

**Медицински Университет – София**

Медицински факултет

Катедра по Хирургия

**„Съвременни диагностични и терапевтични методи,  
подобряващи хирургичния онкологичен радикалитет  
при пациенти със стомашен карцином“**

**АВТОРЕФЕРАТ**

на

дисертационен труд за присъждане на образователна и

научна степен

„ДОКТОР“

Д-р Ангел Николаев Арабаджиев

**Научен ръководител:**

Доц. д-р Манол Бонев Соколов, дм, FEBC (EBSQ)



София

2022 г.



Дисертационният труд е написан на 222 стандартни машинописни страници и включва 49 фигури, 29 таблици и 402 цитирания – 396 на латиница и 6 на кирилица. Той е обсъден, приет и е насочен за защита от катедрения съвет на Катедрата по хирургия на Медицински университет – София.

Научно жури:

**Рецензенти:**

**Проф. д-р Виолета Димитрова Маринова, дмн** – Катедра по обща и оперативна хирургия на Медицински факултет при МУ – София, вътрешен член за МУ – София

**Проф. д-р Кирил Василев Драганов, дмн** – Аджибадем Сити Клиник УМБАЛ Токуда - София – външен член за МУ – София

**Членове:**

**Доц. д-р Свилен Иванов Маслянков, дм** – Катедра по хирургия на Медицински факултет при МУ – София, вътрешен член за МУ – София

**Доц. д-р Ивелин Руменов Такоров, дм** – Първа клиника по хирургия към

Военномедицинска Академия - София, външен член за МУ – София

**Доц. д-р Васил Иванов Михайлов, дм** – Клиника по чернодробно-панкреатична и трансплантационна хирургия към Военномедицинска Академия - София, външен член за МУ – София

Публичната защита ще се състои на 15.06.2022 г. от 13:30 ч. в аудитория „Проф. Д-р Янко Добрев“ на Клиниката по хирургия на УМБАЛ „Александровска“ ЕАД гр. София, на основание чл. 4 ал. 2 от Закона за развитието на академичния състав в Република България, чл. 2, ал. 2 от Правилника за прилагане на Закона за развитието на академичния състав в Република България, на чл. 5, ал. 2, във връзка с чл. 73, ал. 2 от Правилника за условията и реда за придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности в Медицински университет – София и въз основа на Заповед № РК 36-558/04.04.2022 г. на Ректора на МУ – София. Материалите по защитата са на разположение в Секретариата на Клиниката по хирургия на УМБАЛ „Александровска“ – София и са публикувани на интернет страницата на МУ – София.

**Забележка:** Номерата на таблиците и фигурите в автореферата не съответстват с тези в дисертационният труд.

**Използвани съкращения:**

**ИТМ** - индекс на телесна маса

**ИПП** - инхибитори на протонната помпа

**КС** - карцином на стомаха

**КАТ** - компютърно аксиална томография

**ЛВ** - лимфни възли

**НАХТ** - неoadювантна химиотерапия

**НЦЗИ** - национален център по здравна информация

**НРР** - национален раков регистър

**НГС** - назогастрална сонда

**ПБП** - преживяемост без прогресия

**СЛВ** - сентинелни лимфни възли

**СЗО** - световна здравна организация

**ХТ** – химиотерапия

**ЧОО** - честота на обективен отговор

**ЯМР** - ядрено – магнитен резонанс

**AGC** - advanced gastric cancer

**BMI** - индекс на телесно тегло

**СТ/СТ-scan** - компютърноаксиална томография

**DWIs** - дифузионно претеглено магнитно резонансно изображение

**EAC** - езофагеален аденокарцином

**EUS** - ендоскопска ултрасонография

**EGJ** - гастроезофагеална връзка

**ECF** - epirubicin, cisplatina, 5-Fu

**FNs** - флуоресцентни лимфни възли

**FI** - флуоресцентно изобразяване

**FDG** - 18 флуоро – 2 дезокси глюкоза

**IREE** - електронна ендоскопия с инфрачервени лъчи

**ICG** - индоцианиново зелено

**HRQL** - качество на живота свързано с болестта

**LG** - лапароскопска гастректомия

**LADG** - лапароскопски асистирана дистална гастректомия

**LWR** - лапароскопска клиновидна резекция

**MDCT** - мултидетекторна томография

**MAGIC** - Medical Research Council Adjuvant Gastric Infusional Chemotherapy

**MRI** - магнитно – резонансна томография

**NIR** - близка инфрачервена светлина

**OG** - отворена гастректомия

**PET/CT(ПЕТ-СТ)** - Позитронно-емисионна томография

**SGE** - ехо с променлив градиент

**SNR** - съотношение на шум със сигнал

**SN** - сентинелни лимфни възли

**SGE** - 3D образ със специфичен градиент

# Съдържание

1. Въведение .....	9
2. Цел, Работна хипотеза, Задачи .....	10
2.1 Цел .....	10
2.2 Работна хипотеза .....	10
2.3 Задачи .....	11
3. Материали и методи .....	12
3.1 Материали.....	12
3.2 Методи.....	13
3.2.1 Антропометричен метод.....	13
3.2.2 Диагностични методи.....	13
3.2.3 Генетичен метод.....	24
3.2.4 Статистически методи .....	27
4. Резултати .....	39
4.1 <b>ЗАДАЧА 1:</b> Да се проучат генетични мутации при пациенти с карцином на стомаха и да се определи значението им за резектабилността. ....	39
4.1.1 Резултати .....	39
4.1.2 Обсъждане .....	50
4.2 <b>ЗАДАЧА 2:</b> Да се проучи връзката на индивидуалните особености – пол, възраст и индекс на телесна маса на пациентите с карцином на стомаха с резектабилността му. ....	54
4.2.1 Резултати .....	54
4.2.2 Обсъждане .....	62
4.3 <b>ЗАДАЧА 3:</b> Да се установи има ли връзка между стойностите на някои основни маркери на възпалението – левкоцити, фибриноген и СУЕ с резектабилността на карцинома на стомаха. ....	64
4.3.1 Резултати .....	64
4.3.2 Обсъждане .....	66
4.4 <b>ЗАДАЧА 4:</b> Да се установи има ли връзка между стойностите на туморните маркери СЕА и СА 72-4 с резектабилността на карцинома на стомаха. ....	69
4.4.1 Резултати .....	69
4.4.2 Обсъждане .....	72
4.5 <b>ЗАДАЧА 5:</b> Да се оцени приложението на PET/CT в диагностиката и стадирането на карцинома на стомаха. ....	74
4.5.1 Резултати .....	74
.....	75
4.5.2 Обсъждане .....	78

4.6 <b>ЗАДАЧА 6:</b> Да се определи значението на лапароскопията за предоперативното стадиране и резектабилността на стомашния карцином. ....	81
4.6.1 Резултати .....	81
4.6.2 Обсъждане .....	83
4.7 <b>ЗАДАЧА 7:</b> Да се създаде предоперативен алгоритъм подобряващ хирургичния радикалитет при стомашния карцином. ....	86
5. Изводи .....	89
6. Приноси .....	90
6.1 Приноси с оригинален характер.....	90
6.2 Научно-теоретични.....	90
6.3 Научно – практически.....	91
6.4 Потвърдителни .....	91
7. Препоръки.....	91
8. Списък с научните публикации свързани с дисертационния труд.....	92
9. Списък на участията в научни форуми, свързани с темата на дисертационния труд .....	92

## 1. Въведение

Карциномът на стомаха заема пето място по честота и трето място по смъртност сред онкологичната патология в световен мащаб. Отличава се с висок малигнен потенциал – локално агресивен растеж и лимфогенно и хематогенно метастатизиране. Въпреки разработването на различни скринингови програми, появата на нови диагностични методи и оптимизиране на лечението, все още заболяването е с лоша прогноза и ниска преживяемост. 5-годишната преживяемост е ниска дори и при радикално оперираните, като варира от 85-95% за ранните стадии, до 15-20% за IIIA и IIIB стадий. 40% от пациентите пък са с нерезектабилен карцином в момента на диагностицирането. Тези стойности са подчертано по-лоши в България, където съществува тенденция за непълно предоперативно стадиране и извършване понякога на ненужни, диагностични лапаротимии. Ето защо, е необходимо подобряване на подхода към пациентите с карцином на стомаха, определяне на критерии за резектабилността на туморите и създаване на ясни алгоритми на поведение. През последните години проучванията в тази връзка непрекъснато се увеличават, като са насочени основно към установяване на генетични мутации, търсене на връзка между различни рискови фактори и значението им за диагностиката и лечението, определяне ролята на PET/CT и диагностичната лапароскопия, както и на неoadювантната химиотерапия, изучаване на различни детайли от хирургичното лечение с все по-значително навлизане на лапароскопския подход. Всичко това е застъпено в различна степен и в настоящия дисертационен труд.

## **2. Цел, Работна хипотеза, Задачи**

### **2.1 Цел**

Да се оцени значението на нови диагностични и терапевтични методи за подобряване на хирургичния радикалитет на стомашния карцином.

### **2.2 Работна хипотеза**

Увеличава ли се възможността за хирургична радикалност при пациенти със стомашен карцином, чрез прилагане на съвременни диагностични и терапевтични методи, оптимизиращи предоперативното стадиране?

### 2.3 Задачи

Задача 1: Да се проучат генетични мутации при пациенти с карцином на стомаха и да се определи значението им за резектабилността.

Задача 2: Да се проучи връзката на индивидуалните особености – пол, възраст и индекс на телесна маса на пациентите с карцином на стомаха с резектабилността му в изследваната кохорта.

Задача 3: Да се установи има ли връзка между стойностите на някои основните маркери на възпалението – левкоцити, фибриноген и СУЕ с резектабилността на карцинома на стомаха.

Задача 4: Да се установи има ли връзка между стойностите на туморните маркери СЕА и СА 72-4 с резектабилността на карцинома на стомаха.

Задача 5: Да се оцени приложението на PET/CT в диагностиката и стадирането на карцинома на стомаха.

Задача 6: Да се определи значението на лапароскопията за предоперативното стадиране и възможността за постигане на онкологична радикалност при хирургичното лечение на стомашния карцином.

Задача 7: Да се създаде предоперативен алгоритъм подобряващ хирургичния радикалитет на стомашния карцином.

### 3. Материали и методи

#### 3.1 Материали

Настоящият дисертационен труд анализира общо 209 пациенти с хистологично доказан карцином на стомаха. От тях 131 (62,7%) са от мъжки пол, а 78 (37,3%) са от женски. Средната възраст на всички изследвани пациенти е 63,9г., като най – младия пациент е на 33г., а най – възрастния на 86г. Ретроспективен анализ е направен на 141 пациенти преминали през Клиниката по хирургия на УМБАЛ “Александровска” – София за периода 2005-2013 г. Шестдесет и осем пациенти са проследени проспективно през време на подготвяне на дисертационния труд (2014 – 2020 г.) като 64 от тях са преминали през клиниката по хирургия на УМБАЛ „ Александровска“, както и 4 пациента, оперирани в клиниката по хирургия на Университетска болница Saint Pierre – Брюксел за периода от януари 2018 до януари 2019г. Всички пациенти са разделени на две групи в зависимост от резектабилността на тумора. За нерезектабилни тумори се приемаха тези, при които не е възможно осъществяването на радикална хирургична интервенция, включваща отстраняването на целия тумор без макроскопски видима остатъчна малигнена тъкан в ложето, лимфните възли и/или далечни локализации, без наличие на макроскопски и микроскопски негативни резекционни линии, както и тези с наличие на метастази в черния дроб или белия дроб, карциноза на перитонеума, метастази в ретроперитонеалните лимфни възли и наличие на малигнени клетки в цитологичното изследване на перитонеален лаваж.

При 27 от пациентите се направи генетичен анализ за най – честите соматични мутации в панел от 16 гена. При пациентите бяха взимани предоперативни кръвни изследвания за пълна кръвна картина и туморни

маркери. Извършвахме антропометрични измервания на ръста и теглото, като изчислявахме ИТМ при 57 от тях. Стадирането на пациентите е извършено с помощта на адбминална ултрасонография (при 100% от изследваната кохорта), СТ-scan (при 72%) и PET-CT(47,8%).

## 3.2 Методи

### 3.2.1 Антропометричен метод

Измерването на ръста се осъществяваше с ръстомер градуиран в см, а на теглото с везна с неавтоматично действие с мерителна единица килограм. Изчисляваше се индексът на телесна маса (ИТМ) според формулата на Quetlet

$$\text{ИТМ} = \text{тегло(кг)} / \text{ръст (м)}^2$$

### 3.2.2 Диагностични методи

#### 3.2.2.1 Лабораторен метод

На всички пациенти предоперативно, взимахме венозна кръв при приемането в клиниката по хирургия, за изследване на основните маркери на възпалението – левкоцити (3,5-10,5 G/l), фибриноген (от 18 до 65г. <7,1mmol/l, а над 65г. <8,2mmol/l) и СУЕ с референтни стойности за мъже 1-15mm/h и за жени 1-20mm/h.

### 3.2.2.2 Цитологичен метод

Перитонеалния лаваж се центрофугираше, подготвяше и след анализ се оценяше по Papanicolaou classification. (Табл. 1)

Групи по Pap	Описание
Pap 1	Нормални клетки
Pap 2	Атипични клетки, без белези на малигненост (с възпалителни промени)
Pap 3	Атипични клетки, съмнителни за малигненост, без тя да е очевидна
Pap 4	Атипични клетки, силно внушаващи за малигненост
Pap 5	Атипични клетки, със сигурни морфологични данни за малигненост

Таблица 1. Papanicolaou classification

### 3.2.2.3 Хистологичен метод

От всеки изследван пациент с карцином на стомаха, следоперативно се изследва туморната тъкан в целия и обем и определяне на хистологичния вариант, диференциацията на тумора и типа по Лаурен, здравия стомашен остатък, проксималната и дисталната резекционна линия и изолираните лимфни възли, които бяха изпращани на патолози за изготвяне на траен хистологичен препарат.

### 3.2.2.4 Апаратно- инструментални методи

#### 3.2.2.4.1 Фиброгастроскопия

При всички пациенти диагнозата е поставена след извършване на стандартна фиброгастроскопия, определяща наличието на тумор и локализацията му. В хода на изследването са взимани от 4 до 7 биопсии от различни места на тумора за хистологична верификация.

#### 3.2.2.4.2 Ехография на коремни органи

Ултразвукът е много широко приложим метод за диагностициране на различни заболявания. При всички пациенти използвахме ехограф - General Electric с трансдюсер 3,5MHz, чрез него, ние оглеждаме коремните органи в реално време. Отчитахме морфологичната структура на черния дроб и наличието или не на вторични метастатични лезии, както и наличието на свободна течност - асцит. Лимфните възли обикновено не са видими, но при напреднал туморен процес могат да се открият пакети около големите кръвоносни съдове.

#### 3.2.2.4.3 Рентгенография на бял дроб

В настоящия дисертационен труд, всички пациенти предоперативно бяха стадирани с рентгенография на бял дроб за оценка на пулмонарния статус – наличие или не на вторични метастатични лезии, инфилтрация към диафрагмата, плеврални изливи и др.

#### 3.2.2.4.4 Компютърно- аксиална томография на корем с контраст

Подготовка на пациента за изследването:

На всеки пациент бе взимано информирано съгласие. Ако пациента е алергичен следва тестване и консултация с алерголог. Изследвахме бъбречната функция  $K^+$ , креатинин и урея с цел използване на контрастно вещество, в деня на изследването.

Протокол за изследване на пациента:

На първо място, подготовката започва с изпразване на стомаха, като пациентите не приемат нищо през устата в продължение на 5 часа преди изследването.

Изследването с компютърна томография извършвахме с интравенозно инжектиране на йодиран контрастен материал, което е задължително за разграничаване на патологичната тъкан от нормалната лигавица и за получаване на полезна информация за локорегионалния туморен и лимфен статус. Обикновено се инжектира количество от 100-150 ml (средно от 1,5 ml / kg телесно тегло) при скорост 3-4 ml / sec.

Оптимизирането на инфузията на интравенозния контрастен агент е от съществено значение спрямо времетраенето на сканиране при компютърната аксиална томография на корем с висока разделителна способност. Въпреки че порталната венозна фаза, извършена на 60-70 секунди от интравенозното инжектиране, обикновено е достатъчна за правилно изследване на стомашните стени, допълнителна артериална фаза, проведена на 30-35 секунди от интравенозната инфузия, е полезна за стадиране на стомашни първични лезии и за по-добра оценка на границата между туморната и нормалната стомашна тъкан (Т). Обикновено

артериалната фаза се извършва за горната част на корема, докато порталната венозна фаза включва сканиране на гръден кош, корем и малък таз, за пълно стадиране в частност (N) и (M) стадий.

Всъщност болус проследяването и автоматизираните технологии обикновено се използват, за да се получи правилна двуфазна техника, базирана на характеристиките на пациента.

С цел предизвикване хипотония/хипомотилитет на стомашната стена и червата се прилага интрамускулно или интравенозно 20mg butylscopolmanine bromide преди скенеграфското изследване.

#### 3.2.2.4.5 Ядрено-магнитен резонанс на корем с контраст

Подготовка на пациентите.

Всеки един от пациентите, които попадат в изследваната група преминаваше през няколко задължителни етапа предхождащи преценката за извършване на PET-CT изследване.

Първата базова стъпка беше наличието на медицинско обосновано искане за провеждане на PET-CT, което най-често се издава от онколог, лъчетерапевт, хирург или друг вид специалист.

През втория етап преглеждахме на медицинското досие на пациента, със специален акцент върху водещата диагноза (вид на малигнения тумор), онкологичната анамнеза и съответната коморбидност (особено скорошно прекарани инфекция/възпаление и захарен диабет). Провеждахме кратко интервю с пациента/близките му с оглед уточняване и разясняване на показанията за провеждане на процедурата, като основно се събираше и отбелязваше информацията във връзка със

злокачественото заболяване, дати и резултати от проведени образно-диагностични процедури, оперативни интервенции, резултати от биопсия и патологични изследвания, вид на проведено до този момент лечение (лъчетерапия, химиотерапия и др.) и текущи лекарства.

Следващият списък показва в обобщен вариант всички аспекти, обсъждани по време на прегледа:

- о Данни за тумора и/или за други познати туморни/метастатични локализации.
- о Онкологична анамнеза и съответна коморбидност (особено инфекция/възпаление и захарен диабет).
- о Неврологични или психиатрични клинични състояния, включително предполагаеми неврологични паранеопластични синдроми.
- о Височина и телесно тегло (те трябва да се определят точно в случай на измервания на SUV). Теглото измервахме директно преди всяко изследване с FDG PET-CT, тъй като то често се променя по време на хода на заболяването.
- о Серумна глюкоза, дата, час.
- о Пълен преглед на настоящите и наскоро използвани лекарства, особено (но не само) антидиабетни лекарства, кортикостероиди, растежни фактори и седативи. В случай на оценка на ефекта от проведената терапия: вид и дата на последната терапевтична интервенция.
- о Резултати от други образно-диагностични тестове (особено CT, MRI и предишни PET-CT), включително дати на получаване, пълни доклади и, ако е възможно, данни на DICOM от посочените изследвания за сравнение.

о Алергия към контрастни вещества. Ако провеждането на FDG PET/CT изследване с венозно контрастно вещество е крайно необходимо, насочващия лекар-специалист да посочи протокола за премедикация, за подготовката на пациента.

о Бъбречна функция. Трябва да са налични актуални резултати за стойностите на серумния креатинин, ако се използва интравенозно контрастно вещество.

В края на проведения преглед клиничният проблем беше ясно формулиран и аргументиран. Всички пациенти бяха обсъдени за налична история за диабет и съпътстваща терапия, наличие/липса на анамнеза за клаустрофобия, както и способността на пациента да лежи неподвижно с ръце поставени над главата си по време на изследването (15–20 минути).

Използван радиофармацевтик

- Продукт: 18F-флуоро-2-дезоксиглюкоза (FDG)
- Нуклид: Флуор-18

Дозировка/активност: Зависи от системата, времето за една позиция(легло) и теглото на пациента.

Администрация: интравенозно приложение.

Контрол на качеството: Съответствие с Европейската фармакопея в Европа.

Флуор - 18 е циклотрон-произведен радиоизотоп на флуор, който излъчва позитрони и има кратък полуживот (109,7 минути). Това позволява неговото маркиране с многобройни молекулни трейсъри, както и

генериране на изображение в рамките на няколко часа (обикновено <3 часа) след инжектиране.

Най-често използваният трейсър в момента е 18F-флуоро-2-дезоксиглюкоза (18F-FDG). Натрупването на FDG в тъканите е пропорционално на количеството оползотворяване на глюкозата. Повишената консумация на глюкоза е характерна за повечето видове ракови клетки и отчасти е свързана със свръхекспресия на преносителите на глюкоза (GLUT) и повишена активност на ензима хексокиназа.

При всички пациенти проведохме 18F-FDGPET-CT по стандартен или целотелесен протокол след поне 6-8 часа на гладно. Стойностите на кръвната глюкоза преди инжектирането на радиофармацевтика бяха в рамките на допустимия диапазон 7 -10 ммол/л. За пациенти със слабо контролиран диабет и високи нива на кръвната захар, 4-12 единици бързо действащ инсулин инжектирахме подкожно поне 4 часа преди интравенозното аплициране на 18F-FDG.

Средно около 60-90 минути преди сканирането на пациента инжектирахме 18F-FDG с активност около 3-3,5MBq/kg. От съществено значение за получаване на качествени образи е пациентите да ограничат вербални контакти и двигателни дейности през времето на акумулация на радиофармацевтика преди началото на регистрацията. За целта този престой се провежда в специално конструирани боксови помещения, където външните условия са така регулирани, че да осигурят максимален комфорт на тялото.

Използвана апаратура, протокол на изследване и регистрация.

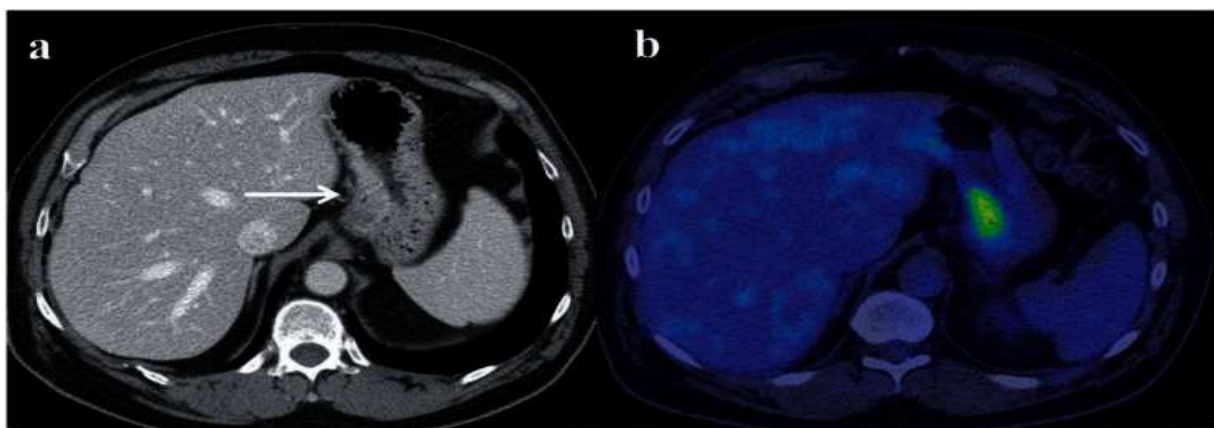
Изследването извършвахме с използването на хибридна апаратура (DiscoveryPET/CT 600, GEHealthcare), на която се извършва последователна регистрация на CT и PET – изображения.

За голяма част от нашите пациенти беше използван стандартен протокол на PET/CT изследванията. Той включва обем на сканиране от върха (или базата) на черепа до средната част на бедрата (т.нар Torso imaging, който е стандарт за Европа и САЩ, като покрива повечето от най-релевантните области при оценката на онкологични заболявания). Стандартно пациентите са с ръце, вдигнати над главата, за избягване артефактите от неадекватна корекция на разсеяното лъчение, особено в абдоминална и тазова област. При насочено търсене на патологичен процес в областта на главата и шията е желателно ръцете да са до тялото.

Компютърно–томографското изследване беше реализирано с помощта на 16-срезов спирален CT-апарат за отслабване на разсеяното лъчение и структурно-анатомична локализация, със следните параметри: дебелина на срезове при сканиране 3,75мм, дебелина на реконструирани срезове 1,25мм, DFOV 70 см, реконструкционна матрица 512 x 512 (матрица на дисплея 1028). Скоростта на въртене на тръбата е 0,8s ,27,50mm за една ротация, pitch-фактор 1,375:1. Токът, който се използва е с автоматична модулация и стойности на напрежението в диагностичния обхват - 120kV. При провеждане на изследването без интравенозно контрастно усилване данните от CT бяха събирани при ток 30-250mA, напрежение 120kV и бяха коригирани спрямо телесното тегло на пациента. В условията на интравенозно контрастно усилване, CT параметрите бяха – ток в диапазон 30-440 mAs и напрежение

120kV. Всички пациенти получиха орален контраст (100mL диатризоат натрий с концентрация на йод 249.64mg/mL, разреден до общ обем от 1000mL). Апликацията на контрастния агент (Ultravist 100) беше осъществено с помощта на автоматичен инжектор в обем от 100 ml, със скорост 2-3 ml/s и закъснение от 40-60 секунди. След приключването на СТ скенирането следваше регистрацията на емисионен запис в посока от средна трета на бедрата до основата на черепа (при съмнение за малигнен меланом, от основата на черепа към бедрата).

Използваните параметри на позитронно емисионната томография бяха съответно: средно 7-8 легла в зависимост от ръста на пациента и използвания протокол (Torsoimagingили Whole-body imaging). Едно PET-легло покрива разстояние от 116-117мм, което отнема между 2 и 5 минути. Трансаксиалната разделителна способност на PET е със стойност на FWHM (FullWidthHalfMaximum) – 5,5мм. Матрицата е 256x256, статичен тип на скениране, припокриване на леглата – 23,4%. Метод на PET реконструкция – VUEPointHD (Фиг.1).



Фигура 1. КАТ на коремни органи с контраст (а) и ПЕТ-СТ(б) при пациент в Т2 стадий на стомашен карцином, разположен по малката кривина – наблюдава се поглъщането.

### 3.2.2.4.7 Диагностична лапароскопия

Пациентите бяха под обща интубационна анестезия, в положение по гръб с разтворени крака. Операторът беше между краката на пациента, а асистента на камерата от лявата му страна. Използваше се лапароскопска колона с източник на светлина, инсуфлатор, монитор, аспирационна система. Методите за достъп до коремната кухина бяха „отворен“ по метода Hasson (периумбиликално) или с помощта на игла на Верес. Пневмоперитонеума беше с константно налягане (12mmHg) като се използваше CO<sub>2</sub>. Периумбиликано поставяхме 1x10mm метален троакар за еднократна употреба и 2x5mm метални троакари съответно по лява и дясна медиоклавикуларна линия (на около 15cm под ребрената дъга) за работните инструменти. Експлорацията започваше с оглед повърхността на черния дроб, оментума, париеталния и висцералния перитонеум, малкия таз в позицията екстреман Тренделенбург. Наличният асцит се аспирираше в спринцовка и се изпращаше за срочно цитологично изследване. Лаваж за цитологични клетки се направи при всеки пациент, в лапароскопската група, като се лаважираха последователно ляв и десен горен квадрант – субфренично и в малкия таз в позицията – екстреман Тренделенбург. Лаважът се аспирира съответно с 3 различни спринцовки по 50мл, изпраща се за срочно цитологично изследване и оценка по Papanicolaou classification (Табл.1). Извършва се оглед на стомашната стена за наличие на инвазия на тумора в съседни структури. Хепатододуоденалния лигамент и порта хепатис също бяха изследвани. В случай на суспектен лимфен възел с клиничен стадий IV, извършвахме биопсия.

### 3.2.3 Генетичен метод

След извършване на стомашната резекция се взимаше проба от туморната и нормална стомашна тъкан с помощта на ножица, като материалите се поставяха в специално обособени за целта контейнери с предварително надписани върху тях даннит на пациента. Материалите се изпращаха за верификация на типа тъкан (тумор/норма) от патолог и се съхраняваха в RNAlater (RNA Stabilization Solution for Tissue) при  $-80^{\circ}\text{C}$  за продължителен период. Изолирането на ДНК започваше след третиране на материалите с хипотонични буфери за разрушаване на клетките и ядрата. Белтъците се обработваха с протеинази в присъствието на етилендиаминтетраоцетна киселина (ЕДТА) и детергенти, а ДНК-молекулите се екстрахираха чрез изсолване. Изолираше се високомолекулна ДНК с Chemagen-полуавтоматичната сепарираща система, базирана на използването на магнитни частици в присъствието на електромагнитно поле или посредством колонен метод (QiaAmp DNA Mini Kit, Qiagen). Изолираната ДНК беше висококачествена с минимални примеси на белтъци, РНК и гликопротеини, като качеството и беше оценявано с помощта на 0.8% агарозна електрофореза. За визуализиране на фрагментите беше използван етидиев бромид с концентрация  $0.05\ \mu\text{g/ml}$ , а количеството на изолираната ДНК се оценяваше спектрофотометрично.

Беше използван кит за мултиплексен анализ на лигирани проби (Multiplex Ligation Probe Amplification-MLPA Holland: SALSA MLPA KIT P458 Gastric Cancer), в който са включени сонди за гените PIK3CA, EGFR, CDK6, MET, GATA4, FGFR1, MYC, PTP4A3, FGFR2, CCND1, KRAS, KLF5, ERBB2, TOP2A, GATA6 и CCNE1. Всяка проба от кита се състоеше от два олигонуклеотида (сонди), с дължина между 130 и 500, които хибридизират в непосредствена близост до таргетната последователност и по време на PCR-реакцията всички лигирани

последователности се амплифицираха посредством една двойка праймери. Един  $\mu\text{l}$  от всяка проба се смесваше с 0.5  $\mu\text{l}$  флуоресцентно белязан стандарт (GeneScan 600 LIZ) и обемът се довеждаше до 14  $\mu\text{l}$  с дейонизиран формаamid. Пробите се денатурираха и се разделяха на капилярна електрофореза с помощта на секвенатор ABI Prism 3130 xl (Applied Biosystems), а електрофореграмите се визуализираха чрез GeneMapper Software и Coffalyser.Net Software. Освен проби за съответните екзони на анализирани гени, MLPA-китът включваше и референтни проби, съдържащи сонди за други участъци от генома. За референтните проби стандартното отклонение за всяка сонда беше  $< 0,10$ . Използвани бяха най-малко 3 референтни контролни проби или на всеки 7 проби, една беше референтна контрола. Референтните контроли бяха от същия биологичен материал, от който е изолирана и пробата, в случая изолираната ДНК от нормалната тъкан на стомаха, като бяха с максимално близко качество и количество до изследваните проби. При количествения анализ за наличие на делеции/дупликации на гените се извършваше сравнение между площта на пиковете, представляващи отделните екзони, тази на съседните референтни проби, както и площта на пиковете на референтни контроли, които са подложени на MLPA-анализ и електрофоретично разделяне при еднакви условия, успоредно със съответната проба. Използваните при MLPA анализа консумативи и условия са представени в таблица 2.

Условия на MLPA анализа					
Компоненти на реакционната смес		Параметри на работните условия			
1 ден		PCR програми без нагряване на капака на апарата			
Денатурация		Етап	Температура	Време	
ДНК (15 ng/ µl)	5 µl	Денатурация	98 °C	5 min.	
Парафин	10 µl	Съхранение в апарата	25 °C	∞	
Хибридизация		Етап	Температура	Време	
SALSA Probemix	1 µl	Денатурация	95 °C	1 min.	
SALSA MLPA буфер	1 µl	Хибридизация	60 °C	18 h.	
Общ обем	2 µl	Съхранение в апарата	54 °C	∞	
2 ден		PCR програми без нагряване на капака на апарата			
Лигазна реакция		Етап	Температура	Време	
SALSA буфер А	2 µl	Лигиране	58 °C	15 min.	
SALSA буфер Б	2 µl	Деактивиране на ензима	98 °C	5 min.	
SALSA Ligase – 65	0,66 µl	Денатурация			
dH <sub>2</sub> O	16,66 µl	Съхранение в апарата	20 °C	∞	
Общ обем	21,32 µl				
PCR реакция		PCR програми с нагряване на капака на апарата			
SALSA PCR праймери	1,32 µl	Етап	Температура	Време	
SALSA полимераза	0,32 µl	Брой цикли: 35	Денатурация	95 °C	30 sec.
dH <sub>2</sub> O	5 µl		Хибридизация	60 °C	30 sec.
Общ обем	6,64 µl		Синтез на нова верига	72 °C	60 sec.
Краен обем	34,96 µl	Краен синтез		72 °C	20 min
		Съхранение в апарата		15 °C	∞
Условия на капилярната електрофорезата					
Апарат	ABI Prism 3130 xl	Микс за електрофорезата			
		Компонент	Количество		
Флуоресцентно багрило за белязане на праймерите	FAM	PCR	1 µl		
		LIZ	0,5 µl		
		HI DI Formamide	12,5 µl		
		Общ обем	14 µl		

Таблица 2. Използвани при MLPA анализа консумативи и условия.

### 3.2.4 Статистически методи

Mean – средна аритметична стойност

Median – медиана

SD – стандартно отклонение

Min – минимална стойност

Max – максимална стойност

t – статистически критерий (t – критерий)

df – степени на свобода

p – ниво на статистическа значимост

#### 1. Дескриптивна статистика

- Количествените променливи са представени чрез обобщаващите статистически характеристики - средна аритметична (Mean), медиана (Median), стандартно отклонение (SD);
- Категорийните променливи са представени чрез абсолютни честоти (n) и относителни честоти (%)

#### 2. Методи за проверка на хипотези

- 1) Тест на Колмогоров-Смирнов при една извадка (One-Sample Kolmogorov-Smirnov test) за проверка на формата на честотните разпределения при количествените променливи.

- 2) Хи-квадрат тест (Chi-square test) или точен тест на Фишер (Fisher's exact test) – при изследване на зависимости между описателни (категорийни) данни с две или повече категории.
- 3) Т-тест при две независими групи (Independent-Samples t-test) – при нормално разпределение на изследваната променлива в сравняваните групи.
- 4) Непараметричен тест на Ман-Уитни (Mann-Whitney test) при сравняване на две независими групи когато формата на честотното разпределение е различна от формата на нормалното разпределение.
- 5) Рангов корелационен коефициент на Спирмън (Spearman's rho) – при изследване на корелационната зависимост между две количествени променливи, когато разпределението не следва нормалното разпределение.

Приетото критично ниво на значимост е  $\alpha=0,05$ . Съответната нулева хипотеза се отхвърля, когато р стойността (p-value) е по-малка от  $\alpha$ .

За обработка на данните от проучването е използван специализирания статистически пакет SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) версия 16.0

#### 3.2.2.6 Хирургични методи

На всеки пациент предоперативно се назначава 2g Ceftriaxon, преди инцизията, който беше продължаван в следоперативния период по преценка на хирурга. При всеки пациент бе поставян уретрален катетър и НГС.

### 3.2.2.6.1 Лапароскопски

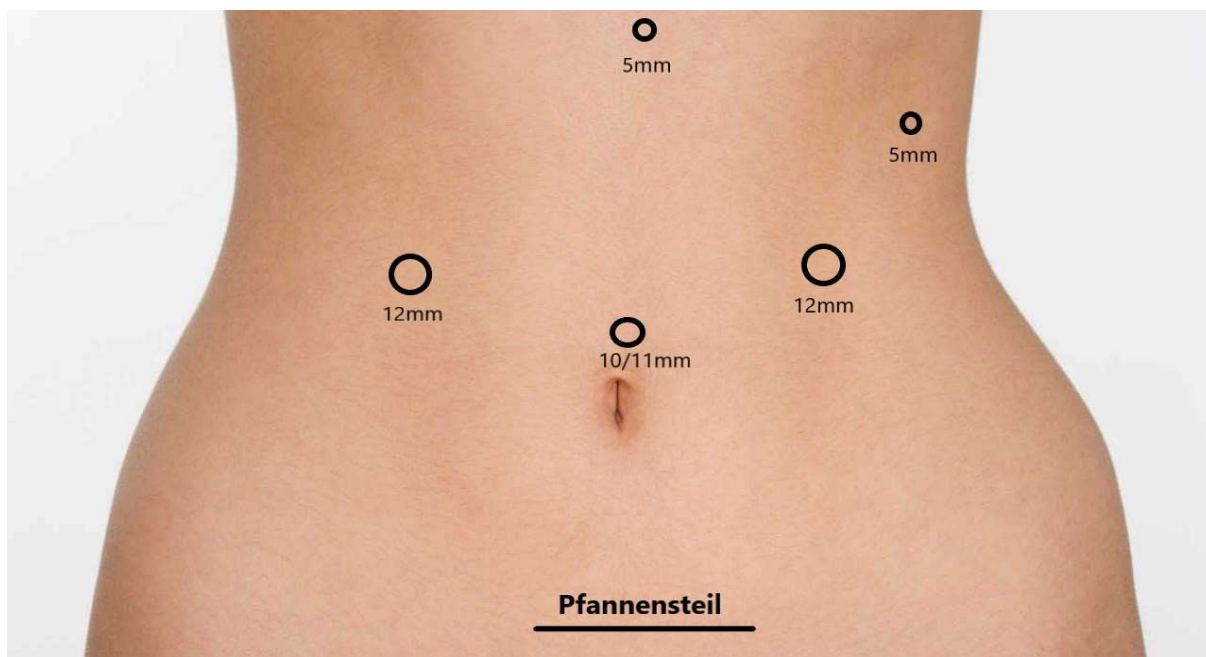
Пациента е в положение по гръб с разтворени крака, като операторът се намира между краката на пациента, асистента на камерата от дясната страна на болния, а вторият асистент от лявата.

Лапароскопията се осъществяваше чрез два вида достъп до коремната кухина, чрез игла на Veress или по отворения метод на Hasson. За операцията бяха необходими 3 или 5 троакара. Използвахме 2 вида троакари според използваемостта – за еднократна и многократна употреба, 4 вида според диаметъра – 5mm, 10mm, 11mm и 12mm троакари. Създаваше се изкуствен пневмоперитонеум с CO<sub>2</sub> до 12 mmHg. Използвахме 10mm 30° ригидна оптика със стандартна дължина и набор от лапароскопски инструменти. Местоположението на троакарите при пет троакарната техника беше както следва – 10mm троакар за многократна употреба при Hasson техниката и 11mm троакар за еднократна употреба (Jonson&Jonson) се поставяше супра или интраумбиликално в зависимост от хабитуса на пациента, през който се въвеждаше оптиката на ендоскопа. По дясна медиоклавикуларна линия поставяхме 12mm троакар за еднократна употреба (Jonson&Jonson) за лявата ръка на оператора. По лява медиоклавикуларна и предна аксиларна линия 2x5mm троакари за многократна употреба, съответно за дясната ръка на оператора (мека клампа без заключващ механизъм с възможност за коагулация) и граспер за втория асистент. Субксифоидално поставяхме 5mm троакар за многократна употреба, с чернодробен ретрактор за втория асистент (Фиг.2). Другите инструменти (за доминантната ръка на хирурга) са коагулираща кука, ножица, както и аспирация и ултразвуков скалпел - Ethicon's HARMONIC Ultracision (Фиг.6).

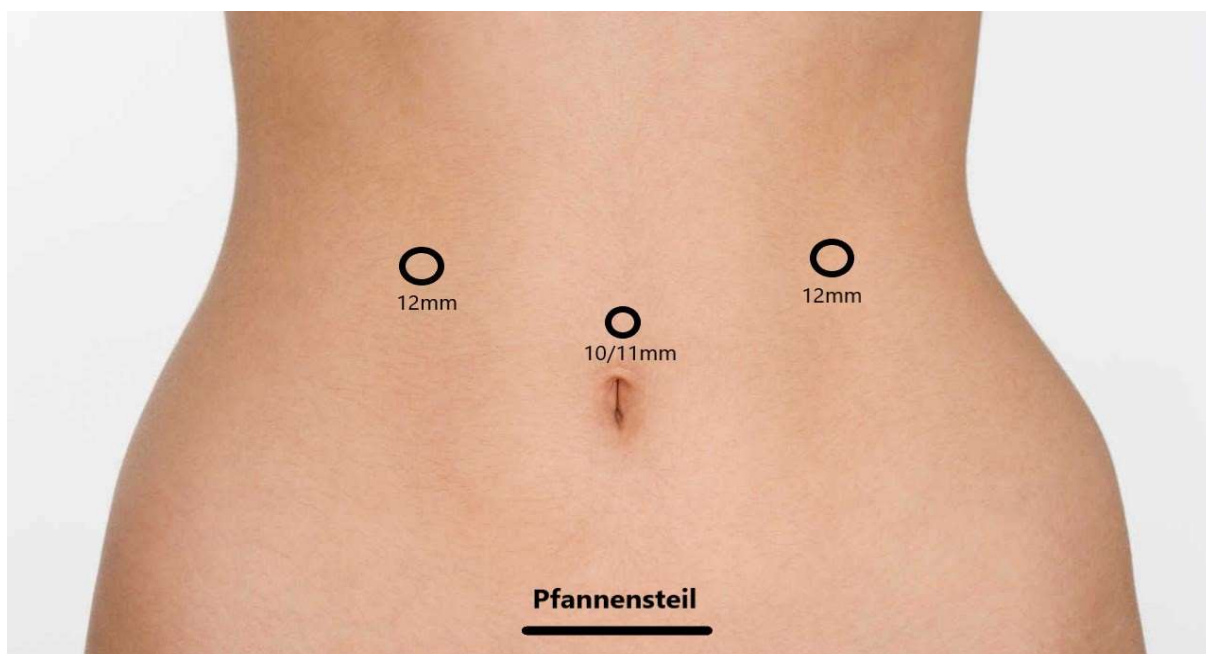
За три троакарната техника поставяхме един 10мм троакар супраумбилкално, един 12мм троакар по лява медиоклавикуларна линия и един 12мм троакар по дясна медиоклавикуларна линия (Фиг. 3).

Перитонеален лаваж от четирите квадранта се изпращаше за цитологично изследване на атипични клетки и оглед на коремната кухина включително на малкия таз в положение екстремен Тренделенбург. Започва се с оментектомия, като оментума се отделя дясната флексура по хода на колон трансверзум, след това се навлиза в bursa omentalis, лигира се а. et v. gastroepiploica dextra, като се запазва а. gastroduodenalis. Мобилизиране на антрума по малка кривна, където се дисектира и лигира а. gastrica dextra. Лимфна дисекция в хепатодуоденалния лигамент на региони 12a, 12b, 12p (Фиг.4). Мобилизиране на дванадесетопръстника. Определяне на дисталната резекционна линия. Дуоденума се прекъсва с помощта на линеарен стаплер (Фиг.5) - Echelon 60mm (син пълнител, 3.5mm, 6 реда), въвеждан в коремната кухина през 12мм троакар. Дисекция по lig. hepatogastricum каудално, като се дисектира и лигира а. gastrica sinistra. Дисекция по голямата кривина и последователно лигиране и прекъсване на гастролиеналните съдове (aa. gastricae breves). Определя се проксималната резекционна линия в зависимост от локализацията на тумора по онкологични принципи и с помощта на един или няколко линеарни стаплери (Фиг.5) - Echelon 60mm (син пълнител, 3.5mm, 6 реда) се прекъсваше стомаха. Ушивателя се въвежда в коремната кухина през 12mm троакар. Извършвахме лимфна дисекция в басейна на truncus coeliacus на региони – 7, 8a,8p и 9 (Фиг. 4). Лимфна дисекция по хода на а. splenica и в хилуса на слезката – региони 11p, 11d и 10. Гастророеюналната анастомоза се извършваше по два начина. С помощта на линеарни стаплери Echelon 60mm (син пълнител, 3.5mm, 6 реда) или мануално на

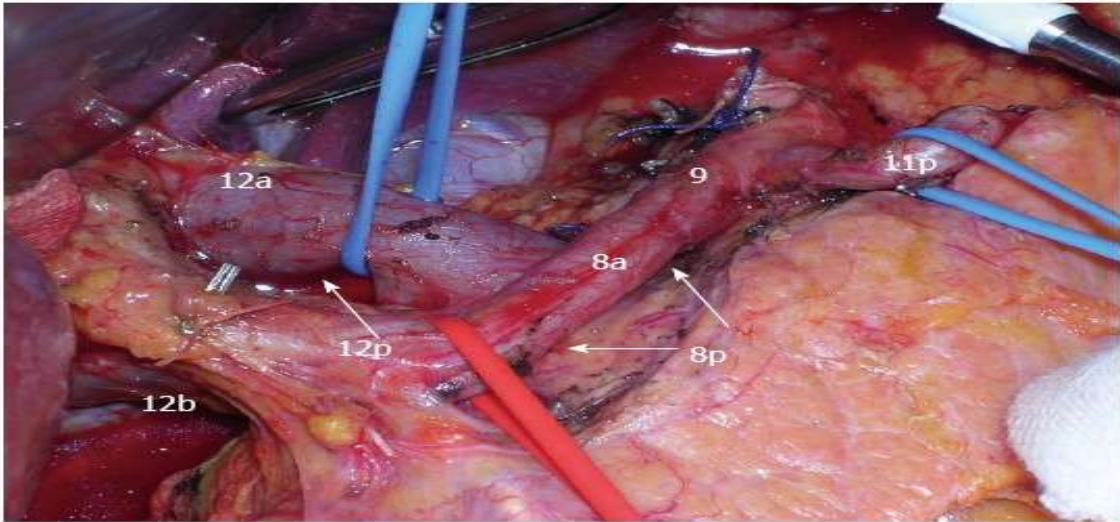
два етажа със синтетични монофиламентни, резорбируеми конци PDS2/0. При тотална гастректомия използвахме двата начина на изпълнение на анастомозата – с помощта на линейрен стаплер и извършване на латеролатерална анастомоза или лапароскопска сутура мануално с продължителен шев, на два етажа, по типа T-T Roux en Y езофаго-йеюно анастомоза. При пациентите с механична стаплерна анастомоза също се извършва се извършваше обходна анастомоза, по Roux en Y, термонолатерална на 50 см от лигамантум Treitz с бял пълнител 45мм (2,6мм, 6 реда). Задължително се извършваше водно-въздушна проба за херметичност на гастро(езофаго) йеюналната анастомоза. Затваряхме мезентериалните дефекти с конец Prolene 2/0 както следва: мезентериалния дефект – циркулярен шев, а пространството на Petersen с продължителен шев. Поставяхме назойеюнална сонда с помощта на анестезиологичния екип под лапароскопски визуален контрол. 2 коремни тръбни дрена – един към дуоденалния чукан и един контактен до анастомозата – при всички случаи. Спесимена се изваждаше чрез миналапаротомия по Pfannenstiel, с помощта на протективен сак и Wound Protector Retractor (Фиг.2,3). Троакарите се изваждаха под визуален контрол и последваща щателна десуфлация. Троакарния достъп на 12mm троакар затваряхме с 1 Z - образен шев с помощта на endoclose. Фасцията на 10(11)mm троакарен достъп зашивахме с резорбируем конец 1 Vicryl - Z образен шев.



Фигура 2. Лапароскопска гастректомия с 5 – троакарен достъп



Фигура 3. Лапароскопска гастректомия с 3 - троакарен достъп



Фигура 4. Част от D2 лимфна дисекция



Фигура 5. Механичен гъвкав, линеарен стаплер Echelon



Фигура 6. Ултразвуков скалпел - HARMONIC ACE

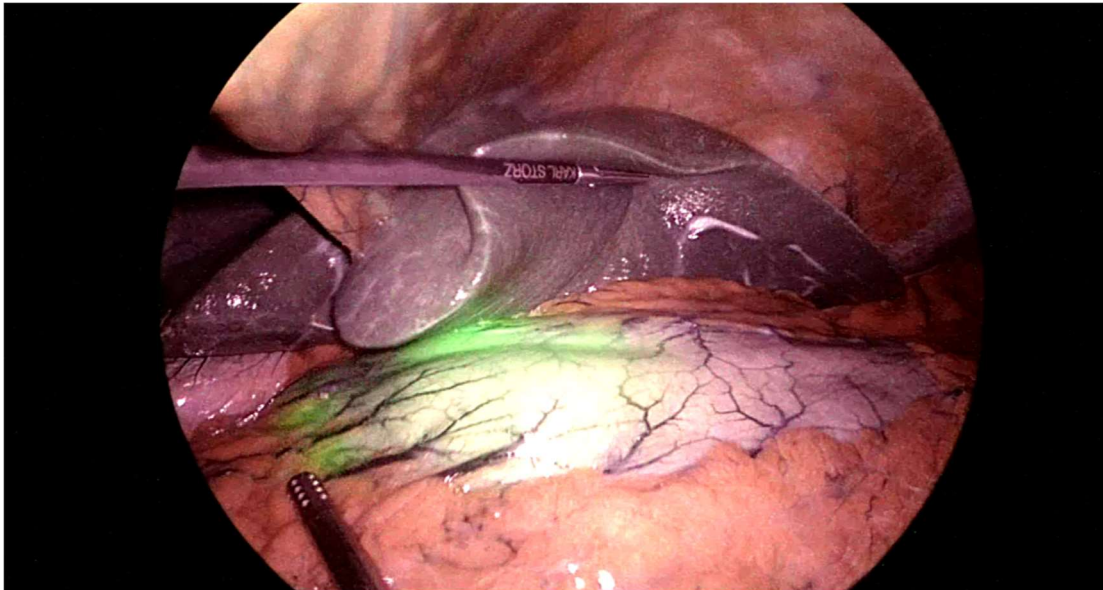
ICG – навигирана лапароскопска гастректомия с D2 лимфна дисекция.

ICG – навигирана лапароскопска гастректомия с D2 лимфна дисекция, извършвахме, като за целта разтворихме 25ml ICG в 20ml стерилна вода. Двадесет и четири часа преди операцията, инжектирахме ендоскопски (ФГС) със специална игла перитуморно (болус от 0,5-1ml във всеки квадрант на тумора), за да се изобрази ясната граница на тумора с нормалната тъкан и да има чиста дифузия към лимфните възли, което да позволи извършването на сентинелна лимфна дисекция. ICG флуоресцентно изобразяване беше извършвано с инфрачервена система и специална камера (PDE-2; Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Япония). Източникът на светлина на флуоресцентната система на ICG е чрез светловод, който излъчва светлина с дължина на вълната 760 nm, а детекторът е свързан с камерата на устройството с лимитиран филтър, използван за филтриране на светлината с дължина на вълните под 820 nm. Флуоресцентните сигнали бяха предадени на цифров видео процесор и се изобразяваха на видеомонитор в реално време.

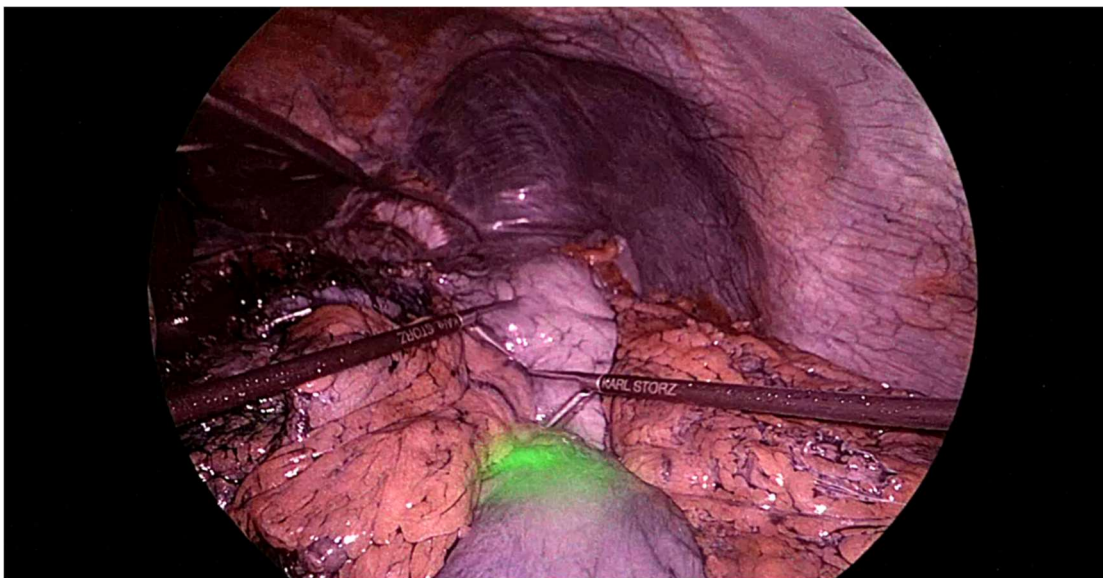
При лапароскопски оглед – 24ч. след маркирането, лимфните възли натрупали ICG се появяват като кръгли петна излъчващи ясна флуоресценция, като те се дефинират като флуоресцентни лимфни възли (FN) (фиг.7). FNs се дисектираха внимателно от обграждащата ги мастна тъкан и от цялостния спесимен.

Туморната тъкан се визуализираше на инфрачервената фаза, като ясно се определяха размера и границите на тумора с околната тъкан (фиг.8). С помощта на флуоресцентните свойства на тумора определяме точно и в съответствие с онкологичните принципи проксималната и

дисталната резекционни линии при един пациент със субтотална гастректомия.



Фигура 7. Лапароскопско изображение на стомашен тумор и перигастрични лимфни възли по време на ICG навигирана лапасоскопска гастректомия.



Фигура 8. Определяне на проксималната резекционна линия в зависимост от местоположението на тумора.

### 3.2.2.6.2 Отворен метод (лапаротомия)

Пациента е по гръб със затворени крака. Операционния екип се разполага както следва – оператора и втория асистент от лявата страна на пациента, а първия асистент от дясната. Чрез срединна лапаротомия, послойно, по остър и тъп начин, се достига до перитонеалната кухина.

Започва се с щателна експлорация на коремната кухина за асцит и вторични лезии по черен дроб, париентален и висцерален перитонеум.

Следва мобилизиране на голямото було от колон трансверзум до дясната флексура. Навлиза се в бурса оменталис. Асистента държи с едната ръка стомаха, а с другата колон трансверзум. Прекъсва се дясната гастроепиплоична артерия и вена. Продължава се с мобилизиране на голямото було до началото на лявата флексура, последвано от мобилизиране на антрума по малката кривина. Следва високо съдово лигиране на дясната стомашна артерия на 1 см от а. hepatica communis. Последва прекъсване на малкото було в проксимални граници. Мобилизира се дванадесетопръстника. Работи се на малки стъпки поетапно с помощта на муската поради наличието малки кръвоносни съдове от а. pancreatoduodenalis докато се визуализира главата на панкреаса. Следва мобилизация на дуоденума по хода на неговата D2 част по външната страна - аваскуларен план, надрязва се серозата. Дистално прекъсваме дуоденума с помощта на линеарен стаплер – зелен пълнител (Covidien AutoSuture TA6048L 4.8mm)(Фиг. 9). Продължава се с повдигане на стомаха и дисекция на а. gastrica sinistra, лигира се проксимално със свободна и дистално с прошивна лигатура. Пресича се лявата триъгълна връзка на черния дроб и гастролиеналните съдове, близо до далака (аа.

gastricae breves). Мобилизира се абдоминалната част на хранопровода. Прекъсват се стомашно-диафрагмалните връзки. След това се прекъсват вагусите и хранопровода се изтегля към свободната перитонеална кухина. Вагусните нерви се палпират като ригидни връзки вентрално и дорзално от абдоминалната част на хранопровода, отделят се с дисектор внимателно, за да се избегне ятрогенна лезия на хранопровода и се прекъсват. Лигира се хранопроводния клон на а. gastrica sinistra. Стомаха се отстранява en Block с оментума като цял спесимен. Проксималната резекционна линия определяме според локализацията на тумора, и прекъсваме с налагане на меки и твърди клампи с помощта на лезвие.

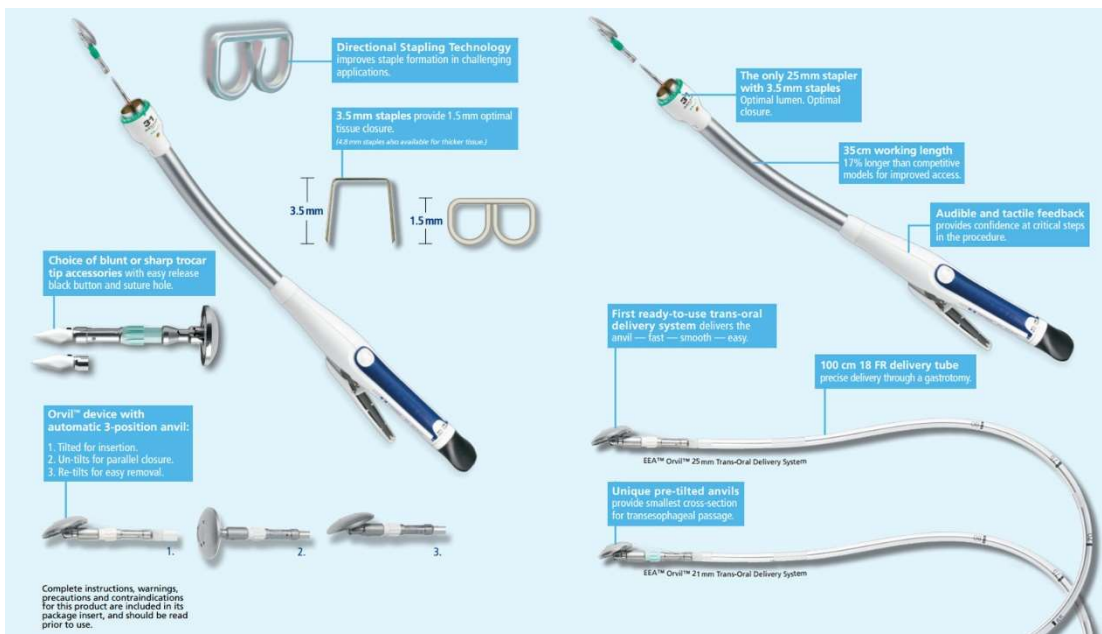
Гастро-йеюналната и езофаго-йеюналната анастомоза извършвахме с помощта на механичен циркулярен стаплер по два типа Roux en Y и Omega с Braun – анастомоза (Covidien EEA21 - DST Series EEA 25mm With 4.88mm Staples) (Фиг.10,11). Ентеро–ентеро анастомозата при двата типа реконструкция извършваме ръчно с помощта на резорбируеми конци Vicryl 2/0 на два етажа с продължителен или прекъснат шев. Коремната кухина затваряме послойно-продължителен шев на перитонеум с резорбируем конец Vicryl 1, фасцията възстановявахме чрез продължителен шев с помощта на монофиламентен конец Loop 0/0.



Фигура 9



Фигура 10



Фигура 11

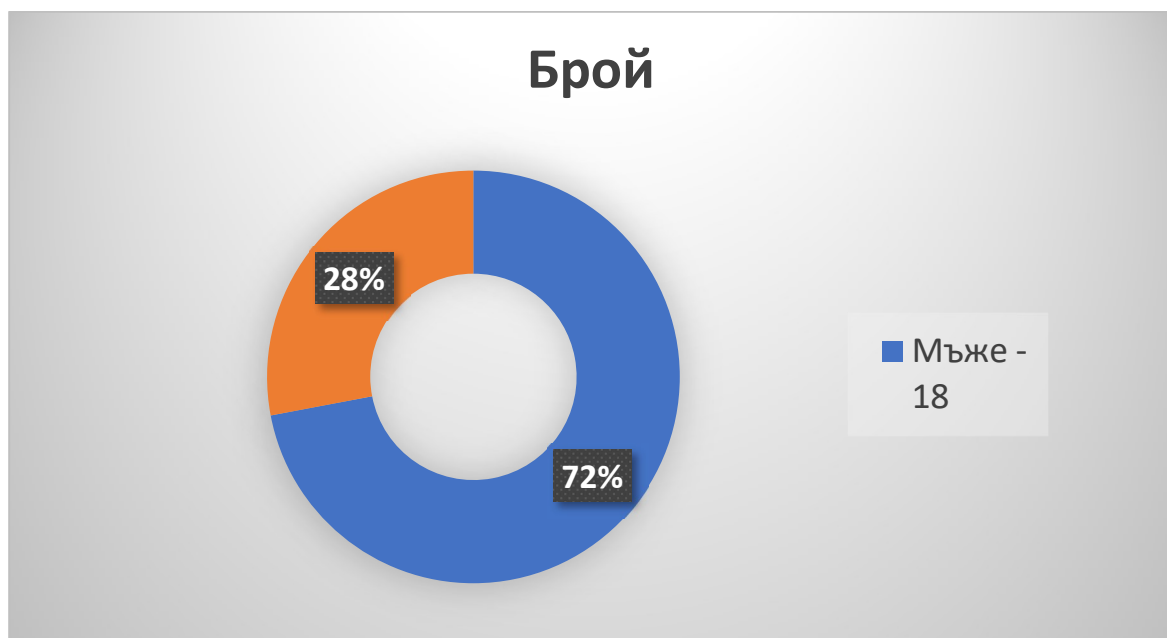
## 4. Резултати

4.1 **ЗАДАЧА 1:** Да се проучат генетични мутации при пациенти с карцином на стомаха и да се определи значението им за резектабилността.

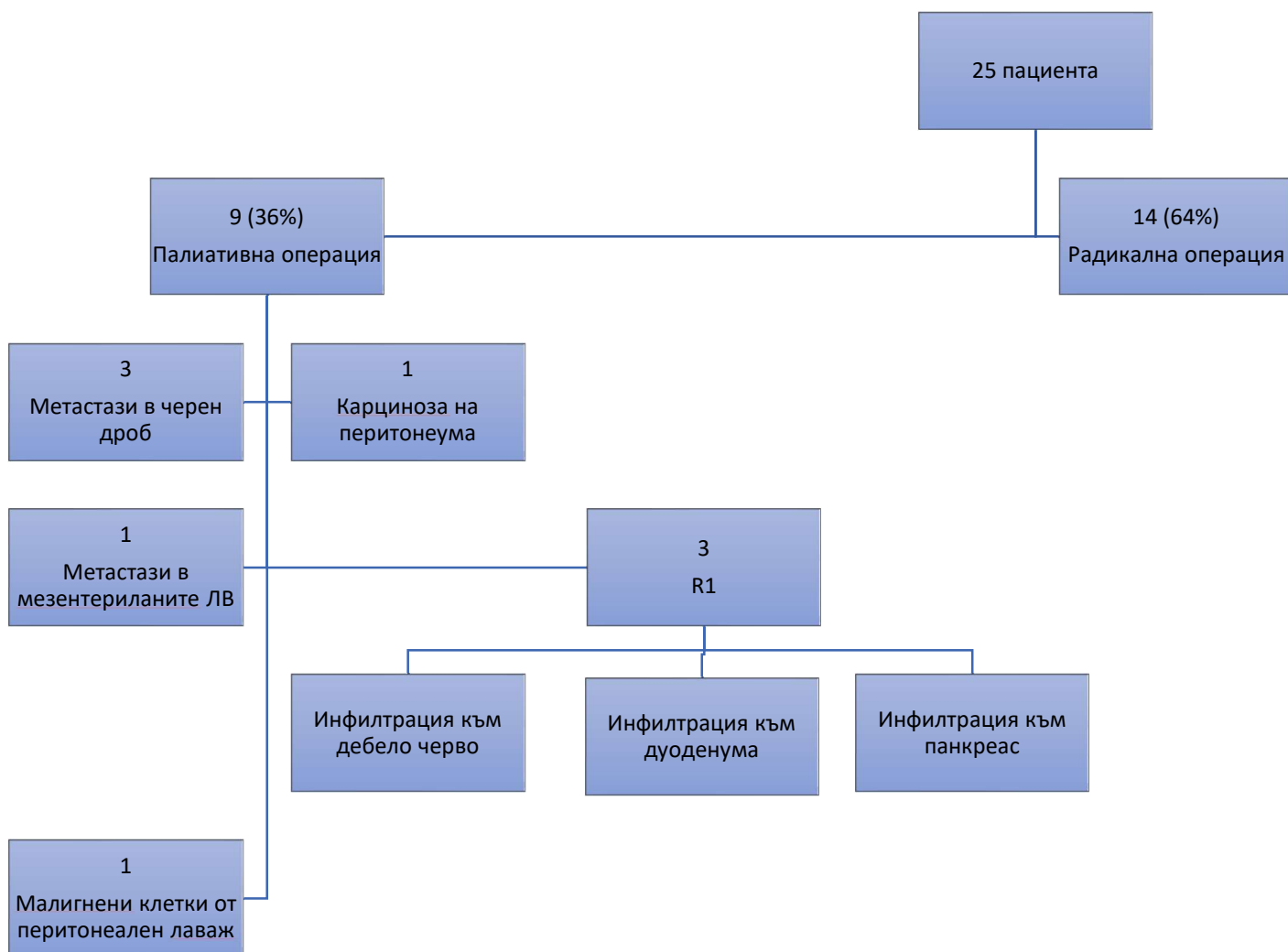
### 4.1.1 Резултати

На генетичен анализ бяха подложени 27 пациента. При един от пациентите се установи наличието на В-клетъчен лимфом на стомаха след изследването на патологоанатомичния препарат, а при друг липсваха пълните данни в попълнените таблици, поради което и двамата бяха изключени от проучването. Характеристиките на пациентите са представени на Таблици 3 и 4, фиг.12,13. Средната възраст на изследваната група беше  $68,2 \pm 8,1$  г (46-79), като 72% (18/25) са мъже, а 28% (7/25) - жени. В зависимост от хистологичния вариант по Lauren 24% (6/25) от аденокарциномите бяха дифузен тип, а 76% (19/25) – интестинален тип. По отношение на диференциацията всички изследвани тумори бяха ниско диференцирани – G3. При 36% (9/25) от пациентите не беше възможно извършването на радикална оперативна интервенция – при трима, поради наличието на далечни метастази в черния дроб, при един, поради наличието на карциноза на перитонеума, при един, поради наличието на метастази в мезентериалните лимфни възли, при един операцията е извършена с оставянето на макроскопски видима туморна тъкан, инфилтрираща дебелото черво, при един, поради положителен за малигнени клетки перитонеален лаваж и двама са с положителна резекционна линия (една от дуоденума и една от съседен орган). При 44% (11/25) от пациентите бяха установени мутации в 8 от изследваните гени: GATA4, GATA6, EGFR, CDK6, KRAS, FGFR1, CCNE1 и ERBB2, като при 16% (4/25) от пациентите беше установено наличието на повече от една мутация. Най-

често срещаната мутация беше дупликация в GATA6 гена (GATA6 dup. ex 3-4-7), която се установи при 20% (5/25) от пациентите. Дупликация в CDK6 гена (CDK6 dup. ex 3-4-8) се намери при двама пациенти, делеция в GATA4 гена (GATA4 del. ex 1-3-7) - при трима, делеция във FGFR1 гена (FGFR1 del. ex2-5-13) - при двама, дупликация на ERBB2 гена (ERBB2 dup. ex13-22-29) - при двама, дупликация в CCNE1 гена (CCNE1 dup. 3-4-7) – при един. При 66% (6/9) от пациентите с нерезектабилен тумор се установиха мутации, като такива в KRAS и EGFR гените бяха открити само и единствено при тях (Таблица 3,4). Една дупликация на KRAS гена (KRAS dup. ex 3-4-6) при 61 годишен мъж с ниско диференциран, тубуларен карцином на стомаха, дифузен тип и метастази в черния дроб. Една дупликация в EGFR гена (EGFR dup ex. 3-4-7) при жена на 69 години с ниско диференциран, пръстеновидноклетъчен карцином на стомаха, дифузен вариант и метастази в мезентериалните лимфни възли.



Фигура 12. Средната възраст на пациентите е 62.5 години (между 46 и 79 години).



Фигура 13. Дизайн на проучването.

pTNM	GATA4	GATA6	EGFR	CDK6	KRAS	FGFR1	CCNE1	ERBB2
T4aN2R0L1M1Pn+					+			
T3N3bR0L1M1Pn+		+						
T4bN2M1L1V1R1Pn+								+
T4NxM1	+					+		
T4aN3bL1V1M0R1								
T4aN3bL1V1M1R0		+						
T4aN3aL1V1R0M0Pn+			+					
T4bN0M+								
T3N1M1p								

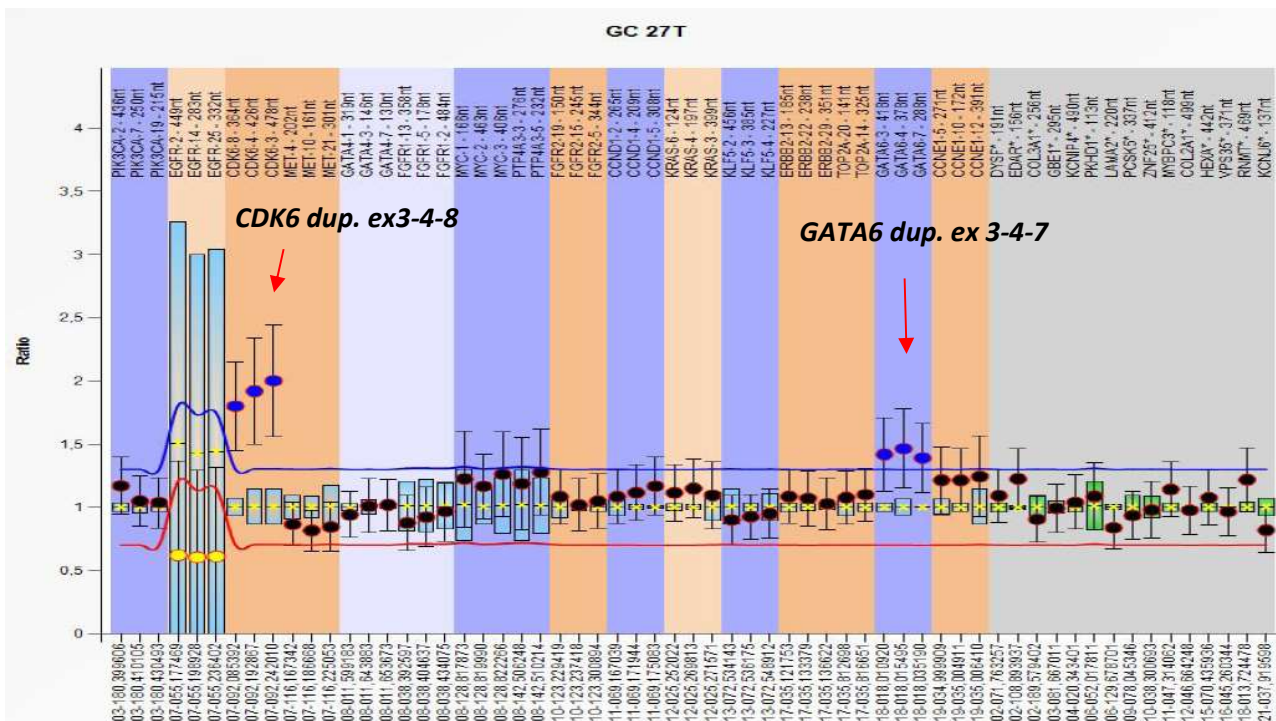
Таблица 3. Генетични мутации в туморната тъкан при пациенти с нерезектабилен карцином на стомаха

pTNM	GATA4	GATA6	EGFR	CDK6	KRAS	FGFR1	CCNE1	ERBB2
T3N1M0R0L0								
T3N0M0R0L0								
T4aN1R0L1V0Pn+				+				
T4aN2M0R0L1Pn+	+						+	+
T4aN1M0R0								
T2N0M0R0								
T3N0M0R0								
T3NxM0R0								
T4aN0M0R0								
T3N1M0R0								
T2N1M0R0	+	+				+		
T2N0M0R0L0								
T1N0M0R0								
T4N1M0R0								
T3N1M0R0L1Pn+		+						
T3N0M0R0		+		+				

Таблица 4. Генетични мутации в туморната тъкан при пациенти с резектабилен карцином на стомаха.

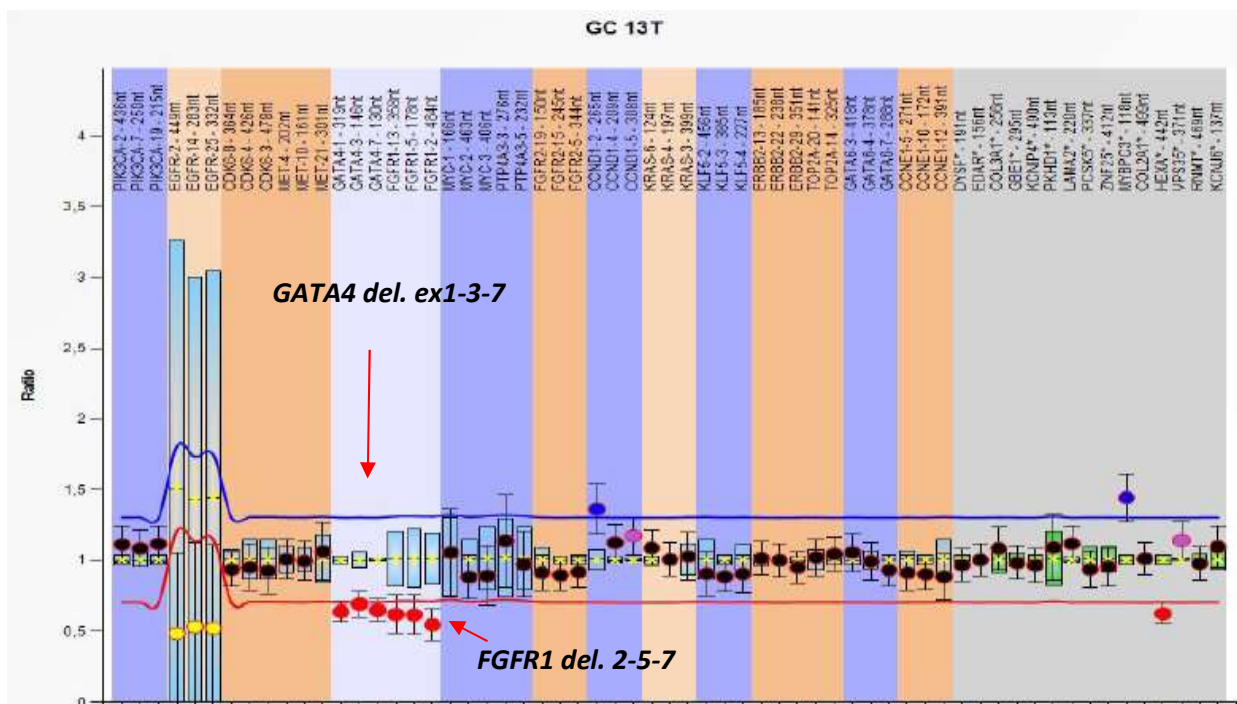
При 37% (10/27) бяха установени аберации в изследваните гени. Геномни пренареждания бяха установени в 8 от изследваните гени: *GATA4*, *GATA6*, *EGFR*, *CDK6*, *KRAS*, *FGFR1*, *CCNE1* и *ERBB2* гените

Анализът показва наличието на дупликация в *CDK6* гена (***CDK dup. ex 3-4-8***) при трима пациенти: при пациент на 65 годишна възраст с ниско диференциран с аденокарцином на стомаха и двама пациенти без налична клинична информация (фиг. 13). При един от пациентите беше установена и дупликация в *GATA6* гена (***GATA6 dup.ex 3-4-7***)(Фиг.14)



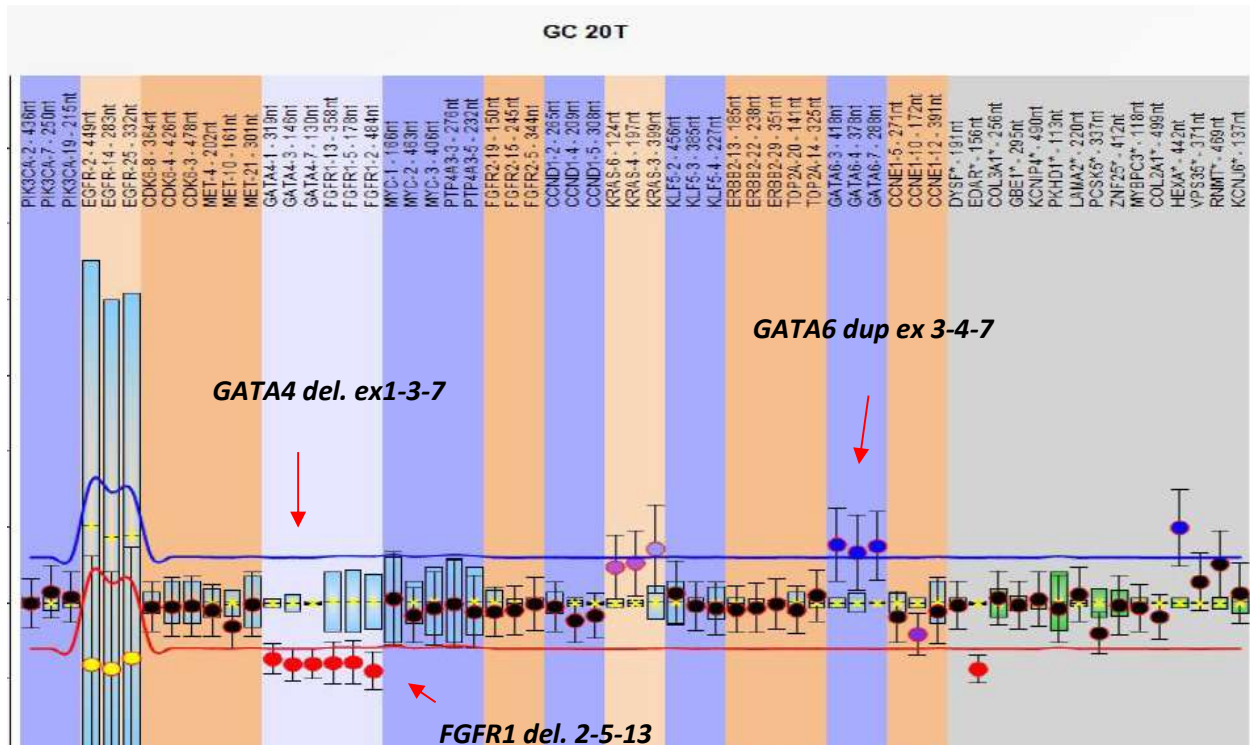
Фигура 14. MLPA анализ на пациент GC027 направен с помощта на Coffalyser.Net софтуер. Със стрелки са показани отчетените дупликации в *CDK6* и *GATA6* гена.

Проведеният MLPA анализ показва наличието на генетични промени в *GATA4* (*GATA4 del. ex1-3-7*) гена при двама пациенти с ниско диференциран аденокарцином на стомаха и при един пациент без клинична информация. (фиг. 14). И при тримата пациенти беше установена и делеция във *FGFR1* гена (*FGFR1 del. 2-5-7*)(фиг.15).



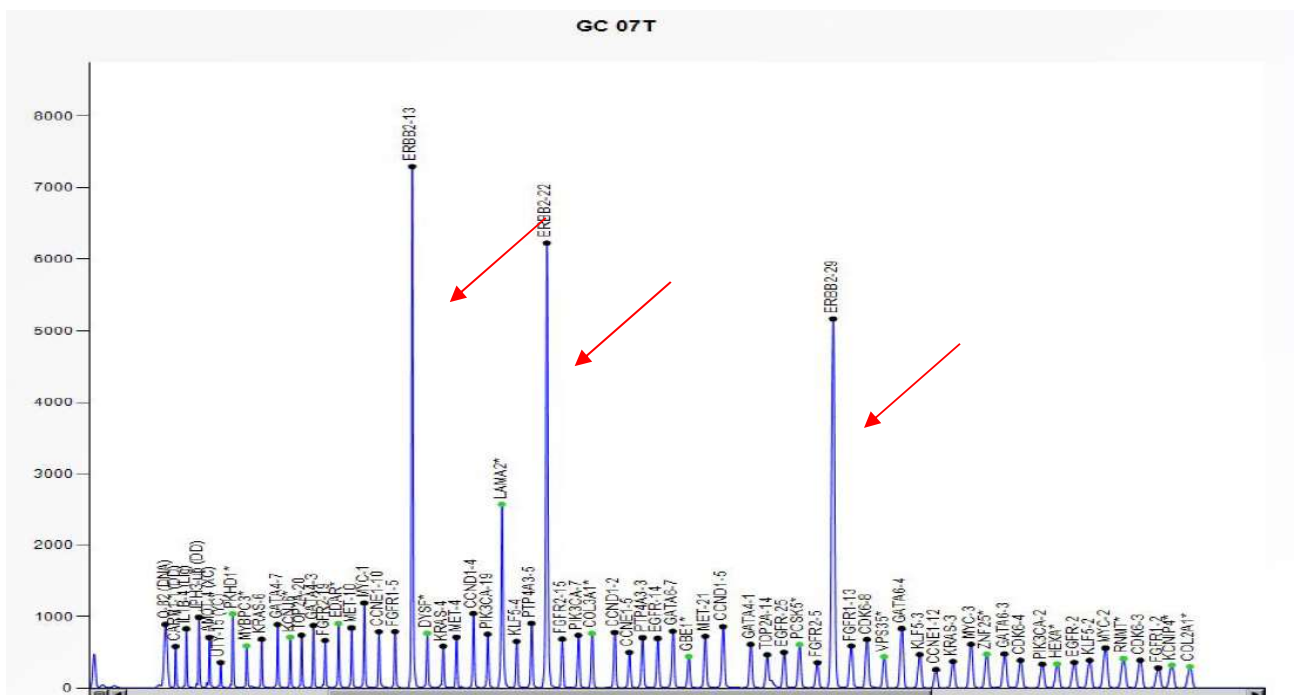
Фигура 15. MLPA анализ на пациент GC013 направен с помощта на Coffalyser.Net софтуер. Анализът показва едновременна делеция в *GATA4* и *FGFR1*.

Изследването показва наличието на генетични промени в *FGFR1* (*FGFR1 del. ex2-5-13*) гена при двама пациенти с ниско диференциран аденокарцином на стомаха (фиг. 16).



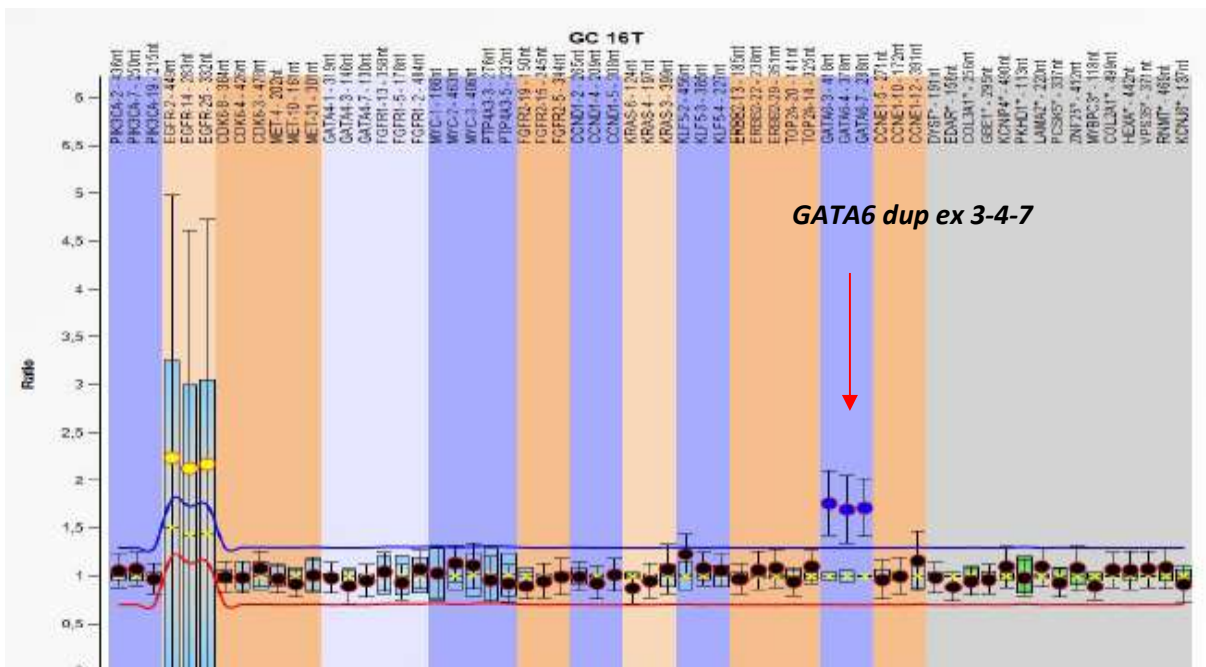
Фигура 16. MLPA анализ на пациент GC020 направен с помощта на Coffalyser.Net софтуер. Анализът показва едновременна делеция в *FGFR1* гена (екзони 2-5-13) и *GATA4* (екзони 1-3-7), както и дупликация на гена *GATA6* (екзони 3-4-7).

При стомашен карцином процента на амплификация и свръхекспресията на ERBB2 обикновено варира между 8% и 18%. В хода на анализа беше установена дупликация на ERBB2 гена (ERBB2 dup. ex13-22-29). Промени в ERBB2 гена бяха установени при два пациенти без информация за HER две статуса (фиг.17).



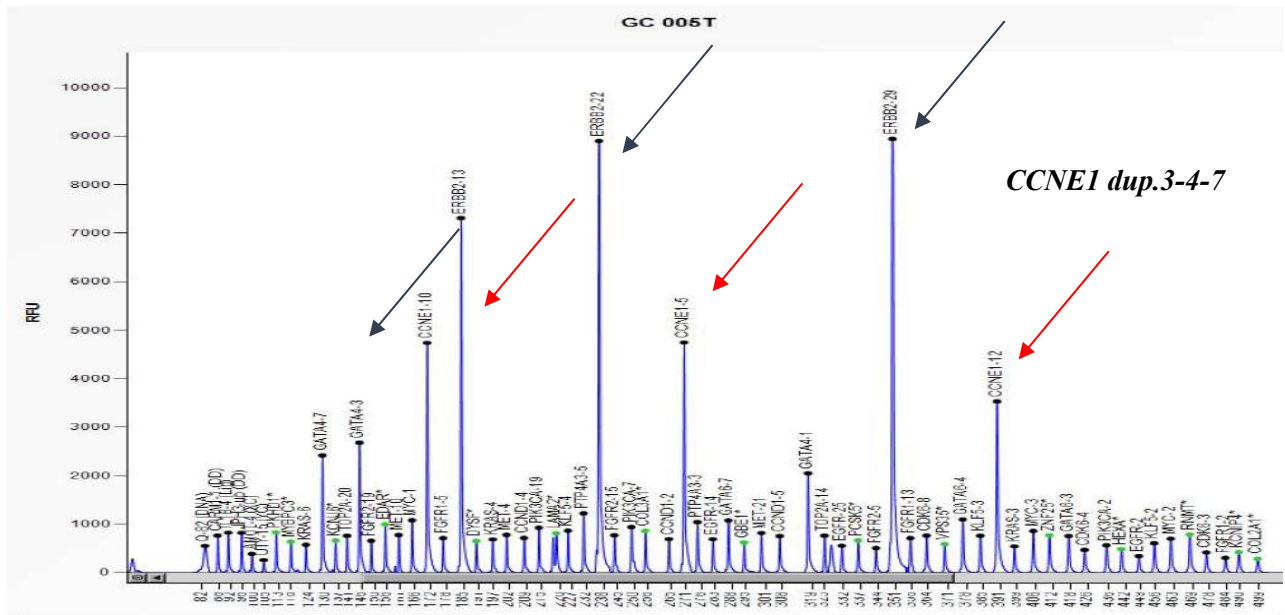
Фигура 17. MLPA анализ на пациент GC007 направен с помощта на Coffalyser.Net софтуер. Със стрелки са показани отчетените делеции в ERBB2 гена (ERBB2 dup.ex. 13-22-29).

Измежду 39 клетъчни линии от стомашен карцином GATA6 свръх-експресията разкрива болестна подгрупа, която експресира много гени като цяло и вероятно оказва влияние върху регулаторната функция на гена. Изследването показва наличието на дупликация в GATA6 (*GATA6 dup. ex3-4-7*) гена при четирима пациенти – трима с ниско диференциран аденокарцином на стомаха и един с неизвестен хистологичен тип на тумора (фиг.18)



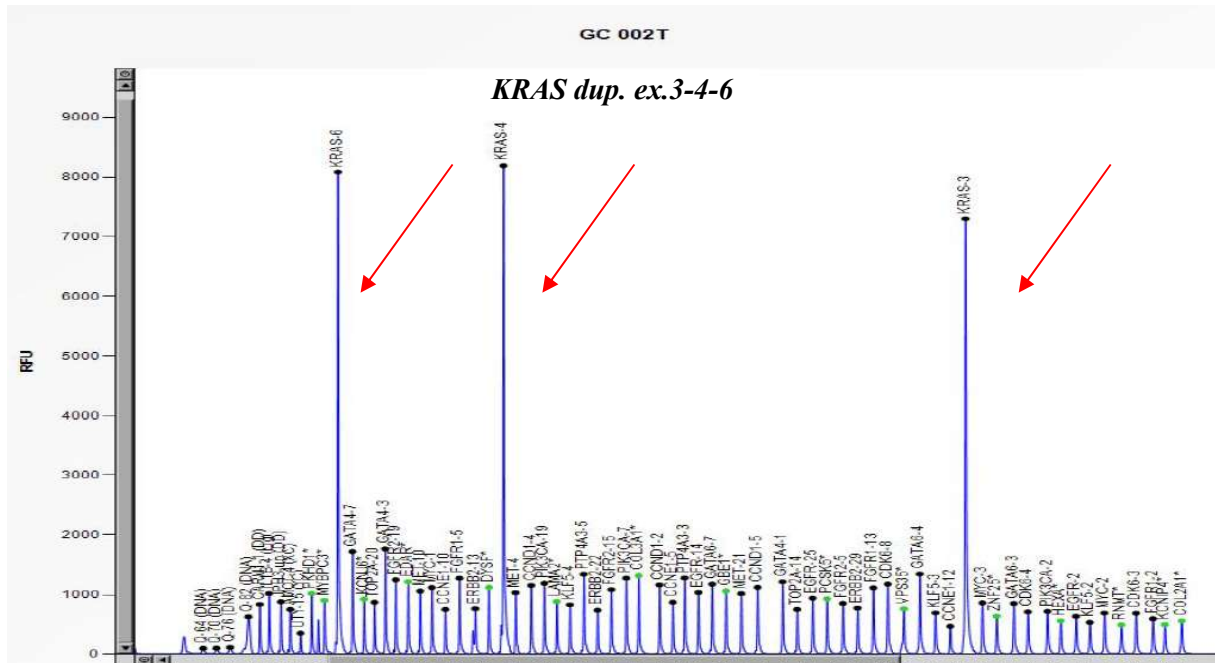
Фигура 18. MLPA анализ на пациент GC016 направен с помощта на Coffalyser.Net софтуер. Резултатът показва наличието на дупликация в GATA6 гена (*GATA dup.ex. 3-4-7*)

Анализът показва наличието на дупликация в *CCNE1* гена (*CCNE1 dup. 3-4-7*) при един пациент със стомашен карцином, означени на (фиг. 18) в червено. При пациента бяха установени и дупликации в *GATA4* и *ERBB2* гените, означени на (фиг. 19) в синьо.



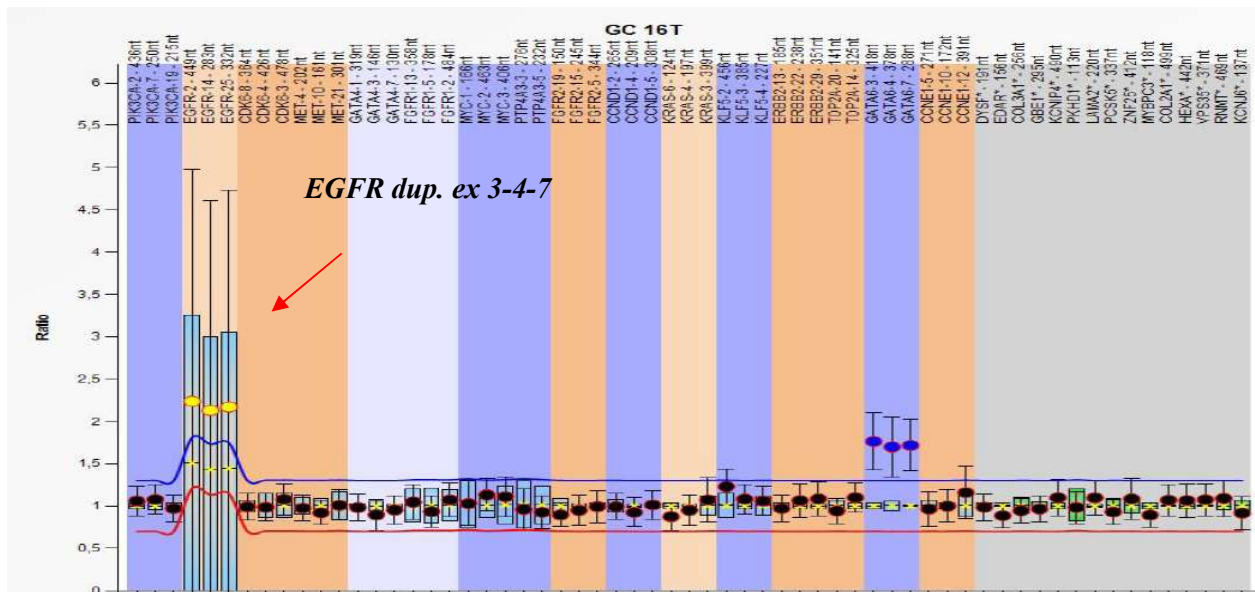
Фигура 19. MLPA анализ на пациент GC016 направен с помощта на Coffalyser.Net софтуер. Отчетената амплификация показва делеция в *CCNE1* гена (*CCNE1 dup.ex. 3-4-7*).

В резултат на проведения MLPA беше установена дупликация на екзони 3, 4 и 7 на *KRAS* гена при 61 годишен пациент с тубуларен ниско диференциран карцином на стомаха (фиг. 20).



Фигура 20. MLPA анализ на пациент GC002 направен с помощта на Coffalyser.Net софтуер. Отчетената амплификация показва дуплокация в *KRAS* гена (*KRAS* dup.ex. 3-4-6).

Промени при активирането на EGFR се появяват избирателно при стомашен карцином от дифузен субтип и са асоциирани с размера на тумора. В нашето изследване само при един пациент на 69 години с ниско диференциран пръстеновидноклетъчен карцином на стомаха беше установена голяма геномна промяна в EGFR гена (**EGFR dup ex. 3-4-7**)(фиг. 21).



Фигура 21. MLPA анализ на пациент GC016 направен с помощта на Coffalyser.Net софтуер. Отчетената амплификация показва дуплокация в EGFR гена (EGFR dup.ex. 3-4-7).

#### 4.1.2 Обсъждане

В настоящото изследване 9 от проучваните 25 пациенти са с установени с нерезектабилен карцином на стомаха. В този стадий на заболяването възможностите за лечение се свеждат до химиотерапия, съобразена с моментното състояние на пациента или включването му в клинично изпитване на нов вид терапия, а хирургията е само палиативна и се прилага само в случаите на стомашна обструкция или кървене. Все още в нашата страна голям процент от пациентите биват оперирани, най-често с идеята за постигане на циторедукция. Според повечето литературни данни обаче редукционната хирургия и извършването на операция, която

не е радикална, са свързани с по-малка продължителност на живота и са лош прогностичен фактор, което налага подобряване на предоперативното стадиране и търсене на предоперативни предиктори за резектабилността на стомашния карцином, за да бъдат избегнати ненужни лапаротомии.

Около 350 (1,6%) от белтък-кодиращите гени в човешкия геном показват рецидивни соматични мутации в туморите и са докладвани доказателства за участието им в канцерогенезата. Някои от тях като семейството на протеин киназите са с ключова роля в клетъчните процеси и прогресията на рака. Един от важните подкласове „движещи“ мутации в туморната тъкан са тези, които отговарят за устойчивостта на рака към терапия. Откриват се в рецидивите на пациенти, които първоначално са отговорили на терапията, но в последствие са развили резистентност. Търсенето и анализирането на подобни мутации беше осъществено и в настоящото изследване чрез MLPA метода, който се използва за откриване на големи делеции, дупликации и геномни пренареждания. Изолираната ДНК беше висококачествена и с концентрация между 50 и 250 ng, което отговаря на приетите стандарти.

В 18% до 22% от стомашния карцином и карцинома на гастроезофагеалната връзка се установява амплифициране или свръхекспресия на GATA 6 ген, локализиран в хромозома 18, което е в съответствие с нашите резултати, според които най-често срещаната мутация беше дупликация в GATA6 гена и се установи при 20% от случаите.

Протеинът, кодиран от CDK6 гена, е част от семейството на циклин-зависимата протеин киназа (CDK). Групата на CDK са много близки до тези на *Saccharomyces cerevisiae cdc28* и *Schizosaccharomyces pombe cdc2*, и са важни регулатори на прогресията на клетъчния цикъл. Експресията на този

ген е повишена при някои типове рак. Нашият анализ показва наличието на дупликация в CDK6 гена при двама пациенти.

GATA4 е транскрипционен фактор, способен да стопира развитието на различни типове човешки неоплазми. Епигенетичната активация в GATA4(GATA5) чрез метилиране на CpG региони е често ранно събитие по време на стомашната карциногенеза и се свързва с инфекция с *H. pylori*. Следователно GATA4/GATA5 могат да играят роля на супресорни гени. Проведеното изследване показва наличието на генетични промени в GATA4 при трима пациенти.

Рецепторът за фибробластен растежен фактор (FGFR1) е част от семейството на рецепторните тирозин кинази, чието активиране чрез амплификация, мутация или транслокация води до пролиферация на туморните клетки и тяхното оцеляване при много карциноми. Ние установяваме делеции в FGFR1 при двама пациенти.

Амплификацията на ERBB2 гена се асоциира с няколко неоплазми като тези на гърдата, стомаха и панкреаса, както и с неврофибробластома. При стомашния карцином процента на амплификацията и свръхекспресията му обикновено варира между 8% и 18%. В хода на нашия анализ резултатите са сходни - беше установена дупликация на ERBB2 гена при двама пациенти – 8%.

Доказано е, че 19q12 генната група, включваща CCNE1 гена е експресирана във висока степен в стомашните тумори, в сравнение с нетуморни стомашни проби. В нашето изследване се установява дупликация в CCNE1 гена само при един пациент със стомашен карцином.

При пациентите с нерезектабилен тумор се установи висок процент на мутации - 66% (6/9), като мутации в KRAS и EGFR гените бяха открити

само при тях. Генът KRAS е хомолог на онкогена Kirsten ras от генната фамилията ras при бозайници. Кодира протеин, който е член на малката GTPase суперфамилия. При гена е докладвана аминокиселинна замяна – с.35G>A (p.Gly12Asp) във втори екзон, която е отговорна за активиращата мутация, водеща до променен белтъчен продукт, отговорен за развитието на онкологични заболявания като белодробен аденокарцином, муцинозен аденом, дуктален карцином на панкреаса и колоректален карцином. В резултат на нашия анализ беше установена дупликация на екзони 3, 4 и 6 на KRAS гена.

EGFR генът е локализиран в хромозома 7p11 и кодира рецептор с размери 170 kDa, намиращ се на клетъчната мембрана под формата на инактивни мономери. След като лиганда се свърже с извънклетъчната част на рецептора, той претърпява конформационни промени, димеризира се и става автофосфолириран в ключов тирозинен участък в извънклетъчния тирозинкиназен домен. Това води до активиране на каскади от реакции, които контролират клетъчното оцеляване, инхибиция на апоптоза и пролиферация. Свърхекспресия на EGFR е описана при много човешки тумори, включително и стомашния карцином . Промени при активирането на EGFR се появяват избирателно при стомашен карцином от дифузен тип и са асоциирани с размера на тумора. В нашето изследване също се установи голяма геномна промяна в EGFR гена също при пациент с дифузен тип, ниско диференциран пръстеновидноклетъчен карцином, който е нерезектабилен и не може да бъде отстранен поради големите си размери и остатъчната макроскопски видима туморна тъкан в съседни органи.

**4.2 ЗАДАЧА 2:** Да се проучи връзката на индивидуалните особености – пол, възраст и индекс на телесна маса на пациентите с карцином на стомаха с резектабилността му.

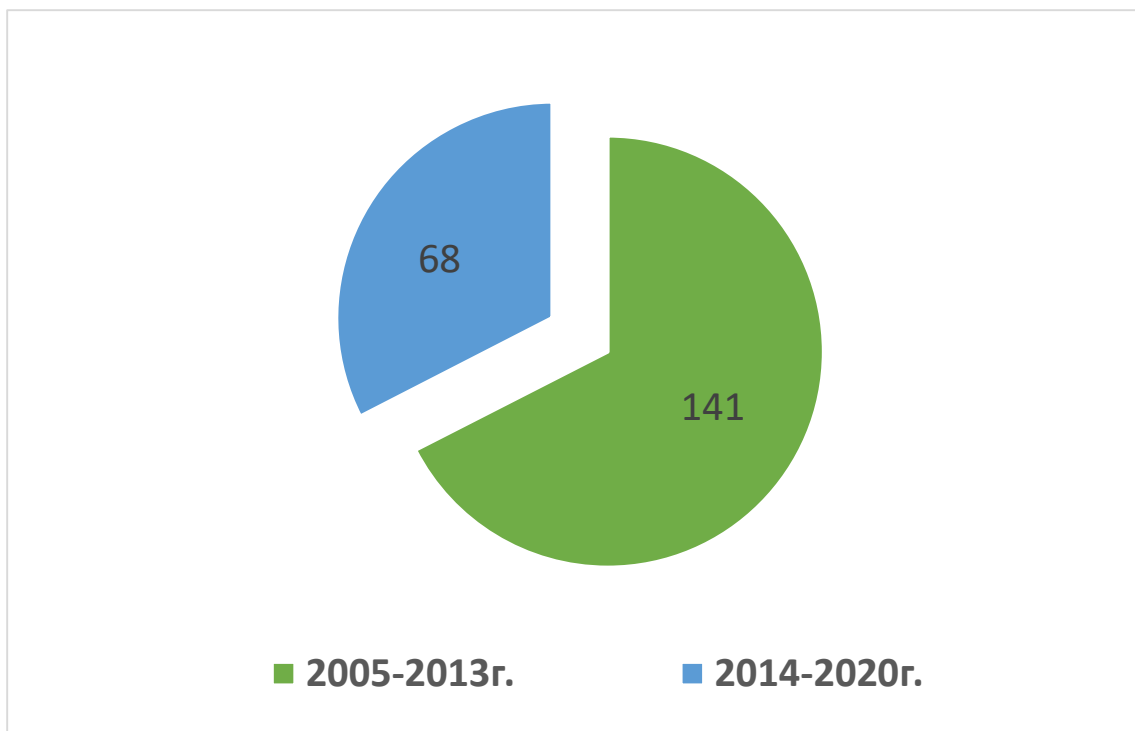
#### 4.2.1 Резултати

За периода 2005-2013г. ретроспективно са проследени 141 пациента, 64 от тях (45,4%) са с нерезектабилен тумор и 77 (54,6%) – с резектабилен. За периода 2014-2020г. са разгледани 68 пациента, като 40 от пациентите (58,8%) са с нерезектабилен тумор и 28 (41,2%) – с резектабилен. Като няма статитистически значима разлика между пациентите от двата периода по отношение резкетабилността на тумора ( $p=0,069$ )(Табл.5)(Фиг.22,23).

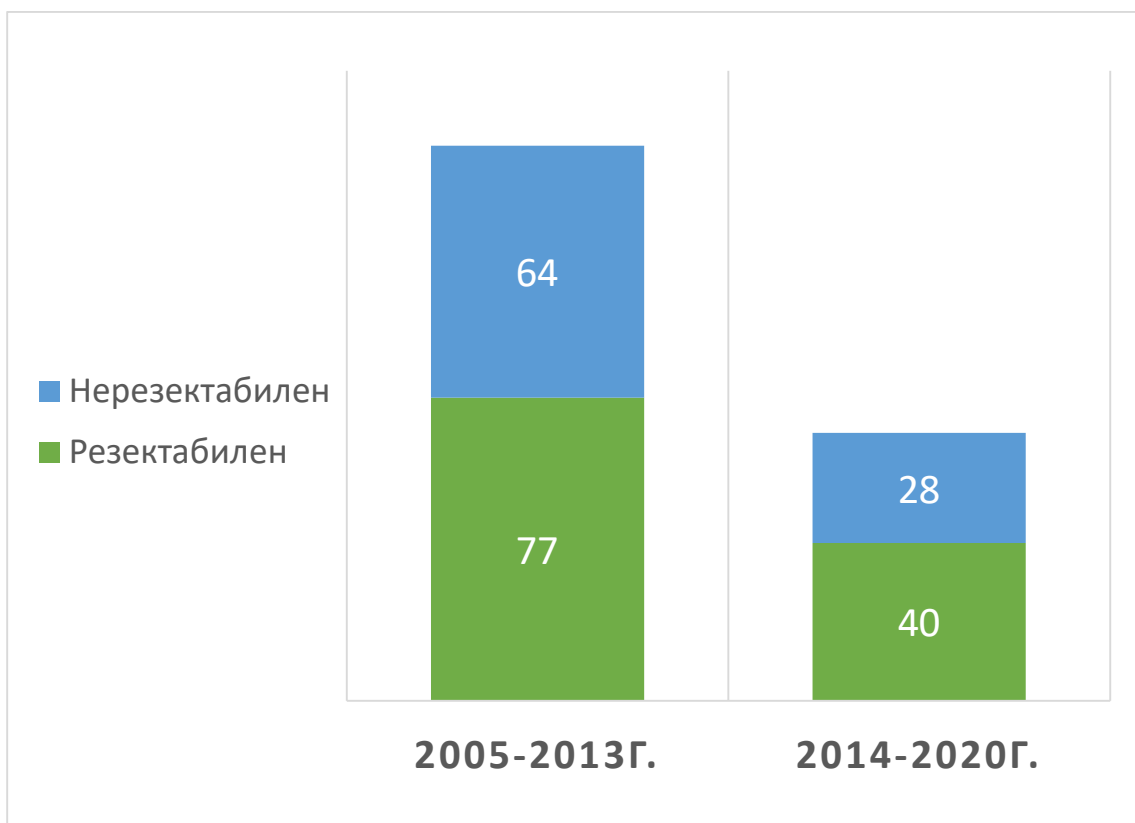
Резектабилен карцином		Група		Общо	p
		Пациенти (2-79)	Пациенти (70-209)		
Не	N	40	64	104	0,069*
	%	58,8%	45,4%	49,8%	
Да	N	28	77	105	
	%	41,2%	54,6%	50,2%	
Общо	N	68	141	209	
	%	100,0%	100,0%	100,0%	

Таблица 5. Връзката между радикалността и пациентите за периода от 2005 до 2014 г. и от 2014 до 2020 г.

\* Chi-square test



Фигура 22. Разпределение на броя на пациентите за двата времеви периода.



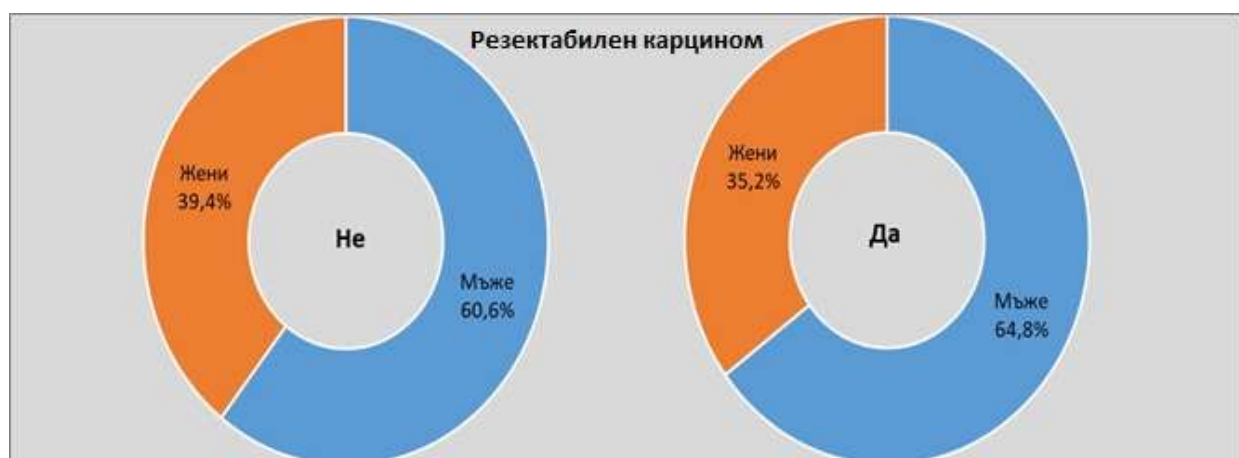
Фигура 23. Съотношение на пациентите по критерия резектабилност в зависимост от периода на изследване.

Общо за целия период 2005-2020г. 105 пациенти (50,2%) са с резектабилен тумор и 104 (49,8%) – с нерезектабилен. По отношение на пола 131 (62,7%) са мъже и 78 (37,3%) са жени. Не се установява статистически значима разлика между резектабилните и нерезектабилните тумори по отношение на пола ( $p=0,531$ )(Табл.6)(Фиг.24).

Пол		Резектабилен карцином		Общо	p
		Не	Да		
Мъже	N	63	68	131	0,531*
	%	60,6%	64,8%	62,7%	
Жени	N	41	37	78	
	%	39,4%	35,2%	37,3%	
Общо	N	104	105	209	
	%	100,0%	100,0%	100,0%	

Таблица 6. Връзка между радикалността на операцията и пола на пациентите с карцином на стомаха.

\* Chi-square test



Фигура 24. Разпределение на пациентите с резектабилен и нерезектабилен карцином на стомаха по пол.

Средната възраст на всички пациенти с диагностициран карцином на стомаха за периода 2005-2020г. е 63,9г., което е в съответствие с резултатите докладвани и от други автори. Средната възраст на пациентите с резектабилен карцином на стомаха е  $61,8 \pm 10,4$ г., а на нерезектабилните –  $66,03 \pm 10,5$ г., като разликата е статистически значима ( $p=0,004$ )(Табл.7)(Фиг.25).

Показател	Резектабилен карцином	N	Mean	Median	SD	Min	Max	t	df	p
Възраст г	Не	104	66,03	67,50	10,54	37,00	86,00	2,91	207	0,004*
	Да	105	61,80	63,00	10,48	33,00	83,00			

Таблица 7. Връзка между възрастта на пациентите с карцином на стомаха и резектабилността на тумора.

\* Independent Samples t-test



Фигура 25. Средната възраст на пациентите с резектабилен карцином на стомаха сравнена с тази на пациентите с нерезектабилен карцином на стомаха.

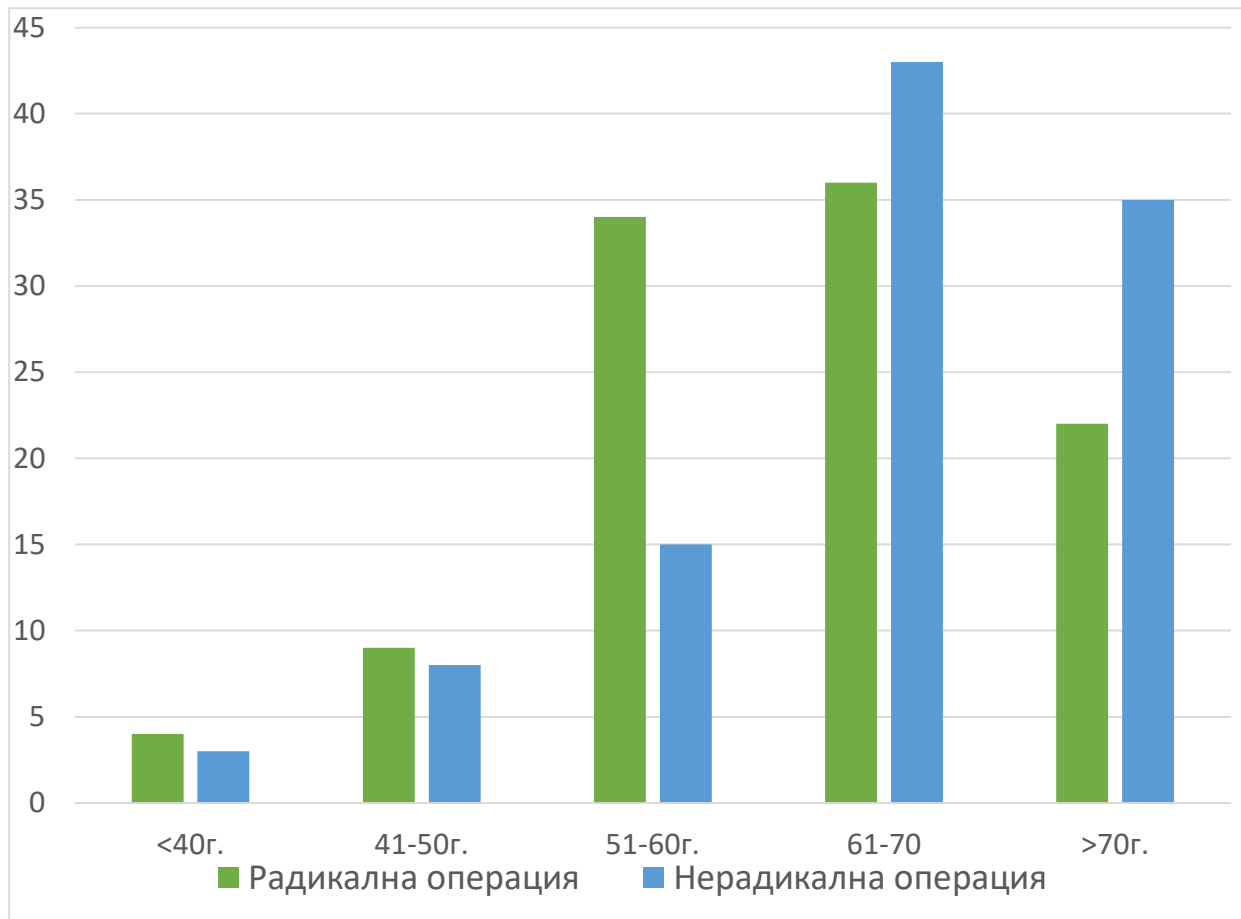
Статистически значимата разлика по отношение на възрастта между пациентите с резектабилен карцином на стомаха и тези с нерезектабилен е за сметка на възрастовите групи между 51-60 г. и при > 70 г. ( $p=0,025$ ) (Табл.8)(Фиг.26).

Възрастова група		Резектабилен карцином		Общо	p
		Не	Да		
≤ 40	N	3 <sub>a</sub>	4 <sub>a</sub>	7	0,025*
	%	2,9%	3,8%	3,3%	
41-50	N	8 <sub>a</sub>	9 <sub>a</sub>	17	
	%	7,7%	8,6%	8,1%	
51-60	N	15 <sub>a</sub>	34 <sub>b</sub>	49	
	%	14,4%	32,4%	23,4%	
61-70	N	43 <sub>a</sub>	36 <sub>a</sub>	79	
	%	41,3%	34,3%	37,8%	
>70	N	35 <sub>a</sub>	22 <sub>b</sub>	57	
	%	33,7%	21,0%	27,3%	
Общо	N	104	105	209	
	%	100,0%	100,0%	100,0%	

Таблица 8. Разпределение на пациентите с карцином на стомаха по възрастови групи и връзката им с резектабилността на тумора.

\* Chi-Square Tests

Забележка: Различните индексни букви означават, че пропорциите по колоните се различават значимо една от друга при ниво 0,05



Фигура 26. Статистически значимата разлика по отношение на възрастта между пациентите с резектабилен карцином на стомаха и тези с нерезектабилен е за сметка на възрастовите групи между 51-60г. и при > 70г. ( $p=0,025^*$ ).

Направени са антропометрични измервания на ръста и теглото при 57 пациенти с карцином на стомаха, като при тях е изчислен и ИТМ. Средният ИТМ е 24,7. 25 от пациентите с карцином на стомаха (43,9%) са с наднормено тегло, но не се установява статистически значима зависимост между ИТМ и резектабилността на тумора ( $p=0,256$ )(Табл. 9). Няма статистически значима разлика и между наличието на наднормено тегло и резектабилността на тумора ( $p=0,426$ )(Табл. 10)(Фиг.27)(Фиг.28).

Показател	Резектабилен карцином	N	Mean	Median	SD	Min	Max	t	df	p
BMI kg/m <sup>2</sup>	Не	33	24,18	23,00	4,26	15,00	33,00	1,15	55	0,256*
	Да	24	25,33	25,50	2,85	20,00	32,00			

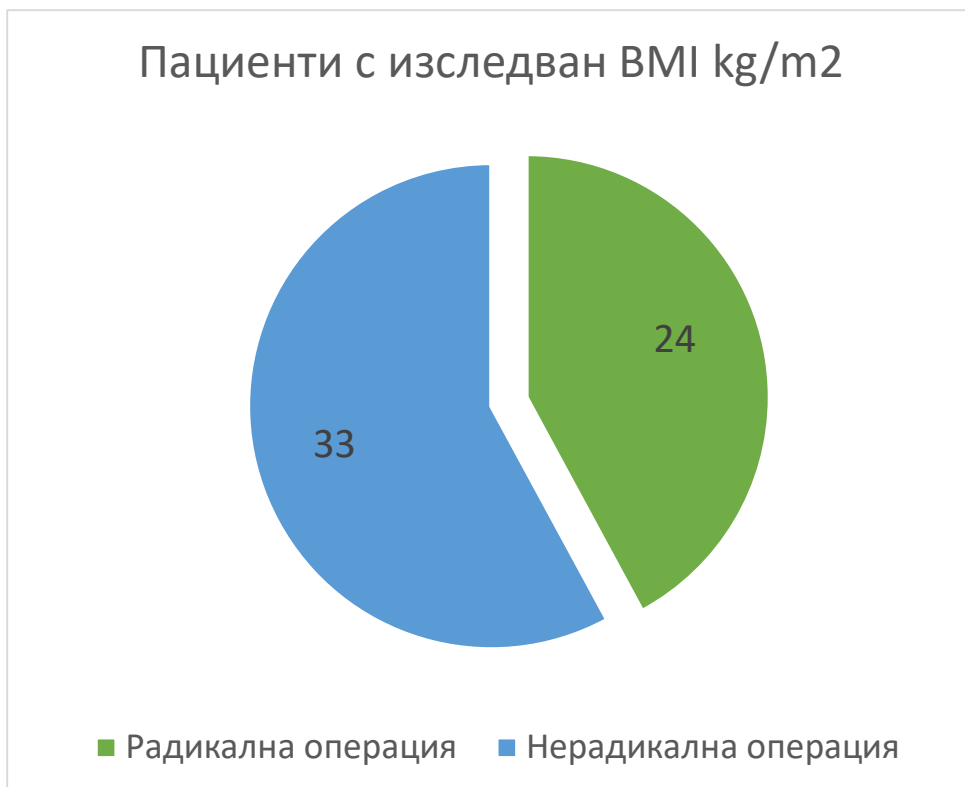
Таблица 9. Връзка между ИТМ при пациенти с карцином на стомаха и резектабилността на тумора.

\*Independent Samples t-test

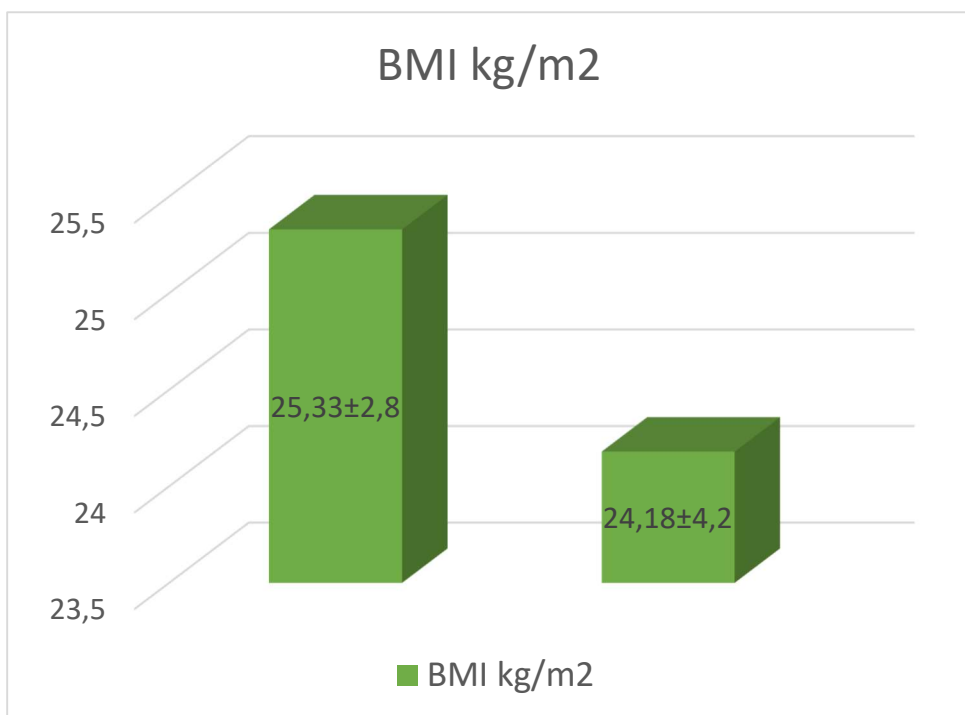
BMI		Резектабилен карцином		Общо	p
		Не	Да		
<=25 kg/m <sup>2</sup>	N	20	12	32	0,426*
	%	60,6%	50,0%	56,1%	
>25 kg/m <sup>2</sup>	N	13	12	25	
	%	39,4%	50,0%	43,9%	
Общо	N	33	24	57	
	%	100,0%	100,0%	100,0%	

Таблица 10. Връзка между наличието на наднормено тегло при пациентите с карцином на стомаха и резектабилността на тумора.

\* Chi-Square Tests



Фигура 27. Съотношение на броя на изследваните пациенти с BMI спрямо радиакалността



Фигура 28. Средния BMI спрямо резектабилността

#### 4.2.2 Обсъждане

В настоящето изследване 49,8% от пациентите са с нерезектабилен тумор, което отново потвърждава големия процент на иноперабилни случаи на карцином на стомаха в България. Тези резултати са съпоставими и с процента на нерезектабилните тумори сред пациентите в Европа – 40%, но са много по-лоши в сравнение с тези в Япония – 10%. Освен това, тенденцията за късната диагностика се задържа в годините - за периода 2005-2013г. 64 от пациентите (45,4%) на Клиниката по хирургия на УМБАЛ “Александровска” - София са с нерезектабилен тумор, а за периода 2014-2020г. 40 от пациентите (58,8%) в Клиниката са с нерезектабилен тумор. Въпреки, че тенденцията не е статистически значима ( $p=0,069$ ), има влошаване в показателите, а би следвало да е обратното, предвид развитието на скрининговите програми и напредъка в диагностиката. 67,2% от нашите пациенти с карцином на стомаха са от мъжки пол, което потвърждава данните от литературата, че мъжете са с по-голям риск от развитие на карцином на стомаха. Не се установява обаче статистически значима разлика между резектабилните и нерезектабилните тумори по отношение на пола ( $p=0,531$ ), което означава, че според нашето проучване той не може да се приеме за предиктор на резектабилността.

Средната възраст на пациенти с диагностициран карцином на стомаха е 63,9г., която е по-ниска в сравнение с предишните години и показва тенденция за спадане на възрастта на пациентите с карцином на стомаха, което се потвърждава и от други автори. Средната възраст на пациентите с резектабилен карцином на стомаха в нашето проучване е 61,8г., а на нерезектабилните – 66,3г., като разликата е статистически значима ( $p=0,004$ ). Нещо повече, карциномите на стомаха при пациентите

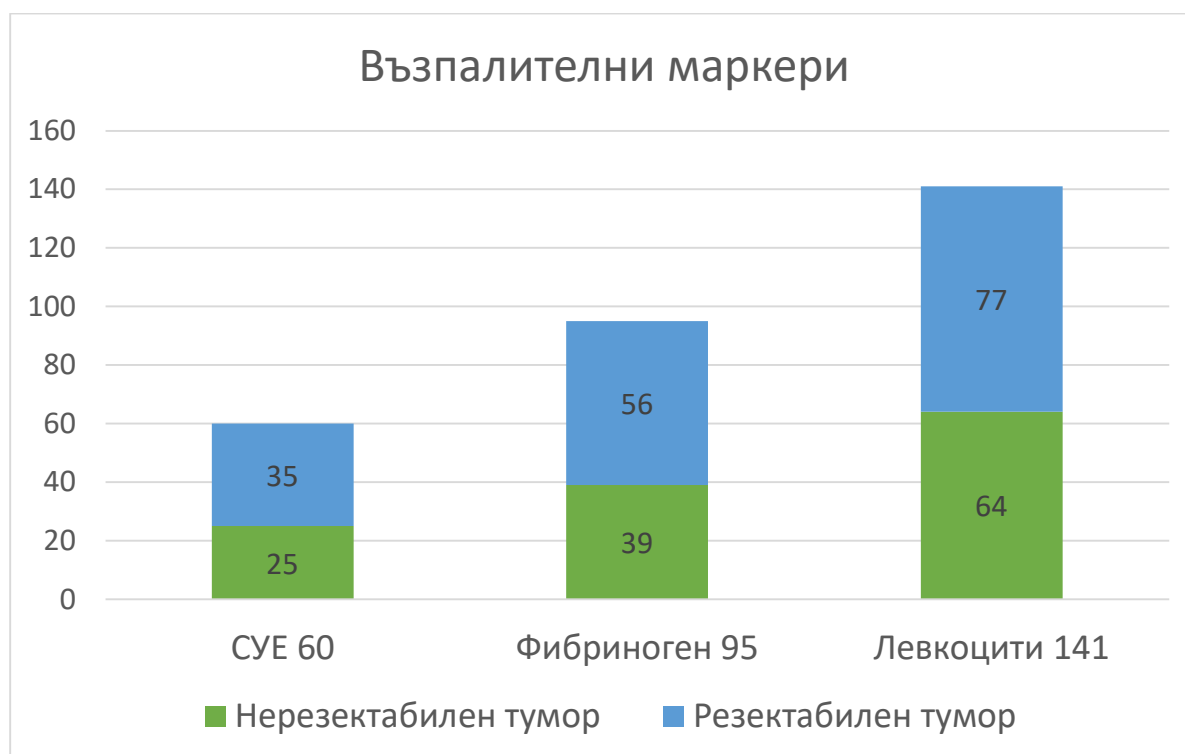
между 51 и 60г. са със статистически значима по-голяма вероятност да бъдат резектаблни, а тези при пациентите над 70г. – със статистически значима по - голяма вероятност да бъдат нерезектабилни.

Затлъстяването е рисков фактор за развитие на злокачествени заболявания с различна локализация. В нашето изследване 43,9% от пациентите с карцином на стомаха са с наднормено тегло. Въпреки, че според редица автори затлъстяването е свързано със затруднения при извършването на операцията, ние не регистрираме статистически значима разлика между резектабилните и нерезектабилните тумори по отношение на ИТМ и наднорменото тегло ( $p=0,256$  и  $p=0,426$  съответно).

**4.3 ЗАДАЧА 3:** Да се установи има ли връзка между стойностите на някои основни маркери на възпалението – левкоцити, фибриноген и СУЕ с резектабилността на карцинома на стомаха.

#### 4.3.1 Резултати

От всички 141 ретроспективно проследени пациенти - 64 (45,4%) са с нерезектабилен тумор и 77 (54,6%) – с резектабилен. Левкоцити са изследвани при всички пациенти, СУЕ при 60 пациента (35 са с резектабилен тумор, 25 са с нерезектабилен), а фибриноген при 95 (56 с резектабилен тумор, 39 нерезектабилен) от тях (Фиг.29). Средната стойност на левкоцитите при пациентите с резектабилен тумор е  $8,13 \times 10^9 \pm 2,68$ , а средната стойност на левкоцитите при пациентите с нерезектабилен тумор е  $8,69 \times 10^9 \pm 3,15$ , като разликата не е статистически значима ( $p=0,370$ )(Табл.11).



Фигура 29. Изследвани възпалителни маркери спрямо резектабилността

Показател	Резектабилен карцином	N	Mean	Median	SD	Min	Max	p
левкоцити x 10 <sup>9</sup> /л	Не	64	8,69	8,00	3,15	3,20	19,20	0,370*
	Да	77	8,13	7,40	2,68	2,49	16,20	

Таблица 11. Връзката между резектабилността на тумора и левкоцитите.

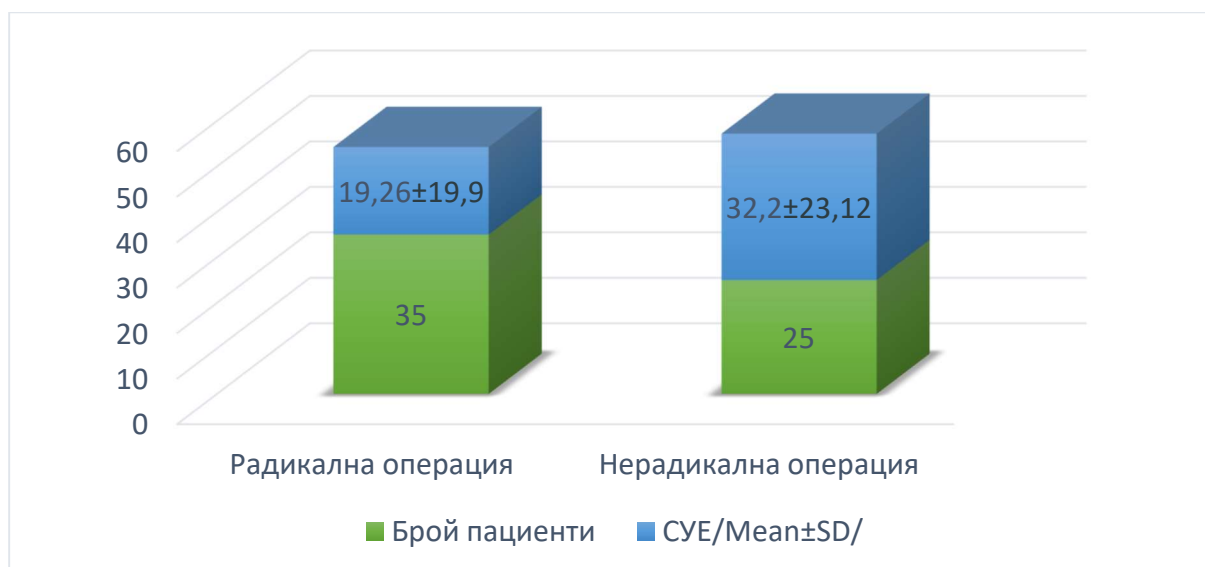
\* Mann-Whitney test

Средната стойност на пациентите със СУЕ при пациентите с нерезектабилен карцином е 32,2mm/h±23,12, а при тези с резектабилен тумор е 19,262mm/h±12,9, като разликата е статистически значима (p=0,008) (Табл.12)(Фиг.30).

Показател	Резектабилен карцином	N	Mean	Median	SD	Min	Max	t	df	p
СУЕ mm/h	Не	25	32,20	24,00	23,12	5,00	110,00	2,76	58	0,008*
	Да	35	19,26	16,00	12,99	2,00	58,00			

Таблица 12. Връзката между резектабилността на тумора и СУЕ.

\* Independent Samples t-test



Фигура 30. СУЕ спрямо резектабилността на тумора (p=0,008)

Средната стойност на фибриногена при пациентите с нерезектабилен тумор е 4,79g/l  $\pm$ 1,44, а при пациентите с резектабилен тумор 4,11 g/l  $\pm$ 1,18, като разликата е статистически значима ( $p=0,013$ )(Табл. 13)(Фиг. 31).

Показател	Резектабилен карцином	N	Mean	Median	SD	Min	Max	t	df	p
фибриноген g/l	Не	39	4,79	4,70	1,44	1,87	8,12	2,54	93	0,013*
	Да	56	4,11	4,13	1,18	1,90	7,31			

Таблица 13. Връзката между резектабилността на тумора и фибриногена.

\* Independent Samples t-test



Фигура 31. Фибриноген спрямо резектабилността на тумора ( $p=0,013$ )

#### 4.3.2 Обсъждане

В последните години широко се изследва връзката между възпалението, вродения имунитет и рака. Много проучвания доказват че възпалителния синдром е свързан с по-лоша прогноза и по-висока смъртност при пациентите с карцином. Системния възпалителен отговор

играе основна роля в карциногенезата и разпространението на тумора. Редица маркери на възпалението са изследвани като прогностични фактори като съотношението между неутрифилите и лимфоцитите, съотношението между тромбоцитите и лимфоцитите. В настоящия дисертационен труд е изследвана връзката между броя на левкоцитите и резектабилността при пациентите с карцином на стомаха, като не се установява статистически значима разлика.

Други автори изследват значението между някои острофазови белтъци, като албумин, С-реактивен протеин, прокалцитонин за предиктивни фактори при пациенти с карцином на стомаха. С-реактивния протеин се образува от хепатоцитите и е маркер на възпалението предизвикана от инфекция или травма. Редица автори установяват високи нива на С-реактивния протеин при различни видове карцином като коло ректален, белодробен и стомашен. Други автори доказват връзката на други маркери на възпалението като интерлефкин 6 и със стадия на заболяването, степента на инвазия на тумора (Т) и прогнозата при пациентите с различен вид рак включително при пациентите с карцином на стомаха.

В нашето проучване изследваме стойностите на СУЕ и фибриноген при пациенти с карцином на стомаха. СУЕ или скорост на утаяване на еритроцитите е показател, който ни дава информация за скоростта, с която кръвта се разделя на плазма и еритроцити. Когато при кръвни изследвания се установи нормална стойност на СУЕ, това означава, че в организма не протича възпалителна реакция. Затова СУЕ се използва като един от критериите при поставяне на диагнози. Чрез СУЕ могат да се установят и редица сериозни заболявания, включително автоимунни и ракови. Fieldman et al. съобщават че СУЕ и CRP имат статистическа значима връзка с развитието на стомашен рак. Установено е също, че високото СУЕ се

наблюдава при различни видове рак с по-лоша прогноза, включително Ходжкинов лимфом стомашен карцином, бъбречноклетъчен карцином, рак на гърдата и MALT лимфом. Описано е че повишеното ниво на СУЕ съответства с повишения туморен маркер СЕА. Доказано е, че при напреднал локорегионален туморен процес, СУЕ се завишава, което се обяснява с перитуморното възпаление.

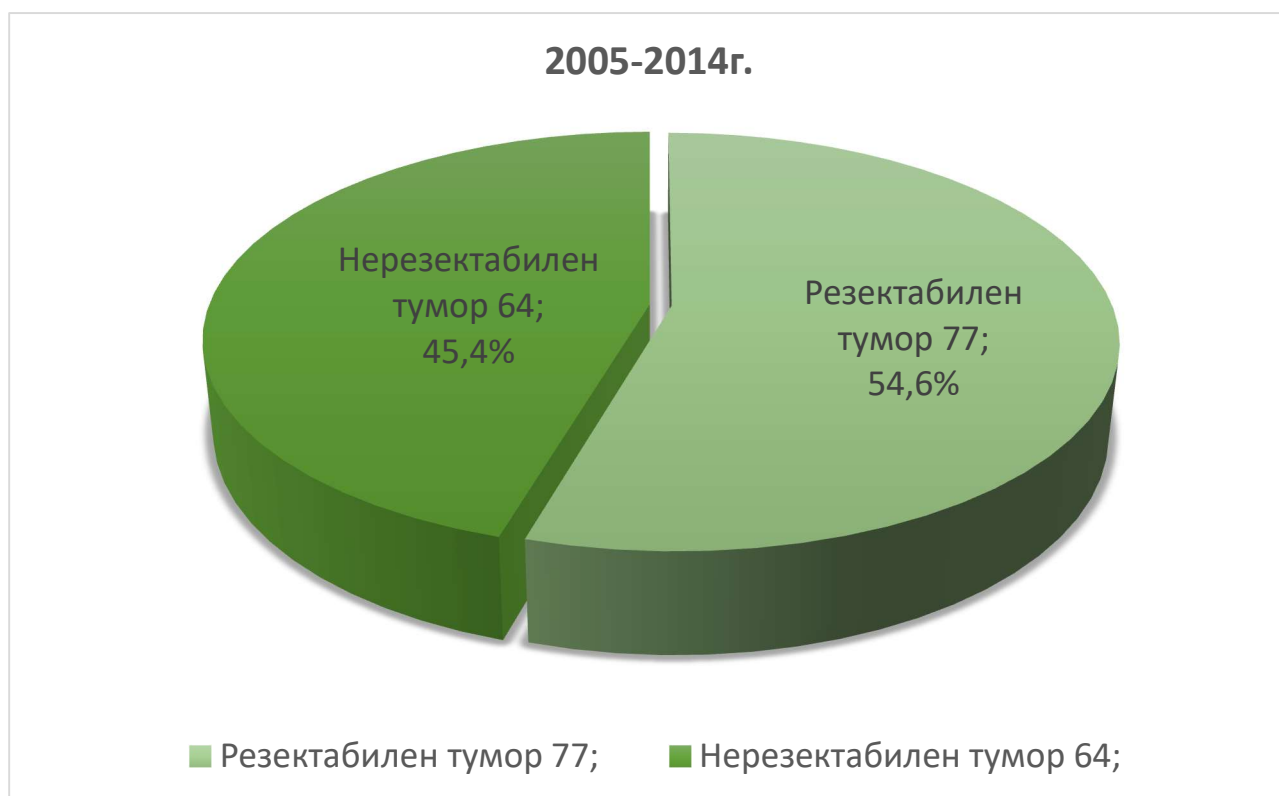
Фибриногенът (фактор I) е важен белтък от каскадата на кръвосъсирването. Намира се разтворен в плазмата и тромбоцитните гранули. В последната фаза на кръвосъсирването фибриногенът се трансформира в неразтворимата си форма – фибрин и участва в оформянето на кръвния съсирек.

Произвежда се от черния дроб в количество 1.7 – 5 g на ден, а полуживотът му в плазмата е 3-5 дни. Извън ролята му в каскадата на кръвосъсирването, фибриногенът е част от групата на острофазовите белтъци, чиито нива се повишават при наличие на системен отговор на организма към тежка увреда (травма, обширно изгаряне, инфекция и др.). Preston et al. докладват за повишен серумен фибриноген при пациенти с аденокарцином на панкреаса. Освен това Tanaka et al. демонстрира, че високите плазмени нива на фибриноген определят по-лоши патологични характеристики и положителна лимфоваскуларна инвазия. Lee et al. съобщават, че размерът на тумора, дълбочината на инвазия, стадия на тумора, метастазите в лимфните възли и лошата преживяемост на пациента са в положителна корелация с предоперативните нива на плазмен фибриноген при напреднал стомашен карцином. В настоящия дисертационен труд установяваме, че при нерезектабилните тумори на стомаха те имат по-високи стойности. Това предполага връзка на възпалителния синдром при пациентите с карцином на стомаха и резектабилността му.

**4.4 ЗАДАЧА 4:** Да се установи има ли връзка между стойностите на туморните маркери СЕА и СА 72-4 с резектабилността на карцинома на стомаха.

#### 4.4.1 Резултати

Шестдесет и четири от пациентите в ретроспективното проучване (45,4%) са с нерезектабилен тумор и 77 (54,6%) – с резектабилен. От тях туморния маркер СЕА е изследван - при 55 (39,01%) от тях, а СА 72-4 при 50 (35,46 %) пациенти (Фиг.32,33).



Фигура 32. Броя на изследваните пациенти с изследвани туморни маркери и резектабилността



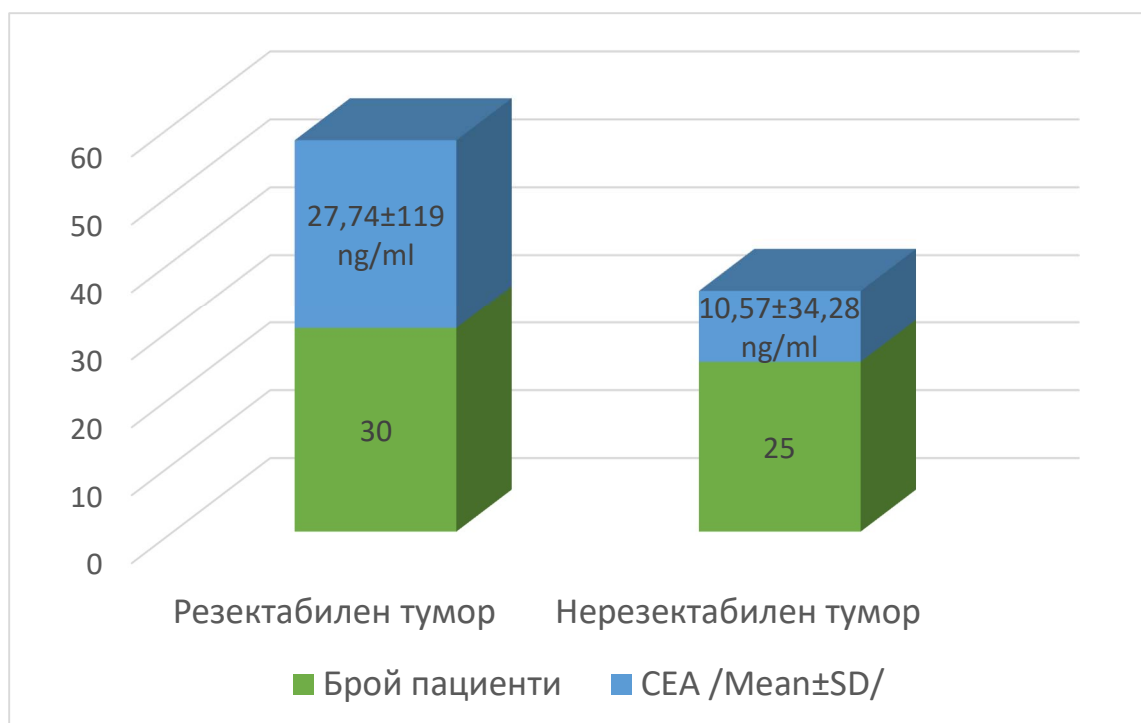
Фигура 33. Процентно съотношение на изследваните пациенти

Средната стойност на туморния маркер CEA при изследваните пациенти с диагностициран карцином на стомаха е 19,9 ng/ml. Средната стойност при пациентите с резектабилен карцином на стомаха е 27,74 ng/ml, а на нерезектабилните – 10,57 ng/ml, като разликата е статистически значима ( $p=0,039$ )(Табл.14)(Фиг.34).

Показател	Резектабиле н карцином	N	Mean	Median	SD	Min	Max	p
CEA ngr/ml	Не	25	10,57	1,50	34,28	0,20	160,00	0,039*
	Да	30	27,74	2,12	119,08	0,20	651,00	

Таблица 14. Връзката между туморния маркер CEA и резектабилността на стомашния карцином.

\* Mann-Whitney test



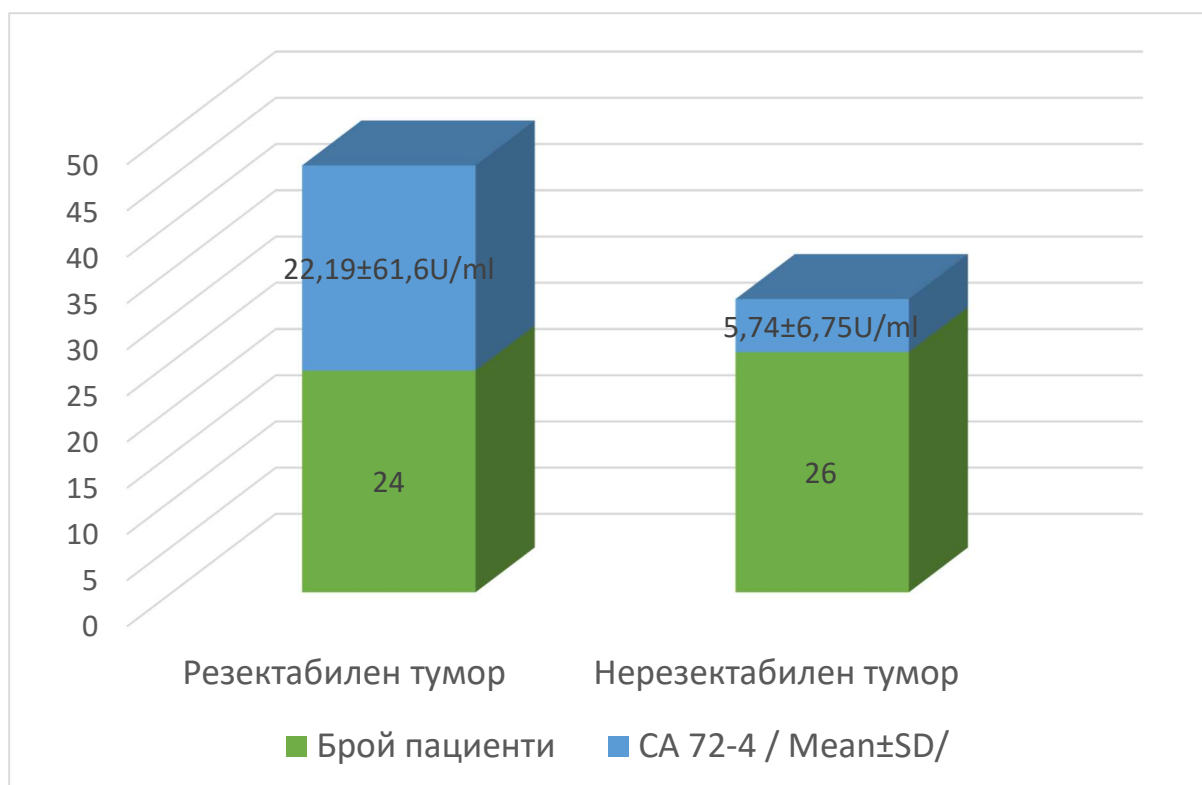
Фигура 34. Средната стойност на CEA при изследваните пациенти и връзката му с резектабилността( $p=0,039$ )

При пациентите изследвани за туморния маркер CA72-4 - 24 от тях са с нерезектабилен тумор, а 26 с резектабилен. Средната стойност на туморния маркер CA72-4 при изследваните пациенти с диагностициран карцином на стомаха е 14,2 U/ml. Средната стойност при пациентите с резектабилен карцином на стомаха е 22,19 U/ml, а на нерезектабилните – 5,74 U/ml, като разликата не е статистически значима ( $p=0,786$ )(Табл.15)(Фиг.35).

Показател	Резектабилен карцином	N	Mean	Median	SD	Min	Max	p
CA 72-4 U/ml	Не	24	5,74	2,44	6,75	0,71	29,15	0,786*
	Да	26	22,19	2,40	61,64	0,62	300,00	

Таблица 15. Връзката между туморния маркер CA72-4 и резектабилността на стомашния карцином.

\* Mann-Whitney test



Фигура 35. Средната стойност на CA 72-4 при изследваните пациенти и връзката му с резектабилността ( $p=0,786$ )

#### 4.4.2 Обсъждане

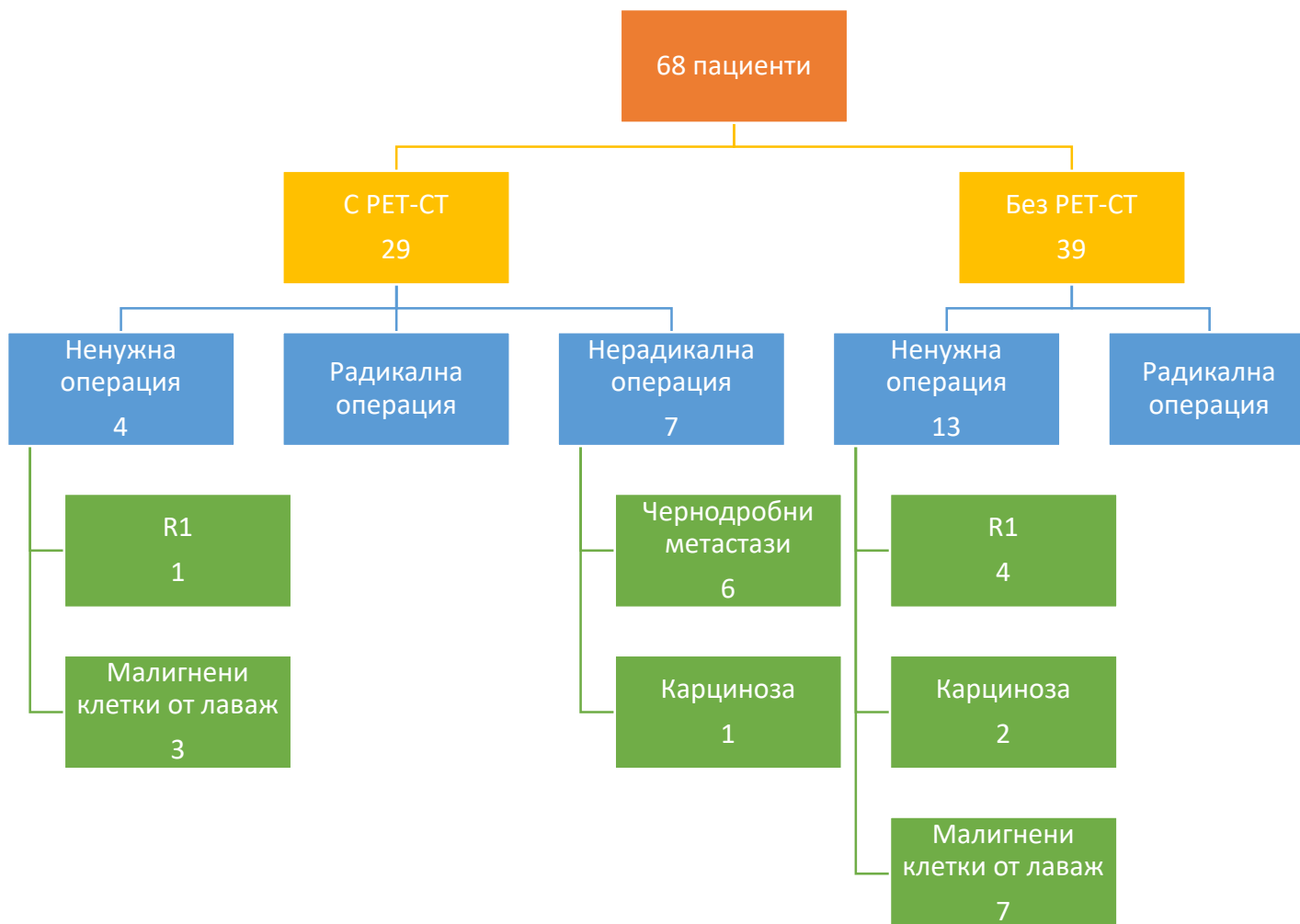
Туморните маркери, не са специфични за определено злокачествено заболяване и се влияят от различни външни фактори като възпаление, тютюнопушене, хранителни навици, придружаващи заболявания и др. При карцином на стомаха основно се използват за предоперативна диагностика и проследяване на ефекта от лечението: следните туморни маркери СЕА, СА 19-9 и СА 72-4. Повечето проучвания изследват тези туморни маркери, както е и в нашето изследване. Ние получаваме средна стойност на СА72-4 - 14,2 U/ml и на СЕА - 19,9 ng/ml, при пациенти със стомашен карцином, които са над референтните стойности на лабораторните данни, което свидетелства за връзка на тези туморни маркери с карцинома на стомаха. Според Cidón et al. предоперативното

серумно ниво на СА72-4 е най – добрия предиктивен показател при оценка на напреднал стомашен карцином, а комбинацията с СЕА и СА19,9 е полезна за предоперативната оценка. Hwang et al. демонстрира, че високите серумни нива на СА19-9 могат да бъдат предиктор за перитонеална дисеминация при стомашен карцином. В проучване на Liu et al. са изследвани серумните нива на СА19-9 и СЕА при пациенти в Т4а стадий, които докладват за статистически значима разлика и твърдят, че повишените серумни нива, могат да бъдат предиктор за локално авансиран туморен стадий. В нашето проучване обаче, ние изследваме връзката на СА72-4 и СЕА с резектабилността, като не се установява статистически значима разлика между стойностите на СА72-4, а при СЕА се установява връзка с резектабилността на тумора. Освен това според нашите резултати, при нерезектабилните тумори, стойностите са по - ниски, което може да се тълкува и с редица фактори, от които те се влияят, като например тютюнопушенето, което е доказан рисков фактор, който ние не сме взели под внимание при провеждане на проучването.

**4.5 ЗАДАЧА 5:** Да се оцени приложението на PET/CT в диагностиката и стадирането на карцинома на стомаха.

#### 4.5.1 Резултати

От проспективно проследените 68 пациенти за периода 2014-2020г., трябва да се отбележи, че анализирането на резултатите по задача 5 е свързано със смисловото изражение на понятията – резектабилност, постигане на онкологичен радикалитет (радикална операция) и определението за „ненужна“ операция. Анализираме пациенти, които са определени като потенциално резектабилни случаи, извършена е резекция на тумора, но при окончателното патохистологично или цитолгично изследване са получени данни, определящи операцията като онкологично нерадикална/ненужна (хистологично позитивна резекционна линия R1 или малигнени клетки от перитонеален лаваж при цитологичното изследване).



Фигура 36. Обобщените резултати на проучването.

Пациентите които са стадирани с РЕТ/СТ са общо 29, като 4 (17,2%) са с ненужна операция. При 3 от пациентите интраоперативно е установено наличието на малигнени клетки в цитологичното изследване на перитонеалния лаваж. При 1 от пациентите имаме положителна резекционна линия от дуоденума (Фиг.36).

Нестадираните с PET/CT пациенти са общо 39 от проспективно проследената кохорта, от които 13 (33,3%) са с ненужна операция. Трима са с положителна резекционна линия – 1 поради локално авансирал тумор, с инфилтрация към панкреаса, 1 с положителна линия от хранопровода, 1 от дуоденума и 1 с инфилтрация към дебелото черво. 2<sup>ма</sup> пациенти са с тотална карциноза на перитонеума и 7 са с малигнени клетки в цитологичното изследване на перитонеалния лаваж.

Не се установява статистически значима разлика между пациентите в групата с извършена ненужна операция в зависимост от стадирането с PET-CT ( $p=0,066$ )(Табл.16).

Ненужна операция		PET/CT		Общо	p
		Не	Да		
Не	N	26	25	51	0.066*
	%	66,7%	86,2%	75,0%	
Да	N	13	4	17	
	%	33,3%	13,8%	25,0%	
Общо	N	39	29	68	
	%	100,0%	100,0%	100,0%	

Таблица 16. Връзката между предоперативното стадиране на пациентите с PET-CT и резектабилността.

\* Chi-Square Tests

Сигнификатна стойност на SUV на туморната лезия е отбелязан при 20 от пациенти с PET/CT, като средната стойност е 7,75 (Табл.17), при 3<sup>ма</sup> от пациентите – 15% не е регистрирана метаболитна активност от тумора, като при двама от тях липсва метаболитна активност в лимфните възли,

хистологичния резултат при тях беше нискодиферинциран аденокарцином  
- пръстен с камък.

Показател	N	Mean	Median	SD	Min	Max
SUV tumor	20	7,75	7,00	5,18	0,00	17,00

Таблица 17. Стойностите на SUV tumor при пациентите с рак на стомаха.

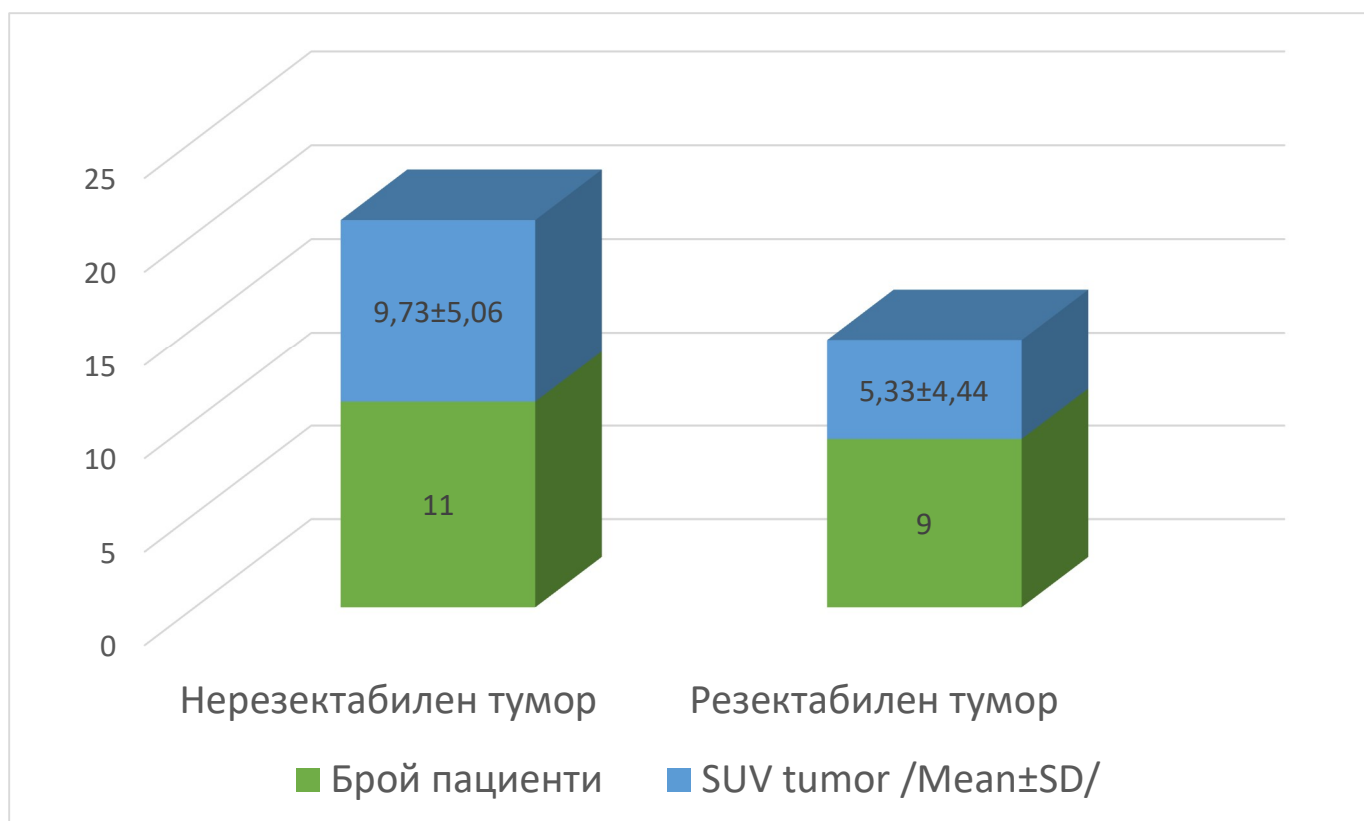
\* Chi-Square Tests

Единадесет (55%) от пациентите, при които е извършено предоперативно стадиране с PET/CT са с нерезектабилен тумор, а 9 (45%) са с резектабилен. Средната стойност на SUV tumor при нерезектабилните е  $9,73 \pm 5,06$ , а при резектабилните  $5,33 \pm 4,44$ , като разликата е статистически значима ( $p=0.039$ )(Табл. 18)(Фиг.37).

Показател	Резектабилен карцином	N	Mean	Median	SD	Min	Max	p
SUV tumor	Не	11	9,73	10,00	5,061	0	17	0,039*
	Да	9	5,33	5,00	4,444	0	14	

Таблица 18. Връзка на туморната метабилитна активност (SUV tumor) и резектабилността.

\* Mann-Whitney test



Фигура 37. Връзка на туморната метаболитна активност (SUV tumor) и резектабилността.

#### 4.5.2 Обсъждане

Според препоръките на NCCN PET-CT не е задължителен метод за предоперативно стадиране. Редица скорошни проучвания обаче, изследват зависимостта между поглъщането на  $^{18}\text{F}$ FDG, от туморната тъкан, въпреки че той не е специфичен агент за злокачествените клетки и може да се позитивира при PET-CT при пациенти с доброкачествени лезии на стомаха като полипи, гастрити, а също така да бъде физиологично повишен при пациенти с гастроезофагеален рефлукс и от нормалната стомашна лигавица.

При 4 от 29 (13,79 % %) от нашите пациенти, PET-CT не само, че не е осигурил правилното стадиране, но са извършени ненужни операции,

поради това, че в 3 от случаите не е установена метаболитна активност от перитонеума свидетелстваща за карциноза и в 1 от случаите не е бил достатъчен за преценката на локално авансирал тумор, което е довело до положителна резекционна линия от дуоденума.

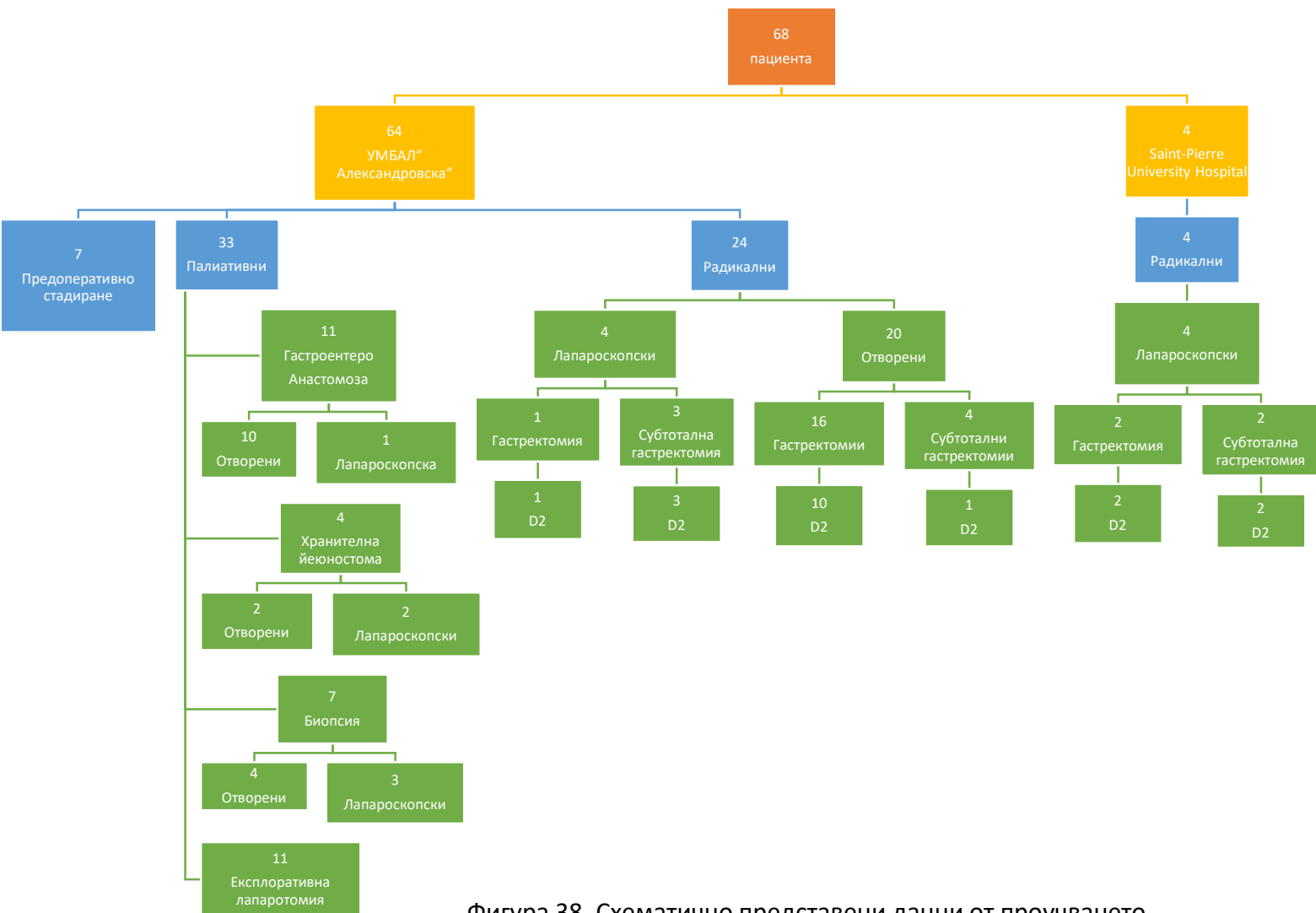
Подобно на нас и други автори докладват за неспецифичността на PET-CT при определянето на перитонеалните метастази и локалния статус на тумора при карцином на стомаха. Въпреки това ние докладваме за по-добро предоперативно стадиране при използването на PET-CT в сравнение с неизползването му, в които случаи е извършена ненужна лапаротомия. През последните години все повече доказателства набира становището за прилагането на диагностичната лапароскопия, при такива неясни случаи, но все още е с неточно изяснени индикации. Така сме подходили и ние в един от случаите, който е бил предоперативно стадиян включително с PET-CT - T3N+M0, но по време на диагностичната лапароскопия се установява, наличието на малигнени клетки в цитологичното изследване на перитонеалния лаваж.

Много изследвания проучват и връзката на стойностите на SUV на тумора с прогнозата при пациентите с карцином на стомаха и оценка на резултата от неoadювантното лечение. Установена е строга зависимост между стойността на SUV и големината на първичния тумор. Според някои автори, при тумори по-големи от 3,5 см стойностите на SUV се увеличават и инвазията на тумора е по-голяма. Средната стойност на SUV в нашето проучване е  $7,75 \pm 5,18$ , като при четирима пациенти тумора е бил по-голям от 3,5 см и е бил стадиян като T4. От друга страна някои хистологични варианти на аденокарцинома на стомаха като муцинозния и тип пръстен с камък SUV е с ниски стойности - средно 4,2. В нашето проучване при 3ма от пациентите не се установява активност от първичния

тумор при изследването с PET-CT, като при единия обаче има активност от лимфните възли (SUV 4.1). И при тримата хистологичния вариант е пръстен с камък, като предоперативния стадий е бил съответно T2N0M0, T3N+M1, T2N+M0, а патологичното стадиране е било съответно – T1aN0M0, липса на патологично стадиране поради неизвършване на операция и T1bN0M0. В нашето проучване ние изследваме връзката на SUV на тумора и резектабилността му, която се оказва значима ( $p=0,039$ ). За подобряване на диагностичната стойност на PET-CT, някои автори препоръчват използването на друг радиофармацевтик - FLT-PET. Други пък споменават за потенциалните предимства, които биха могли да донесат новата генерация образни изследвания, като PET-MR и/или PET/CT – MR.

4.6 **ЗАДАЧА 6:** Да се определи значението на лапароскопията за предоперативното стадиране и резектабилността на стомашния карцином.

4.6.1 Резултати



Фигура 38. Схематично представени данни от проучването.

От общо 68 изследвани пациенти броя на оперираните пациенти с извършена стомашна резекция са 28 – 8 лапароскопски (28,6%) и 20 отворени операции (71,4%)(Фиг.38). Средната възраст на пациентите в групата на лапароскопския достъп е  $62,13 \pm 10,99$ г., като 5<sup>-ма</sup> са от мъжки

пол(62,5%) и 3<sup>ма</sup> от женски(37,5%), а тази на пациентите в групата на лапаротомииите е 62,5±9,66г., като 9 са от мъжки пол (63,3%) и 11 са от женски пол (36,7%). Средният индекс на телесна маса при пациентите с лапароскопия е 23,63±4,60 kg/m<sup>2</sup>, а тези при лапаротомия е 24.96±2,86 kg/m<sup>2</sup>. Двете групи са ендородни по отношение на 3<sup>те</sup> показателя - p=0,900, p=0,965 и p=0,311 (Табл.19,20,21).

Показател	достъп	N	Mean	Median	SD	Min	Max	p
Възраст г	лапароскопия	8	62,13	64,00	10,99	39,00	77,00	0.900*
	лапаротомия	20	62,50	64,50	9,66	43,00	79,00	

Таблица 19. Връзка между вида на операцията и пола на пациентите с карцином на стомаха.

\* Mann-Whitney test

Пол		достъп		Общо	p
		лапароскопия	лапаротомия		
Мъже	N	5	9	14	0.965*
	%	62,5%	45%	50%	
Жени	N	3	11	14	
	%	37,5%	55%	50%	
Общо	N	8	20	28	
	%	100,0%	100,0%	100,0%	

Таблица 20. Връзката между вида на операцията и пола на пациентите с рак на стомаха.

\* Fisher's Exact Test

Показател	достъп	N	Mean	Median	SD	Min	Max	p
BMI kg/m <sup>2</sup>	лапароскопия	8	23,63	23,50	4,60	18,00	32,00	0.311*
	лапаротомия	20	24,96	25,00	2,86	20,00	29,00	

Таблица 21. Връзката между вида на операцията и индекса на телесна маса.

\* Mann-Whitney test

D2 лимфна дисекция е извършена при всички пациенти с лапароскопска резекция и при 11 пациента с отворена операция (55%). Не се установява статистически значима разлика от отношение на броя на лимфните възли изолирани повреме на D2 лимфната дисекция, които са съответно 34,25бр.±14,03 при лапароскопската и 24,94бр.±9,31 при групата с отворената операция (p=0,118)(Табл. 22).

Показател	достъп	N	Mean	Median	SD	Min	Max	p
ЛВ	лапароскопия	8	34,25	34,00	14,03	16,00	54,00	0,118*
	лапаротомия	11	24,94	22,50	9,31	15,00	41,00	

Таблица 22. Връзката между вида на операцията и изораните лимфни възли.

\* Mann-Whitney test

При трима от пациентите с лапароскопска операция е извършена гастректомия и при други пет е извършена субтотална гастректомия. При 16 от пациентите с отворена операция е извършена гастректомия и при четирима – субтотална гастректомия. Не се установява статистически значима разлика във двете групи по отношение на положителната резекционна линия. При един от пациентите с лапароскопска операция има R1(12,5%), която е от дуоденума. При 6 от пациентите с лапаротомия има R1 (20%) – 3 от дуоденума, 1 от хранопровода, 1 локално авансирал тумор към панкреаса и 1 към дебелото черво.

#### 4.6.2 Обсъждане

Лапароскопския достъп при пациентите с карцином на стомаха е с доказани предимства и през последните десетилетия постигна бързо развитие и популярност поради миниинвазивността, значително по - малката кръвозагуба, по-слабата следоперативна болка и респективно

намаленото използване на аналгетици и не на последно място, по-бързо възстановяване, основно поради доказан по-нисък интензитет на системен възпалителен отговор. Лапароскопската гастректомия е безопасна и технически осъществима при пациенти с ранен и напреднал стадий на рак на стомаха, като оперативната техника е свързана с подобрения в няколко краткосрочни резултата, но най-важното е, че е свързана с намалена заболеваемост и започване в по-кратък период на адювантна терапия. Данни от 5 рандомизирани проучвания докладват, че общата краткосрочна смъртност и заболеваемост са непроменени при миниинвазивния подход при извършването на гастректомия при локално напреднал рак на стомаха в сравнение със стандартната отворена техника. Все още остава дискутабилен въпроса по отношение на преживяемостта и радиакалността на извършените лапароскопски операции, въпреки, че все по-често, проучвания показват, че пациентите подложени на лапароскопска гастректомия имат по-добра преживяемост в сравнение с тези, подложени на отворения метод. В нашето проучване ние демонстрираме, че при извършването на лапароскопска D2 лимфна дисекция се изолират повече ЛВ, макар и разликата да не е статистически значима ( $p=0,118$ ), освен това при лапароскопските операции се извършва, по-често D2 лимфна дисекция, спрямо отворените операции. Cui et al. през 2015г., докладват проучване с 296 пациенти, подложени на лапароскопска и отворена гастректомия по повод напреднал рак на стомаха. Средният брой на изолираните лимфни възли при D2 лимфна дисекция са, съответно, 29,3 за миниинвазивния и 30,1 за отворения метод. Park et al. през 2017г., разглеждат 207 пациенти и докладват за среден брой на изолирани възли, съответно, 37,0 и 39,7 за лапароскопския и отворения достъп. В нашето проучване ние изолираме  $34,25 \pm 14,03$  за

миниинвазивния и  $24,94 \pm 9,31$  за отворения подход, като разликата не е статистически значима.

Голям проблем в стомашната хирургия остава определянето на резекционните линии и все още високия процент на положителна резекционна линия както от дуоденума така и от хранопровода.

В нашето проучване регистрираме общо 7 пациенти с положителна резекционна линия (18,4%) , което се потвърждава и от други автори, от тях само 1 е с лапароскопска операция, а другите 6 са с лапаротомия и въпреки това няма статистически значима разлика ( $p=1,000$ ). Някои автори определят като основна причина, лошия хистологичен вариант, нискодиферинцирания карцином или тип лимфитис пластика, както е и при трима от нашите пациенти (42,85%). В тези случаи туморът не може да бъде категорично визуализиран, което затруднява определянето на резекционните линии. Ето защо въвеждането на ICG навигирана лимфна дисекция и резекция би имало голямо предимство и полза в тези случаи. При един от нашите пациенти сме използвали предоперативно при гастроскопията, което позволи интраоперативно да се визуализира тумора и всичките лимфни пътища и метастатични лимфни възли. Това би дало още едно голямо предимство на лапароскопския достъп.

**4.7 ЗАДАЧА 7:** Да се създаде предоперативен алгоритъм подобряващ хирургичния радикалитет при стомашния карцином.

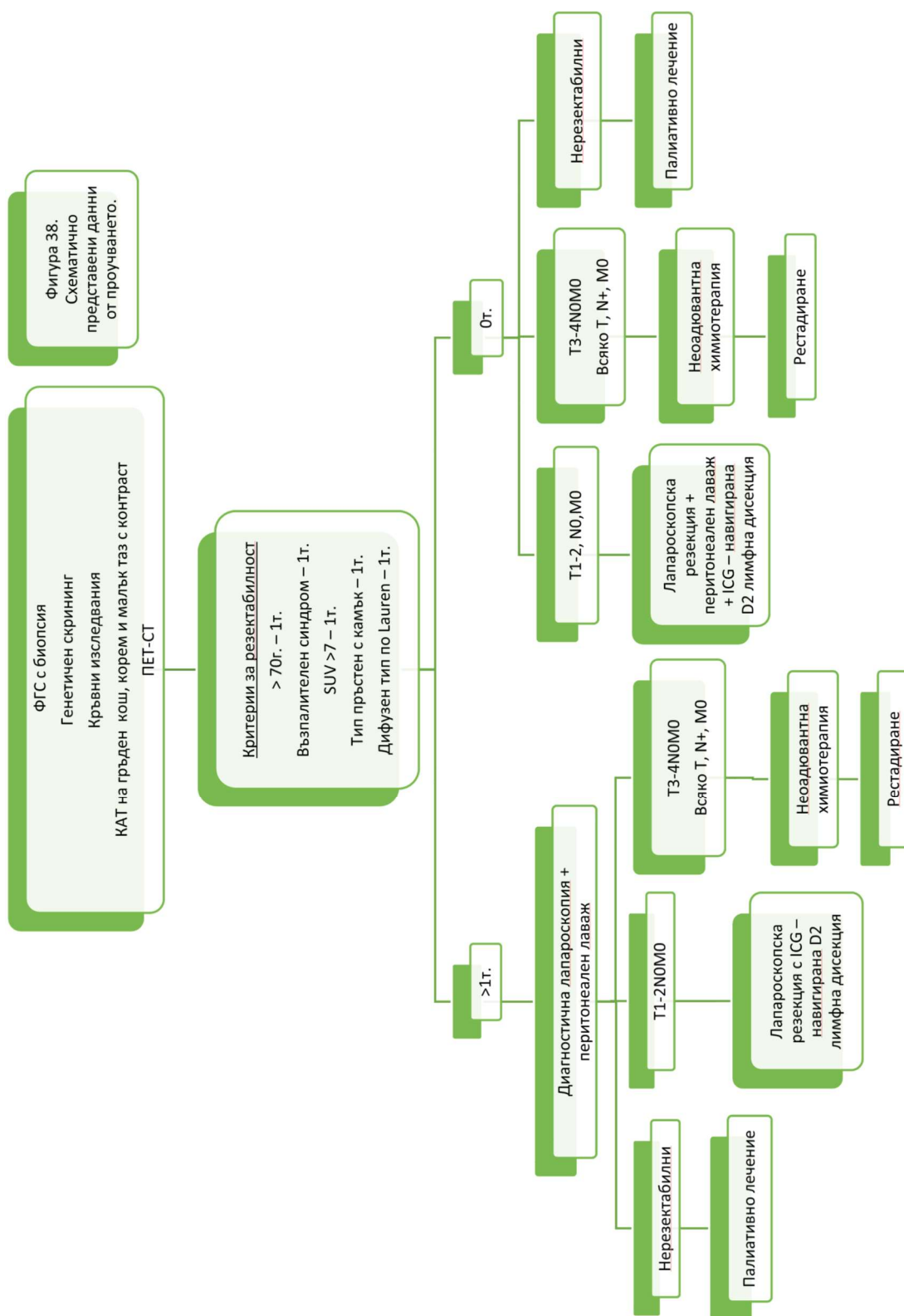
След задълбочен анализ на резултатите изведохме основни изводи по всяка една от задачите, които използвахме, за да съставим алгоритъм за детайлизирана диагностика при пациентите с карцином на стомаха с цел подобряване на резектабилността.

- При всички пациенти извършвахме фиброгастроскопия с вземане на биопсичен материал от суспектната формация в стомаха с цел хистологично верифициране. Извършвахме предоперативни параклинични изследвания, пациентите стадирахме със скенер на гръден кош, корем и малък таз с контраст и PET-CT. В зависимост от резултатите, формирахме 5 критерия за резектабилност, всеки от които носи (1т), а именно – възраст над 70г., наличие на възпалителен синдром, SUV по голямо от 7, хистологичен тип пръстен с камък и дифузен тип по Lauren.

- При наличието на минимум един от тези 5 критерия е задължително провеждането на диагностична лапароскопия с цел перитонеален лаваж за наличие на атипични клетки и определяне на локалния туморен статус. При нерезектабилните тумори се извършва палиативно лечение. При T1-2, без позитивни локорегионални и далечни метастази, ние препоръчваме извършването на лапароскопска резекция с ICG – навигирана D2 лимфна дисекция. При T3-4 и/или наличие на позитивни локорегионални лимфни възли, без далечни метастази пациента подлежи на неoadювантна химиотерапия с цел downstaging и downsizing и рестадирание, за оценка на отговора.

- При 0т. или отсъствие на 5-те критерия при предоперативната диагностика подхода е следния – T1-2 и липса на локорегионални и далечни

метастази, ние препоръчваме извършването на лапароскопска резекция, перитонеален лаваж с ICG – навигирана D2 лимфна дисекция. Всеки пациент с тумор T3-4 или позитивни лимфни възли подлежи на неоадювантна химиотерапия и последващо рестадиране. При несъответствие със клиничния стадий и наличие на нерезектабилен тумор, пациента ще получи диагностична лапароскопия и възможност за палиативно лечение и ще бъде избегната ненужна лапаротомия (Фиг.39).



Фигура 39. Предоперативен алгоритъм подобряващ хирургичния радикалитет при стомашния карцином.

## 5. Изводи

1. Очаква се в бъдеще генетичният анализ да играе съществена роля при стратифицирането на пациентите с карцином на стомаха.
2. Карцинома на стомаха в България се диагностицира късно, като според нашето проучване 49,8% от случаите, приети за лечение са нерезектабилни.
3. При мъжкия пол рискът за развитие на карцином на стомаха е по-висок.
4. Въпреки че 43,9% от пациентите с карцином на стомаха са с наднормено тегло, ИТМ няма отношение към резектабилността на тумора.
5. Пациентите с нерезектабилен карцином на стомаха имат измерена по-висока стойност на фибриноген и СУЕ в сравнение с тези с резектабилен тумор.
6. Не се установява връзка между стойностите на левкоцитите и резектабилността на тумора при пациенти с карцином на стомаха.
7. Туморните маркери СЕА и СА72-4 се увеличават при повечето пациенти с карцином на стомаха.
8. Не се препоръчва използването на PET-CT в диагностичния алгоритъм при карцином на стомаха.
9. По-високите стойности на SUV на тумора при провеждането на PET-CT корелират с по-висок процент на нерезектабилност.
10. Лапароскопския подход дава възможност и за диагностично доуточняване и по - точно определяне на стадия, с което да се избегне ненужна лапаротомия.

11. Лапароскопския подход при оперативното лечение на стомашния карцином има еквивалентни резултати по отношение на радикалността на резекцията в сравнение с отворения подход.
12. Напредъка на технологиите дава възможност по време на лапароскопския подход да се използват допълнителни техники, които да подобрят радикалността при ранни тумори (T1-T2), като например ICG – навигираната лимфна дисекция.
13. Лапароскопския подход може да се използва и за палиативно лечение при пациентите със симптоматичен карцином на стомаха.

## **6. Приноси**

### **6.1 Приноси с оригинален характер**

1. За пръв път в България е направен генетичен анализ на мутации в туморна тъкан при карцином на стомаха.
2. Създаден е оригинален алгоритъм за предоперативна диагностика за определяне на резектабилността на тумора при пациенти с карцином на стомаха.
3. За пръв път в България е приложена техниката за ICG – навигирана лапароскопска лимфна дисекция при пациент с карцином на стомаха.

### **6.2 Научно-теоретични**

1. Направен е ретроспективно проучване за демографските показатели и резектабилността на голяма група пациенти – 209 с карцином на стомаха за 15 годишен период.

### 6.3 Научно – практически

1. Създадена е биобанка съдържаща стомашен тумор, нормална стомашна тъкан и венозна кръв, която може да служи за бъдещи изследвания с цел подобряване на резектабилността.
2. Описани са различни техники за гастроеюнална и езофагойеюнална анастомоза при лапароскопска гастректомия.

### 6.4 Потвърдителни

1. Потвърдено е значението на мъжкия пол като рисков фактор за развитие на карцином на стомаха.
2. Потвърдено е потенциалното значение на туморните маркери СЕА и СА72-4 в диагностиката при карцином на стомаха.
3. Наблюдавани са съпоставимите резултати по отношение на радикалността на резекция между лапароскопския и отворения достъп.

## 7. Препоръки

1. Да се насърчи рутинно приложение на диагностичната лапароскопия с перитонеален лаваж за предоперативно стадиране и оценка на ефекта от неoadювантно лечение.
2. Да се въведе в лечебната практика неoadювантна химиотерапия с цел подобряване на резектабилността и преживяемостта при пациентите с карцином на стомаха.

3. Да се увеличи делът на пациентите със стомашен карцином оперирани с миниинвазивни методики с натрупване на хирургичния опит.

## **8. Списък с научните публикации свързани с дисертационния труд**

1. **Arabadzhiev A**, Grozdev K, Veleв G, Bulanov D, Khayat N, Hadzhiminev, Kachakova D, Todorov G, Angelov A. Somatic mutations of tumor tissue in gastric cancer patient – resectability predictor?. *Khirurgiia* 85/2019
2. **Arabadzhiev A**, Popov Ts, Toshev Sv, Maslyankov Sv., Sokolov M. Individual characteristics and Inflammatory markers - predictors of resectability in gastric cancer. *Khirurgiia* (2022).
3. **Arabadzhiev A**, Popov Ts, Sokolov M. Laparoscopic gastrectomy with ICG guided D2 lymph node dissection – a case report and review of the literature. *Acta Med. Bulg.* (Impact Factor 0.204 © Thomson Reuters Journal Citation Reports 2021)

## **9. Списък на участията в научни форуми, свързани с темата на дисертационния труд**

1. **Арабаджиев А**, Попов, Цв., Соколов М., Тошев Св. Лапароскопска субтотална гастректомия с ICG - навигирана D2 (D2+) лимфна дисекция – Симпозиум - „Съвременно лечение на хирургичните заболявания“ с международно участие, 25-27.03.2022г., гр. Русе.