

РЕЦЕНЗИЯ

от проф. д-р Георги Цветанов Момеков
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 „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 13.05.2016г. 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.

Д-р Станислав Минчев Филипov 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 Филипov 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 Филипov 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 Филипov 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).

Актуалност, значимост и дисертативност

Убедено считам, че представената разработка на д-р Филипov е актуална, но и авангардна поради прецизното допълване на клинично-морфологични поручвания и съвременни експериментални проучвания. Целта на дисертационния труд е коректно формулирана - разработване на оптимизиран функционален алгоритъм 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 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 трансляция както на клинично-морфологичните, така и на експерименталните данни.

С оглед реализиране на поставените цели са поставени няколко задачи, насочени към разработване на експериментален *in vitro* модел за анализ на хепатоцитна култура (клетъчна линия HEP-G2 - малигнено трансформирани човешки хепатоцити); отчитане на възпалителни промени в отговор на различни тригери – третиране с инфламаторни цитокини или директно добавяне в култивационната среда на стимулирани моноцити (диференцирани с форболов естер човешки левкемични бласти); 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.

Структура на дисертационния труд

Дисертационен труд е написан на 214 машинописни страници и отговаря на традиционно 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. Не са формулирани приносите на представените проучвания. Резултатите от собствените изследвания са представени на 37 фигури, много от които с интегрирани данни в табличен вид. Цитираната литература включва внушителните 461 публикации на английски език, много от които са от последните 5–10 г.

Литературният обзор е написан на внушителните 108 страници. В него дисертантът подробно и компетентно е очертал всички теоретични проблеми асоциирани с тематиката на дисертационния труд, в т.ч. анатомо-физиологична характеристика на черния дроб и съответните клетъчни популации, 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, молекулната патогенеза и други особености на туморната биология на онкологичните заболявания на черния дроб. По мое мнение, литературният обзор в дисертационния труд на д-р Филипков представлява широкообхватен и същевременно целево-структуриран и критичен литературен преглед, който недвусмислено демонстрира значителна научна ерудиция и аналитична компетентност на автора по дискутираната проблематика.

Методологичният раздел е развит образцово с подробно описание на използваните материали, реактиви, изследователски и статистически методи. Методичният набор е внушителен и позволява разрешаването на поставените проблеми.

Получените резултати са представени изключително подробно в табличен и графичен вид като разделът е оформен образцово. Данните са обстойно обсъдени в отделен раздел.

Основни резултати, изводи и приноси

Резултатите са в две обособени направления – клинично-морфологично проследяване и експериментални проучвания. 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 /парциална 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.

Особено важен принос 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 дисетрационния труд е разработен чрез ко-култивиране 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. Пресъздадената индуцирана автофагия е потвърдена морфологично и посредством анализ на протеинната експресия.

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. Установени са комплексни взаимодействия между ко-култивираните клетъчни популации като при контакт на хепатоцитите с еозинофилни клетки е налице индукция на антиапоптозни фактор Bcl-2. 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, запазване на митохондриалните функции и подтискане експресията на NFκB-зависимите сигнални каскади. При това стимулирането на еозинофилни клетки с високи дози форболов естер вероятно води до засилена секреция на интерлевкини и цитокини, инхибиране на апоптозата и ре-активиране на проинфламаторния фактор NF-κB.

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 валидиран като фармакологична тест-система като за целта са използвани природни продукти от групата на фенолните съединения с установен противовъзпалителен, антиоксидантни и имуно-модулиращ потенциал – куркумин и хранителната добавка «Герисан», на основата на екстракт от *Geranium sanguineum*. Фармакологичното проучване показва стационаране на процеса на автофагия и генериране на клетъчни загуби, които са особено изразени при куркумин, който е на практика един от най-добре охарактеризирани 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 транслация 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.

Дискусията на резултатите и изводите отговарят на поставените задачи и са формулирани прецизно, което ми дава основание да ги приема без забележки. При предварителното ми запознаване с проекта за дисертационен труд се натъкнах на единични стилистични и терминологични неточности, които впоследствие бяха отстранени от д-р Филипков.

Получените резултати са дисеминирани 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.

Заклучение

Дисертационният труд е едно задълбочено интердисциплинарно проучване, при което личният принос на д-р Филипков е несъмнен. Използваният методичен набор е най-

съвременен и адекватно подбран. Изводите на труда са формулирани коректно. Особено достойнство на дисертационния труд е успешното разработване на оригинален *in vitro* модел на чернодробно възпаление с възможност за идентифициране и валидиране на нови маркери за ранна диагностика на инфекциозно и/или туморно-индуцирано хепатоцелуларно увреждане, както и с провеждането на „high-throughput“ фармакологични тестове за скриниране на потенциални хепатопротектори *in vitro*. Транслиращият характер на изследванията е потвърден от удачно представените и формулирани клинични корелации на предложения модел по отношение възпроизвеждане на мултифокални огнища на организация на туморни хепатоцити, като модел за оценка на функционален капацитет и фармакологична тест-система за хепатопротекция.

На тази основа убедено считам, че представения дисертационен труд е завършен и напълно покрива количествените критерии за придобиване на **образователната и научната степен «ДОКТОР»** съгласно 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) и си позволявам да препоръчам на уважаемите членове на катедрения съвет да гласуват положително.

София, 5.07.2016 г.


Подпис:.....
(проф. д-р Георги Цветанов Момеков)