

РЕЦЕНЗИЯ

От доц. Виктория Стефанова Левтерова, д.м.,
зав.отдел „Микробиология” при НЦЗПБ, София,

На дисертационен труд представен пред научно жури, сформирано със заповед № 583/01.12.2023 г. на Директора на НЦЗПБ, за присъждане на образователната и научна степен „ДОКТОР” по научната специалност „Микробиология” – шифър 01.06.12. В област на висше образование 4. „Природни науки, математика и информатика”. Професионално направление 4.3. „Биологически науки”

Автор: Борислава Илиева Цафарова

Форма на докторантурата: редовна

Тема: *„Микробиологични, електронно-микроскопски и молекулярно-биологични методи за изследване на патогенезата при саркоидоза”*

Научен ръководител: проф. дн Стефан Панайотов, НЦЗПБ

Представеният ми за официална защита дисертационен труд на тема *„Микробиологични, електронно-микроскопски и молекулярно-биологични методи за изследване на патогенезата при саркоидоза”* на Борислава Илиева Цафарова ми дава основание да формулирам рецензията си както следва:

Актуалност на тематиката

Саркоидозата е мултисистемно грануломатозно заболяване с неизвестна етиология. Клиничните изяви са неспецифични и разнообразни. В над 90% от случаите се проявява белодробна форма, като са засегнати белите дробове и/или вътрегръдните лимфни възли. Протичането на заболяването варира от самоограничаващо се до инвалидизиращо и свързано с ранна смъртност. Предполага се, че саркоидозата се предизвиква от неизвестен антиген (антигени) у хора с анормален имунен отговор и генетична предразположеност. Опитите за установяване на етиологичния причинител на заболяването продължават вече повече от 140 години. Някои изследователи смятат саркоидозата за автоимунно заболяване, други посочват неинфекциозен агент от

околната, домашна или работна среда, като отключващ фактор. Трети предполагат участие на един или няколко различни микроорганизма в патогенезата на саркоидозата. Към момента все повече данни насочват към инфекциозната етиология на заболяването или развитие на заболяването следствие от дисбиоза на микробиома. Множество изследователи доказват наличие на микроорганизми в саркоидни проби. Тъй като до момента не е доказан един единствен етиологичен причинител на саркоидозата, е възможно различни по вид микроорганизми да участват в патогенезата на заболяването. Най-много доказателства има натрупани за представители от род *Mycobacterium* (*Mycobacterium tuberculosis*) и за *Cutibacterium acnes*. Борислава Цафарова се фокусира върху търсене на доказателства за микробно участие в етиологията на саркоидозата. Основна цел на докторантката е изследване на микробиома при пациенти със саркоидоза и контролни лица чрез молекулярни, културелни и микроскопски техники за анализ.

Изследвания по проблема

Дисертационният труд е конструиран в традиционна форма със съответните раздели - увод, литературен обзор, цел и задачи, материали и методи, резултати и дискусия, изводи, приноси и литература. Резултатите от всяка изпълнена задача са придружени от дискусия. Дисертационният труд съдържа 169 страници, 42 фигури и 11 таблици. Библиографията включва 213 литературни източника. Висок процент от тях са от последните няколко години, което подчертава неговата актуалност. Всички те изцяло кореспондират с поставените цел и задачи.

Литературният обзор е написан информативно и представя подробен обзор за състоянията на изследванията по проблема. Описани са научните тенденции и хипотези за изясняване патогенезата на саркоидозата.

Разделът материали и методи представя подробно описание на приложените методи. Методите са разнообразни и интердисциплинарни. Включват микробиологично култивиране, молекулярни техники, сканираща и трансмисионна микроскопия, други микроскопски техники и секвениране от ново поколение. За целите на дисертацията са изследвани двойки материали - кръв и тъканен биопсичен материал от 13 пациента с предполагаема саркоидоза, и кръв, биопсия и бронхоалвеоларен лаваж от 31 пациента суспектни за саркоидоза. За част от експериментите, включващи култивиране на кръв и електронна микроскопия е използвана кръв от седем здрави доброволци. Към изследваните материали са включени 20 броя парафинови блокчета с включен биопсичен

материал от пациенти с белодробна саркоидоза и 19 броя парафинови блокчета с оперативен материал от пациенти с белодробна туберкулоза.

По поставените задачи и подзадачи, общо четири на брой, са постигнати важни и съществени резултати. Резултатите са онагледени с 42 фигури и 11 таблици. Описанието на резултатите е точно и ясно и е направено на добър научен език. Към всеки резултат е направено обсъждане, което улеснява четенето и възприемането. Визуализацията на резултатите е професионално изработена. Снимковият материал е ясен и с добър контраст. Описанието на фигурите е подробно и разбираемо.

Докторантката успешно изпълнява поставените си две комплексни задачи:

1. Задача 1. Анализ на кръвния и тъканен микробиом на пациентите със саркоидоза чрез култивиране на кръв от пациенти със саркоидоза и контролни лица при нормални стресови условия. Микроскопски морфологичен анализ на микробни видове вкултивирана цяла и лизирана кръв. Изолиране на ДНК от култивирани (кръв) и некултивирани клинични материали (кръв и биопсия) от пациенти със саркоидоза, и контролни лица и провеждане на микробиомен анализ чрез секвениране от ново поколение.
2. Задача 2. Изследване ролята на *Cutibacterium acnes*, *Mycobacterium tuberculosis* и други микобактерии и микроорганизми за изясняване на потенциалното им участие в патогенезата на саркоидозата чрез изследване на клинични материали (биопсия, кръв и БАЛ) от пациенти със саркоидоза за *Cutibacterium acnes*, *M. tuberculosis* и други микобактерии чрез PCR. Имунохистохимично изследване с моноклонално антитяло за доказване на *Cutibacterium acnes* в засегнати от саркоидоза лимфни възли.

Получените резултати описват морфологията и механизмите на пролиферация при кръвните микробиоти. Борислава Цафарова публикува изследване в което описва механизмите на делене, чрез светлинна и електронна микроскопия. Открива, че кръвните микробиоти, формират електронно плътни и електронно прозрачни микробни телца. Визуално наблюдава и открива нов механизъм на размножаване на кръвните микробиоти, при който дъщерните клетки не напускат майчината клетка, а нарастват, и вътре в тях се размножават нови дъщерни клетки. Механизмът на делене е наречен „клетка в клетка“ и го сравнява с матрьошки където в една могат да се поместят няколко по-малки.

Докторантката изследва ролята на *Cutibacterium acnes*, *M. tuberculosis*, други микобактерии и *Toxoplasma gondii* в етиологията на саркоидозата чрез PCR с видово и родово специфични праймери. Резултатите показват, че тези микробни видове имат отношение към заболяването. На база на метагеномните данни от секвенирането на проби (кръв, БАЛ и биопсия) от саркоидозно болни е изследвана връзката на *Cutibacterium acnes*, *Toxoplasma gondii*, *M. tuberculosis* и други микобактерии, като потенциални патогени участващи при формирането на грануломи. Получени са резултати (непубликувани) *Toxoplasma gondii* в патогенезата на саркоидозата. В литературата към момента няма публикувани доказателства за участие на този паразит в патогенезата на саркоидозата.

В обобщение разделът „Резултати и дискусия“ е написан компетентно. Много добре е илюстриран и документиран.

Изводите са коректно формулирани и обобщават основните акценти в работата. Борислава Цафарова формулира пет научно-теоретични приноса с оригинален характер и четири научно-приложни приноса с които съм напълно съгласна. Изводите могат да се обобщят по следния начин:

1. Фиксираните с формалин и включени в парафин тъканни проби не са подходящ модел за молекулярно-биологично изследване на патогенезата на саркоидозата. Остатъчната ДНК е силно увредена вследствие на обработката със токсични реактиви и стареене.

2. Кръвните микробиоти се различават по морфология, но най-общо биват два вида: електронно плътни телца и електронно прозрачни телца.

3. Електронно плътните телца се размножават чрез пъпкуване или формиране на верижки, или нарастват и отделят прогениторни клетки с размери 180 – 200 nm.

4. Наблюдаван е нов механизъм на размножаване наречен „клетка в клетка“.

5. Ролята на микобактериите, *Cutibacterium acnes* и *Toxoplasma gondii* в патогенезата на саркоидозата изисква допълнителни проучвания.

6. Наблюдава се характеристичен микробиомен профил на кръвта и характеристичен микробиомен профил на белодробната тъкан, които се различават един от друг.

7. Микробиомният анализ показва, че други микробни видове също биха могли да имат участие в патогенезата на саркоидозата.

Публикации и личен принос на докторанта

Резултатите са публикувани в 7 научни статии по темата на дисертацията. Три са в издания с импакт фактор като *Frontiers in Cellular and Infectious Microbiology*, *Microorganisms* и *Computational and Structural Biotechnology*. Приложен е цитиран постер в списание с импакт фактор, който според Приложение 1 на Правилника на НЦЗПБ за прилагане на Закона за развитие на академичния състав в РБ се счита за публикация с импакт фактор. Списанието в което е публикуван цитираният постер е *ERJ Open Research* и е с импакт фактор 4.6. Публикациите имат общ импакт фактор 16.359 (или 20,959). Публикациите имат 13 цитирания към момента. Докторантката е докладвала резултатите си на 16 международни и 7 национални научни форума. Броят набрани кредитни точки е 747. Според правилника на НЦЗПБ и НАЦИД докторантката надхвърля необходимите 200 кредитни точки за защита на образователна и научна степен „Доктор“. Видно е, че докторантката има съществен личен принос в изследванията и е работила старателно и задълбочено по дисертацията си.

Нямам критични забележки по структурата, резултатите и описването на дисертационния труд.

В заключение, дисертационният труд на Борислава Илиева Цафарова е задълбочено и професионално изследване на кръвния и тъканен микробиом при саркоидозно болни и здрави лица. Дисертационният труд е иновативен и с научно и приложно значение.

Поради гореизложеното считам, че рецензираният дисертационен труд отговаря напълно на изискванията на Закона за развитие на академичния състав в Р. България (ЗРАСРБ), Правилника за неговото приложение и Правилника на НЦЗПБ за присъждане на образователната и научна степен „Доктор“.

Давам **положителната си оценка** и подкрепям присъждането на образователната и научна степен „Доктор“ по научна специалност „Микробиология“ на Борислава Илиева Цафарова.

15.01.2024 г.

Рецензент:

доц. Виктория Левтерова, дм