

## РЕЦЕНЗИЯ

от Доц. д-р Радосвет Петров Горнев дм  
Катедра „Хирургични болести, акушерство и гинекология“  
Медицински факултет, Софийски университет „Св.Климент Охридски“

Представеният за рецензиране дисертационен труд на гл. ас. д-р Станислав Минчев Филипов на тема „Подход при хирургично лечение на пациенти с първичен хепатоцелуларен карцином (експериментални и клинично-морфологични аспекти)“ и с научни ръководители: доц. д-р Здравко Йорданов Лазаров, дм и проф. д-р Спиро Михайлов Константинов, дм, е предназначен за обсъждане от научно жури, определено със Заповед № РД 38-310/13.05.2016 на Ректора на СУ „Св. Климент Охридски“, София.

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.

За по-голяма прегледност рецензията е структурирана в шест части, съдържащи последователно биографична справка за кандидата, характеристика на структурата на дисертацията, актуалност и дисертабилност на проблема, научна стойност (вкл. резултати, изводи и приноси), заключение и въпроси.

### I. Биографична справка за кандидата.

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. Характеристика на структурата на дисертацията

Дисертационният труд е разработен в обем 216 страници, от които 26 страници списък на използваната литература. Библиографската справка е съставена от 461 литературни източника, всички от които са оригинални статии и обзори на английски език, свързани с темата на дисертацията. В структурно отношение трудът отговаря на приетите в СУ качествени критерии и се състои от седем глави с прилежащите им подчасти: литературен обзор, цел и задачи на изследването, материали и методи, резултати, дискусия, изводи и приноси. Главите са структурирани адекватно и са написани с хубав стил и език. В тях последователно са разгледани актуалните проблеми, свързани с диагностиката и лечението на първичен хепатоцелуларен карцином, нуждата от

въвеждане на нови диагностични маркери, както и възможностите за тяхното изследване с помощта на експериментални клетъчни модели, допълващи клинично-морфологичните проучвания.

Литературният обзор е задълбочен и последователно структуриран да обоснове зададените цели и методите за изпълнението на конкретните задачи. Той обхваща 108 страници и представлява подробен критичен анализ на настоящите клинични патоанатомични и хирургични проблеми, свързани с диагностицирането, стадирането и лечението на първичен хепатоцелуларен карцином.

Работните протоколи и методи са описани на 25 страници в самостоятелен раздел. Използвани са разнообразни съвременни изследователски и статистически методи, които постигат изпълнение на задачите във връзка с целите на дисертацията.

Получените резултати са подредени последователно на 29 страници в отделен раздел и са онагледени посредством 11 графики и 18 фигури със снимки на микроскопските препарати и експресията на маркерите на възпаление и автофагия, които са с много добра информативност, прегледност и естетика.

Изводите са 7 на брой, ясно и точно формулирани и представляват логичен преход към приносите на дисертацията.

### **III. Актуалност и познаване на проблема**

Избраната тематика за дисертационна разработка е от първостепенна важност за терапията на първичен хепатоцелуларен карцином с оглед на ниската преживяемост, големия брой усложнения при пациентите и недостатъчния брой методи за масов скрининг за навременна диагностика на патологичния процес и стадиране на заболяването.

Поставянето на правилна диагноза и насочването към хирургично лечение са особено дискусабилни в съвременна клинична практика, като се има предвид, че за последното десетилетие на XX век и първото десетилетие на XXI век с подобряване на хирургичните техники, следоперативната смъртност при чернодробни резекции при пациенти с цироза е намалена от 14% на 10%.

Представената разработка на д-р Филипov е авангардна поради логичното съчетаване на клинично-морфологични подходи с разработване и валидиране на експериментален *in vitro* клетъчен модел за структурно-функционален анализ с цел разработване на оптимизиран алгоритъм за оценка и селекция на пациенти с първичен хепатоцелуларен карцином, подлежащи на хирургично лечение.

Използването на *in vitro* модел разширява възможностите за оценка на настъпващите промени в чернодробни клетки при определени физиологични и патологични условия (асоциирани с автофагия), в т.ч. дефиниране на капацитета на следоперативния регенераторен процес и толеранса на съхранени зони от паренхима 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 данни. Докторантът впечатлява със задълбоченото познаване на проблема, което прозира от широтата и всеобхватността на описанието на чернодробните заболявания и тяхната патогенеза в литературния обзор. Разгледани са изчерпателно анатомо-физиологичните характеристики на черния дроб и неговите функции с акцент върху патологичните възпалителни, инфекциозни и токсични процеси, обуславящи неопластични изменения.

Задълбочено са дискутирани биохимичните аспекти на чернодробната канцерогенеза във връзка с диагностицирането на съответните онкологични заболявания и определяне на следоперативната функционална пластичност, регенераторен процес и толеранс на съхранените зони от паренхимата, като преход към определяне на възможността за извършване на по-големи по обем чернодробни резекции.

Задачите, свързани с изпълнението на поставената цел, включват разработването на експериментален *in vitro* клетъчен модел, представляващ ко-култура на малигнено трансформирана човешка хепатоцитна клетъчна линия с висока степен на диференциация на клетките (HEP-G2) с еозинофилни моноцити (човешки левкемични бласти), стимулирани към продукция на инфламаторни цитокини с форболов естер. неговото предназначение е да предостави опростена, но близка до реалните условия в човешкия организъм възможност за сравнителен анализ на клетъчния отговор – пролиферация, автофагия, апоптоза при различни експериментални условия с помощта на цитометрични и цитологични методи; проучване на възможностите за повишаване на устойчивостта на хепатоцитите при различни експериментални въздействия; изследване на експресията на експресията на интегринови рецептори, на NF-κB и степента на неговата активност, както и на маркери за индуциране на автофагия в култивирани хепатоцити.

#### **IV. Научна стойност (вкл. резултати, изводи и приноси)**

Целта и задачите на дисертацията са ясно дефинирани и последователни. В комбинация с комплексния и богат набор от методики за изследване и включването на адекватни клинични проби от пациенти, те са позволили да се получат редица интересни резултати и приноси, които хвърлят допълнителна светлина върху някои неизяснени въпроси и обогатяват научните ни познания относно оценка на премалигнен потенциал и пролиферативен риск, мостови тип терапия с протективна подкрепа на чернодробния остатък и възможностите за хирургична намеса при голям брой туморни огнища с малък размер и ограничена площ.

Резултатите са обособени в две направления – клинично-морфологично проследяване и *in vitro* експериментални изследвания на морфологично и молекулно ниво.

Ще се спра накратко върху някои по-съществени приносни моменти в представената дисертация.

При проследяването на тъканните находки от карциноми с висока степен на диференциация е установено, че разпределението на находките намалява, като 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. Тези данни кореспондират с находките за органно разпределение. При това лимитираното представителство на периферен или силно изразен възпалителен отговор показва увеличена площ на туморните гнезда, ограничаване в техния брой и корелира с клиничната проява на хепатоцелуларни карциноми при пациенти с непроменен черен дроб, които се проявяват като единични и големи възли /при клинични условия 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 на заболяването.

Появата на огнища с премалигнен потенциал и пролиферативен риск показва, че тяхното физическо елиминиране може да повиши приживяемостта в клинични условия.

Фоновите промени и генерираният от тях премалигнен риск представляват основен модулиращ фактор, който ограничава или позволява увеличен обем на предприетите резекции.

Така хирургичната резекция се очертава като водещ подход и оптимално лечение на хепатоцелуларен карцином. Комбинирането на резекция с друг вид терапевтични модалности или локална аблативна терапия остава въпрос, който може да бъде решен само в клинични условия, тъй като той зависи от топографията и ориентацията на туморната лезия.

Важен принос към дисертацията е разработването и апробирането на експерименталния модел като тест-система за потенциални клинични корелации, който успява да възпроизведе мултифокални огнища на организация на туморни хепатоцити без наличие на други фонове процеси.

В световен мащаб се разраства тенденцията за етаблиране и въвеждане на нови *in vitro* тестове за токсичност, които 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) като крайната цел е да се намали броя на необходимите опитни животни и да се извлече максимален обем полезна информация, приложима в хуманната медицина. Проведените върху този модел тестове с хепатопротектори демонстрират неговата адекватност.

Докторантът е доказал, че тест-системата възпроизвежда близка морфология до тази на пациенти с хепатоцелуларен карцином и инфекциозен хепатит. 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 и 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.

Анализът на молекулните фактори на апоптоза автофагия и възпаление доказват липсата на апоптоза, онагледена чрез флуоресцентна микроскопския с разтвор на Hoechst, целяща да покаже евентуално наличие ДНК фрагментация при индукция на процеса. Липсата на такава се обяснява с експресията на антиапоптозния фактор Bcl-2 след въздействие върху хепатоцитите със стимулирани еозинофилни клетки. Активираната автофагия при инхибирана апоптоза /липсваща ДНК фрагментация при експресиран Bcl-2 протеин/ е показател за адаптация на хепатоцитите в условия на

стрес, увеличаване на преживяемостта на туморните клетки и запазване на митохондриалните функции.

Подтискането на експресията на факторът на възпаление NFκB, което е свързано и с зависимите от него сигнални каскади, при слаба стимулация на моноцитите с форболов естер е допълнително доказателство за процес на адаптация. Тъй като стимулирането на еозинофилни клетки с по-високи дози форболов естер води до реактивиране на проинфламаторния фактор NF-κB, то може да се предположи че засилената секреция на интерлевкини и цитокини е отговорна за индукцията на възпаление при тези експериментални условия.

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.

Като допълнителна задача е предвидено валидиране на тест-системата за фармакологични цели, свързани с изследване на възможностите за повишаване на устойчивостта на хепатоцитите в условия на стрес.

Задачата е изпълнена успешно чрез третиране на клетъчната ко-култура с природни фенолните съединения с установен противовъзпалителен, антиоксидантен и имуномодулиращ потенциал – куркумин и хранителната добавка «Герисан», съдържаща екстракт от растението *Geranium sanguineum*.

Фармакологичното проучване показва 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.

Така се очертава основа за бъдещи по-задълбочени проучвания, насочени към валидиране на предложения модел и оптимизиране на условията на ко-култивиране и биооценка.

Получените резултати относно клетъчната тест-система са дискутирани във връзка с морфологичните и биохимични промени, установени по време на въздействието и логично обясняват настъпилите клетъчни изменения, поради което приемам дискусията без допълнителни забележки.

Д-р Филипov е направил 7 извода, които произтичат пряко от собствените резултати и са подчинени на структурата и логиката на дисертацията.

Авторът посочва три вида приноси – методични, теоретично-фундаментални и с такива с приложен, потвърдителен или допълващ характер.

От особена значимост е разработеният оригинален експериментален *in vitro* тест-модел за чернодробно увреждане на базата на клинични корелации, тъй като той може да служи за оценка на функционален капацитет и фармакологична тест-система за хепатопротекция и дава възможност за идентифициране и валидиране на нови маркери за ранна диагностика на инфекциозно и/или туморно-индуцирано хепатоцелуларно увреждане.

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.

#### V. Заключение

Като цяло дисертационният труд несъмнено е лично дело на дисертанта и получените резултати са негова лична заслуга.

Той е едно задълбочено интердисциплинарно и компетентно проучване на диагностичните проблеми при първични тумори на черния дроб.

Използваният методичен набор е най-съвременен и адекватно подбран. Научно-приложните резултати представляват оригинален принос в науката и отговарят на всички изисквания на Закона за развитие на академичния състав в Република България, правилника за прилагането му и правилника на СУ.

Изводите са формулирани коректно. Авторефератът е правилно и прецизно направен, добре структуриран и предоставя пълна представа за същността и достоинства на дисертационния труд.

По значимост, актуалност, мащаб и оригиналност трудът притежава всички качества на дисертация и напълно покрива количествените критерии за придобиване на **образователната и научната степен «ДОКТОР»**, поради което си позволявам да препоръчам на уважаемите членове на научното жури да гласуват положително за присъждане на тази научна степен на **Д-р Станислав Минчев Филипов**.

София, 06. 07.2016 г.

Подпис:.....

(доц. д-р Радосвет Петров Горнев дм)