

## СТАНОВИЩЕ

от

проф. д-р Веселин Т. Беловеждов, дм  
Катедра по обща и клинична патология,  
Медицински университет - Пловдив

в качеството му на член на научно жури въз основа  
на заповед Ректора на МУ - Варна № Р-109-71/04.02.2022 г.

*относно дисертационен труд на тема*

### **ПРОГНОСТИЧНИ И ПРЕДИКТИВНИ ФАКТОРИ ПРИ МУЛТИФОРМЕН ГЛИОБЛАСТОМ**

*за присъждане на ОНС „доктор”*  
с автор д-р Георги Стоянов Стоянов

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

*Катедра по обща и клинична патология, съдебна медицина и деонтология  
Факултет по медицина, МУ – Варна*

За конкурса са депозираны материали на хартиен и електронен носител - дисертационен труд, автореферат, биографични и професионални данни, административни документи, копия от публикации от д-р Георги Стоянов Стоянов.

Д-р Георги Стоянов Стоянов е роден през 1992 г. През 2011 г. той завършва средно образование, а през 2017 г. приключва успешно следването си в МФ на МУ - Варна придобивайки магистърска степен по медицина. След това той работи като хоноруван асистент в Катедра по Анатомия и клетъчна биология, в Катедрата по физиология и патофизиология, работи на доброволни начала и в Катедрата по обща и клинична патология, съдебна медицина и деонтология, а впоследствие и като редовен асистент в същата от 2018 г. до днес.

Дисертационният труд на д-р Георги Стоянов е посветен на актуален проблем в областта на човешката патология - мултиформения глиобластом. Това е един от най-малигнените тумори, при който, въпреки неимоверните научни и клинични проучвания

през последните 50 години, преживяемостта на пациентите е нараснала средно едва с няколко месеца, както правилно е написал авторът в своя публикация. Поради това изучаването на аспектите свързани с това злокачествено новообразувание на ЦНС е важна задача на съвременната медицина. По тази причина изследването на прогностични и предиктивни фактори при него, каквато задачи си е поставил д-р Стоянов, правят актуален дисертационния му труд.

Дисертацията е написана на 113 стандартни машинописни страници, тя съдържа 65 фигури и 13 таблици и е разпределена по следния стандартен начин : 2 стр. използвани съкращения, 22 стр. лит. обзор, цел и задачи – 2 стр., материали и методи – 7 стр., резултати – 33 стр., дискусия – 17 стр., заключение, изводи и приноси – по една страница. В работата са цитирани 250 литературни източника. От тях 11 са на кирилица и прави добро впечатление, че са взети под внимание и разработки на български изследователи.

Литературният обзор е добре структуриран и изчерпателен. След занимателен исторически преглед авторът представя актуалното становище на СЗО, че диагностиката на туморите на нервната система и в частност на ГБМ е комплексна – локализация, макроскопски и хистологичен вид. Според вижданията на някои автори „на мултиформения глиобластом трябва да се гледа повече, като на нозологична група от заболявания с вариращо биологично поведение, като все още не са установени дефинитивни маркери, показващи биологичния потенциал, с изключение на IDH и MGMT статуса“. Част от тези характеристики се дължат не само на биологичния потенциал на самия тумор, но и на реакцията на организма срещу него. Важно значение за разбирането на този потенциал заема и молекулярното познание при тези тумори. То е важна отправна точка за класификацията на туморите на ЦНС, която непрекъснато търпи усъвършенстване, с повишаване на познанията в тази област. Последната е от 2021 г., която надлежно е представен в обзора. Подробно са описаните микроскопските белези на ГБМ и ИХХ му отнасяния. Подчертава се, че молекулярното тестване има ключово значение за определяне на тумора, като конвенционалното морфологично изследване не губи своето значение. Въпреки големия прогрес в молекулярно-генетичното разбиране на процесите на глиомагенезата и драйверните мутации, на този етап прогностичните и предиктивни маркери с отношение към ГБМ са изключително оскъдни и отчасти с противоречив характер. Изтъква се, че има неизследвани при мултиформен глиобластом фактори с не добре установено прогностично и предиктивно значение. Такива са напр. имунният отговор на организма и корелацията му с туморния растеж, както и ролята на Diaph3 като диагностичен маркер за туморна пролиферация. С неизменно клинично значение макар извън класификациите е и MGMT профилът на тумора, който е предиктивен фактор за отговора към лечение на пациентите с глиални тумори. MGMT е протеин със стабилизираща и репаративна роля за ДНК. Туморите без мутация в MGMT са с нисък отговор спрямо терапия, докато тези с MGMT мутация, показват много добър отговор.

На основата на тези заключенията направени на финала на обзора дисертантът посочва целта на работата, която намирам за уместна - да се направи комплексен анализ на възрастово-половите характеристики на мултиформения глиобластом, на туморния размер и локализация, на значение на напрегнатия имунен отговор и преживяемостта при първично диагностицирани тумори като те да бъдат сравнени с MGMT профила на туморите и значението за диагнозата и прогнозата на формите и нива на експресия на Diaph3 при него.

За реализацията на тази цел са поставени логично следните задачи : 1. Подбор на материали от глиални тумори. 2. Прекласифициране на туморите спрямо нововъведената класификация. 3. Определяне на демографската характеристика. 4. Анализ на предоперативна кръвна картина. 5. Установяване на MGMT профила. 6. Установяване на образно-диагностичните характеристики на туморите. 7. Изготвяне на триизмерни реконструкции на избраните тумори. 8. Изследване на експресията на Diaph3. 9. Изследване на интензивността на експресия в ритмичните (Шерерови) структури на растеж. 10. Статистически анализ и корелация на получените данни.

За решаването на поставените задачи са използвани материали от тъканни срези от хистологично доказан ГБМ и равна по обем контролна група от нетуморни процеси в УМБАЛ „Света. Марина“ - Варна, Варна, България от периода февруари 2018 - февруари 2021 година като n=62 случая, основна група и n=62 случая, контролна група. Използвани са данни от медицинската документация на диагностицираните пациенти, както и образните им изследвания на ЦНС.

Използваните методи накратко са анализ на хистологичните срези и оцветявания, имунохистохимично маркиране с IDH1 R132H анти тяло и на MGMT анти тяло, на Diaph3 анти тяло, всички по стандартен протокол, както и анализ на компютър томографски и ядрено-магнитни образни изследвания, изясняване на съотношението неутрофили към лимфоцити, тромбоцити към лимфоцити и моноцити към лимфоцити, с цел установяване на еквилибриума на имунния отговор към туморния растеж, дигитализиране и автоматична обработка на получените образи, дигитализиране на получените ИХХ препарати посредством автоматичен скенер, софтуер ImageScope V12.1.0.5029 с цел последващ статистическият анализ осъществен чрез програмен пакет MaxStat Pro v3.6 и включващ методите - (1) дескриптивен анализ за определяне на статистически величини: средна стойност, стандартна грешка на средната, минимални и максимални стойности, медиана, (2) непараметрични методи за проверка на нулевата хипотеза, (3) параметрични методи - Student t-test, сдтатистическо изследване на зависимости чрез корелационен анализ и Сох регресионен модел за унивариантен анализ. Така използваните методи гарантират обективността на получените резултати.

Резултатите от изследванията показват, че демографската характеристика на пациентите с ГБМ е : 56% (n=28) са мъже, а 44% (n=22) - жени; съотношението м:ж е 1,27:1; средна възраст е 65.3 години, медианата - 65 години, диапазонът е 43-86 години. От общо 50 случая след имунохистохимично изследване на MGMT мутационен

статус позитивни са 35% (n=17), като средната възраст на пациентите с MGMT позитивни ГБМ е съпоставима с тази на общата кохорта, като не е налице статистически значима разлика, жените преобладават с малко. По отношение на туморната локализация се констатира, че той се среща малко по-често в лявата голямомозъчна хемисфери, най-много, 37.78% (n=17) ГМБ са установени в темпоралния дял. Средните размери на туморите са 50.51мм (диапазон 20-76мм), а по отношение на туморния размер и латералността на процеса няма статистически значима разлика. Тумори с най-големи размери се намират в темпоралния дял. Методика на триизмерните реконструкции очертава по-добре характеристиките на растежа на тумора и особено неговите неравни очертания. Средната преживяемост в общата кохорта (n=50) от деня на оперативната интервенция до деня на смъртта е 255.96 дни (8.41 месеца). Диапазонът на преживяемост е от 18 дни до 1061 дни, като най-дългата обща преживяемост е при пациент, който е жив 1150 дни (37.78 месеца) след оперативната интервенция. Данните от предоперативна кръвна картина с диференциално броене (при само 22 пациента) показва, че средният брой на неутрофили отчетен в кохортата е 15.81, медианата е 6.77, осем пациента имат СНЛ>4, пет пациента имат СТЛ>200, пет пациента имат СМЛ>0.45, което е свидетелство, че напрегнат имунитет имат малък брой пациенти. В подкрепа на това е резултатът, че комбинирано синергично увеличени СНЛ, СТЛ и СМЛ индекс се установяват при трима пациента. В изследваната кохорта (n=50 - 100%) всички тумори показват позитивна реакция за Diaph3 анти тялото. Реакцията е умерено до високо интензивна, грануларна, като предилекционно е локализирана в цитоплазмата на туморните клетки, но единични клетки показват и слаба до умерена, фибриларна ядрена реакция. Средната продължителност на живота при пациентите в кохортата е 255.96 дни (8.41 месеца), като тя е по-висока при мъжете. 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). Спрямо туморната локализация, при париетално разположените тумори има най-дълга преживяемост - 310.23. А спрямо възрастовите групи най-голяма е средната преживяемост в групата 41-50 години - 584.75 дни. Статистически значима разлика в преживяемостта, с  $p=0.0044$  се установява само при пациенти с  $MLR >0.45$ , като при тези тях преживяемостта е значително по-ниска - 103.83 дена срещу 313.13 при пациенти, при които не се наблюдава повишаване на индекса. Посредством корелационен анализ не се установяват статистически зависимости между нивата на експресия на Diaph3 спрямо възрастта, пола, туморната локализация и неврорадиологично установения туморен обем.

Въз основа на тези данни и информацията от литературата, авторът в дискусиата представя становище, че мултиформният глиобластом е нозологична единица, представляваща значителна диагностична трудност от клинична гледна точка, с голямата вариабилност в хистологичната находка, с разнообразни молекулярните и генетичните алтерации, които се изследват интензивно, но където въпреки голямата концентрация на усилия по темата няма все още позитивни резултати в терапията. Въз основа на значителните по обем молекулярно-генетично изследвания и представените на тази база доклади на cIMPACT-NOW, в петия от тях, е изложена най-значимата

промяна в класификациите на тумори на нервната система от въвеждането ѝ в практиката. С идея за унифициране на класификациите на СЗО и начина на отговаряне, грейдът е предложено да се отбелязва с арабски (1-4), а не с римски числа (I-IV). Също така IDH мутантните тумори са отделени със собствена диагностична категория, като е уточнен морфологичен критерий за грейд 3 тумори - изразена митотична активност. В шестия доклад са представени принципите за модифициране на бъдещите класификации с въвеждане на типове и субтипове към част тях, а в последния към момента седми доклад са направени малки уточнения за част от новите молекулярни профили на туморите. От гл. т. на IDH R132H мутационен статус мутантен фенотип се установява при 9.1% (n=5) от общо n=55 пациента в първичната кохорта, даваща възможност за рекласифициране на туморите по новата класификация. Тези данни изцяло са съпоставими с данните на големите кохорти, където честотата на IDH мутантите, понастоящем дифузен астроцитом, СЗО ЦНС грейд 4, варира около 10%.

Що се отнася до честотата заболяемостта от мултиформен глиобластом тя, според автора, няма драстично да се промени, разлика обаче ще има 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, се смята, че статистическо покачване ще има на случаите при мъже. Друго пряко следствие, според д-р Стоянов 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, според дисертанта, могат да бъдат сумирани като: глиобластомът е тумор характерен за старческата възраст, по-чест при мъже, с лоша прогноза. Поради тази причина мултиформения глиобластом се дефинира от клинична и епидемиологична гледна точка и като неврологично заболяване, което е характерно при мъже в напреднала възраст. Въпреки по-висока преживяемост при наблюдения различни от тези представени в дисертацията, мултиформеният глиобластом е тумор с изключително лоша прогноза. 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 изследваната група от д-р Стоянов честотата на MGMT позитивните тумори е 35% (n=17), която е съпоставима с литературните данни, където честотата варира между 30% и 60%. 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 често с последстващ неврологичен дефицит. Различия се констатират в локализацията, която в представените случаи в дисертацията най-често е в темпоралната област, за разлика от тези в литературата, които констатират, че тя е по-често фронтално. Най-голяма статистическа значимост спрямо преживяемостта по отношение на имунния отговор се отчита при MLR индекса, самостоятелно и в комбинация с други маркери на инфламаторния отговор, като сходни резултати са получени и при други изследвания. 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. 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, а мултиформеният глиобластом е тумор с хетерогенна експресия на Diaph3. Констатирано е, че неговата експресия ще има все по-голямо роля при терапията на ГБМ.

На финала на работата като откровенно признава, че «в настоящия дисертационен труд в никакъв случай не са изчерпани всички възможности за стратифициране на заложените проблеми“, авторът подвежда изводите, че 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, че основният фактор, определящ прогнозата на пациентите е мутационният статус на MGMT, че преживяемостта на пациентите с острофазов имунен отговор и/или занижен напрегнат имунитет е голяма, че мултиформеният глиобластом е Diaph3 позитивен тумор, като позитивността е хетерогенна но има очаквания за бъдеща терапия свързана с неговата експресия.

Представеният от д-р Стоянов труд съдържа следните приноси :

1. С клинично-диагностичен характер : на триизмерни реконструкции е потвърдена корелацията между неврорадиологичните параметри при мултиформен глиобластом и извършени обемни анализи, установени са предилекционните места за развитие на тумора, установен е средния му неврорадиологичен размер - малко над 50 мм, установено е значението на експресията на антитялото anti-Diaph3, установена е липса на корелация между нивата на експресия на Diaph3 и преживяемостта и първичният туморен размер.

2. С терапевтичен характер : установена е ролята на системният имунен отговор, потвърдено е ключовото значение на MGMT мутационният статус, аргументирано е значението на експресията на Diaph3 като евентуален предиктивен фактор за лечението на ГБМ с таксани и рапамицин.

Резултатите от дисертацията са представени в тринайсет научни публикации, осем в реферирани списания, две от които с IF, три в международни нереферирани списания, две в национални нереферирани списания, и в един доклад на научен форум.

Въз основа на горе изложеното считам, че дисертационният труд на д-р Стоянов е напълно завършена работа, съдържащ съществени резултати и изводи с клинично-диагностична и терапевтична значимост. Работата е подробна и изчерпателна, тя има широк обхват включващ прегледа на чужди и български източници, тя представлява важно изследване по проблема за ГБМ и глиалните тумори в родната научна литература и напълно отговаря на изискванията на Закона за развитие на академичния състав в България и на условията и реда за придобиване на научни степени в МУ - Варна.

Затова давам позитивна оценка на дисертацията, ще гласувам за, а и си позволявам да препоръчам на членовете на уважаемото Научното жури да подкрепят присъждането на образователната и научната степен „доктор” на д-р Георги Стоянов Стоянов.

22.03. 2022 г.

A handwritten signature in blue ink, consisting of several overlapping loops and a long tail stroke extending downwards and to the right.

проф. д-р Беловежков