

**РЕЦЕНЗИЯ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД НА Д-Р ГЕОРГИ СТОЯНОВ СТОЯНОВ НА ТЕМА:
ПРОГНОСТИЧНИ И ПРЕДИКТИВНИ ФАКТОРИ ПРИ МУЛТИФОРМЕН ГЛИОБЛАСТОМ**

Съгласно заповед № Р-109-71/04.02.2022г. по процедура на ОНС „Доктор“ по докторска програма „Патоанатомия и цитопатология; професионално направление 7.1. Медицина, област на висше образование 7. Здравеопазване и спорт.

РЕЦЕНЗЕНТ ДОЦ. Д-Р МАРГАРИТА АНГЕЛОВА КАМЕНОВА, дм

Въведение

Глиобластомът /ГБМ/ е сред най-злокачествените тумори в човешката патология, характеризира се с изключителна хистологична и генетична хетерогенност. Стремещът да се разбере механизма на възникване на тази вариабилност и невъзможността да се създее агресивната му еволюция поддържа изключителен интерес за неговото изучаване и провокира различни становища за неговата същност. Откритието в последното десетилетие на мутацията на IDH1/2 се оказа ключов фактор в генезата на глиалните тумори. Постепенно генетичните увреждания не само на глиомите, но и на много тумори на ЦНС, придобиха голямо значение дори паритет в диагностиката им наред с хистологичните им характеристики още в ревизираната класификация, 2016г. Последната класификация на глиалните тумори, СЗО, 2021г. затвърди ролята на генетичните алтерации и доведе до надмощието им в конкуренцията между цитираните два метода. GBM, описан хистологично преди повече от 100 години, поддържаше почти еднотипно определение с голям обем от разнообразни подвидове, варианти и patterns, но съдържаше винаги триадата – клетъчен и ядрен атипизъм, бурна неоваскуларизация, дала основание за вазооклузивен модел на възникването им и некрози от палисаден и исхемичен фенотип. Доскоро съществуваше разделяне на GBM на две групи - IDH мутантен и IDH немутантен, като в тях бяха установени и разлики в клиничната им характеристика. В последната класификация на WHO, 2021 GBM се трансформира в два отделни туморни вида, независимо от сходната им хистологична картина. Малка част от наречените преди GBM отпаднаха от него и се преименуваха в дифузен астроцитом, 4 степен, на основание на мутацията на IDH. Голямата група запази своето име мултиформен глиобластом също поради статуса на IDH, който не е мутантен. Хистологичните критерии отстъпиха на заден план за идентификацията на злокачествените астроглиални тумори.

Дали тази таксономична промяна ще се отрази позитивно върху изучаване на поведението на GBM и повлияване от лечението му ще покажат бъдещите изследвания. Проучването на д-р Стоянов с прекласификация на GBM, съобразена с последните промени, е стъпка в това направление. Бързият рефлекс на дисертанта за преориентиране към новите класификационни схеми дават осъвременена информация за демографските особености, локализацията и някои прогностичните фактори на новоименувания GBM. Самият факт, че GBM се разглежда от автора като самостоятелен тумор в новата си

класификационна рамка и то с актуализирани клинични и имунохистохимични /ИХХ/ изследвания са предпоставка за ползотворни резултати и оригинални изводи.

Темата на дисертационния труд „Прогностични и предиктивни фактори при GBM“ е много обширна и е свързана с цялата история на глиомалогията. Прогностичите показатели на GBM са залежали още от класификацията на Бейли и Къшинг, в която се утвърждава клинично-морфологичното направление, кодирано от неговите автори патолог и неврохирург. Всички следващи фундаменталните трудове - на Кернохан, въвеждащ градирането, Шерер, Ръсел и Рубинщайн, са по същество хистобиологични, защото съчетават хистогенезата и хистологията с прогнозата. Тази тенденция изкрystalизира и в първата класификация на WHO под редакцията на Цюлх, 1979г. /степените се определят според преживяемостта/ и се поддържа до наши дни. Натрупани са стотици хистологични, хистохимични, имунохистохимични и флуорометрични данни, както и генетични алтерации, изучавани в насока на определяне на прогностичното им, а по-късно на предиктивното им значение. В обзора д-р Стоянов стеснява информацията и предвидливо я насочва в няколко параметри с евентуално прогностично и предиктивно значение, върху които ще концентрира изследванията си.

Обзорът се базира на 250 източници, които са предимно от последните години. След изложението за съществени исторически етапи от проучването на GBM и данни за последната класификация, 2021г., д-р Стоянов разглежда епидемиологичните публикации за разпределение на GBM по пол и възраст и за тяхната топография, определена според неврорадиологични изследвания. Съобщени са и нови тенденции в образната диагностика за триизмерно изследване на глиомите, представящо точната им обемна характеристика. Обзорът включва ролята на IDH, който се наложи като водещ генетичен фактор още в ревизираното 4-то издание, WHO 2016г. и на MGMT, чието значение като прогностичен и предиктивен биомаркер при глиомите е широко дискутирано в последното десетилетие. Обширно е разгледана ролята на Diaph3 в малигнени тумори не произхождащи от CNS, което е провокирало д-р Стоянов да проучи неговото значение в GBM. Изхождайки от ключовата позиция на Diaph3 върху формирането и функцията на цитоскелета той предполага, че в GBM като високомалигнен тумор с разстроена генетична стабилност е възможна алтерация и на този ген. Информацията от последните години за ролята на системната възпалителна реакция в злокачествени тумори, вкл. GBM показват, че нарушените съотношения между неутрофилните левкоцити, тромбоцитите и макрофагите с лимфоцитите имат прогностичен ефект и биха могли да насочат лечението към повлияване на тази реакция. Обзорът обединява данни от историческото развитие и актуалното състояние на проучванията върху GBM и някои аспекти на други малигнени тумори, и дава основание на д-р Стоянов да насочи изследванията си върху дискуссионни проблеми, фокусирани върху прогнозата, както и в изясняване на ролята на неизследвани в GBM маркери с възможно прогностично и предиктивно значение. Не мога да не се съглася с извода в обзора за недостатъчните данни за предиктивни маркери в GBM и за

противоречивия характер на някои от многобройните изучавани до сега биомаркери с прогностично значение.

Целта на автора е „На фона на нерешените проблеми да се *изследва кохорта пациенти с GBM като се направи комплексен анализ на възрастово-половите характеристики, туморен размер и локализация, значение на напрегнатия имунен отговор и преживяемостта при първично диагностицирани тумори и се сравнят с MGMT профила на туморите и значението за диагнозата и прогнозата на формите и нивата на експресия на Diaph3*”. Целта отговаря на задачите, темата и съдържанието на дисертацията, но за формулирането ѝ може да се пожелае по-синтезиран вид. *Всъщност целта е да се анализират редица клиникобиологични характеристики /демографски, топографски и лабораторни.../ и имунохистохимичните /ИХХ/ маркери MGMT и Diaph3 във връзка с тяхната роля като прогностични и/или предиктивни маркери.*

Задачите са свързани с целта и са описани пунктуално: подбор на тъканните блокчета, прекласифициране на ГБМ, демографска характеристика, анализ на съотношението неутрофилни левкоцити, тромбоцити и моноцити към лимфоцитите, установяване на образнодиагностичните анатомични параметри – размери и топография, изследване на експресията на MGMT и Diaph3 и статистически анализ на данните.

Материал. Изследвани са 62 блокчета от глиобластоми и 62 контролна група като 57 са с нормален мозъчен паренхим и 5 – с реактивна глиоза, уточнени са изключващи критерии, използвани са данни от История на заболяването и от неврорадиологични изследвания, необходими за изпълнение на определените задачи.

Методите са съвременни, широкообхватни, насочени към изчерпателно хистологично, клинично и неврорадиологично проучване и ИХХ изследвания напълно съответстващи на задачите. Голяма част от методиките са модернизирани с компютърна обработка на данните. Методите включват: Рекласифициране на всички тумори чрез анализ на хистологичните препарати и верифицирани с необходимия за диагнозата маркер IDH-1 R132H, изваждане от ИЗ на съотношението на неутрофили, тромбоцити и моноцити поотделно към лимфоцитите в кръвта, анализ на КТ и МТР образни изследвания с изработване на триизмерна реконструкция за определяне на обемите им, ИХХ изследване с MGMT антитяло и с Diaph3 антитяло в туморите, изследване на експресията на Diaph3 в реактивна глиоза и нормални мозъчни структури, статистически анализ. Методиката на ИХХ изследванията следват протокола на производителя и са валидирани с подходящи позитивни и негативни контроли и уточняване на работната концентрация. Тези методични уточнения са гаранция за високо качество и релевантност на резултатите. Подробно е описано двуетапното извършване на триизмерната реконструкция за разкриване на обема на тумора и авторския модел с цветна маркировка, която по-добре подчертава туморните размери и взаимоотношения със съседните мозъчни структури.

Проведено е дигитализиране и автоматична обработка на част от хистологичните срези и на всички ИХХ срези, модерен метод, който чрез софтуерна програма създава възможност за преглед на много срези при желаното увеличение. Извършено е роботно отчитане на експресията на Diaph3 посредством автоматизиран алгоритъм, което също удостоверява точноста на резултатите. Въвеждането на дигитализация на научните факти от д-р Стоянов е иновативен подход в изследванията, полезен и за телеконсултации, който заслужава да бъде поощряван и разпространяван в диагностичната практика на патолозите. Широко е приложен и статистически анализ, обезпечен от голям набор от статистически методи.

Резултати. След прецизиране на тъканните блокчета броят на изследваните случаи е уточнен на 55. Рекласифицирането на GBM с изискването за липса на мутации на IDH1 R132H е довело до отпадане на 5 пациента във възрастовата група под 50 години. Полученото съотношение IDH немутантен/мутантен ГБМ 10:1 съвпада с публикуваните досега резултати. Избраните илюстрации за промените в класификацията на ГБМ е много типична – и в двете хистоснимки има почти еднотипна хистология /слабо изразена разлика в целуларитета/, но на фиг. 5.1 се демонстрира тумор, който се отнасяше доскоро към глиобластом със структура на астроцитом /ГБМ, /WHO,2016/. Изследвани са важни демографски показатели за разпределение на ГБМ по пол и възраст.

В резултатите са описани точната локализация и размери в 45 пациенти според предоперативни неврорадиологични показатели. Установено е леко преобладаване на левостранните /55.55%/, обхващане на повече от един лоб в 40%, един мултицентричен тумор в двете хемисфери. Най-чести са ГБМ в темпоралния дял /37.78%/, следвани от париеалния /28.89%/, намаляване във фронталния до 24.44% и най-малко са в окципиталния дял /8.89%/. Направена е пълна топографска карта на разпределението според размера и съотношението им с лобовата локализация с незначими статистически разлики. Със стремеж за максимално извлечение на значението на всеки параметър на ГБМ, авторът търси факти в подкрепа на растежа на тумора и цитира два случая с повторно MRT изследване на мозъка, при които туморът нараства за 8 м. до 51 мм в единия случай, а в другия за 28 дни до 26 мм. Важно е да се отбележи, че нарастването на тумора по радиологични показатели може да се дължи на псевдопрогресия и е за препоръчване да се определя при съчетание с хистологично изследване. Нарастването зависи също от големината на остатъчния тумор, както и от пролиферативния капацитет. Моят личен опит доказва изключително бързо нарастване до удвояване на ГБМ в следоперативния период /до 2м./, зависим от хистологичните корелати на този растеж. Анализът на важни характеристики на GBM въз основа на неврорадиологичната картина с акцент върху размера, топиката и разпространението на тумора дава съществена информация с прогностично значение и обосновава до голяма степен лечебното поведение. Съпоставянето на хистологичните и образнодиагностични резултати, направен от д-р Стоянов, е необходим елемент на силно препоръчваната в последните години интегрирана диагноза и заслужава положителна оценка.

Изследването на туморите за MGMT е показала позитивност в 17 пациенти /35%/, 8 мъже и 9 жени. Възрастта и на двата пола е по-голяма при негативните случаи - средна възраст 66.79 г. у негативните срещу 62.42г. у позитивните пациенти.

Безспорен успех на дисертанта е изследване на пациенти, чиято преживяемост ни е известна - това се среща рядко в нашите условия, а е от първа необходимост да извлечем заключения за прогностичния и предиктивен ефект на определени биомаркери. Дисертантът намира средна преживяемост 8.41 месеци с диапазон от 18 дни до 1061 дни, като един пациент е жив 37.78 месеци след операцията. Преживяемостта е 26% през първата година, намалява на 8% през втората и е едва 4% на третата година, което съвпада с резултатите от големи клинични проучвания. Статистически анализ е проведен върху зависимостите на средната преживяемост с редица параметри. Не е отчетена статистически зависимост в преживяемостта и параметрите пол, латералност, лобова локализация и размери на тумора. Статистическа значима разлика е намерена между преживяемостта и възрастта само в групата 41-50 г. която живее по-дълго в сравнение с групите 71-80 и 81-90г.

Статистическият анализ води убедително до заключението, че **преживяемостта корелира с експресията на MGMT** и е увеличена при позитивни пациенти – средната преживяемост при позитивните е 15.7 месеца, а на MGMT негативните – 4.65 месеца със статистическа значимост от $p < 0.0001$. При MGMT позитивните тумори преживяемостта на първата година е припл. 59%, на втората и третата намаляват на 24% и 12%. Средната ѝ стойност е по-висока при мъжете - 9.02 месеца срещу 7.64 месеца при жените.

Много подробно са анализирани резултатите от **изследването на имунния отговор** според съотношението между левкоцити, тромбоцити и моноцити към лимфоцитите поотделно и в комбинация спрямо утвърдените стандарти за напрегнат имунитет. Те показват статистически потвърдена значително по-ниска преживяемост у пациенти с повишени циркулиращите моноцити - при стойности на MLR > 0.45 преживяемостта е 103 дни срещу 313 дни при пациенти без промяна на този индекс. Не са открити статистически значими разлики в преживяемостта и съотношението неутрофилни левкоцити /лимфоцити и тромбоцити/ лимфоцити.

Комбинираното изследване на всички индекси в проучването показва, че пациентите с повишаване на циркулиращите моноцити и още един маркер /синергично повишени NLR и MLR, както и MLR и PLR/ имат значително по-ниска преживяемост. С други думи нарушеното съотношение между моноцитите и лимфоцитите независимо дали са в самостоятелни съотношения или комбинирани с другите показатели показват статистически значима по-къса продължителност на живота.

Експресия на Diaph3 антитяло. Отчитането на реакцията е прецизирано относно разпространението, интензитета, локализацията в отделните компоненти на тумора - туморни клетки, израстъци, палисадни структури, ендотел. Реакцията е описана по сходни

показатели и в нормалното мозъчно вещество, менингите, съдовете и в реактивната глия. Експресия е установена във всички изследвани 50 GBM. Относно позитивността за Diaph3 случаите са разделени на две групи в зависимост от процента на експресиращите туморни клетки: над 60% са с високи нива на експресия, и под 60% - с ниски нива. 26 са в групата с високи нива /средна преживяемост 246 дни/ и 24 група с ниски нива на експресия /267дни/. Промените в ИХХ реактивност са описани в детайли в различните зони на тумора. Подчертана е хетерогенността на реакцията с различна интензивност в централната /слаба до липсваща/ и периферните зони, вкл. във феномените на растеж на Scherer. Високата интензивност в палисадите правилно е свързана с активната миграция на клетките извън некротичната зона. Силна имунореактивност е отбелязана в ангиоцентричните макророзети около големи съдове, което авторът обяснява с предположението, че „туморните клетки ангажират първо големите съдове, а след това се разпространяват по техните малки клонове“. Тази картина може да се обясни с пренареждането на туморните клетки около съдовете, които им осигуряват по-добри условия за преживяемост, а за това е необходимо стимулиране на цитоскелетните структури, в които участва Diaph3; проникването на туморни клетки се осъществява на ниво микроциркулация. Отчетен е градиент в експресията в зоната на преход с неангажиран паренхим, корелиращ с перифокалния едем; в същата зона експресията е умерена до висока в единични клетки от васкуларната сателитоза, сравнима с по-ниската физиологична експресия в ендотела на малките съдове. Високо интензивна реакция се открива и в трактовата зона /фиг. 5.23/, която микроскопски привидно не е ангажирана. Силно намаляване на експресията е констатирана с приближаване към мозъчната кора до негативна реакция в субпиалната зона. С алгоритъма на роботното отчитане авторът установява изключително голяма вариабилност на позитивните клетки в тумора с диапазон 12-96% и със среден процент на експресиращи туморни клетки от 62.66%.

Не са установени статистически значими стойности между експресията на Diaph3 и демографски показатели, размер и локализация на тумора, както и със средната преживяемост на пациентите.

Резултатите са представени с богат, висококачествен и много добре оформен илюстративен материал, съдържащ 65 фигури и 13 таблици.

Обсъждането е целенасочено и съобразено с получените резултати и литературните данни, но на места, както и в обзора, доминира информация, неподплатена от собствени проучвания. Това не е критика, а разумен и естествен подход, който показва разширен поглед към изследваната проблематика и възможност за следващи изследвания. В обсъждането проличава задълбоченото мислене на автора и аналитично съпоставяне на получените факти с публикуваните. Ще разгледам няколко важни характеристики на GBM, върху които то е фокусирано.

Ролята на IDH като прогностичен и предиктивен критерий е изчерпана в съвременното определение на GBM и се свежда до диагностичната му стойност. На базата мутация в IDH

д-р Стоянов намира, че 9.1% са рекласифицирани в мутантни GBM, което е съпоставимо със съотношението с немутантните GBM в големи статистически изследвания. Това предполага, че преобладаващата част от клиникобиологичните показатели на GBM ще бъдат идентични с немутантния вид на GBM в предишната класификация, в която двата вида на GBM - мутантен и немутантен - бяха подробно характеризирани по редица демографски и биологични индикатори.

Честотата на GBM е разгледана в обсъждането на базата на предишни авторски изследвания, според които е 2.03 % на 100 000 души, значително по ниска от данните на CBRITUS/3.23 на 100 000. Дисертантът правилно отбелязва, че заболяемостта от GBM няма да се промени драстично при отпадане само на 10% от групата. Според автора сравнението с честотите в други държави ни поставя в групата на страните с висок процент на скрита заболяемост. Логично е да се очаква, че разлики ще има относно два показателя, поради изваждането на мутантния GBM /предишна класификация/, който започва в по-ранна възраст и има по-дълга преживяемост. Наблюденията на д-р Стоянов потвърждават, че средната възраст за поява на GBM е 65.3 години за разлика от предходното им изследване – 59.18 години, а средната преживяемост е значително по-ниска /8.41 в месеци/ сравнена с данните на CBITRUS /16.9 месеци/. В изследванията на д-р Стоянов няма голяма разлика в преживяемостта между половете в сравнение с данните на Ostrom, който намира значителна разлика между преживяемостта у мъжете /15 месеца/ и жените /25.5 месеци/.

Д-р Стоянов открива недобра тенденция в нашата страна в сравнение с развитите страни - по-ниска честота на GBM и по-ниска преживяемост. Анализът на честотата на GBM е извън преките задачи на проучването, но от епидемиологична гледна точка е важно е да се изяснят причините за тези факти и това може да е цел на бъдещи проучвания в национален мащаб. Според мен, причините следва да се търсят в системни организационни слабости. Регистрацията на туморите на ЦНС не отразява точните данни за тяхното разпространение и видова диагноза - не всички мозъчни тумори се регистрират в Националния регистър, а отчетените не винаги са правилно диагностицирани. Непоставянето на ранна диагноза, пропуски в ефективното лечение и проследяването на пациентите могат да са други източници за тези недобри показатели. Тези факти би трябвало да провокират нашата система на здравеопазване за по-задълбочени епидемиологични проучвания и подобряване на диагностиката и терапията. Трябва все пак да се отбележи, че малко по-добрата преживяемост на пациентите в USA, анализирани в CBRITUS, не се отразява съществено върху качеството на живота и смъртността при GBM, което е високо и в развитите страни.

Д-р Стоянов установява, че GBM има еднакво разпределение за фронтални и темпорални лобове и незначителна разлика в париеталните. Сравнението с различни публикации показва разнопосочни данни с преобладаване в един или друг дял, но има единомислие относно рядкото засягане на окципиталните лобове. Липсата на статистическа

закономерност между точната локализация и преживяемостта на пациентите е важен извод, че значението на локализацията трябва да се насочи в друга посока. Повлияване на преживяемостта може да се прогнозира евентуално от разпространение на ГБМ към базалните ганглии, особено в доминиращата хемисфера. Практическа полза може да се извлече от факта за по-рядката почти казуистична локализация на ГБМ в окципиталните дялове. Този факт може да помогне на патолога при диференциалната диагноза на тумори в окципиталната област.

Не е отчетена статистически значима разлика между първичните и вторични триизмерни реконструкции с неврорадиологично отчетените параметри на тумора. Но изследването е авторски принос с определяне на позитивните параметри на неговата приложимост, включващи и показанията за оптимална циторедукция от неврохирурга.

Обсъден е въпросът за значението на големината на резекцията, но конкретни изводи от собствения материал не са направени.

Интерес представлява изследването на ролята на имунния отговор според съотношението между броя на неутрофилните левкоцити, тромбоцитите и макрофагите към броя на лимфоцитите. Авторът намира статистически значима зависимост между преживяемостта и MLR индекса – преживяемостта е по-ниска при $MLR > 0.45$ и при комбинирано повишаване на циркулиращите моноцити и поне на още един от изследваните маркери. Имунният статус при GBM е обект на многогодишни проучвания и се проявява в много аспекти, от проучване на лимфоцитната туморна строма до изследване на чекпойнт молекулите, както и с провеждане на имунна терапия, какъвто опит има и в нашата страна. Рядко патолози се насочват към този тип клинично-лабораторни изследвания. Подходът на д-р Стоянов е иновативен и в съзвучие със стремежа да изследваме туморите многопланово. Резултатите са показателни за ролята на тези индекси като прогностични фактори. Тъй като тези изследвания са сравнително лесно изпълними може да се стимулира тяхното въвеждане в практиката като индикатори за активността на системния имунен отговор.

Изследването на Diaph3 заема централно място в дисертационния труд по много съображения. Презумпцията, че толкова хетерогенен тумор като GBM може да има увреждане на ген, свързан с основна функция на клетката, е оригинална, както и търсенето на аналогии с други силно злокачествени тумори. Изследванията върху този ген в заболяванията на CNS са пренебрежимо малко на брой, но са предимно от последните години. Изборът не е случаен, защото има заложен предиктивен елемент и възможност пациентите с позитивен ГБМ да се повлияят от терапия. В дискусията дисертантът проявява своята широка осведоменост за предиктивната роля на Diaph3 при лечение на извънмозъчни злокачествени тумори. Изяснява функционалното значение на Diaph3 като част от групата протеини, участващи в полимеризирането на актините и стабилизиране на микротубулите, осъществяване на контакти с клетъчните израстъци и на цитоскелета като цяло. При злокачествени процеси загубата на Diaph3 улеснява движението на клетките в

ЕММ и се очаква повишаване на метастатичните способности на туморните клетки. Действително при голяма част от различни тумори загубата му корелира с прогресията на туморите. Въпреки изяснената функционална роля на загубата на Diaph3 д-р Стоянов изтъква, че клиничните наблюдения са твърде противоречиви – високата експресия е асоциирана с благоприятна прогноза при някои тумори и неблагоприятна при други. Това явление се наблюдава и при други биомаркери и може да се обясни със сложните взаимоотношения между сигналните пътища и молекули, възникващи в генетичния хаос и нестабилност в процеса на туморна прогресия. Изследванията на Diaph3 са показали корелация с прогнозата, но в противоположни посоки – на подобряване или на влошаване на прогнозата. Резултатите в дисертационния труд разкриват, че Diaph3 се експресира само в някои GBM /междувидова хетерогенност/, в част от отделния GBM /интратуморна хетерогенност/ т.е. налага се изводът, че GBM е хетерогенен и по отношение на изследвания маркер. На второ място, типът на експресия в GBM и в реактивната глиоза е различен и следователно Diaph3 може да служи като диференциално-диагностичен белег между двата процеса. Практическо значение с диагностична стойност има откриването на силна експресия на антиялото Diaph3 в периферните зони или в зоните на инфилтрация. Този факт се дължи според автора на преимуществено наличие на стволови клетки в зоните на растеж. Доколко има строго разпределение на стволови и зрели клетки и доколко има запазени зрели клетки в центъра на тумора изисква допълнителни доказателства и е малко вероятно предвид неподлежащия на строги правила растеж на злокачествените тумори.

Един от добре осветените проблеми в обсъждането е за ролята на Diaph3 в mTOR пътя на сигнална трансдукция, свързан с евентуална роля на Diaph3 като предиктивен маркер за терапия с рапамицин и таксани. В клетъчни култури е доказано, че понижена експресия на Diaph3 е съчетана с намаляване на експресията на mTOR свързаните протеини. Клиничните проучвания за лечение на GBM с рапамицин водят обаче до противоречиви резултати – около половината пациенти не се повлияват от лечението. На базата на добра информираност и собствените резултати д-р Стоянов прави логично предположение, че благоприятно повлияване от рапамицин биха имали само пациенти с голям процент позитивни за антиялото туморни клетки. Обсъдена е и ролята на Diaph3 в терапията с таксани, базирана на извънклинични проучвания, че ниски нива не показват повишена чувствителност към таксани. Клинични проучвания за терапия на мамарния карцином с таксани показват, че загубата на Diaph3 е свързана с по-дълга преживяемост при терапия с таксани, т.е. той е положителен предиктивен фактор за таксани. Внимателно е направена съгестия, че при GBM действат подобни механизми, още повече има свидетелства, че пациенти с GBM, лекувани с таксани имат повишена преживяемост.

Изводите в дисертационния труд са логичен синтез на резултатите в преобладаващата си част. /Само първият извод е постулиран по дефиниция от WHO, 2021г. и не е свързан с проучването/. Те съдържат най-важните факти установени в проучването, част от които са оригинални.

Установен е размер на тумора при първичната диагноза, над 50 мм. Установено е, че първичният туморен размер и локализацията по лобове и латералност нямат прогностична роля. Възрастовият фактор има значение като статистическа значимост между възрастовите групи 41-50 г. и над 70 г.

MGMT статусът има определено прогностично и предиктивно значение – разликата в преживяемостта между групите с експресия и без експресия на MGMT е съществена относно средната преживяемост за целия период, а също и за преживяемостта за всяка от първите три години.

Установена е статистическа значимост в преживяемостта на пациентите с острофазов имунен отговор и/или занижен напрегнат имунитет, особено силно проявена в съотношението моноцити към лимфоцити, а повишаването на коефициента над MLR 0.45 е лош прогностичен белег.

Доказано е, че GBM е Diaph3 позитивен тумор, с хетерогенна позитивност в границите на отделния тумор. Не е открита корелация между нивата на експресия спрямо прогнозата и туморния размер.

Изводът на д-р Стоянов, че Diaph3 е маркер със силен предиктивен потенциал и може да се използва в селекцията на пациенти за лечение с рапамицин и таксани е резонен, почиващ на широка осведоменост на автора за неговите функционалните взаимодействия, предиктивната роля на този маркер за избор на таргетна терапия при не-неврогенните злокачествени тумори, както и на собствените резултати на автора.

Приноси: Проведено е първото изчерпателно проучване на демографските и топографски показатели на мултиформения глиобластом у пациенти, оперирани в един неврохирургичен институт в страната.

Направена е пълна топографска карта на туморната локализация според неврорадиологични изследвания.

Установени са предилекционните места на развитие на GBM, без зависимост от пола, възрастта и латералността на процеса. Не е установена статистически доказана връзка между топографията и преживяемостта, но пълнотата на изследването на GBM по лобове и латералност на процеса са факти, създаващи подходяща рамка за сравнение със следващи проучвания, основани на по-голям брой изследвани пациенти.

Установен е средният неврорадиологичен размер – малко над 50мм, с диапазон 20-76мм.

Въведени са модерни методики за обработка на неврорадиологични параметри и за дигитализация на хистологичните образи.

Потвърдена е корелацията между неврорадиологичните параметри при GBM и обемните анализи на триизмерните реконструкции. Определени са предимствата на авторския

модел на реконструкцията за обучението по медицина, предоперативното планиране и постоперативното проследяване на пациента.

Потвърдена е ролята на системния имунен отговор като прогностичен фактор със статистически анализ.

Потвърдена е прогностичната и предиктивна роля на MGMT статуса за пациенти с GBM.

Введено е ИХХ изследване на Diaph3 в мултиформения глиобластом с пълноценно и детайлно характеризирани експресията в тумора, зоните на растеж и нормални структури на мозъка.

Доказано е значението на експресията на Diaph3 в диагностиката на GBM.

Ролята на Diaph3 като потенциален предиктивен фактор за лечение на GBM с рапамицин и таксани е аргументирана с богата научна информация.

Не е намерена корелация между експресията на Diaph3 и показателите за преживяемостта на пациентите и първичния туморен размер.

Описани са важни характеристики на експресията на Diaph3 за диференциалната диагноза с реактивна глиоза.

Препоръки: Препоръчително е проучване на MGMT и на Diaph3 и в астроцитомата, 4 степен /бивш IDH мутантен GBM/ за сравняване на резултатите. Тъй като се анализира предиктивния ефект на MGMT е добре да се приложи схемата за лечение на пациентите – еднаква ли е била за позитивните и негативните за MGMT. Това е особено важно като се има предвид, че относително добър резултат имат и пациенти с негативен статус за MGMT са лекувани с темозоламид. Предвид тълкуването на резултатите за имунния отговор като предиктивен фактор е препоръчително да имаме информация дали е провеждано някакво имунно лечение въз основа на тези показатели поне по литературни данни. Разширението на изследването на ролята на Diaph3 с генетични методики е силно препоръчително и се предвижда и от автора.

В заключение: Проучването на д-р Стоянов е задълбочено, актуално и съответстващо на модерните концепции в последната декада за интегрирана диагноза, базирана на анализ на клинични, лабораторни, образнодиагностични, хистологични и молекулярнопатологични изследвания. Изяснено е значението на редица важни параметри на GBM като прогностични или предиктивни фактори. Съотношението между частите на труда е съразмерно като най-големият дял е отделен за собствените резултати. Обзорът е актуален с публикации предимно от последните години. Целта и задачите са формулирани добре и съответстват на резултатите и изводите. Подборът на материалите е извършен стриктно. Методиките са описани точно, като с особена прецизност се отличават ИХХ изследвания. Резултатите са представени ясно, богато онагледени и подкрепени от мултифункционален статистически анализ. Обсъждането показва високата информираност

на дисертанта, способността му за сравнителни анализи, асоциативно мислене и изводи, които могат да трасират пътя за следващи проучвания. Подкрепям правилността на авторските изводи и приносите в дисертационния му труд. Важно е да се отбележи и неговата самокритичност, както и очертаните насоки за бъдещи изследвания. Направените 13 публикации, вкл. в реферирани списания, от които в 11 е водещ автор, разкриват неговата научна активност, богата информираност, аналитично мислене и стремеж към усвояване на модерни методики, ориентирани към решаване на основни проблеми в изучаването на глиобластома. Оценявам високо труда на д-р Стоянов, неговата системност и последователност в научните разработки още от студентските години, подчертан интерес към иновациите, неговите научни постижения, които разкриват перспективи за още по-изявена изследователска дейност с национално и международно значение.

С голяма убеденост ще дам моя положителен вот и препоръчвам на уважаемото жури да подкрепи избора на д-р Стоянов за получаване на научно-образователното звание „доктор по медицина“.



Рецензент: доц. Маргарита Каменова