

РЕЦЕНЗИЯ

от доц. д-р Дора Николова ПОПОВА, доктор
Началник отделение по клинична имунология, ККЛИ, ВМА – София
Относно: защита на дисертационен труд на тема

„АНГИОЕДЕМ И УРТИКАРИЯ: КЛАСИФИКАЦИЯ, ИМУНОЛОГИЧНА И ГЕНЕТИЧНА ХАРАКТЕРИСТИКИ“

за присъждане на научна и образователна степен „ДОКТОР“
на д-р АННА ВАЛЕРИЕВА ДИМИТРОВА

Научни ръководители: доц. д-р Мария Тончева Ставеска, дм
Проф. д-р Васил Димитров Димитров, дм

Научен консултант: Проф. д-р Марко Чикарди

Клиничен център по алергология
Медицински факултет, Медицински Университет - София

Професионално направление 7.1.Медицина
Докторска програма *Имунопатология и алергология*

Квалификация и професионален път

Д-р Анна Валериева Димитрова е завършила Медицина в МУ - София през 2012 г. След успешно положени конкурси изпити е зачислена за редовен докторант през 2013 г. и асистент към Клиничния център по алергология през 2015 г. Следдипломното обучение на д-р Валериева включва стаж по програма Еразъм+ при проф. д-р Марко Чикарди в Университета на Милано, Италия, където специализира в сферата на ангиоедема и състоянията на пароксизмален хиперпермеабилитет. Форма на продължаващо обучение е участието ѝ в специализирани национални и международни форуми, от които свързани с дисертационния труд съответно 3 и 10, както и в научно-изследователски проекти – национални (4) и международни (1).

Структура, оформление и онагледяване на дисертационния труд

Дисертационният труд съдържа 217 печатни машинописни страници, от които 186 – текст, 23 страници библиография, използвани съкращения и съдържание. Въведението и литературният обзор обхващат 54 страници, изложението на целта, задачите, материалите и методите – 23 страници, резултатите и обсъждането – 105 страници, изводите, препоръките и приносите – 4 страници. Илюстриран е с 56 фигури и 38 таблици. Разделите обхващащи резултатите и обсъждането им следват поставените задачи. Считам, че структурата на разработката отговаря на съответните изисквания на МУ - София.

Актуалност на проблематиката

Ангиоедемът представлява преходен, асиметричен, локализиран оток, засягащ дълбоките подкожни или лигавични слоеве, свързан с повишена съдова пропускливост и екстравазация на съдова течност вследствие освобождаване на вазоактивни медиатори (основно хистамин и брадикинин). Счита се, че 10 до 20% от хората могат да бъдат засегнати от ангиоедем в живота си. Ангиоедемът е изключително хетерогенен от гледна точка на етиология (придобит или наследствен), патофизиология (хистаминергичен, брадикинин-медиран) и клинични прояви. Те са с непредсказуем ход, обезобразяване, болезненост, емоционален стрес, а в някои случаи застрашават живота на пациента и налагат хоспитализация. Фенотипното разнообразие се явява предизвикателство за точната диагноза и адекватно терапевтично поведение, особено в условия на спешност и липса на подходяща подготовка на медицинския персонал. Значителните физически, психологически и социални ефекти, с висок брой отсъствия от работа, определят медико-социалната значимост на проблема. Представеният за защита дисертационен труд разглежда в нова светлина наличните познания за ангиоедема и това прави темата на научното проучване много актуална, като резултатите намират пряко практическо приложение.

Литературен обзор

Написан е много компетентно и показва отличната теоретична, практическа и методична подготовка на автора. Книгописът включва 346 заглавия. От тях 6 са на кирилица, а останалите 340 – на латиница, включващи още 4 български колектива. 46,5% са от последните пет (154/346), а 18% са от последните две години (62/346). Богатият литературен материал е целево синтезиран, осмислен с вешчина, зрялост и критичност и проследява развитието на познанията върху ангиоедема от първите описания в края на 19-ти век до днес. Във фиг. 5 на стр. 23 е представен много добре онагледен синтез на биологичните ефекти, свързани с действието на С1-инхибитора. Включен е преглед и на уртикарията, с което дисертационният труд съответства на неговото заглавие.

Адекватност на формулираните цел и задачи на научното изследване

Въз основа на данните от литературата и обобщението на нерешените проблеми са формулирани ясно и с практическа насоченост целта и произтичащите от нея задачи на изследването. Известна изненада крие фактът, че целта на дисертационния труд е фокусирана единствено върху ангиоедема, докато заглавието включва и уртикария.

Използвани материали и методи на научното изследване

Дисертационният труд обхваща проучвания върху пациенти с ангиоедем с различна генеза, както и група с хронична уртикария. Прецизно са описани

включващите и изключващите критерии за пациентите с ангиоедем – брадикинин-медиран или хистаминергичен с хронична уртикария. В раздел „Материали и методи“, обаче, никъде не е указан броят на изследваните лица, за да се прецени дали той е достатъчен и е предпоставка за получаване на достоверни и практически значими резултати. Въпреки това, от данните с анализ на резултатите става видно, че изследването се разпростира върху впечатляващо голям брой пациенти с редки форми на брадикинин-медиран ангиоедем. Ретроспективно са анализирани 202 болни от 41 фамилии, с превес на мъжете (55%). От тях починали са 56 (27%), проследяват се 46 лица (23%), а 100 пациента са загубени от проследяване (50%). За периода 2013 – 2018 г. проспективно са анализирани 85 пациента от 26 фамилии, от които 46 жени (54%).

Описани са детайлно включените методи на изследване – документален, клинични подходи, лабораторни и статистически методи. Към рутинно използваните клинични методи - анамнеза и статус – би могла да се добави оценката на клиничната тежест на наследствения ангиоедем по Bygum A., с конкретните ѝ въпроси, резултати от която са приложени по-нататък.

Към рутинно прилаганите лабораторни показатели пълна и диференциална кръвна картина с биохимия са добавени високочувствителен тест за С-реактивен протеин (hsCRP) и тестове за функция на щитовидната жлеза. Имунологичните методи включват нефелометрия и радиална имунодифузия за C1-инхибитор, C4 и C1q фракции на комплемента, колориметричен метод за определяне на C1-естеразна активност, Western blot за разграждане на кининогена с високо молекулно тегло, и ELISA за IL-6, IL-10, IL-33, химиокина CCL2/MCP-1 и анти-C1-INH антитела от класове IgG, IgA, IgM. Някои повторения в изследователските протоколи биха могли да се избегнат. Коректно е отбелязано къде са извършени лабораторните изследвания. Част от тях са осъществени с участието на докторанта (изследването на C1 инхибитора като количество и функция, C1q, C4, разграждане на кининогена с високо молекулно тегло, анти-C1-INH антитела) при обучението й в Лабораторията за изучаване на Комплемента, ръководена от Prof. Marco Cicardi, Университет на Милано, Италия.

Комплексният методичен подход е съвременен, високо информативен и адекватен за поставената цел и получаване на адекватен отговор на задачите, решавани в дисертационния труд.

Анализ и оригиналност на получените резултати и обсъждането им

Получените резултати са представени изчерпателно и нагледно в глави, съответстващи на поставените задачи:

1. Литературните данни за нови генетични нарушения при ангиоедема с нормално ниво на С1-инхибитор в гените за фактор 12, плазминоген и ангиопостин-1, дават основание на докторанта за актуализация на съществуващата клинична класификация от 2014 г. (M. Cicardi и сътр.). Предложена е и оригинална патофизиологична класификация, която застъпва нова хипотеза за съществуване на припокриване (overlap) между медиаторите при не добре характеризираните форми на идиопатичен ангиоедем.
2. На хистаминергичния ангиоедем се падат над 90% от пациентите с ангиоедем, най-често асоцииран с хронична уртикария. При хипотезата за нарушени имунни регулаторни механизми, при 45 пациента с хронична уртикария са потърсени данни за персистиращо системно възпаление, обективизирано чрез hsCRP, IL-6, IL-10, IL-33 и химиокина CCL2/MCP-1. В 31 от случаите (табл. 8) е наблюдаван и ангиоедем. За сравнение е използвана контролна група от 10 здрави лица. В повечето таблици (5, 6, 7, 9, 10, 12, 13, 14) и фигури (14, 15, 16, 18) са представени резултати, касаещи хроничната уртикария. От изследваните цитокини, за IL-33 е налице сигнificantна разлика ($p = 0.048$) между пациентите с хронична уртикария със и без ангиоедем: съответно 2.36 и 0.90 pg/ml. Няма обяснение на намерените нива при лека (1.67 pg/ml), тежко протичаща уртикария (2.14 pg/ml) и здравите контроли (5.0 pg/ml) за този цитокин. Трябва да се отбележи, че литературните данни относно нивата на IL-10 и IL-33 при хронична уртикария са противоречиви (1 250 000 резултата от търсене по тези ключови думи), най-вероятно поради разлики в техническото изпълнение на пробите – цитокините са изключително чувствителни на съхранение и температурни промени. Всички автори, обаче, са единодушни, че отклоненията в цитокиновите нива подкрепят становището за нарушена имурегулация при хроничната уртикария.
3. Най-значителният принос на дисертационната работа безспорно е свързан с редките форми на брадикинин-медиран ангиоедем с неговите демографски, клинични и имунологични характеристики. Пациентите са разпределени в групи с тип 1 и тип 2 наследствен ангиоедем (НАЕ). След 2013 г. са идентифицирани пациенти с особено редките типове: наследствен ангиоедем с нормално ниво на С1-инхибитор (2), ангиоедем с придобит С1-инхибиторен дефицит (2) и идиопатичен нехистаминергичен придобит ангиоедем (1 болен). Данните за забавянето на диагнозата след първите оплаквания от страна на болните от 10,2 г. до 2013 г. и 16,8 г. след 2013 г., са близки до съобщаваните в литературата. Впечатляваща е двойно по-кратката преживяемост на починалите при смърт вследствие на НАЕ (33,3 г.), в сравнение с другите причини за летален изход (66,7 г.). В 76,5% от смъртните случаи поради НАЕ, диагнозата не е била поставена приживе (данни за

периода до 2013 г., без смъртни случаи вследствие НАЕ след това). Заслужава внимание фактът, че средният период на проследяване на пациентите с НАЕ е 16 г., какъвто малко страни могат да отбележат. Данните сочат, че в 93% от случаите първите прояви на НАЕ се наблюдават до 20 г., а в едва 45% диагнозата е поставена до тази възраст. Неразпознатата диагноза е била причина за трахеотомия в 10.3% и ненужна лапаротомия в 18.2% от болните с НАЕ. При това, диагностицираните български пациенти са с тежест на клиничните прояви над средната, според оценката на A. Bygum (≥ 5), въведена в последните години.

Чест прави на д-р Валериева обобщението на наличните терапевтични стратегии, подходящи за различните форми на ангиоедем. В същото време трябва да признаем, че българските възможности за адекватно лечение, самоприложение на C1-инхибитор и профилактика са твърде ограничени, а прецизната клинична характеристика с факторите индуциращи и влошаващи ангиоедема и нелеката лабораторна диагностика губят смисъл при липса на навременна адекватна животоспасяваща терапия.

4. Значим принос на докторанта е създаването на карта за разпространението на редки форми на ангиоедем на територията на България. Тя е показателна за ниското ниво на диагностична готовност в 13 области в страната, където не е регистриран нито един случай на НАЕ. На тази база оценката за честотата на заболяването не се очаква да е точна: 1 / 93 105 души население. Вероятно изчислената в края на 90-те години на миналия век честота от проф. Б. Божков, е по-близка до реалната – 1 / 68 000.
5. Д-р А. Валериева представя най-машабното генетично изследване в българската популация на пациенти с брадикинин-медиирани форми на ангиоедем, обхващащо 73% от диагностицираните фамилии, с описани 3 нови мутации като причинители на НАЕ, характеризирани прецизно с помощта на авангардното секвениране от ново поколение. С оглед на бъдещи генетични проучвания е създадено началото на биобанка от изолирана ДНК на пациенти с хронична уртикария с/без ангиоедем.
6. Овладянният клиничен опит на д-р А. Валериева ѝ дава възможност да обобщи данните за клинична характеристика на случаите с ангиоедем. Нещо повече, тя предлага оригинален алгоритъм за диагностика и поведение при тези пациенти.

В обсъждането получените данни са умело сравнени с наличната научна литература. Въпреки известни повторения на изложеното в раздел „Резултати“, обсъждането предлага важни практически обобщения и насоки за бъдещи изследвания и терапевтично поведение.

Напълно съгласна съм с направените изводи. По правило се очаква, обаче, изводите да следват поставените задачи. Подкрепям формулираните научно-теоретични и научно-приложни приноси. Към набелязаните препоръки бих подчертала отново необходимостта от по-насочена работа с педиатрите и специалистите по гастроентерология и спешна медицина. Освен информацията за ангиоедема, смятам че обобщаващи данни за диференциалната диагноза също биха били полезни.

Представяне и яснота на дисертационния труд

Смятам, че дисертационният труд би спечелил ако изложението е по-кратко и без излишни повторения, някои от които бяха отбелязани. Не се налага една и съща информация от резултатите да фигурира като текст, в таблица и фигура. От друга страна, защитата на дисертационния труд се осъществява в български медицински университет и това изисква изложение на български език, без прекомерна употреба на чужди (английски) термини не само в текста, но и във фигураните и табличите, които следва да имат заглавия. Освен това, десетичният знак, приет в България е запетаята. Тези критични бележки имат характер на добронамерени препоръки с оглед придобиването на „образователната“ степен „доктор“. Те в никакъв случай не омаловажават безспорните новости и смисъла на изложението. В този ред на мисли предлагам във фиг. 4, стр. 21 активаторите на мастоцитната клетка да бъдат дефинирани като екзогенни и ендогенни, вместо индуцируеми и спонтанни. Последните, асоциирани с автоантитела от класове IgG или IgE, по същество също са индуцируеми при определени условия в организма. Към ендогенните активатори на мастоцитната дегранулация могат да се добавят споменатите в текста анафилатоксии C3a и C5a, човешкият β-дефензин и субстанция P. На стр. 22, CD41 да се чете CD4+ T-клетки, а по отношение имиграцията, терминът емиграция е по-подходящ за напускащите страната ни пациенти.

Няма съмнение, че цялостното оформяне на проучването е лично дело на докторанта, отразяващо отлична професионална подготовка, възможности за критичен анализ, творчески синтез и самостоятелно провеждане на научно изследване. Личните качества на д-р А. Валериева - изявите ѝ в научната и организационната дейност, заслужават висока оценка.

Авторефератът коректно представя основните проблеми и резултати, разгледани в дисертационния труд. Той също би могъл да се съкрати, особено в частта на методите.

Докторантът прилага списък от 5 публикации, от които една в списание с импакт фактор - Allergy, Asthma & Clinical Immunology; IF = 2,051 (90 т. при минимално изискване за 30 т.). Д-р А. Валериева участва в 13 доклада и научни съобщения, свързани с темата на проучването и неговото популяризиране – 10 международни и 3 национални събития. В 3 от статиите и 12 участия в

конференции д-р А. Валериева е водещ автор. Две от научните съобщения са с награда за постерна презентация. Всичко това е свидетелство за личния ѝ принос, популяризирането на труда и оценката на научната общност за нея.

В заключение, дисертационният труд „Ангиоедем и уртикария: класификация, имунологична и генетична характеристики“ на д-р Анна Валериева Димитрова *съдържа научно-приложни резултати, които представляват оригинален принос в науката и отговарят на всички изисквания на Закона за развитие на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ). Правилника за прилагане на ЗРАСРБ и специфичните изисквания, приети във връзка с Правилника на МУ - София.*

Дисертационният труд показва, че докторантът *д-р Анна Валериева Димитрова* притежава задълбочени теоретични знания и професионални умения в областта на клиничната алергология и имунопатология, като демонстрира качества и умения за самостоятелно провеждане на научно изследване.

Поради гореизложеното, убедено давам своята *положителна оценка* за дисертационния труд на тема „Ангиоедем и уртикария: класификация, имунологична и генетична характеристики“, представено от рецензираните по-горе дисертационен труд, автореферат, постигнати резултати и приноси, и *предлагам на почитаемото научно жури да присъди образователната и научна степен „доктор“ на д-р АННА ВАЛЕРИВА ДИМИТРОВА* в докторска програма по имунопатология и алергология.

София

23.12.2018 г.

Изготвил рецензията:



Доц. д-р Дора Ник. Попова, дм