



**МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ - ВАРНА  
„ПРОФ. Д-Р ПАРАСКЕВ СТОЯНОВ”**

---

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

---

**д-р Георги Стоянов Стоянов**

---

**Прогностични и предиктивни  
фактори при мултиформен  
глиобластом**

---

**автореферат на дисертационен труд за  
присъждане на образователна и научна степен  
„доктор“**

---

**Ръководител: проф. д-р Петър Генов, дм  
Консултант: доц. д-р Стоян Павлов, дм**

---

**ВАРНА 2022**

Дисертационният труд е оформен върху 113 стандартни машинописни страници. Подкрепен е с 65 фигури, 13 таблици и 250 литературни източника, от които 11 на кирилица и 239 на латиница.

Официалната защита ще се състои на 14 април, 2022 година от ..... часа във втора учебна зала на Катедра обща и клинична патология, съдебна медицина и деонтология към Медицински университет - Варна, на открито заседание на Научно жури в състав:

***Външни членове***

доц. д-р Маргарита Каменова, д.м.

проф. д-р Веселин Беловеждов, д.м.

проф. д-р Николай Лазаров, д.м.н.

***Резервен външен член***

доц. д-р Илия Биволарски, д.м.

***Вътрешни членове***

доц. д-р Деян Дженков, д.м.

проф. д-р Антон Тончев, д.м.н.

***Резервен Вътрешен член***

Проф. д-р Ара Капрелян, д.м.н.

Съдържание:

<b>1. По-често използвани съкращения</b> .....	6
1.1 На кирилица .....	6
1.2 На латиница .....	6
<b>2. Увод</b> .....	9
<b>3. Цел и задачи</b> .....	12
3.1 Цел .....	12
3.2. Задачи .....	12
<b>4. Материал и методи</b> .....	14
4.1 Материали .....	14
4.2 Методи.....	15
<b>5. Резултати</b> .....	20
5.1 Кохорта.....	20
5.2 Рекласифициране на подбраните случаи спрямо критериите на класификацията на СЗО за тумори на нервната система от 2021 година.....	21
5.3 Демографски характеристики .....	22
5.4 Честота на MGMT мутационен статус .....	24
5.5 Туморна локализация и размери .....	26
5.7 Преживяемост в кохортата .....	32
5.8 Състояние на системния имунен отговор .....	33

5.8.1	Съотношение на неутрофили към лимфоцити	33
5.8.2	Съотношение на тромбоцити към лимфоцити	34
5.8.3	Съотношение моноцити към лимфоцити	34
5.9	Експресия на Diaph3	35
5.9.1	Експресия на Diaph3 в нормален мозъчен паренхим	35
5.9.2	Експресия на Diaph3 при реактивна глиоза	37
5.9.3	Експресия на Diaph3 в мултиформен глиобластом	38
5.10	Статистически анализ	46
<b>6.</b>	<b>Дискусия</b>	<b>58</b>
6.2	IDH R132H мутационен статус	58
6.3	Честота, демографска характеристика и преживяемост	58
6.4	MGMT мутационен статус	63
6.5	Туморна локализация, размер, растеж и роля на неврорадиологичните модалности	64
6.6	Роля на системния имунен отговор	67
6.7	Роля на Diaph3 във физиологични и някои патологични процеси	69
6.8	Предиктивен потенциал на Diaph3 като биомаркер за отговор към терапия с рапамицин и таксани	74
<b>7.</b>	<b>Изводи</b>	<b>77</b>
<b>8.</b>	<b>Приноси</b>	<b>79</b>

8.1 Приноси с клиничко-диагностичен характер .....	79
8.2 Приноси с терапевтичен характер .....	79
<b>9. Публикации по темата .....</b>	<b>81</b>
9.1 Устни доклади .....	81
9.2 Пълнотекстови публикации.....	81
9.2.1 В международни списания .....	81
9.2.2 В национални списания .....	83
<b>10. Благодарности.....</b>	<b>84</b>

## **1. По-често използвани съкращения**

### **1.1 На кирилица**

- ❖ БДУ – без други уточнения
- ❖ ГБМ – мултиформен глиобластом
- ❖ ДНК – деоксирибонуклеинова киселина
- ❖ ИХХ - имунохистохимия
- ❖ КТ – компютърна томография
- ❖ РНК – рибонуклеинова киселина
- ❖ СЗО – Световна здравна организация
- ❖ СМЛ – съотношение моноцити към лимфоцити
- ❖ СНЛ – съотношение неутрофили към лимфоцити
- ❖ СТЛ – съотношение тромбоцити към лимфоцити
- ❖ ЦНС – централна нервна система
- ❖ ЯМР – ядрено-магнитен резонанс

### **1.2 На латиница**

- ❖ CBTRUS – central brain tumor registry of the United States

- ❖ cIMPACT-NOW - Consortium to Inform Molecular and Practical Approaches to CNS Tumor Taxonomy—Not Official WHO
- ❖ CK AE1/AE3 – cytokeratin cocktail
- ❖ CNS – central nervous system
- ❖ Diaph3 - Diaphanous Related Formin 3
- ❖ EGF-EGFR - epidermal growth factor - epidermal growth factor receptor
- ❖ GFAP – glial fibrillary acidic protein
- ❖ H3 – histone 3
- ❖ IDH – isocitrate dehydrogenase
- ❖ MGMT - O-6-methylguanine-DNA methyltransferase
- ❖ mTOR – mammalian target of rapamycin
- ❖ MLR – monocyte to lymphocyte ratio
- ❖ NLR – neutrophil to lymphocyte ratio
- ❖ NEC – not elsewhere classified
- ❖ NOS – not otherwise specified
- ❖ TLR – thrombocyte to lymphocyte ratio

- ❖ VEGF-VEGFR – vascular endothelial growth factor – vascular endothelial growth factor receptor
- ❖ WHO - World Health Organization



## 2. Увод

Мултиформеният глиобластом – *glioblastoma multiforme* (ГБМ) е злокачествено новообразувание на централната нервна система (ЦНС) (Louis *et al.*, 2021). ГБМ е един от най-малигнените тумори в човешката патология, при който въпреки неимоверните научни и клинични проучвания през последните 50 години преживяемостта на пациентите е нараснала средно едва с няколко месеца (Stoyanov и Dzhenkov, 2017).

ГБМ води началото си от прекурсори на астроцитната глия и/или зрели глиални клетки и се класифицира като първичен тумор на ЦНС - представител на глиалните тумори, наричани по-често глиоми (Altaner, 2008; McNeill, 2016). Спрямо действащото в момента пето издание на класификация на туморите на нервната система на Световната здравна организация (СЗО) от 2021 година определя ГБМ като:

„Високостепенен глиом с предимно астроцитна диференциация, белези на ядрена атипия, клетъчен плеоморфизъм (в повечето случаи), митотична активност, дифузен растеж, микроваскуларна пролиферация и/или некрози, който е без мутация в IDH“ (Louis *et al.*, 2021).

Спрямо предходната класификация на СЗО от 2016 година (модифицирана четвърта ревизия), част от туморите които класически отговарят на описанието ГБМ, са вече класифицирани като дифузен астроцитом с IDH мутация, четвърта степен по СЗО и дифузни глиоми,

характерни за по-млада възраст - хемисферен глиом (при наличие на H3 G34 мутация), глиом на срединната линия (при наличие на H3 K27 мутация) и педиатричен тип високостепенен глиом (без мутации в H3 и IDH) (Louis *et al.*, 2021).

По честота ГБМ е най-честият първичен тумор на ЦНС, със средна заболеваемост от 3-4 на 100 000 души население, като е характерен за всички възрасти, включително се наблюдават и вродени форми, но най-висока е честотата му след четвъртата декада със средна възраст на поставяне на диагнозата от 64 години (Ostrom *et al.*, 2017; Stoyanov *et al.*, 2018). И двата пола са засегнати, като превес по отношение на честотата има мъжкият (Ostrom *et al.*, 2017).

От клинична гледна точка ГБМ е тумор с фулминантно протичане, който късно дава неврологична симптоматика (хемипареза, афазия, зрителни нарушения и др.), като изключение правят случаите с локализация на тумора в ключови за ЦНС зони (Krex *et al.*, 2007). Най-честата презентация на тумора е симптоматика на менингоградикулерно дразнене, главоболие с мигренозни пристъпи, повръщане от централен характер и епилептични пристъпи, които най-често се явяват и причината за диагнозата (Omuro и DeAngelis, 2013). Други макар и по-редки симптоми могат да бъдат остро настъпили и прогресиращи поведенчески нарушения, и когнитивни промени (Hanif *et al.*, 2017; Omuro и DeAngelis, 2013). Фулминантното развитие на клиничната картина води до бързото поставяне на диагнозата, като

най-често това става до шест месеца след първоначалната поява на симптоматиката (IJerman-Korevaar *et al.*, 2018; Ozawa *et al.*, 2018).

От клинична гледна точка, златният стандарт за поставяне на диагнозата „тумор на ЦНС“ са образните изследвания, като използваната в миналото вентрикулография и по-съвременните методи на компютър томография (КТ) и ядрено-магнитен резонанс (ЯМР) (Alper, 1999; Lutters и Koehler, 2018; Stummer *et al.*, 2006).

При образните изследвания ГБМ се описва като единична, относително голяма туморна формация с неправилни граници и перифокален оток, за разлика от метастатичните процеси, които най-често са множествени, окръглени и добре отграничени от околния паренхим (Cha *et al.*, 2007; S. Wang *et al.*, 2009). При осъществяване на контрастно усилване, ГМБ контрастира по периферията на лезията, т.нар. пръстеновидно усилване, като централно контрастиране отсъства поради наличие на обширни некротични зони (Omuro и DeAngelis, 2013).

Формацията може да обхваща обширни зони от определен лоб и дори два лоба едновременно (Agrawal, 2009; Dziurzynski *et al.*, 2012).

### **3. Цел и задачи**

#### **3.1 Цел**

На фона на нерешените проблеми в литературата си поставихме за цел да изследваме кохорта от пациенти с ГБМ, като направим комплексен анализ на възрастово-половите характеристики, туморния размер и локализация, значение на напрегнатия имунен отговор и преживяемостта при първично диагностицирани тумори и ги сравним с MGMT профила на туморите и значението за диагнозата и прогнозата на формите и нива на експресия на Diaph3.

#### **3.2. Задачи**

За постигане на посочената цел си поставяме следните задачи

1. Подбор на тъканни блокчета от хистотеката на Клиника по обща и клинична патология, УМБАЛ „Света. Марина“ - Варна, Варна, България, с първично диагностицирани ГБМ в периода февруари 2018 - февруари 2021 година
2. Прекласифициране на туморите спрямо нововъведенията от класификацията на СЗО от 2021 година, с цел унифициране на кохортата спрямо най-новите диагностични изисквания
3. Извеждане на демографска характеристика на кохортата

4. Анализ на предоперативна кръвна картина за брой неутрофили, тромбоцити, моноцити и лимфоцити с изясняне на показатели за съотношение с лимфоцити
5. Установяване на MGMT профила на избраните в кохортата тумори
6. Установяване на образно-диагностичните характеристики на туморите - туморен размер и локализация
7. Изготвяне на триизмерни реконструкции на избраните тумори с последващ обемен анализ
8. Изследване на експресията на Diaph3 в кохортата, както и в равна по размер контролна група от материал от ЦНС на некропични случаи без ангажиране на нервната система от патологичен процес и такива с реактивна глиоза
9. Изследване на интензивността на експресия в ритмичните (Шерерови) структури на растеж
10. Статистически анализ и корелация на получените данни

## 4. Материал и методи

За осъществяването на поставените цели и задачи използвахме:

### 4.1 Материали

1. Тъканни срези от хистологично доказан ГБМ и равна по обем контролна група от нетуморни процеси в УМБАЛ „Света. Марина“ - Варна, Варна, България диагностицирани в периода февруари 2018 - февруари 2021 година - n=62 случая основна група и n=62 случая контролна група (от които n=57 с нормален мозъчен паренхим и n=5 с реактивна глиоза), като двете групи не са възрастово съпоставими една с друга.
  - 1.1 Изключващи критерии - пациенти с хистологично доказан ГБМ и втори тумор в друга локализация
  - 1.2 Изключващи критерии - пациенти с предходно диагностициран ГБМ, реоперирани в посоченият времеви интервал
2. Данни от медицинската документация на диагностицираните пациенти, касаещи пол, възраст, предоперативна кръвна картина с диференциално броене и постоперативна преживяемост

3. Образни изследвания на ЦНС на пациенти от подбраната кохорта

## 4.2 Методи

1. Рекласифициране на подбраните тумори, спрямо нововъведенията от петата класификация на СЗО за тумори на нервната система, посредством:

- 1.1. Анализ на всички хистологични срези и оцветявания, осъществени за поставянето на първичната диагноза

- 1.2. Имунохистохимично маркиране с моноклонално мише IDH1 R132H антитяло (Sigma-Aldrich Prestige Antibodies, каталожен номер SAB4200548)

2. Изнасяне на съотношение неутрофили към лимфоцити, тромбоцити към лимфоцити и моноцити към лимфоцити, с цел установяване на еквилибриума на имунния отговор към туморния растеж, по формулите:

$$\text{NLR} = \frac{\text{брой неутрофили (10}^9\text{)}}{\text{брой лимфоцити (10}^9\text{)}}$$
$$\text{PLR} = \frac{\text{брой тромбоцити (10}^9\text{)}}{\text{брой лимфоцити (10}^9\text{)}}$$
$$\text{MLR} = \frac{\text{брой моноцити (10}^9\text{)}}{\text{брой лимфоцити (10}^9\text{)}}$$

3. Имунохистохимично маркиране с поликлонално заешко MGMT антитяло (Sigma-Aldrich Prestige Antibodies, каталожен номер HPA069497)
4. Анализ на компютър томографски и ядрено-магнитни образни изследвания на ЦНС, извършени в етапа на поставяне на първичната диагноза
  - 4.1. Анализ на локализацията, размера и контакта на тумора с ключови за централната нервна система структури
5. Изработване на триизмерни реконструкции от подходящи компютър томографски и ядрено магнитни образни изследвания за обемен анализ
6. Имунохистохимично маркиране на подобрите туморни парафинови срези с поликлонално заешко Diaph3 антитяло (Sigma-Aldrich Prestige Antibodies, каталожен номер HPA032151)
7. Подбор на равна по обем кохорта от контролни парафинови блокове (биопсични и некропсични) на пациенти без патологични промени в централна нервна система и такива с реактивни изменения (нетуморни) за установяване туморна специфичност на Diaph3

Систематичното изследване бе извършено след получаване на разрешение от Комисия по етика на научните изследвания към Медицински университет - Варна "Проф. д-р Параскев Стоянов", Варна, България с номер 93/21.05.2020.



Финансиране за извършване на изследването бе получено от Фонд наука към Медицински университет - Варна "Проф. д-р Параскев Стоянов", Варна, България с номер на проекта 19010.

За осъществяване на имунохистохимично маркиране на парафиновите тъканни срези с IDH1, MGMT и D1aph3 бе използван следният протокол:

1. Валидиране на антитела и постигане на работна концентрация

1.1. IDH1 валидиран на позитивна контрола от ГБМ с молекулярно-генетично верифицирана мутация с работна концентрация на антитялото 1:1000

1.2. MGMT валидиране на позитивна контрола от простата и палатинна тонзила с работна концентрация на антитялото 1:700

1.3. D1aph3 валидиран на позитивна контрола от простата с работна концентрация 1:700

Описаните антитела, освен валидиране на позитивна контрола са титрувани до достигане на оптимална реакция спрямо концентрацията на антитялото, като са извършени и негативна контрола – върху тъкани без протеинова експресия и абсолютно негативна контрола – върху тъкани с и без протеинова експресия, като от протоколът е изключено накапването на първично антитяло.

Дигитализиране и автоматична обработка на получените образи

- Дигитализиране на получените ИХХ препарати посредством автоматичен скенер

Селектирани препарати от първичната биопсия, както и всички изработени имунохистохимични срези бяха дигитализирани посредством сканиране с помощта на автоматизиран скенер за хистологични препарати Leica Aperio Scanscope AT2 device (Aperio Technologies, Vista, CA). Всички срези бяха сканирани на увеличение  $\times 400$ , което дава възможност за интерактивна навигация на цял срез с вариращи увеличения и детайлен анализ, посредством софтуер ImageScope V12.1.0.5029 (Aperio Technologies, Vista, CA).

- Роботно отчитане на експресията в цяла тъкан за препарати от туморна тъкан маркирани с Diaph3 се извърши посредством автоматизираният машинен алгоритъм на QuPath v0.2.3 (Centre for Cancer Research & Cell Biology at Queen's University Belfast; Bankhead *et al.*, 2017).

#### Статистически анализи

Статистическият анализ е осъществен чрез програмен пакет MaxStat Pro v3.6 и включва следните методи:

(1) Дескриптивен анализ за определяне на статистически величини: средна стойност, стандартна грешка на средната, минимални и максимални стойности и медиана.

(2) Непараметрични методи:

Kolmogorov–Smirnov St: тест за проверка на нулевата хипотеза и определяне на типа на разпределение на стойностите с оглед подбор на параметричен и непараметричен корелационен метод за анализ.

(3) Параметрични методи:

Student t-test: тест за сравняване на средните стойности между две групи от случаи и Tukey post-comparison за повече от две група

(4) Статистическо изследване на зависимости чрез корелационен анализ:

чрез определяне коефициент на Spearman (непараметричен метод) и/или

чрез коефициент на Pearson (параметричен метод)

$\chi^2$  –test или Fisher exact test

(5) Kaplan–Meier Test за преживяемост.

(6) Cox регресионен модел за унивариантен анализ с цел подбор на фактор с независимо прогностично значение.

При всички проведени анализи се приема допустимо ниво на значимост  $p < 0.05$  при доверителен интервал 95%.

## 5. Резултати

### 5.1 Кохорта

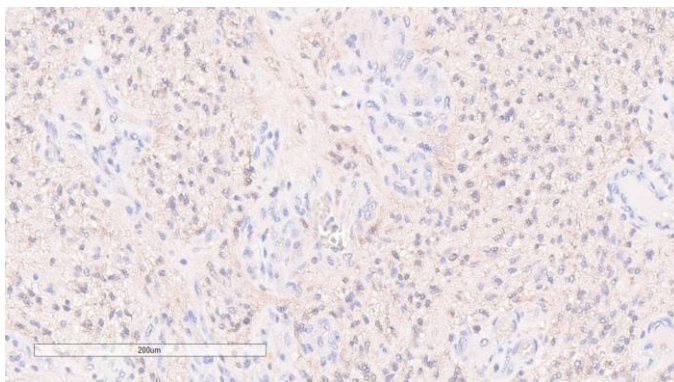
Според заложените в Материал и методи включващи и изключващи критерии за подбиране на кохорта, в нея попаднаха общо общо 62 случая (средна възраст 63,69 години, диапазон 23-86 години), от които 33 мъже (средна възраст 59,85 години, диапазон 23-85 години) и 29 жени (средна възраст 68,07 години, диапазон 52-86 години). На база на тези характеристики съотношението мъже:жени в първичната кохорта е 1,14:1.

На база на наличните парафинови блокове в архивната от първичната кохорта бяха селектирани 58 случая. Първично извадените от кохортата четири случая са поради липса на парафинови тъканни блокове, изискани изрично от пациента и/или неговите близки, както и наличие на втора туморна локализация при един пациент - синхронен глиобластом и недребноклетъчен карцином на бял дроб. От останалите 58 случая, на втори етап от кохортата бяха отстранени още три случая, поради минимално количество туморна тъкан в парафиновите блокове, непозволяващо обработката им с научна цел, предвид навлизането на новата класификация на СЗО за тумори на ЦНС от 2021 и необходимостта от извършване на нови изследвания за прецизното рестадииране на голяма част туморите, с цел оптимизиране на противотуморната терапия на пациентите.

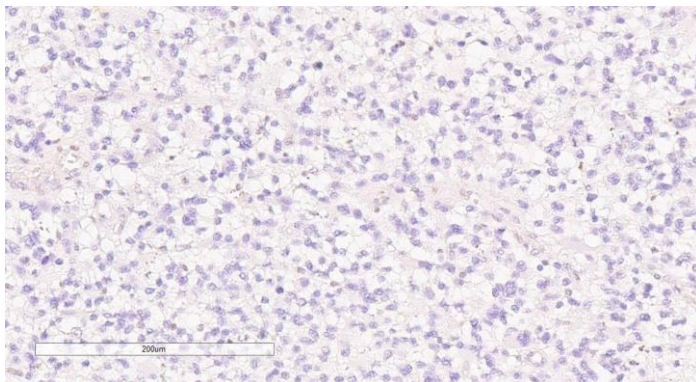
## 5.2 Рекласифициране на подбраните случаи спрямо критериите на класификацията на СЗО за тумори на нервната система от 2021 година

С цел дефиниране на диагнозите спрямо новите изисквания на СЗО за тумори на ЦНС от 2021 година, изискващи изследването на IDH R132H мутация, кохортата бе унифицирана спрямо този критерий. Макар част от пациентите да са с първоначален биопсичен отговор мултиформен глиобластом, БДУ по класификацията от 2016 година, при извършването на изследвания за IDH R132H мутационен статус, част от тях бяха изключени, поради непокриване на този критерий (n=5) (Фигура 5.1-2).

Съпоставено спрямо демографските характеристики, по показателя IDH R132H мутация, отпаднаха само млади пациенти във възрастовата група под 50 години, като по-голям дял на IDH R132H мутация бе отчетен при жени (n=3).



*Фигура 5.1 - IDH R132H мутантен фенотип, рекласифициран като Астроцитом, СЗО ЦНЗ грейд 4 по критериите от 2021 година, оригинално увеличение x 200*



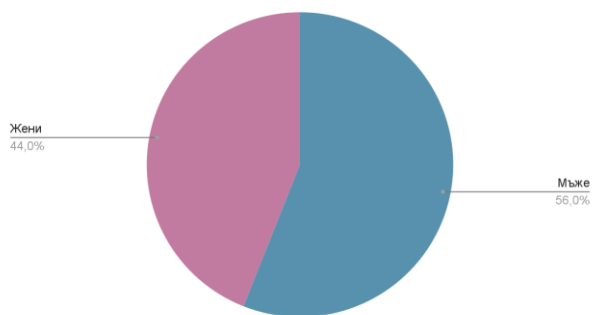
*Фигура 5.2 - Мултиформен глиобластом, без мутация в IDH, СЗО ЦНС грейд 4 по критериите от 2021, оригинално увеличение x 200*

### **5.3 Демографски характеристики**

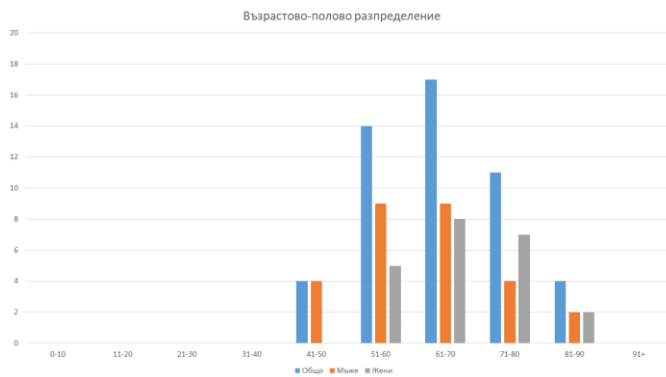
След рекласифицирането на всички тумори в първичната кохорта, като мултиформен глиобластом, без IDH мутация, СЗО ЦНС степен на диференциация 4, в нея останаха 50 случая.

Демографските характеристики на окончателната ни кохорта са както следва: 56% (n=28) мъже, 44% (n=22) жени; съотношение мъже:жени 1,27:1; средна възраст 65.3 години, медиана 65 години, диапазон 43-86 години (Фигура 5.3-4).

Полово разпределение



Фигура 5.3 - полово разпределение при мултиформен глиобластом

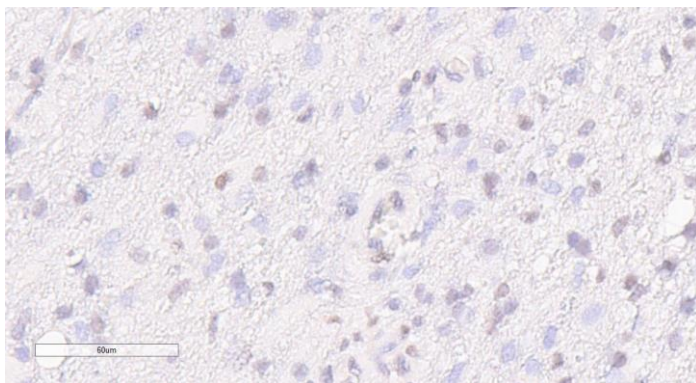


Фигура 5.4 - Разпределение на случаите в кохортата по възрастови групи

#### 5.4 Честота на MGMT мутационен статус

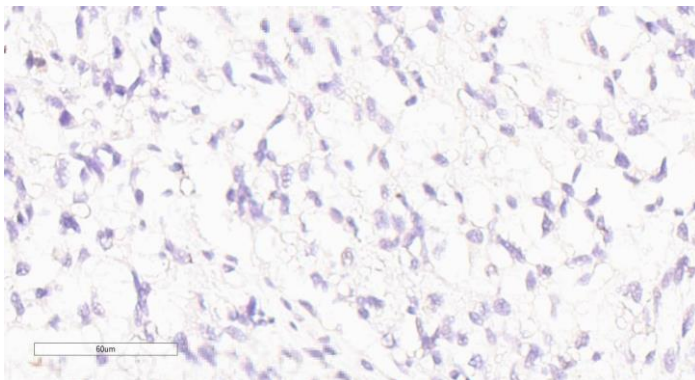
От общо 50 случая в нашата хорорта, слез имунохистохимично изследване на MGMT мутационен статус 35% (n=17) бяха положителни (Фигура 5.5-6).

Средната възраст на пациентите с MGMT позитивни ГБМ е съпоставима с тази на общата кохорта, като не показва статистически значима разлика - 62.42 години (диапазон 43-77 години) (Таблица 5.1). Половото разпределение от своя страна показва, че 42.84% (n=8) от пациентите с MGMT позитивни ГБМ са мъже, докато 47.06% (n=9), са жени. От тези данни е видно, че макар повечето пациенти с ГБМ да са мъже (общо съотношение мъже:жени - 1.27:1), честотата на MGMT мутация е по-голяма при жени (съотношение мъже:жени при MGMT позитивни тумори - 1:1.3).



*Фигура 5.5 - мултиформен глиобластом, имунохистохимично позитивен за MGMT, оригинално увеличение x 400*





*Фигура 5.6 - мултиформен глиобластом, имунохистохимично негативен за MGMT, оригинално увеличение x 400*

*Таблица 5.1 - Възрастова характеристика на кохортата и спрямо MGMT профилът на туморите*

<b>стойност</b>	<b>общ резултат (n=50)</b>	<b>MGMT негавини (n=33)</b>	<b>MGMT позитивни (n=17)</b>
средна възраст	65.3	66.79	62.42
медiana	65	66	62
мода	63	63 и 72	59
минимална стойност	43	50	43
максимална стойност	86	86	77

При мъжете в общата кохорта, средната възраст на пациентите с MGMT негативни тумори е 64.65 години, а тази на позитивните 58. При жените в общата кохорта, средната възраст на пациентите с MGMT негативни тумори е 70.08 години, а тази на позитивните 66.33 (Таблица 5.2).

*Таблица 5.2 - възрастово-полова характеристика на кохортата, спрямо MGMT профилът на туморите*

стойност	MGMT негативни мъже (n=20)	MGMT позитивни мъже (n=8)	MGMT негативни жени (n=13)	MGMT позитивни жени (n=9)
средна възраст	64.65	58	70.08	66.33
медиана	63	59	70	68
мода	63 и 72	59	70	няма
минимална стойност	50	43	56	52
максимална стойност	85	70	86	77

## 5.5 Туморна локализация и размери

В медицинската документация на пациентите и предоперативните изследвания, бяха намерени данни за първичната туморна локализация на 45 от пациентите. При останалите n=5 пациента от кохортата, предоперативните неврорадиологични изследвания са

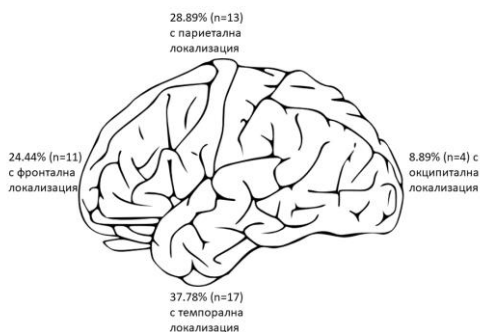
извършени в извънболнична обстановка, а самите оперативни интервенции са извършени по витални индикации, непозволяващи болнично-базирано неврорадиологично изследване предоперативно. При тези пациенти в медицинската документация има данни само за латералността и локализацията на процеса, като постоперативните неврорадиологични изследвания не позволяват интерпретирането на първичния туморен размер поради перифокален оток, както и първичната туморна локализация, поради обема на резекцията, ангажиращ повече от един лоб.

При пациентите с болнично-базирани предоперативни неврорадиологични изследвания (n=45) 55.55% (n=25) от туморите са с левостранна локализация, а останалите 44.45% (n=20) с десностранна (Фигура 5.7).



*Фигура 5.7 - Разпределение на случаите според локализация в голямомозъчна хемисфера.*

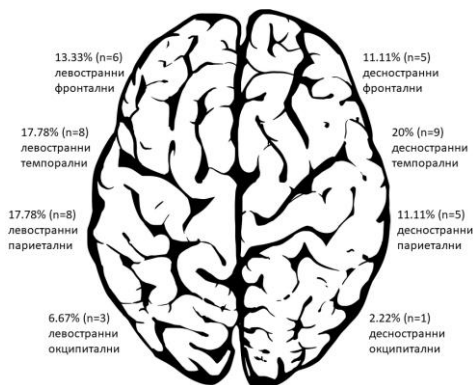
В кохортата общо 40% (n=18) от туморите неврорадиологично обхващат повече от един лоб на голямомозъчните хемисфери, като за първична локализация бе приет лобът с най-екстензивно ангажиране. От тези тумори 2.22% (n=1) бе същински мултицентричен тумор, с ангажиране и на двете мозъчни хемисфери, без обаче да покрива всички критерии за пеперудообразен глиом. Спрямо разположението в хемисферите 24.44% (n=11) случая бяха локализирани във фронталния лоб, 37.78% (n=17) в темпоралния, 28.89% (n=13) в париеталния и 8.89% (n=4) в окципиталния (Фигура 5.8).



*Фигура 5.8 - разпределение на случаите в кохортата спрямо локализация в голямомозъчна хемисфера*

Пълна топографска карта на туморната локализация при всички случаи показва че левостранно във фронталния лоб са разположени 13.33% (n=6) случая, а десностранно 11.11% (n=5); в темпоралния лоб

левоотранни са 17.78% (n=8) случая, а десноотранни 20% (n=9); в париеталния лоб левоотранни са 17.78% (n=8) случая, а десноотранни 11.11% (n=5); в окципиталния лоб левоотранни са 6.67% (n=3) случая а десноотранни 2.22% (n=1) случай (Фигура 5.9).



*Фигура 5.9 - разпределение на случаите в кохортата спрямо локализация в лоб и латералност*

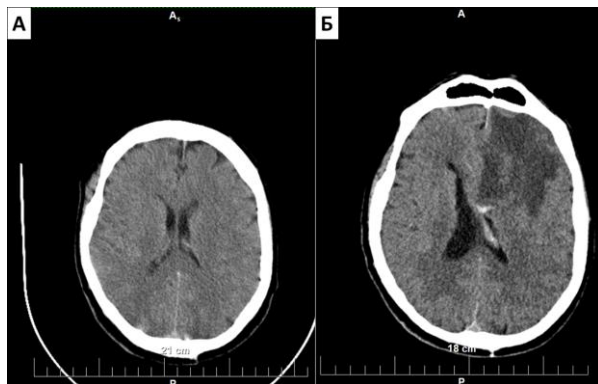
От неврорадиологичните данни бе извлечен максималният размер на тумора в мм. От получените резултати и извършен статистически анализ е видно, че ГБМ при поставяне на диагнозата е със средни размери 50.51мм (диапазон 20-76мм), като липсва статистически значима разлика в туморния размер спрямо латералността на процеса с изключение на париеталните тумори (Таблица 5.3).

*Таблица 5.3 - обобщени дескриптивни характеристики на туморите в париеталния лоб*

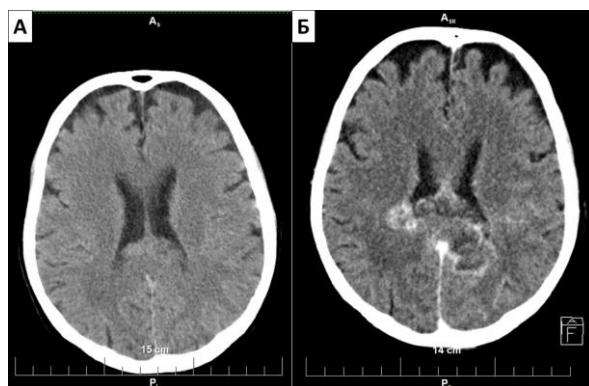
стойност	общ резултат	левостранни	деснострани
среден размер, в мм	42.77	39.38	48.2
медиана, в мм	44	35.5	48
мода, в мм	48	няма	няма
минимална стойност, в мм	21	21	31
максимална стойност, в мм	76	76	60

В настоящата кохорта, след установяването на тумора няма случаи на последователни неврорадиологични изследвания, които да позволят анализиране на динамиката на туморния растеж. При двама от пациентите има неврорадиологични изследвания, извършени в рамките на година преди поставянето на диагнозата по други показания. При първия пациент, мъж на 63 години, е извършена КТ на главен мозък, поради съмнения за остър мозъчно-съдов инцидент. На контролно КТ и последващ ЯМР осем месеца по-късно, поради новопоявила се неврологична симптоматика, в дясно фронтално се установява туморна формация с максимален размер 51 мм (Фигура 5.10). Вторият пациент, жена на 74 години е подложена на КТ на главен мозък поради травма, като се установява само корова атрофия на мозъчния паренхим. Впоследствие пациентката развива неврологична симптоматика и 28 дни по-късно на контролна КТ и последвал ЯМР окципитално в дясно се

установява туморна формация с най-голям размер 26 мм (Фигура 5.11).



*Фигура 5.10 - КТ на 63 годишен пациент: А - запазена структура на мозъчния паренхим; Б - голяма туморна формация в дясно фронтално, с неясни граници, осем месеца по-късно*



*Фигура 5.11 - КТ на 74 годишна жена: А - корова атрофия; Б - туморна формация в дясно окципитално с неясни граници и перифокален едем, 28 дни по-късно.*

## **5.7 Преживяемост в кохортата**

Средната преживяемост в общата кохорта (n=50) от деня на оперативната интервенция до деня на смъртта е 255.96 дни (8.41 месеца), като важно уточнение е че пет от пациентите са все още живи, т.е. реалната окончателна преживяемост е със сигурност по-голяма величина (Таблица 5.4). Диапазонът на преживяемост е от 18 до 1061 дни, като най-дългата обща преживяемост е при пациент, който все още е жив 1150 дни (37.78 месеца) след оперативната интервенция. Преживяемостта на първата година е 26%, а на втората 8%, като предвид краткия срок на проследяване на кохортата преживяемостта на третата година е 4%. При този показател обаче е налице значителна разлика според MGMT статуса на туморите, като при MGMT позитивните тумори преживяемостта на първата, втората и третата година са съответно 58.82%, 23.53% и 11.76%.

*Таблица 5.4 - преживяемост в кохортата, в дни и месеци*

<b>стойност</b>	<b>резултат в дни</b>	<b>резултат в месеци</b>
средна преживяемост	255.96	8.41
медиана	185	6.08
мода	няма	няма



минимална стойност	18	0.59
максимална стойност	1150	37.78

Средната преживяемост при мъжете е значително по-висока със стойност от 274.43 (9.02 месеца) в сравнение с 232.46 дни (7.64 месеца) при жените (Таблица 5.5).

*Таблица 5.5 - преживяемост при мъжете и жените в кохортата*

стойност	мъже	жени
средна преживяемост	274.43	232.46
медиана	239	112.5
мода	няма	97 и 127
минимална стойност	23	18
максимална стойност	1150	1061

## **5.8 Състояние на системния имуен отговор**

Данни от предоперативна кръвна картина с диференциално броење бяха намерени само за 22 пациента от кохортата.

### **5.8.1 Съотношение на неутрофили към лимфоцити**

Като гранична стойност за съотношение неутрофили към лимфоцити (СНЛ), използвахме СНЛ 4,

който е утвърден индекс за отчитане на напрегнат имунитет при редица други онкологични заболявания. В кохортата общо осем пациента имаха СНЛ $>4$ , с най-голям СНЛ индекс от 77.17. Останалите 14 пациента бяха със СНЛ $<4$  и най-малък СНЛ индекс 1.81.

### **5.8.2 Съотношение на тромбоцити към лимфоцити**

Като гранична стойност за съотношение тромбоцити към лимфоцити (СТЛ), използвахме СТЛ 200, който е утвърден индекс за отчитане на напрегнат имунитет при редица други онкологични заболявания. В кохортата общо пет пациента имаха СТЛ $>200$ , с най-голям СТЛ индекс от 301.74. Останалите 17 пациента бяха със СТЛ $<200$  и най-малък СТЛ индекс 43.73.

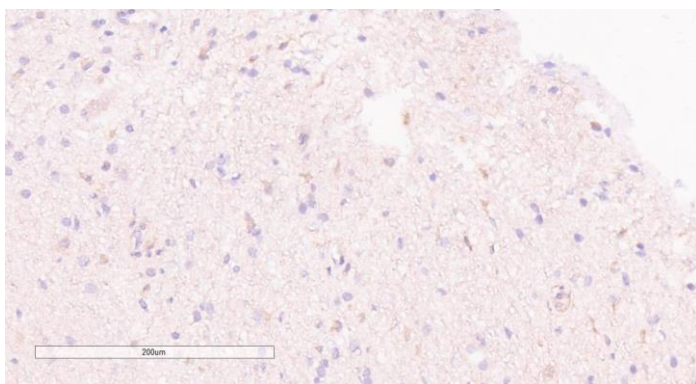
### **5.8.3 Съотношение моноцити към лимфоцити**

Като гранична стойност за съотношение моноцити към лимфоцити (СМЛ), използвахме СМЛ 0.45, като при този индекс съществуват множество различие при редица туморни и нетуморни заболявания. В кохорта общо пет пациента имаха СМЛ $>0.45$ , с най-голям СМЛ индекс от 4.07. Останалите 17 пациента бяха със СМЛ $<0.45$  и най-малък СМЛ индекс 0.09.

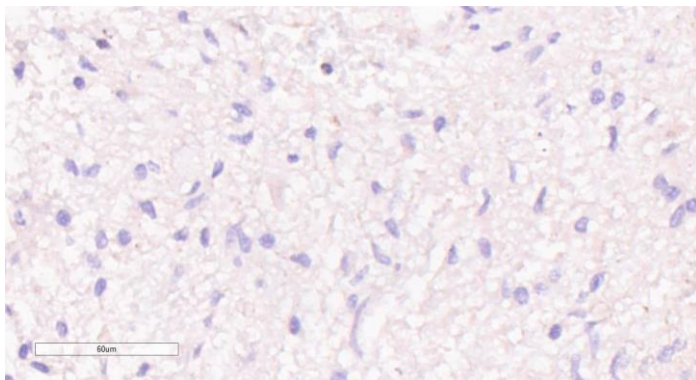
## 5.9 Експресия на Diarh3

### 5.9.1 Експресия на Diarh3 в нормален мозъчен паренхим

При използваната от нас концентрация за работа с Diarh3 в съотношение 1:700, в контролите от нормален мозък, експресията на антитялото бе цитоплазмено локализирана, слаба до умерена по интензитет, фино грануларна и налична само в единични клетки на крайномозъчната кора с невронална и астроглиална морфология, а в бялото вещество позитивност на клетки не се установи (Фигура 5.12-13)

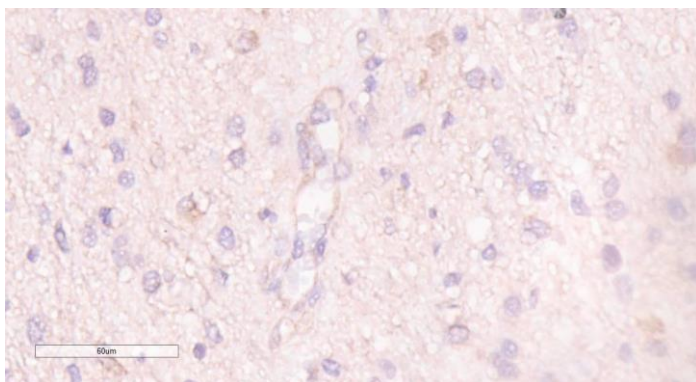


*Фигура 5.12 - Единични слабо до умерено интензивно позитивни клетки в мозъчната кора на здрави контроли, имунохистохимично маркиране с Diarh 3, оригинално увеличение x 200*



*Фигура 5.13 - Липса на клетъчна позитивност в бялото мозъчно вещество на здрави контроли, имунохистохимично маркиране с Diarh 3, оригинално увеличение x 400*

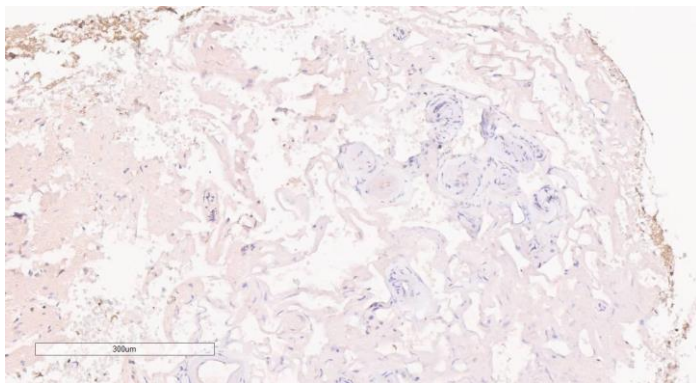
Слаба по интензитет, но униформна - в бялото и сиво мозъчно вещество реакция се установи и в ендотелните клетки на съдовете (Фигура 5.14).



*Фигура 5.14 - Слабо интензивна реакция в ендотелните клетки на малокалибрен съд в мозъчната кора,*

*имунохистохимично маркиране с Diarh 3, оригинално  
увеличение x 400*

Също така униформна фино гранулирана и слабо интензивна експресия в здравите контроли се отчете и в меката мозъчна обвивка (Фигура 5.15).

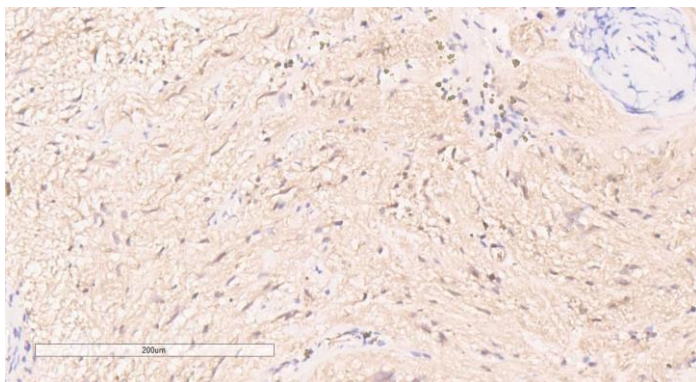


*Фигура 5.15 - Слабоинтензивна експресия в меката мозъчна обвивка, имунохистохимично маркиране с Diarh 3, оригинално увеличение x 100*

### **5.9.2 Експресия на Diarh3 при реактивна глиоза**

В контролната група включихме и пет случая с реактивна глиоза в различни зони на ЦНС вследствие на мозъчно-съдов инцидент, травма или бенигна тумор притискащ мозъчния паренхим. В тези контроли се наблюдава по-интензивно фоново оцветяване, както и високо интензивна фибриларна експресия предимно в израстъци на клетки с астроцитна морфология, както и ядрена експресия в единични клетки с морфология на лимфоцити, разположени периваскуларно (Фигура 5.16).

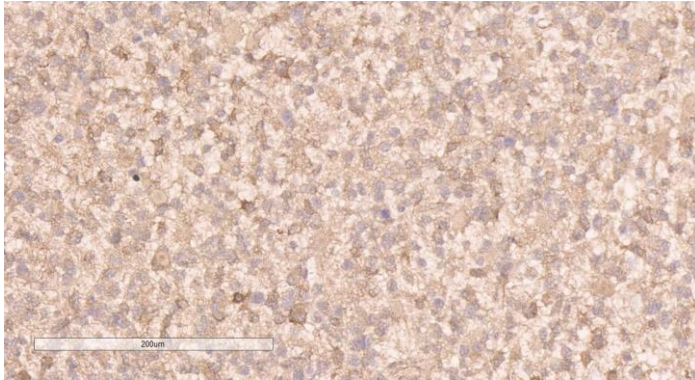
Тази форма на експресия в лимфоцитни ядра представлява интерес, тъй като тя показва че Diaph3 участва и в ремоделирането на нуклеарния скелет при повишени нива на транскрипция и/или процесите на митоза.



*Фигура 5.16 - Реактивна глиоза в мозъчната тъкан периферно на доброкачествен съдов тумор, имунохистохимично маркиране с Diaph 3, оригинално увеличение x 200*

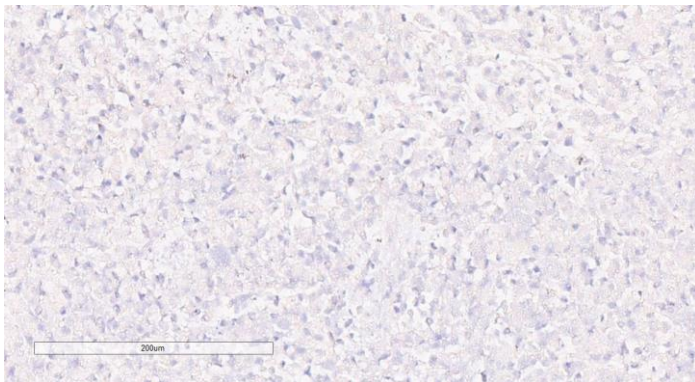
### **5.9.3 Експресия на Diaph3 в мултиформен глиобластом**

В нашата кохорта (n=50 - 100%) всички тумори показаха позитивна реакция на Diaph3 антитялото в концентрация 1:700. Реакцията беше умерено до високо интензивна, грануларна, като предилекционно бе локализирана в цитоплазмата на туморните клетки, но единични клетки показват и слаба до умерена, фибриларна ядрена реакция (Фигура 5.17)



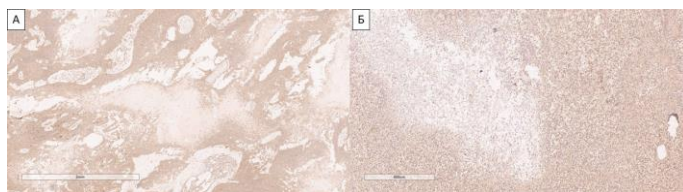
*Фигура 5.17 - Високо и умерено интензивна експресия на Diaph3 в мултиформен глиобластом, оригинално увеличение x 200*

По своята дифузност, реакцията беше хетерогенна, като отделни зони от туморния паренхим, локализирани централно в самата туморна формация показваха слаба по интензитет до липсваща експресия на антитялото (Фигура 5.18).



*Фигура 5.18 - Слаба по интензитет до липсваща експресия в централните части на мултиформен глиобластом, имунохистохимично маркиране с Diaph 3, оригинално увеличение x 200*

Хетерогенност по отношение на експресията се установи и във всички видове фигури на Scherer, като най-интензивна експресия се отчете в зоните на псевдопалисадна некроза - първични фигури на Scherer (Фигура 5.19). В тези, понякога обширни зони от туморният паренхим, високоинтензивната експресия на антиятлото е очаквана, предвид доказаните феномени на туморна миграция извън некротичното огнище и характеристиката на Diaph3 като молекула вземаща активно участие в ремоделирането на цитоскелета при клетъчно движение.

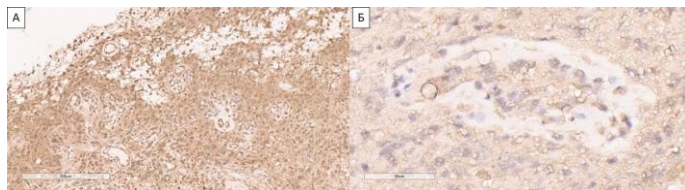


*Фигура 5.19 - Високоинтензивна експресия на клетките около псевдопалисадните некрози и нискоинтензивна в некротичното огнище при псевдопалисадни некрози, имунохистохимично маркиране с Diaph3: А - оригинално увеличение x 20; Б - оригинално увеличение x 40*

Сред вторичните фигури на Scherer, най-близка до експресията в нормални тъкани бе отчетена в ендотелните

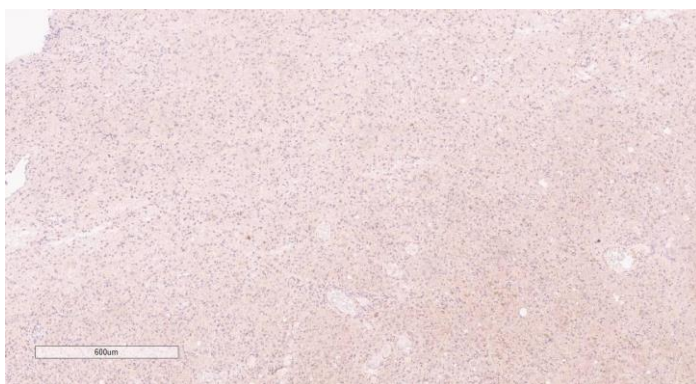


клетки на гломерулоидните съдови пролиферации (Фигура 5.20).



*Фигура 5.20 - Умерена до високоинтензивна експресия на антитялото в ендотелните клетки на гломерулоидните съдови пролиферации, имунохистохимично маркиране с Diaph3: А - оригинално увеличение x 200; Б - оригинално увеличение x 400*

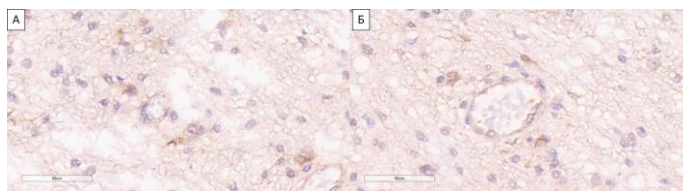
В граничната зона на преход от туморен паренхим, към макроскопски неангажиран мозъчен паренхим, корелиращ на неврорадиологичния феномен на перифокален едем се отчете градиент в експресията (Фигура 5.21)



*Фигура 5.21 - Градиент в експресията на антитялото от високо до умереноинтензивна в хиперцелуларните зони, към слабоинтензивна в клонящите към нормоцелуларни зони, имунохистохимично маркиране с Diaph3, оригинално увеличение x 40*

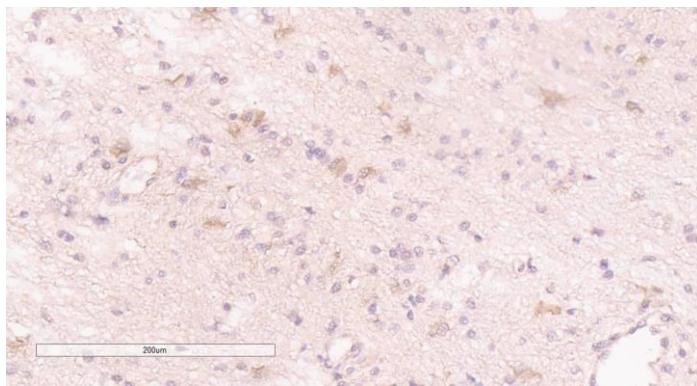
В тези зони на градиент се отчете високо до умерено интензивна експресия в единични клетки от паренхимата, корелиращи на част от вторичните фигури на Scherer. От вторичните фигури на Scherer, отчитане на експресия не бе възможно само при феномена на невронална сателитоза, предвид наличието на на Diaph3 позитивни неврони в контролите от здрав мозък.

Умерено до високо интензивна експресия в единични клетки в граничната зона се отчете в зоните на васкуларна сателитоза, където експресията в разпространяващите се туморни клетки е с по-висок интензитет от запазената физиологична експресия в ендотелните клетки на малките съдове (Фигура 5.22).



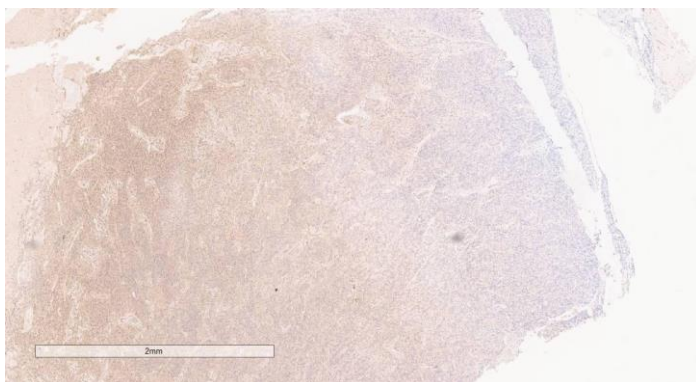
*Фигура 5.22 - Повишено количество на позитивни клетки с умерено до високо интензивна експресия в привидно неангажиран от туморният процес мозъчен паренхим, разположени около малките съдове, имунохистохимично маркиране с Diaph3; А и Б - оригинално увеличение x 400*

Идентична характеристика на имуноекспресията на антитялото имаха и зоните на трактова агрегация (Фигура 5.23), където се отчете паралелно подреждане на лонгитудинално разположени малки клетки с умерено до високо интензивна имунореактивност.

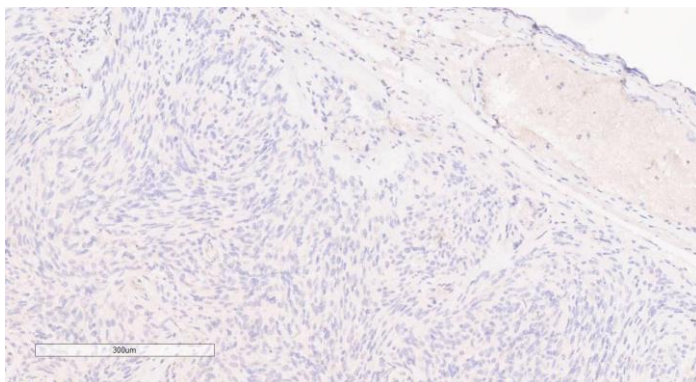


*Фигура 5.23 - лонгитудинално и паралелно подреждане на групи от клетки с умерено до високо интензивна реакция в привидно нормоцелуларна, макроскопски неангажирана от тумора зона, имунохистохимично маркиране с D1apH3; А и Б - оригинално увеличение x 200*

При туморите макроскопски и хистологично ангажиращи и крайномозъчната кора до границата ѝ с меката мозъчна обвивка се наблюдаваше значителен градиент в експресията на антитялото (Фигура 5.24). От особен интерес тук е, че описаният градиент е към пълна загуба на имуноекспресия в зоните на субменингеална палисадност (Фигура 5.25).

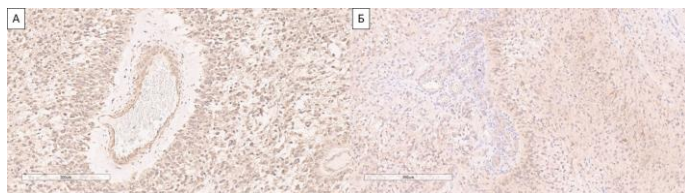


*Фигура 5.24 - градиент в имуноекспресията на мултиформен глиобластом ангажиращ цялата дебелина на крайномозъчната кора, имунохистохимично маркиране с Diaph3, оригинално увеличение x 20*



*Фигура 5.25 - загуба на имунореактивност на клетките на мултиформен глиобластом в зона на субменингеална палисадност, имунохистохимично маркиране с Diaph3, оригинално увеличение x 100*

Извън диагностичните критерии и феномените на растеж, силна имунореактивност за антиялото бе отчетена в ангиоцентричните макророзети около големи кръвоносни съдове, без да е на лице инвазия в тях (Фигура 5.26). Този феномен, най-вероятно е тясно свързан с васкуларната сателитоза, като туморните клетки първо ангажират големите съдове, а след това се разпространяват по техните малки клонове.



*Фигура 5.26 - макророзети около голямокалибрени кръвоносни съдове - туморните клетки са с високо интензивна имунореактивност, но не пенетрират в стената на съда, имунохистохимично маркиране с Diaph3: А - напречен срез на голям съд, оригинално увеличение x 100; Б - надлъжен срез на съд от среден калибър, оригинално увеличение x 100*

На фона на тази силно изразена хетерогенност на експресията на Diaph3 в различните зони на тумора, посредством посочения в глава Материал и методи алгоритъм на роботно отчитане на позитивните клетки в тумора се отчете изключително голяма вариабилност по отношение на съотношението на позитивни клетки в туморния паренхим със среден процент на експресиращи

туморни клетки в паренхима от 62.66%, диапазон 12-96% (Таблица 5.6).

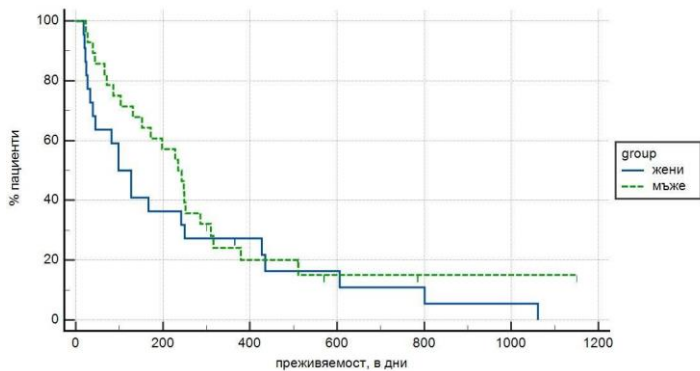
*Таблица 5.6* Дескриптивни характеристики на експресията на *Diarh3* в мултиформен глиобластом

<i>стойност</i>	<i>Diarh3 (%)</i>
средна стойност	62.66
медиана	61.5
мода	53 и 90
минимална стойност	12
максимална стойност	96

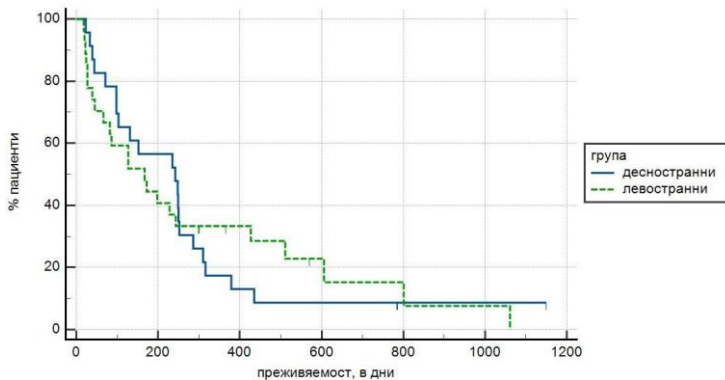
### 5.10 Статистически анализ

Както вече бе споменато средната продължителност на живота при пациентите в кохортата е 255.96 дни (8.41 месеца), като тя е по-висока при мъжете - 274.43 (9.02 месеца) в сравнение с 232.46 дни (7.64 месеца) при жените, като тази разлика не е статистически значима  $p > 0.05$  (Фигура 5.27).

По отношение на латералността на процеса - левостранен или десностранен, средната преживяемост при левостранните тумори е 254.41 дни, в сравнение с 257.78 при десностранните, като разликата в преживяемостта отново не е статистически значима -  $p > 0.05$  (Фигура 5.28).



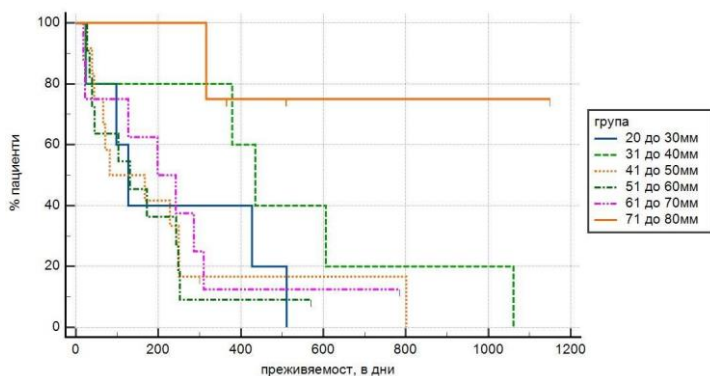
*Фигура 5.27 - Kaplan-Meier анализ на преживяемостта спрямо пол*



*Фигура 5.28 - Kaplan-Meier анализ на преживяемостта спрямо латералност на тумора*

По отношение на туморния размер, туморите бяха разделени на 6 групи, като средната продължителност в тях бе както следва: 20-30мм - 237.4 дни; 31-40мм - 500.8 дни; 41-50мм - 193.67 дни; 51-60мм - 169.36 дни; 61-70мм

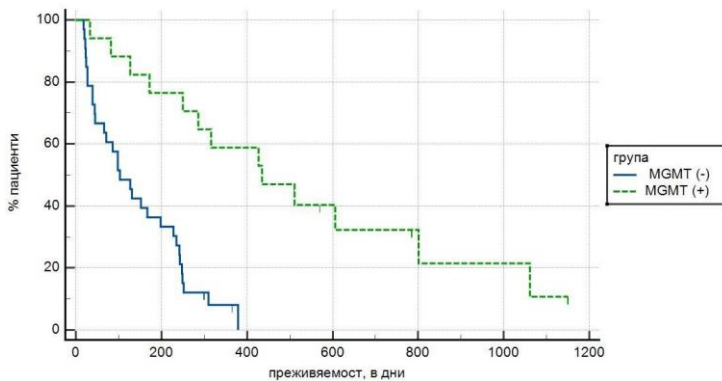
- 248.5 дни и 71+мм - 585.25 дни. Спрямо туморният размер групите бяха изключително разнородни, както по наблюдавата в тях преживяемост, така и по броят случаи в тях, вариращ от четири случая в групата 71+мм до 12 случая в групата 41-50мм. Сравнение на преживяемостта по групи, използвайки 1-way ANOVA тест и Kaplan-Meier анализ на преживяемостта, показаха че няма статистически значима разлика в преживяемостта на различните групи,  $p > 0.05$  (Фигура 5.29).



*Фигура 5.29 - Kaplan-Meier анализ на групова преживяемостта спрямо първичен размер на тумора*

Най-голяма разлика в преживяемостта се установи на база на MGMT статуса, където средната преживяемост на пациентите от кохортата с MGMT позитивни тумори е 477.77 дни (15.7 месеца) срещу 141.58 дни (4.65 месеца) със статистическа значимост от  $p < 0.0001$  (Фигура 5.30).



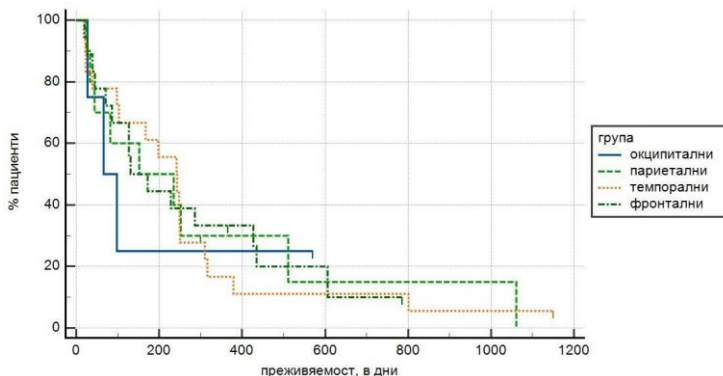


*Фигура 5.30 - Kaplan-Meier анализ на преживяемостта спрямо MGMT статуса на туморите*

Спрямо туморната локализация в лоб, при фронталните тумори средната преживяемост е 248 дни, при темпоралните - 284.94 дни, при париеталните - 310.23 дни, а при окципиталните - 190.25 дни. Отново бяха наблюдавани големи различия в групи, не само по отношение на броя случаи в група по и по преживяемостта наблюдавана в групата, като 1-way ANOVA тестът и Kaplan-Meier анализ на преживяемостта не показва статистически значима разлика в преживяемостта,  $p > 0.05$  (Фигура 5.31).

Спрямо възрастовите групи, в групата 41-50 години средната преживяемост е 584.75 дни, в групата 51-50 е 306.43 дни, в групата 61-70 е 284.47 дни, в групата 71-80 е 104 дни и в групата 81-90 години, средната преживяемост в кохортата е 47.25 дни. 1-way ANOVA тестът и Kaplan-Meier анализ показаха статистически

значима разлика в преживяемостта с  $p=0.0059$  (Фигура 5.32). На втори етап бе извършен post comparison Tukey test, който установи, че възрастовата група 41-50 години живее статистически по-дълго в сравнение с групите 71-80 и 81-90 години, като статистически значима разлика не бе установена между останалите групи (Таблица 5.7).

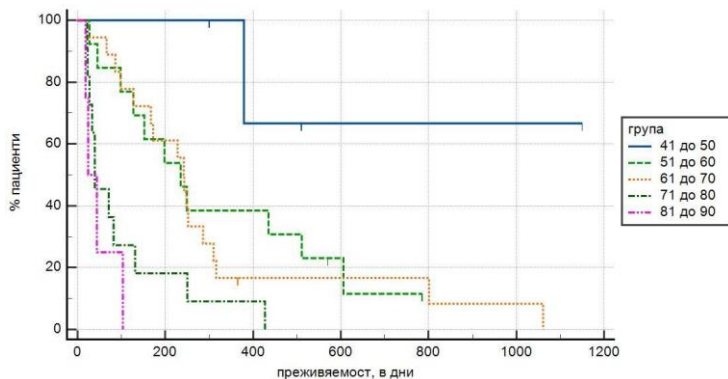


Фигура 5.31 - Kaplan-Meier анализ на преживяемостта спрямо локализацията в лоб

Таблица 5.7 - post comparison Tukey test за сравнение на преживяемостта между различните групи за статистическа значимост

преживяемост на 41-50 спрямо	разлика	df	статистическа значимост
51-60	278.32	2.97	не
61-70	300.28	3.27	не

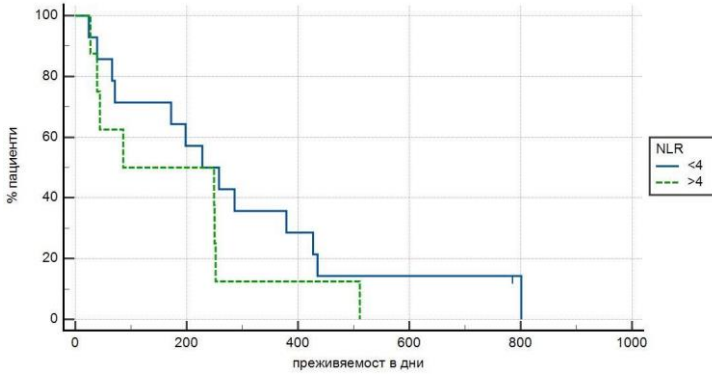
71-80	480.75	4.98	да
81-90	537.5	4.6	да



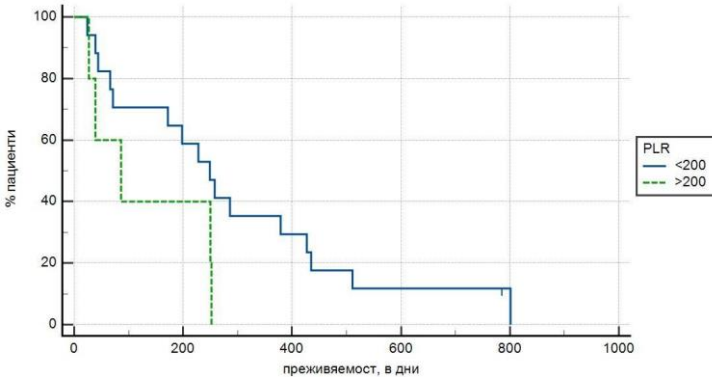
*Фигура 5.32 - Kaplan-Meier анализ на преживяемостта спрямо възрастовите групи на пациентите*

По отношение на реакцията на имунната система, не бе установена корелация на преживяемостта при пациенти с  $NLR > 4$ ,  $p > 0.05$ , които са с преживяемост 182.25 дена, срещу 297.79 дена при пациенти, при които този показател не е завишен (Фигура 5.33).

Отново с  $p > 0.05$ , не бе установена статистически значима разлика в преживяемостта при пациенти с  $PLR > 200$ , при които средната преживяемост е 130.8 дена, спрямо 292.53 дни при пациентите при които този показател не е завишен (Фигура 5.34).



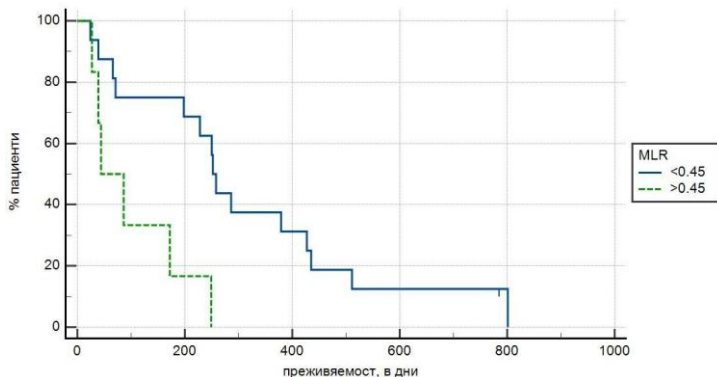
Фигура 5.33 - Kaplan-Meier анализ на преживяемостта спрямо съотношението неутрофили към лимфоцити



Фигура 5.34 - Kaplan-Meier анализ на преживяемостта спрямо съотношението тромбоцити към лимфоцити

Статистически значима разлика в преживяемостта, с  $p=0.0044$  се установи при пациенти с  $MLR >0.45$ , като при тези пациенти преживяемостта е значително по-ниска

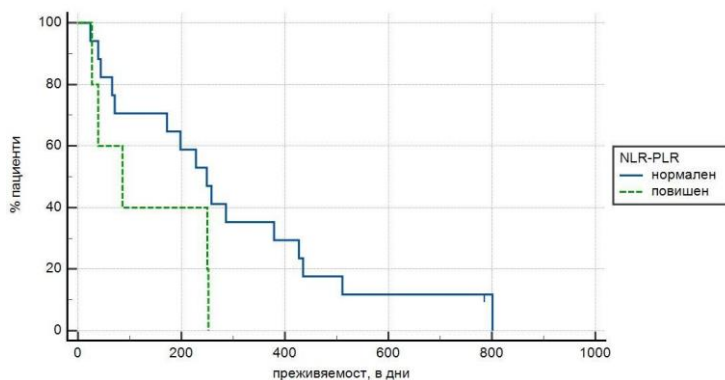
- 103.83 дена срещу 313.13 при пациенти, при които не се наблюдава повишаване на индекса (Фигура 5.35).



*Фигура 5.35 - Kaplan-Meier анализ на преживяемостта спрямо съотношението моноцити към лимфоцити*

При изчисляването на комбиниран индекс на повишени NLR и PLR, NLR и MLR, MLR и PLR, както и NLR, PLR и MLR се установи, че статистически значима разлика в преживяемостта имат пациентите, при които се установява комбинирано повишаване на циркулиращите моноцити и поне още един от изследваните маркери, като при тези пациенти се наблюдава значително по-малка преживяемост, която не е асоциирана с възрастта, спрямо пациенти при които тези показатели са в норма. Установените статистически величини са както следва: пациентите със синергично повишени NLR и PLR са без статистически значима разлика в преживяемостта със статистически значима по-ниска преживяемост,  $p > 0.05$ , преживяемост 130.8 срещу 292.53 дена; пациенти със

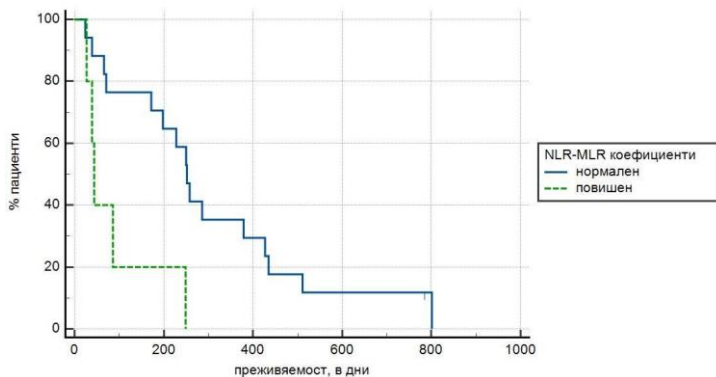
синергично повишени NLR и MLR са със статистически значима но-ниска преживяемост,  $p=0.0062$ , 100.25 срещу 291.56 дена; пациентите със синергично повишени MLR и PLR са със статистически значима по-ниска преживяемост,  $p=0.0044$ , 50.67 срещу 288.16 дена, като при всички пациенти от тази група имаше и синергично повишаване и на трите показателя - NLR, PLR и MLR, като отново бе отчетена статистически значима по-ниска преживяемост,  $p=0.0044$  (Фигура 5.36-38).



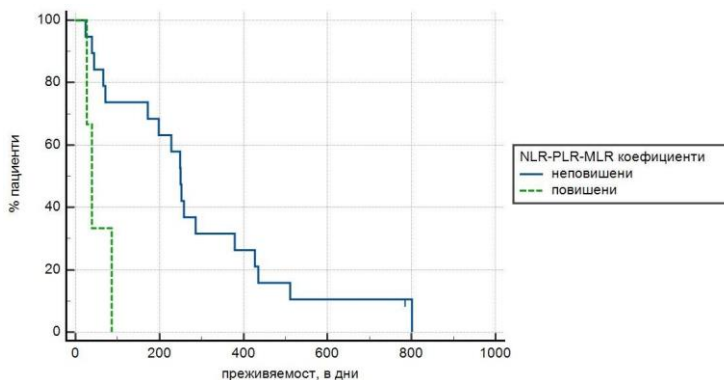
*Фигура 5.36 - Kaplan-Meier анализ на преживяемостта спрямо синергично завишени показатели неутрофили към лимфоцити и тромбоцити към лимфоцити*

По отношение на процента на експресиращите *Diaph3* туморни клетки, случаите в кохортата бяха разделени дихотомно, като за гранична стойност приехме експресия на 60%, като най-близка до медианата кръгла стойност. По този начин двете оформени групи, с ниска и висока степен на експресия, включваха максимално

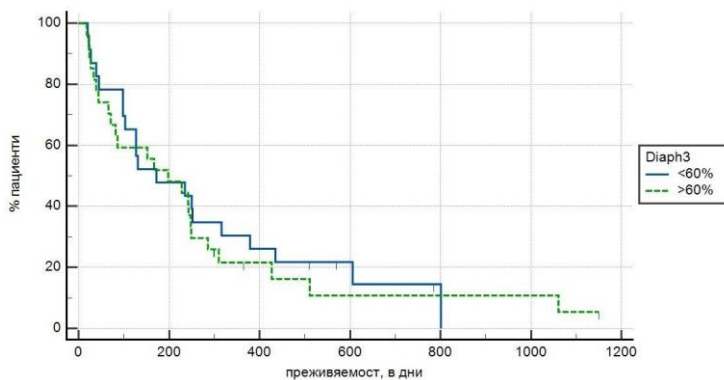
близък по брой тумори -  $n=26$  за групата с високи нива на експресия и  $n=24$  за групата с ниски нива на експресия. Анализ на значението на нивата на експресия спрямо преживяемостта на пациентите в групата посредством метода на Kaplan-Meier, показва  $p>0.05$ , със средна продължителност на живота в групата с висока експресия от 246.19 дни, срещу 267.17 дни (Фигура 5.39).



*Фигура 5.37 - Kaplan-Meier анализ на преживяемостта спрямо синергично завишени показатели неутрофили към лимфоцити и моноцити към лимфоцити*



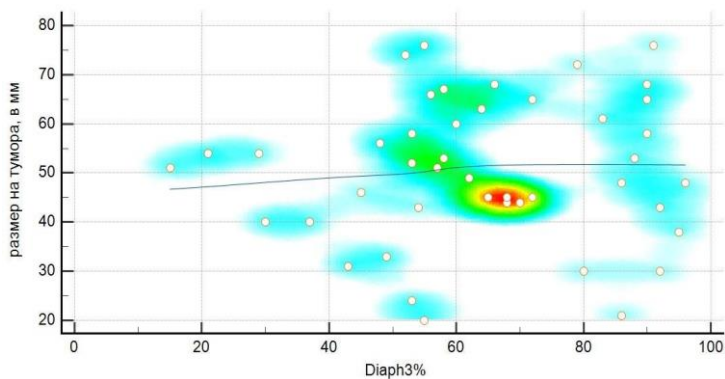
Фигура 5.38 - Kaplan-Meier анализ на преживяемостта спрямо спрямо синергично завишени показатели неутрофили към лимфоцити, тромбоцити към лимфоцити и моноцити към лимфоцити



Фигура 5.39 - Kaplan-Meier анализ на преживяемостта спрямо нивата на туморни клетки експресиращи Diaph3



Не бяха установени статистически зависимости между експресия на *Diaph3* и възрастта, пола, локализация и туморен обем,  $p > 0.05$  (Фигура 5.40).



*Фигура 5.40 - Корелационен анализ с heatmap за съпоставка на туморния размер и процентната експресия на *Diaph3* от туморните клетки*

## **6. Дискусия**

### **6.2 IDH R132H мутационен статус**

В нашата кохорта, както вече бе посочено, мутантен фенотип бе установен при 9.1% (n=5) от общо n=55 пациента в първичната кохорта, даваща възможност за рекласифициране на туморите по новата класификация. Тези наши данни изцяло са съпоставими с данните на големите кохорти, където честотата на IDH мутантите, понастоящем дифузен астроцитом, СЗО ЦНС грейд 4, варира около 10% от глиобластомите по класификацията от 2016 година, а други форми на мутация в IDH1 освен тази в R132H локустът, както и мутации в IDH2 са показани като по-скоро казуистика, отколкото статистически значима форма на мутация (Lai *et al.*, 2011; Yan *et al.*, 2009). Съпоставимо с тези данни е и възрастово-половото разпределение, мутантните форми са по-чести в младата възраст под 50 години, като са най-често срещани при жени (Lai *et al.*, 2011).

### **6.3 Честота, демографска характеристика и преживяемост**

Предвид случаите които са рекласифицирани в друга от ГБМ група, няма драстично да се промени заболяемостта от мултиформен глиобластом, който в нашата популация по собствени данни от предходна пет годишна кохорта (n=183) е 2.03 случая на 100 000 души население годишно (Stoyanov *et al.*, 2017), което е пониска честота от последните докладвани данни от САЩ -

3.23 случая на 100 000 души население, при съпоставима медианна възраст от 65 години, като честотата е значително по-високи при мъже - 4.04, спрямо 2.53 за жени (Ostrom *et al.*, 2021).

Драстична разлика, обаче, ще настъпи в средната възраст на начало на заболяването, като се има предвид че мутантните форми са по-чести в младата възраст под 50 години, като също така ще има статистическо покачване на случаите при мъже, поради по-голямата честота при жени. Така например настоящата средна възраст в кохортата е 65.3 години, докато в предходната ни кохорта тя е 59.18 (Дженков, 2018). Друго пряко следствие от промяната в класификацията е намаляване на средната преживяемост при пациентите, като се има предвид попадането на по-дълго преживяващите пациенти в друга нозологична единица. С тези новости в класификацията промените могат да бъдат сумирани като - глиобластомът е тумор характерен за старческата възраст, по-чест при мъже, с лоша прогноза.

Именно поради тази причина Kim дефинира мултиформения глиобластом от клинична и епидемиологична гледна точка и като неврологично заболяване, което е характерно при мъже в напреднала възраст (Kim *et al.*, 2021). От своя страна Ostrom, извежда средна годишна заболеваемост от 3.99 на 100 000 души население за мъже и 2.52 на 100 000 души население при жени, като посочените разлики във възрастовото разпределение са съпоставими с настоящите резултати и резултатите от предходната ни кохорта (Ostrom *et al.*,

2018; Stoyanov *et al.*, 2017). В същото проучване макар че е базирано на класификацията за СЗО от 2016 година, Ostrom прави анализ и на преживяемостта, паралелно на ГБМ с и отделно без IDH мутация. В анализът на туморите без IDH мутация, отговарящи на мултиформен глиобластом по класификацията на СЗО за туморите на ЦНС от 2021 година, медианната установена преживяемост в цялата кохорта, която наброява повече от 200 души, е 16.9 месеца, като медианната преживяемост при мъжете е 15 месеца, а при жените 25.5 месеца. На базата на тези епидемиологични данни и изведената преживяемост в кохортата, ГБМ е не само по-често срещан тумор при мъже, но е и със значително по-лоша прогноза при тях.

Както се вижда от резултатите в нашата кохорта значителна разлика в преживяемостта между мъже и жени няма, като средната преживяемост при мъжете е дори по-висока в сравнение с тази при жените. От сравнителния анализ с CBTRUS се вижда, че в нашата кохорта средната преживяемост е значително по-ниска - 8.41 месеца срещу 16.9 месеца, т.е. повече от два пъти (Ostrom *et al.*, 2021). Въпреки това, преживяемостта в настоящата кохорта е обнадеждаващ фактор, предвид рязкото ѝ покачване спрямо предходна наша кохорта (n=94), която при наличие на IDH мутантни форми е със средна преживяемост 197.5 дни (6.49 месеца) (Дженков, 2018). Въпреки значително по-ниската средна преживяемост в нашата кохорта, преживяемостта на първата година - 26%, на втората година - 8% и на третата година 4% са данни съпоставими или близки до

докладваните в други проучвания (Batash *et al.*, 2017; Tamimi и Juweid, 2017; Thon *et al.*, 2013; Witthayanuwat *et al.*, 2018).

Както се вижда от нашата извадка и сравнението с другите кохорти, въпреки по-висока преживяемост при тях, мултиформеният глиобластом е тумор с изключително лоша прогноза. Въпреки огромните ресурси насочени в проучването на биологичното поведение на тумора и възможностите за фармакологично и нефармакологично повлияване, исторически преживяемостта остава почти непроменена, в сравнение с други малигнени заболявания където има значително понижаване на смъртността през последните десетилетия, като например плоскоклетъчният карцином на маточната шийка (Cervical Cancer — Cancer Stat Facts). Видно от данните на CBTRUS, нашите извадки, ограничените данни от Националния раков регистър на Република България и GLOBOCAN е че ГБМ е най-честият тумор на нервната система, като според някои статистики има по-голяма честота от някои малигнени заболявания с по-голям обществен обхват, като например ракът на ларинкса, щитовидната жлеза и болестта на Ходжкин (CBTRUS Fact Sheet 2021 - CBTRUS, n.d.; Stoyanov *et al.*, 2018, 2017; Sung *et al.*, 2021; Werneck de Carvalho *et al.*, 2017; Валерианова *et al.*, 2017, 2015; Дженков, 2018). Също така от посочените големи статистически извадки е очевидна по-високата честота, не само на ГБМ, но и на всички тумори на ЦНС в развитите страни, спрямо развиващите се (CBTRUS Fact Sheet 2021 - CBTRUS). Този факт разбира се е свързан осовно с достъпа до медицинска

помощ и наличието на модалности за диагностицирането на тези нозологични единици, а не реална по-ниска заболяемост в тези популации (Peters *et al.*, 2008; PUNCHAK *et al.*, 2018; Weiss *et al.*, 2020). За жалост установената при нас по-ниска заболяемост в сравнение със страните с висок икономически ресурс, ни поставя в групата страни с относително висок процент на скрита заболяемост (Ostrom *et al.*, 2021; Stoyanov *et al.*, 2018, 2017, 2017). Предвид данните за относително високата честота на ГБМ в някои региони са регистрирани опити за програми за ранна диагностика, предвид невъзможността от профилактика, както е например при малигнените заболявания на маточната шийка, бял дроб, ларинкс, дебело черво и стомах (Neugut *et al.*, 2019). Предвид липсата на ефективен скрининг, за разлика от други малигнитети като простатния, дебелочревния, мамарния и тиреоидния карцином, поради необходимостта от оборудване и персонал за неврорадиологични изследвания, тези програми обаче са неефективни на първо място по финансовия ресурс спрямо ползата, като също така оказват малък ефект върху преживяемостта на ранно диагностицираните пациенти (Croswell *et al.*, 2010; Jakola *et al.*, 2012; Komotar *et al.*, 2008; Neugut *et al.*, 2019; Verduin *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2014). Към настоящия момент единственият финансово ефективен скринингов метод, въпреки ниската му специфичност е изследването на циркулиращи нива на GFAP, който е по-сокоро насочващ към наличието на патологичен процес в централната нервна система и ефективен при проследяването на тези пациенти, предвид факта че завишени циркулиращи нива са установени както при

всички групи тумори, включително и метастатични, така и при мозъчно-съдови, възпалителни и невродегенеративни заболявания (Abdelhak *et al.*, 2018; Jung *et al.*, 2007; Puspitasari *et al.*, 2019; Saraste *et al.*, 2021; Sharquie *et al.*, 2020; Tichy *et al.*, 2015; Verberk *et al.*, 2021).

#### **6.4 MGMT мутационен статус**

Основен фактор със значение за преживяемостта на пациентите с мултиформен глиобластом по критериите на СЗО за туморите на ЦНС от 2021 остава MGMT мутационният статус, показващ възможността за повлияване на тумора от терапия с темозоломид. В нашата кохорта честотата на MGMT позитивните тумори е 35% (n=17), която е съпоставима с литературните данни, където честотата варира между 30% и 60% (Costa *et al.*, 2010; Choi *et al.*, 2021; Håvik *et al.*, 2012; Incekara *et al.*, 2020; Pandith *et al.*, 2018). В нашето изследване разликата в преживяемостта е с извънредно голяма статистическа значимост от  $p=0.0001$ , със средна преживяемост в MGMT позитивните тумори от 477.77 дни срещу 141.58 дни при негативните, като статистическата значимост е съпоставима с тази, докладвана от други автори, така както и средната продължителност на преживяемостта при положителните случаи (Annavaarapu *et al.*, 2021; Fuster-Garcia *et al.*, 2021; Radke *et al.*, 2019; Smrdel *et al.*, 2016). Сходно съотношение се установява и при преживяемостта на първата, втората и третата година (Izadpanahi *et al.*, 2014; Ostrom *et al.*, 2021). От тези данни можем да заключим че голямата разлика в преживяемостта между нашето и други сходни проучвания се дължи не на MGMT

позитивните случаи, където тя е почти еднаква, но предимно на MGMT негативните случаи, където преживяемостта е значително под докладваната (Izadpanahi *et al.*, 2014; Ostrom *et al.*, 2021).

## **6.5 Туморна локализация, размер, растеж и роля на неврорадиологичните модалности**

По отношение на туморната локализация, е трудно в този преходен период на класификацията да се направи сравнение с установените по литература данни поради различията в биологичното протичане на туморите с и без IDH мутация. Един от малкото анализи на локализацията на IDH мутантните форми показва, че те са най-често установими във фронталния лоб (Lai *et al.*, 2011). IDH мутантната форма е основна част от групата на вторично възникващите глиобластоми - възникнали на базата на предходен нискостепенен глиом. Тези форми на ГБМ по дефиниция са бавно растящи, по-малко инвазивни и с по-малки размери. Въпреки това те остават агресивни тумори, като в обща кохорта (тумори с и без мутация) Stensjoen посредством повторни неврорадиологични изследвания при 106 пациента преди хирургично лечение установява, че дневният процент на увеличаване на туморния обем е 1.4%, а времето за удвояване е 49.6 дни (Stensjøen *et al.*, 2015). Ако приемем че 10% от туморите в тази извадка губят класификацията си като ГБМ по критериите на СЗО от 2021, то растежът на новопредефинираният ГБМ със сигурност е още по-агресивен. В по-малка група (n=32) с подобна характеристика и използвайки сходни методи, Wang



установява, че времето за удвояване на туморния обем е 17 дни (Wang *et al.*, 2009). В описание на случай на 60 годишен мъж Zhang илюстрира неврорадиологично прогресия на мултиформен глиобластом от 7 мм до 13 мм лезия на 12 ден, 17 мм на 23 ден и ангажиране на почти цялата хемисфера 7 месеца след първите симптоми, поради което предполага, че мултиформеният глиобластом удвоява размерите си за около 10 дена (Zhang *et al.*, 2016). Както се вижда и от случаите с нашата кохорта, макар само двама пациента да имат предходно болнично-базирано неврорадиологично изследване, мултиформеният глиобластом е тумор с фулминантно развитие и бързи темпове на растеж. Въпреки че на базата на само две неврорадиологични изследвания, на първото от което тумор не е наличен, не можем да определим темпът на растеж на туморите, те добре подчертават агресивността му. Най-добре това е видимо при 74 годишната пациентка, при която само за четири седмици се развива тумор с най-голям размер 26мм.

Предвид бързия растеж на тумора и дифузия му характер, който не може да бъде установен добре неврорадиологично, неврохирургичните интервенции при мултиформен глиобластом са не само трудни методологично и с последстващ неврологичен дефицит, но и ключови за преживяемостта на пациентите. При анализ на преживяемостта на повече от 400 пациента с мултиформен глиобластом по старите класификации, Lасгоix установява че едва при ексцизия на повече от 85% от неврорадиологично установения туморен обем се наблюдава подобряване в преживяемостта на пациентите

спрямо биопсия и ограничена резекция, като статистически значима разлика в преживяемостта се наблюдава при резекция на над 98% от неврорадиологично установения туморен обем (Lacroix *et al.*, 2001). Един от пионерите на съвременната неврохирургия Walter Dandy съобщава за пет случая на хемисферна резекция, четири от тях при пациенти с глиоми, като въпреки високата постоперативна смъртност (един умира 48 часа след операцията поради кръвоизлив, друг – след две седмици от пневмония), другите трима преживяват между три месеца (пациент с пеперудообразен глиом) и три и половина години след операцията (Dandy, 1928).

По отношение на туморната локализация, Flores при 44 пациента, само с мултиформен глиобластом по класификацията на СЗО от 2021 година и много близки до нашите демографски характеристики установява, че по-голямата част от туморите (59.1%) са локализирани в дясна голямомозъчна хемисфера, а най-честата локализация е във фронталния лоб (29.5%), следван от темпорален и паритален с по 25% и най-рядка локализация в окципитален лоб (Palpan Flores *et al.*, 2020). Въпреки различията между двете изследвания, Flores също стига до извода, че неврорадиологично изведените параметри на тумора са съпоставими с тези от триизмерните реконструкции (Palpan Flores *et al.*, 2020). В друга, сходна по обем и полово разпределение група, но със значително по-ниска средна възраст (49.05 години), Abd-Elghany установява че отново най-честата локализация на мултиформения глиобластом е във

фронталния лоб, следвани от темпорален, париетален, окципитален лоб и най-рядко субтенториално (Abd-Elghany *et al.*, 2019). Въпреки различията в локализацията между трите кохорти, тъй като при нашата извадка най-честа локализация е темпоралната, те добре подчертават разнородността на произход на тумора от различните структури на главният мозък. Обединяваща между трите кохорти е и изключителната рядкост на мултиформения глиобластом в окципиталните дялове.

В относително голяма извадка от глиоми, сред които и  $n=116$  глиобластома по критериите на СЗО от 2016 година, Larjavaara установява, че глиомите най-често са разположени във фронталния лоб, следвани от темпорален, париетален, париетален и са най-редки окципитално (Larjavaara *et al.*, 2007). В същото проучване на общата извадка от глиални тумори е установено че с най-малък туморен обем презентират туморите в окципитален лоб, следвани от париеталните, като най-голям е туморният обем във темпоралния лоб с пренебрежимо малка разлика спрямо фронталния (Larjavaara *et al.*, 2007). Тук отново, въпреки разликата в хистогенетичните критерии и в разпределението на тумора спрямо лобовете, неврорадиологично установения туморен размер е напълно съпоставим.

## **6.6 Роля на системния имунен отговор**

Системният имунен отговор – изследван от нас по показателите NLR, PLR и MLR, има потенциал да бъде добър биомаркер, предвид липсата на контакт с външната

среда и ниската честота на инфламаторните състояния на ЦНС в сравнение с други туморни локализации - бял дроб, отделителна система, дебело черво и др. През последните години в научната литература се натрупаха много данни за статистическа значимост на предоперативния NLR за преживяемостта на пациентите (Figueroa *et al.*, 2020; Haksoyler *et al.*, 2021; Lei *et al.*, 2019; Lopes *et al.*, 2018; Weng *et al.*, 2018). В допълнение, Weng установява и позитивна корелация между степента на повишаване на NLR и хистологичния грейд на туморите, а Haksoyler доказва, че прогностичната стойност на индекса се запазва и при рецидив на заболяването (Haksoyler *et al.*, 2021; Weng *et al.*, 2018).

По отношение PLR коефициента, данните са противоречиви - някои автори отчитат статистическа значимост, докато други, подобно на нас я отричат (Baran *et al.*, 2019; Kaya *et al.*, 2017; Kemerdere *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2018; Yang *et al.*, 2020). Интересен факт, допълващ неуточненото значение на PLR индекса е, че автори, изследващи комбинираната роля на NLR и PLR отбелязват, че комбинираният коефициент има същото статистическо значение както и NLR сам по себе си (Kaya *et al.*, 2017; Kemerdere *et al.*, 2017). Тази корелация, която макар и без статистическа значимост се установи и от нас.

Най-голяма статистическа значимост спрямо преживяемостта отчетохме при MLR индекса, самостоятелно и в комбинация с други маркери на инфламаторния отговор. Сходни резултати са получени и

при други изследвания (Baran *et al.*, 2019; Subeikshanan *et al.*, 2016; Zhao *et al.*, 2020).

### **6.7 Роля на Diaph3 във физиологични и някои патологични процеси**

Diaph3 е протеин, принадлежащ към групата на формините, които от своя страна са цитоплазмена група от протеини, участващи в полимеризацията на актиновите филаменти в процесите на пролиферация, стабилизирането на микротубулите, клетъчната миграция и делене, като те са също така важен интерфейс на сигнала трансдукция и процесите на вътреклетъчна регулация (Chalkia *et al.*, 2008; Evangelista *et al.*, 2003).

В човешкият организъм групата на формините е съставена от общо 15 протеина, разделени на седем подсемейства, много от които се коекспресират в голям брой тъкани (Schönichen и Geyer, 2010). Функциите на Diaph3, до голяма степен са характерни за по-голямата част от протеините от това семейство, като неговата физиологична роля е да опосредства полимеризирането на актиновите молекули, стабилизиране на микротубулите, като също има роля и в осъществяването на контакт с профилините - структурно оформяне на мобилни клетъчни израстъци като киноцилии и псеводопи (Palander *et al.*, 2021). Макар и по-слабо проучена, протеинът играе и роля в деленето на клетката, като участва в стабилизирането не само на делителното вретено, но и на цитоскелета като цяло (DIAPH3 Gene - GeneCards | DIAPH3 Protein).

Функционални промени при инактивация на Diaph3 в стволовите клетки по време на ембрионалното и фетално развитие на организма са асоциирани с митотични грешки, водещо до изчерпване на невроналните прогенитори и нарушения в образуването на цилиите на епителните клетки (Lau *et al.*, 2021; Palander *et al.*, 2021). На този етап съществуват оскъдни данни за ролята на протеина в заболявания на нервната система, като най-силни такива съществуват за аутистичният спектър от заболявания при загуба на експресия и автозомно доминантна аудиторна невропатия при свръхекспресия (Vorstman *et al.*, 2011).

Доклади за значението на Diaph3 са налични при малигнени тумори на панкреаса, простатата, млечната жлеза, черния дроб, плоскоклетъчния карцином на маточната шийка, както и при остеосарком (Iwadata *et al.*, 2010; Morley *et al.*, 2015; Rong *et al.*, 2021; Wan *et al.*, 2021; Zhang *et al.*, 2021; Expression of DIAPH3 in cancer - The Human Protein Atlas). Според данните на Human Protein Atlas и Foda по-благоприятна е прогнозата при висока експресия на Diaph3 за колоректалния карцином, докато тя е по-лоша при белодробен и ендометриален (AlRahman Foda *et al.*, 2018; Expression of DIAPH3 in cancer - The Human Protein Atlas).

От наличните данни за ролята на Diaph3 при злокачествени процеси е установено, че загубата на експресия води до т.нар. амебоиден фенотип - клетките придобиват пластични свойства, което им позволява да се придвижват в екстрацелуларния матрикс без да го

разрушават (посредством протеолиза или индуцирана некроза) или да адхезират с него, като по този начин малигнени клетки по-лесно и бързо навлизат в лимфни и кръвоносни съдове, което благоприятства метастатичния потенциал (Nager *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2021). При голяма група хистогенетично различни тумори, загубата на *Diaph3* е време свързан процес - наблюдава се като хетерогенен феномен с авансирането на тумора (Nager *et al.*, 2012).

Въпреки че е асоцииран с прогресирането на тумора и благоприятства метастатичния потенциал, феноменът на загуба на *Diaph3* може да е с потенциално предиктивен ефект за фармакологичното повлияване на туморите, предвид стабилизиращата му роля в цитоскелета на клетката. Противоречива и до голяма степен неизяснена обаче остава ролята на *Diaph3* при малигнени тумори - високата експресия е асоциирана с благоприятна прогноза при някои и неблагоприятна при други групи, това най-вероятно се дължи на мултифасетни механизми на туморна прогресия, като при някои тумори проеинът играе ключова роля, докато при други е страничен участник в прогресията на тумора (Wan *et al.*, 2021).

Като важна молекула, чиято загуба позволява ремоделирането на цитоскелета при амебоидната миграция на клетки, *Diaph3* играе основно роля в инвазията на околните тъкани и развитието на лимфонодуларни метастази при посочените тумори, като най-голяма специфичност е доказана при прогресията на

простатния, мамарния и хепатоцелуларния карцином, където експресията в метастатичните лезии е по-слаба, а слабо позитивни тумори са с по-лоша прогноза (Hager *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2014; Morley *et al.*, 2015). Взаимодействие е установено и при тройно негативния мамарен карцином, където свръхекспресията на *Diaph3* обаче е асоциирана с по-слаба инвазивност и метастатичен потенциал, следователно по-добра прогноза (Jiang, 2017). Данни съществуват и при плоскоклетъчния карцином на маточната шийка, където свръхекспресията на протеина се свързва с неблагоприятна прогноза, докато загубата на експресия - с по-бавна прогресия (Wan *et al.*, 2021). Според авторите на този доклад, загубата на *Diaph3* корелира с инактивация на mTOR пътя, който е важен афектор и регулатор на P13K и Akt пътищата (Tian *et al.*, 2019; Wan *et al.*, 2021). По този начин, загубата на експресия води до блокиране на сигналната трансдукция и взаимодействието на клетката с растежни фактори като EGFR и PDGF, които са с добре установена роля при мултиформен глиобластом (Akhavan *et al.*, 2010; Nagarajan и Costello, 2009). Друго интересно доказано взаимодействие на *Diaph3* при този тип тумори е че загубата на експресия води до повишена чувствителност на тези тумори към таксани (Morley *et al.*, 2015).

Интерес на този фон са получинет от нас данни по отношение на *Diaph3* експресията при глиобластоми, от които можем да заключим на първо място че мултиформеният глиобластом е тумор с хетерогенна експресия на *Diaph3*. Като към този фактор добавим и факта, че мозъчната тъкан е с предимно липсваща



експресия на антитялото, с изключение на единични позитивни клетки в крайномозъчната кора, както и че при реактивна глиоза е с добре представена фонова реакция, но цитоплазмената реакция за антитялото е в израстъците на клетки с астроцитна морфология, то  $\text{D}\alpha\text{r}\text{h}3$  се явява добър диференциално диагностичен маркер при отдиференцирането на тумор от реактивна глиоза. Разбира се, това не означава че  $\text{D}\alpha\text{r}\text{h}3$  е глиално специфичен маркер, предвид показаната експресия в нормални тъкани при мобилни, секретирани и ремоделиращи се клетки.

Ако приемем описаните до тук взаимодействия за валидни и при мултиформния глиобластом, то на базата на получените от нас резултати това допълнително подчертава хетерогенността на туморноклетъчната популация. От своя страна тази хетерогенност е както морфологична, така и имунофенотипна и функционална. По този начин допълнително се подчертава не само вътретуморна хетерогенност на клетъчната популация при мултиформен глиобластом, но също така и предизвикателствата в терапията му, предвид различията в сигналните пътища които могат да бъдат повлияни.

Не на последно място, чисто практичното приложение на експресията на  $\text{D}\alpha\text{r}\text{h}3$  в невропатологичната практика, може да бъде от помощ на невропатолога, при отдиференцирането не само на нормален паренхим от глиоза и тумор, но също така и при идентифицирането на туморни пролиферации при невронавигирани (стереотаксички) биопсии от периферните на тумора зони,

където ритмичните структури на растеж биват добре подчертани поради силната си експресия на антитялото.

## **6.8 Предиктивен потенциал на Diaph3 като биомаркер за отговор към терапия с рапамицин и таксани**

Един от предложените механизми е за ролята на Diaph3 в mTOR пътят на сигнална трансдукция, където загубата на експресия е свързана с инактивация на тази каскада (Месса *et al.*, 2018; Wan *et al.*, 2021).

Резултати публикувани от Wan демонстрират че високата експресия на Diaph3 е в положителна корелация с цисплатин, като анализ на клетъчни култури, показва че пониженото ниво на Diaph3 намалява експресията на mTOR свързаните протеини - p-AKT, mTOR и p-p70s6k и повишава експресията на PTEN - тумор супресорна каскада (Wan *et al.*, 2021).

Поради възможността за фармакологично повлияване на тези механизми, съществуват няколко предклинични проучвания изследващи ефекта на рапамицин (търговско наименование сиролимус) при терапията на пациенти с хистологично верифициран глиобластом (Chandrika *et al.*, 2016; Heimberger *et al.*, 2005; Zimmerman *et al.*, 2020). Използвайки клетъчни култури и ксенографски модели на глиобластом Arcella докладва намаляване на туморния обем с до 95% и почти двойно по-дълга преживяемост при терапия с рапамицин, посредством индукция на автофагията (Arcella *et al.*, 2013). Клинично проучване за ефекта на рапамицин при терапия на пациенти с мултиформен глиобластом

публикувано от Cloughesy показва добро повлияване на част от пациентите, със значителна редукция на клетъчната пролиферация, без значителни странични ефекти, при адекватна интратуморна концентрация на медикамента (Cloughesy *et al.*, 2008). Липса на ефект обаче е наблюдаван при почти половината пациенти, както и развитие на резистентност към терапия с времето (Cloughesy *et al.*, 2008).

Като се има предвид силната хетерогенност на експресия на *Diaph3* в нашата кохорта и описаните до тук механизми следва, че благоприятно повлияване от рапамицин биха имали само пациенти с голям процент позитивни на антигялото туморни клетки. Допълнителни доказателства за тази корелация са налични от данни за пациенти с туберозна склероза, които са предразположени към развитието на множество тумори, сред които и астроглиални, при които терапията със сирулимус оказва превантивен и антитуморен ефект (Li *et al.*, 2019).

Друга важна предложена роля на *Diaph3*, в фармакологичната терапия при малигнени заболявания е свързана с ниски нива на *Diaph3* и чувствителността към таксани и други медикаменти действащи върху микротубулите, предвид дестабилизиране на цитоскелета (Kawabata Galbraith и Kengaku, 2019; Lau *et al.*, 2021; Morley *et al.*, 2015). По данни публикувани от Morley клетки с ниска експресия на *Diaph3* показват повишена чувствителност към тези таксани (Morley *et al.*, 2015).

Анализ, отново на Morley, показва че няколко рандомизирани клинични проучвания за терапия на мамарен карцином с таксани докладват че ниски нива на интратуморна експресия или загубата на Diaph3 е свързана с по-добра прогноза при терапия с таксани (Morley *et al.*, 2015). По сходен начин данни от същия доклад показват че ниските нива на Diaph3 иРНК корелират с по-дълго време до настъпване на рецидив при същата терапия (Morley *et al.*, 2015).

Предвид тези данни и въпреки силната хетерогенност в експресията на нашата кохорта, изглежда тези механизми са валидни и за мултиформения глиобластом, при който съществуват не само данни за значението на mTOR пътят – ключово взаимодействащо звено, но и за ефективността на терапията с таксани, която значително повишава преживяемостта при част от пациентите (Akhavan *et al.*, 2010; Hess *et al.*, 2005; Iwadate *et al.*, 2010; Sémiond *et al.*, 2013; Stoyanov и Dzhenkov, 2017).

На фона на противоречивите данни от клинични и предклинични проучвания за ролята на таксаните и рапамицин при терапията на ГБМ и предвид сходното дихотомно разделение в нашата кохорта и докладваните от Arcella резултати – много добър ефект срещу липса на такъв, както и вътреклетъчните взаимодействия на Diaph3 можем да заключим че той е маркер със силен предиктивен потенциал в селекцията на пациенти подходящи за горепосочените терапии.

## 7. Изводи

Мултиформеният глиобластом, според критериите на СЗО за тумори на ЦНС от 2021 година е малигнен тумор с предимно астроцитна диференциация, клетъчен полиморфизъм, микроваскуларна пролиферация и/или псевдопалисадни некрози, който е без мутация в IDH.

Туморът се проявява с извънредно големи размери, средно над 50 мм в диаметър и с неврологичен дефицит, според засегнатата зона в главния мозък. Първичният туморен размер, локализацията и латералността на процеса нямат роля в прогнозата на пациентите. Статистическа значимост спрямо възрастта на поставяне на диагнозата се установи само между възрастовите групи 41-50 години и над 70 години.

Основен фактор, определящ прогнозата на пациентите е мутационният статус на MGMT, който показва възможността за конвенционално повлияване на тумора посредством терапия с темозоломид, където разликата в преживяемостта между двете групи е изключително голяма, не само по критерия средна преживяемост, а и за преживяемостта на първата, втората и третата година.

Въпреки относителната автономност на нервната система по отношение на имунния отговор, статистическата значимост в преживяемостта на пациентите с острофазов имунен отговор и/или занижен напрегнат имунитет е голяма. Според получените резултати с най-голяма статистическа значимост е

съотношението моноцити към лимфоцити от предоперативна кръвна картина, а повишаването на този коефициент е лош прогностичен белег.

Доказано е, че мултиформеният глиобластом е  $D1ap\eta3$  позитивен тумор, като позитивността е хетерогенна - силна в зоните на туморен растеж, където са на лице туморни стволови клетки, докато голяма част от зрелите туморни клетки са негативни за тумора. Не се установи корелация на нивата на експресия спрямо прогнозата на пациентите и туморния размер, но предвид установените взаимодействия на протеина с пътищата на сигнална трансдукция,  $D1ap\eta3$  е кандидат за биомаркер, показващ чувствителността на тумора към таксани.

## 8. Приноси

### 8.1 Приноси с клиничко-диагностичен характер

- потвърдена е корелацията между неврорадиологичните параметри при мултиформен глиобластом и извършени от тях обемни анализи на триизмерни реконструкции
- установени са предилекционните места за развитие на мултиформен глиобластом - фронтален, темпорален и париетален лоб, без наличие на разлика спрямо пол, възраст и латералност на процеса
- установен е средния неврорадиологичен размер на мултиформения глиобластом - малко над 50 мм при поставянето на диагнозата, вариращ в диапазон 20-76мм
- установено е значението на експресията на антитялото anti-Diaph3 в диагностиката на тумори на нервната система
- установена е формата на експресия на антитялото anti-Diaph3 в нормален мозъчен паренхим, при реактивна глиоза и при мултиформен глиобластом
- установена е липса на корелация между нивата на експресия на Diaph3 и преживяемостта и първичният туморен размер

### 8.2 Приноси с терапевтичен характер

- установена е ролята на системният имунен отговор в прогнозата на пациентите с мултиформен глиобластом

- потвърдено е ключовото значение на MGMT мутационният статус при пациенти с мултиформен глиобластом
- аргументирано е значението на експресията на *D1arh3* като евентуален предиктивен фактор за лечението на ГБМ с таксани и рапамицин.



## **9. Публикации по темата**

### **9.1 Устни доклади**

**Г Стоянов**, Е Лютфи, Д, Дженков, Л. Петкова. Роля на Diaph3 в растежа на мултиформен глиобластом. ЮБИЛЕЙНА НАУЧНА КОНФЕРЕНЦИЯ - 60 ГОДИНИ ПАТОФИЗИОЛОГИЯ - МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ- ВАРНА. 24 – 25 септември 2021, Варна, България.

### **9.2 Пълнотекстови публикации**

#### **9.2.1 В международни списания**

##### **9.2.1.1 В реферирани списания с импакт фактор**

**Stoyanov G**, Kitanova M, Dzhenkov D, Ghenev P (2019) The diagnostic dilemma of epithelial marker expression in glioblastoma. Pathology & Oncology Research, 25(2), 809-810.

**Stoyanov GS**, Dzhenkov D, Ghenev P, Iliev B, Enchev Y, Tonchev AB (2018) Cell biology of glioblastoma multiforme: from basic science to diagnosis and treatment. Medical Oncology, 35(3), 1-10.

##### **9.2.1.2 В реферирани списания, без импакт фактор**

**Stoyanov GS**, Petkova L, Dzhenkov DL (2019) Hans Joachim Scherer and his impact on the diagnostic, clinical, and modern research aspects of glial tumors. *Cureus*, 11(11).

**Stoyanov GS**, Petkova L, Dzhenkov DL (2019) A Practical Approach to the Differential Diagnosis of Intracranial Tumors: Gross, Histology, and Immunoprofile-based Algorithm. *Cureus*, 11(12).

**Stoyanov GS**, Sarraf JS, Matev BK *et al.* (2018) A comparative review of demographics, incidence, and epidemiology of histologically confirmed intracranial tumors in Brazil and Bulgaria. *Cureus*, 10(2).

**Stoyanov GS**, Dzhenkov DL (2018) On the Concepts and History of Glioblastoma Multiforme-Morphology, Genetics and Epigenetics. *Folia medica*, 60(1), 48-66.

**Stoyanov GS**, Dzhenkov DL, Kitanova M, Donev IS, Ghenev P (2017) Correlation between Ki-67 Index, world health organization grade and patient survival in glial tumors with astrocytic differentiation. *Cureus*, 9(6).

**Stoyanov GS**, Dzhenkov DL, Kitanova M, Ghenev P, Tonchev AB (2017) Demographics and incidence of histologically confirmed intracranial tumors: a five-year, two-center prospective study. *Cureus*, 9(7).

### **9.2.1.3 В международни, нереферирани списания**

Lyutfi EM, Georgieva R, **Stoyanov GS**, Dzhenkov D. (2020). Tumor growth patterns in central nervous system tumors with astrocytic differentiation. *Glioma*, 3(2), 67.

Georgieva R, Lyutfi E, **Stoyanov GS**, Dzhenkov D. (2020). CD34 neural progenitor cells in glioblastoma multiforme. Glioma, 3(1), 13.

**Stoyanov GS** (2019) The 2016 revision of the World Health Organization classification of tumors of the central nervous system: Evidence-based and morphologically flawed. Glioma, 2(4), 165.

### **9.2.2 В национални списания**

**Stoyanov GS**, Dzhenkov D, Ghenev P (2017) Cytokeratin AE1/AE3 mimicry in glioblastoma. Scripta Scientifica Medica, 49(1), 47-52.

**Stoyanov GS**, Dzhenkov D, Ghenev P. (2017). The Great Imitator-EMA positive glioblastoma multiforme. Scripta Scientifica Medica, 49(1), 21-25.

## 10. Благодарности

Благодаря на моя научен ръководител – проф. д-р Петър Генов, дм, за възможността да бъда негов докторант и градивната критика, която отправяше към извършената работа и оформлението на дисертационният труд.

Благодаря на моя научен консултант – доц. д-р Стоян Павлов, дм, за методологичните насоки в работния процес.

Благодаря на моя учител – доц. д-р Деян Дженков, дм, за това, че ме въведе в невропатологията, както и за цялата помощ в подбора на материали.

Благодаря на моите ментори - проф. д-р Антон Тончев, дмн, доц. д-р Николай Сапунджиев, дм и доц. д-р Камелия Братоева, дм за всички положени усилия и дадените ми възможности да развитие.

Благодаря на д-р Петър Вълчанов от Катедра анатомия и клетъчна биология за методологичната подкрепа в извършването на триизмерните реконструкции.

Благодаря на лаборантите Светла Костадинова за прецизността, с която изработи препаратите по дисертационния труд, както и на покойната Елена Боева, за това че ме въведе в тънкостите на това изкуство.

Благодаря на д-р Лиляна Петкова за непрекъснатата подкрепа в работния процес.

Благодаря на д-р Христо Попов, дм, д-р Ина Кобавока, дм, лаборант Ивета Дангова и препаратор Виолета Желязкова за ежедневната подкрепа и кураж, които ми вдъхваха.

Благодаря на колегите от Катедра обща и клинична патология, съдебна медицина и деонтология, с ръководител проф. д-р Мария Цанева, дм за помощта в трудните моменти.

Благодаря на моите колеги и приятели – д-р Емран Лютфи и бъдещата д-р Ренета Георгиева за методологичната подкрепа и неизчерпаемата енергия и хъс за работа.

Благодаря на колегите от Катедра анатомия и клетъчна биология, Катедра физиология и патофизиология, Катедра образна диагностика, интервенционална рентгенология и лъчелечение и Катедра неврология и невронауки за помощта в събирането на случаи и интерпретиране на резултатите.

Не на последно място благодаря и на моето семейство, за това че с техния труд и вяра в мен, платиха цената да стигна до тук.

**БЛАГОДАРИЯ!**