



МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ
КАТЕДРА ПО МЕДИЦИНСКА ХИМИЯ И БИОХИМИЯ

ЕМИЛИЯ КРАСИМИРОВА НИКОЛОВА

**Роля на дерегулирани микроРНКи, промяна в броя копийни
варианти (CNV) и цитомегаловирусен инфекциозен статус
като диагностични и прогностични биомаркери при
пациенти с глиомни тумори**

АВТОРЕФЕРАТ

**На дисертационен труд
за присъждане на образователна и научна степен
„ДОКТОР“**

**Област на висше образование: 4. Природни науки, математика и
информатика
Професионално направление: 4.3. Биологически науки
Докторска програма: Молекулярна биология**

НАУЧНИ РЪКОВОДИТЕЛИ:

**Проф. Албена Първанова Тодорова – Георгиева, дбн
Акад. д-р Ваньо Иванов Митев, дм, дбн**

София, 2025

„Умът не е съд, който трябва да се напълни, а огън, който трябва да се разпали.“
— *Плутарх*

Посвещавам този труд на дъщеря ми – София,

една сбъдната мечта, която се появи по време на дисертацията ми и пандемията от COVID-19. Ти ми даде нова сила и смисъл.

Благодаря на семейството ми – за любовта, търпението и за това, че запалиха в мен искрата на любознателността и стремежа към знание.

Изказвам своята дълбока признателност към моя научен ръководител – проф. Албена Тодорова, която не спираше да вярва в мен, дори когато аз се колебаех. Благодаря ѝ, че ми даде свободата да експериментирам и да се развивам като самостоятелен учен. Нейното менторство и вяра в потенциала на хората бяха ключови за пътя, който извървах.

Сърдечно благодаря на моите колаборатори – д-р Лили Лалева, д-р Милко Милев, доц. д-р Тома Спириев, доц. д-р Дилян Фердинандов, както и на всички медицински специалисти и колеги, които направиха възможно осъществяването на този труд.

Благодаря и на всички близки и приятели, които ме подкрепяха и вдъхновяваха през целия този път.

Дисертационният труд съдържа 183 страници, 59 фигури и 35 таблици¹.

Цитирани са 231 литературни и 6 електронни източника.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита от Катедра по медицинска химия и биохимия на Медицински факултет, Медицински университет – София.

Включените в дисертацията изследвания са извършени в:

- Катедра по медицинска химия и биохимия на Медицински факултет, Медицински университет – София
- Генетична Медико-Диагностична Лаборатория „Геника“, гр. София

Настоящото изследване е финансирано частично от Съвета по медицинска наука на Медицински университет – София по договори №Д-118/2018 и № Д-127/2019.

Дисертационният труд е одобрен и насочен за защита на катедрен съвет на Катедра по медицинска химия и биохимия, Медицински университет – София и решение на факултетен съвет протокол № 3/20.02.2025 г.

Публичната защита на дисертационния труд ще се състои на 20.05.2025 г. от 12 ч. в Катедра по Медицинска Химия и Биохимия, Медицински Университет - София, ул. Здраве 2, гр. София пред научно жури в състав:

Външни членове:

- Чл.–кор. проф. Сорен Бохос Хайрабемян, дбн – Институт по биология и имунология на размножаването „Акад. Кирил Братанов“, БАН - становище
- Доц. д-р Тома Юриев Спириев. дм – Аджибадем Сити Клиник УМБАЛ „Токуда“ - рецензия
- Доц. Стефка Крумова Иванова, дв – НРЛ „Морбили, Паротит, Рубеола“, НЦЗПБ - становище

Вътрешни членове:

- Проф. Радка Петрова Кънева, дб - Катедра по медицинска химия и биохимия на Медицински факултет, Медицински университет – София - становище
- Доц. Д-р Атанаска Петрова Еленкова, дм - Катедра по ендокринология на Медицински факултет, Медицински университет – София - рецензия

Резервни членове:

Проф. Албена Георгиева Йорданова, дб - външен резервен член за МУ – София
Доц. д-р Дилиан Фердинандов, дм - вътрешен резервен член за МУ – София

Материалите по защитата са на разположение в Катедра по медицинска химия и биохимия, Медицински университет – София.

Настоящата дисертация и съдържащите се в нея научни резултати, текстове и графики са защитени съгласно ЗАПСП. Използването им за научни, образователни или други цели е допустимо само при коректно цитиране или след изричното съгласие на автора.

¹ Номерацията на фигурите и таблиците в автореферата не съответства на тази в дисертационния труд.

Съдържание

Използвани съкращения:.....	5
1. ВЪВЕДЕНИЕ.....	6
2. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ.....	8
2.1. ЦЕЛ.....	8
2.2. ЗАДАЧИ.....	8
3. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ.....	9
3.1. МАТЕРИАЛИ.....	9
3.2. МЕТОДИ.....	9
4. РЕЗУЛТАТИ.....	10
4.1. Епидемиологична характеристика на изследваната представителна извадка от пациенти с глиоми.	10
4.1.1. Резултати от анализите за асоциации между клиничните характеристики.....	12
4.2. Анализ на генната експресия на микроРНК при пациенти с глиоми.....	12
4.2.1. Спектрофотометричен анализ.....	12
4.2.2. Експресионни анализи на селектираните микроРНК.....	13
4.2.3. Резултати от корелационните анализи.....	16
4.2.4. Анализ на ROC кривите и площта под кривата – AUC.....	17
4.2.5. Анализ на оцеляването (Kaplan-Meier) според експресионните нива на селектираните микроРНКи.....	21
4.3. Резултати от генетичните анализи.....	25
4.3.1. MLPA анализи за определяне броя копийни варианти (CNVs) при набор от гени, засегнати при глиомите.....	25
4.3.2. Асоциации между клинично-патологичните характеристики и CNVs.....	29
4.3.3. Анализ на оцеляването (Kaplan-Meier analysis) според CNV статуса на изследваните гени.....	30
4.3.4. Резултати от секвениране по Sanger на <i>IDH1</i> и <i>IDH2</i> гените.....	31
4.3.5. Анализ на асоциациите между клинично-патологичните характеристики и <i>IDH1</i>	32
4.3.6. ROC анализ според <i>IDH1</i> статуса.....	33
4.3.7. Анализ на оцеляването според <i>IDH1</i> статуса.....	33
4.3.8. Корелация между наблюдаваните CNVs, мутациите в <i>IDH1</i> гена и експресионните нива на микроРНКите.....	34
4.3.9. Модели на логистична регресия.....	34
4.3.10. Провеждане на регресионни модели на Кокс.....	35
4.4. Резултати от ДНК анализа на ЦМВ.....	36
4.5. Анализ на генна онтология (ГО).....	37
4.6. Диагностичен и прогностичен алгоритъм.....	39
5. ОБСЪЖДАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ И ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	41
6. ИЗВОДИ.....	44
7. ПРИНОСИ.....	45
7.1. Научно-теоретични.....	45
7.2. Научно-приложни приноси.....	45
8. ПУБЛИКАЦИИ, УЧАСТИЯ, НАУЧНИ ПРОЕКТИ И НАГРАДИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИЯТА.....	46
8.1. ПУБЛИКАЦИИ.....	46
8.2. УЧАСТИЯ В НАУЧНИ КОНГРЕСИ И СЕМИНАРИ.....	46
8.3. УЧАСТИЯ В ПРОЕКТИ.....	47
8.4. НАГРАДА.....	47

Използвани съкращения:

AKT - a serine/threonine protein kinase
ATRX - alpha thalassemia/mental retardation syndrome X-Linked
AUC - area under the curve
CDKN2A - cyclin dependent kinase inhibitor 2A
CNS – central nervous system
CNVs – copy number variations
EGFR - epidermal growth factor receptor
EMT - epithelial-mesenchymal transition
IDH - isocitrate dehydrogenase
IGF1R - insulin-like growth factor 1 receptor
KPS - Karnofsky performance status
MAPK- mitogen-activated protein kinase
MGMT - O⁶-methylguanine - DNA methyltransferase
mTOR - mammalian target of rapamycin
MLPA – Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification
OS- Overall Survival
PI3K - phosphatidylinositol 3-kinases
PTEN - phosphatase and tensin homolog
PFS-Progression-Free Survival
ROC - receiver operating characteristics
RTK – receptor tyrosine kinase
TMZ - Temozolomide
TP53 - tumour protein p53
WHO - World Health Organization

ВСГ – високостепенни глиоми
НСГ - нискостепенни глиоми
СЗО - Световната Здравна Организация

1. ВЪВЕДЕНИЕ

Според Световната здравна организация (СЗО) раковите заболявания са водеща причина за заболяемост и смъртност по света. Въпреки значителния напредък на персонализираната медицина и таргетната терапия, допринасящи за по-добрата прогноза при някои видове рак, все още съществуват т.нар. „трудни за диагностика и лечение тумори“, сред които се нареждат и дифузните глиоми.

Глиоите са сред най-често срещаните първични мозъчни тумори. Късната манифестация на симптомите, инфилтрацията в съседната здрава тъкан и молекулярната хетерогенност са причини за наблюдаваните чести рецидиви и резистентност към терапията. Въпреки прилагането на мултимодален модел на лечение, включващ максимално хирургично отстраняване, радиотерапия и химиотерапия с алкилиращи агенти, петгодишната преживяемост при пациенти с най-агресивния тип глиом – глиобластом – остава изключително ниска (5–10%). Поради високата смъртност, нарастващата заболяемост и влошеното качество на живот на пациентите с дифузни глиоми, изследванията върху нови диагностични и терапевтични стратегии са от изключителна важност.

Настоящото изследване анализира промените в експресионните нива на селектиран набор от микроРНК, копийните вариации (CNVs) и наличието на активна цитомегаловирусна (ЦМВ) инфекция при български пациенти с високостепенни (ВСГ) и нискостепенни глиоми (НСГ). Целта е идентифициране на клинично-приложими биомаркери за диагностика, прогноза и стратификация на пациентите.

МикроРНК са къси некодиращи РНК молекули, осъществяващи посттранскрипционен контрол върху голям брой иРНК, свързани с ключови процеси като клетъчна пролиферация, диференциация, ангиогенеза, апоптоза и др. Промените в тяхната експресия се асоциират с редица заболявания, включително и карциногенезата. Поради изключително важната им роля, две Нобелови награди за физиология и медицина са присъдени на учени, изследващи тяхната функция. Изследването на експресионните профили и промени на микроРНК е обект на засилен научен интерес, тъй като тези молекули имат обещаващ биомаркерен потенциал за диагностика, прогноза и предикция на терапевтичния отговор при онкологични заболявания.

В последните две класификации на глиоите (2016 г. и 2021 г.) хистологичната оценка се комбинира с генетични маркери, което цели по-прецизна диагностика и прогноза на пациентите (фиг. 1.1)



Фигура 1.1. Класификационен алгоритъм при дифузните глиоми. Определянето на *IDH* статуса лежи в основата на класификацията от 2021 г. Диагноза „глиобластом, *IDH*-див тип, 4-та степен по СЗО на ЦНС“ се поставя при липса на мутация в *IDH1/2* гените, независимо от наличието или отсъствието на хистологични данни за микроваскуларна пролиферация и некроза. Препоръчително е изследване на мутации в промотора на *TERT*, *EGFR* амплификация и профил +7/-10 (амплификация на 7-ма хромозома, в комбинация със загуба на 10-та хромозома). *IDH*-мутантни дифузни глиоми с коделеция на *1p/19q* и/или запазена експресия на *ATR*X и *TP53* се диагностицират като олигодендроглиоми. *IDH*-мутантните астроцитомисти често са с липса на експресия на *ATR*X и с мутация в *TP53*. Хомозиготната делеция на *CDKN2A* се асоциира с понижена преживяемост и по-висока степен по СЗО.

По време на настоящия дисертационен труд беше публикувано петото издание на класификацията на туморите на ЦНС (CNS5, 2021 г.). В него се наблюдава значително нарастване на броя на CNVs (Copy Number Variations – вариации в броя копия на дадени гени), което подчертава важноста на тези генетични аберации. Най-засегнатите сигнални пътища при глиомите включват инактивация на *p53* и ретинобластомния (RB) път, промени във фосфатидилинозитол-3-киназния (PI3K) път и дерегулация на рецептор-тирозинкиназните (RTK) пътища. Гени, засегнати от CNVs при глиомните тумори, са част именно от тези сигнални каскади.

Присъствието на ЦМВ като онкомодулиращ агент също се свързва с глиомагенезата. Предполага се, че ЦМВ участва в развитието и прогресията на мозъчните тумори чрез регулация на клетъчната сигнализация, имуносупресия и активиране на онкогенен фенотип. Изследвания върху приложението на анти-ЦМВ терапия при първични и вторични глиобластоми показват обнадеждаващи резултати и удължена преживяемост спрямо контролната група, лекувана със стандартна терапия.

Натрупаните научни данни потвърждават актуалността на биомаркерните проучвания при глиомите и тяхната значимост за подобряване на диагностиката, мониторинга и развитието на персонализирани терапевтични стратегии, които биха могли да подобрят качеството на живот на пациентите.

2. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

2.1. ЦЕЛ

Настоящата научна разработка цели да проведе мултидисциплинарен молекулярно–генетичен анализ, за да оцени ролята на дерегулирани микроРНКи, гени с променен брой копия (CNVs) и присъствието на активна ЦМВ инфекция като биомаркери за диагностика и прогнозиране хода на заболяването при пациенти с глиоми.

2.2. ЗАДАЧИ

За изпълнението на целта си поставихме следните задачи:

1. Подбор на български пациенти с различни степени на глиоми.
2. Изолиране на тотална РНК и микроРНКи. Провеждане на експресионни анализи на предварително селектирани микроРНКи чрез TaqMan технология и количествен PCR в реално време.
3. Изолиране на геномна ДНК. MLPA анализ на вариации в броя копия на гени (CNVs), засягащи ключови сигнални пътища, секвениране по Сангер на *IDH1* и *IDH2* гените и PCR анализ за детекция на ЦМВ репликация.
4. Статистически анализ на получените резултати (SPSS, R) и сравнение със световната база данни.
5. Селекция на диагностични и прогностични биомаркери, и предлагане на персонализиран подход (алгоритъм) при пациенти с глиоми.

3. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

3.1. МАТЕРИАЛИ

Клинични материали - в настоящия дисертационен труд бяха изследвани 76 пациенти с ВСГ и НСГ.

3.2. МЕТОДИ

В настоящия труд бяха използвани следните методи и процедури, съобразени с инструкциите на производителите и описани подробно в дисертацията:

- ♥ Изолиране на тотална РНК и фракция от микроРНК с miRNeasy mini kit
- ♥ Синтез на копиДНК с TaqMan Advanced miRNA cDNA synthesis kit
- ♥ Експресионен анализ с TaqMan Advanced miRNA assay
- ♥ Изолиране на високомолекулярна ДНК от глиоми с QIAamp DNA mini kit
- ♥ MLPA анализи с SALSA MLPA Probemix P105 Glioma-2
- ♥ Секвениране по Sanger на гените *IDH1* и *IDH2*
- ♥ PCR анализ за наличието на ЦМВ с AmpliSens CMV-screen-FTR kit
- ♥ Статистически анализи за селекция на диагностични и прогностични биомаркери
- ♥ Създаване на класификационен и прогностичен алгоритъм

Използваните методи са показани на фиг. 3.1.



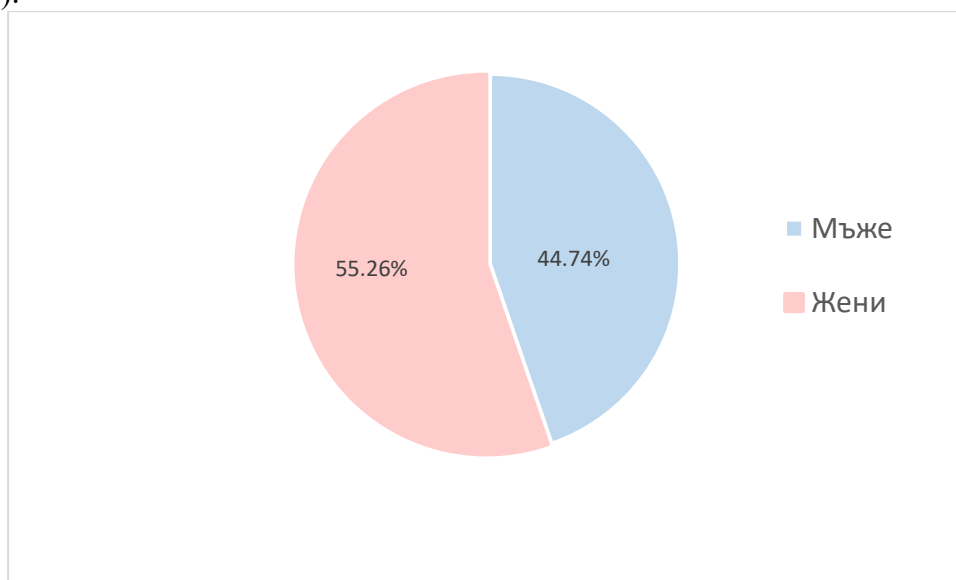
Фигура 3.1. Дизайн и методика на настоящото проучване

4. РЕЗУЛТАТИ

4.1. Епидемиологична характеристика на изследваната представителна извадка от пациенти с глиоми.

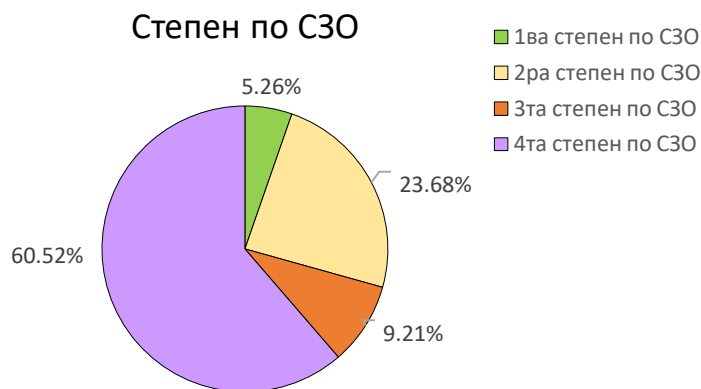
В настоящия дисертационен труд са включени 76 пациенти с глиоми. Пациентите са консултирани и насочени към настоящото проучване благодарение на колаборацията с Аджибадем Сити Клиник УМБАЛ „Токуда“, УМБАЛ „Св. Иван Рилски“, и ГМДЛ "Геника".

Средната възраст на изследваните пациенти е 49.73 ± 17.77 г. Разпределението по пол съответно е 42 (55.26%) от пациентите са от женски пол и 34 (44.74%) от мъжки пол (фиг. 4.1).



Фигура 4.1. Разпределение на пациентите по пол.

От тях 54 (71.05%) пациенти са с данни за високостепенни глиоми (ВСГ) (степен 3-та или степен 4-та по СЗО) и 22 (28.95%) пациенти са с данни за нискостепенни глиоми (НСГ) (степен 1-ва или степен 2-ра по СЗО). От групата на ВСГ 46 (60.52%) пациенти са с диагноза глиобластом - 4-та степен по СЗО и 7 (9.21%) пациенти са с 3-та степен по СЗО, от които 4ма (5.3%) пациенти са с диагноза олигодендроглиом и 3ма (3.9%) са с диагноза астроцитом. Групата на НСГ обхваща 18 (23.68%) пациенти с 2-ра степен по СЗО – 2ма (2.6%) с диагноза олигодендроглиом и 16 (21.1%) с астроцитом, както и 4 (5.26 %) пациенти с астроцитом, 1-ва степен по СЗО (фиг. 4.2).

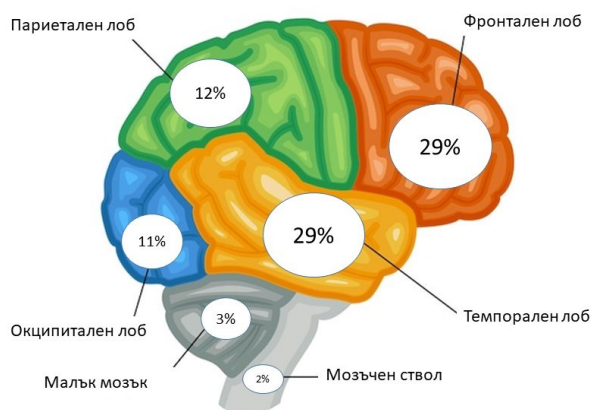


Фигура 4.2. Разпределение на пациентите според степента по СЗО. Степен 1-ва и 2-ра се отнасят към групата на НСГ, степен 3-та и 4-та се отнасят към групата на ВСГ.

По отношение на KPS статуса, 43 (56.58%) пациенти са с показател по – висок или равен на 70, от тях 24 (31.58%) са с ВСГ, а 19 (25%) са с НСГ. Броят на пациентите с KPS статус по-нисък от 70 е 30 (39.47%), от които 27 (35.53%) са ВСГ и 3 (3.95%) са с НСГ. От изследваната извадка 20 (26.32%) пациенти са с рецидивирали глиоми, а 56 (73.68%) пациенти са с първични глиоми.

При 17 (22.37%) пациенти размерът на тумора е над 5 см, при 47 (61.84%) е между 3-5 см, само при 9 (11.84%) е под 3 см, докато за 3 (3.95%) пациенти липсват данни.

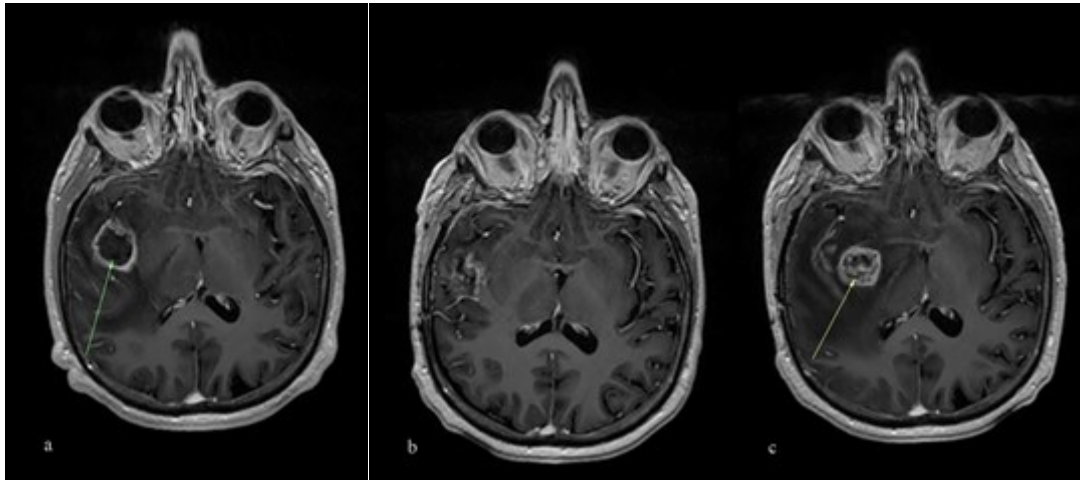
Разпределението на глиомните тумори, според локализацията при изследваната кохорта, е представено на фигура 4.3. При 29% от изследваните пациенти са засегнати фронталният и темпоралният дял, 12% са локализирани париетално, 3% са локализирани в малкия мозък, 2% засягат мозъчния ствол.



Фигура 4.3. Процентно разпределение на глиомите според локализация на засегнатите мозъчни дялове. Представените проценти са общи за ВСГ и НСГ при данни за 66 пациенти.

За периода на проследимост на пациентите в извадката от 2018 г. до 2024 г. 54 (71.05%) от пациентите са починали, 19 (25%) пациенти са живи и за трима липсват данни. От живите пациенти 17 са под 50 г. при диагностицирането, като 13 от тях са с диагноза НСГ.

С диагноза глиобластом, най-агресивният и злокачествен тумор, са 46 (60.52%) от изследваните пациенти (фиг. 4.4.).



Фигура 4.4. ЯМР на 58-годишен пациент с глиален тумор (потвърден молекулярно - хистологично като глиобластом). (а) ЯМР преди операцията - със стрелка е показан туморът (б). Следоперативен ЯМР-след пълна хирургическа резекция (с). ЯМР на рецидивирал глиобластом

4.1.1. Резултати от анализите за асоциации между клиничните характеристики

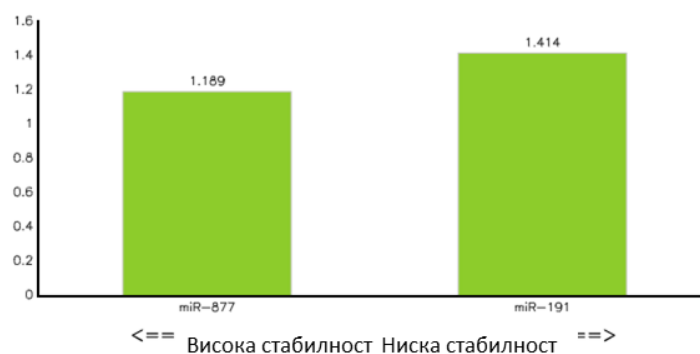
Проведените статистически тестове за определяне на асоциации между клинично-патологичните характеристики показаха следните значими резултати:

- ♥ в изследваната извадка възрастта на пациентите показва негативна корелация с общата преживяемост (OS) ($\rho = -0.629$, $p = 1.13E-9$), преживяемостта без рецидив (PFS) ($\rho = -0.446$, $p = 6.9E-5$) и KPS ($\rho = -0.397$, $p = 3.8E-4$). Увеличаването на възрастта е свързано с по-кратки периоди на OS, PFS и по-ниски стойности на KPS. Възрастта на пациентите показва връзка с вида ВСГ или НСГ ($p=0.001$), като ВСГ се наблюдават при пациенти в напреднала възраст.
- ♥ KPS показва корелация с OS ($\rho = 0.479$, $p = 1.18E-5$) и с PFS ($\rho = 0.355$, $p = 0.002$), като ниските стойности на KPS са свързани с по-кратки периоди на обща преживяемост и период без рецидив. Този показател е свързан с вида глиом - НСГ или ВСГ ($p=1.6E-4$), като по-ниски стойности на KPS се наблюдават при пациенти с ВСГ.

4.2. Анализ на генната експресия на микроРНК при пациенти с глиоми

4.2.1. Спектрофотометричен анализ

Изолираните РНК бяха измерени спектрофотометрично с NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, DE) преди експресионните анализи, като абсорбционните съотношения A260/280 и A260/230 бяха съответно между 1.76-2.1 и 1.7-2.3. Количеството на РНК в изследваните проби беше в диапазона 105 ng/ μ l – 953 ng/ μ l. Експресионните анализи на двете потенциални ендеогенни контроли (miR-191 и miR-877) показаха, че експресията на miR-877 беше по-стабилна и показва по-малко стандартно отклонение (фиг. 4.5).



Фигура 4.5. Анализ на експресионните данни и определяне на по-стабилно експресирана микроРНК, с цел подбор на ендегенна контрола.

При последващите експресионни анализи, селектираните микроРНК - miR-21-5p, miR-10b-5p, miR-7-5p, miR-491-5p, miR-34a-5p, бяха нормализирани спрямо експресията на избраната ендегенна контрола - miR-877.

4.2.2. Експресионни анализи на селектираните микроРНК

За да оценим разликите в експресията на селектираните микроРНК при различните степени глиоми и контролната група, проведохме експресионен анализ и получените данни бяха анализирани с Крускал-Уолис тест за данни с непараметрично разпределение (табл. 4.1).

Таблица 4.1. Данни от експресионните анализи на микроРНКи при сравнение на различни степени глиоми и контроли.

МикроРНК	Експресия	Медиана	25-75 процентил	р-стойност
miR - 7	понижена	0.15	0.04-0.48	4.4E-7**
miR - 10b	повишена	1.1x10 ⁶	2.7-7.2x10 ⁶	1.4E-5**
miR - 21	повишена	3.84	1.46-13.4	5.34E-5**
miR - 34a	понижена	0.84	0.49-1.6	0.025*
miR - 491	понижена	0.41	0.16-0.75	2.65E-7**

* $p < 0.05$, ** $p < 0.001$.

Експресионните анализи показаха, че в изследваната извадка микроРНКи с понижена експресия са miR - 7 ($p = 4.4E-7$), miR - 491 ($p = 2.65E-7$) и miR - 34a ($p = 0.025$), докато miR - 21 ($p = 5.34E-5$) и miR - 10b ($p = 1.4E-5$) са с повишена експресия, като всичките микроРНКи показват статистически значима разлика в разпределението на нивата на експресия в изследваните групи пациенти.

За да изследваме по-подробно между кои точно групи е наблюдаваната разлика, проведохме Dunn's post-hoc тест (табл. 4.2). В таблицата е показано нивото на статистическа значимост преди и след корекцията на Бонферони.

Таблица 4.2. Дерегулирани микроРНК при различни степени глиоми. С червен шрифт са показани статистически значимите резултати, докато с удебелен и червен шрифт са показани коригираните и значими резултати.

МикроРНК	miR - 7		miR - 21		miR - 10b		miR - 491		miR - 34a	
	р	кор. р	р	кор. р	р	кор. р	р	кор. р	р	кор. р
Сравнение по групи										
Контрола-LGG	9.19E-5 ***	2.76E-4 ***	0.001**	0.003**	2.1E-5 ***	6.3E-5 ***	0.043*	0.129	0.45	1.35
Контрола-HGG	1.007E-6 ***	3.02E-6 ***	2.36E-5 ***	7.08E-5 ***	9.13E-6 ***	2.74E-5 ***	3.55E-6 ***	1.07E-5 ***	0.096	0.288
LGG-HGG	0.01*	0.03*	0.171	0.513	0.46	1.38	1.1E-4	3.3E-4 ***	0.014	0.042*

кор.р - коригирана р стойност - нивото на статистическа значимост след Бонферони корекция. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

При miR-7 се наблюдава значително понижаване в експресията ($p = 3.02E-6$) в групата на ВСГ в сравнение с контролната група, както и в групата на НСГ глиоми ($p = 2.76E-4$) спрямо контролите. Допълнително, miR-7 е по-ниска при ВСГ в сравнение с НСГ ($p = 0.03$).

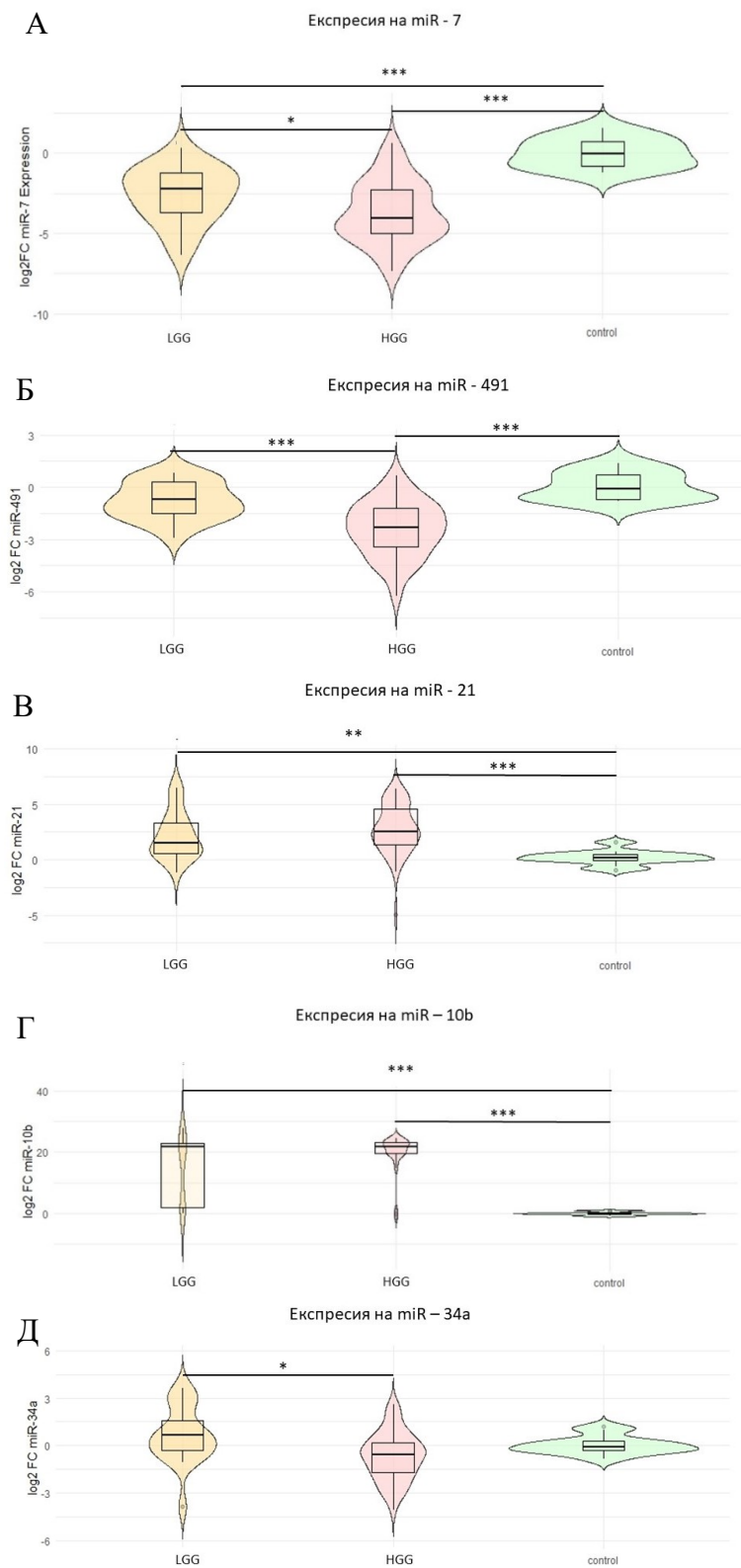
При miR-21 се отчете значимо повишаване на експресията при ВСГ ($p = 7.08E-5$) и НСГ ($p = 0.003$) спрямо контролите.

Експресията на miR-10b е значително повишена при ВСГ ($p=2.74E-5$), както и при НСГ ($p=6.3E-5$) спрямо нормална мозъчна тъкан. В селектираните здрави контроли, както и при някои НСГ не беше отчетена експресия на miR-10b.

MiR-491 показва по-ниска експресия при ВСГ спрямо контролите ($p = 1.07E-5$), както и потенциална възможност за разграничаване на ниско от високостепенни глиоми ($p=3.3E-4$).

Откриваме по-ниска експресия на miR-34a единствено при ВСГ в сравнение с НСГ ($p=0.042$).

Резултатите са представени графично на фигура 4.6.



Фигура 4.6. Виолинови диаграми с бокс-плот графики, изобразяваща нивата на експресия на miR-7 (А), miR-491 (Б), miR-21 (В), miR-10b (Г) и miR-34a (Д), при пациенти с НСГ (жълто) и ВСГ (светло червен) в сравнение с контролна група (зелен). Данните са анализирани с тест на Крускал - Уолис и резултатите са представени като логаритмична стойност от промяната на относителната експресия (FC) след корекция на Бонферони. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, FC-fold change

4.2.3. Резултати от корелационните анализи

С цел определяне дали наблюдаваните промени в експресията на микроРНКите корелират с клинично-патологичните характеристики на изследваните пациенти проведохме корелационни анализи. Използвахме теста за определяне на рангова корелация на Спирмън, като изчислихме коефициента на Спирмън и определихме посоката на корелацията.

Първо проверихме дали съществува корелация между нивата на изследваните микроРНК (табл. 4.3).

Таблица 4.3. Корелации между изследваните микроРНКи. Показани са стойностите на корелационните коефициенти на Спирмън - ρ (rho) и нивата на статистическа значимост за всяка микроРНК. Статистически значимите корелации ($p < 0.05$) са отбелязани в червено и *.

	miR-7	miR-10b	miR-21	miR-34a	miR-491
miR-7					
ρ (rho)	1	-0.02	-0.244*	0.21	0.505***
p		0.87	0.033	0.06	3.3E-06
miR-10b					
ρ (rho)	-0.2	1	0.289*	0.048	-0.049
p	0.87		0.011	0.68	0.68
miR-21					
ρ (rho)	-0.244*	0.289*	1	0.438***	-0.12
p	0.033	0.011		7.66E-5	0.32
miR-34a					
ρ (rho)	0.213	0.048	0.438***	1	0.422***
p	0.064	0.68	7.66E-5		1.47E-4
miR-491					
ρ (rho)	0.505***	-0.049	-0.12	0.422***	1
p	3.3E-06	0.68	0.32	1.47E-4	

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

Проведените анализи показват следните значими корелации:

- значителна положителна корелация между miR-491 и miR-7, $\rho = 0.505$, $p = 3.3E-06$
- умерена положителна корелация между miR-491 и miR-34a, $\rho = 0.422$, $p = 1.47E-4$
- умерена положителна корелация между miR-21 и miR-34a, $\rho = 0.438$, $p = 7.66E-5$
- слаба отрицателна корелация между miR-21 и miR-7, $\rho = -0.244$, $p = 0.033$
- слаба положителна корелация между miR-21 и miR-10b, $\rho = 0.289$, $p = 0.011$

Корелациите между експресионните нива на микроРНКите и клинично-патологичните характеристики на пациентите са показани на таблица 4.4.

Таблица 4.4. Корелации между изследваните микроРНК и клинично-патологичните характеристики. Показани са стойностите на корелационните коефициенти на Спирмън - $\rho(\text{rho})$ и нивата на статистическа значимост (значимите корелации са отбелязани в червено и *).

	Възраст	Пол	Степен по СЗО	Рецидив	KPS	OS	PFS	Лечение ^a
miR-7								
$\rho(\text{rho})$	-0.32**	0.45	-0.571***	-0.02	0.27*	0.238*	0.19	-0.36**
p	0.003	0.69	1.8E-8	0.85	0.02	0.046	0.139	0.002
miR-10b								
$\rho(\text{rho})$	0.38***	-0.01	0.39**	0.1	-0.084	-0.117	-0.176	0.04
p	0.0003	0.9	2.4E-4	0.28	0.47	0.326	0.134	0.72
miR-21								
$\rho(\text{rho})$	0.291**	-0.08	0.459**	0.1	-0.229*	-0.145	-0.268*	0.1
p	0.008	0.45	1.3E-5	0.24	0.046	0.229	0.021	0.38
miR-34a								
$\rho(\text{rho})$	0.002	0.06	-0.27*	-0.06	-0.19	0.044	0.077	-0.24*
p	0.99	0.6	0.014	0.6	0.87	0.68	0.51	0.048
miR-491								
$\rho(\text{rho})$	-0.399*	0.54	-0.632***	-0.127	0.236*	0.217	0.157	-0.469***
p	1.9E-4	0.62	1.5E-10	0.276	0.048	0.069	0.224	3.7E-5

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. ^a Отразява необходимостта от включване на повече от един вид терапия

Проведените анализи показват следните значими корелации между микроРНКите и клинично-патологичните характеристики:

- miR-7 показва значителна отрицателна корелация със степента по СЗО ($\rho = -0.571$, $p = 1.8E-8$), умерена отрицателна корелация с възрастта ($\rho = -0.32$, $p = 0.003$) и избора на лечението, като по-ниските нива на miR-7 са свързани с включването на повече от един вид терапия ($\rho = -0.36$, $p = 0.002$). Слаба положителна корелация откриваме между miR-7 KPS ($\rho = 0.27$, $p = 0.02$) и OS ($\rho = 0.238$, $p = 0.046$)

- miR-10b показва умерена положителна корелация с възрастта на пациентите ($\rho = 0.38$, $p = 0.0003$) и със степента по СЗО ($\rho = 0.39$, $p = 2.4E-4$)

- miR-21 показва умерена положителна корелация със степента по СЗО ($\rho = 0.459$, $p = 1.3E-5$) и слаба положителна корелация с възрастта ($\rho = 0.291$, $p = 0.008$), както и слаба отрицателна корелация с KPS ($\rho = -0.229$, $p = 0.046$) и PFS ($\rho = -0.268$, $p = 0.021$)

- miR-34a показва слаба отрицателна корелация със степента по СЗО ($\rho = -0.27$, $p = 0.014$) и с лечението ($\rho = -0.24$, $p = 0.048$)

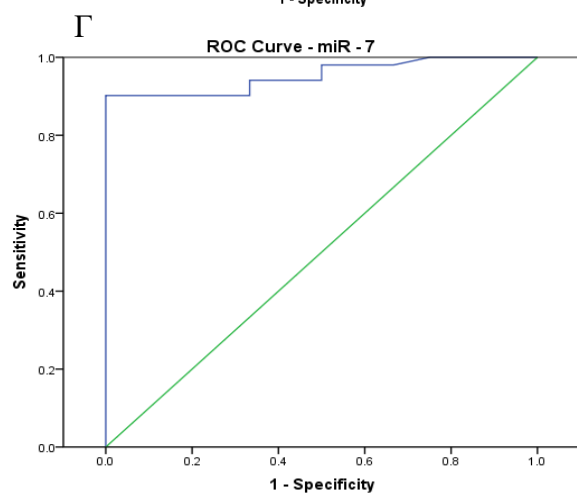
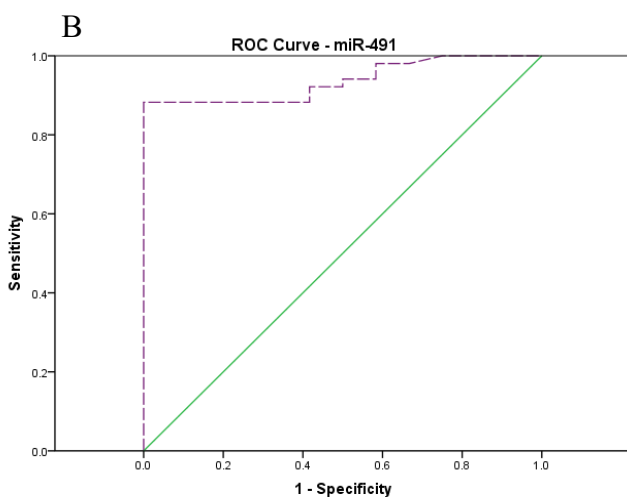
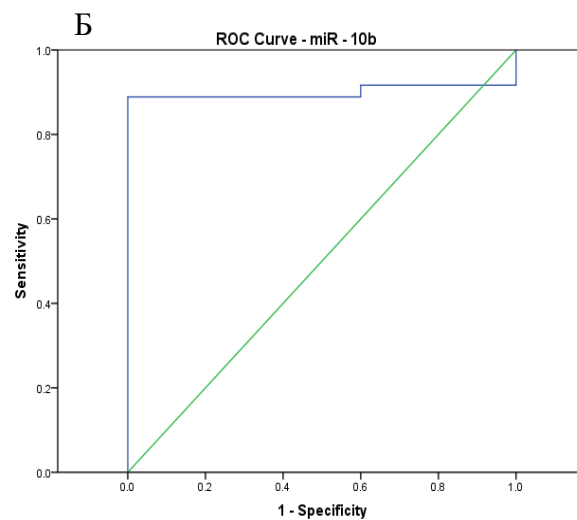
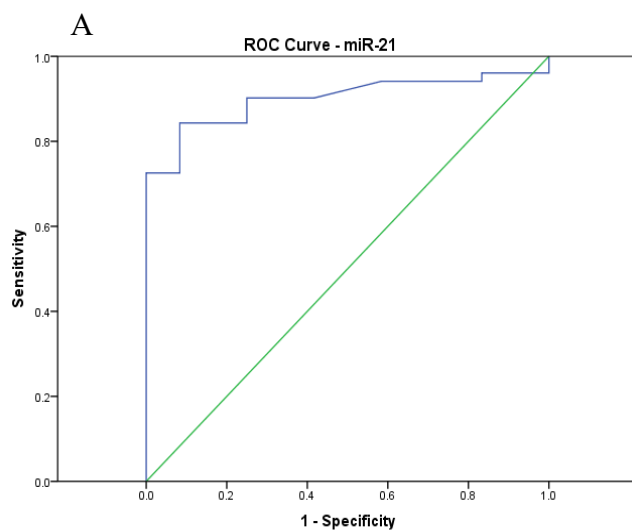
- miR-491 показва значителна отрицателна корелация със степента по СЗО ($\rho = -0.632$, $p = 1.5E-10$), умерена с лечението ($\rho = -0.469$, $p = 3.7E-5$) и възрастта ($\rho = -0.399$, $p = 1.9E-4$) и слаба положителна корелация с KPS ($\rho = 0.236$, $p = 0.048$).

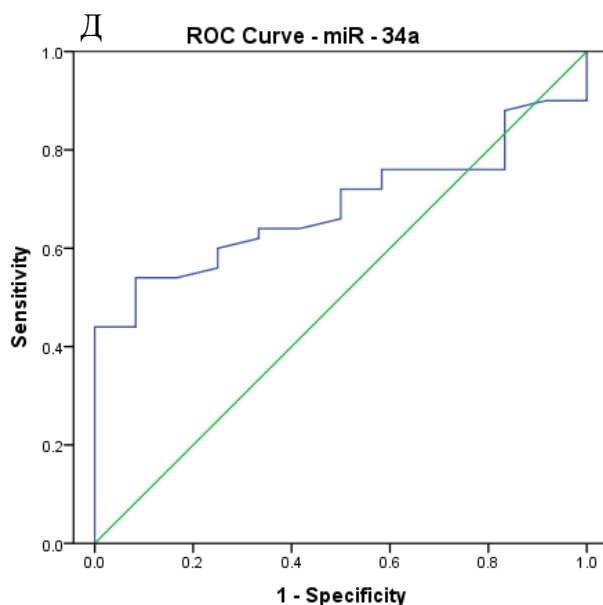
4.2.4. Анализ на ROC кривите и площта под кривата – AUC

За да отговорим на въпроса дали селектираните микроРНК притежават диагностичен биомаркерен потенциал при пациенти с различни степени глиоми проведохме анализ на ROC кривите и изчислихме площта под кривата - AUC.

4.2.4.1. Анализ на ROC кривите при сравнение между ВСГ и контроли

Проведените ROC анализи и изчислената AUC (фиг. 4.7) показаха, че miR – 7 (AUC = 0.953), miR – 10b (AUC = 0.957), miR – 21 (AUC = 0.90) и miR – 491 (AUC = 0.937) имат отличен диагностичен биомаркерен потенциал, докато miR – 34a показва слаб биомаркерен потенциал за разграничаване между ВСГ и контроли (табл. 4.5).





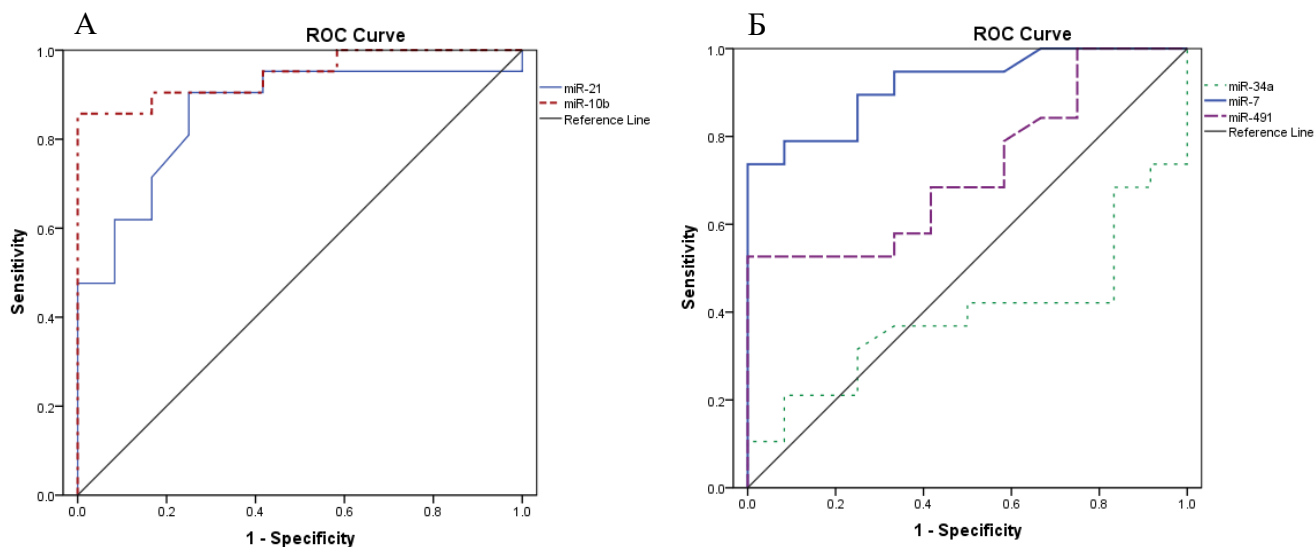
Фигура 4.7. Анализ на ROC кривите и AUC на изследваните микроРНК при сравняване между ВСГ и контроли. Отличен биомаркерен потенциал откриваме при (А) miR – 21 (AUC = 0.90, 95% CI = 0.824-0.977, p = 1.8E-5), (Б) miR – 10b (AUC = 0.957, 95% CI = 0.907-1.0, p = 1.05E-6), (В) miR – 491 (AUC = 0.937, 95% CI = 0.879-0.995, p = 2.8E-6) и (Г) miR – 7 (AUC = 0.953, 95% CI = 0.905-1.0, p < 0.001). miR – 34a (Д) показва слаб биомаркерен потенциал (AUC = 0.685, 95% CI = 0.555-0.815, p = 0.048).

Таблица 4.5. Данни от ROC анализите на изследваните микроРНК при сравняване между ВСГ и нормални контроли.

микроРНК	AUC	95% CI	Р стойност
miR - 7	0.953	0.905-1.00	<0.001
miR - 10b	0.957	0.907-1.0	1.05E-6
miR - 21	0.90	0.824-0.977	1.8E-5
miR - 34a	0.685	0.555-0.815	0.048
miR - 491	0.937	0.879-0.995	2.8E-6

4.2.4.2. Анализ на ROC кривите при сравнение между НСГ и контроли

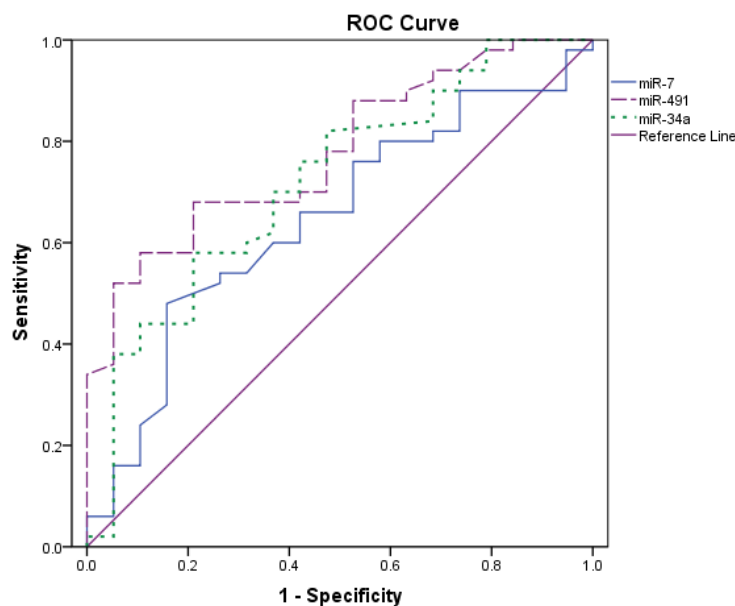
Анализът на ROC кривите при сравнение между НСГ и контроли (фиг. 4.8) показва, че miR-7 (AUC = 0.919, 95% CI = 0.825-1.0, p = 1.07E-4) и miR-10b (AUC = 0.944, 95% CI = 0.87-1, p = 2.77E-5) притежават отличен биомаркерен потенциал. Добър биомаркерен потенциал показва miR-21 (AUC = 0.861, 95% CI = 0.729-0.993, p = 0.001). miR – 491 показва умерен биомаркерен потенциал (AUC = 0.726, 95% CI = 0.548-0.904, p = 0.037), а miR – 34a не показва биомаркерен потенциал (AUC = 0.393, 95% CI = 0.192-0.593, p = 0.32).



Фигура 4.8. Анализ на ROC кривите и AUC на изследваните микроРНК при сравняване между НСГ и контроли. (А) ROC анализ на miR-10b (AUC = 0.944, 95% CI = 0.87-1, $p=2.77E-5$) и miR-21 (AUC = 0.861, 95% CI = 0.729-0.993, $p=0.001$). (Б) ROC анализ на miR-7 (AUC = 0.919, 95% CI = 0.825-1.0, $p=1.07E-4$), miR – 491 (AUC = 0.726, 95% CI = 0.548-0.904, $p=0.037$) и miR – 34a (AUC = 0.393, 95% CI = 0.192-0.593, $p=0.32$).

4.2.4.3. Анализ на ROC кривите при сравнение между НСГ и ВСГ

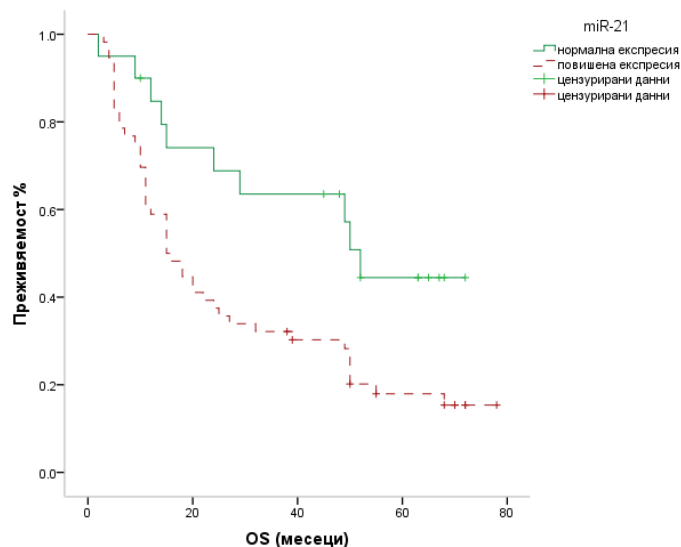
Анализът на ROC кривите при сравнение между НСГ и ВСГ показва, че miR – 491 (AUC = 0.788, 95% CI = 0.666-0.89, $p=3.9E-4$) притежава умерен биомаркерен потенциал, докато miR-7 (AUC = 0.692, 95% CI = 0.558-0.827, $p=0.01$) и miR – 34a (AUC = 0.69, 95% CI = 0.553-0.827, $p=0.014$) показват слаб биомаркерен потенциал за разграничаване на двете групи глиоми (фиг. 4.9). miR-10b (AUC = 0.547, 95% CI = 0.383-0.711, $p=0.536$) и miR-21 (AUC = 0.598, 95% CI = 0.446-0.749, $p=0.195$) не показаха биомаркерен потенциал.



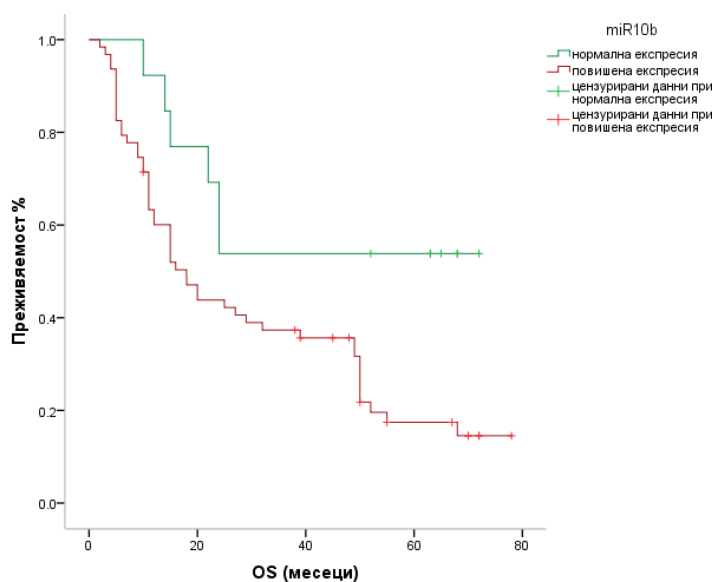
Фигура 4.9. Анализ на ROC кривите и AUC на изследваните микроРНК при сравняване между НСГ и ВСГ

4.2.5. Анализ на оцеляването (Kaplan-Meier) според експресионните нива на селектираните микроРНКи

За да проверим зависимостта на периода на обща преживяемост (OS) и периода без прогресия (PFS) на пациентите от нивата на изследваните микроРНКи, проведохме анализ на оцеляването. Резултатите са показани на фиг. 4.10, фиг. 4.11, фиг. 4.12 и фиг. 4.13. Анализите показаха, че пациентите с повишени нива на miR-21 ($p = 0.014$) и miR-10b ($p = 0.020$) са със значимо по-кратка OS в сравнение с пациенти с нормални нива на тези микроРНКи.



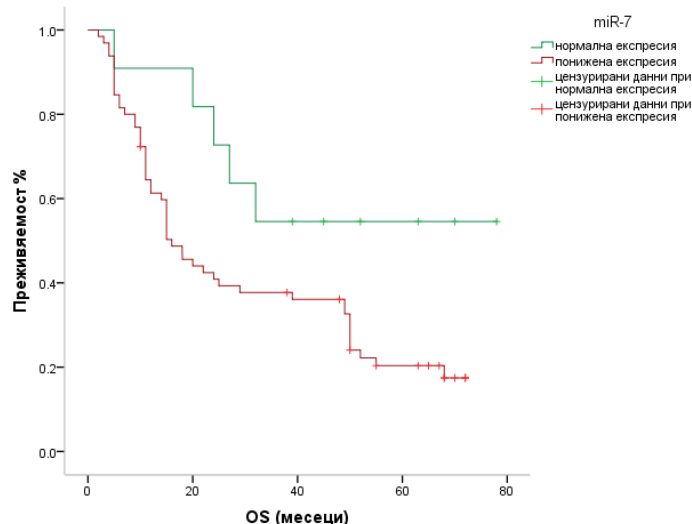
Фигура 4.10. Каплан-Майер анализ на преживяемостта на пациентите с глиоми според експресионните нива на miR-21. Тестът на log-rank показва, че високите нива на miR-21 (червено) са свързани с по-кратка преживяемост ($p = 0.014$) спрямо нормалните стойности (зелено).



Фигура 4.11. Каплан-Майер анализ на преживяемостта на пациентите с глиоми според експресионните нива на miR-10b. Високите нива на miR-10b (червено) са свързани с по-кратка преживяемост в сравнение с нормални стойности на експресия (зелено) при пациенти с глиоми ($p = 0.02$).

Стойността на медианата на OS при пациентите с повишена експресия на miR-21 е 15 месеца (95% CI = 9.50-20.50), докато при пациенти с нормални нива е 52 месеца (95% CI = 46.44-57.56). Медианата на OS при пациентите с повишена експресия на miR-10b е 18 месеца (95% CI = 11.78-24.22), докато при тези с нормални нива е 58 месеца.

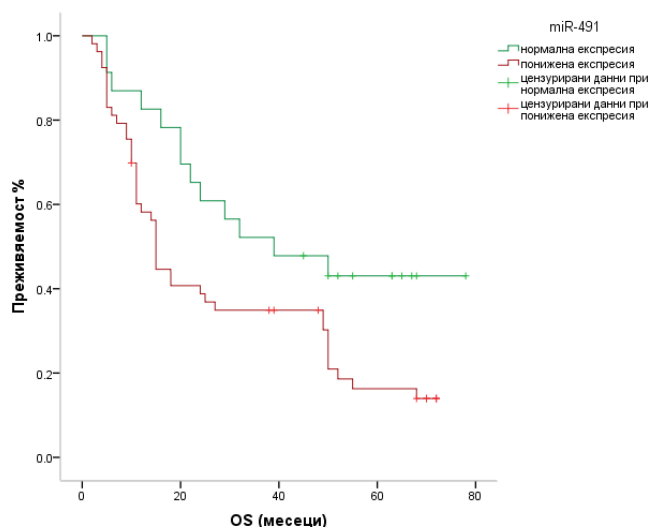
Анализите показаха, че пациенти с по-ниски нива на miR-7 ($p = 0.048$) и miR-491 ($p = 0.020$) са със значимо по-кратка OS в сравнение с пациентите с нормални нива на тези микроРНКи.



Фигура 4.12. Каплан-Майер анализ на преживяемостта на пациентите с глиоми според експресионните нива на miR-7. Ниските нива на miR-7 (червено) са свързани с по-кратка преживяемост в сравнение с нормални стойности на експресия (зелено) при пациенти с глиоми ($p = 0.048$).

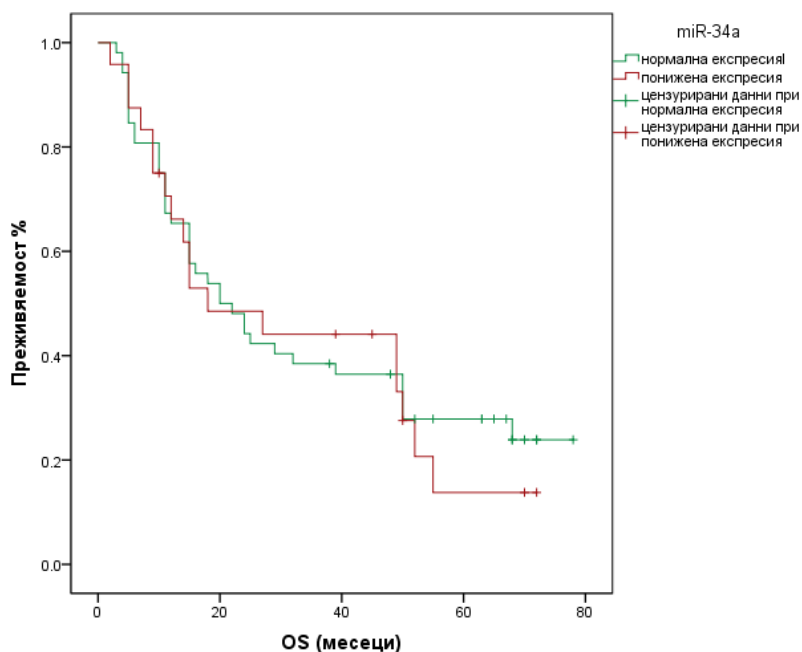
Стойността на медианата на OS при пациентите с ниска експресия на miR-7 е 16 месеца (95% CI = 11.36-20.50), докато при тези с нормални нива е 52.4 месеца (95% CI = 35.37-69.36).

Стойността на медианата на OS при пациентите с ниска експресия на miR-491 е 15 месеца (95% CI = 13.84-16.16), докато при пациентите с нормални нива е 39 месеца (95% CI = 7.19-70.81).



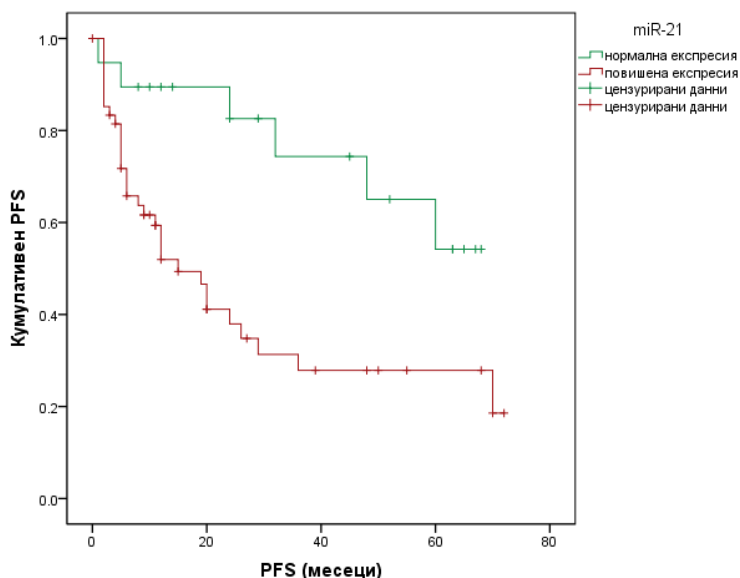
Фигура 4.13. Каплан-Майер анализ на преживяемостта на пациентите с глиоми според експресионните нива на miR-491. Ниските нива на miR-491 (червено) са свързани с по-кратък период на обща преживяемост в сравнение с нормални стойности на експресия (зелено) ($p = 0.020$).

При miR-34a не беше отчетена статистически значима връзка ($p = 0.716$) между нивата на експресията и преживяемостта на пациентите (фиг. 4.14).

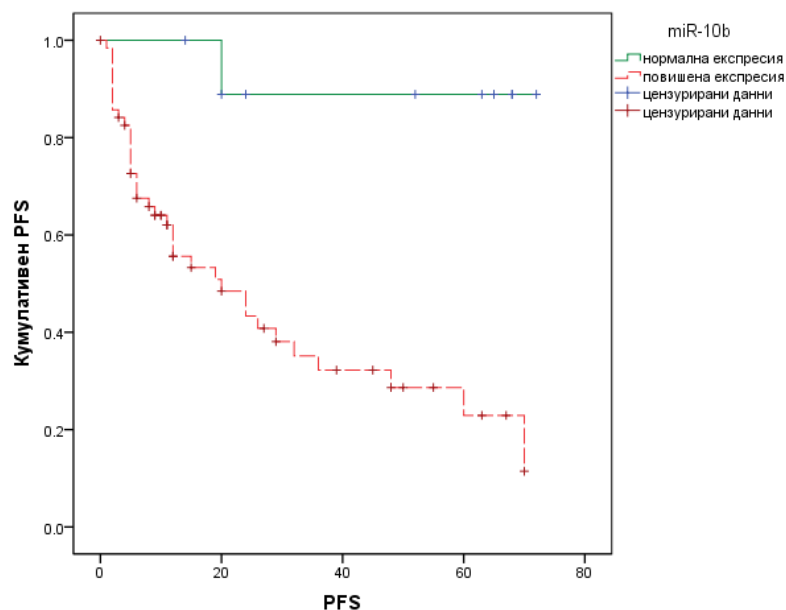


Фигура 4.14. Каплан-Майер анализ на преживяемостта на пациентите с глиоми според експресионните нива на miR-34a. Понижените нива на miR-34a (червено) не показаха значима връзка с преживяемостта ($p = 0.716$).

По отношение на PFS, установяваме, че miR-21 (фиг. 4.15), miR-10b (фиг. 4.16) и miR-491 (фиг. 4.17) показват статистически значима връзка с периода без прогресия. Повисоките нива на експресия на miR-21 са свързани с по-кратък период без прогресия ($p=0.007$)

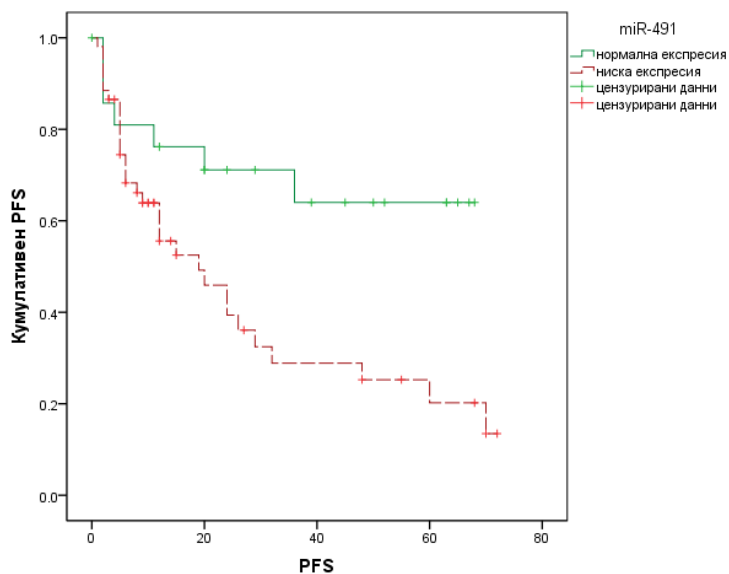


Фигура 4.15. Каплан-Майер анализ на PFS на пациентите с глиоми според експресионните нива на miR-21. Повишените нива на miR-21 (червено) са свързани с по-кратък период без прогресия в сравнение с нормални стойности на експресия (зелено) ($p = 0.007$). PFS – период (в месеци) преди появата на рецидив.



Фигура 4.16. Каплан-Майер анализ на PFS на пациентите с глиоми според експресионните нива на miR-10b. Повишените нива на miR-10b (червено) са свързани с по-кратък период без прогресия в сравнение с нормални стойности на експресия (зелено) ($p = 0.002$). PFS – период (в месеци) преди появата на рецидив.

По-високите нива на експресия на miR-10b също са свързани с по-кратък период без прогресия ($p=0.002$).



Фигура 4.17. Каплан-Майер анализ на PFS на пациентите с глиоми според експресионните нива на miR-491. Ниските нива на miR-491 (червено) са свързани с по-кратък период без прогресия в сравнение с нормални стойности на експресия (зелено) ($p = 0.013$). PFS – период (в месеци) преди появата на рецидив.

Каплан-Майер анализът на зависимостта на PFS на пациентите от нивата на miR-491 показва, че по-ниските нива на експресия на miR-491 са свързани с по-кратък период без прогресия ($p=0.013$). Другите микроРНКи – miR-7 ($p=0.46$) и miR-34a ($p=0.61$) не показаха статистически значима връзка с PFS.

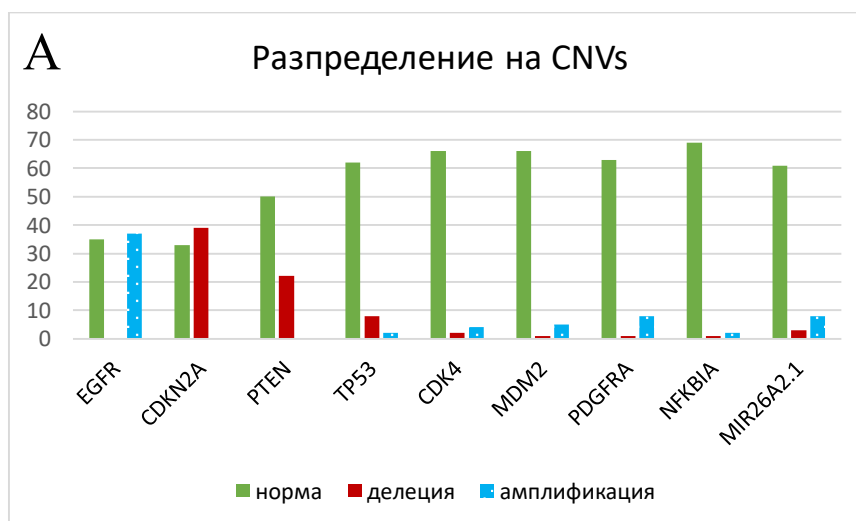
4.3. Резултати от генетичните анализи

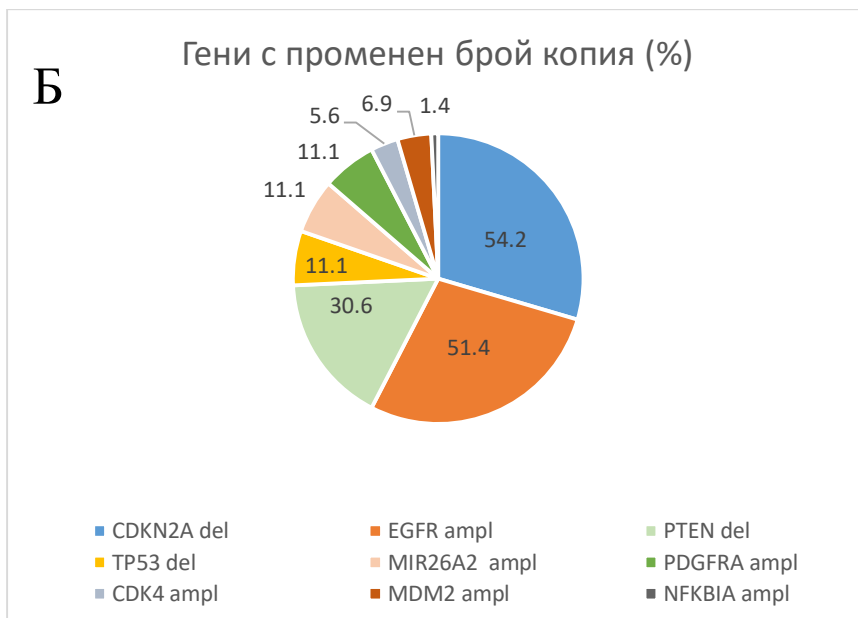
В настоящото изследване бяха сравнени два метода за екстракция на ДНК – метод, базиран на фенол/хлороформ и комерсиален кит - QIAamp DNA Mini Kit. Резултатите показаха, че при десет ДНК, изолирани с QIAamp DNA Mini Kit, наблюдаваме по-висока чистота ($A_{260}/A_{280} = 1.8 - 1.95$) в сравнение с методиката, базирана на фенол/хлороформ. Екстракцията с комерсиалния кит е много по-бърза, изолираните ДНК са с по-висока чистота и минимално наличие на замърсители, както и отчитаме много по-добри показатели и ефикасност на MLPA анализа. Поради тези причини, анализите са проведени върху ДНК, изолирана с QIAamp DNA Mini Kit.

Допълнително беше направено сравнение между резултатите на двадесет ДНК, изолирани от свежа туморна тъкан и от FFPE, след оценка от патолог. Сравнението показва, по-ниска ефикасност на MLPA анализа при ДНК от FFPE, докато свежата тъкан осигурява по-добри резултати, поради по-високата чистота, интактната ДНК и липсата на замърсители. Генетичните резултати на ДНК, изолирани от двата вида материали съвпадаха.

4.3.1. MLPA анализи за определяне броя копийни варианти (CNVs) при набор от гени, засегнати при глиомите

MLPA анализът на гените *EGFR*, *CDKN2A*, *PTEN*, *TP53*, *PDGFRA*, *CDK4*, *MIR26A2*, *MDM2*, *NFKB1A* показва, че при 61 пациенти се открива една или повече промени в изследваните гени (фиг. 4.18). Четири от пациентите бяха изключени от MLPA анализа, поради лошо качество на пробите и недостатъчен материал за повторение.

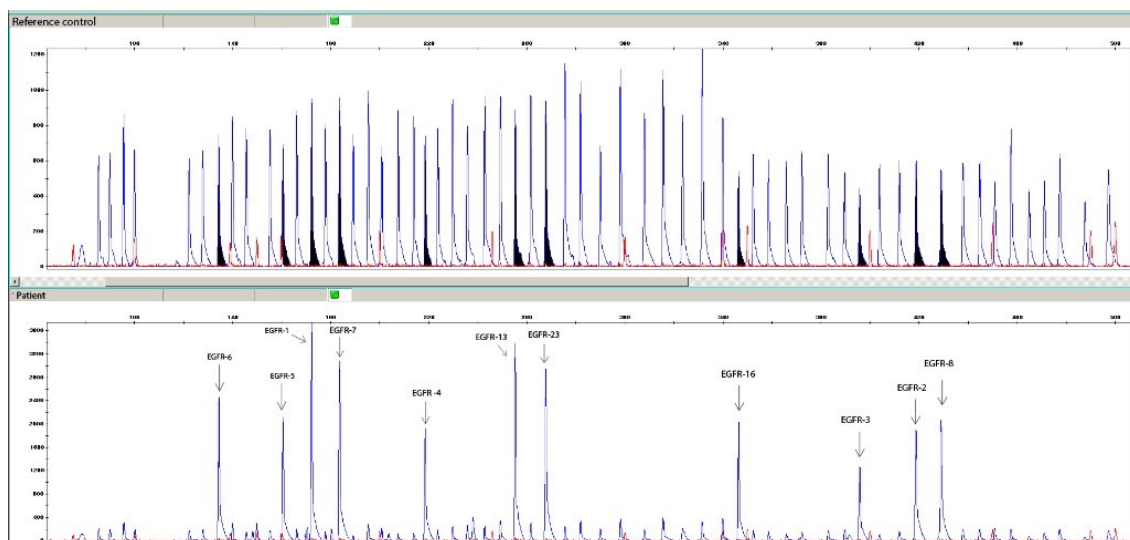




Фигура 4.18. Разпределение на промените в броя копия (CNVs) на анализирани гени при изследваната група пациенти с глиоми. Данните са представени като брой CNVs (А) и като пай фигура с проценти (Б).

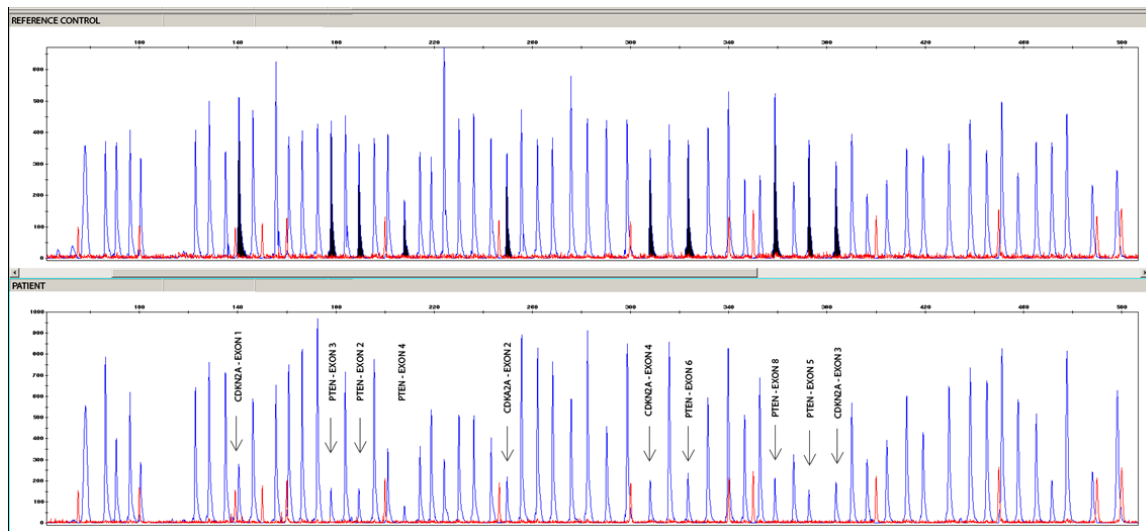
Най - често засегнатият ген с нарушения в броя копия е *CDKN2A*, като при 39 (54.2%) от пациентите с глиоми този ген е делетиран. Хомозиготна делеция откриваме при 20 (27.8%) пациенти, докато хетерозиготна делеция се наблюдава при 19 (26.4%) от пациентите. Важно е да подчертаем, че хомозиготна делеция в нашата извадка се отчете предимно при ВСГ – 19 пациенти, от които 18 са с диагноза глиобластом, докато при НСГ отчитаме само един пациент с хомозиготна делеция. Хетерозиготна делеция на *CDKN2A*, в нашата извадка, се отчете при 14 пациенти с ВСГ и при 5 пациенти с НСГ.

Следващият по честота засегнат ген е *EGFR*. Амплификация в *EGFR* откриваме при 37 (51.4%) от пациентите (фиг. 4.19).



Фигура 4.19. Електрофореграма, показваща амплификация на *EGFR*. Първата електрофореграма е на контрола с маркирани в тъмносиньо пикове на *EGFR*. Втората електрофореграма е на пациент с глиом, като са обозначени силно повишените пикове на отделните екзони на *EGFR* в сравнение с останалите гени.

Делеция на *PTEN* се открива при съответно 22 (30.6 %) от изследваните глиоми. Като CNVs в *CDKN2A* и *PTEN* се откриват и в комбинации (фиг. 4.20).

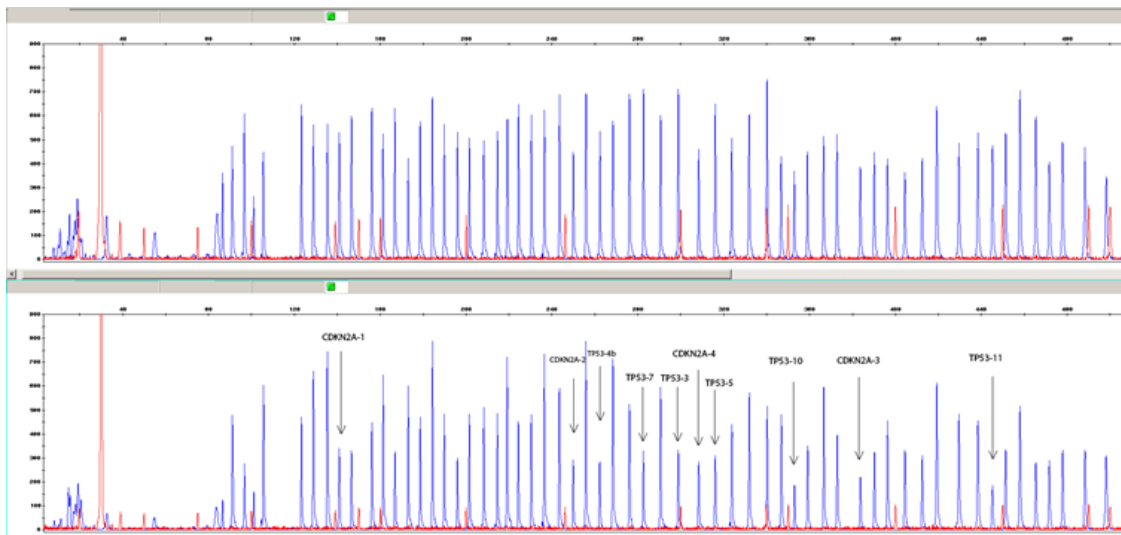


Фигура 4.20. Електрофореграма на на нормален профил (горе) и комбинирана делеция на *CDKN2A* и *PTEN* (долу).

При 13 пациенти откриваме едновременна амплификация на *EGFR* и делеция на *CDKN2A*, и *PTEN*. Един от пациентите (мъж на 55 г.) е с рецидивирал глиобластом и три поредни операции. Интересното при него е, че при първата операция се отчита само амплификация на *EGFR* и делеция на *CDKN2A*, но не се наблюдава делецията на *PTEN*. Делецията на *PTEN* се отчита при анализ на първия рецидив, който се появява две години след първата операция. Три месеца след това, пациентът постъпва за трета поредна операция, поради втори рецидив и отчитаме същия CNV профил от предишното изследване. Останалите гени остават непроменени, като и при трите проби отчитаме мутация в *IDH1*. Общата продължителност на живот на пациента е 52 месеца от първото постъпване в болницата и 4 месеца след операцията за рецидив и отчитане на едновременното засягане на *CDKN2A*, *EGFR* и *PTEN*. Още един пациент (жена на 63 г.) с диагноза глиобластом постъпва два пъти в болницата за операция, като при първата операция отчитаме амплификация на *EGFR* и делеция на *CDKN2A*, докато всички останали гени са с нормални профили. След 5 месеца се наблюдава рецидив и MLPA анализът показва появата допълнително на делеция на *PTEN* и амплификация на *PDGFRA*.

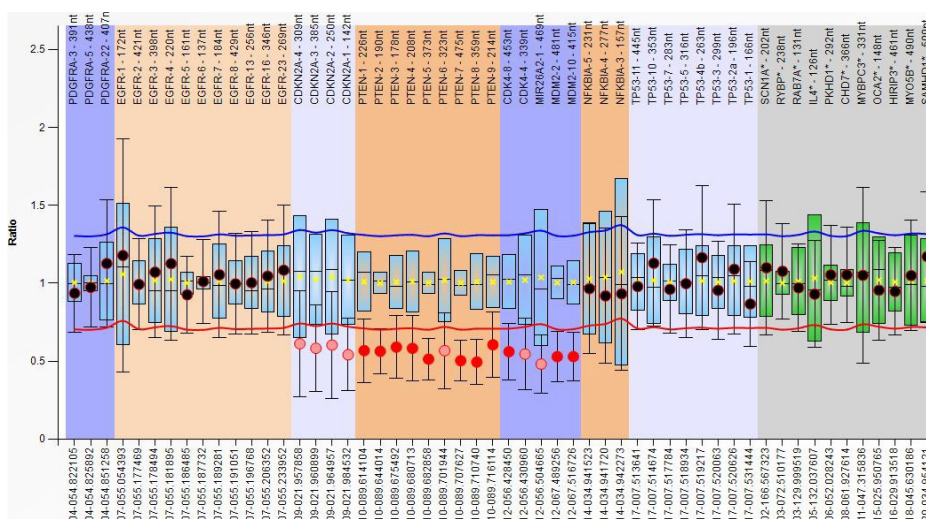
Пациентите със засягане на трите гена - *CDKN2A*, *EGFR* и *PTEN* са със средна OS от 9 месеца.

Делеция на *TP53* откриваме при 8 (11.1%) пациенти, докато при двама този ген е амплифициран. Пациентите с амплификации на *TP53* бяха с рецидивирали глиобластоми и допълнителни CNVs, като амплификация на *EGFR*, *CDK4*, *MDM2* и делеция на *PTEN*, вероятно вследствие на повишената геномна нестабилност при прогресия на тумора. Средната OS при пациентите с ВСГ и делеция на *TP53* е 21 месеца, докато при тези с НСГ – 26 месеца. На фигура 4.21 е показана електрофореграма с комбинирана делеция на *CDKN2A* и *TP53*.



Фигура 4.21. Электрофореграма с нормален MLPA профил (горе) и комбинирана делеция на *CDKN2A* и *TP53* (долу).

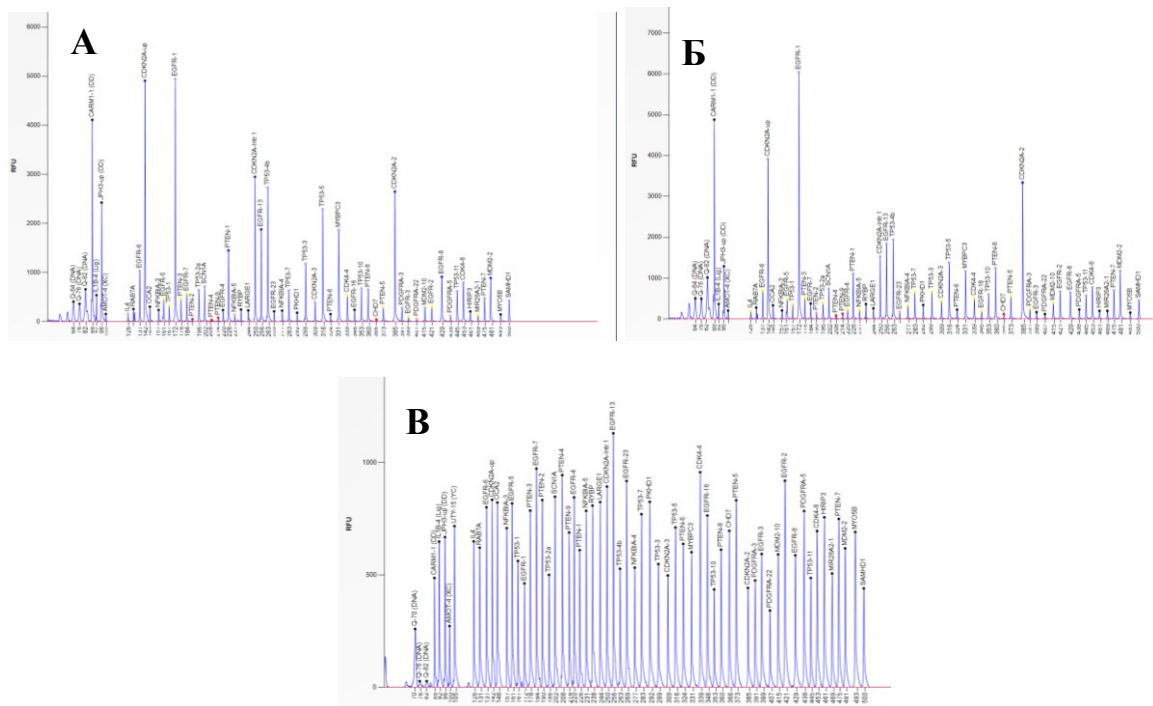
Амплификация на *MIR26A*, *CDK4* и *MDM2* е открита при съответно 8 (11.1%), 4 (5.6%), 5 (6.9%) от пациентите. Делеции на *MIR26A*, *CDK4* и *MDM2* също се наблюдават съответно при 3 (4.2%), 2 (2.8%) и един (1.4%) пациент (фиг. 4.22).



Фигура 4.22. MLPA профил с хетерозиготни делеции на *CDKN2A*, *PTEN*, *MIR26A*, *CDK4* и *MDM2*. MLPA анализът разкри интересен случай на пациент със смесена хистологична диагноза (ПНЕТ и глиобластом), при който се открива нетипична делеция на *MDM2*, *CDK4* и *MIR26A2-1*.

Амплификация на *PDGFRA* се открива при 8 (11.1%) пациенти, а делеция при един. Делеция на *NFKBIA* установяваме при един пациент (1.4%), докато при двама този ген е амплифициран.

Интересени резултати получихме при сравнение на MLPA анализите между съседна „здрава контрола“ (на разстояние 1-2 см) по време на операцията и туморна тъкан. Оказва се, че при няколко пациенти MLPA профилите на макроскопски „здрава“ тъкан и туморна тъкан са много сходни (фиг. 4.23).



Фигура 4.23. Електрофореграми с профил на (А) съседна макроскопски „здрава“ мозъчна тъкан, (Б) туморна тъкан и (В) нормален профил на пациент без CNVs.

4.3.2. Асоциации между клинично-патологичните характеристики и CNVs

Статистическите анализи за определяне наличието на връзка между изследваните CNVs и клинично-патологичните характеристики показаха асоциация с появата на рецидив, степента по СЗО, статуса на оцеляване (жив или починал) и лечението (табл. 4.6).

Таблица 4.6. Асоциации между клинично-патологичните характеристики и CNVs.

	<i>EGFR</i>	<i>CDKN2A</i>	<i>PTEN</i>	<i>TP53</i>	<i>PDGFRA</i>	<i>CDK4</i>	<i>MDM2</i>	<i>MIR26A</i>	<i>NFKBIA</i>
Степен по СЗО	0.013*	0.51	0.04*	0.9	0.2	0.72	0.101	0.25	0.95
Рецидив	0.68	0.78	0.27	0.04*	0.75	0.61	0.12	0.14	0.48
Статус на оцеляване	0.002*	0.021*	0.027*	0.4	0.055	0.36	0.23	0.17	0.57
Лечение	0.006*	0.17	0.013	0.2	0.63	0.12	0.1	0.03	0.97

Показана е р стойността, като значимите стойности са отбелязани със * и удебелен шрифт

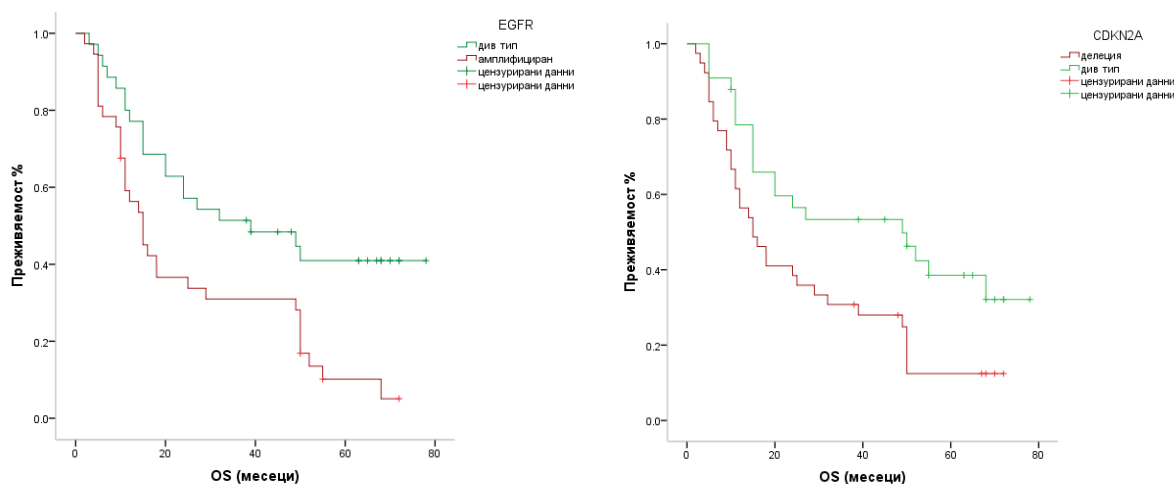
EGFR показва асоциация със степента по СЗО ($p=0.013$), като този ген е значително по-често амплифициран при ВСГ в сравнение с НСГ. Съответно, асоциация се наблюдава със статуса на оцеляване ($p=0.002$) и избора на повече от един вид лечение ($p=0.006$). *CDKN2A* показва асоциация със статуса на оцеляване ($p=0.021$), като в края на настоящото проучване всички пациенти с хомозиготна делеция бяха починали. Откритата негативна асоциация индикира, че хомозиготната делеция се свързва повече с лоша прогноза и диагноза ВСГ, за разлика от хетерозиготната делеция.

PTEN показва асоциация със степента по СЗО ($p=0.04$), като делеция на този ген откриваме при 21 ВСГ, от които 19 пациенти са с глиобластом и само при един пациент с НСГ. Делецията на *PTEN* показва асоциация и със статуса на оцеляване ($p=0.027$), като 20 от пациентите с делеция са починали, а само двама са живи. *TP53* делецията показва

асоциация с отсъствието на рецидиви ($p=0.04$), като в нашата извадка делеция на този ген се открива само при пациенти без рецидиви.

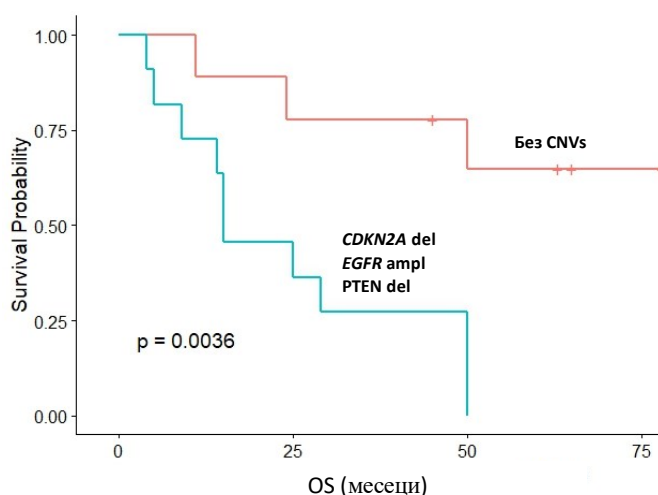
4.3.3. Анализ на оцеляването (Kaplan-Meier analysis) според CNV статуса на изследваните гени

За да определим дали изследваните от нас CNVs имат връзка с преживяемостта на пациентите проведохме анализ на оцеляването. Каплан–Майер кривите на OS според CNV статуса и log-rank теста показаха, че пациентите с амплификация на *EGFR* (фиг. 4.24А) или делеция на *CDKN2A* (фиг. 4.24Б) са със значимо по-кратка OS в сравнение с пациенти с нормални профили на тези гени.



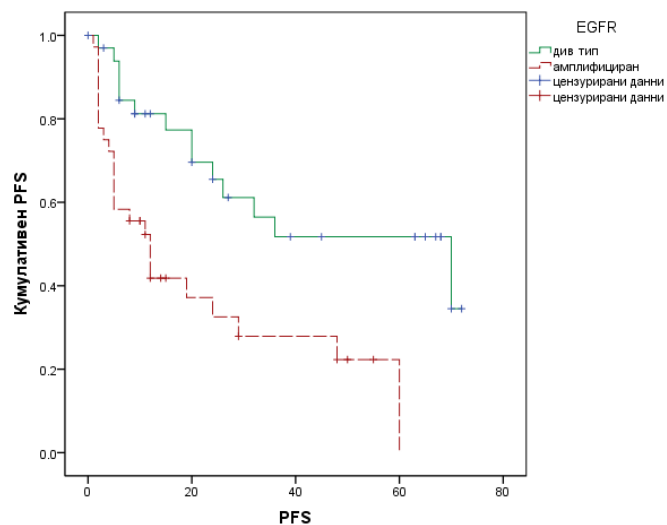
Фигура 4.24. Каплан-Майер анализ на OS и log-rank тест на пациентите с глиоми според CNV статуса на *EGFR* (А) и *CDKN2A* (Б). А. Амплификацията на *EGFR* (червено) е свързана с по-кратка преживяемост ($p = 0.004$) спрямо пациентите с див тип *EGFR* (зелено). Б. Делецията на *CDKN2A* (червено) е свързана с по-кратка преживяемост ($p = 0.011$) спрямо пациентите с див тип *CDKN2A* (зелено).

Каплан-Майер анализът показва, че пациенти с комбинация от амплификация на *EGFR*, делеция на *CDKN2A* и *PTEN* живеят значително по-кратко ($p=0.0036$) спрямо тези с нормален CNV статус на тези гени (фиг. 4.25).



Фигура 4.25. Каплан-Майер анализ на общата преживяемост (OS) на пациентите с глиоми според трите най-чести CNVs. Тестът на log-rank показва, че комбинацията от делецията на *CDKN2A*, *PTEN* и амплификация на *EGFR* (синьо) е свързана с по-кратка преживяемост ($p = 0.0036$) спрямо пациентите с див тип на тези гени (червено).

По отношение на PFS, Каплан–Майер кривите показаха, че пациентите с амплификация на *EGFR* имат по-кратки периоди без прогресия и амплификацията на този ген е свързана с по-бърза поява на прогресия (фиг. 4.26). Медианата на PFS периода при пациенти с амплификация на *EGFR* е 12 месеца (95% CI = 7.07-16.93) в сравнение с пациенти с нормален профил на този ген, при които медианата е 24 месеца.

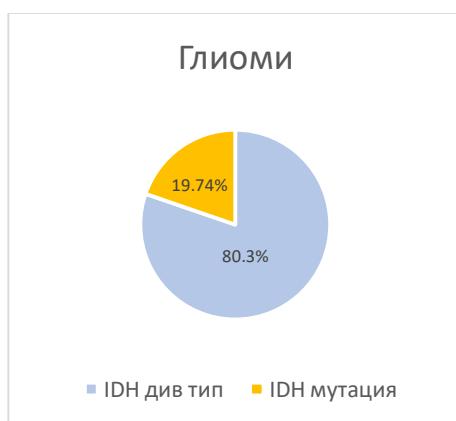


Фигура 4.26. Каплан-Майер анализ на PFS периода на пациентите с глиоми според CNV статуса на *EGFR*. Тестът на log-rank показва, че амплификация на *EGFR* (червено) е свързана с по-кратки PFS периоди ($p = 0.001$) спрямо пациентите с див тип *EGFR* (синьо). PFS – период (в месеци) преди появата на рецидив.

Делецията на *CDKN2A* ($p=0.363$), *PTEN* ($p=0.92$), *TP53* ($p=0.21$) и *NFKB1A* ($p=0.51$), както и амплификацията на *PDGFRA* ($p=0.18$), *CDK4* ($p=0.7$), *MDM2* ($p=0.82$) и *MIR26A2* ($p=0.88$) не показаха значими връзки с PFS периода в сравнение с пациенти с нормални профили на тези гени.

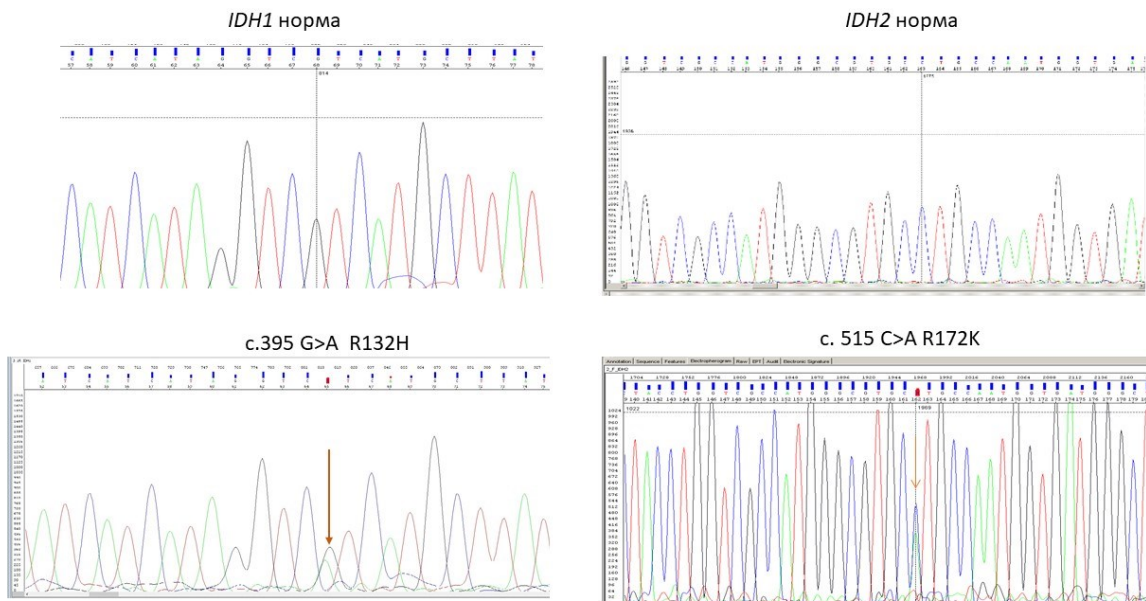
4.3.4. Резултати от секвениране по Sanger на *IDH1* и *IDH2* гените.

В изследваната пациентска извадка извършихме секвениране по Sanger на *IDH1* и *IDH2* гените. Мутации в тези гени се откриват при 15 (19.74%) от пациентите (фиг. 4.27). При ВСГ се откриха 9 мутации в *IDH1*, като от тях 6 пациенти бяха с диагноза глиобластом (2 de novo и 4-ри с рецидивирали вторични глиобластоми), един с олигодендроглиом, 3-та степен по СЗО и останалите при астроцитомии, 3-та степен по СЗО. При НСГ откриваме 5 мутации в *IDH1* гена и една в *IDH2* гена.



Фигура 4.27. Разпределение на *IDH1/2* мутациите сред изследваната кохорта пациенти с глиоми.

При 9 пациенти наблюдаваме вариант *IDH1* с.395 G>A (R132H) (фиг. 4.28А), при 5 пациенти *IDH1* с.394 C>T (R132C) и само при един *IDH2* с. 515 C>A (R172K) (фиг. 4.28Б).



Фигура 4.28. Електрофореграми от секвениране по Sanger на *IDH1* (А) и *IDH2* (Б) гените. (А) Показан е профил на пациент с див тип *IDH1* (горе) и пациент с най-честата мутация в изследваната кохорта при *IDH1* гена с.395 G>A, R132H (червена стрелка). (Б) Показан е профил на пациент с див тип *IDH2* (горе) и профил с мутацията в *IDH2* гена с. 515 C>A R172K (с червена стрелка е отбелязано мястото на мутацията).

Първата мутация, *IDH1* с.395 G>A (R132H), се намира в екзон 4 на *IDH1* гена. Тази мутация е транзиция (заменя се пуриновата база гуанин с друга пуринова база- аденин) и води до промяна на аминокиселината аргинин (R) в позиция 132 с хистидин (H). Това е missense мутация, която променя ензимната активност на *IDH1*. Другата установена missense мутация - *IDH1* с.394 C>T (R132C), в екзон 4 на *IDH1* гена, също е транзиция (цитозина е заменен с тимин), което води до замяна на аминокиселината аргинин (R) на позиция 132 с цистеин (C). Отново тази missense мутация е свързана с променена ензимна активност на *IDH1*. Третият вид мутация, *IDH2* с.515 C>A (R172K), е разположена в екзон 5 на *IDH2* гена. Тази мутация е трансверсия (цитозин е заменен с аденин), която променя аминокиселината аргинин (R) в позиция 172 с лизин (K). Както и предходните, това е missense мутация, която води до функционални промени в ензима *IDH2*.

4.3.5. Анализ на асоциациите между клинично-патологичните характеристики и *IDH1*

Наличието на мутация в *IDH1* показва корелация със следните клинично-патологични характеристики:

- KPS ($\rho = 0.264$, $p = 0.021$)
- OS ($\rho = 0.248$, $p = 0.031$)
- степента по СЗО ($\rho = -0.251$, $p = 0.029$)

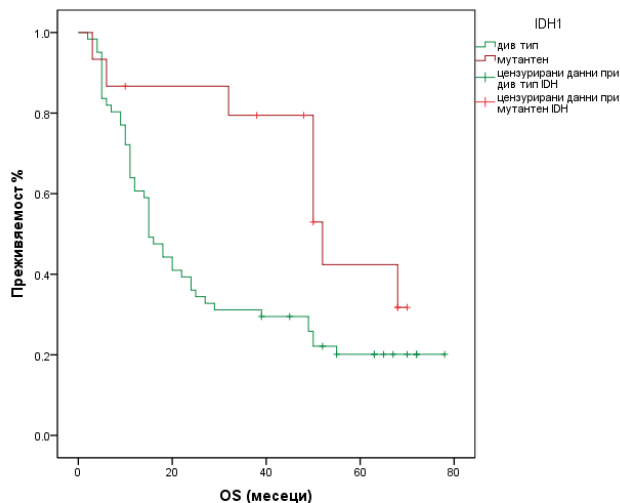
Мутациите се откриват предимно при НСГ или рецидивирани ВСГ от предишни НСГ

4.3.6. ROC анализ според *IDH1* статуса

Като индивидуален маркер, в нашата извадка, според проведения ROC анализ *IDH1* не показва значим диагностичен потенциал ($p = 0.413$, $AUC = 0.561$, 95% CI 0.412-0.71) за разграничаване на ВСГ от НСГ.

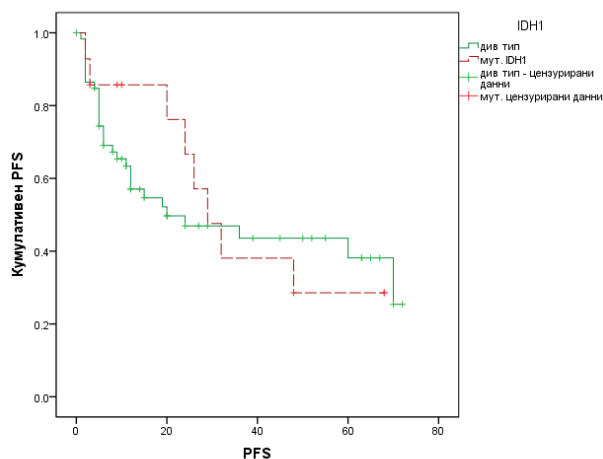
4.3.7. Анализ на оцеляването според *IDH1* статуса

Каплан-Майер анализът показва, че пациентите с наличието на мутация в *IDH1* гена живеят повече ($p=0.026$) спрямо тези с див тип ген (фиг. 4.29).



Фигура 4.29. Каплан-Майер анализ на общата преживяемост (OS) на пациентите с глиоми според *IDH1* статуса. Присъствието на мутации в *IDH1* (червено) е свързана с по-дълъг период на преживяемост ($p = 0.026$) спрямо пациентите с див тип *IDH1* (зелено).

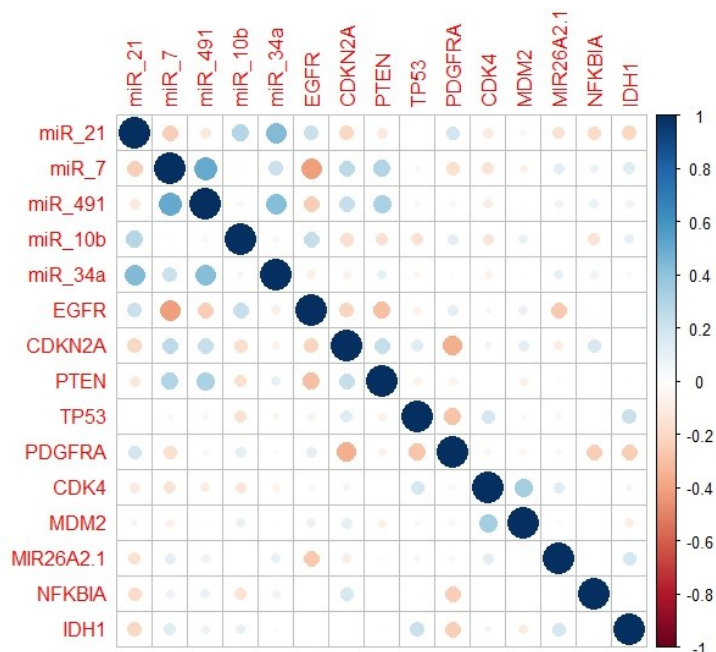
Каплан-Майер анализът на PFS според *IDH1* статуса не показва статистически значима разлика ($p = 0.83$) в кривите на пациентите с див тип *IDH1* и с мутация в *IDH1* гена (фиг. 4.30).



Фигура 4.30. Каплан-Майер анализ на PFS според *IDH1* статуса. Пациентите с мутации в *IDH1* (червено) не показаха разлика ($p = 0.83$) по отношение на PFS спрямо пациентите с див тип *IDH1* (зелено). PFS – период (в месеци) преди появата на рецидив.

4.3.8. Корелация между наблюдаваните CNVs, мутациите в *IDH1* гена и експресионните нива на микроРНКите

За да проверим наличието на корелации между изследваните микроРНКи, CNVs и откритите мутации в *IDH1* гена, проведохме корелационни анализи. Получените резултати са показани на фиг. 4.31.



Фигура 4.31. Корелация между изследваните CNVs и микроРНКите

Проведените корелационни анализи показват следните значими корелации между наличието на CNVs и нивата на микроРНКите:

♥ *EGFR* амплификацията корелира негативно с miR-7 ($\rho = -0.382$, $p=0.001$), miR-491 ($\rho = -0.249$, $p=0.035$), докато с miR-10b показва позитивна корелация ($\rho = 0.258$, $p=0.029$). Амплификация на *EGFR* се наблюдава по-често при пациенти с по-ниски нива на miR-7.

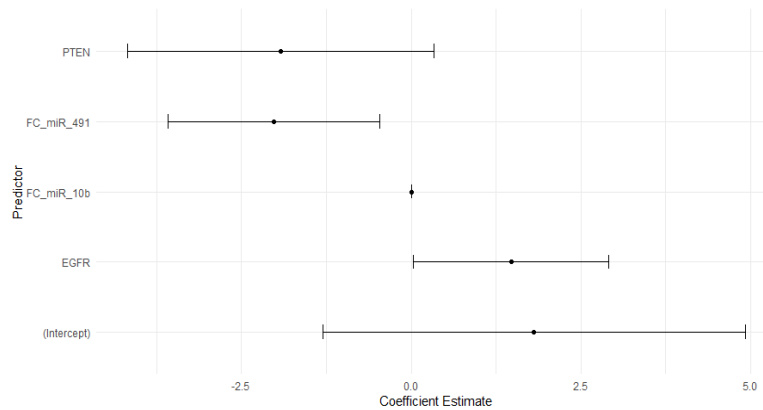
♥ *PTEN* делецията показва позитивна корелация с miR-7 ($\rho = 0.268$, $p=0.023$) и miR-491 ($\rho = 0.322$, $p=0.006$).

Останалите гени с променен брой копия, както и наличието или отсъствието на мутация в *IDH1*, не показват корелация с изследваните микроРНКи в нашата кохорта.

4.3.9. Модели на логистична регресия

Създадохме поредица от модели на логистична регресия и анализирахме диагностичния потенциал на комбинации от променливи, включващи CNVs, нивата на микроРНКите и клинично-патологичните характеристики. Най-добрите логистични модели, подбрани чрез стъпаловидна селекция на предиктивни променливи, показаха следните значими резултати:

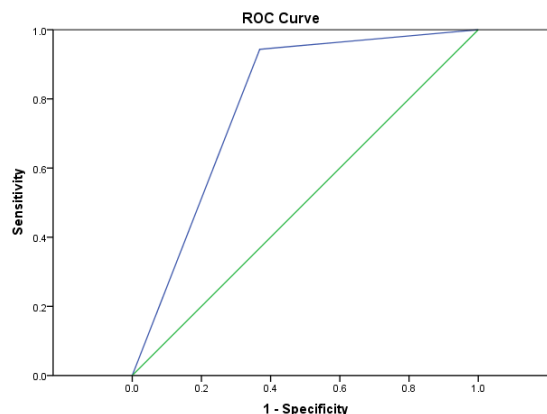
- ♥ Комбинацията между понижена експресия на miR-491 ($OR = 0.107$, $p = 0.004$) и амплификация на *EGFR* ($OR = 6.19$, $p = 0.009$) разграничава ВСГ от НСГ с точност от 80.6%.
- ♥ Комбинацията между понижена експресия на miR-491 ($OR = 0.12$, $p = 0.01$), амплификация на *EGFR* ($OR = 5.19$, $p = 0.02$) и делеция на *PTEN* ($OR = 0.15$, $p = 0.089$) разграничава ВСГ от НСГ с точност от 81.9% (фиг. 4.32).



Фигура 4.32. Графика на предиктивните коефициенти (B) за всеки предиктор и 95% доверителния интервал. Делецията на *PTEN* повишава вероятността за ВСГ ($B = -1.9$, $p = 0.089$), понижената експресия на *miR-491* ($OR = -2.1$, $p = 0.01$) и амплификацията на *EGFR* повишават вероятността за ВСГ ($OR = 1.6$, $p = 0.02$).

- ♥ Комбинацията между статус на *IDH1* ($OR = 0.216$, $p = 0.057$), понижена експресия на *miR-491* ($OR = 0.12$, $p = 0.01$), амплификация на *EGFR* ($OR = 5.19$, $p = 0.02$) и делеция на *PTEN* ($OR = 0.15$, $p = 0.089$) диференцира ВСГ от НСГ с точност от 86.1%.

ROC анализът показва, че комбинацията от ниски нива на *miR-491*, амплификация на *EGFR*, делеция на *PTEN* и див тип *IDH1*, е статистически значима в диагностично отношение за разграничаване на ВСГ от НСГ с $AUC = 0.787$ ($p = 2.17E-4$, 95% CI 0.648-0.927) (фиг. 4.33).



Фигура 4.33. Анализ на ROC кривите и AUC на комбинацията от *miR-491*, *EGFR*, *PTEN* и *IDH1*, при сравняване между ВСГ и НСГ $AUC = 0.787$ ($p = 2.17E-4$, 95% CI 0.648-0.927).

4.3.10. Провеждане на регресионни модели на Кокс

С цел да проучим дали има връзка между определени предиктори и преживяемостта на пациентите, както и да определим силата и посоката на връзката при значимите предиктори, проведохме поредица от еднофакторни и многофакторни регресионни модели на Кокс. Вероятността за колинеарност между променливите беше изключена, тъй като в изследваната извадка не откриваме данни за променливи с висока корелация (>0.7).

♥ Еднофакторен регресионен модел на Кокс:

- по-високата експресия на *miR-491* и *miR-7* е значително свързана с по-дълга преживяемост ($HR = 0.811$, 95%CI = 0.685 - 0.961, $p = 0.0154$) и ($HR = 0.833$, 95% CI = 0.719 - 0.965, $p = 0.0149$). Увеличение с 1 единица в експресията на *miR-491*

или miR-7 намалява риска от смърт съответно с 18.9% или с 16.7%, докато намаление с 1 единица увеличава риска съответно с 23.3% или 20.1%.

- С нарастване на възрастта се увеличава рискът от смърт, като с всяка една година рискът се повишава с 3.7% (HR = 1.037 p = 0.0362).
- Амплификацията в *EGFR* е свързана с увеличен риск от смърт (HR = 2.196, 95% CI = 1.25 - 3.86, p=0.00615). Пациенти с амплификация в *EGFR* имат около 2.2 пъти по – висок риск от смърт в сравнение с пациенти с нормален ген.
- Нормалният статус на *CDKN2A* гена има протективен ефект и е свързан с по-нисък риск от смърт (HR = 0.528, 95% CI = 0.30-0.929, p=0.027), докато наличието на делеция на *CDKN2A* гена увеличава риска от смърт.
- Амплификацията на *PDGFRA* показва връзка с увеличен риск от смърт (HR = 2.179, 95% CI =1.03 - 4.6, p=0.041).
- Наличието на мутация в *IDH1* има протективен ефект и се свързва с намален риск от смърт (HR = 0.443, 95% CI =0.21-0.942, p=0.035) в нашата извадка.

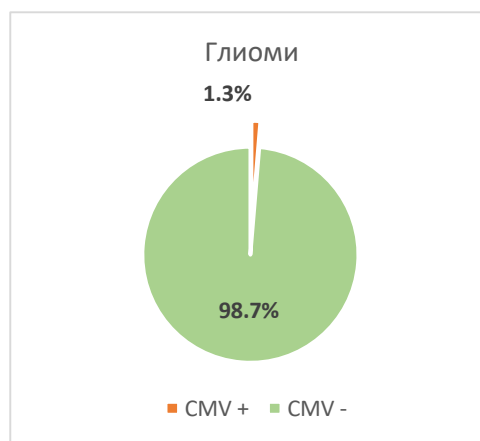
♥ Многофакторен регресионен модел на Кокс

Комбинирането на различни променливи в многофакторен модел на Кокс показва, че комбинацията от делецията на *CDKN2A* (HR = 0.57, p<0.05), *PTEN* (HR = 0.312, p<0.05), възрастта (HR = 1.077, p<0.001), див тип *IDH1* (HR = 0.277) са силно значими предиктори за по-кратка OS. Индексът на съответствие (C-index) беше 0.768, което предполага добра дискриминационна сила и означава, че моделът предлага точност на прогнозата от 76.8% според статуса на включените показатели.

Проведеният многофакторен модел на Кокс по отношение на предикторите на PFS показва, че комбинацията от *EGFR* (HR = 4.071, p = 0.004), *PTEN* (HR = 0.320; p = 0.027), *PDGFRA* (HR = 4.246, p = 0.019) и наличието на артериална хипертония (АН) (HR = 3.144, p = 0.019) са силно значими предиктори за по-кратък PFS. Данните показват, че пръсъствието на амплификация на *EGFR* и *PDGFRA* се свързват с четири пъти по-висок риск от прогресия. Наличието на артериална хипертония при пациентите също е свързана с 3 пъти по-висок риск от прогресия, докато нормалният статус на *PTEN* намалява риска от прогресия с 68%.

4.4. Резултати от ДНК анализа на ЦМВ

В изследваната пациентска извадка, откриваме ЦМВ инфекция само при един пациент (1.3%) на 59 г. от мъжки пол, постъпил за повторна операция поради вторично рецидивирал глиобластом (фиг. 4.34).



Фигура 4.34. Честота на ЦМВ (CMV) сред изследваната популация пациенти с глиоми

4.5. Анализ на гена онтология (ГО)

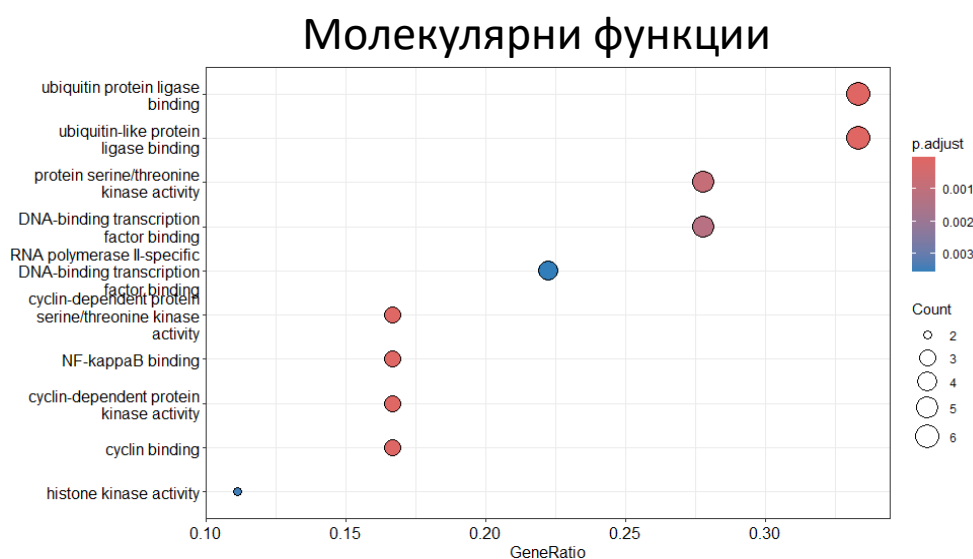
Анализът идентифицира значимите функции, свързани с най-честите и експериментално потвърдени таргетни гени на селектираните микроРНКи (табл. 4.7), както и изследваните гени за CNVs, с цел по-задълбочено разбиране на ролята им в клетъчните процеси.

Таблица 4.7. Част от валидираните таргети на изследваните микроРНКи

микроРНК	Таргетни гени
miR-21	PTEN, PDCD4, RPS7, RECK, BCL2, RRASGRP, CDC25A
miR-7	EGFR, CALM3, RELA, PAK1, KLF4, RAF1, PIK3CD, IGR1R
miR-10b	HOXD10, PTEN, CDKN2A, TP53, NF1, BCL2, H3F3C/B
miR-491	EGFR, BCL2L12, CDK1, TMEM48, MMP9, TP53, SMAD3
miR-34a	CDK4/6, PDGFRA, MDM4, SIRT1, MYC, NOTCH

За да разберем различните биологични функции на гените с CNVs и таргетните гени на изследваните микроРНК, анализирахме ГО термини. Селектирани са 10 от най-важните функции, съответно с най-ниска стойност на p , при праг на $p < 0.05$. Съотношението на гените (gene ratio) показва каква част от селектираните гени са свързани с всяка молекулярна функция, биологичен процес или клетъчен компонент.

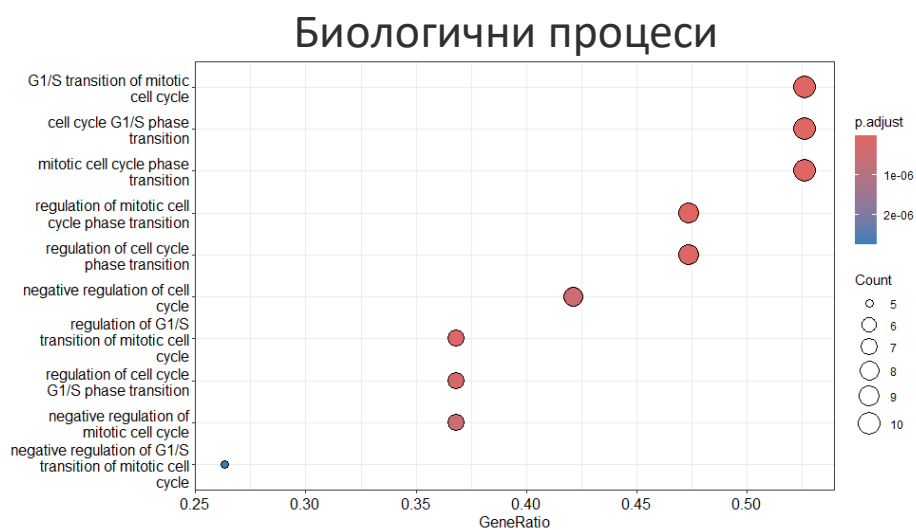
Анализът показва, че статистически значими молекулярни функции, в които участват таргетните гени (фиг. 4.35), включват свързване с убиквитин лигаза, регулация на активността на серин/треонин киназите, свързване на транскрипционни фактори към ДНК, свързване на РНК полимера II – специфични транскрипционни фактори към ДНК, регулиране на киназна активност на циклин-зависими протеини, свързване на NF- κ B и др.



Фигура 4.35. ГО анализ и точкова диаграма (dot plots) за визуализиране обогатяването на молекулярните функции на селектираните гени. По-високото генно съотношение показва, че по-голяма част от нашите гени участват в определена функция (напр. генно съотношение от 0,28 за функцията „киназна активност на серин/треонин протеините“ показва, че 28% от гените в нашия анализ участват в тази дейност. Оста х

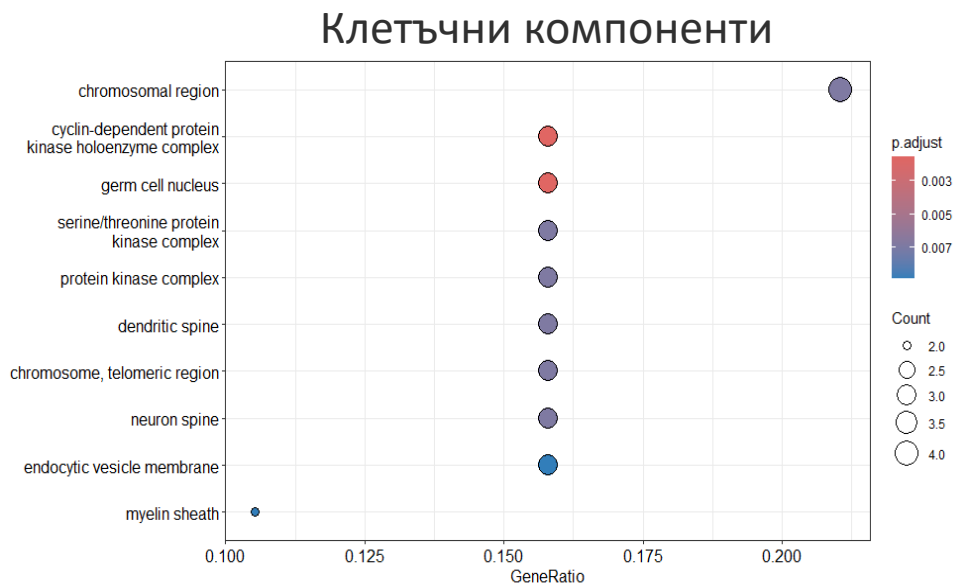
(gene ratio) представлява резултат от обогатяване (enrichment) на всеки анализиран таргет (десетичен логаритъм на коригираната р стойност), докато оста у изброява съответните идентифицирани функции.

Анализът показва, че биологичните процеси, в които участват таргетните гени включват основно регулация на G1/S прехода от клетъчния цикъл (фиг. 4.36).



Фигура 4.36. ГО анализ на биологичните процеси, в които участват таргетните гени.

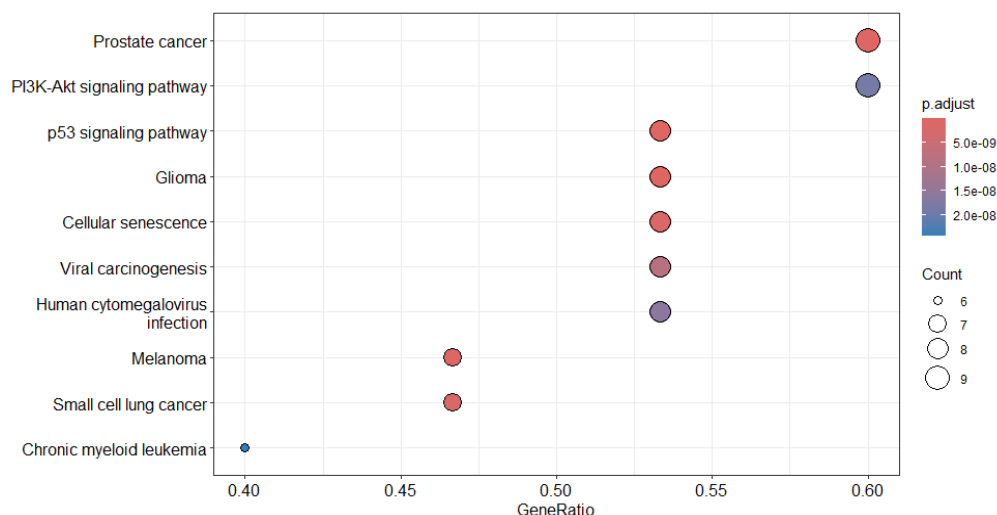
Клетъчните компоненти, свързани с таргетните гени включват хромозомните и теломеразните региони, циклин-зависим протеинкиназен комплекс, ядрата на гаметите, серин/треонин протеинкиназен комплекс, контактите между дендритите, невроните и миелиновата покривка (фиг.4.37).



Фигура 4.37. ГО анализ на клетъчните компоненти, в които участват таргетните гени.

Анализът на KEGG показва, че биологичните пътища и заболяванията, които са значимо асоциирани с нашия сет от гени включва PI3K-Akt сигналният път, p53 пътя, клетъчно стареене, вирусна карциногенеза, простатен карцином, **глиоми**, инфекция с **ЦМВ**, меланом, дребноклетъчен белодробен карцином, хронична миелоидна левкемия (фиг.4.38).

KEGG анализ



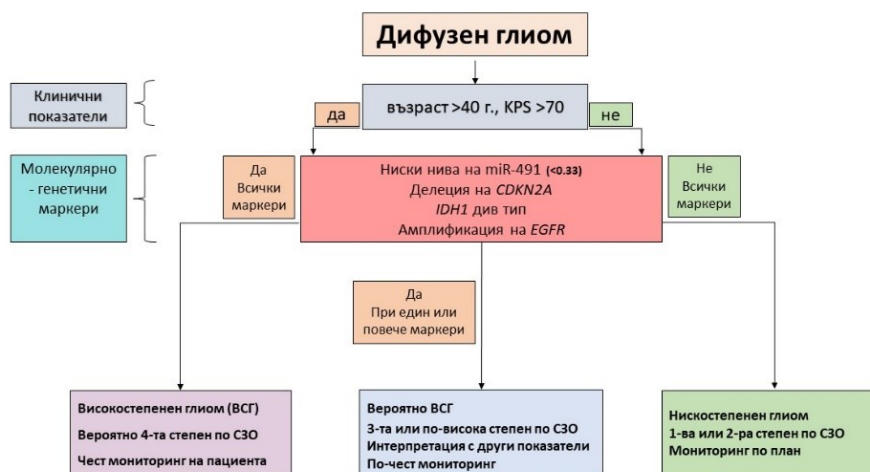
Фигура 4.38. KEGG анализ на асоцираните биологични пътища и заболявания със селектираните гени.

Резултатите от проведените ГО и KEGG анализи показват кои биологични функции или пътища са най-важни за селектирания от нас набор от гени и как те могат да бъдат свързани с конкретни заболявания или фенотипове, с цел по-задълбочен анализ и интерпретацията на резултатите.

4.6. Диагностичен и прогностичен алгоритъм

4.6.1. Диагностичен алгоритъм

Получените резултати от описаните по-горе анализи по отношение на биомаркерите с диагностичен потенциал подчертават значението на интегрирането на ниските нива на miR-491, амплификацията на *EGFR*, делецията на *PTEN* и статуса на *IDH1*. Предложеният от нас алгоритъм за диагностика е показан на фигура 4.39.



Фигура 4.39. Диагностичен алгоритъм при използване на комбинация от диагностични предиктори, включващ клиничните маркери – възраст >40 г. и KPS >70, и молекулярно-генетичните маркери - статус на *IDH1*, понижена експресия на miR-491, амплификация на *EGFR* и делеция на *PTEN* от дифузен глиом ВСГ от НСГ с точност от 86.1%.

4.6.2. Прогностичен алгоритъм

Данните от предложения прогностичен алгоритъм са интегрирани с препоръките на петото издание (CNS5) на класификацията на СЗО от 2021 г. (фиг. 4.40).



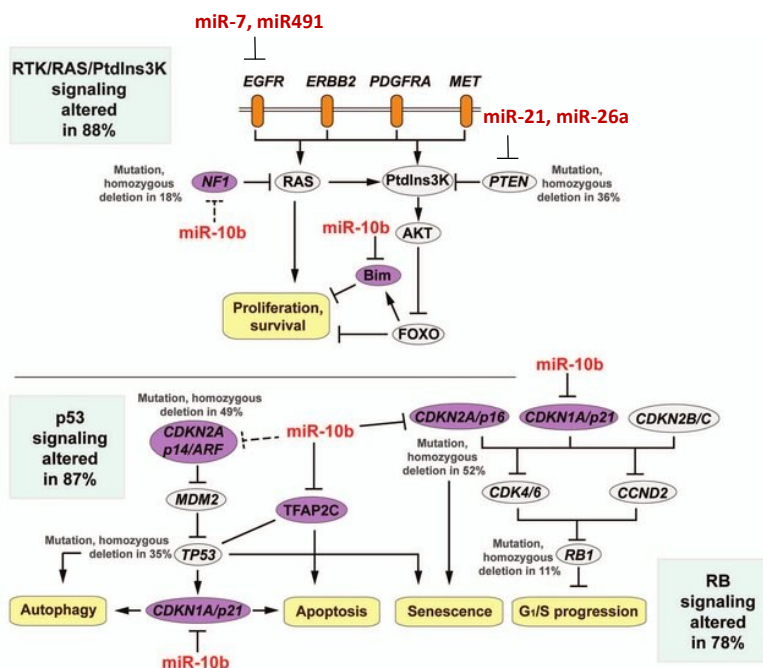
Фигура 4.40. Прогностичен алгоритъм, комбиниращ диагностичните маркери от CNS5 и получените от нас данни за прогнозиране на преживяемостта на пациентите.

Предложеният алгоритъм (survival decision tree) показва, че нивата на miR-491, заедно с възрастта и IDH статуса (според CNS5) могат да служат като първични маркери за стратификация на пациентите. Другите диагностични и прогностични предиктори включват делеции на туморсупресорите *CDKN2A* и *PTEN*, както и амплификация на *EGFR*. Натрупването на допълнителни CNVs, свързани с по-висока геномна нестабилност, както и нивата на показаните микроРНКи, са допълнителни прогностични фактори за преживяемостта на пациентите.

5. ОБСЪЖДАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ И ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящия дисертационен труд проведехме интегриран анализ, включващ експресионно профилиране на селектиран набор от микроРНК (miR-7, miR-10b, miR-21, miR-34a и miR-491), анализ на измененията в броя копия (CNVs) на ключови онкогени и туморсупресорни гени, свързани с глиомагенезата, както и изследване на цитомегаловирусна (ЦМВ) активна инфекция при български пациенти с глиоми.

Нашите резултати показаха, че всички изследвани микроРНК са дерегулирани при глиоми в сравнение с контролни проби, като **miR-7**, **miR-21**, **miR-491** и **miR-10b** демонстрират най-добър диагностичен потенциал. Важно е да се отбележи, че наблюдавахме значително **понижена експресия на miR-491** при ВСГ спрямо НСГ ($p = 3.9E-4$), което подчертава градиращия биомаркерен потенциал на тази микроРНК. Селектираният микроРНК профил показва асоциация с показатели като обща преживяемост (OS) и преживяемост без прогресия (PFS), което показва и прогностичната му стойност. Повишената експресия на онкогенните miR-21 и miR-10b, както и намалените нива на туморсупресорните miR-7 и miR-491, играят ключова роля за активирането на PI3K/Akt/mTOR и Raf/MEK/ERK сигналните пътища, свързани с клетъчна пролиферация, миграция, васкуларизация и супресия на апоптозата (фиг.5.1). Наблюдавахме повишена експресия на miR-10b само в туморните проби и липса на експресия при контролите и някои НСГ, което индикира ролята ѝ като специфичен невро-онкологичен биомаркер и терапевтичен таргет. В тази връзка, бъдещи изследвания, насочени към инхибирането на селектирания от нас микроРНК профил, могат да доведат до разработване на нови терапевтични подходи за лечение на пациенти с глиоми.



Фигура 5.1. Връзка между микроРНКите и ключови гени, участващи в трите основни сигнални пътя, засегнати при глиоми (Gabriely *et al.*, 2011, *Cancer res.*).

Сред най-често срещаните CNVs в изследваната извадка от пациенти идентифицирахме делеция на *CDKN2A* (54.2%), амплификация на *EGFR* (51.4%) и делеция на *PTEN* (30.6%), последвани от делеция на *TP53*, амплификация на *PDGFRA* и

MIR26A2. Комбинацията от амплификация на *EGFR* и делеции на *CDKN2A*, и *PTEN* е свързана със значително **по-кратка OS** ($p=0.0036$) в сравнение с останалите CNVs профили или пациенти с липса на CNVs. Гените с променен брой копия основно засягат RAS/RAF/MAPK и PI3K/AKT/mTOR сигналните каскади (фиг. 5.1). Изследваните CNVs не само имат диагностична стойност, но и прогностична, като корелират с лоша прогноза и терапевтична резистентност. Терапии, насочени срещу различни CNVs, засегнати при дифузните глиоми, са в процес на активна разработка, като за съжаление до момента някои от монотерапиите (*EGFR*, *EGFRvIII*) не показват задоволителен клиничен отговор. Разработването на комбинирани терапии, насочени към множество прицелни гени, представлява обещаващ подход за лечение на глиоми.

В изследваната извадка честотата на мутациите в *IDH1* и *IDH2* гените е 19.74%, което е благоприятен маркер, свързано с по-добра прогноза. Въпреки че *IDH1* не показва диагностичен потенциал, като индивидуален маркер, за разграничаване на ВСГ от НСГ ($p = 0.413$), пациентите с мутация в *IDH1* показваха по-дълга преживяемост ($p=0.026$) и намален риск от смърт с 56% ($HR= 0.443$) в сравнение с тези без мутация в *IDH1*.

Важно наблюдение е откриването на генетични промени, близки до туморните, в макроскопски „нормално“ изглеждащи съседни мозъчни тъкани (на около 2 см). Вероятно тези резултати се дължат на попадане в перитуморната мозъчна зона (PBZ), за която е характерна инфилтрация от туморни клетки, ранни генетични и епигенетични промени, откривани в радиус от около 6 мм до 3 см от туморния ръб. Поради това за контролна тъкан е добре да се използва материал, взет извън тази зона, т.е. на повече от 3 см от туморния ръб, за да се минимизират шансовете за молекулярни изменения и да се гарантира валидността на резултатите.

В нашето изследване активна ЦМВ инфекция бе открита само при един пациент с рецидивирал глиобластом. Поради ниската честота на детекция на ЦМВ ДНК в изследваната популация от български пациенти с глиоми, не се откри статистически значима връзка с клинично-патологичните характеристики, нивата на микроРНКите и гените с CNVs. От друга страна, при KEGG анализа откриваме, че вирусната карциногенеза и ЦМВ инфекция са статистически значимо асоциирани с изследваните от нас таргети на селектираните микроРНКи и CNVs. Тези наблюдения съответстват на докладваните резултати от анти-ЦМВ терапевтични проучвания при пациенти с глиоми. За по-прецизна оценка на тези наблюдения са планирани бъдещи проучвания на събраните проби в по-голяма извадка и алтернативни транскриптомни и/или протеомни методи, с цел валидиране на наблюдаваните резултати, както и за задълбочаване на познанията ни относно ролята на ЦМВ при глиалните тумори.

В изследваната представителна кохорта, 5-годишната преживяемост на българските пациентите с диагноза глиобластом е изключително ниска - 3.9%. В тази връзка вярваме, че прилагането на мултидисциплинарен подход и интегрирани стратегии ще доведе до по-прецизна диагностика и стратификация на глиомите. Въз основа на получените данни предложихме диагностичен модел, включващ амплификация на *EGFR*, делеция на *PTEN*, див тип *IDH1* и ниски нива на *miR-491*, който разграничава ВСГ от НСГ с точност **86.1%**. Прогностичният ни модел за преживяемост, базиран на делеция на *PTEN* и *CDKN2A*, напредналата възраст и нормален статус на *IDH1*, свързани с **по-кратка OS**, демонстрира точност от 76.8% (C-индекс = 0.768). Допълнително, амплификацията на *PDGFRA* и *EGFR*, делецията на *PTEN* и анамнеза за **артериална хипертония** са предиктори за по-кратък PFS.

До началото на 2025 г. одобрените от Администрацията по храните и лекарствата (FDA) терапии за глиоми включват Темозоломид, Кармустин, Ломустин, Бевацизумаб, TTF (tumour-treating fields) за пациенти с ВСГ, Ворасидениб (НСГ с *IDH* мутация), Товорафениб и Дабрафениб с Траметиниб за педиатрични пациенти със засягане на

BRAF. През последните две години, подобно на други онкологични заболявания, FDA одобрява все повече медикаменти за таргетно лечение и при глиомите, насочени към различни генетични изменения, включително *CNV*. В момента множество таргетни молекули са в процес на оценка за регулаторно одобрение или се намират в различни фази на клинични изпитвания, което показва важната роля на биомаркерните изследвания и персонализираната медицина в невроонкологията.

Нашите резултати подчертават значението на дерегулираните микроРНК и подкрепят използването на комбинирани молекулярни и клинични предиктори за по-прецизна диагностика и прогнозиране. В бъдеще интегрирането на нашите модели с AI-базиран радиомични подходи би могло допълнително да подобри диагностичната и прогностичната точност, отваряйки нови перспективи за персонализирана медицина при пациенти с дифузни глиоми.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Мозъчните тумори са мултифакторни заболявания, при които напредъкът в диагностиката и контрола на рецидивите остава ограничен, особено при ВСГ. Въвеждането на персонализиран подход за диагностика и мониторинг би могло значително да подобри прогнозата на пациентите и да оптимизира терапевтичните стратегии. Получените резултати предлагат комбинация от биомаркери с диагностична и прогностична стойност, които в предложените алгоритми показват подобрена дискриминационна точност и по-прецизна стратификация спрямо предходни модели. Селектираните биомаркери могат да допълнят конвенционалните методи за диагностика и стратификация, особено в случаи с гранична или подценена диагноза.

Вярваме, че данните от настоящия дисертационен труд имат реално клинично приложение и могат да послужат като основа за бъдещи таргетни терапии при глиомите. Прецизната и достъпна диагностика, комбинирана с молекулярно насочени терапевтични стратегии, е ключът към подобряване на качеството на живот на пациентите с това изключително тежко заболяване.

6. ИЗВОДИ

1. Всички изследвани микроРНК са с нарушена експресия при глиоми в сравнение с контролите, като miR-7, miR-21, miR-491, miR-10b демонстрират най-добра способност за разграничаване на ВСГ или НСГ от контроли.
2. miR-491, miR-7 и miR-34a притежават диагностичен биомаркерен потенциал за разграничаване между ВСГ от НСГ.
3. miR-7, miR-491, miR-21 и miR-10b притежават прогностичен биомаркерен потенциал по отношение на общата преживяемост (OS), докато miR-10b, miR-21 и miR-491 притежават прогностичен биомаркерен потенциал по отношение на преживяемостта без прогресия (PFS).
4. Изследваните глиоми на български пациенти са най-често засегнати от CNVs, включващи делеция на *CDKN2A*, амплификация на *EGFR* и делеция на *PTEN*.
5. ЦМВ инфекцията не играе водеща роля като онкогенен фактор в глиомагенезата и прогресията на заболяването.
6. Комбинацията от ниски нива на miR-491, амплификация на *EGFR*, делеция на *PTEN* и див тип *IDH1* има диагностичен потенциал за разграничаване между ВСГ и НСГ с точност 86.1%.
7. Комбинацията от делеция на *CDKN2A* и *PTEN*, напредналата възраст и див тип *IDH1* има прогностична роля и е значимо свързана с по-кратка OS
8. Комбинацията от амплификация на *EGFR* и *PDGFRA*, наличието на артериална хипертония и делеция на *PTEN*, показва връзка с по-кратки периоди на PFS.
9. Предложихме диагностични и прогностични алгоритми с цел подпомагане на стратифицирането и проследяването на пациентите.
10. Когато се използва за контрола близко разположена, „нормално“ изглеждаща мозъчна тъкан трябва да се подхожда с особено внимание.
11. Получените данни освен като адювантни биомаркери в клиничната практика могат да послужат и като основа за бъдещи таргетни терапии при пациенти с глиоми.

7. ПРИНОСИ

7.1. Научно-теоретични

1. За първи път българските пациенти с глиоми бяха анализирани с интегративен подход, комбиниращ експресионен анализ на микроРНКи, анализ на CNVs и ЦМВ инфекциозен статус, като получените резултати биха повишили прецизността на класификацията и стратификацията на глиомите.
2. За първи път в световната литература беше докладван градиращият биомаркерен потенциал на miR-491 за разграничаване между ВСГ и НСГ. miR-491 показва висока чувствителност и специфичност от *IDH1* в изследваната кохорта от български пациенти.
3. За първи път сред български пациенти с глиоми се докладва диагностично и прогностично - специфичен микроРНКов профил (miR-7, miR-10b, miR-21 и miR-491).
4. С наблюдаваните молекулярни промени при съседна на тумора мозъчна тъкан, подчертаваме, че „нормалната“ контрола е препоръчително да се вземе извън перитуморната мозъчна зона (по възможност над 3 см), за да се избегне влиянието на генетични и епигенетични промени, които могат да компрометират резултатите.

7.2. Научно-приложни

1. Предложихме диагностичен и прогностичен алгоритъм за класификация, комбиниращ генетични и епигенетични данни, който може да доведе до персонализиран подход за мониторинг и лечение.
2. Създадохме тъканна банка от над 90 туморни проби от пациенти с различни степени глиоми, както и банки с изолирани от пробите ДНКи и РНКи, които биха били изключително ценни при последващи изследвания.
3. Селектираните профили от генетични и транскриптомни маркери позволява лесна клинична имплементация поради рестриктивния набор от таргети.

8. ПУБЛИКАЦИИ, УЧАСТИЯ, НАУЧНИ ПРОЕКТИ И НАГРАДИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИЯТА

8.1. ПУБЛИКАЦИИ

1. **Nikolova E, et al.** miRNAs and related genetic biomarkers according to the WHO glioma classification: From diagnosis to future therapeutic targets. *Noncoding RNA Res.* 2023;9(1):141-152. **IF - 5.9.**

Забелязани цитирания: 14

2. **Nikolova, E., Georgiev, C., et al.** Diagnostic, grading and prognostic role of a restricted miRNAs signature in primary and metastatic brain tumours. Discussion on their therapeutic perspectives. *Mol Genet Genomics.* 2022; 297(2), 357–371. **IF - 3.1.**

Забелязани цитирания: 5

3. **Nikolova E, Dimova P, Minkin K, Todorov T, Mitev V, Todorova A.** Human cytomegalovirus DNA detection in a recurrent glioblastoma multiforme tumour, but not in whole blood: a case report and discussion about the HCMV latency and therapy perspectives. *J Neurovirol.* 2020 Dec;26(6):984-987. **IF – 2.643.**

Забелязани цитирания: 1

ОБЩ ИМПАКТ ФАКТОР: 11.643

ОБЩО ЦИТИРАНИЯ: 20

8.2. УЧАСТИЯ В НАУЧНИ КОНГРЕСИ И СЕМИНАРИ

1. **Nikolova E, et al.** CNVs in critical cell-signalling genes with potential targeted therapeutic application. *Molecular Analysis for Personalised Therapy Congress, 2019.UK. Annals of Oncology, 30, 7, vii33.*
2. **Nikolova E, et al.** Prevalence of human cytomegalovirus infection among Bulgarian patients with brain tumours, *EUROPEAN HUMAN GENETICS CONFERENCE, 2019, Sweden*
3. **Nikolova E, et al.** Role of miRNAs in Glioblastoma multiforme, *IIIrd PhD symposium, Molecular biology – From molecule to cell and back, IMB, BAS, 2019, Sofia, Bulgaria*
4. **Nikolova E, et al.** HCMV infection and genetic aberrations in tumour suppressor genes and oncogenes among Bulgarian patients with Glioblastoma multiforme, *ESMO Preceptorship on Brain Tumours, 2018, Athens, Greece*
5. **Nikolova E, et al.** Molecular alterations in Bulgarian patients with Glioblastoma multiforme, *EUROPEAN HUMAN GENETICS CONFERENCE 2018, Milan, Italy*
6. **Nikolova E, et al.** Implementation of next generation sequencing (NGS) for analyzing deregulated microRNAs in neuro-oncology, *Workshop “Next generation diagnostics”, 2018, Skopje, FYR Macedonia*
7. **Nikolova E, et al.** Molecular diagnostic approach in neuro-oncology. *12th Balkan Congress of Human Genetics, 2017, Plovdiv, Bulgaria*

8.3. УЧАСТИЯ В ПРОЕКТИ

1. Водещ изследовател-Договор №Д-118/2018, Млад Изследовател‘ 2018, МУ-София
„Оптимизиране на молекулярно-генетични методи за идентификация на специфични микроРНКи в невро-онкологията и оценка ролята на вирусната компонента“
2. Водещ изследовател - Договор № Д-127/2019, Млад Изследовател‘ 2019, МУ-София
„Мултидисциплинарен анализ при български пациенти с мозъчни тумори. Връзка между вирусни етиологични агенти, генетични и епигенетични фактори“

8.4. НАГРАДА

**НАЙ-УСПЕШНА НАУЧНА РАЗРАБОТКА В ОБЛАСТ МЕДИЦИНА -
КОНКУРС „МЛАД ИЗСЛЕДОВАТЕЛ-2019”, МУ-СОФИЯ**