



До Председателя на научното жури
назначено със заповед № 583/01.12.2023 г.
на Директора на НЦЗПБ,
Проф. д-р Ива Христова, дми, мзм

РЕЦЕНЗИЯ

относно процедура за придобиване на ОНС „Доктор“ с кандидат **Йордан Красимиров Ходжев**, редовен докторант в НЦЗПБ в област на висше образование 4. Природни науки, математика и информатика, професионално направление 4.3 Биологически науки, по научната специалност „Микробиология“

Тема на дисертационния труд: „Микробиомен и биоинформатичен анализ за проучване на патогенезата на саркоидозата“

Научен ръководител: Проф. дн Стефан Панайотов

Изготвил рецензията: Доц. Иван Николаев Иванов, дм завеждащ Национална референтна лаборатория по контрол и мониториране на антимикробната резистентност, отд. Микробиология, Национален център по заразни и паразитни болести

Представените конкурсни документи са изготвени коректно и в съответствие със Закона за развитието на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ) и правилника за прилагането му в НЦЗПБ.

Декларирам, че нямам конфликт на интереси по смисъла на чл. 4, ал. 5 от ЗРАСРБ.

Карьерно развитие.

Йордан Ходжев завършва средното си образование в гр. Велико Търново. От 2000 г. е студент в Биологически факултет на Софийски университет специалност молекулярна биология и през 2006 г. придобива магистърска степен по биофизика. След завършване на висшето си образование работи като учител по биология, математика, физика и химия за прогимназиален курс и като биостатистик в компания за клинични изпитвания. От м.

октомври 2020 г. е редовен докторант в лабораторията по „Особено опасни бактериални инфекции“, сектор „Микробиом“ на отдел „Микробиология“ на НЦЗПБ.

Актуалност на темата.

Саркоидозата е рядко възпалително заболяване, с развитие на грануломи в различни органи. Саркоидозата е описана преди повече от 130 години. Предимно са засегнати белите дробове и лимфните възли. За съжаление патогенезата на заболяването е неизвестна.

Потенциалното участие на различни микробни видове в патогенезата на саркоидозата е предложено преди години. При саркоидоза се наблюдават хистологични прилики с грануломатозните лезии свързани причинители на туберкулоза, бруцелоза и др. Епидемиологични и микробиологични проучвания предполагат, че поне при част от пациентите, микроби или техни продукти могат да предизвикат имунен отговор, водещ до образуване на саркоиден гранулом. Нови проучванията показват имуномодулиращата роля на белодробния микробиом при саркоидоза. Връзката между микробиома на кръвта и саркоидозата не е проучена. Ролята на кръвния микробиом в патогенезата на множество заболявания е сравнително ново научно направление. За изясняването на тази многостранна връзка са необходими интердисциплинарни изследвания, комбиниращи микробиологични, имунологични, клинични и биоинформатични знания. Напредъкът в областта на биоинформатиката и изследванията на кръвния микробиом дават нови възможности за изясняване на патогенезата на саркоидозата.

Общо описание на дисертацията.

Структура на дисертационния труд и библиография, написан е на 128 страници, съдържа 24 фигури и 10 таблици. Ползвани са 121 литературни източника, като преобладаващата част тях са от последните 10 години. По обем, структура и оформяне дисертацията напълно отговаря на изискванията за придобиване на образователната и научна степен „доктор“. Дисертацията е структурирана стандартно както следва: Въведение - 3 стр. с графичен абстракт на дисертацията; Литературен обзор - 31 стр.; Цел и задачи – 1 стр.; Материали и методи 17 стр.; Резултати и обсъждане - 30 стр., Заключение - 8 стр., и Изводи и приноси - 4 стр.

Литературният обзор в стегнат вид описва състоянието на изследванията по проблема.

Цел и задачи. Дисертантът си поставя за цел да изследва хипотезата, че микробният дисбаланс или свързаните количествени изменения на специфични представители на кръвния микробиом могат да допринесат за развитие на белодробната саркоидоза или дори да я индуцират. Целта и шестте задачи са прецизно формулирани, отразявайки основните аспекти и същността на дисертационния труд.

Материалите и методите са детайлно и коректно описани, от което личи високото ниво на компетентност на кандидата.

Резултати и дискусия.

Проведените изследвания разкриват детайли относно участието на кръвния микробиом в патогенезата на саркоидозата. Анализът на кръвния микробиом предлага оригинални данни за нови диагностични маркери за идентифициране и наблюдение при саркоидоза. Предложен е иновативен подход за изследване и оценка на участието на кръвния микробиом в патогенезата на саркоидозата.

Получените резултати могат да се обобщят начин:

(1) Докторантът провежда биоинформатичен анализ на базисния (core) кръвен микробиом при здрави лица, спрямо който е сравнен с кръвния микробиом на пациенти със саркоидоза. Чрез култивиране на кръвни проби от здрави лица е извършено реанимиране (resuscitation) на латентни микробни клетки. Реанимирането е осъществено при стресови условия – температура различна от физиологичната (43°C) и токсичен стрес с високи концентрации на синтетичен витамин К (1g/l, водоразтворим менадион натриев бисулфит). В култивирани и некултивирани кръвни проби от здрави лица, анализирани чрез таргетно секвениране на 16S рРНК и ITS маркери са идентифицирани 241 бактериални OTU и 272 гъбични OTU. Доминиращите бактериални типове сред некултивираните проби са били Proteobacteria 92,97%, Firmicutes 2,18%, Actinobacteria 1,74% и Planctomycetes 1,55%, докато сред култивираните проби Proteobacteria са били 47,83%, Firmicutes 25,85%, Actinobacteria 16,42%, Bacteroidetes 3,48%, Cyanobacteria 2,74% и Fusobacteria 1,53%. Доказаните гъбички от типове Basidiomycota, Ascomycota и неидентифицирани гъбичи са били съответно 65,08%, 17,72% и 17,2% сред некултивираните проби, докато сред култивираните проби съответно 58,08%, 21,72% и 20,2%. Други автори потвърждават доминиращото присъствие на латентни Proteobacteria в кръвта на здрави лица (Paisse et al., 2016). Трябва да се отбележи, че други изследвания свързани с културелното стресово реанимиране на микробни видове в кръвта не са публикувани. Лабораторията е първата в света, която доказва съществуването на нормален гъбичен микробиом в кръвта на здравите лица. Бактериалното разнообразие в кръвта на здрави и болни от саркоидоза е изследвано на индивидуално и групово ниво и е представено чрез диаграми на Sankey и Krona. Проведеният от докторанта статистически анализ доказва значително увеличение на богатството на бактериалното алфа-разнообразие при пациенти със саркоидоза, използвайки индексите на Shannon и Simpson в сравнение със здрави контроли. Индексът на Bray-Curtis за различие в таксономичния състав е използван, като показател за бета-разнообразие между групите на пациенти и здрави лица. Анализът на главните координати (PCoA) ясно илюстрира разграничаването между двете групи.

(2) Визуализация на количествения и качествен състав на кръвния микробиом. Изследвани са кръвни проби от 7 пациенти със саркоидоза и 22 здрави индивида. Пробите са секвенирани чрез 16S rRNA таргетен метагеномен подход. Резултатите са визуализирани чрез диаграми на Sankey и кръгови диаграми тип Krona. Диаграмата на Sankey показва действителното разнообразие от секвенции, а Krona илюстрира относителното богатство.

(3) Докторантът изследва количествени параметри, които отчитат промени в състава на микробиома, водещи до саркоидозна патология. Идентифицирани са количествени показатели на дисбиоза в кръвния микробиом. Диаграмите на Sankey и Krona показват четири доминантни типа: Actinobacteria, Proteobacteria, Firmicutes и Bacteroidetes. Микробиомният анализ на саркоидозно болните идентифицира няколко специфични родове - *Cutibacterium*, *Corynebacterium* и *Veillonella*. Род *Dietzia* и *Acinetobacter* преобладават сред здравите лица. Прилагайки теста на Mann-Whitney докторантът установява значително увеличение на пет бактериални рода при пациенти със саркоидоза: *Veillonella*, *Prevotella*, *Cutibacterium*, *Corynebacterium* и *Streptococcus*.

(4) Докторантът разработва алгоритъм за машинно обучение, който прави класификационно дърво на секвенционните данни. Моделът изчислява и сортира приноса на всеки микробен тип за диференциране на саркоидозно болни от здрави лица. Класификационният модел работи на базата на количеството OTU секвенции за таксон. Тип Proteobacteria се откроява като най-значимия в класификационния модел, следван от Firmicutes и Bacteroidetes. Представителите на тип Actinobacteria не показват принос към модела. Моделът за машинно обучение за идентифициране на вероятни ключови таксони свързани с микробиомна дисбиоза, водеща до развитие на саркоидоза има практическа приложимост за изследване на микробната дисбиоза при заболявания с неизяснена инфекциозна патогенеза.

Изводите, осем на брой, са прецизно формулирани и отразяват адекватно изпълнението на целта и поставените задачи едновременно акцентирайки върху най-важните находки от дисертационния труд. Изводите допълват многобройните проучвания, които доказват наличието на микробни видове в тъканите, кръвта и телесните течности при болни и здрави хора. Публикуваните резултати описващи гъбичния микробиом в кръвта на здрави лица са все още единствените в научната литература. Изключение правят изследвания на тъканния микробиом при пациенти с различни онкологични заболявания, където се доказват бактерии и гъбички (Nejman et al., 2020). Ролята на кръвния микробиом в човешкото здраве е отворено поле за иновативни изследвания с потенциал да се превърне в нова дисциплина на медицинската микробиология.

Дисертационният труд съдържа оригинални научни и научноприложни приноси в науката. Работата показва, че кандидатът притежава задълбочени теоретични знания в

областта на биоинформатиката и способности за самостоятелни научни изследвания. Формулирани са четири фундаментални принос:

1. Демонстрирани са експериментални доказателства за връзка между таксономичния състав на кръвния микробиом и развитието на белодробна саркоидоза.
2. Предложена е хипотеза за взаимодействие между кръвния и белодробния микробиом в патогенезата на саркоидозата.
3. За първи път, културелно и метагеномно се доказва присъствието на гъбичен микробиом в кръвта при здрави лица.
4. Количествената оценка на дисбиозата на кръвния микробиом е показател за развитие на патологични процеси.

Приносите с приложен характер са също четири:

1. Разработен е биоинформатичен подход за установяване на състава на кръвния микробиом при здрави възрастни лица.
2. Предложени са методи за визуализация и оценка на количествения и качествен състав на кръвния микробиом на единични пациенти.
3. Разработен е ефективен биоинформатичен метод за сравнителен анализ на таксономичния състав на култивирани кръвни проби за изпитване на различни хранителни среди и стресови условия за реанимиране на латентните кръвни микробиоти.
4. Приложеният класификационен модел за машинно обучение дава възможност за определяне на ключовите микробни таксони с най-голям вероятен принос в патогенезата на различни заболявания свързани с микробна дисбиоза.

Нямам съществени критични забележки по структурата, резултатите и описването на дисертационния труд. Научният стил на някои места в текста може да бъде по-ясно поднесен. Забелязах дребни езикови размествания следствие на редакции. Извод 1 е описан като резултат, а не като извод с фундаментален принос. Съгласен съм с докторанта за коментираните ограничения на проведените изследвания.

Публикации и личен принос на докторанта

По темата на дисертацията докторантът Йордан Ходжев прилага шест статии в списания с импакт фактор и импакт ранг. Четири са в списания с импакт фактор като *Frontiers in Cellular and Infectious Microbiology* – ИФ 6, Q1, *Microorganisms* – ИФ 4.1, Q2,

Computational and Structural Biotechnology – ИФ 6.1, Q1 и Biotechnology and Biotechnology Equipment – ИФ 1.6, Q3. 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 се приравнява към публикациите с импакт фактор. Списанието в което е публикуван цитираният постер е ERJ Open Research и е с импакт фактор 4.6. Общият импакт фактор е 22,559. Цитиранията са 14. Резултатите са докладвани на 15 международни и 7 национални научни конгреса. Приложените публикации имат пряко отношение към целите и резултатите от дисертационния труд. Във всички трудове Йордан Ходжев е първи или водещ автор. Йордан Ходжев е участвал и участва в четири научни проекта като изпълнител. Според правилника на НЦЗПБ и НАЦИД са необходими 200 кредитни точки за защита на образователна и научна степен „доктор“. Набраните кредитни точки по време на докторантурата са 1239 и многократно надхвърлят изискванията.

Видно е, че докторантът Йордан Ходжев има основен принос за разработването на дисертационния труд. Той е положил особено старание за усвояване и прилагане на иновативни биоинформатични методи за решаване на трудна научна задача.

Заключение.

Дисертантът Йордан Ходжев е постигнал целта и поставените задачи. Дисертационният труд е иновативен и е с научно и приложно значение. Представените дисертационен труд, публикации и други документи от кандидата покриват всички наукометрични критерии според ЗРАСРБ за защита на дисертационен труд за образователна и научна степен „доктор“.

Убедено давам своята **положителна оценка** и препоръчвам на Научното жури да присъди придобиването на образователна и научна степен „доктор“ на Йордан Красимиров Ходжев в област на висшето образование 4. „Природни науки, математика и информатика“, направление 4.3 „Биологически науки“ по научна специалност „Микробиология“.

София, 15/01/2024 г.

Изготвил рецензията:.....

/Доц. Иван Иванов/