

РЕЦЕНЗИЯ

От проф. д-р Деян Тонев Желев, дмн
Клиника по гастроентерология, УМБАЛ Св. Ив. Рилски,
Катедра по вътрешни болести, МФ, МУ, София
Член на научно жури

Относно дисертационен труд за придобиване на научна степен
„Доктор на медицинските науки“
на доц. д-р Ася Захариева Кръстева-Панова, дм

Тема на дисертацията: „Оралната медицина и диагностични панели“

1. Актуалност на проблема

Дисертационният труд на доц. д-р Ася Захариева Кръстева-Панова е посветен на актуален и клинично значим проблем. Натрупаните данни показват, че патологията в устната кухина е широко разпространена и може да засегне до $\frac{1}{2}$ от лицата от изследвания контингент. Най-честите ѝ прояви са оралните лезии, които са твърде неспецифични и представляват сериозно диагностично предизвикателство. Оралните промени нерядко са отражение на множество различни заболявания – гастроентерологични, хематологични, ревматологични, инфекциозни, дерматологични и др. Нещо повече – промените в устната кухина може да са свързани с въздействие на повече от една етиологична нокса. Последното ясно показва същественото клинично значение на разглеждания проблем, който е с подчертано интердисциплинарен характер. За изграждането на широка диференциална диагноза се изискват наличие на специфични познания относно оралната патология от една страна и от друга - използване на набор от подходящи лабораторни изследвания. Това мотивира необходимостта от провеждане на задълбочени изследвания при пациенти с промени в устната кухина за определяне на диагностичните възможности на различни клинично-лабораторни параметри, вирусни маркери, показатели на възпалението и локалния имунитет. Безспорно групирането на подобни показатели с цел изграждане на диагностични модели би улеснило диагностичния процес и ще е добра основа за построяване на оптимален план за лечение. Именно в това актуално направление са насочени проучванията на доц. Ася Кръстева-Панова, представени в дисертационния ѝ труд.

2. Структура на дисертацията

Дисертацията е написана на 337 страници, онагледена е с 79 таблици и 190 фигури. Доц. Кръстева-Панова е структурирала научната си теза в 11 раздела като текста в тях е правилно балансиран. Съдържанието включва: въведение – 1 стр.; литературен обзор – 79

стр.; цел и задачи – 1 стр.; материал и методи – 10 стр.; резултати – 165 стр.; обсъждане – 20 стр.; изводи – 1,5 стр.; приноси – 1 стр.; участия в научни проекти, свързани с разработването на дисертационния труд - 1 стр.; библиография – 36 стр.

Въведението представя стегнато и ясно проблема, акцентира на предизвикателствата, които логично са мотивирали авторката да разработи дисертацията.

Литературният обзор е съвременен и професионално написан. Дава цялостна характеристика на оралните промени в устната кухина като е добре фокусиран върху целта и задачите на дисертацията. Обобщени са авторитетни проучвания, публикувани предимно през последните 5 години и ясно са очертани водещите тенденции, както и нерешените проблеми. Анализирани са епидемиологични данни за честотата на лезиите на устната лигавица при лица от различни възрастови групи и региони на света. Детайлно са разгледани еритропоеичните дефицити на желязо, фолиева киселина и вит. В12 в контекста на оралното здраве и е подчертано значението на всеки един от тях. Авторката отделя специално внимание на недостига на витамин D, който в последните години е широко обсъждан световен проблем. Много компетентно е представена ролята на херпесните вируси (CMV, EBV и HSV-1/2) при оралните лезии. Посочена е честотата на разпространение на обсъжданите вирусни инфекции, прицелно засяганите от тях органи и системи, както и характера на лезиите в лицево-челюстната област и предилекционните места на оралните прояви. Акцентирано е на съвременните диагностични вирусни маркери, както и на професионалния риск, свързан с ролята на слюнката за трансмисия на инфекцията чрез директен контакт или по време на стоматологични процедури. Ценни са клиничните данни за значението на ко-инфекциите с два и повече вируса при различна орална патология, включително рецидивиращи и трудноподдаващи се на лечение улцерации в устната кухина. Много добре е описана оралната патология, срещана при пациенти с *H. pylori* инфекция и е очертана потенциалната роля на хеликобактера в патогенезата на афтозо-подобните лезии, рецидивирация афтозен стоматит, оралния лихен планус, левкоплакията, парадонтита и периимплантита. С голяма вещина е извършен преглед на HPV и връзката му с оралното здраве, както и значението на HPV и някои херпес вируси за оралните неоплазми. Представени са интересни данни за оралните изяви при хроничните хепатити B, C и D, професионалният риск за денталните лекари, както и възможностите за характеризирание на вирусния товар чрез изследване на слюнка. Разгледана е потенциалната роля на последната като вектор за предаване на HBV и HCV инфекциите. Цялостно е представен въпросът за използването на нестимулираната слюнка като диагностична алтернатива, включително възможностите за използването ѝ при оценка на имунния статус на оралната лигавицата и ролята на слюнчените нивата на някои биомаркери за възпаление - CRP, Calprotectin, IgA и sIgA.

Доц. Кръстева-Панова е успяла да отрази стегнато, изчерпателно и точно най-важните постижения в обсъжданата област. Обзорът завършва с обобщение на конкретните нерешени проблеми, на част от които са посветени и собствените проучвания на авторката в дисертационния ѝ труд.

Целта на изследването е ясно и точно формулирана: да се анализират диагностичните възможности на някои клинично-лабораторни показатели и да бъдат

изградени оптимални диагностични панели при различни орални и общи заболявания с прояви в устната кухина. Проведените изследвания са пряко подчинени на поставената цел. Логично са изведени 6 **задачи**. Те включват:

- Оценка на честотата на еритропоетични дефицити (желязо, фолиева киселина, витамин B12, витамин D) при пациенти с изменения в устната кухина;
- Оценка на честотата и значението на вирусни инфекции (EBV, CMV, HSV1 и HSV2) при пациенти с характерни прояви в устната кухина;
- Установяване наличието на ниско-рискови и високо-рискови HPV-типове в слюнка у здрави лица и в биопсична тъкан на пациенти с орални и орофарингеални неоплазми;
- Определяне честотата на хепатитните вируси В и С сред дентални пациенти;
- Определяне носителството на *H. pylori* у дентални пациенти с оплаквания, вероятно свързани с инфекцията;
- Оценка на маркерите на възпалението и на оралния лигавичен имунитет в слюнката за охарактеризиране на локални и общи заболявания.

Всички набелязани задачи са конкретни и реално изпълними. Те са правилно структурирани и решаването им дава възможност за постигане на поставената цел.

Материал и методи: Обект на изследването **са много голям брой пациенти - общо 791**, които са групирани както следва:

- 160 болни със специфична орална патология, установена след преглед в диагностичния кабинет към Катедра „Образна и орална диагностика“ на Факултета по дентална медицина, София;
- 208 дентални пациенти с оплаквания от общ характер и подозрителни за вирусни инфекции и витаминни дефицити;
- 82 дентални пациенти, подозрителни за инфекция с *H. pylori*;
- 196 здрави дентални пациенти, при които в слюнка са изследвани високо и ниско рискови типове HPV;
- 48 болни с орални и орофарингеални неоплазми, при които в биопсична тъкан са изследвани високо и ниско рискови типове HPV;
- 21 болни с хроничен вирусен хепатит;
- 270 пациенти с орални пренеоплазми и неоплазми, както и болни с различни общи заболявания, при които са изследвани показатели на възпалението в слюнката за характеризиране на възпалението и оралната лигавична имунна система.

Извършени са впечатляващ брой изследвания – общо 2831. Наборът на изследваните показатели респектира с широтата си, както по отношение на броя на изследваните показатели, така и с разнообразието на използваните диагностични среди, включващи серум, слюнка и биопсична тъкан. В серум са изследвани: Fe, Vitamin B12, Folic acid, Vitamin D, CMV IgM, CMV IgG, anti-VCA IgM, anti-VCA IgG, anti-EBNA IgG, HSV-1 IgM, HSV-2 IgM, HBsAg, anti-HCV, Hp IgG, в слюнка - CRP, Calprotectin, IgA, sIgA. В серум и слюнка паралелно е определяно нивото на HBV DNA, включително динамиката по време на противовирусно лечение с пегелиран интерферон, а в тъкан и слюнка е изследван HPV.

Изследванията са извършвани със съвременни и надеждни методи - electrochemiluminescence immunoassay, радиална имунодифузия, имунотурбодиметричен метод, ELISA, Real-time PCR, PCR with colorimetric detection.

Предложени са панели от показатели, включващи изследване:

- в серум – на желязо, вит. В12, фолиева киселина при дентални пациенти с оплаквания от общ характер и с подозирани прояви на еритропоетични дефицити в устната кухина;
- в серум – на HSV-1, HSV-2, EBV, CMV при дентални пациенти с неспецифични афтозо- подобни лезии и с херпесподобни изменения по устната лигавица;
- в нестимулирана слюнка – на CRP, IgA, sIgA, Calprotectin при пациенти с орални пренеоплазми и неоплазми, както и при болни с общи заболявания.

Данните са обработени чрез статистическия софтуерен пакет – IBM SPSS for Windows, v.16.0. Доц. Ася Кръстева-Панова прилага широк набор от подходящи статистически методи: вариационен анализ, параметрични методи (Т-тест на Student), непараметрични методи (Mann–Whitney и Kolmogorov–Smirnov), корелационен параметричен анализ (Pearson correlation), корелационен непараметричен (Spearman's). Авторката много умело е използвала възможностите на графичния и клъстерния анализ. Последният помага за разбиването на данните на интересни и смислени подгрупи (клъстери), базирайки се на принципа за максимално вътреклъстерно сходство и минимално междуклъстерно сходство. Този подход дава възможност за разкриване на интересни и значими особености, които е невъзможно да бъдат идентифицирани при използване на рутинните статистически модели.

Достатъчният брой проучени пациенти, както и използваните съвременни методи за изследване и подходящата статистическа обработка на данните са предпоставка за получаване на надеждни и достоверни резултати, които са лично дело на авторката.

Резултатите от собствени проучвания са детайлно представени и подходящо онагледени с таблици и фигури.

При пациенти с орални прояви, доц. Кръстева-Панова установява класически дефицит на серумно желязо в близо 4% от случаите, на витамин В12 - в 8% от мъжете и 13% от жените, а на фолиева киселина – при 1,6%. С помощта на графичен и клъстерен анализ се демонстрира явна разлика в железните нива между двата пола, като стойностите се групират съответно в 4 клъстера при жените и 3 - при мъжете. Оформените клъстерни нива на вит. В12 и фолиева киселина са съответно 4 и 3. Авторката разкрива латентен железен дефицит в над 20% от случаите, а латентните дефицити за витамин В12 и фолиева киселина са съответно при около 40% и 16% от изследваните. Получените резултати са с важно клинично значение. Оформят се две клъстерни зони на критични стойности – дефицити и много високи нива. Пациентите, попадащи в тези две групи, изискват допълнителни действия за уточняване на причините за отклоненията и последващото комплексно лечение.

Много интересни са резултатите от приложения орален херпесен панел при дентални пациенти с неспецифични афтозо-подобни лезии и херпесподобни изменения по устната лигавица. Авторката установява ниска честота на острите вирусни инфекции за CMV – около 2%, а тази на EBV е около 7%. Най-чести са двата херпес вируса HSV-1 и HSV-2 -

между 18-20%. Едновременно активна инфекция с HSV-1 и HSV-2 е установена в 13.6%. Демонстрирана е също висока корелация между нивата на антителата от клас IgM срещу HSV-1 и HSV-2. По отношение на HSV-2, резултатите на доц. Кръстева-Панова, потвърждават скорошни проучвания, че HSV-2 не причинява само генитални инфекции, както се считаше доскоро, но вирусът играе роля и при херпесни лезии, стоматити и гингивити. Той е вече описан в слюнката и/или лигавицата на устата при такива болни. Авторката установява също, че сред рутинните дентални пациенти в 23% е налична поне една остра инфекция с CMV, EBV и/или HSV. В близо половината от тези случаи има съчетание на две остри инфекции, а в 3% - на три. Анализът от клинично-диагностична гледна точка показва, че ако от предложения панел отпадне изследването на CMV, поради ниската честота на установени остри инфекции, откриваемостта на остри вирусни инфекции би спаднала само с 2% от 23% на 21%. Изглежда изследване за CMV следва да се назначава само при конкретни клинични подозрения.

Специално внимание заслужават данните от изследване на *H. pylori* IgG при дентални пациенти. Дисертантката установява много висок дял на положителни резултати, надвишаващи с близо 2 пъти честотата, регистрирана от предходни проучвания в България. Много любопитни и ценни за клиничната практиката са резултатите от едновременно изследване на *H. pylori* IgG от една страна и от друга - EBV VCA IgG или HSV IgM. Авторката демонстрира, че при лица с напрегнат имунитет срещу EBV (EBV VCA IgG > 750 U/mL), инфекцията с *H. pylori* е по-рядка - 25% vs. 65% ($p < 0.01$). Освен това наличната инфекция с хеликобактер вероятно протектира острата херпесна инфекция. Този феномен е установен както за HSV-1, така и за HSV-2 остри инфекции. Въпреки относително малкия брой на изследвани болни и липса на твърдо установени серологични критерии за реактивиране на EBV, горните резултати повдигат фундаментални научни въпроси за взаимодействието между обсъжданите патогени. Проблемът е във фокуса на изследователския интерес през последните години, но остава открит въпросът дали *H. pylori* има защитна роля за херпесните инфекции или имунният отговор към тях предпазва от развитието на *H. pylori* инфекцията.

Доц. Кръстева-Панова изследва HPV при дентални пациенти като използва две диагностични среди - слюнка и биопсична тъкан. В общата нестимулирана слюнка на здрави пациенти, HPV се установява в 5% от случаите, докато в неопластичната тъкан от болни с орални и орофарингеални неоплазми - в 23%. И в двете изследвани среди по-честа е инфекцията при мъжете. Налице са различия в HPV генотиповете, установени в слюнката на здрави лица и в неопластична тъкан от орални и орофарингеални неоплазми. В 90% от случаите в слюнката е открит генотип 16, като 40% са инфектирани с 2 генотипа едновременно, а 10% - с три HPV генотипа. В изследваните биопсии HPV генотип 16 е установен в 18%, а най-чест е бил HPV генотип 6. Широко обсъждана тема в медицинската литература е как хората се заразяват с орален HPV. Някои проучвания показват, че трансмисия на вируса е възможна чрез орален секс с човек, имащ генитална HPV инфекция, а други - че инфекцията може да се разпространи чрез целувка със заразен с орална HPV инфекция. Напоследък има и по-смели твърдения за пренасяне на вируса при обикновен контакт. В своето проучване доц. Кръстева-Панова се опитва да хвърли допълнителна

светлина по този актуален проблем. За целта проспективно са събрани и анализирани данни от анкета, която е попълвана от пациентите. Резултатите показват, че 10,5% от отговорилите определят себе си с хомосексуална ориентация, наличие на над 5 интимни партньори са съобщили 26,3%, а 5% са ползвали платени сексуални услуги. В допълнение между 26% и 37% от пациентите не са дали отговор на тези въпроси. Важно е също, че 10% от болните съобщават за наличие на неоплазма в лицево-челюстната област при друг член от семейството. Безспорно в тази част от дисертацията авторката повдигна въпроси с важно научно и практическо значение. HPV в слюнката отразява наличието на вируса в други биологични течности, но следва да се изясни дали пътя за инфектиране с HPV е не само сексуален.

Подчертано иновативни са проучванията, свързани с изследване на HBV ДНК в слюнката. Ограничен брой други изследователи също установяват наличие на HBV ДНК в слюнката на пациенти с хроничен хепатит В, но доц. Кръстева-Панова за първи път изследва серия от пациенти с различен вирусен товар, варираща в изключително широки граници от много ниски стойности, показващи „неактивно“ носителство на вируса до екстремно висока вирусемия, свързана с висока вирулентност. Изследването включва паралелно определяне на серумната и слюнчената концентрация на HBV ДНК в едновременно събрани проби от един и същи ден. Благодарение на този дизайн става възможно за първи път да бъде описано от авторката наличието на HBV ДНК в слюнката дори и при пациенти с много ниска серумна концентрация. Демонстрира се също много силна корелация между серумното и слюнченото ниво на HBV ДНК с корелационен коефициент $r = 0.998$. Тези резултати демонстрират ролята на слюнката за трансмисията на HBV инфекция дори и при пациенти с ниска вирусемия. Уникални са също и резултатите от едновременно проследяване на промените в слюнчената и серумната концентрация на HBV ДНК по време на интерфероново лечение. Трябва да се отбележи, че това реално е първото съобщение в медицинската литература по този проблем.

Оригинални са резултатите на авторката, получени от приложения слюнчен белтъчен панел при пациенти с орални неоплазми и болни с различни общи заболявания. Той включва изследване на CRP, IgA и калпротектин в слюнката на горепосочените групи лица. Първоначално при контролни групи от здрави деца и възрастни дисертантката прецизно е установила нормалното слюнчено ниво на CRP (<220 mg/L) и това на IgA (<120 mg/L). Чрез последващи изследвания на групи пациенти с различни болестни състояния, д-р Кръстева-Панова демонстрира, че наднормено повишен CRP в слюнката се установява при 48% от изследваните пациенти, а увеличен IgA - при 27%. Високите стойности на CRP са предимно при нелекувани деца с астма и бронхит, доброкачествени тумори и неоплазми в устната кухина, а на IgA - при пациентите с орални пренеоплазми и неоплазми в лицево-челюстната област, както и при болни с възпалителни заболявания на червата (болест на Крон и улцерозен колит). Авторката показва, че съчетаното определяне на CRP и IgA добре характеризира възпалителния процес и локалната имунна система. Интересна част от резултатите в този раздел са свързани с проследяване на sIgA в слюнката след пробиотично лечение (*Lb.bulgaricus* и *Str.thermophilus*) у пациенти без сериозни здравословни и дентални проблеми. Установява се хармонизиране на нивата на sIgA при изследваните лица. С приносен характер са и резултатите от проследяване на слюнчените нива на калпротектин

преди и след 5 дневно лечение с Азитромицин на болни с гингивит. В мнозинството от случаите е документирано отчетливо намаление на калпротектина в слюнката след терапията.

Обсъждането е стегнато и компетентно. Резултатите са добре анализирани и съпоставени с наличните в медицинската литература данни. Д-р Кръстева-Панова борави свободно и умело с научните факти, като показва висока осведоменост по проблема.

Библиографията включва 367 литературни източници, от които 30 са на кирилица. Цитирани са най-важните научни публикации в областта. Над 50% от цитираните статии са от последните 5 години, което е висок процент на използвани актуални публикации и показва отличната информираност на дисертантката по разработваната тема.

Дисертационният труд завършва с **6 извода**, които са логично следствие на получените резултати.

Открояват се оригинални приноси с важно значение за клиничната практика и фундаменталната наука:

- Оптимизирани са панели за орална диагностика на еритропоеични дефицити, афтозоподобни лезии и лигавична имунна система, съобразени с оплакванията и находките в устната кухина;
- Проследена е промяната в концентрацията на хепатитния вирус В в обща нестимулирана слюнка по време на лечение с интерферон;
- Определена е честотата и генотипа на HPV в обща нестимулирана слюнка на български пациенти;
- Определена е честотата и генотипа на HPV в биопсична тъкан на български пациенти с орални и орофарингеални пренеоплазми и неоплазми;
- Определени са рамките на латентни дефицити за еритропоеичните фактори (желязо, В9 и В12);
- Разкрити са взаимоотношения на хроничните херпесни инфекции (EBV и херпесните вируси HSV-1 HSV-2) с H. Pylori;
- Документирана е промяна на слюнчените нива на калпротектин при антибиотично лечение;
- Доказано е хармонизиране на секреторния IgA при локално приложение на пробиотик.

Авторефератът отразява вярно и в резюме съдържанието на дисертацията.

Във връзка с дисертационния труд са реализирани 20 публикации, от които 13 на английски език и 7 - на български език. В 18 от тях доц. Ася Кръстева-Панова е първи автор, и е втори автор при останалите две. Във връзка с темата на дисертацията авторката е участвала в разработката и изпълнението на 4 научно-изследователски проекта, финансирани: от МОН – 1 и от Медицински университет, София – 3.

3. Заключение

Доц. Д-р Ася Кръстева-Панова е изграден специалист, утвърден изследовател и отличен преподавател. Дисертационният ѝ труд е добре планирано изследване, посветено на интересен и актуален научен проблем. Проучването впечатлява с големия брой анализирани пациенти и широкия набор от извършени изследвания в различни диагностични среди. Използвани са съвременни и адекватни на целта и задачите методи на изследване. Дисертацията респектира с подчертано новаторския си характер и реално е най-мащабното, комплексно и задълбочено изследване по разглеждания проблем. Съществена част от получените резултати са без аналог в световната медицинска литература. Данните са добре представени, обобщени и анализирани. Направени са важни изводи и са изведени значими приноси за съвременната наука и клинична практика.

Дисертационният труд отговаря на изискванията на Закона и Правилника на МУ-Варна за придобиване на научна степен „доктор на медицинските науки”. Убедено давам своето положително становище и предлагам на уважаемите членове на научното жури да гласуват за присъждане на научната степен „доктор на медицинските науки” на доц. д-р Ася Кръстева-Панова.

07.08.2018г.

Проф. д-р Деян Желев, дмн

