

СТАНОВИЩЕ

от Доц. д-р Дорина Асенова Михова дм
Катедра „Хирургични болести, акушерство и гинекология“
Медицински факултет, Софийски университет „Св.Климент Охридски“

Относно дисертационен труд на тема „Подход при хирургично лечение на пациенти с първичен хепатоцелуларен карцином (експериментални и клиничко-морфологични аспекти)“

Автор: гл. ас. д-р **Станислав Минчев Филипов**, Катедра „Анатомия, Хистология, Патология и Съдебна медицина“ , СУ „Св.Климент Охридски“, Медицински факултет.

Научни ръководители: доц. д-р Здравко Йорданов Лазаров, дм
проф. д-р Спиро Михайлов Константинов, дм

За присъждане на образователната и научната степен «ДОКТОР»

по направление “7. Здравеопазване и спорт”

професионално направление “7.1. Медицина»

научна специалност «Обща Хирургия» с **шифър 03.01.37**

Настоящото становище представям в качеството си на член на научното жури, определено със Заповед № РД 38-310/13.05.2016 на Ректора на СУ „Св. Климент Охридски“, София въз основа на решение на Факултетния съвет на Медицински факултет (Протокол № 47/07.04.2016)

I. Кратка биографична справка за дисертанта.

Д-р Станислав Минчев Филипов 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. Докторантът е завършил **МЕДИЦИНА** в Медицински факултет на Медицински Университет–София през 1991 г. *Академичната кариера на д-р Филипов започва в* Лаборатория по експериментална патология и токсикология при Националния център по хигиена, медицинска екология и хранене /НЦХМЕХ/ към МЗ (1992-2000). След това д-р Филипов постъпва на работа в УМБАЛ „Александровска“, а в периода 2004-2007 е хоноруван асистент при Катедра по обща и клинична патология на МУ- София. В последствие *преподавателската кариера на д-р Филипов е реализирана 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).

II. Технически данни за дисертационния труд

Предоставеният за оценяване дисертационен труд отговаря на изискванията, посочени Закона за развитие на академичния състав в Република България, правилника за прилагането му и правилника на СУ. Структуриран е в 7 глави, обхващащи 190 стандартни страници, към които се добавя разделът с библиографичната справка, съдържащ 461 литературни източника на латиница и разположен на 26 страници. Резултатите са онагледени с 11 графики и 18 фигури. Изводите са 7 на брой,

произтичащи от собствените резултати на дисертанта и в съответствие с трите вида приноси на дисертацията – методични, теоретично-фундаментални и такива с приложен, потвърдителен или допълващ характер.

III. Значимост на темата

Разработването на помощен *in vitro* модел за предварителен структурно-функционален анализ на патологични анатомични и биохимични органични промени с диагностична и фармакологична приложимост е в съзвучие със световната тенденция за намаляване на броя на използваните опитни животни във фундаменталните и приложни медицински научни изследвания. Тази тест-система е подходяща за оценка на патоанатомични и патобиохимични промени в хепатоцитите, настъпващи вследствие на автофагия и цели да допринесе 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). Ето защо дисертацията на д-р Филипов представлява стъпка напред в тази област. Научната стойност на разработката се увеличава значително от установените клинични корелации поради възможността за последваща трансляция на данните към клиничната практика.

IV. Литературен обзор, цел и задачи

Литературният обзор е разгърнат на 108 страници се състои от 13 подчасти, в които задълбочено са анализирани съвременните диагностични и терапевтични проблеми, свързани с първичен хепатоцелуларен карцином. Ясно формулирана е нуждата от въвеждане на нови диагностични маркери за откриване и стадиране на заболяването, допълващи клинично-морфологичните подходи. Впечатляват показаните от дисертанта обширни познания по проблематиката, представени чрез подробна аналитична дискусия върху патогенезата на чернодробните увреждания, водещи към малигнена трансформация.

Задачите съответстват на поставената цел и позволяват нейното постигане. Те включват разработването на експериментален клетъчен модел чрез ко-култивиране на малигнено трансформирана високо диференцирана човешка хепатоцитна клетъчна линия (HEP-G2) с еозинофилни човешки клетки. Последните са стимулирани към продукция на инфламаторни цитокини с форболов естер, което възпроизвежда условия, близки до реалните в човешкия организъм и дава възможност за сравнителен анализ на клетъчния отговор – пролиферация, автофагия, апоптоза с помощта на цитометрични и цитологични методи. Това позволява да се проучат възможностите за повишаване на устойчивостта на хепатоцитите при различни експериментални въздействия; изследването на експресията на про-инфламаторния фактор NF-κB и степента на неговата активност, както и на маркери за индуциране на автофагия в култивирани хепатоцити и е стъпка към клиничната трансляция на получените резултати.

V. Резултати, изводи и приноси

Резултатите представляват комбинация между клинично-морфологичен анализ на биопсии от пациенти и функционален анализ на *in vitro* експериментален модел на чернодробно възпаление с установени корелации между двете групи проби на морфологично и молекулно ниво.

Важен принос към дисертацията е етаблирането на експерименталната клетъчна система за предварителна оценка на процеси, свързани с канцерогенезата на първичния хепатоцелуларен карцином. Дисертантът е доказал, че моделът възпроизвежда успешно мултифокални огнища на организация на туморни хепатоцити без наличие на други фонови процеси и е адекватен за провеждане на фармакологични тестове с хепатопротектори или увреждащи агенти с цел предвиждане на полезен или токсичен ефект. Пресъздадената индуцирана автофагия и възпаление са потвърдени морфологично и посредством анализ на протеинова експресия на маркери на възпалението, апоптозата и автофагията.

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 акуратно явленията, свързани с първоначален остър възпалителен процес.

Установено е настъпване на автофагия, характеризираща се със значителна морфологична хетерогенност, което може да се разглежда като белег за клетъчна адаптация в условия на стрес и повишена способност на туморните клетки за дългосрочно оцеляване. При тези клетки морфологичните критерии за малигнена трансформация кореспондират с увеличен брой автофагозоми. Тези морфологични процеси са доказани от молекулярно-биологичния анализ на експресията на клетъчни фактори, свързани с процесите на апоптоза, автофагия и възпаление. Потвърдено е успешно, че в условия на стрес клетките отключват автофагия като адаптивна реакция с цел преживяване (както се вижда от стимулирането на маркерите за автофагия Beclin-1 и LC3BII), което е съпроводено от блокиране на апоптозата поради свръхекспресия на антиапоптозния фактор Bcl-2. Подтискането на експресията на про-инфламаторния факторът NFκB е допълнително доказателство за процес на адаптация в началото, като засилената секреция на интерлевкини и цитокини е отговорна за неговата ре-индукцията при увеличаване концентрацията на форболов естер. 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 генериране на малигнено трансформирани клетки.

Моделът е приложен успешно за фармакологична оценка на ефектите на два хепатопротектора от природен произход: куркумин и хранителната добавка Герисан, съдържаща екстракт от растението червен здравец (*Geranium sanguineum*), богат на фенолни съединения. Известно е, че последните имат доказан антиоксидантен и противовъзпалителен ефект.

Доказано е тяхното значение за стационариране на процеса на автофагия и генериране на клетъчни загуби, които са особено изразени при куркумин, който е на практика един от най-добре охарактеризираните инхибитори на транскрипционния фактор NF-κB. Наред с успешното апробиране на модела като тест-система, получените данни показват, че куркумин и «Герисан» притежават потенциал за благоприятно модулиране на патогенетичните промени при хепатоцелуларния карцином като могат да допринесат за увеличаване на функционалния резерв на чернодробната тъкан.

Тези данни очертават допълнителна клинична трансляция на представената студия и перспективността на някои природни продукти като лекарствени кандидати или потенциални "лидерни" структури за разработване на хепатопротективни средства. 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.

Огромното количество получени резултати са подложени на задълбочен анализ, който заслужава висока оценка. Направено е сравнение между експерименталния модел и клиничните проби, като са установени корелации в морфологичните изменения, което е особено ценно, като се има предвид възможното практическо приложение на модела.

Въз основа на тези резултати, Д-р Филипov е формулирал 7 извода, които следват логиката на дисертацията и статистическия анализ на получените данни.

Авторът е изброил три вида приноси – методични, теоретично-фундаментални и такива с приложен, потвърдителен или допълващ характер. Счита за приносите за оригинални и бих искала да подчертая особено значимостта за клиничната практика на разработения оригинален експериментален *in vitro* тест-модел за чернодробно увреждане, който дава възможност за идентифициране и валидиране на нови маркери за ранна диагностика на инфекциозно и/или туморно-индуцирано хепатоцелуларно увреждане и може да се прилага и за фармакологични тестове.

VI. Публикации, свързани с дисертационния труд

Получените резултати са публикувани в научната литература както следва – четири реални 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. Експериментите по дисертационния труд са получили финансиране от ФНИ – МОН, както и от автономния фонд за научни изследвания на СУ.

VII. Заключение

С този дисертационен труд д-р Станислав Филипov се представя като отлично подготвен специалист в областта на експериментална, клинично ориентирана патология и хирургия.

Очевидно е, че изработените резултати са лична заслуга на дисертанта.

Извършената от него работа е оригинална и с безусловно практическо значение. Представения дисертационен труд отговаря на всички изисквания на Закона за развитие на академичния състав в Република България, правилника за прилагането му и правилника на СУ. Авторефератът е добре структуриран и дава пълна представа за качествата на дисертационния труд.

Всичко това ми дава основание горещо да препоръчам на уважаемото специализирано жури да гласува за присъждане на образователната и научна степен „Доктор“ на д-р Станислав Минчев Филипov.

София, 06. 07.2016 г.

Подпис:.....
(доц. д-р Дорина Асенова Михова дм)