

СТАНОВИЩЕ

от проф. д-р Спиро Михайлов Константинов, дм
Катедра по фармакология, фармакотерапия и токсикология, Фармацевтичен
факултет при МУ-София

по отношение на представения дисертационен труд на гл. ас. д-р СТАНИСЛАВ МИНЧЕВ ФИЛИПОВ, докторант към Катедрата по хирургични болести, акушерство и гинекология, МФ на СУ „Св. Климент Охридски“ на тема „Подход при хирургичен избор на лечение на пациенти с хепатоцелуларен карцином (експериментални и клинично-морфологични аспекти)“ с научни ръководители: доц. д-р Здравко Лазаров, проф. д-р Спиро Константинов, дм във връзка със заповед РД 38-310 от 13.5.2016г. на Ректора на СУ „Св. Климент Охридски“.

Дисертационният труд е за придобиване на образователната и научната степен «ДОКТОР» по направление “7. Здравеопазване и спорт”, професионално направление “7.1. Медицина» и научна специалност «Обща Хирургия» с шифър 03.01.37.

Кратки биографични данни

Д-р Станислав Минчев Филипков е докторант на самостоятелна подготовка към катедрата по Хирургични болести, Акушерство и Гинекология при МФ на СУ. Роден е през 1965 г. в гр. София. Средното си образование д-р Филипков завършва в НПМГ София през 1983г. Станислав Филипков завършва следването си по медицина в Медицински факултет на Медицински Университет–София през 1991 г. Началото на академичната кариера на д-р Филипков е в Лаборатория по Експериментална Патология и Токсикология при Националния Център по Хигиена, Медицинска Екология и Хранене /НЦХМЕХ/ към МЗ (1992-2000). Има завършена специализация с придобиване на специалност “Хигиена на храненето” от декември 1995 г. От същата година Станислав Филипков работи по Проект “Употреба на биомаркери за оценка на риска при експозиция на генотоксични химически субстанции” в рамките на програма “Коперник”. В периода от 1998-2004г. специализира и придобива призната специалност “Обща и клинична патология” от май 2004 г. След това Станислав Филипков постъпва на работа в УМБАЛ „Александровска“, а в периода 2004-2007 е хоноруван асистент при Катедра по Обща и Клинична патология към МФ при МУ- София. След това преподавателската кариера на Станислав Филипков продължава в Медицински факултет на Софийски университет „Климент Охридски“- Катедра „Анатомия, хистология, патология и съдебна медицина“, УБ „Лозенец“, където последователно заема длъжностите асистент (2007-2008), старши асистент (2008-2011) и главен асистент (от 2011 досега). В периода от 2010 до 2013г. активно работи по Проект “Разработване на методи за минимално-инвазивна хирургия в урологията (МИХУ) с помощта на нов пренастройваем инфрачервен лазер”, определен за финансиране въз основа на конкурс, проведен от Фонд „Научни изследвания” - „Стимулиране на научните изследвания в държавните висши училища”. От 2013г. досега работи по три проекта към Софийски Университет “Св. Климент Охридски”, които са във връзка с дисертационния труд.

Структура на дисертационния труд

Дисертационен труд е написан на 214 страници и отговаря на широко възприетата у нас структура, както и на утвърдените в СУ качествени критерии: въведение, литературен обзор, цел и задачи, материали и методи, резултати, дискусия, изводи и литературни източници. Резултатите от собствените изследвания са представени на 29 фигури, много от които с интегрирани данни в табличен вид. Цитираната литература включва 461 публикации на английски език, много от които са от последните 5–10 г.

Приложен е автореферат, който адекватно отразява основните моменти и в допълнение съдържа списък на публикациите във връзка с дисертационния труд, който включва 3 публикации на английски език, една от които в чуждестранно научно издание с импакт-фактор (IF=2,406) и едно научно съобщение в пълен текст в сборник от международен научен форум в САЩ.

В литературния обзор подробно и компетентно са очертани всички важни теоретични проблеми, свързани с темата на дисертационния труд, включително анатоמו-физиологична характеристика и особености на черния дроб и съответните клетъчни популации. Направен е обстоен преглед на разнообразните токсични, възпалителни, инфекциозни и неопластични патологични процеси, засягащи черния дроб с техните характеристики, както и на възможностите за терапевтично повлияване. Особено задълбочено са засегнати клиничната характеристика, епидемиологията, етиологията, молекулярната патогенеза и други важни детайли от цялостната характеристика на малигнените заболявания на черния дроб.

Методологичният раздел е представен педантично с подробно описание на използваните материали, реактиви, изследователски и статистически методи. Методичният набор е впечатляващ и позволява разрешаването на поставените задачи.

Получените собствени резултати са представени подробно в табличен и графичен вид като фигурите и таблиците са достатъчно информативни и говорят за уменията и ерудицията на автора. Резултатите обхващат две обособени направления – клинично-морфологично проследяване и експериментални проучвания. При проследяването на тъканните находки от карциноми с висока степен на диференциация е установено, че максималният диаметър на най-голямата туморна лезия надхвърля 4 см само при 31,25% от случаите, а при 68,75% тази големина не е достигната. Лимитираната проява на периферен или силно изразен възпалителен отговор показва увеличена площ на туморните гнезда, ограничаване на техния брой и корелира с клиничната проява на хепатоцелуларни карциноми при пациенти с непроменен черен дроб, които се представят с единични големи възли /над 100 мм/. Установено е, че липсата на съпътстващо чернодробно заболяване се явява главен прогностичен фактор, независимо от проявения подвид на първичния хепатоцелуларен карцином. На тази база проследяването на пациенти с висок или много висок риск остава реална практическа възможност за откриване на тумори в по-ранни стадии. Появата на огнища с премалигнен потенциал и пролиферативен риск показва, че тяхното физическо елиминиране може да доведе до повишаване на преживяемостта. Фоновите промени и генерираният от тях премалигнен риск представляват основен модулиращ фактор, който

ограничава или позволява увеличен обем на предприетите резекции. Така частичната хирургична резекция се очертава като водещ подход и оптимално лечение на хепатоцелуларен карцином. Комбинирането на резекция с друг вид терапевтични подходи или локална аблативна терапия остава въпрос, който може да бъде решен само в клинични условия.

Особено важен принос на дисертационния труд е разработването и апробирането на тест-система, показваща потенциални клинични корелации. Това е от съществено значение предвид тенденцията за разработване и въвеждане на нови *in vitro* тестове за токсичност, които ще намалят броя на необходимите опитни животни и ще допринесат за практическото реализиране на принципите на т. нар. тройно R – „Replacement, Reduction and Refinement of animal experiments” (заместване, намаляване и усъвършенстване на опитите с животни). Предложеният модел, разработен в рамките на дисертационния труд е базиран на ко-култивране на човешка хепатоцитна клетъчна линия HEP-G2 със стимулирани еозинофили, а проведените с него експерименти демонстрират неговата адекватност. Установено е, че ко-култивирането на хепатоцити със стимулирани еозинофилни клетки от клетъчна линия EOL-1 възпроизвежда близка морфология до тази на пациенти с хепатоцелуларен карцином и инфекциозен хепатит. Налице е индуцирана автофагия, която е потвърдена морфологично и посредством имуноблот.

При определянето на увреждането на хепатоцитите е установено, че ко-култивирането с диференцирани и не-диференцирани еозинофилни клетки не е асоциирано с директен инхибиращ или апоптогенен ефект и може да се разглежда като моделна експериментална система, която независимо от ограниченията на *in vitro* моделите и потенциалните артефакти възпроизвежда достатъчно точно явленията, свързани с възпалителен процес.

Предизвиканата автофагия се характеризира със значителна морфологична хетерогенност и може да се разглежда като белег на клетъчна адаптация в условия на стрес и засилена вероятна възможност на туморните клетки за дългосрочно оцеляване. При тези клетки морфологичните критерии за малигна трансформация кореспондират с увеличен брой автофагозоми. Установени са комплексни взаимодействия между ко-култивираните клетъчни популации като при контакт на хепатоцитите с еозинофилни клетки е налице индукция на антиапоптозния фактор Bcl-2. Активираната автофагия при инхибирана апоптоза, а именно липсваща ДНК фрагментация при експресия на Bcl-2 протеин, е показател за адаптация на хепатоцитите в условия на стрес, увеличаване на преживяемостта на туморните клетки, относително запазване на митохондриалните функции и подтискане експресията на NF- κ B-зависимите сигнално-трансдукционни каскади. При това стимулирането на еозинофилни клетки с по-високи концентрации на форболов естер вероятно води до засилена секреция на интерлевкини и цитокини, инхибиране на апоптозата и ре-активиране на проинфламаторния транскрипционен фактор NF- κ B, който вероятно е отговорен за постулирания още от Virchow преход от хронично възпаление към малигнен процес. От друга страна устойчивата активация на клетки с макрофагеална активност води до постоянна секреция на хепатотропни митогенни цитокини, които стимулират хепатоцитната пролиферация. В условия на оксидативен стрес и хепатоцитни увреждания,

тази активация води до засилено формиране на малигнено трансформирани клетки без последващо адекватно елиминиране.

Ко-култивационният модел е валидиран като фармакологична тест-система като за целта са използвани природни продукти от групата на фенолните съединения с установен противовъзпалителен, антиоксидантни и имуномодулиращ потенциал – куркумин и хранителната добавка «Герисан», на основата на екстракт от *Geranium sanguineum*. Фармакологичното проучване показва забавяне и задържане на автофагията и генериране на клетъчни загуби чрез апоптоза, които са особено изразени при куркумин, а той се явява един от най-добре охарактеризираните за момента инхибитори на транскрипционния фактор NF-κB с нисък токсичен потенциал. Получените резултати свидетелстват за това, че куркумин и «Герисан» се отличават с потенциал за благоприятно повлияване на патогенетичните изменения при хепатоцелуларния карцином като могат да допринесат за нарастване на тъканния функционален резерв на черния дроб. Тези данни несъмнено очертават перспективността на бъдещи по-задълбочени проучвания, насочени към валидиране на предложения модел и оптимизиране на условията на ко-култивиране и биооценка.

Данните от получените резултати са обстойно обсъдени в отделен раздел, което също е достойнство на дисертационния труд. Обсъждането и изводите отговарят на поставените задачи и са формулирани прецизно, което ми дава основание да ги приема като уместни и правилни.

Получените резултати са обект на интензивна публикационна активност – четири оригинални публикации на английски език – 3 в специализирани издания - *Acta morphologica et anthropologica*, *Progress in Biomedical Optics and Imaging*, *Journal of biological regulators and homeostatic agents*, както и една пълнотекстова публикация в сборник от конгрес. Важно е да се отбележи, че експерименталните разработки, свързани с дисертационния труд са получили финансиране от ФНИ – МОН, както и от автономния фонд за научни изследвания на СУ „Св. Климент Охридски“

Актуалност и значимост на дисертационния труд

С оглед на нарастващите възможности за лечение на чернодробни заболявания чрез хирургични интервенции и в частност чернодробни трансплантации оценявам представената разработка на д-р Филипов не само като актуална, но и авангардна поради комплементарното допълване на класически клинично-морфологични проучвания със съвременни експериментални клетъчно-молекулярни проучвания. Целта на дисертационния труд е прецизно поставена - формулиране на оптимизиран функционален подход за оценка и селекция на пациенти с първичен хепатоцелуларен карцином, подлежащи на хирургично лечение. Допълнителна цел на изследването е чрез разработване и валидиране на експериментален *in vitro* модел за структурно-функционален анализ да бъдат обогатени възможностите за проучване и оценка на настъпващите промени в чернодробни клетки при определени физиологични и патологични условия, включително за определяне на капацитета на следоперативния регенераторен процес и толеранса на съхранени зони от паренхимата към по-големи по обем чернодробни резекции. Третираният проблем е изключително актуален, предвид възможностите за реална клинична трансация както на клинично-морфологичните, така и на експерименталните клетъчно-молекулярни данни.

Заклучение

Дисертационният труд на д-р Станислав Филипов е едно задълбочено и несъмнено интердисциплинарно проучване, при което личният принос е неоспорим факт. Като научен ръководител мога да оценя дисертанта като изграден изследовател с опит и компетентност в областта на клиничната и експериментална патология с пряко отношение към съвременната хирургия на хепатоцелуларния карцином като важен медицински проблем. Особено достойнство на дисертационния труд е успешното разработване на оригинален интердисциплинарен *in vitro* модел на чернодробно възпаление с възможност за идентифициране и валидиране на нови биомаркери на възпалително и туморно-индуцирано хепатоцелуларно увреждане. Друг важен аспект е приложимостта на модела за реализиране на фармакологични изследвания на потенциални хепатопротектори *in vitro*. Транслирацията на характер на изследванията е потвърден от добре представените и прецизно формулирани клинични корелации на предложения модел с мултифокалните огнища на хепатоцелуларната канцерогенеза.

Убеден съм, че дисертационният труд отговаря отговаря на критериите на чл.6 от Закона за развитието на академичния състав в Република България (ДВ. бр.38 от 21 Май 2010г., посл. изм. ДВ. бр.68 от 2 Август 2013г.) и правилника за условията и реда за придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности в СУ (Изменен на 28 октомври 2015 г. с решение на Академическия съвет). Поради това си позволявам да препоръчам на уважаемото жури да присъди образователната и научна степен "ДОКТОР" по направление "7. Здравеопазване и спорт", професионално направление "7.1. Медицина" и научна специалност «Обща Хирургия» с шифър 03.01.37. на докторанта **д-р Станислав Минчев Филипов**.

София, 5.7.2016 г.

Подпис:



(проф. д-р С. Константинов, дм)