



**МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ
„ПРОФ. Д-Р ПАРАСКЕВ СТОЯНОВ“ - ВАРНА
ФАКУЛТЕТ ПО МЕДИЦИНА**

**КАТЕДРА ПО ОБЩА И КЛИНИЧНА ПАТОЛОГИЯ, СЪДЕБНА
МЕДИЦИНА И ДЕОНТОЛОГИЯ**

д-р Деян Людмилов Дженков

**ЕКСПРЕСИЯ НА ТРАНСКРИПЦИОНЕН ФАКТОР ZBTB20
В ГЛИАЛНИ ТУМОРИ НА ЦЕНТРАЛНАТА НЕРВНА
СИСТЕМА**

АВТОРЕФЕРАТ

за присъждане на образователна и научна степен „Доктор“
Научна специалност: „Патологоанатомия и цитопатология“

Научен ръководител: Проф. д-р Петър Иванов Генев, д.м.
Научен консултант: Проф. д-р Антон Божидаков Тончев, д.м.н.

**Варна
2019**

Дисертационният труд съдържа 122 страници, онагледен е с 46 фигури и 5 таблици.
Литературната справка съдържа 144 заглавия.
Дисертационният труд е обсъден и насочен за официална защита от катедрения съвет на Катедрата по обща и клинична патология, съдебна медицина и деонтология при Медицински университет – Варна

Защитата на дисертационния труд ще се състои на 2019 г. от часа в
аудитория на Медицински университет „Проф. д-р Параскев Стоянов“, гр. Варна на
открито заседание на научното жури. Материалите по дисертацията са на разположение
в библиотеката на МУ- гр. Варна.

СЪДЪРЖАНИЕ

I. ВЪВЕДЕНИЕ.....	6
II. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР	9
2.8. Изводи от литературната справка:.....	9
2.9. Заключение	10
III. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ	11
3.1. Цел.....	11
3.2. Задачи:	11
IV. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ НА ИЗСЛЕДВАНЕ	12
4.1. Материали, използвани в изследването	12
4.1.1. Материална база за реализиране на дисертационния труд	12
4.1.2. Пациентска популация	13
4.2. Методи на изследване	14
4.2.1. Хистологични изследвания	14
4.2.2. Специфични методи на изследване	14
4.2.2.1. Имунохистохимични методи и използвани антитела.	14
4.2.2.2. Подготовка на биопсичните материали за имунохистохимично изследване	15
4.2.2.3. Имунохистохимичен протокол	15
4.2.3. Методи за отчитане на експресията на ZBTB20 и Ki-67.....	16
4.2.4. Статистически методи	18
V. РЕЗУЛТАТИ	20
5.1. Честота и демографска характеристика на лезиите в ЦНС.....	20
5.2. Морфологична диагностиката на GBM и предизвикателства свързани с мимикрия за епителни маркери (СК AE1/AE3).	27
5.3. Клинико - морфологични характеристики на изследваните пациенти с глиоми.	31
5.3.1. Възраст на пациентите.	31
5.3.2. Пол на пациентите	32
5.3.3. Преживяемост на пациентите.	33
5.3.3.1. Обща преживяемост на всички пациенти с глиоми.	33
5.3.3.2. Зависимост между пациентите според пола и общата им преживяемост.	34
5.3.3.3. Корелация на пациентите според пола и общата им преживяемост само за GBM.	35
5.3.3.4. Сравняване на случаи между нискостепенни глиоми (II степен по C3O) и високостепенни глиоми (III, IV степен по C3O) спрямо общата им преживяемост.	35
5.3.3.5. Сравняване на случаи между GBM (WHO IV) и неглиобластомни тумори (WHO grade II, III) спрямо общата им преживяемост.	36
5.4. Оценка на експресия на прогностични фактори.....	37
5.4.1. Оценка на експресия според пролиферативния индекс Ki-67%.....	37
5.4.1.1. Разпределение на всички случаи според процента на пролиферативния им индекс.	38
5.4.1.2. Оценка на влиянието на експресията на Ki-67% в туморна тъкан спрямо общата преживяемост на пациентите с глиоми	39
5.4.1.3. Оценка на пролиферативния индекс при GBM спрямо общата преживяемост.	40

5.4.2. Оценка на тъканата експресия на ZBTB20 при глиални тумори и корелиращите с нея фактори.	41
5.4.2.1. Оценка на експресията на туморната тъкан според процент експресиращи клетки за транскрипционен фактор ZBTB20.....	46
5.4.2.1.1. Разпределение на пациентите според процент експресия на клетките в туморната тъкан за ZBTB20.....	46
5.4.2.1.2. Оценка на зависимостта между процента на експресия на ZBTB20 в туморната тъкан и преживяемостта.	46
5.4.2.2. Оценка на интензивност на експресията на туморната тъкан според H-score на ZBTB20.	47
5.4.2.2.1. Разпределение на пациентите според стойностите на H-score на ядрена експресия на туморната тъкан за ZBTB20.	47
5.4.2.2.2. H-score експресия на ZBTB20 при мъже и жени	48
5.4.2.2.3. Корелация между силата на експресия на ZBTB20 и общата преживяемост на пациентите с глиомни тумори.	49
5.4.2.2.4. Зависимост между силата на експресията на ZBTB20 и общата преживяемост на пациенти с GBM (глиом степен IV по C3O).	50
5.4.2.2.5. Зависимост между силата на експресията на ZBTB20 и общата преживяемост на пациентите с високостепенни глиоми (степен III и IV по C3O).	51
5.4.3. Корелация на експресия на ZBTB20 с пролиферативен индекс на тумора.	52
5.4.3.1. Оценка на преживяемостта на пациентите според комбинация от две алтернативни стойности на ZBTB20 и Ki-67.....	53
5.4.3.2. Комбинация на пациентите в четири групи според двата показателя, H-score за ZBTB20 и пролиферативен индекс Ki-67.	54
VI. ОБСЪЖДАНЕ	56
6.1. Демографски анализ на оперирани и морфологично верифицирани пациенти с интракраниални лезии.	56
6.2. Предизвикателства в диагностиката на GBM - мимикрия при оцветяване с CK AE1/AE3.	57
6.3. Експресия на ZBTB20 при глиоми.....	58
VII. ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	62
VIII. ИЗВОДИ	63
IX. ПРИНОСИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД.....	64
X. СПИСЪК С ПУБЛИКАЦИИ И УЧАСТИЯ.....	65
XI. ИЗПОЛЗВАНА ЛИТЕРАТУРА.....	66
XII. БЛАГОДАРНОСТИ.....	70

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

На кирилица:

ИКТ -	Интракраниален тумор
ИХХ -	Имунохистохимия
ЦНС -	Централна нервна система

На латиница:

CK -	Cytokeratin / цитокератин
ETMR -	Embryonal tumor with multilayered rosettes / ембрионален тумор с многопластови розетки
GBM -	Glioblastoma multiforme / мултиформен глиобластом
GFAP -	Glial fibrillary acidic protein / глиален фибрилераен кисел протеин
IDH -	Isocytate dehydrogenase / изоцитрат дехидрогеназа
p53 -	Transforming protein 53 / трансформиращ протеин 53
pGBM -	Primary glioblastoma multiforme / първичен мултиформен глиобластом
sGBM -	Secondary glioblastoma multiforme / вторичен мултиформен глиобластом
WHO -	World health organization / СЗО - Световна здравна организация
ZBTB20 -	Zink Finger and BTB Domain Containing 20 (транскрипционен фактор, съдържащ домейн Zn-finger и домейн BTB (хомоложен на гените Broad-Complex, Tramtrack and Bric-a-brac при Drosophila)

I. ВЪВЕДЕНИЕ

Злокачествените тумори са заболявания, свързани с генетични и епигенетични промени на соматични клетки, които са сериозен проблем на медицината, както и социално, икономическо и психологическо бреме за болните и техните близки. Те са изключително хетерогенни, като за някои са въведени скринингови методи за откриване на предракови или ранни ракови промени, други са с ясно дефинирани рискови фактори с възможност за профилактика и превенция (1), трети са податливи на съвременна комплексна терапия. Независимо от малигнения си характер голяма част от пациентите с определени тумори или предракови лезии могат успешно и радикално да се лекуват.

За съжаление това не се отнася за злокачествените мозъчни неоплазии, за които не са известни конкретни етиологични фактори с оглед на превенция, скринингови методи за ранно откриване и комплексната им терапия все още не показва сериозен напредък. В продължение на повече от столетие преживяемостта за най-агресивния представител на тези тумори GBM за петгодишен период се запазва около 5%, независимо от огромния напредък на медицинското изкуство (1). Тези данни са потвърждават и от настоящото ни проучване, при което от 97 пациенти, 95 са починали в изследвания период.

Последните години познанията за биологията на туморите и особено на глиомите претърпяха фундаментални промени, което дава нови надежди в борбата с тях. Тази тенденция се вижда особено ясно в последната ревизираната класификация на Световната Здравна Организация (СЗО) за туморите на нервната система (2016).

В съвременната онкопатология навлязоха молекулярно-генетични методи на изследване, които откриват специфични мутации и биомаркери, което разкрива нови хоризонти за изясняване на пътищата на канцерогенеза, прецизна диагностика и идентифициране на молекулярни сигнатури на туморите. Такива като *IDH1/2* мутация и 1p19q коделеция са инкорпорирани в дефинициите на глиомите и имат основополагащо значение за комплексната диагноза, прогноза и терапия при тези онкологични заболявания.

Глиомите представляват група от мозъчни неоплазми с прояви предимно на астроглиална или олигодендроглиална диференциация и все още не напълно установен клетъчен произход. Най-вероятният източник са прогенитори на глиални клетки разположени в субвентрикуларната зона на мозъчната тъкан, които са запазили пролиферативния си потенциал, както и способността си за диференциация (2). Глиомите съставляват 80% от първичните малигнени мозъчни тумори и преживяемостта им варира сред отделните класове според степента си на диференциация, като с най-добра прогноза са обикновено нискостепенните астроцитомы и олигодендроглиомы, а с най-неблагоприятна е GBM (3).

През последните петнадесет години средната преживяемост се увеличава плавно за най-агресивния представител на глиомите (GBM), като значение за това има и въвеждането на алкализиращия химиотерапевтик Temozolomide (4,5).

С оглед определяне поведението на туморите освен по хистоморфологичния им вид, вече са открити биомаркери, с помощта на които все повече се изяснява тяхната биология. Много нови молекули, участващи в процесите на клетъчна пролиферация, инвазия и

неоангиогенеза, са обект на интерес при различни типове неоплазми, включително и при мозъчните тумори.

Гените от фамилията *ZBTB* (Zinc finger and BTB domain containing) кодират транскрипционни фактори, които имат важно значение за регулиране на тъканното развитие и поведението на определени злокачествени заболявания (6,7). *ZBTB* протеините модулират транскрипционни пътища в контрола на клетъчния цикъл, диференциация и клетъчна съдба. Изследвания на *ZBTB* протеини в солидни тумори отчитат тяхната потенциална роля в регулиране на клетъчния цикъл и сигналния път на p53 (8–12). Транскрипционният фактор BCL6 от фамилията на *ZBTB* чрез анализ на модели на генна експресия е идентифициран като глиома промотор (12).

ZBTB20 е също член на фамилията, който функционира като транскрипционен репресор и се експресира както в нормална мозъчна тъкан, така и при глиоми. Множество изследвания са свързани с ролята му при морфогенеза на хипокампа и формиране на слоевете на кортекса по време на ембрионалното развитие (11), както и при промоция на ранна астроцитна диференциация на прогениторни клетки (13). Непротеин кодиращи малки молекули (miR-758-5p) чрез подтискане на експресията на *ZBTB20* гена възпрепятстват пролиферацията, инвазията и миграцията на туморните клетки, като по този начин водят до забавяне на прогресията на глиобластоми (14).

Всички тези примери и липсата на достатъчно морфологични проучвания посветени на този транскрипционен репресор по отношение на мозъчните неоплазии, обуславя необходимостта от анализ на експресията му при глиалните тумори.

II. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР

2.8. Изводи от литературната справка:

1. Познаването на клетъчния състав и произход на ЦНС крие в себе си ключа към откриване на нови диагностични и терапевтични подходи към злокачествените глиоми.

2. Прогенитори на глиалните клетки в субвентрикуларната зона са най-вероятния източник на глиомите.

3. Средната заболяемост от GBM в различни популации е малко над 3 случая на 100 000 годишно, като рискови фактори с най-голямо значение са напредналата възраст и наличието на предходен глиом. Средната преживяемост след поставянето на диагнозата GBM е около 13 месеца.

4. Съвременната морфологична диагностика на глиомите задължава използването на молекулярно-генетични маркери (или техни сурогати чрез ИХХ изследване), като минималния панел включва: IDH1, ATRX, p53, чрез които могат да се определят четирите групи глиоми според WHO. Като първият от тях е важен и за отграничаването на туморните клетки от реактивни астроцити. В част от случаите са необходими и други методи, като например флуоресцентна ин ситу хибридизация за 1p19q делеция при олигодендроглиоми.

5. Транскрипционният фактор ZBTB20 участва в развитието на различни неоплазии извън нервната система, а в мозъка се експресира в прогенитори, намиращи се в субвентрикуларната зона. Това обуславя

вероятността ZBTB20 да се експресира в глиоми, което налага настоящото изследване.

2.9. Заключение

Глиомите са тумори с разнообразна генетична характеристика и морфологична проява. Те са по правило с неблагоприятна прогноза и липсва сериозен напредък в ранната им диагностика и успешното им лечение. Комплекс от клинични, морфологични, генетични и епигенетични показатели ще дадат нов тласък към персонализирана медицина и значително ще подобрят прогнозата на пациентите с тези тумори.

III. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

3.1. Цел

Цел на настоящия дисертационен труд е да се определи експресията на транскрипционния фактор ZBTB20 в различни глиални тумори, да се оцени отношението му към преживяемостта и евентуална корелация с известни прогностични фактори.

3.2. Задачи:

Във връзка с гореизложената цел бяха формулирани следните основни задачи:

1. Да се определи относителния дял, честота и демографските характеристики на глиалните тумори при пациенти оперирани за интракраниални лезии.
2. Да се извърши морфологична диагностика на глиалните тумори в частност на мултиформения глиобластом.
3. Да се оцени експресията на транскрипционния фактор ZBTB20 в различни по степен на диференциация глиални тумори и околната мозъчна тъкан.
4. Да се оцени връзката между експресията на ZBTB20 с преживяемостта и корелацията му с известни прогностични фактори като степен на диференциация и пролиферативния индекс Ki-67.

IV. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ НА ИЗСЛЕДВАНЕ

4.1. Материали, използвани в изследването

4.1.1. Материална база за реализиране на дисертационния труд

- „Катедра по обща и клинична патология, съдебна медицина и деонтология“ – Медицински Университет – Варна
- Използвана е информация от електронна база данни „MultiLab“ на Университетска болница „Св. Марина“ – Варна

Биологичните материали, получени от пациенти и използвани за експерименталната част на настоящият дисертационен труд са същите използвани за поставяне на рутинната диагностична дейност между Клиниката по неврохирургия, УМБАЛ „Св. Марина“, Варна и Клиниката по обща и клинична патология, УМБАЛ „Св. Марина“, Варна.

Част от данните, касаещи пациенти използвани само за статистическа обработка, спрямо поставените задачи, невключващи експериментална дейност върху биологични тъкани са предоставени от Отделението по клинична патология, МБАЛ „Св. Анна“, Варна и Клиниката по неврохирургия, МБАЛ „Св. Анна“, Варна.

Осъществяването на изследването бе извършено съгласно решение на Комисия по Етика на Научните Изследвания към Медицински университет – Варна „Проф. д-р Параскев Стоянов“, Варна, България № 20 от 26.04.2012 година.

4.1.2. Пациентска популация

Изследвани са 97 пациенти с първични мозъчни тумори: 54 мъже и 43 жени, съответно със следните морфологични диагнози: 81 GBM, 6 глиоми III степен и 10 глиоми II степен. От всички изследвани 97 пациента, 95 са екзитирали в този период, което представлява 97,93% процента от групата. Двама пациенти са живи съответно с поставени диагнози астроцитом II степен и високостепенен глиом (GBM). Пациентите са представени в таблица 2.

Табл. 2. Основни клинико-морфологични показатели на изследваните пациенти.

Пациент	Възраст в години	Преживяемост в дни	Степен на малигненост	пол
P001	50	101	4	м
P002	61	272	4	ж
P003	66	1248	4	м
...	...	...	...	...
P094	54	746	2	ж
P095	35	479	2	м
P096	0	1212	2	м
P097	40	498	2	м

Обект само за статистически анализ са и 822 пациенти с интракраниални лезии оперирани от неврохирургичните звена на два многопрофилни болници във Варна обслужващи пациенти от Североизточна България за период от 5 години.

4.2. Методи на изследване

4.2.1. Хистологични изследвания

Материалите получени при оперативната интервенция са фиксирани в 10% неутрален буфериран формалин и след съответната обработка включени в парафин с точка на топене 52-54°C с цел изготвяне на парафинови блокчета. Срези с дебелина 5 µm са стандартно оцветени с хематоксилин-еозин за оценка на хистологичните промени в тумора.

4.2.2. Специфични методи на изследване

4.2.2.1. Имунохистохимични методи и използвани антитела.

Използван бе индиректен имунопероксидазен метод за имунохистохимичен анализ с помощта на EnVision™ FLEX MiniKit, HighpH, DAKO, с каталожен номер K8024. Използвани са следните антитела:

- Анти-ZBTB20 антитяло, SigmaAldrich, САЩ, каталожен № HPA016815-100UL, поликлонално заешко антитяло срещу човешки ZBTB20, в разреждане 1:100 и антигенно разкриване при pH 6,0.

- Анти-CKAE1/AE3 антитяло, DAKO, каталожен № 10140494, моноклонално мише антитяло срещу човешки CKAE1/AE3, готово за употреба с антигенно разкриване при pH 9,0.

- Анти-GFAP антитяло, DAKO, каталожен № 20061678, поликлонално заешко антитяло, готово за употреба с антигенно разкриване при pH 9,0.

- Анти-Ki-67 антитяло клон MIB-1, DAKO, каталожен № 20058909, моноклонално мише антитяло срещу човешки Ki-67, готово за употреба с антигенно разкриване при pH 6,0.

Използваната система за имунохистохимично оцветяване съдържа стъпка за сигнална амплификация с поливалентен линкер, вторично антитяло, конюгирано с ензим хрянова пероксидаза (HRP) и подходящ хромогенен субстрат диаминобензидин (DAB).

4.2.2.2. Подготовка на биопсичните материали за имунохистохимично изследване

- Биопсичните материали (фиксиращи в неутрален формалин и включени в парафинови блокчета) бяха нарязани на срези с дебелина 5 µm и поставени върху силанизирани стъкла.
- Извършено е депарафиниране в низходяща редица от алкохоли, както следва: етанол 100% 3 мин., етанол 90% 3 мин., етанол 80% 3 мин., етанол 70% 3 мин., ксилол 3×10 мин. След това срезите са измити с течаща вода и се поставени в дестилирана вода.
- Антигенно разкриване: разкриването на антигените се осъществи с предварително загрят до 65 °C EnVision FLEX TargetRetrievalSolution (работен разтвор) в PT Link контейнер, като срезите бяха инкубирани за 20 мин. при температура 97°C и pH 6,0 (за анти-ZBTB20 и анти-Ki-67) или pH 9,0 (анти-GFAP и анти-CKAE1/AE3). След охлаждане пробите са промити на стайна температура с измиващ буфер FLEX WashBuffer за 1-5 минути.

4.2.2.3. Имунохистохимичен протокол

Срезите бяха оцветени според EnVisionFLEX протокола на производителя, като за всички стъпки се използва влажна камера.

1. Инкубация с пероксидазен блокиращ разтвор (3% H_2O_2) за 5 минути на стайна температура за блокиране на ендогенната пероксидазна активност. След инкубацията разтвора се премахва чрез изплакване с измиващ буфер за 5 мин.
2. Инкубация с първичното антитяло, в съответното разреждане, за 20 мин. на стайна температура.
3. Промиване с измиващ буфер за 2×5 мин. на стайна температура.
4. Инкубация с маркиран полимер HRP за 20 мин. на стайна температура.
5. Промиване с измиващ буфер за 3×5 мин. на стайна температура.
6. Инкубация на срезите с хромоген DAB пероксидазен разтвор за 2×5 мин., при непрекъснато микроскопиране.
7. Промиване с измиващ буфер за 2 мин.
8. Изплакване с дестилирана вода за 2 мин.
9. Контраоцветяване с Mayer'shematoxylin за 5 мин.
10. Изплакване на пробите с дестилирана вода за 5 мин.
11. Дехидриране в обратен възходящ ред етанол 70%, етанол 80%, етанол 90%, етанол 100% със същата продължителност както при депарафинизацията.
12. Влагане в монтираща среда и поставяне на покривно стъкло.

4.2.3. Методи за отчитане на експресията на ZBTB20 и Ki-67

Препаратите са сканирани с помощта на апарат Leica Aperio Scan Scope AT2 device (AperioTechnologies, Vista, CA) с последващи анализи на образите със софтуер ImageScope V12.1.0.5029 (Aperio). Оценка на имунохистохимичното изследване е направена, като е изследвано туморно поле с висока целуларност („hot spot”), като се избягват зони на некроза и съдова пролиферация, на увеличение $\times 200$ за всеки отделен случай.

[illegible]

Имунохистохимичната експресия на ZBTB20 за всички клетки и Ki-67 за туморни клетки бе оценена полуколичествено процентно в туморната тъкан.

	17
--	----

$H\text{-score} = 100 \times [1 \times (\text{брой клетки с } 0 \text{ и } 1+) + 2 \times (\text{брой клетки с } 2+) + 3 \times (\text{брой клетки с } 3+)] / [\text{общ брой клетки с } 1+, 2+ \text{ и } 3+]$, в диапазон от 0 до 300.

Крайният H-score (17) беше дихотомно разделен на ниска и висока експресия, като за граница бе приета стойност при, която има максимална разлика в преживяемостта на двете подгрупи, близка до медианата.

4.2.4. Статистически методи

Статистическият анализ е осъществен чрез програмен продукт Microsoft Excel 2016 и статистическа програма GraphPad Prism 7.03 за Microsoft Windows и включва следните методи:

- Дескриптивен анализ за определяне на статистически величини: средна стойност $\pm$ стандартно отклонение, медиана, 25-ти и 75-ти персентил, минимална и максимална стойност, като в текста, освен ако не е изрично указано са показани средна стойност $\pm$ стандартно отклонение.
- Корелационен анализ за оценка на зависимостта между изследваните показатели чрез непараметричен тест на Spearman.
- Анализ на преживяемостта – Logrank (Mantel-Cox тест) и Gehan-Breslow-Wilcoxon тест изследване на преживяемостта на пациентите в зависимост от нивото на експресия изследваните антигени.
- Сравнителен анализ (оценка на хипотези) – непараметричен тест на Mann-Whitney сравняване на количествени и качествени показатели и изследване на разликата между тях.

При всички проведени анализи се приема допустимо ниво на значимост $p < 0,05$ при доверителен интервал 95%. Графичното и таблично изобразяване на статистическите данни е осъществено с помощта на Microsoft Office 2016 и GraphPad Prism 7.03.

V. РЕЗУЛТАТИ

5.1. Честота и демографска характеристика на лезиите в ЦНС

За периода 1 Януари 2012 до 31 Декември 2016 (5 пълни календарни години), бяха регистрирани общо 822 случая на оперирани и хистологично потвърдени интракраниални лезии в неврохирургичните звена на УМБАЛ „Св. Марина“, Варна, България или МБАЛ „Св. Анна“, Варна, България.

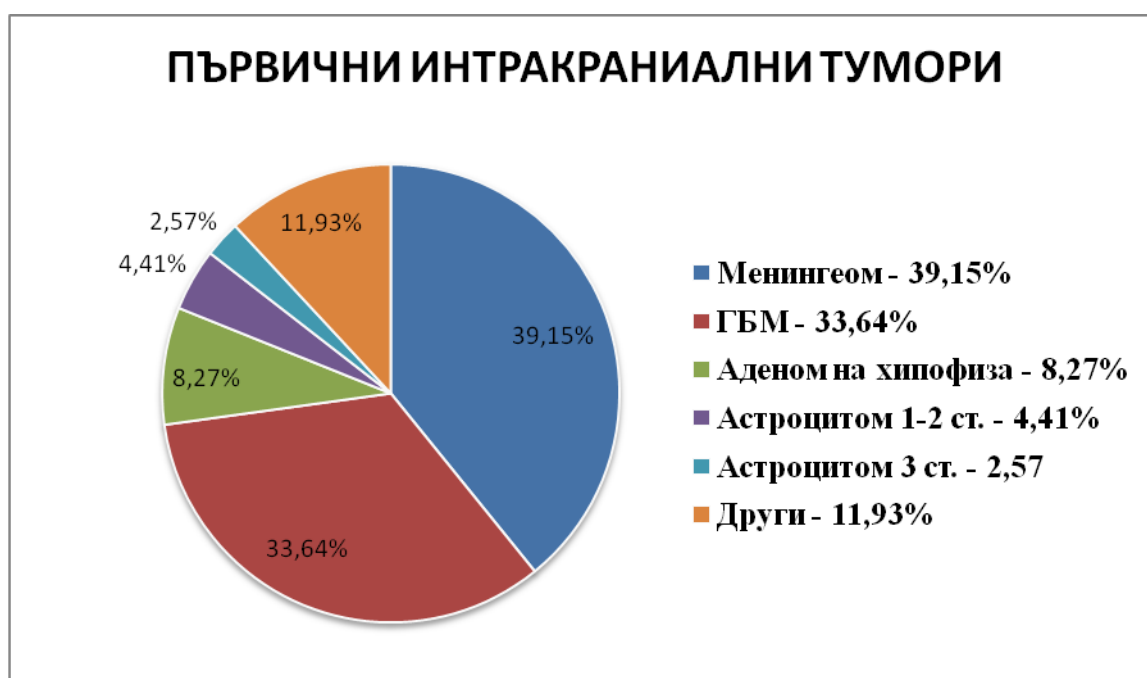
Статистическият анализ на тези 822 морфологично потвърдени случая показва, че 66,2% (n = 544) от тях попадат в категорията първични ИКТ, 30,9% (n = 254) са метастатични ИКТ, а останалите 2,9% (n = 24) са нетумор обемзаемащи процеси (НТОЗП). Разпределението на описания анализ сме показали на Фигура 8.



Фиг. 8. Разпределението по честота на интракраниалните лезии

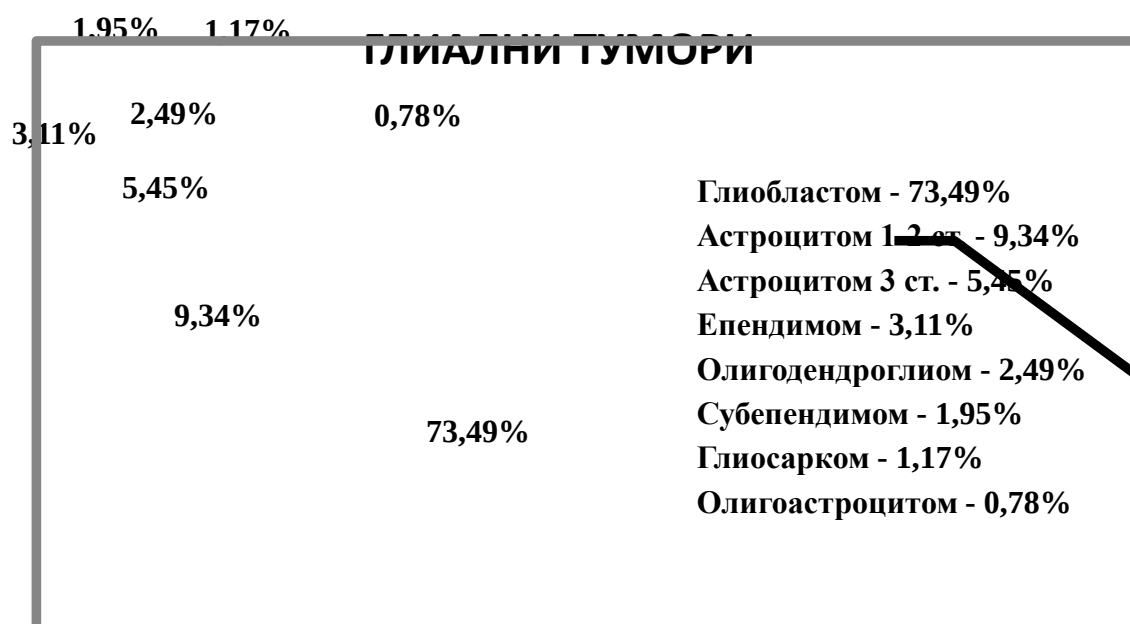
Последващия анализ на първичните ИКТ показва, че от 544 случая 45,77% (n = 249) са тумори от групата на глиалните, докато останалите 54,23% (n = 295) се дължат на менингиом - 39,15% (n = 213), хипофизен аденом - 8,27% (n = 45), невриноом - 2,21% (n = 12), първичен лимфом на ЦНС- 1,29% (n = 7), хемангиперицитом - 0,74% (n = 4), медулобластом - 0,55% (n=3), краниален хордом - 0,55% (n = 3), ЕТМР 0,55% (n = 3), плексус папилом 0,36% (n = 2), пинеоцитом - 0,18% (n = 1), миофибробластен тумор 0,18% (n = 1) и първичен интракраниален лейомиосарком 0,18% (n = 1).

Най-честият първичен ИКТ в това изследване е менингиом (n = 213) общо 25,91% от всички интракраниални лезии и 39,15% от всички първични ИКТ. Вторият по честота ИКТ е мултиформеният глиобластом (n = 183), 22,26% от всички интракраниални лезии и 33,64% от ИКТ. Тези данни корелират с публикуваните данни от други статистически изследвания (1). Най-честите първични ИКТ са представени на Фигура 9.



Фиг. 9. Разпределение по честота на всички първични ИКТ

Разпределението само на глиалните тумори сме представили на Фигура 10, като GBM обхваща 73,49% от всички глиоми.



Фиг. 10. Разпределение по честота на всички глиални тумори

На Таблица 3 са показани общо разпределението на всички интракраниални лезии, първични интракраниални и глиални подгрупи, а на Таблица 4 на нетуморобемзаемащите процеси.

Табл. 3. Разпределение на всички първични интракраниални тумори

Първични вътречерепни тумори:	№	Интракраниални лезии %	Първични тумори %	Глиални тумори %
Глиобластом	183	22,26%	33,64%	73,49%
Астроцитом 1-2 ст.	24	2,92%	4,41%	9,34%
Астроцитом 3 ст.	14	1,70%	2,57%	5,45%
Глиосарком	3	0,36%	0,55%	1,17%
Епендимом	10	1,22%	1,84%	3,11%
Олигодендроглиом	8	0,97%	1,47%	2,49%
Субепендимом	5	0,61%	0,92%	1,95%
Олигоастроцитом	2	0,24%	0,37%	0,78%

Медулобластом	3	0,36%	0,55%
ЕТМР	3	0,36%	0,55%
Плексус папилом	2	0,24%	0,37%
Менингеом	213	25,91%	39,15%
Аденом на хипофизата	45	5,47%	8,27%
Неврином	12	1,46%	2,21%
Първичен лимфом на ЦНС	7	0,85%	1,29%
Хемангиоперицитом	4	0,49%	0,74%
Хордом	3	0,36%	0,55%
Пинеоцитом	1	0,12%	0,18%
Лейомиосарком	1	0,12%	0,18%
Миофибробластен тумор	1	0,12%	0,18%
Общо първични вътречепни тумори		544	

Табл. 4. Разпределение на интракраниални нетумор обемзаемащи процеси (НТОЗП)

НТОЗП	№	Интракраниални лезии %	НТОЗП %
Мозъчен абсцес	11	1,34%	45,83%
Епидермална киста	7	0,85%	29,17%
Колоидна киста	3	0,36%	12,50%
Лангерхансова хистиоцитоза	1	0,12%	4,17%
Холестеролов гранулом	1	0,12%	4,17%
Демиелинизиращ псевдотумор	1	0,12%	4,17%
Общо НТОЗП	24		

Всички регистрирани видове метастатични ИКТ са без ясна статистическа разлика по отношение на пола, с изключение на полово специфичните като карцином на гърда, простатна жлеза, матка и яйчници.

От 119 случая, които попадат в категорията на метастази от бял дроб, 84,87% (n = 101) са недребноклетъчен карцином, а останалите 15,13% (n = 18) са дребноклетъчен карцином. Недребноклетъчният карцином на белия дроб се разпределя на 69,3% (n = 70) аденокарцином и 30,7% (n = 31) плоскоклетъчен карцином.

От всички 52 случая на интракраниални метастази с неизвестно първично огнище 69,2% (n = 36) са диагностицирани като метастатичен аденокарцином, 21,2% (n = 11) метастатичен плоскоклетъчен карцином, 7,7% (n = 4) метастатични невроендокринни тумори и 1,9% (n = 1) метастатичен алвеоларен сарком на меките тъкани. Общата честота на отделните видове интракраниални метастази по отношение на тяхното първично място, във връзка с всички интракраниални, метастатични и метастази от бял дроб са показани в Таблица 5.

Прегледът на локализацията на метастазите, позволен от биопсичните листи, попълнени от опериращите неврохирурзи и допълнителната медицинска документация, показва, че от всички 254 метастатични тумори 87,80% (n = 223) са супратенториални, а другите 12,20% (n = 31) са инфратенториални (Фигура 3). Не беше открит туморен тип, който има статистически значимо преобладаващо супра- или инфратенториално местоположение на метастазиране в ЦНС.

Табл. 5. Разпределение и честота на всички интракраниални метастази

Метастатични тумори:	№	Вътречерепн и тумори %	Метастатичн и тумори %	Метастази от бял дроб %
Белодробен аденокарцином	70	8,52%	27,56%	58,82%
Белодробен плоскоклетъчен карцином	31	3,77%	12,20%	26,05%
Белодробен дребноклетъчен карцином	18	2,19%	7,09%	15,13%
Меланом	20	2,43%	7,87%	
Коло-ректален карцином	16	1,95%	6,30%	
Карцином на гърда	15	1,82%	5,91%	
Гастро-езофагеален аденокарцином	7	0,85%	2,76%	
Бъбречноклетъчен карцином	7	0,85%	2,76%	
Уротелни карциноми	7	0,85%	2,76%	
Карцином на маточната шийка – плоскоклетъчен	3	0,36%	1,18%	
Ендометриален карциноми	3	0,36%	1,18%	
Аденокарцином на простатна жлеза	2	0,24%	0,79%	
Овариален карциноми	1	0,12%	0,39%	
Левкемична инфилтрация в ЦНС	1	0,12%	0,39%	
Аденокарцином на панкреаса	1	0,12%	0,39%	
Метастази без установено първично огнище:				
Аденокарцином	36	4,38%	14,07%	
Плоскоклетъчен карцином	11	1,34%	4,33%	
Невроендокринен тумор	4	0,49%	1,57%	
Алвеоларен сарком на меките тъкани	1	0,12%	0,39%	
Общо метастази	254			

Средната възраст на пациентите и съотношението мъже/жени за най-често срещаните вписвания са както следва:

Мултиформен глиобластом ($n = 183$) средна възраст $59,18 \pm 13,52$ години, съотношение мъже/жени 1,3:1.

Астроцитом Степен I-II по СЗО ($n = 24$) средна възраст $45,55 \pm 19,94$, съотношение мъже / жени 1,5:1.

Астроцитом СЗО степен III ($n = 14$) средна възраст $56,91 \pm 10,37$, съотношение мъже / жени 1,8:1.

Менингиом ($n = 213$) средна възраст $60,40 \pm 10,95$, съотношението мъже / жени 1:1,8.

Неврином ($n = 12$) средна възраст $61,55 \pm 6,89$, съотношение мъже / жени 1:2,2.

Аденом на хипофизата ($n = 45$) средна възраст $48,17 \pm 4,70$, съотношение мъже / жени 1,05:1. Епендимом ($n = 10$) средна възраст $27,71 \pm 21,36$, съотношение мъже / жени 1,1:1.

Първичен лимфом на ЦНС ($n = 7$) средна възраст $58,50 \pm 7,40$, съотношение мъже / жени 1,4:1 (18).

Метастази от мамарен карцином ($n = 15$) средна възраст $56,83 \pm 10,82$, само при жени.

Метастазите от стомашно-чревния тракт ($n = 32$) средна възраст $64,29 \pm 3,87$, съотношението мъже / жени 1,8:1. Метастази от меланом ($n = 20$) средна възраст $49,15 \pm 14,98$, съотношение мъже / жени 1:1.

Метастази от бял дроб ($n = 119$) средна възрастта $60,82 \pm 8,42$, съотношение мъже / жени 3,1:1.

Урогенитални метастази, включително типовете ракови заболявания, специфични за пола ($n = 25$), средна възраст $62,33 \pm 7,32$, съотношение мъже / жени 1,2:1.

Абсцес на ЦНС ($n = 11$) средна възраст $57,67 \pm 17,31$ години, съотношение мъже / жени 2,7:1 (Фигура 6).

Въз основа на описателния анализ и общото население на регионите, чието неврохирургично лечение е поемано от посочените в анализа медицински институции (около 1 800 000 души), годишната честота на 100 000 души от глава на населението на всички ИКТ е 9,12, включващи 6,03 на 100 000 за първични ИКТ, 2,82 на 100 000 за метастатични ИКТ и 0,27 на 100 000 за НТОЗП. Годишната честота на най-често диагностицираните първични ИКТ на 100 000 е 2,36 за менингиома и 2,03 за глиобластом.

Годишната честота на най-често диагностицираните метастатични ИКТ на 100 000 е 1,32 за метастатичен белодробен карцином, 0,28 за стомашно-чревни метастази, 0,22 за меланом и 0,17 за метастази от рак на гърдата.

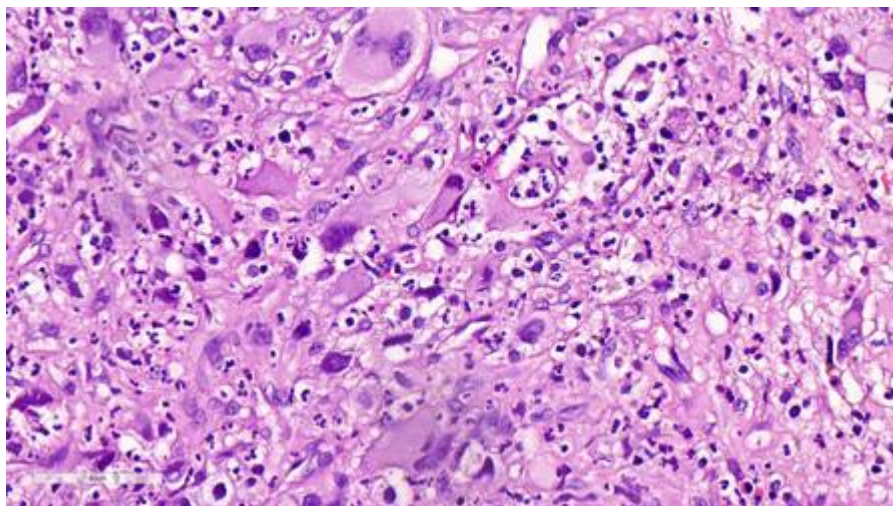
5.2. Морфологична диагностиката на GBM и предизвикателства свързани с мимикрия за епителни маркери (СК AE1/AE3)

От нашия опит и поради наличието на данни за мимикрия на епителни маркери, най-вече СКАЕ1/АЕ3, бе предприет анализ на част от случаите, за съществуваща такава в нашата група пациенти (19). Бяха

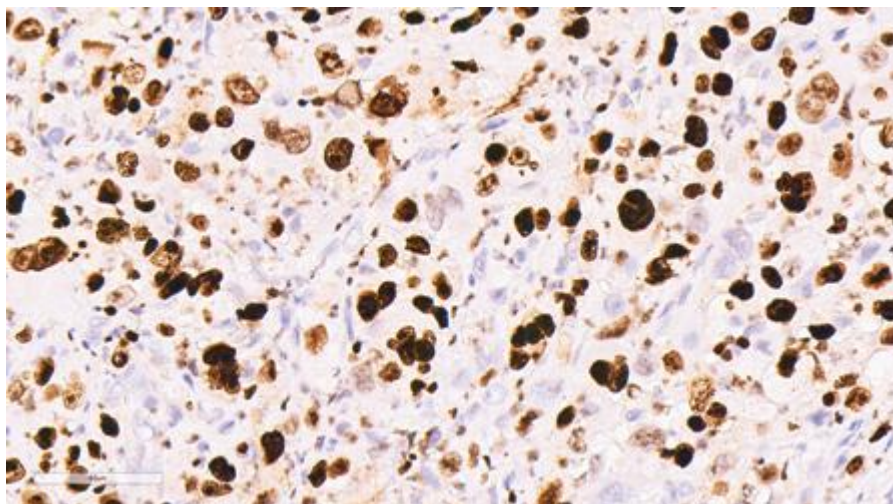
подбрани и тествани десет случая на мултиформен глиобластом от диагностичната практика на УМБАЛ „Св. Марина“, Варна, България спрямо GFAP и СКАЕ1/АЕ3, като бе търсена корелация, представляваща диагностично предизвикателство.

Както се очакваше, всичките десет случаи на мултиформен глиобластом показаха интензивно положителна цитоплазмена реакция за GFAP (Фигура 8). Само два от тези случаи, обаче останаха напълно отрицателни за СК АЕ1 /АЕ3.

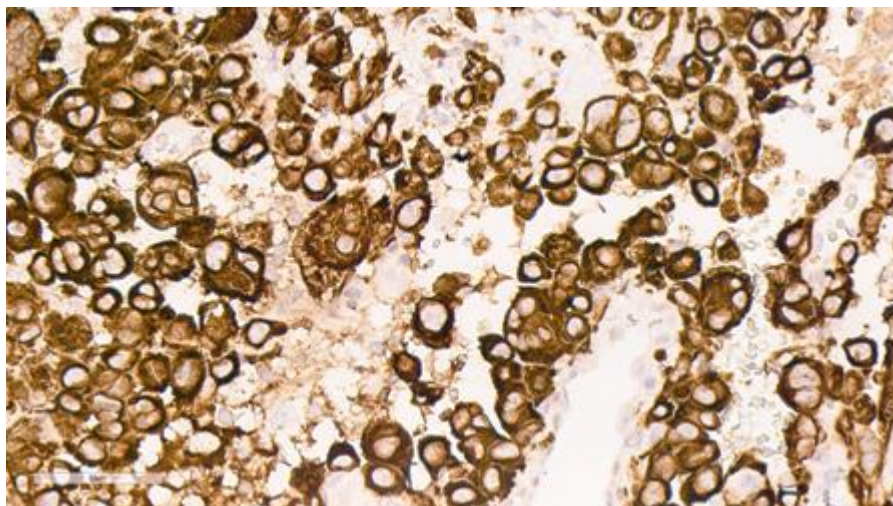
Осем от десетте случаите мултиформен глиобластом показаха различна интензивност в реакция с така наречения панепителен коктейл СК АЕ1/АЕ3, който не се експресира в нормални астроцити. Пет от тези осем случая имаха слаба положителна реакция във всички туморни клетки или неравномерна реакция в част от туморните клетки с антитялото СК АЕ1/АЕ3, която съответства на недиагностична стойност. Останалите три случая на мултиформен глиобластом, показаха интензивна цитоплазмена реакция с СК АЕ1/АЕ3, която би се приела за диагностично значима, ако се разгледа извън контекста на GFAP . На Фигура 11 сме показали на случай на GBM с изразена анаплазия, на Фигура 12 експресия на пролиферативния му индекс Ki67 и на Фигура 13 интензивна цитоплазмена реакция за СК АЕ1/АЕ.



Фиг. 11. Мултиформен глиобластом.
Оцв. с ХЕ. Увеличение $\times 200$.

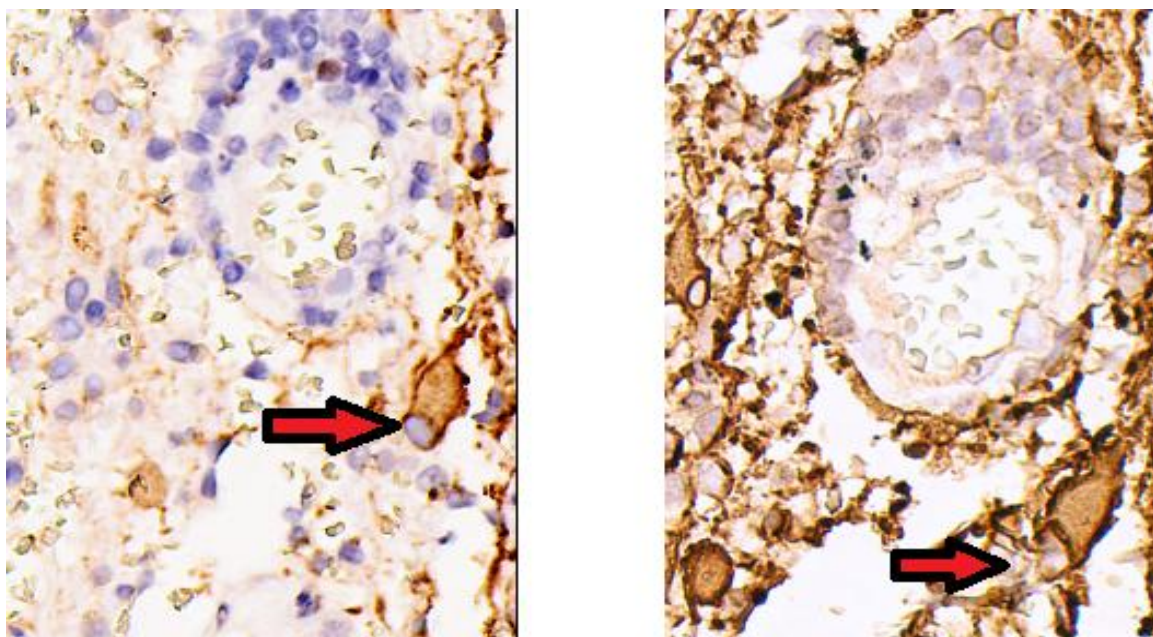


Фиг. 12. Висок Кi-67 пролиферативен индекс на Мултиформен
глиобластом. Оцв. с ХЕ. Увеличение $\times 200$.



Фиг. 13. Интензивна цитоплазмена експерсия на СКАЕ1/СКАЕ3 при мултиформен глиобластом. Оцв. с ХЕ. Увеличение $\times 200$.

При ИХХ оцветяване на последователни срези от описания случай беше добре видимо, че положителни туморни клетки за СК АЕ1/АЕ3 са също положителни и за GFAP (Фигура 11)

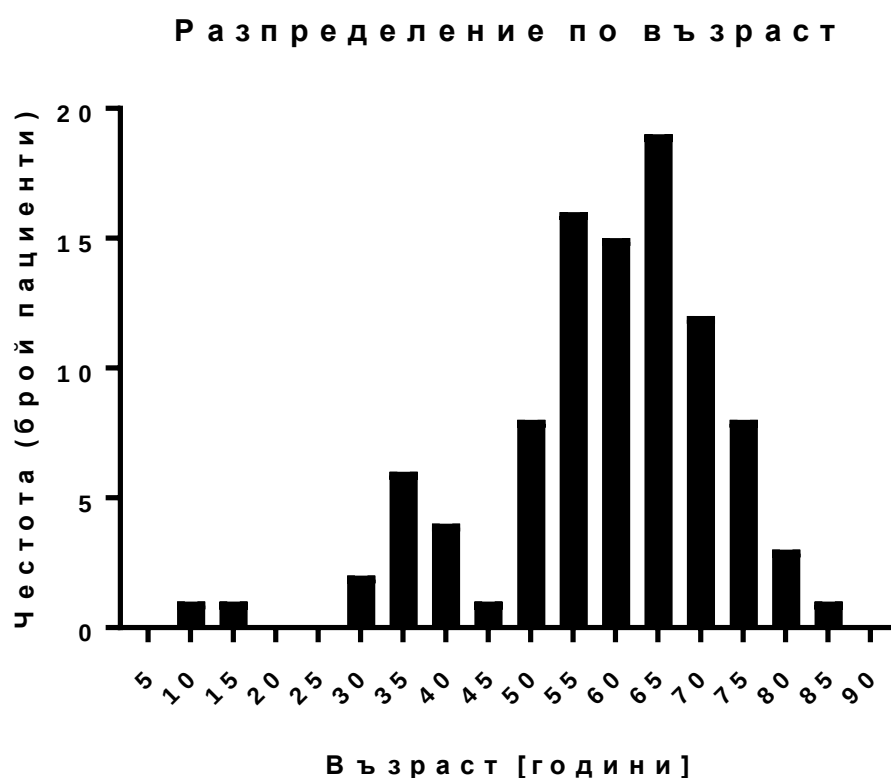


Фиг. 14. Идентични туморни клетки с интензивна цитоплазмена експресия на СКАЕ1/АЕ3 и GFAP при последователни серийни срези обозначени с червена стрелка при GBM. Увеличение $\times 400$.

5.3. Клинико - морфологични характеристики на изследваните пациенти с глиоми

5.3.1. Възраст на пациентите

Впоследствие, изследвахме материали от 97 пациенти, за които имахме информация за преживяемостта им, със средна възраст $58,82 \pm 13,60$ год., като най-младият пациент е на 7,6 години, а най-възрастният - на 87,2 години. От всички пациенти, най-голям брой случаи бяха на глиобластом 81(83,5%), следвани съответно от 10(10,3%) случая на астроцитом II степен и 6(6,2%) анапластичен астроцитом III степен.

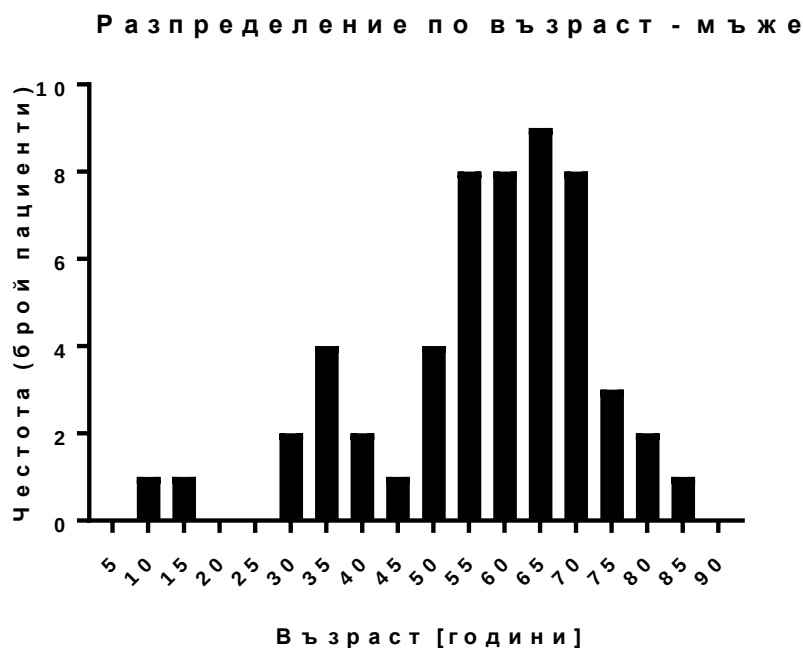


Фиг. 15. Разпределение на всички пациенти по възраст

От разпределението е видно, че се наблюдават два пика, малка група около 35 годишна възраст и преобладават пациенти в диапазона между 50-75 години в нашето изследване, което е обяснимо поради явно превалиращия брой на GBM, който се наблюдава предимно при по-възрастни пациенти (Фиг. 6).

5.3.2. Пол на пациентите

В изследваната група доминира мъжкият пол – 54 от случаите (55,7%), докато жените са 43 (44,3%). Статистически глиалните тумори са малко по-чести в мъжкия пол, както се наблюдава и в нашето изследване (1). Разпределението им по възраст е показано на (Фиг. 7) за мъже средна възраст $57,5 \pm 15,7$ и за жени $60,5 \pm 10,3$ (фиг. 8). В двете групи според пола доминиращата възрастова група е между 50 и 75 години.



Фиг. 16. *Разпределение на всички мъже по възраст*

При анализ на разпределението по възраст на мъже се наблюдава същия пик от малка група пациенти около 35 годишна възраст и преобладаване на пациенти след 50 годишна възраст.

5.3.3. Преживяемост на пациентите

От изследваните 97 пациенти независимо от пола, трима са изключени от статистическата обработка за преживяемост поради това, че двама от пациентите са живи, а един е починал в деня на извършената неврохирургична интервенция.

5.3.3.1 Обща преживяемост на всички пациенти с глиоми

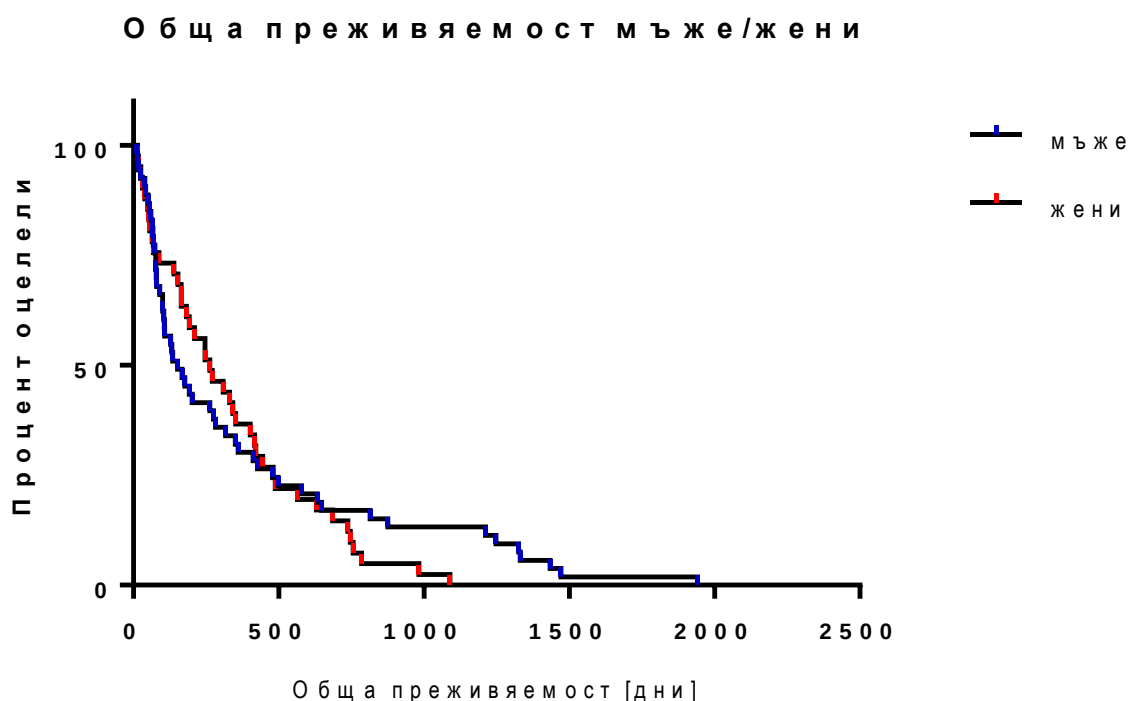
Медианата на преживяемостта при изследваните 94 пациента е 197,5 дни или близо седем месеца. Този резултат е следствие също на големия брой пациенти в групата с GBM и потвърждава неблагоприятния изход при този вид неоплазии. Графично сме представили тези данни на Фигура 17.



Фиг. 17. Обща преживяемост на всички пациенти с глиоми

5.3.3.2. Зависимост между пациентите според пола и общата им преживяемост

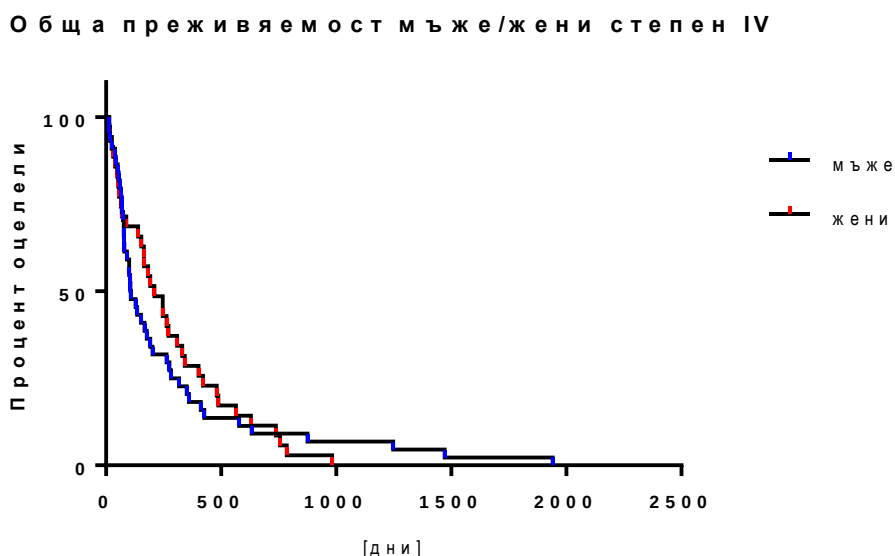
При сравняване на същия брой пациенти според пола няма статистическа значима разлика (*Gehan-Breslow-Wilcoxon test* $p=0,61$; $p>0,05$) в общата преживяемост, като единични случаи от мъжки пол живеят по-дълго, но независимо от това медианата на преживяемостта в женския пол е 263 дни спрямо медианата за мъжкия от 152 дни, което е близо два пъти повече. Данните са представени на Фигура 18.



Фиг. 18. Обща преживяемост на всички пациенти с глиоми според пола.
(*Gehan-Breslow-Wilcoxon test* $p=0,61$; $p>0,05$)

5.3.3.3 Корелация на пациентите според пола и общата им преживяемост само за GBM

При сравняване на 79 пациенти (двама изключени, като единия е жив към момента на анализа (20), а втория починал в същия ден на хирургичната интервенция) според пола само с диагноза GBM също открихме, че няма статистически значима разлика (*Gehan-Breslow-Wilcoxon test* $p=0,68$; $p>0,05$) в общата преживяемост, като съотношението между медианата на преживяемостта между женския (210 дни) и мъжкия пол (108 дни) се запазва приблизително еднакво с общата група тумори, но очаквано е по-ниска с приблизително два месеца. Данните са представени на Фигура 19.

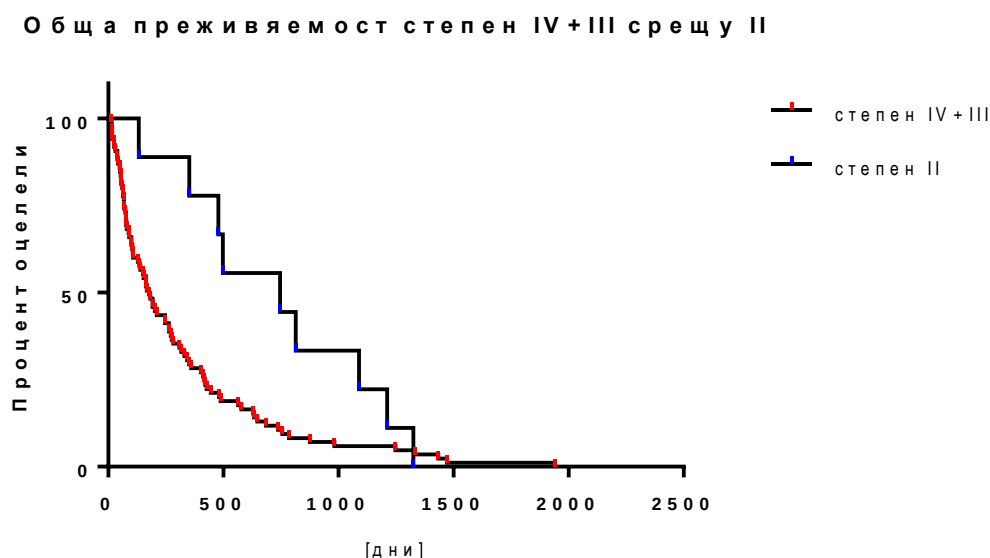


Фиг. 19. Обща преживяемост на пациенти само с GBM според пола.
(*Gehan-Breslow-Wilcoxon test* $p=0,68$; $p>0,05$)

5.3.3.4. Сравняване на случаи между нискостепенни глиоми (II степен по СЗО) и високостепенни глиоми (III, IV степен по СЗО) спрямо общата им преживяемост

При сравняване на 94 пациента с нискостепенни (9 случая с WHO II) и високостепенни (85 случая с WHO III-IV) глиоми по отношение на

общата преживяемост, установихме статистически значима разлика (*Gehan-Breslow-Wilcoxon test* $p=0,0063$; $p<0,01$), като при пациентите с ниска степен на малигненост медианата на преживяемостта е 746 дни, а при тези с висока 177 дни, разлика от 18,9 месеца или почти две години повече, което показва че степента на диференциация има определящо значение за прогнозата при тези тумори. Отчитаме като ограничение в тази статистическа извадка сравнително малкия брой на пациентите с нискостепенни глиоми. Данните са представени на Фигура 20.

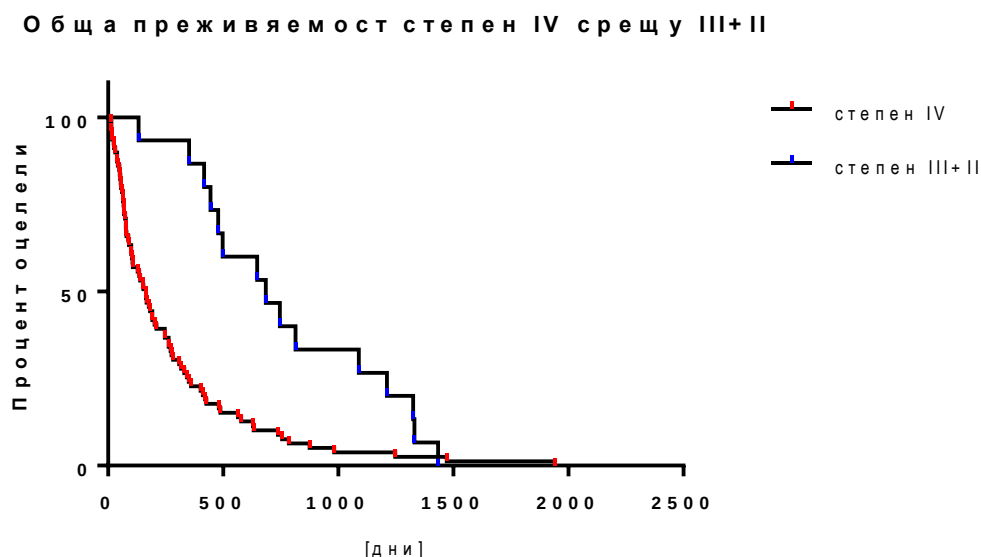


Фиг. 20. *Обща преживяемост на пациенти с високостепенни и нискостепенни глиоми (*Gehan-Breslow-Wilcoxon test* $p=0,0063$; $p<0,01$).*

5.3.3.5. Сравняване на случаи между GBM (WHO IV) и неглиобластомни тумори (WHO grade II, III) спрямо общата им преживяемост

Интересни резултати се получиха при сравняване на GBM (80 случая) с неглиобластомни тумори (15 случая) с много изразена статистическа значимост (*Gehan-Breslow-Wilcoxon test* $p<0,0001$), при което медианата на преживяемостта на пациентите с GBM е 164 дни, а при неглиобластомни тумори 686 дни, разлика съотнесима с предходното

сравняване на нискостепенни и високостепенни глиоми. Това потвърждава най-агресивния характер на GBM по отношение на лошата прогноза при пациентите с тези тумори. Данните са представени на Фигура 21.



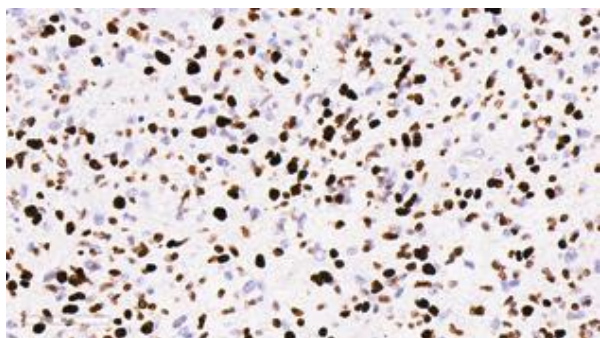
Фиг. 21. Обща преживяемост на пациенти с високостепенни и нискостепенни глиоми (Gehan-Breslow-Wilcoxon test $p < 0,0001$).

5.4. Оценка на експресия на прогностични фактори

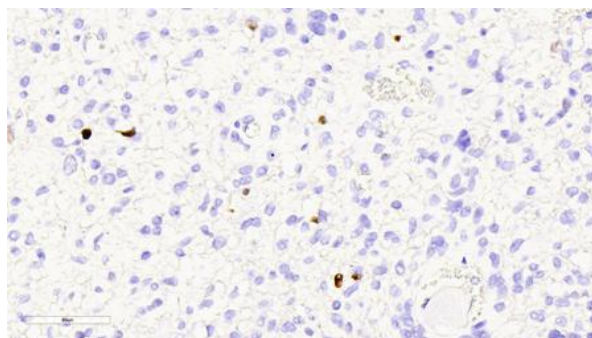
5.4.1. Оценка на експресия според пролиферативния индекс Ki-67%

Ki-67% е ядрен маркер пряко свързан с пролиферацията на туморните клетки, като за 9 пациенти с астроцитом II степен средния пролиферативен индекс е 3,0% в диапазон от 1,0% до 10,0%, за 5 случая с анапластичен астроцитом III степен 17,0% в диапазон от 1,0% до 35,0%, за 61 случая с GBM IV степен средна стойност 22,0% от 2,0% до 80,0%. Разнообразието в пролиферативния индекс се наблюдава и при други

подобни изследвания, като пролиферативния индекс се увеличава за всяка следваща група по степен на малигненост. (21).



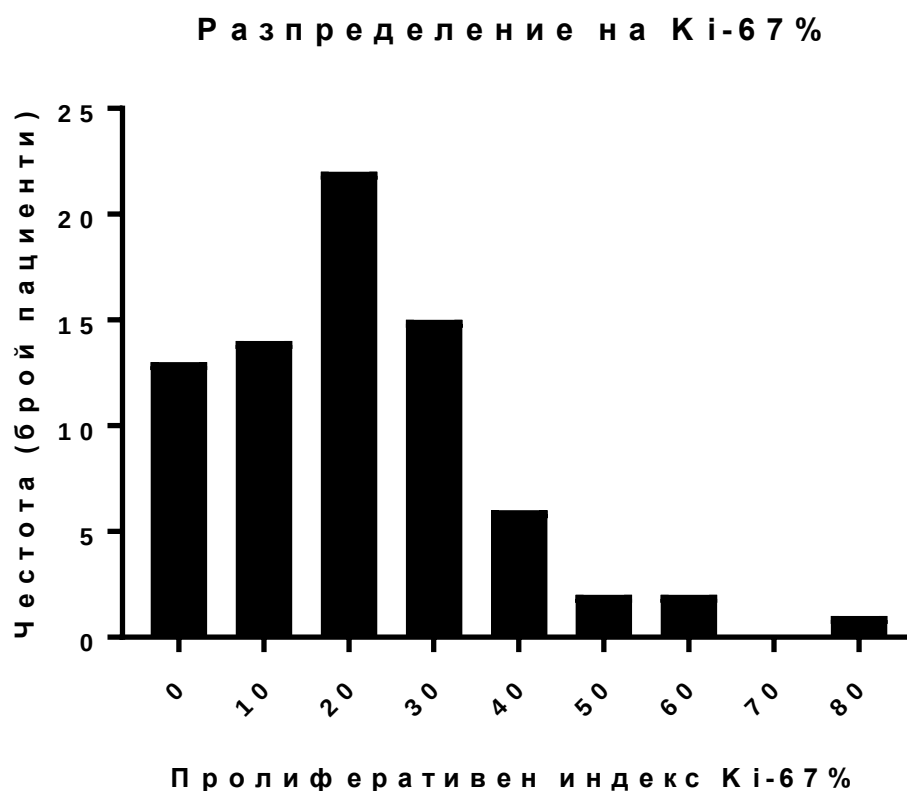
Фиг. 22. Висока експресия на Ki-67 при GBM. Имунохистохимично изследване с анти Ki-67. Увеличение $\times 200$.



Фиг. 23. Ниска експресия на Ki-67 при GBM. Имунохистохимично изследване с анти Ki-67. Увеличение $\times 200$.

5.4.1.1. Разпределение на всички случаи според процента на пролиферативния им индекс

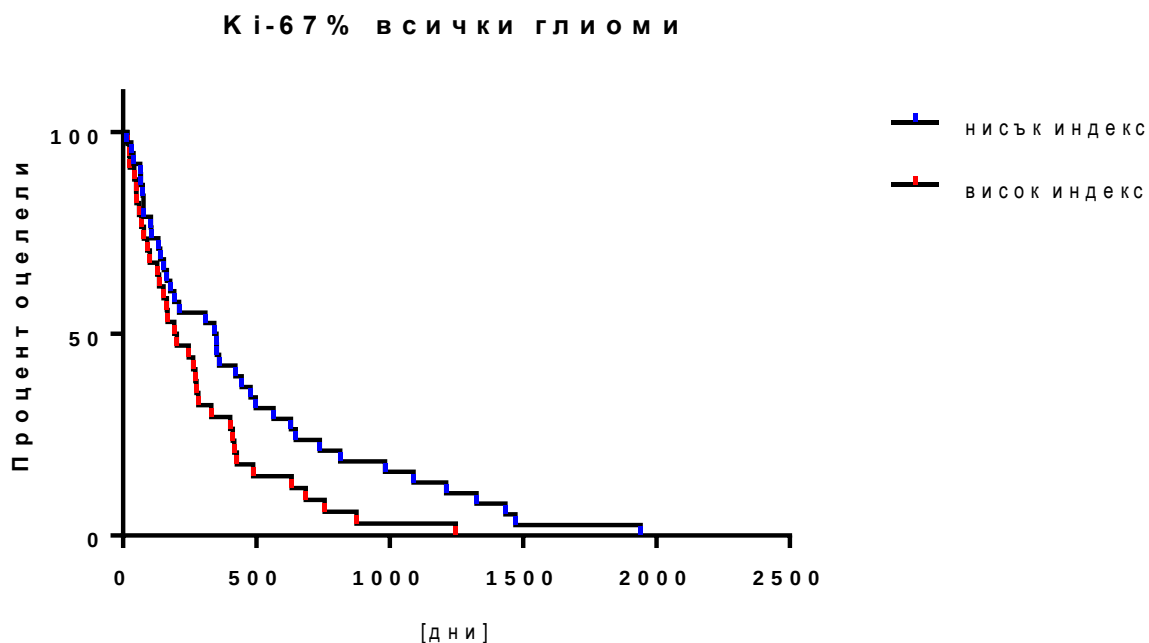
При статистическа обработка на 75 случая според процента на пролиферативния им индекс - Ki-67% установихме липса на нормално разпределение на групата с доминиране на пациентите до 40% пролиферативен индекс и средна стойност 20,1% със стандартна девиация от 15,7% и медиана от 15% с диапазон от 1,0% до 80,0. Тези резултати се дължат на големия процент високостепенни глиоми и по-конкретно GBM и потвърждават разнообразието в пролиферативния индекс при тези глиоми от други проучвания (22).



Фиг. 24. Разпределение на всички пациенти с глиоми според пролиферативния индекс Ki-67.

5.4.1.2 Оценка на влиянието на експресията на Ki-67% в туморна тъкан спрямо общата преживяемост на пациентите с глиоми

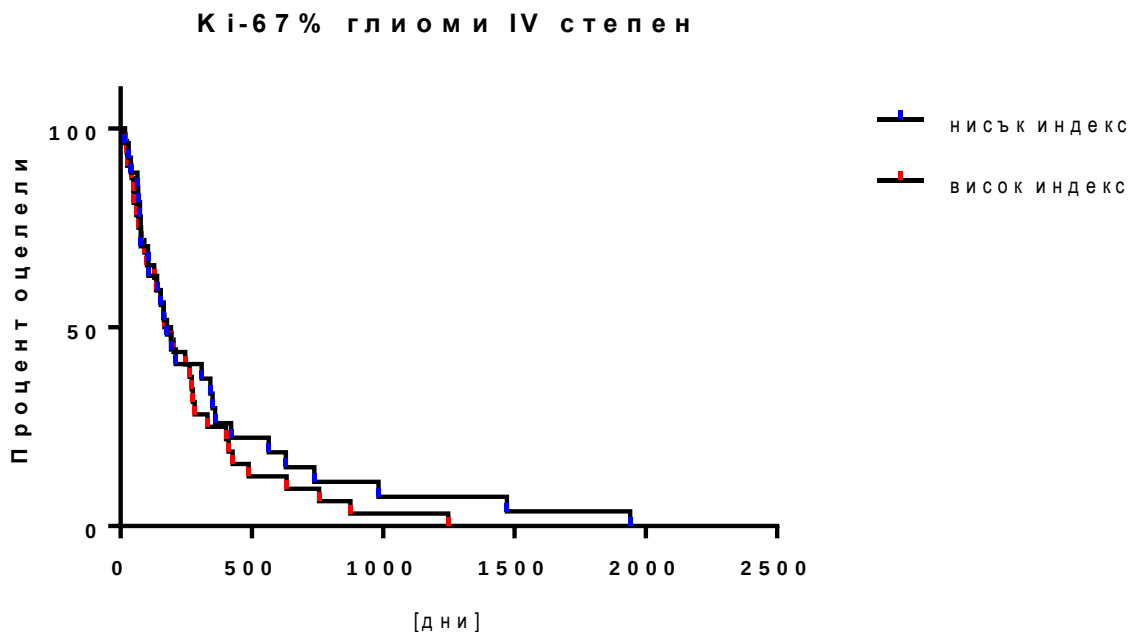
В нашето проучване с избрана разделителна граница от 17,9% на група с висока и ниска експресия се наблюдава равномерно разделение на случаите, от които 38 случая са с нисък процент на експресиращи клетки, а 34 с висок. При обработка на данните установихме статистически значима разлика в преживяемостта или с тенденция към такава според втория метод (*Log-rank test* $p=0,0363$; $p<0,05$, *Gehan-Breslow-Wilcoxon test* $p=0,1083$; $p>0,05$), като пациентите с нисък процент експресия медианата на преживяемостта е 346,5 дни, а тези с висок 197,5 дни, разлика от почти пет месеца. Данните са представени на Фигура 25.



Фиг. 25. Обща преживяемост прямо пролиферативния индекс на Ki-67% за всички степени глиоми. (Log-rank test $p=0,0363$; $p<0,05$, Gehan-Breslow-Wilcoxon test $p=0,1083$; $p>0,05$).

5.4.1.3 Оценка на пролиферативния индекс при GBM спрямо общата преживяемост

При последващо изследване на 59 пациенти само с GBM, при които за разделителен праг приехме 17,9%, при медиана 15,8% за отграничване на групите превалира високия процент на Ki-67% (32 висок и 27 нисък) и не се наблюдава статистически значима разлика в преживяемостта (*Gehan-Breslow-Wilcoxon test* $p=0,67$; $p>0,05$), като медианата на преживяемостта е почти еднаква в двете групи - 201,5 дни за нисък и 197,5 дни за висок процент. Тези данни потвърждават други подобни изследвания за преживяемостт за GBM по този показател (22). Данните са представени на Фигура 26.

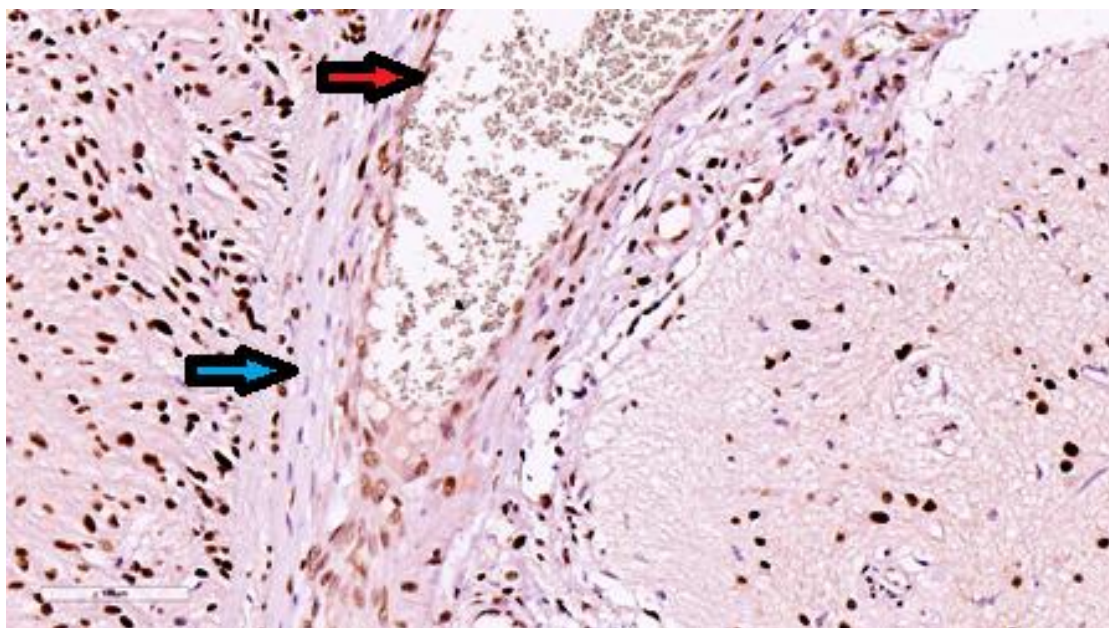


Фиг. 26. *Kaplan-Meier* криви на обща преживяемост спрямо тъканните нива на експресия на Ki-67 само за GBM (Gehan-Breslow-Wilcoxon test $p=0,67$; $p>0,05$).

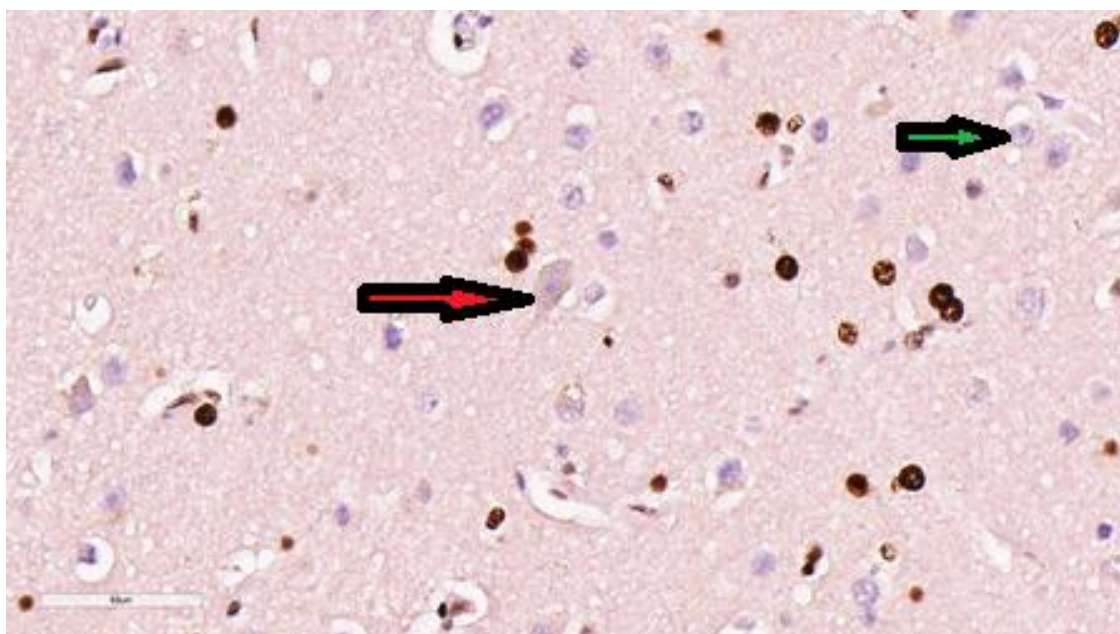
5.4.2. Оценка на тъканната експресия на ZBTB20 при глиални тумори и корелиращите с нея фактори

Осъществихме имунохистохимични оцветявания за да оценим експресията на транскрипционен фактор ZBTB20 в биопсии от глиални тумори (Таблица 2, секция 4.1.2., стр. 48). Както се очаква за ядрена молекула, какъвто е този протеин, открихме в огромно болшинство случаи ядрен тип оцветяване (Фиг. 33 и Фиг. 34). Забелязахме и, че интензивността на оцветяване е различна в ядрата на туморните клетки от глиоми с различна степен на диференциация, както и в нетуморни клетки: ендотелни, гладкомускулни и имунни.

В зони на околния на тумора мозъчен паренхим се експресират с различна интензивност астроцити, но липсва такава в неврони и олигодендроцити (фиг. 28).

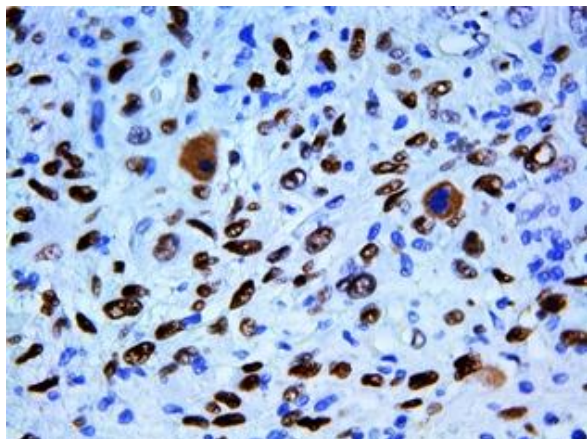


Фиг. 27. Експресия на ZBTB20 в нетуморни клетки, с червена стрелка е обозначен ендотел с умерена експресия и синя стрелка медия с гладкомускулни клетки с умерена експресия. Увеличение $\times 200$

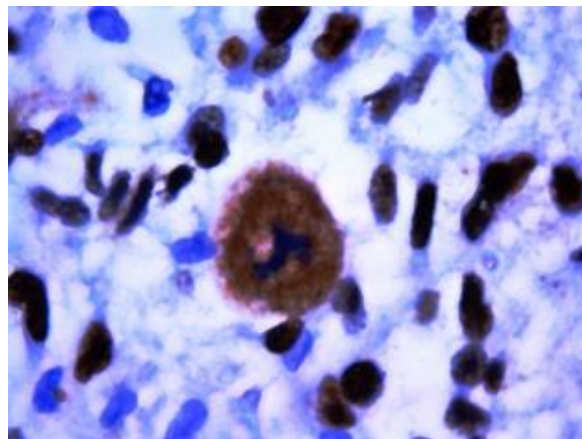


Фиг. 28. Липсва експресия на ZBTB20 в неврони (червена стрелка) и глиални клетки (зелена стрелка) в перитуморна мозъчна тъкан. Увеличение $\times 200$.

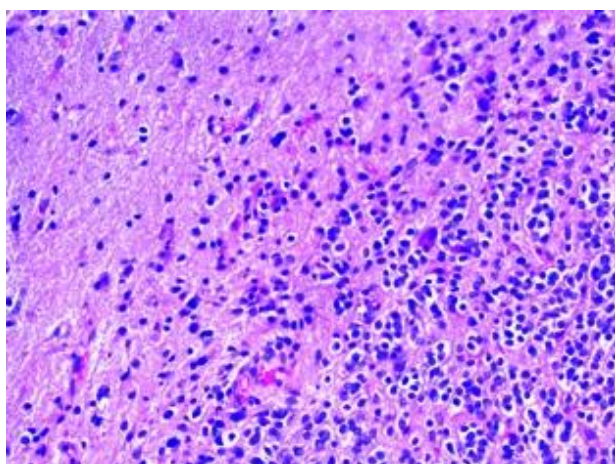
Освен преобладаващата ядрена експресия на ZBTB20, наблюдавахме в редки случаи и цитоплазмен тип експресия (Фиг. 29 и Фиг. 30), само при някои GBM.



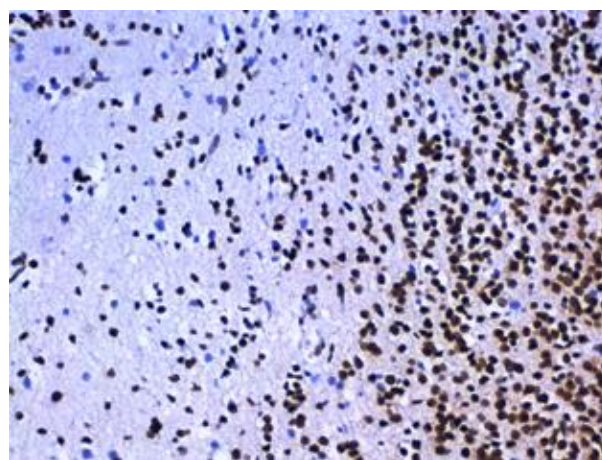
Фиг. 29. Цитоплазмена експресия на ZBTB20 в туморни клетки на GBM. Увеличение $\times 200$.



Фиг. 30. Цитоплазмена експресия на ZBTB20 в туморни клетки на GBM. Увеличение $\times 400$.



Фиг. 31. Преходна зона на глиален тумор с олигодендроглиален фенотип и околна мозъчна тъкан. Оцветяване с ХЕ. Увеличение $\times 200$.

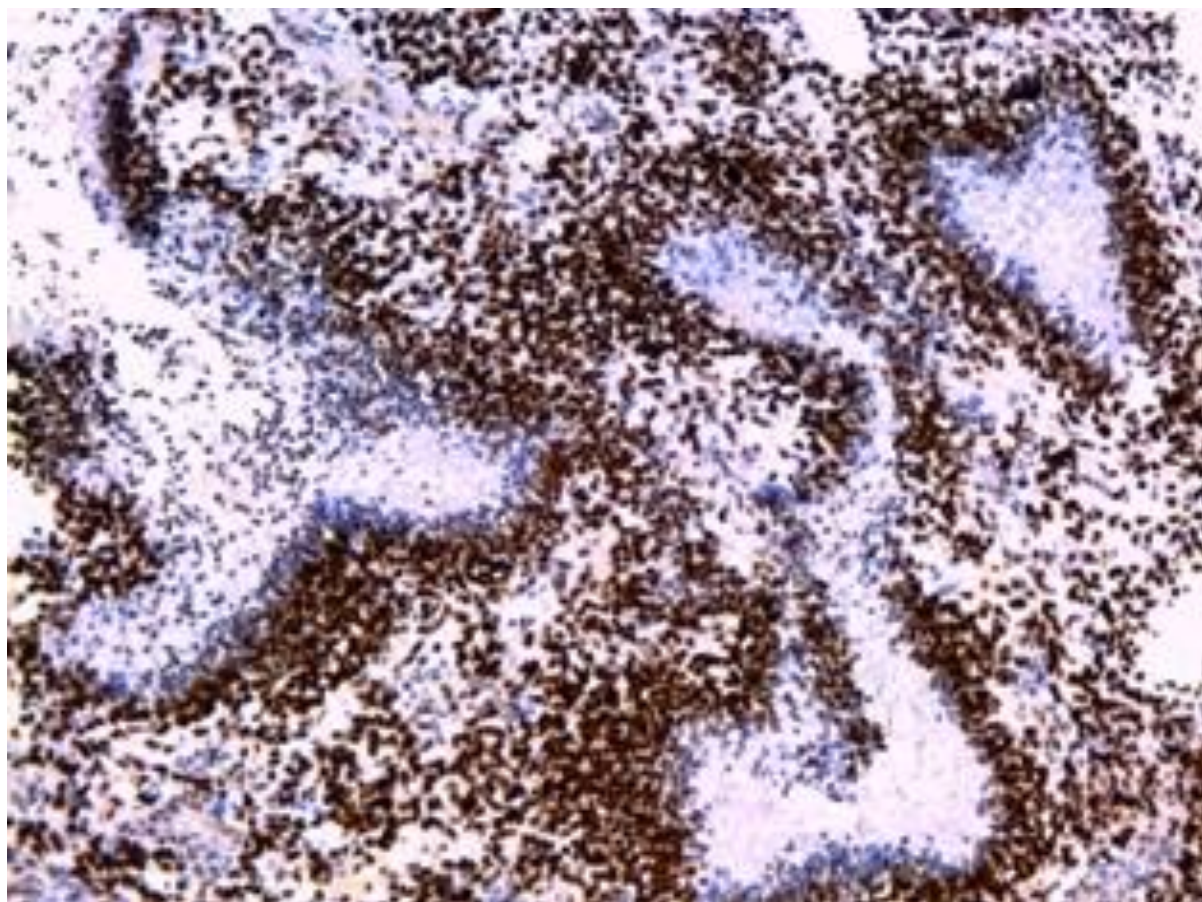


Фиг. 32. Преходна зона на глиален тумор с олигодендроглиален фенотип и околна мозъчна тъкан. ИХХ с анти-ZBTB20. Увел. $\times 200$.

В тумори с олигодендроглиален фенотип, наблюдаваме интензивна експресия на транскрипционния фактор ZBTB20 в ядрата на туморните клетки. На Фиг. 31 и Фиг. 32 сме показали гранична зона на тумор с

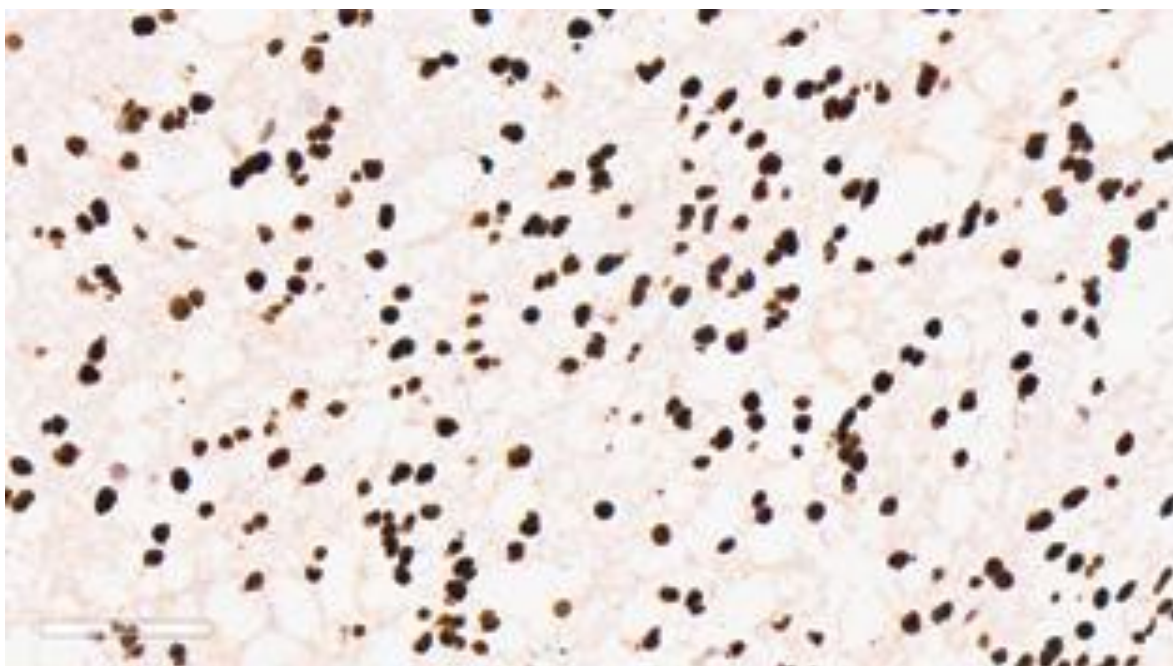
олигодендроглиален фенотип с инвазия в околния мозъчен паренхим и висока експресия на ZBTB20. Експресия на ZBTB20 при глиоми с различна степен на диференциация е илюстрирана на Фиг. 33 с GBM и Фиг. 34 с нискостепенен глиом (астроцитом II степен).

Висока експресия се наблюдава и във високостепенни глиоми като при глиобластом с характерни псевдопаписадни некрози.



Фиг. 33. Интензивна ядрена експресия в туморните клетки за ZBTB20 при GBM с патогномонични псевдопаписадни некрози. Увеличение $\times 200$.

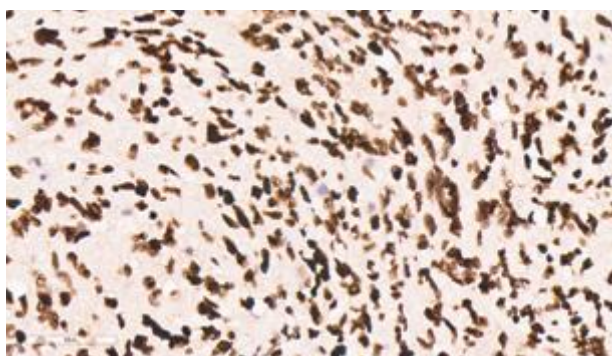
В нискостепенни глиоми, също наблюдаваме случаи на високостепенна експресия.



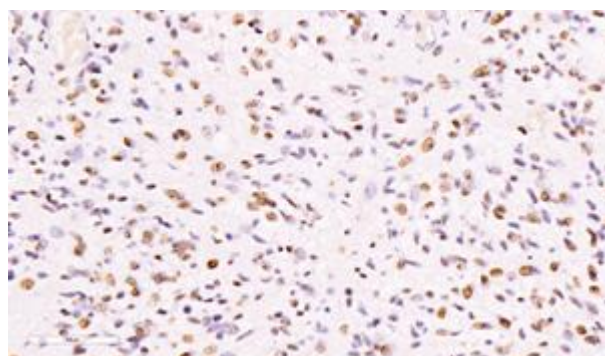
Фиг. 34. Интензивна ядрена експресия в туморните клетки за ZBTB20 при нискостепенен глиом (дифузен астроцитом II степен). Увеличение $\times 200$.

В морфологично идентични глиоми с еднаква степен на диференциация открихме различен процент експресиращи туморни клетки за ZBTB20, както и различна интензивност на експресия на туморните клетки в тъканта.

Случаи с висока и ниска степен на експресия на ZBTB20 при GBM са илюстрирани на Фигури 36 и 37.



Фиг. 35. Интензивна ядрена експресия в туморните клетки за



Фиг. 36. Слаба до умерена ядрена експресия в туморните клетки за

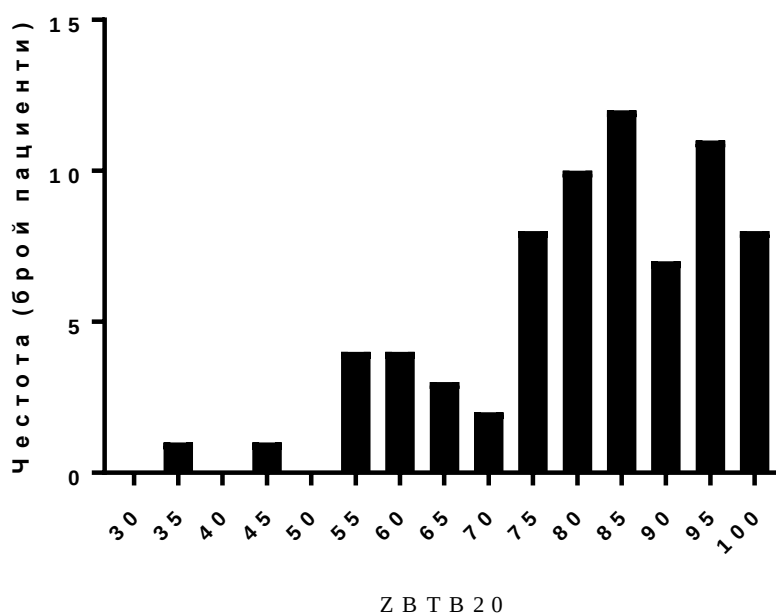
ZBTB20 при GBM. Увеличение $\times 200$. ZBTB20 при GBM. Увеличение $\times 200$.

5.4.2.1. Оценка на експресията на туморната тъкан според процент експресиращи клетки за транскрипционен фактор ZBTB20

5.4.2.1.1. Разпределение на пациентите според процент експресия на клетките в туморната тъкан за ZBTB20

При оценка на случаите с глиоми според процента на позитивни клетки в туморната тъкан с експресия за ZBTB20 получихме неправилно разпределение на пациентите. Почти всички стойности са с над 50% експресия, като доминират случаите с висок процент над 75%.

Хистограма за ZBTB20 според % клетки



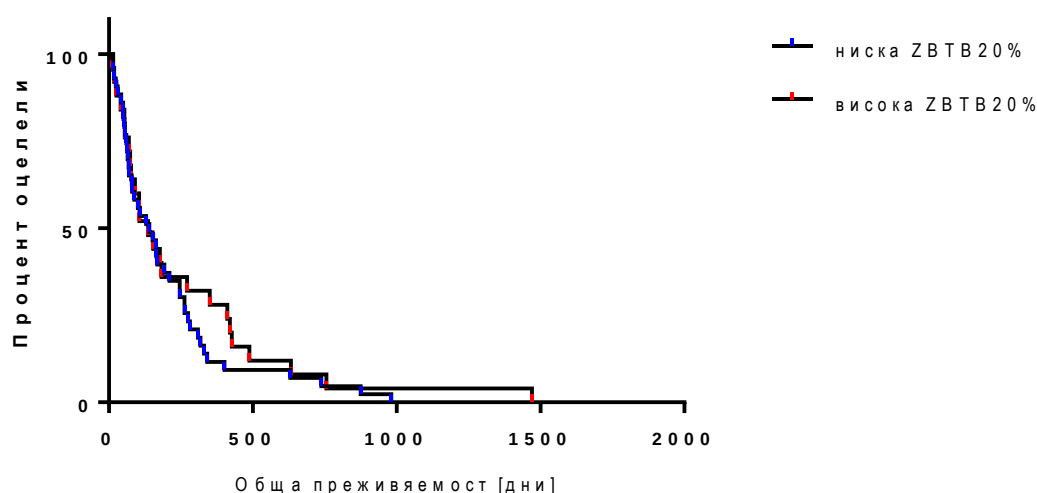
Фиг. 37. *Разпределение на всички пациенти с глиоми според процент клетки експресиращи ZBTB в туморната тъкан.*

5.4.2.1.2. Оценка на зависимостта между процента на експресия на ZBTB20 в туморната тъкан и преживяемостта.

Избрахме праг за разделение на групите от стойност 87 близка до медианата, която е 84, при средна стойност $81,3 \pm 14,4$.

При получените резултати не наблюдаваме статистическа значимост по отношение на общата преживяемост на пациентите според процента на експресия за ZBTB20 в туморната тъкан, като медианата на преживяемостта е почти еднаква съответно 146 дни за нисък процент и 136 дни за висок (*Gehan-Breslow-Wilcoxon test* $p=0,63$; $p>0,05$).

ZBTB20 според % ниска/висока експресия



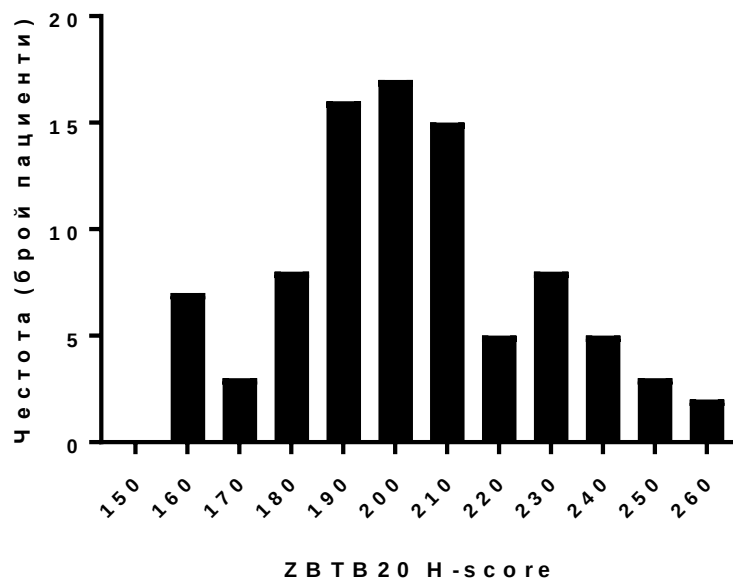
Фиг. 38. Обща преживяемост на всички пациенти с глиоми според процент клетки експресиращи ZBTB в туморната тъкан (*Gehan-Breslow-Wilcoxon test* $p=0,63$; $p>0,05$).

5.4.2.2. Оценка на интензивност на експресията на туморната тъкан според H-score на ZBTB20

5.4.2.2.1. Разпределение на пациентите според стойностите на H-score на ядрена експресия на туморната тъкан за ZBTB20.

При изследване на 89 пациенти разпределени по ZBTB20 H-score на туморната тъкан отбелязахме нормално разпределение при средна стойност $202,8 \pm 24,0$. Медиана на ZBTB20 H-score бе 201,8, а най-ниската стойност бе 155,0 и най-високата 257,4.

Разпределение на ZBTB20 H-score всички глиоми

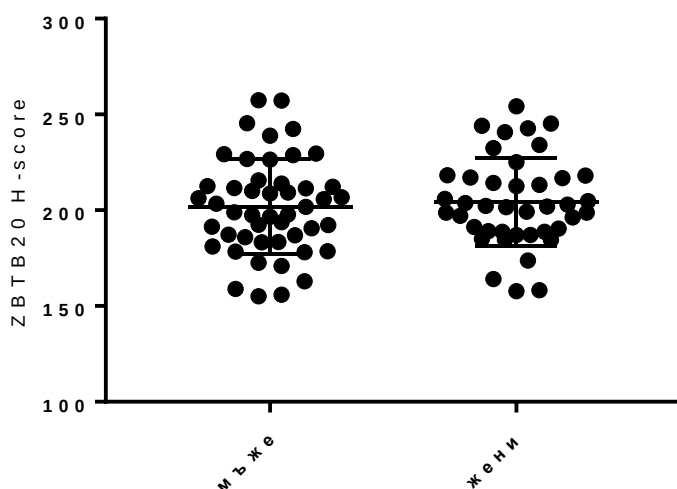


Фиг. 39. Разпределение на всички пациенти с глиоми според интензивността на експресия определена чрез H-score ZBTB в туморната тъкан.

5.4.2.2.2. H-score експресия на ZBTB20 при мъже и жени

При изследване на експресията между двата пола не се установи статистически значима разлика (*Mann-Whitney test* $p=0,57$; $p>0,05$), като медианите са съответно 201,8 за мъжкия пол и 201,6 за женския. Следователно няма статистически значима междуполова разлика в експресията на ZBTB20 при глиоми.

Разпределение H-score ZBTB20 мъже и жени



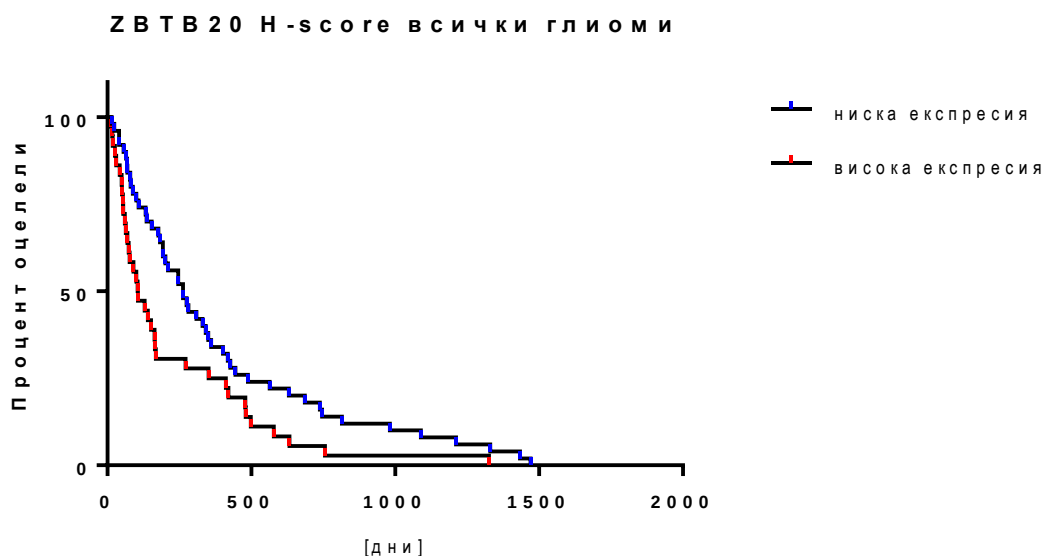
Фиг. 40. Разпределението на ZBTB20 според H-score експресията при мъже и жени (Mann-Whitney test $p=0,57$; $p>0,05$).

5.4.2.2.3. Корелация между силата на експресия на ZBTB20 и общата преживяемост на пациентите с глиомни тумори.

Извърши се изследване на силата на експресия на ZBTB20 при 86 случаи на глиални тумори, изчислена чрез H-score. Данните, получени за всеки пациент бяха корелирани с общата преживяемост на пациентите. Пациентите се разделиха на две групи: 1) случаи с ниска експресия на ZBTB20 (50 случая) и 2) случаи с висока експресия на ZBTB20 (36 случая). За граница се прие стойност на H-score от 204,00, близка до медианата 201,67, като при тази граница има максимално значимо разделяне между групите с ниска и висока експресия.

Беше извършен анализ на преживяемостта на същите 86 пациента. Пациентите с високи нива на експресия в туморната тъкан имат по-кратка медиана на общата преживяемост (106 дни) в сравнение с пациенти с ниска ядрена експресия на ZBTB20 в тумора (263 дни) (Gehan-Breslow-Wilcoxon test $p=0,0076$; $p<0,01$). Следователно пациенти с ниска експресия на

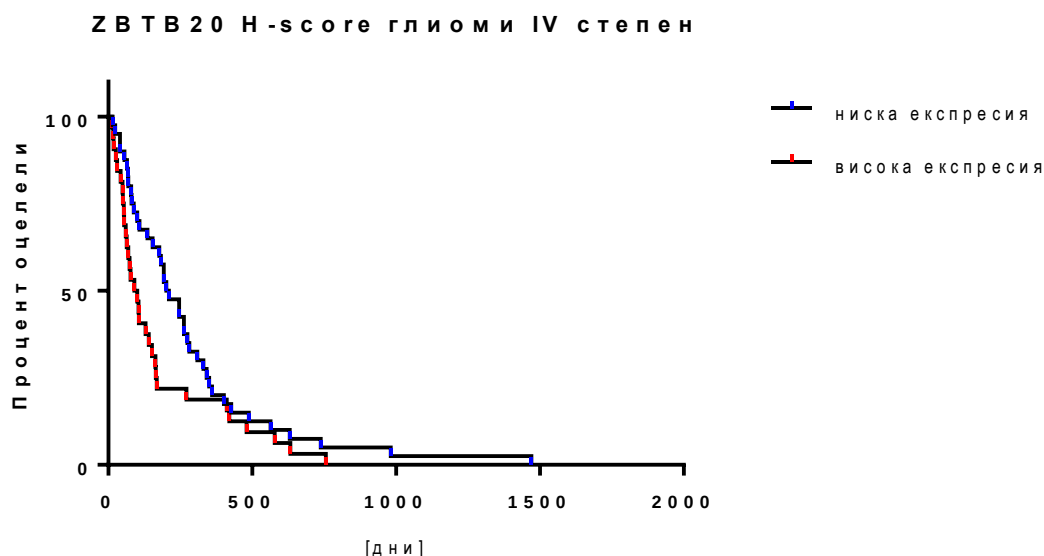
ZBTB20 имат преживяемост 5,3 месеца повече. Резултатите са илюстрирани на Фиг. 41.



Фиг. 41. *Обща преживяемост спрямо тъканните нива на експресия на ZBTB20 при пациенти с ниска и висока експресия (Gehan-Breslow-Wilcoxon test $p=0,0076$; $p<0,01$).*

5.4.2.2.4. *Зависимост между силата на експресията на ZBTB20 и общата преживяемост на пациенти с GBM (глиом степен IV по C3O).*

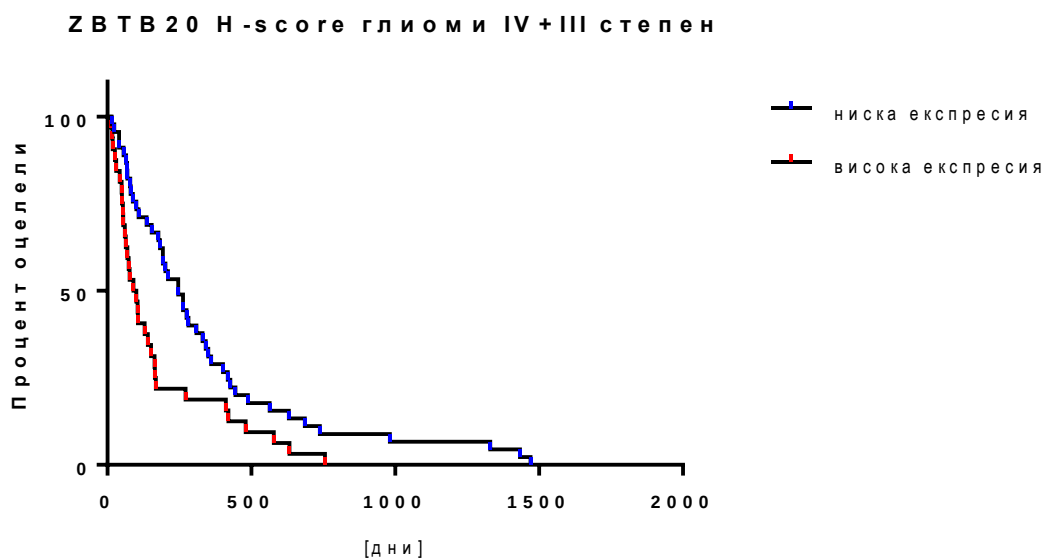
При 72 от горепосочените 86 пациента беше поставена диагнозата GBM. Ние оценихме зависимостта между силата на експресия на ZBTB20 в туморната тъкан и общата преживяемост. Изследването показва, че пациентите с високи нива на ядрена експресия на ZBTB20 имат значимо по-кратка медиана на общата преживяемост (96 дни) в сравнение с пациенти с ниска експресия на ZBTB20 (206 дни) (Gehan-Breslow-Wilcoxon test $p=0,0136$; $p<0,05$), с разлика от 3,7 месеца. (Фиг. 42).



Фиг. 42. *Обща преживяемост спрямо тъканите нива на експресия на ZBTB20 при 72 пациентана с GBM (Gehan-Breslow-Wilcoxon test $p=0,0136$; $p<0,05$).*

5.4.2.2.5. Зависимост между силата на експресията на ZBTB20 и общата преживяемост на пациентите с високостепенни глиоми (степен III и IV по C30).

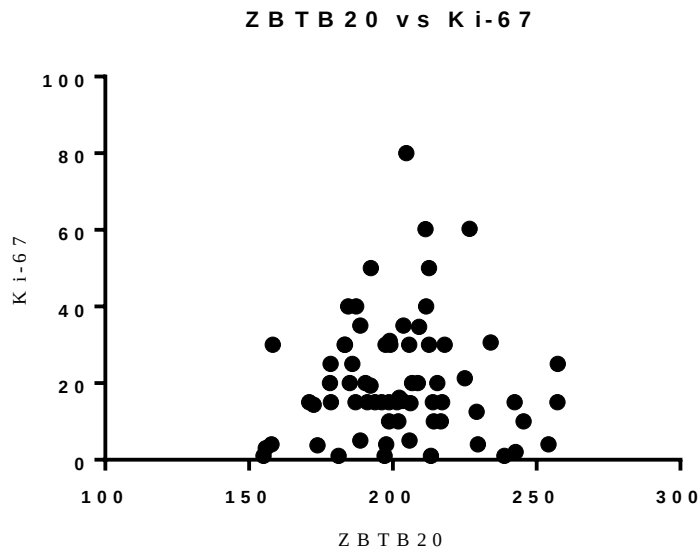
Подобно на корелацията на експресия на ZBTB20 с преживяемост при GBM, установихме статистически значими резултати и при изследване на 77 пациента с високостепенни глиоми (степен III и IV) глиоми. Пациентите с високи нива на ядрена експресия имат по-кратка медиана на общата преживяемост (96 дни) в сравнение с пациенти с ниска ядрена експресия на ZBTB20 в туморната тъкан (246 дни) (Gehan-Breslow-Wilcoxon test $p=0,0023$; $p<0,01$), с разлика от 5 месеца. Резултатите са илюстрирани на Фиг.43.



Фиг. 43. *Обща преживяемост на пациенти с високостепенни глиоми спрямо тъканните нива на експресия на ZBTB20 (Gehan-Breslow-Wilcoxon test $p=0,0023$; $p<0,01$)*

5.4.3. Корелация на експресия на ZBTB20 с пролиферативен индекс на тумора

След като изследвахме ZBTB20 и Ki-67 като независими прогностични фактори в нашето проучване, решихме да проверим дали съществува директна зависимост между тях при глиалните тумори. За тази цел изследвахме корелацията между ZBTB20 H-score и Ki-67% при 69 случая по метода на Spearman, като не се установи статистически значима корелация между двата фактора (Spearman $r=0,0153$, 95% доверителен интервал от -0,2307 до 0,2595, $p=0,90$; $p>0,05$). Резултата представен графично на Фигура 44.



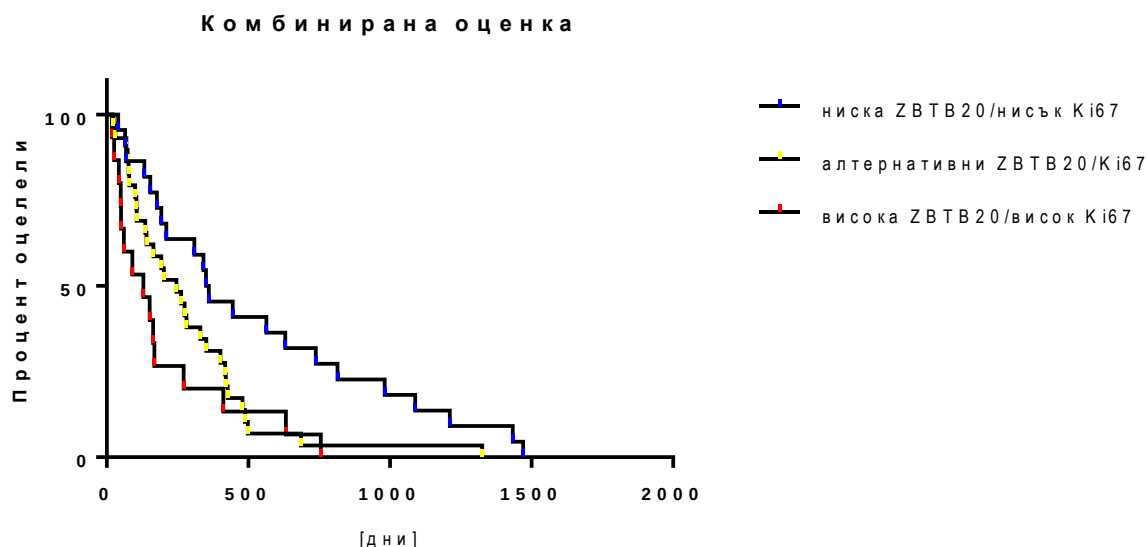
Фиг. 44. Графика на зависимостта между ZBTB20 H-score и Ki-67% (Spearman $r=0,0153$, 95% CI $-0,2307$ до $0,2595$, $p=0,90$; $p>0,05$).

5.4.3.1. Оценка на преживяемостта на пациентите според комбинация от две алтернативни стойности на ZBTB20 и Ki-67

В първия случай комбинирахме двата прогностични фактора в три групи спрямо преживяемостта на пациентите (66 случая) с глиоми и получихме следните резултати:

1. група: нисък Ki-67 и нисък за ZBTB20.
2. група: нисък Ki-67 и висок ZBTB20/ или висок Ki-67 и нисък ZBTB20.
3. група: висок Ki-67 и висок ZBTB20.

Получихме следните статистически значими резултати (*Gehan-Breslow-Wilcoxon test* $p=0,0069$, $p<0,01$). В първата група с най-благоприятна предпоставка (ниски стойности за двата показателя) пациентите имат медиана на преживяемостта от 356 дни, втората група 246 дни и третата 129 дни. Всяка следваща група е с около 4 месеца по-кратка преживяемост. Резултата е представен на Фиг. 45.



Фиг. 45. Обща преживяемост в зависимост от нивата на експресия на ZBTB20 и Ki-67 - комбинирана оценка (Gehan-Breslow-Wilcoxon test $p=0,0069$, $p<0,01$).

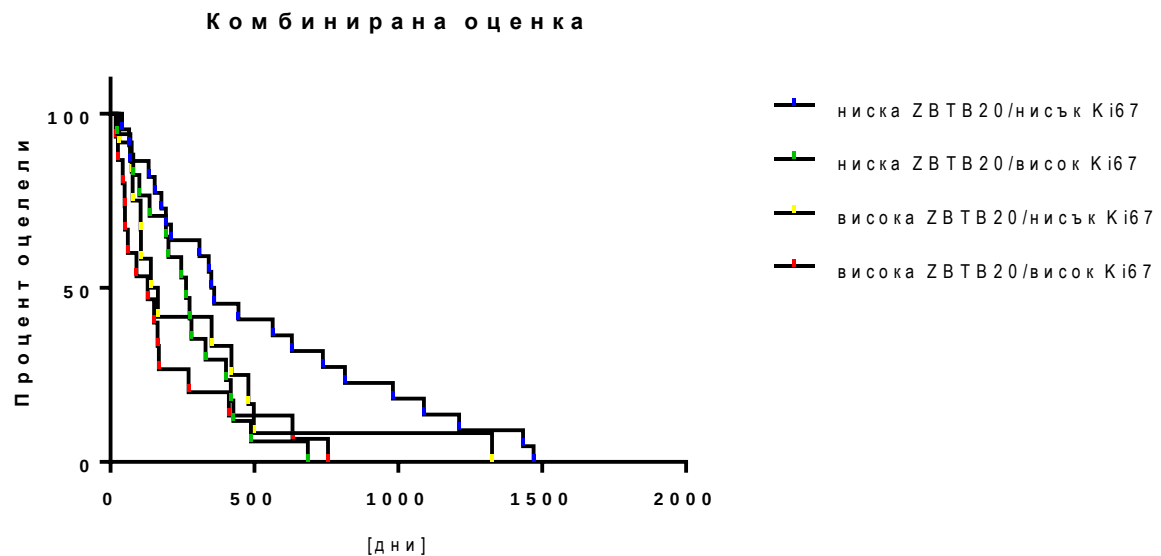
5.4.3.2. Комбинация на пациентите в четири групи според двата показателя, H-score за ZBTB20 и пролиферативен индекс Ki-67

Когато разпределим пациентите в четири групи според риска:

1. група: нисък Ki-67 и нисък H-score за ZBTB20,
2. група: висок Ki-67 и нисък H-score за ZBTB20,
3. група: нисък Ki-67 и висок H-score за ZBTB20,
4. Група: висок Ki-67 и висок H-score за ZBTB20.

Тенденцията се запази и получихме също статистически значими резултати (Gehan-Breslow-Wilcoxon test $p=0,0185$, $p<0,05$). Разпределението според преживяемостта е съответно според отделните групи е с медиани: 356 дни, 263 дни, 153 дни и 129 дни.

Можем да направим извод, че ZBTB20 влияе в по-голяма степен на преживяемостта на пациентите от стойността на пролиферативния индекс Ki-67%.



Фиг. 46. Обща преживяемост в зависимост от нивата на експресия на ZBTB20 и Ki-67 - комбинирана оценка (Gehan-Breslow-Wilcoxon test $p=0,0185$, $p<0,05$).

VI. ОБСЪЖДАНЕ

6.1. Демографски анализ на оперирани и морфологично верифицирани пациенти с интракраниални лезии

Наличните за България статистически данни относно мозъчните тумори включват разпределение по отношение на възраст, пол и локализация на злокачествените неоплазии, но не и по степен на диференциация и хистологичен вид (23). Ето защо извършеният от нас подробен анализ на пациенти, оперирани за интракраниални лезии в две неврохирургични звена във Варна, обслужващи населението от Източна България за период от пет календарни години, представляват нови за България данни.

Според резултатите на нашето проучване при 822 пациенти се установи обща честота 9,2/100 000 на интракраниалните лезии с превес на първичните тумори (6,03/100 000) в сравнение с метастатичните (2,82/100 000) и нетуморните обемзаемащи процеси (0,27/100 000). Превалирането на първичните тумори в изследването е свързано с извършване на неврохирургична интервенция при метастази само при необходимост поради палиативния характер на обгрижването на тези пациенти.

Метастатичните процеси са локализирани предимно супратенториално (87,2%), като най-честа първична локализация са тумори на бял дроб, които са почти половината от случаите (46,9%). Други сравнително чести първични локализации са тумори на гастроинтестинален тракт, меланом и мамарен карцином.

В съответствие със световните данни (24) и при нас най-честия първичен интракраниален тумор е менингиом (2,36/100 000), следван от глиалните тумори, най-чест от които е и най-агресивният от тях - GBM (2,03/100 000).

При разпределение на общо 249 глиални тумори прави впечатление честота на глиобластомите в сравнение със световните данни, която при нас е с 17,4% по-висока: 73,5% в нашата кохорта спрямо 56,1% по световни данни (1), свързано вероятно с неголемия общ брой случаи включени в нашето изследване (249). Като първо подробно статистическо изследване за България по отношение на хистологичния вид на мозъчните тумори, първични и метастатични, както и на нетуморните процеси настоящото проучване има ограничения, например по отношение на менингиомите. Те не са разгледани според диференциацията си като бенигнени, атипични и анапластични, но това може да бъде предпоставка за по-обстойно следващо проучване за мозъчните лезии с по-голям брой пациенти за по-дълъг период.

6.2. Предизвикателства в диагностиката на GBM - мимикрия при оцветяване с СК AE1/AE3

Нашите резултати показват наличие експресия на епителен маркер при GBM (по-убедителна в 3 от изследваните 10 случая на GBM), в съответствие с наблюдения на други автори (25). Това поставя въпроса дали туморните клетки в тези случаи действително експресират цитокератинови молекули, или съществува друга причина за реакцията на СК AE1/AE3 при GBM.

Данните, базирани на имуноблот тестове, показват, че туморните клетки в мултиформен глиобластом не произвеждат цитокератинови молекули, а имунохистохимичното оцветяване е резултат на кръстосана реактивност между GFAP, продуциран от тях и AE3 фракцията на коктейла от антитела CK AE1/AE3 (25–27).

Следователно така наречения панепителен маркер CK AE1/AE3 не трябва да се използва при мозъчни тумори за отдиференциране от епителни метастази. Могат да се използват други високо- и нискомолекулни цитокератини, при които липсва експресия при глиални тумори като: CK34BE12, CK5, CK6, CK7, CK8, CK14, CK 18, CK19 и CK20.

В случаи при доказан първичен карцином (напр. на белите дробове) индивидуалното използване само на CK AE1/AE3 би довело до погрешно заключение за метастатичен процес. Това е още едно доказателство за необходимостта от използване на комплексен имунохистохимичен панел при диагностиката на туморите, както и при дискриминация на първични от метастатични неоплазии.

6.3. Експресия на ZBTB20 при глиоми

В нашето изследване на експресията на транскрипционния фактор ZBTB20 при глиални тумори, ние установихме предимно ядрена локализация на протеина в клетки. Тази експресия е идентична с типа експресия, описана в Човешкия Протеинен Атлас (128). Интензитетът на експресията на ZBTB20 бе вариабилен, вариращ от липсваща до силна експресия в ядрата на клетките, инцидентно, единични клетки показаха цитоплазмена експресия, за което не открихме публикувани данни. Тези

оригинални резултати изискват допълнително изследване при по-голяма извадка от тумори. Освен в туморни клетки, слаба до умерена експресия наблюдавахме и в астроцити в околния на тумора мозъчен паренхим, както и в клетки с мезодермален произход като ендотелни, гладкомускулни, и имунни. Последните данни не са изненада предвид вече докладваната експресия на ZBTB20 в хемопоеични органи (142).

Ние осъществихме различни подходи за изследване експресията на ZBTB20 в туморната тъкан. Първият подход включваше оценка на процента ZBTB20-позитивни клетки в туморната тъкан независимо от интензитета на тяхната експресия спрямо всички клетки в тумора. Чрез този подход установихме неправилно разпределение на процента ZBTB20-експресиращи клетки в глиоми при отделните степени на диференциация по СЗО, като резултатите не показаха статистическа значимост по отношение на преживяемостта на пациентите. Установи се, че последната не показва съществена разлика между пациентите с глиоми с нисък или висок процент на ZBTB20-позитивни клетки. Следователно пропорцията на ZBTB20-експресиращите от всички клетки няма прогностично значение при глиомите. Този резултат е в съзвучие с откритието ни, че глиоми с различна степен на диференциация експресират равни пропорции от ZBTB20-позитивни клетки. Също така, трябва да се отбележи, че в нормалните астроцити мозъчния паренхим също показват отчетлива експресия за ZBTB20, както е вече съобщено за мозъка на мишки (143). Вторият подход за анализ на експресията на ZBTB20 при глиоми включваше измерване на силата на експресия за всеки тумор чрез H-score и корелиране с различни параметри, като хистологична диференциация на глиомите и обща преживяемост на пациентите.

Силата на експресия на ZBTB20 е прогностичен маркер при глиоми

Когато сравнихме интензитета на експресия на ZBTB20 между случаите на нискостепенни глиоми и такива с мултиформен глиобластом, ние установихме много близки стойности, без сигнификантна разлика. В същото време, установихме статистически значима зависимост между силата на експресия, измерена чрез H-score и общата преживяемост на пациентите. Високите нива на експресия корелираха с по-лоша прогноза и намалена преживяемост при: 1) всички глиоми (разлика в преживяемостта от 5,25 месеца спрямо пациентите с по-ниска сила на експресия); 2) високостепенни (стадий III или IV по СЗО) глиоми (разлика в преживяемостта от 5 месеца спрямо пациентите от тази група с по-ниска сила на експресия); и 3) само глиобластоми (разлика в преживяемостта от 3,66 месеца спрямо пациентите от тази група с по-ниска сила на експресия). От горепосочените три вида сравнения, най-висока статистическа значимост на резултатите наблюдавахме при сравнение на силата на експресия на ZBTB20 между нискостепенни и високостепенни глиоми. Корелация между интензитета на експресия на ZBTB20 и преживяемостта на пациентите според техния пол не се установи. Следователно силата на интензивност на експресия на ZBTB20 има отношение към прогнозата от глиомните тумори, но не и според процента на експресиращи клетки.

Нашите данни за корелация между силата на експресия и преживяемост при глиоми са в унисон с подобни изследвания, които изследват връзката между силата на експресия на ZBTB20 и преживяемостта при пациенти с хепатоцелуларен карцином (116,124).

Процента на експресия на Ki-67 при глиоми показва голяма вариация, като общо тя е по-висока при глиобластоми и се движи в

диапазона от 2% до 80%, докато при неглиобластомни тумори варира от под 1% до 35%. Липса на статистическа значимост между процента пролифериращи Ki-67-позитивни клетки в глиобластомите се съобщава и при други изследвания (128,129). Независимо от широкия диапазон на стойностите с пролиферативна активност на туморните клетки при различни степени на глиоми, той е полезен маркер при общата преценка на степента им на диференциация и общата преживяемост на пациентите, като тези с висок пролиферативен индекс са по правило с по-лоша прогноза.

При сравнение на двата маркера (нива на експресия на ZBTB20 и пролиферативен индекс Ki-67), не открихме корелация между тях. Това предполага, че те са независими фактори по отношение на ролята им при глиоми. В същото време, прилагането на комбинирана оценка от нивата на ZBTB20 и пролиферативния индекс чрез Ki-67 показва, че случаите с ниски нива на ZBTB20-експресия/Ki-67 имат значимо по-дълга преживяемост спрямо случаи с високи нива на ZBTB20-експресия/Ki-67.

В съответствие с нашите данни, неотдавна публикуваните резултати за микроРНК-Mir-758-5p, която подтиска глиобластомната пролиферация, инвазия и миграция, постига това отчасти посредством редукция на експресията на иРНК на гена *ZBTB20* (14).

VII. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Злокачествените мозъчни тумори, в частност глиомите, са агресивни неоплазии с неблагоприятна прогноза и обикновено с бърз фатален изход.

В продължение на почти век опитите им за лечение не са довели до съществени резултати. Нови надежди в тази насока е тенденцията към прилагане на съвременна персонализирана медицина изискваща освен точна хистоморфологична диагноза, но и установяване на молекулярно генетични промени, чрез въведените нови биомаркери в невропатологията.

Транскрипционните фактори регулират общо процесите на биологично развитие на туморите. ZBTB20 е един от тях, който според нашето проучване има прогностична стойност при различни видове глиоми, като по-високата му експресия в туморната тъкан носи повишен риск за живота на пациентите независимо от степента на туморна диференциация.

VIII. ИЗВОДИ

Въз основа на настоящото проучване могат да се направят следните изводи:

1. GBM е най-честия злокачествен първичен тумор на ЦНС с много неблагоприятна прогноза и висока смъртност.
2. Част от GBM показват интензивно оцветяване за епителния маркер СКАЕ1/АЕ3.
3. Всички глиоми показват ядрена експресия на ZBTB20, но с различен интензитет.
4. ZBTB20 корелира с преживяемостта на пациентите само по отношение на силата на експресия, но не и според процента на експресиращи клетки.
5. Високата интензивност на експресия на ZBTB20 в туморната тъкан е свързана с неблагоприятна прогноза при малигнени глиоми с различна степен на диференциация.
6. Пролиферативният маркер Ki-67 има прогностична роля при сравняване на всички глиоми, но не при групата с GBM.
7. Интензивността на експресия за ZBTB20 и пролиферативния индекс Ki-67 са независими прогностични фактори.
8. Общата оценка на експресия на ZBTB20 и Ki-67 има информативна стойност за преживяемостта на пациентите.

IX. ПРИНОСИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

Научни приноси с оригинален характер:

- Осъществен е комплексен клинико-морфологичен, имунохистохимичен и статистически анализ на първични, метастатични мозъчни тумори и нетуморни лезии за региона.
- Оценена е имунохистохимичната експресия на транскрипционен фактор ZBTB20 при глиоми с различна степен на диференциация.
- Анализирана е за първи път експресията на ZBTB20 във връзка с общата преживяемост на пациентите с глиоми.
- ZBTB20 и пролиферативния индекс Ki-67 са оценени като прогностични фактори за общата преживяемост при глиоми с различна степен на диференциация.

Научни приноси с потвърдителен характер

- GBM е най-честия глиален и най-разпространения първичен злокачествен тумор на ЦНС.
- GBM е тумор с много неблагоприятна прогноза и общата преживяемост на пациентите е под 5% за петгодишен период.
- GBM е възможно да има позитивно оцветяване за епителни маркери като СКАЕ1/АЕ3, което предполага използването на други антитела в имунохистохимичен панел при отдиференцирането му от карциномни метастази.

Х. СПИСЪК С ПУБЛИКАЦИИ И УЧАСТИЯ

Публикации свързани с дисертацията:

1. Stoyanov G., **Dzhenkov D.**, Ghenev P. Cytokeratin AE1/AE3 mimicry in Glioblastoma, Scripta Scientifica Medica, vol.49,No. 1,2017,pp 47-55, Medical University Varna
2. Stoyanov G., **Dzhenkov D.**, Ghenev P. The Great Imitator – EMA positive Glioblastoma Multiforme, Scripta Scientifica Medica, vol.49,No. 1,2017,pp 21-25, Medical University Varna
3. Stoyanov G., **Dzhenkov D.**, Kitanova M. Ghenev P., Tonchev A. Demographics and Incidence of Histologically Confirmed Intracranial Tumors: A Five-year, Two-center Prospective Study, Cureus 9(7): e1476. DOI 10.7759/cureus.1476, vol.49,No. 1,2017,pp 47-55, Medical University Varna

Списък участия на научни форуми:

1. Stoyanov GS, **Dzhenkov D.** Cytokeratin AE1/AE3 mimicry in Glioblastoma. International Biomedical Congress – Sofia. 25-28 February 2016.
2. Stoyanov GS, **Dzhenkov D.** The great imitator – glioblastoma and the value of immunohistochemistry in its diagnostics. Black Sea Symposium for Young Scientist in Biomedicine – Varna. 7-10 April 2016.
3. Stoyanov GS, **Dzhenkov D.**, Kitanova M, Shterev I. Correlation between Ki-67 index and patient survival in glioblastoma multiforme. Black Seas Symposium for Young Scientist in Biomedicine – Varna. 6-9 April 2017

XI. ИСПОЛЗВАНА ЛИТЕРАТУРА

1. Ostrom QT, Gittleman H, Liao P, Vecchione-Koval T, Wolinsky Y, Kruchko C, et al. CBTRUS Statistical Report: Primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2010–2014. *Neuro Oncol* [Internet]. 2017;19(suppl_5):v1–88. Available from: http://academic.oup.com/neuro-oncology/article/19/suppl_5/v1/4596648
2. Lee JH, Lee JE, Kahng JY, Kim SH, Park JS, Yoon SJ, et al. Human glioblastoma arises from subventricular zone cells with low-level driver mutations. *Nature* [Internet]. 2018 Aug 1 [cited 2019 Jan 17];560(7717):243–7. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41586-018-0389-3>
3. Ostrom QT, Gittleman H, Farah P, Ondracek A, Chen Y, Wolinsky Y, et al. CBTRUS statistical report: Primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2006-2010. *Neuro Oncol* [Internet]. 2013;15(SUPPL.2):ii1----ii56. Available from: <http://neuro-oncology.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/neuonc/not151>
4. Dall'Oglio S, D'Amico A, Pioli F, Gabbani M, Pasini F, Passarin MG, et al. Dose-intensity temozolomide after concurrent chemoradiotherapy in operated high-grade gliomas. *J Neurooncol* [Internet]. 2008;90(3):315–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18688571>
5. Darefsky AS, King JT, Dubrow R. Adult glioblastoma multiforme survival in the temozolomide era: A population-based analysis of Surveillance, Epidemiology, and End Results registries. *Cancer* [Internet]. 2012;118(8):2163–72. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/cncr.26494>
6. Kelly KF, Daniel JM. POZ for effect - POZ-ZF transcription factors in cancer and development. *Trends Cell Biol* [Internet]. 2006;16(11):578–87. Available from: <http://www.cell.com/article/S096289240600239X/abstract>
7. Xie Z, Ma X, Ji W, Zhou G, Lu Y, Xiang Z, et al. Zbtb20 is essential for the specification of CA1 field identity in the developing hippocampus. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2010;107(14):6510–5. Available from:

<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0912315107>

8. Rosenthal E. Transcription factor {Zbtb}20 controls regional specification of mammalian archicortex. [Internet]. Technische Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig Braunschweig; 2010. Available from:
http://pubman.mpdl.mpg.de/pubman/item/escidoc:641599/component/escidoc:860990/Rosenthal_Dissertation.pdf
9. Lee SU, Maeda T. POK/ZBTB proteins: An emerging family of proteins that regulate lymphoid development and function. *Immunol Rev* [Internet]. 2012;247(1):107–19. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3334328/>
10. Peterson ML, Ma C, Spear BT. Zhx2 and Zbtb20: Novel regulators of postnatal alpha-fetoprotein repression and their potential role in gene reactivation during liver cancer. *Semin Cancer Biol* [Internet]. 2011;21(1):21–7. Available from:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1044579X11000022>
11. Tonchev AB, Tuoc TC, Rosenthal EH, Studer M, Stoykova A. Zbtb20 modulates the sequential generation of neuronal layers in developing cortex. *Mol Brain* [Internet]. 2016 Dec 9 [cited 2019 Jan 17];9(1):65. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27282384>
12. Xu L, Chen Y, Dutra-Clarke M, Mayakonda A, Hazawa M, Savinoff SE, et al. BCL6 promotes glioma and serves as a therapeutic target. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2017;114(15):3981–6. Available from:
<http://www.pnas.org/lookup/doi/10.1073/pnas.1609758114>
13. Nagao M, Ogata T, Sawada Y, Gotoh Y. Zbtb20 promotes astrocytogenesis during neocortical development. *Nat Commun* [Internet]. 2016;7:1–14. Available from:
<http://dx.doi.org/10.1038/ncomms11102>
14. Liu J, Jiang J, Hui X, Wang W, Fang D, Ding L. Mir-758-5p Suppresses Glioblastoma Proliferation, Migration and Invasion by Targeting ZBTB20. *Cell Physiol Biochem*. 2018;2074–83.
15. Wild P, Rupp N, Buhmann J, Schöffler P, Fuchs T, Ong C. TMARKER: A free software toolkit for histopathological cell counting and staining estimation. *J Pathol Inform* [Internet]. 2013;4(2):2. Available from:

<http://www.jpathinformatics.org/text.asp?2013/4/2/2/109804>

16. T-Marker software [Internet]. Available from:
http://www.nexus.ethz.ch/equipment_tools/software/tmarker.html
17. Detre S, Saccani Jotti G, Dowsett M. A “quickscore” method for immunohistochemical semiquantitation: Validation for oestrogen receptor in breast carcinomas. *J Clin Pathol*. 1995;48(9):876–8.
18. Stem M, Clinical CA, Tumagelova-yuzeir K, Ivanova-todorova E, Naydenov E, Velikova T, et al. Cultured Cells Isolated from CNS Indolent B- Cell Lymphoma Have Characteristics of Scientific Research. 2018;12(3).
19. Miller RT. Cytokeratin AE1/AE3. ProPath [Internet]. 2003;November(November). Available from: http://www.ihcworld.com/_newsletter/2003/focus_nov_2003.pdf
20. Naydenov E, Tzekov C, Minkin K, Nachev S, Romansky K, Bussarsky V. Long-term survival with primary glioblastoma multiforme: A clinical study in bulgarian patients. *Case Rep Oncol* [Internet]. 2011;4(1):1–11. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21537375>
21. Darweesh MF, Abdel-salam LO, Negm MS. Evaluation of the Proliferation Marker Ki-67 in Glioblastoma and its Correlation with the Histopathological Findings. 2016;9(2):13–8.
22. Skjulsvik AJ, Mørk JN, Torp MO, Torp SH. Ki-67/MIB-1 immunostaining in a cohort of human gliomas. *Int J Clin Exp Pathol*. 2014;7(12):8905–10.
23. Hospital NO. Cancer Incidence in Bulgaria, 2013 [Internet]. Valerianova Z, Dimitrova N, Vukov M, Atanasov T, editors. Sofia: Paradigma; 2015. Available from:
http://www.sbaloncology.bg/assets/files/rakov_registar/PD-Rakov-2015.PDF
24. Ostrom QT, Gittleman H, Stetson L, Virk SM, Barnholtz-Sloan JS. Epidemiology of Gliomas. In 2015 [cited 2018 Aug 15]. p. 1–14. Available from:
http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-12048-5_1
25. Terada T. Expression of Cytokeratins in Glioblastoma Multiforme. *Pathol Oncol Res* [Internet]. 2015;21(3):817–9. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s12253-015-9896-9>

26. Goswami C, Chatterjee U, Sen S, Chatterjee S, Sarkar S. Expression of cytokeratins in gliomas. *Indian J Pathol Microbiol* [Internet]. 2007;50(3):478–81. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17883112>
27. Oh D, Prayson RA. Evaluation of epithelial and keratin markers in glioblastoma multiforme: an immunohistochemical study. *Arch Pathol Lab Med* [Internet]. 1999;123(10):917–20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10506444>
28. Zhang W, Mi J, Li N, Sui L, Wan T, Zhang J, et al. Identification and Characterization of DPZF, a Novel Human BTB/POZ Zinc Finger Protein Sharing Homology to BCL-6. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2001;282(4):1067–73. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006291X01946893>
29. Doeppner TR, Herz J, Bähr M, Tonchev AB, Stoykova A. Zbtb20 Regulates Developmental Neurogenesis in the Olfactory Bulb and Gliogenesis After Adult Brain Injury. 2018;
30. Xie Z, Zhang H, Tsai W, Zhang Y, Du Y, Zhong J, et al. Zinc finger protein ZBTB20 is a key repressor of alpha-fetoprotein gene transcription in liver. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2008;105(31):10859–64. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0800647105>

XII. БЛАГОДАРНОСТИ

- Благодаря на научния си ръководител проф. Петър Генов и на научния си консултант - проф. Антон Тончев за предоставената ми възможност и безценните съвети по време на разработването на дисертационния труд.
- Благодаря на проф. Мария Цанева и проф. Иван Щерев за оказания стимул по приключване на проекта.
- Благодаря на моите колеги и приятели - доц. Трифон Червенков, д-р Свилен Караиванов и д-р Георги Стоянов за огромната подкрепа и разкриването на красотата и стойността на изследователската дейност.
- Благодаря на всички настоящи и бивши колеги от Катедрата и Клиниката по обща и клинична патология за оказаното съдействие.
- Благодаря на моите родители.

Malignant brain tumors present a serious problem with modern medicine. There are no known etiological factors for the prevention and screening of risk groups and their complex therapy has not yet shown significant progress. Not accidentally, the survival rate remains very low despite the improvement in diagnostics. Determining the behavior of these tumors by their histological appearance does not provide sufficient information for prognosis and treatment. This requires further clarification of the brain tumor biology and the search for new solutions. In this respect, studies on ZBTB20 a transcription factor involved in the development of various neoplasms are promising, as it is expressed in progenitor cells of the brain, and this suggests that ZBTB20 may be expressed in glial tumors. In turn, ZBTB genes are involved in various processes such as transcriptional regulators, apoptosis, cell proliferation and differentiation, all of them related to tumor transformation and progression.

The aim of this dissertation thesis is to determine the expression of transcription factor ZBTB20 in different glial tumors and to evaluate its eventual relationship with other prognostic factors and survival. The study was conducted on biopsy materials from 97 patients treated for primary brain tumor. The materials were examined light-microscopically and morphometrically with routine histological and immunohistochemical methods and the results were statistically processed. In tumors with an oligodendroglial phenotype, we observed intensive expression in the nucleus of the tumor cells. In some cases, we found only the cytoplasmic expression of ZBTB20 - a fact for which explanation is needed. Intensive nuclear expression of ZBTB20 was observed in low grade gliomas, in high-grade gliomas, as well as in glioblastomas. Comparison of the expression intensity of ZBTB20 with clinical parameters revealed statistically significant dependencies.