктор“* с кандидат д-р Деян Людмилов Дженков в МУ-Варна.

За конкурса кандидатът е представил на хартиен и електронен носител комплект от материали, включващи всички необходими документи в съответствие с изискванията на ЗРАСРБ, Правилника за приложението му и ПРАС в МУ-Варна, както и копия от публикации по темата на дисертацията.

**Кратки биографични данни и професионално развитие на докторанта**

Д-р Деян Людмилов Дженков е роден 31.03.1973 год. в гр. Добрич. Завършва средното си образование през 1991 год. в Природо-математическата гимназия „Св. Климент Охридски“ в гр. Силистра с основен профил биология. През 1992 год. е приет за студент в Тракийски Университет, МФ- гр. Стара Загора, където през 1999 год. придобива образователно-квалификационна степен „магистър“ по специалността медицина.

След завършване на университетското си обучение, през периода 10.12.1999 - 20.03.2006 год. д-р Дженков работи като лекар- ординатор в отделение по Патоанатомия при МБАЛ „Силистра“ АД. От 21.03.2006 год. до настоящия момент работи в Клиника по Обща и клинична патология при УМБАЛ „Св. Марина“-Варна като ординатор- патоанатом ,и като асистент в Катедрата по Обща и клинична патология, съдебна медицина и деонтология при МУ-Варна. През периода 2010-2014 год. е бил курсов ръководител, а от 2014год. e административен асистент в Катедрата. Д-р Дженков придобива специалност по Обща и клинична патология през м януари 2008 год. От м. април 2016 год. е зачислен като докторант за самостоятелна форма на обучение, като на 18.12.2018 г. е отчислен с право на защита. Д-р Дженков има над 10 години трудов стаж като асистeнт-преподавател по специалността „Обща и клинична патология“. Участва активно в преподаването на дисциплината на българските и чуждестранни студенти от специалностите „Медицина“, „Дентална медицина“ и „Фармация“, на студентите от специалностите „Медицински сестри“ и „Акушерки“, и на обучаващите се в Медицински колеж към МУ-Варна медицински лаборанти и фармацевти.

Д-р Дженков има завършени със сертификат участия в 5 курса, вкл. за обучител от Експертен курс за диагностика и скориране на NSCLC през 2017 год., и патология на уротелните карциноми- 2018 в гр. Касел, Германия; от Интернационално училище по проблемите на мозъчните неоплазми, 2013 / ЕАССМЕ /, в Правец, България; от Европейско училище по патология на уринарния тракт и мъжка полова система през 2018 год, Варна, и от курс за диагностика на HER2 DISH- тест при карцином на гърдата и стомах, 2018 год, Варна . Дисертантът има участие в 15 научни статии, 3 от които са по темата на дисертацията му. С научни доклади, постери и презентации д-р Дженков е участвал в редица национални, и с международно участие прояви. Професионалните му и научни интереси са в областта на невропатологията, молекулярната биология и патологията на мъжкия уро-генитален тракт.

Д-р Дженков владее на много добро ниво английски език и има изключително добра компютърна грамотност; членува в БЛС и Българското научно дружество по патология .

**Актуалност и значимост на темата**

Дисертационният труд на д-р Дженков е успешен опит за първи път в България да бъде извършено едно системно и задълбочено проучване, посветено на глиомите –представляващи 80% от първичните злокачествени мозъчни тумори, които имат все още ненапълно изяснен клетъчен произход, разнообразна генна характеристика, морфологични прояви и биологично поведение. Сред тях с най-лоша прогноза се очертава мултиформеният глиобластом, който, макар и не често срещан,тумор, създава сериозни терапевтични проблеми поради факта, че обикновено води до инвалидизация на пациентите и до летален изход. Пет- годишната преживяемост при МГБ е ниска / запазва се около 5%/, независимо от непрестанния напредък в медицинската наука. Все още недостатъчно проучените въпроси, свързани с морфологичната диагностика и лечението на глиалните тумори, както и противоречивите данни от литературата, отнасящи се до корелацията между резултатите от различни ИХХ-изследвания, молекулярния статус на тумора и прогностично/ предиктивните му параметри, извеждат на преден план необходимостта от провеждане на системно проучване, и определят до голяма степен актуалността и практическата значимост на проблемите, свързани с глиалните тумори, на които д-р Дженков е посветил дисертационния си труд. Насочвайки вниманието си към изучаване на връзката между морфологичната находка и биологичните особености на тези тумори, дисертантът си поставя за цел да търси фактори, които биха оказали влияние най-вече върху пролиферативната клетъчна активност, туморната прогресия и преживяемостта на пациентите. Навлизането на молекулярно-генетичните методи на изследване и на биомаркери, помагащи за изясняване туморната патология на глиомите, допринасят за разкриване на нови възможности относно изясняване пътищата на канцерогенеза, диагностика и идентификация на молекулярни туморни сигнатури, имащи решаваща роля при определяне на прогностичните и предиктивни туморни характеристики, налагащи комплексен индивидуален подход с възможност за по-широка достъпност и прилагане на адекватна прицелна терапия за лечението на мозъчните неоплазми.

Понастоящем много нови молекули , участващи в процесите на клетъчна пролиферация, инвазия и неоангиогенеза са обект на засилен интерес, насочен и към мозъчните тумори. В този аспект внимание заслужават проучванията на гените от фамилията ZBTB, които кодират транскрипционни фактори, и играят важна роля в регулирането на тъканното развитие на определени злокачествени тумори. Член на фамилията, ZBTB20 функционира като транскрипционен репресор и се експресира в прогениторни клетки от нормална мозъчна тъкан и в глиоми. Установено е, че подтискане експресията на този ген влияе негативно върху пролиферацията и миграцията на туморните клетки и забавя прогресията на глиобластомите.

Използваният от д-р Дженков достатъчен по обем материал, приложението на адекватни, добре подбрани методики, и липсата на достатъчни морфологични проучвания за ролята на ZBTB20 гена в проявите и развитието на глиалните тумори / обект на настоящето проучване / е достатъчно убедителен аргумент, обуславящ необходимостта от системен и обоснован анализ, отнасящ се до експресията на ZBTB20 при тези тумори, който анализ би позволил да се изведат съществени изводи, касаещи биологичното поведение и прогресия в развитието на глиомите.

**Структура на дисертационния труд**

Дисертационният труд на д-р Дженков е правилно структуриран, с издържан научен стил и терминология; изграден е върху материал и методики с висока степен на достоверност, при спазване на изискуемите пропорции. Дисертацията е написана на 122 стр. и е богато илюстрирана с 46 цветни фигури и 5 таблици. Разпределението по раздели е както следва: титулна страница, съдържание и използвани съкращения-5 стр.; въведение 3 стр.; литературен обзор 35 стр.; цел и задачи 1 стр.; материал и методи 11 стр.; резултати – 37 стр.; обсъждане 6 стр.; заключение-1 стр.; изводи и приноси 2 стр.; списък с публикации и участия в научни форуми- 1 стр.; библиография 20 стр., включва общо 144 източника, от тях 62 /43,05%/ са публикувани през последните 5 години, а общо 101 /70,1%/ - през последните 10 години. Към дисертационния труд има приложени 3 публикации в пълен текст, свързани с разработваната тема, и три участия в научни конференции с отпечатани резюмета.

**Оценка на литературния обзор**

Представеният литературен обзор е структуриран в 8 глави, отнасящи се до: общите принципи в морфологията на НС и концепция за стволовите клетки в мозъка; исторически данни за глиалните тумори; епидемиология и рискови фактори при мултиформен глиобластом; имунофенотипна диагностика на глиалните тумори; особено внимание е обърнато на молекулярната патология на мултиформения глиобластом/ МГБ /, вкл. и на генетичните мутации с изяснена роля в процесите на онкогенеза при този тумор, и на епигенетичните фактори, играещи роля в онкогенезата му; подробно са разгледани прогностичните и предиктивни фактори при диагностиката, като възраст, пролиферативен индекс, туморна ангиогенеза, наличие на некрози; натрупване на мутации, размер, локация на първичното огнище и радикалност на резекцията; функционална увреденост на пациента и др. Специално внимание д-р Дженков обръща на въпроса за генотипната класификация на МГБ, изработването на която цели оптимизиране на лечебния процес и възможността за избор на най-ефективен лечебен подход при наличие на определени мутации в туморния генотип. Като утвърдени и най-подходящи за диагностиката и практиката се посочват модели за генетично класифициране, включващи мутации, засягащи EGFR, PTEN, PI3K, p53 и NF1 кодиращите гени. Седем страници от обзора са посветени на съвременната интегрирана класификация на глиомите по СЗО 2016 год. Тук авторът прави описание на принципите в изграждането на 4-те класа със съответна нарастваща малигненост от 1-4 в класификацията от 2007 год. Описани са включените в ревизията от 2016 год на IV-та класификация от 2007 год, глиоми и някои техни подтипове, като авторът спира вниманието си на основните промени, касаещи дифузните глиоми, за диагностиката на които се използват три молекулярно-генетични маркера, а именно: 1р/19q, IDH /IDH1/2/ и ATRX- мутация. Много подробно д-р Дженков се спира на описанието и подразделението в класификацията на дифузните астроцитни и олигодендроцитни тумори.

Един от разделите в литературния обзор е посветен на биологичната роля на гените от фамилията ZBTB и значението им за развитието на туморните процеси, чрез участие в регулация на транскрипцията, клетъчната пролиферация и морфогенеза, апоптоза и протеинна деградация посредством убиквити-протеозомната система. Отбелязва се,че ZBTB протеините имат потенциална роля в регулиране на клетъчния цикъл и сигналния път на р53 при определени злокачествени тумори.

Като член от фамилията, **ZBTB20 генът** нормално се експресира в прогениторни клетки на хипокампа и е от ключово значение за развитието му. Отбелязана е позитивната регулация на ZBTB20 върху EGFR-експресията с участие в хепатоцитната пролиферация при чернодробна регенерация в условията на експеримент. ZBTB20 е специфичен транскрипционен репресор на гена алфа-фетопротеин; повишената му експресия влошава прогнозата при хепатоцелуларен карцином. Понастоящем се смята, че съществува възможност непротеин- кодиращи малки молекули чрез подтискане експресията на ZBTB20 да възпрепятстват пролиферацията и миграцията на туморните клетки, и да забавят прогресията на глиобластомите.

От представения литературен обзор проличава много добрата осведоменост на дисертанта при запознаването с постиженията в световната наука, отнасящи се до превенцията, диагностиката, прогнозата и лечението на глиалните тумори. Това му дава възможност за правилна оценка на въпроси, отнасящи се до класификационни проблеми, морфологията, биологичното поведение, имунохистохимичния и молекулярно-генетичен профил на глиомите.

Обзорът завършва с 5 извода от литературната справка , от които най-голямо внимание заслужава последният, в който отбелязаното участие на транскрипционният фактор ZBTB20 в различни неоплазии извън нервната система, и експресирането му в мозъка в прогенитори, локализирани в субвентрикуларната зона е достатъчно убедителен аргумент в полза на съществуваща вероятност ZBTB20 гена да се експресира в глиоми. Това безспорно е основание и дава категорична подкрепа за провеждане от д-р Дженков на изследване в тази насока. В краткото заключение дисертантът отново подчертава факта, че липсата на сериозен напредък през годините в ранната диагностика и лечението на глиомите налага необходимостта от продължаване на проучванията в тази област. Откриването на нови сигнални пътища при туморната прогресия и разширяване на възможностите за прилагане на комплексни клинични, морфологични др. показатели, могат да доведат до реална възможност за провеждане на антитуморна терапия и подобряване на прогнозата при пациенти с този вид тумори.

**Цел и задачи**

Целта на дисертационния труд „ **Да се определи експресията на транскрипционния фактор ZBTB20 в различни глиални тумори, и да се оцени връзката му с преживяемостта и корелацията му с известни прогностични фактори“** е точно и ясно формулирана, конкретна и адекватна на дисертационната тема. Тя, и произтичащите от нея 4 задачи са правилно конструирани и изпълними и представляват логично продължение на литературния обзор, което дава възможност направените изводи от научната разработка да имат практическо приложение. **Задачите включват**: определяне относителния дял, честота и демографските характеристики на глиалните тумори при пациенти, оперирани за интракраниални лезии; извършване на морфологична диагностика на глиалните тумори и в частност на МГБ; оценка на експресията на транскрипционния фактор ZBTB20 в различни по степен на диференциация глиални тумори и околната мозъчна тъкан; оценка на връзката между експресията на гена с преживяемостта и корелацията му с известни прогностични фактори като Кi67.

**Материал и методи на изследване**

За целите на разработвания дисертационния труд е използван достатъчен по обем материал, необходим за статистическа обработка на данните и определяне на тяхната достоверност. Предметът, обектите и признаците на изследването са подбрани адекватно. В дисертацията обект на проучването са пациенти, разпределени в 2 групи: I гр. Изследване на биопсични материали от 97 пациента с първични мозъчни тумори, оперирани в Клиниката по неврохирургия при УМБАЛ „Св.Марина“-Варна; II гр.- 822 пациента с интракраниални лезии, оперирани в неврохирургичните звена на УМБАЛ „Св. Марина“ и МБАЛ „Св.Анна“- Варна за период от 01.01.2012- 31.12.2016 год., на които е извършен само статистически анализ.

Материалната база за реализиране на дисертационния труд включва: 1. Базата на Катедра по Обща и клинична патология, съдебна медицина и деонтология при МУ- Варна, и 2.Информация от електронната база данни „Multi Lab“ на УМБАЛ „Св. Марина“ - Варна

В разработката дисертантът е подбрал и включил голям набор от адекватни за целите на изследването методи- рутинни хистологични / с определяне на голям брой характеристики/, и специфични, имунохистохимични методи на изследване, при които са използвани 4 антитела / ZBTB20, CK AE1/AЕ3; GRAF, Ki67/. При провеждането на ИХХ- реакциите са спазени всички елементи на методиката, вкл. технологична дисциплина, описание локализация на експресията /ядрена, мембранна, цитоплазмена /, и др., като критериите за позитивност са точно формулирани при отчитане на резултатите. Подробно са описани стъпките в подготовката на биопсичните материали за ИХХ- изследване, имунохистохимичния протокол, произхода на използваните антитела и визуализиращата система.

Отчитането на експресията на ZBTB20 и Ki67 е осъществено при сканиране на препаратите с апарат Leica Aperio Scan Scope AT2 devise /Aperio Technologies, Vista, CA/ с последващи анализи на образите със софтуер Image Scope V12.1.0.5029. Изследвани са туморни полета с висока целуларност на увеличение х200 за всеки отделен случай. Анализ на ИХХ- маркери е направен посредством софтуер с отворен достъп Tmarker. ИХХ- експресия на ZBTB20 за всички клетки и на Ki67 за туморни клетки е оценявана полуколичествено процентно в туморната тъкан. Като втори метод за отчитане интензивността на експресията на ZBTB20, е използван модифициран Н-score /histo score/върху тъканни проби, като интензивността на оцветяване е определяна в четиристепенна скала /0, 1+,2+, 3+ /. На финала H-score е изчислен по формула, в която тежестта на всяка група нараства с увеличаване интензивността на експресията. Крайният H- score е дихотомно разделен на ниска и висока експресия според медианата на пробите, като за граница е приета стойност, при която има максимална разлика в преживяемостта на двете подгрупи, близка до медианата.

Получените резултати са обработени чрез богат набор от статистически методи за анализ на данните- дескриптивен и корелационен анализ- чрез непараметричен тест на Spearman, анализ на преживяемостта- Logrank / Mantel-Cox тест / и Gehan-Breslow-Wilcoxon тест и сравнителен анализ / оценка на хипотези /- непараметричен тест наMann-Whitney.

Статистическият анализ е осъществен чрез програмен продукт Microsoft Exel 2016 и статистическа програма GraphPad Prism 7.03 за Microsoft Windows. При всички проведени анализи за допустимо ниво на значимост се приема р< 0,05 при доверителен интервал 95.

**Резултати и обсъждане**

Резултатите от проведеното в дисертационната разработка изследване са най-значителната част от труда и демонстрират задълбоченост и опит за максимална обективност на автора. Представени са в 4 основни групи, като при описанието им е спазена последователността на поставените задачи, а на места интерпретацията им се осъществява паралелно с описанието. Анализът на резултатите е проведен на много добро методично ниво, което е позволило на д-р Дженков да направи значими по своята същност изводи и заключения. В обсъждането им д-р Дженков аргументирано излага съвременните научни познания по разглежданите въпроси, придружени от съответно тълкуване. Резултати са онагледени в изключително прегледен и добре оформен табличен вид и качествени цветни фигури.

Обединените в групи получените резултати се отнасят до: 1. Проследяване честотата и демографската характеристика на лезиите в ЦНС. 2.Морфологичната диагностика на мултиформения глиобластом и предизвикателствата, свързани с мимикрия за епителни маркери / в частност СК АЕ1/АЕ3 /.3. Клинико-морфологични характеристики на изследваните пациенти с глиоми. 4. Оценка на експресията на прогностични фактори, и оценка на преживяемостта на пациентите според комбинация от две алтернативни стойности на ZBTB20 и Кi67.

По т.1. Разпределението на интракраниалните лезии при оперираните общо 822 пациента в МБАЛ „Св.Анна“ и УМБАЛ „Св.Марина“-Варна показва безспорно предимство на първичните мозъчни тумори /66,18%/, следвани от метастатичните/30,90%/ и НТОЗП -2,92%. Сред всички първичните интракраниални мозъчни тумори първото място се отрежда на менингеомите 39,15%%, а вторият по честота ИКТ е МГБ / 33,64%/- тумор, който е начело в класацията при разпределението само на глиалните тумори – 73,49%.

Сред метастатичните тумори първо място заемат метастазите от карцином на белия дроб, като 84,87% са от недребноклетъчен и 15,13%- от дребноклетъчен карцином. Авторът прави много подробно таблично описание на разпределението и честотата на всички интракраниални метастази, както и на средната възраст и съотношението м/ж при най-често наблюдаваните, вкл. метастатичните ИКТ. Отбелязва се, че годишната честота на 100 000 души на всички ИКТ е 9,12 / съотв. 6,03 за първичните, 2,82 метастатични и 0,27 за НТОПЗ/.

Съществен принос в този раздел от дисертацията представляват новите за страната данни, в които за 5-год. период, към разпределението на туморите освен по пол, възраст и локализация, авторът прибавя и степента на диференциация и хистологичния им вид.

По т. 2. Имайки предвид собствен опит и наблюдения относно наличието на мимикрия на епителни маркери /СК АЕ1/АЕ3 /, особен интерес и значимост за диагностиката представляват резултатите, получени от д-р Дженков при анализ на подбрани 10 случая на МГБ от групата на оперираните в УМБАЛ „Св.Марина“ пациенти, в търсенето на корелация при тестване спрямо GFAP и AE1/AE3. Данните от изследването показват различна по интензитет експресия на АЕ1/АЕ3 в глиалните туморни клетки на 8 от случаите, откроявайки се в три от тях с висока интензивност, която извън контекста на GFAP би се приела за диагностично значима. Дисертантът прави заключението, че панцитокератиновият маркер АЕ1/АЕ3 не трябва да се използва за отдиференциране на метастатични епителни, от първични мозъчни тумори, тъй като в случаи на доказан първичен карцином / напр. белодробен / ползването само на този маркер основателно би довело до погрешно заключение,а това е още едно доказателство за необходимостта от прилагането на комплексен ИХХ-панел при диагностиката на туморите.

По т. 3.При описание на клинико-морфологичните характеристики на изследваните пациенти с глиоми, като средна възраст на засегнатите от тумора се посочва 58,82 год. - най-младият е бил на 7,6 год., а най-възрастният- на 87,2 год. По отн. на половото разпределение се установява, че мъжете са засегнати в по-голяма степен- средна възраст за мъже 57,5 и за жени- 60,5 год- резултати, не различаващи се съществено от установените в литературата.

Проследявайки факторите, влияещи върху преживяемостта на болни с глиоми, д-р Дженков не установява зависимост м/у пол и обща преживяемост на пациентите, както и липсва статистически значима разлика в общата преживяемост м/у мъже и жени, и така също между пол и обща преживяемост само на пациентите с МГБ. Медианата на преживяемостта при изследваните 94 пациента е близо 7 месеца / 197,5 дни /- резултат, потвърждаващ неблагопрятното развитие и изход при този вид неоплазии. Що се касае обаче до сравнение на случаите с нискостепенни глиоми / II ст. по СЗО / и високостепенни глиоми /III и IV ст. / по отн. на общата преживяемост, д-р Дженков установява статистически значима разлика р= 0,0063; p< 0,01- резултат, недвусмислено показващ прогностичната роля на степента на туморна диференциация.

Резултатите, получени при сравняване на случаи с МГБ и неглиобластомни тумори / WHO gr= II, III / спрямо общата им преживяемост показват изразена статистически значимост / p< 0,0001 Gehan-Breslow-Wilcoxon test /, и също потвърждават изключително агресивния характер и лошата прогноза при МГБ. / медиана с МГБ -164 дни, с/у 686 дни при неглиобластомните тумори /.

По т. 4. Специално внимание в дисертацията си д-р Дженков е отделил на оценката на експресия на прогностичните фактори, отговорни за преживяемостта на болни с глиални тумори. Дисертантът първоначално се спира на експресията на пряко свързания с пролиферацията на туморните клетки ядрен маркер Ki67, стойностите на чиито вариации нарастват с увеличаване степента на малигненост в групите. При статистическата обработка на 75 случая според процента на пролиферативния им индекс, авторът установява липса на нормално разпределение на групата с преобладаване на пациентите до 40% пролиферативен индекс и средна стойност 20,1%. Резултатите потвърждават разнообразието му, установено от други проучвания при глиомите.

Направеният статистически анализ, отнасящ се до оценката за влиянието Кi67- експресията в туморна тъкан спрямо общата преживяемост на пациентите с глиоми показва, че при пациентите с нисък процент на експресия/38 случая / медианата на преживяемост е 346,5 дни, а тези с висок процент експресия /34 пациента / имат преживяемост 197,5 дни- т.е., разликата е почти от 5 месеца в полза на имащите нисък процент на Кi-67 експресия. Проследената връзка м/у пролиферативния индекс само при МГБ спрямо общата преживяемост не показва статистически значима разлика / медианата е почти еднаква в двете групи – 201,5 дни за нисък и 197,5 дни за висок % на Кi67/. Получените от автора данни са сходни с тези на други автори при подобни изследвания .

Резултатите от проведените ИХХ-изследвания с оглед оценка и анализ на тъканната експресия на ZBTB20 гена при глиални тумори и корелиращите с нея фактори показва предимно ядрено оцветяване, с различна степен на интензивност в туморни клетки с различна степен на диференциация, както и в нетуморни клетки- ендотелни, гладкомускулни и имунни.При единични МГБ се наблюдава цитоплазмена експресия. ZBTB20 се експресира интензивно и в ядрата на клетките от тумори с олигодендроглиален фенотип и при глиоми с различна степен на диференциация. Интересна находка е откриването на различен процент експресиращи туморни клетки в морфологично идентични глиоми с еднаква степен на диференциация, а така също и различна по интензитет експресия на туморни клетки в тъканта.

Разпределението на пациентите според процента на експресиращите ZBTB20 клетки не показва статистически достоверна зависимост- почти всички стойности са над 50% експресия, с доминиране на случаите с високa,над 75% експресия. Не се наблюдава статистическа значимост и по отн. на общата преживяемост на пациентите според % на експресия на ZBTB20 в туморната тъкан, като стойностите на медианата са почти еднакви-- 146 дни за нисък, и 136 дни за висок процент. При разпределението на пациентите според стойностите на Н-score на ядрeна експресия в туморната тъкан не се установяват съществени различия от медианата /201, 8; най-ниската стойност е 155,0 а най-високата 257,4./. Липсва статистически значима разлика и при изследване експресията по пола- медианата за мъже е 201,8 а за жени- 201,6.

За проследяване на корелацията м/у силата на експресия на ZBTB20 и общата преживяемост на пациентите с глиомни тумори, изчислена чрез Н-score, авторът разделя пациентите на две групи: 1гр. 50 случая с ниска експресия и 2. 36 случая с висока експресия на ZBTB20. При извършения непараметричен анализ на преживяемостта на пациентите се установява, че пациенти с високи нива на експресия в туморната тъкан имат по-кратка медиана на обща преживяемост / 106 дни/, докато пациенти с ниска ядрена експресия имат висока преживяемост / 263 дни /, р< 0,01 т.е., пациенти с ниска експресия имат 5,3 месеца по-голяма преживяемост. Същата зависимост между силата на експресия на ZBTB20 и общата преживяемост се установява при пациенти с МГБ - пациентите с високи нива на ядрена експресия имат по-кратка медиана на обща преживяемост / 96 дни /, докато при пациенти с ниска експресия преживяемостта е 206 дни - т.е., разлика от 3,7 месеца.

Подобни статистически значими резултати д-р Дженков установява при определяне зависимостта между силата на експресия и общата преживяемост на пациенти с високостепенни глиоми / III и IV ст /. И тук пациентите с високи нива на ядрена експресия са с по-кратка медиана на обща преживяемост / 96 дни / в сравнение с пациенти с ниска ядрена експресия в туморната тъкан / 246 дни /- т.е., разлика от 5 месеца.

След изследването на ZBTB20 и Ki67 като независими прогностични фактори, д-р Дженков си поставя задача да проследи евентуалното съществуване на директна зависимост между експресията на двата фактора при глиални тумори. За целта първоначално е проследена корелацията между ZBTB20 K-score и Ki67 при 69 случая по метода на Spearman, при което се установява, че липсва статистическа значимост по отношение на такава между двата фактора. С оглед достигане до оценка по отн. преживяемостта на пациентите с глиоми според комбинацията от две алтернативни стойности на ZBTB20 и Ki67, дисертантът формира 3 групи , съотв:I гр- нисък Кi67 и нисък ZBTB20; II гр.- нисък Кi67 и висок ZBTB20 или висок Кi67 и нисък ZBTB20; и III гр. висок Кi67 и висок ZBTB20. Получените резултати са статистически значими, като в I гр. пациентите имат медиана на преживяемост от 356 дни; IIгр.- 246 дни и в III гр.- 129 дни; всяка следваща група е с около 4 мес. по-кратка преживяемост. При направеното увеличение на групите / 4 групи / и съотв.комбинации в тях , се установява запазване на тенденцията, като получените резултати са статистически значими, с р< 0,05. Изводът от направените вариации е, че ZBTB20 влияе в по-голяма степен на преживяемостта на пациентитеот стойността на пролиферативния индекс Кi67.

От изложеното до тук става ясно, че проблемът, отнасящ се до определяне прогностичната тежест на всеки отделен показател е сложен, и е рисковано да бъде решен с едно изследване. Това дава основание проучването да бъде продължено и разширено с използването на по-големи групи от пациенти, като би било добре при възможност да се определи евентуална експресия на ZBTB20 гена в някои от метастатичните мозъчни тумори с различна хистогенеза, и да се приложи многофакторен анализ, резултатите от който да послужат при търсенето на нови възможности в прилагането на таргетната антитуморна терапия. Установената дифузна експресия на ZBTB20 гена в туморните клетки дава основание на д-р Дженков да изкаже предположението, че маркерът би могъл да има диагностична стойност и значение за терапевтичното поведение като мишена на антитуморно лечение при глиалните тумори.

Тъй като д-р Дженков освен отчасти паралелното обсъждане на резултатите от разработката, е направил и отделно, самостоятелно обсъждане, следващо структурата на изложението, ще се спра накратко само върху някои по-съществени момента, а именно:

1. Изнесените данни във формулирания в синтетичен вид демографски анализ на оперирани и морфологично верифицирани пациенти с интракраниални лезии са нови за България, като това се отнася най-вече за направената оценка на хистологичния вид и степента на туморната диференциация. Будещи безпокойство са данните, сочещи за нарастващата у нас честота на глиобластомите- 73,5% спрямо 56,1% в литературата – т.е., в България тя е по-висока със 17,4% при сравнение с отбелязаната в световен мащаб. Във връзка с този факт дисертантът прави предположението, че високият % може да се дължи на неголемия общ брой включени в изследването случаи, което от своя страна, с цел по-голяма обективност, е достатъчно убедителен повод, предполагащ и изискващ продължаването му **.**

2. По отн. предизвикателствата в диагностиката на МГБ, отнасящи се до резултатите, получени при експресията в туморните клетки на СК АЕ1/АЕ3 и доверието в тях, авторът изказва съмнение относно достоверността им, като се солидаризира с мнението на автори от литературата, според които ИХХ-оцветяването в тези случаи е резултат от кръстосана реакция между GFAP и АЕ3 -фракцията на коктейла. Това навежда на мисълта, че съществува вероятност при използване само на един маркер да се стигне до невярно заключение за метастатичен процес- факт, който налага прилагането на ИХХ-панел при диагностиката на туморите.

3. Във финалната част на обсъждането дисертантът интерпретира резултатите, получени от прилагането на различни подходи при изследване експресията на ZBTB20, отнасяща се за интензитет на оцветяването, вариации в локализацията и туморната площ и корелация с други фактори, като Ki67 в туморната тъкан. Установява се липса на статистическа значимост по отн. преживяемостта на пациентите в зависимост от % позитивни туморни клетки, независимо от интензитета на експресия; - т.е., пропорцията от ZBTB20 експресиращи клетки, от тази на всички клетки няма прогностично значение при глиомите. При измерване силата на експресия за всеки тумор чрез Н-score и корелация с различни параметри/ хистологична диференциация и обща преживяемост/ **обаче се** **установява, че тя определено е прогностичен маркер при глиомите.** Високите нива на експресия корелират с по-лоша прогноза при**: 1. Всичк**и **глиоми,** спрямо тези с по-ниска степен на експресия; **2. Високостепенни глиоми** и **3.Само глиобластоми**. Кi67 показва вариабилност в експресията, която е по-висока при глиобластоми, като по правило пациентите с по-висок индекс са с по-лоша прогноза. Сравнението на двата маркера- ZBTB20 и Кi67 по отношение на тяхната експресия не показва корелация между тях, докато прилагането на комбинирана оценка от нива на ZBTB20 и Кi67 показва, че случаите с ниски нива имат по-голяма преживяемост спрямо тези с по-високи нива на експресия, т.е., **силата на интензивност на експресията, а не процентът на експресиращите клетки има решаващо отношение и значение за прогнозата на глиомите.**

В заключението д-р Дженков подобно на други автори от световната литература изразява надежда, че не сме далеч от времето, когато въвеждането на нови биомаркери за извършване на точна хистоморфологична диагноза и установяване на молекулярно-генетични промени ще доведат до възможност за прилагане на съвременна персонализирана терапия и подобряване статуса на пациентите. С присъщата си скромност д-р Дженков изтъква, че случаите, които са използвани в разработката, биха могли да бъдат повече на брой, което би дало възможност направените изводи да бъдат по-конкретни и категорични. Това от своя страна е предпоставка и налага продължаване и разширяване на изследванията в тази насока.

**Изводи:** От проведеното изследване са оформени 8 извода, които отговарят на поставените цел и задачи, формулирани са добре и са логичен завършек от получените резултати. Приемам ги във вида, в който са представени, без забележки.

**Приноси:**

Д-р Дженков е формулирал 7 приноса на дисертационния труд, разпределени в две групи: 1.**Четири научни приноса с оригинален характер,** като **2, 3 и 4 от тях,** отнасящи се до оценка на ИХХ-експресията на ZBTB20 при глиоми с различна степен на диференциация, направеният за първи път у нас анализ на експресията на този ген във връзка с общата преживяемост на пациенти с глиоми, и оценката на ZBTB20 и Ki67 като прогностични фактори за общата преживяемост при глиоми с различна степен на диференциация, могат да бъдат приложени в клинико-морфологичната практика при диагностицирането и прогнозата на глиалните тумори. 2.Т**ри научни приноса с потвърдителен характер,** като сред тях се откроява третият, отнасящ се до съществуващата възможност за евентуално позитивно оцветяване на ядрата в клетките на МГБ с епителен маркер АЕ1/АЕ3.

Д-р Дженков е представил 3 научни публикации, свързани с темата на дисертационния труд, публикувани в наши списания. Публикационната активност- брой на публикациите, тяхното съдържание и стойност отговарят на изискванията за представяне на резултатите от научните изследвания.

**Авторефератът** е изготвен в съответствие с приетите научни изискванията. Той е отпечатан на 71 страници, които включват всички основни части на дисертационния труд, таблици, фигури и снимки. Съдържанието на автореферата дава достатъчно добра и пълна представа за цялостния дисертационен труд , като отразява постигнатите резултати и направените изводите от разработката.

**Заключение:**

Дисертационният труд на д-р Деян Людмилов Дженков третира един изключително актуален проблем, отнасящ се до възможностите за подобряване диагностиката и превенцията на мозъчните тумори, решаването на който би имал голям социално-икономически ефект. Целта на разработката е постигната, поставените задачи са изпълнени. Изводите са точни, ясно формулирани и изчерпателни. Приносите имат не само научна, но и практическа стойност. Представените публикации и научни съобщения отговарят на изискванията. Дисертацията е написана на добре издържан научно-литературен език и е онагледена по най-добър начин с таблици и цветни снимки с високо качество.

Дисертационен труд на д-р Деян Дженков съдържа научни и научно-приложни резултати, отговарящи на всички изисквания на Закона за развитие на академичния състав в Р България, Правилника за прилагане на ЗРАСРБ и Правилника на МУ-Варна. Дисертационният труд показва, че д-р Дженков притежава задълбочени теоретични знания и умения по научната специалност Патологична анатомия, като демонстрира качества за самостоятелно провеждане на научно изследване.

Поради гореизложеното, напълно убедено давам своята **положителна оценка** на предложения дисертационен труд , като препоръчвам на уважаемите членове на Научното жури да присъдят образователната и научна степен „Доктор“ на д-р Деян Людмилов Дженков по научната специалност „Патоанатомия и цитопатология“

22.03.2019 Рецензент: доц. д-р Екатерина Боянова Софтова-Златарова, дм

Гр. Варна