



## СТАНОВИЩЕ

От професор д-р Искра Георгиева Райнова, „доктор на науките“,

Национален център по заразни и паразитни боласти (НЦЗПБ)

Относно: дисертационен труд за присъждане на образователната и научна степен  
“ДОКТОР”

Професионално направление: 4.3 „Биологични науки“,

Научна специалност: „Микробиология“

Автор: Йордан Красимиров Ходжев

Форма на докторантурата: редовна

Отдел: Микробиология, НЦЗПБ

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

Научен ръководител: проф. Стефан Въчев Панайотов, дн

### 1. Общо представяне на процедурата и докторанта

Представеният комплект материали на хартиен и електронен носител е в съответствие с Чл. 31 (2) от правилника за приложение на ЗРАСРБ в НЦЗПБ и включва всички изброени документи. Изготвянето и подреждането на необходимите документи е коректно и прецизно.

### 2. Актуалност на тематиката

Саркоидозата е рядко възпалително заболяване, с развитие на грануломи в различни органи, като те се откриват предимно в белите дробове и лимфните възли. През последните две десетилетия е постигнат значителен напредък в диагностиката, клиничната оценка и лечението на саркоидозата, но точната етиология на заболяването засега остава неизвестна.

Ролята на микробиома при различни автоимунни и възпалителни заболявания е активна област на изследване. Съществуват научни доказателства за взаимодействието на микробите с имунните клетки, които могат да участват в имунопатогенезата на саркоидозата. Нови проучвания показват имуномодулиращата роля на белодробния микробиом при саркоидоза. Тези нови изследвания обуславят и актуалността на темата поради необходимостта за изясняване на връзката между микробиома на кръвта и саркоидозата. Основната работна хипотеза на дисертационния труд е, че микробният дисбаланс или количествените изменения на специфични представители на кръвния

микробиом могат да допринесат за развитие на белодробната саркоидоза или дори да я индуцират. Тезата на докторанта е, че тази нова и недостатъчно изследвана научна област може да бъде развита с помощта на методите на биоинформатиката и съвременните техники за микробиомен анализ.

### **3. Познаване на проблема**

В дисертационния труд на Йордан Ходжев са реферирани общо 121 авторски заглавия на латиница, като 42% от реферираните публикации са от последните 6 години. Докторантът е много добре запознат с постиженията на световната наука и практика по различните въпроси, касаещи микробиома. Целта на дисертационния труд е ясно и точна формулирана, като за нейното изпълнение са поставени четири задачи, свързани с апробиране на биоинформатичен подход за установяване на състава на кръвния микробиом в норма при здрави лица, визуализация и оценка на количествения и качествен състав на кръвния микробиом при отделни пациенти със саркоидоза, изясняване на потенциалните причинно-следствени връзки между дисбиозата на микробиома на кръвта и патогенезата на белодробната саркоидозата и прилагане на алгоритми за машинно обучение за определяне на ключови микробни таксони с потенциален принос в патологията на белодробната саркоидоза. Съдържанието на целта и задачите показват добре обоснован подход за реализация на докторантската теза.

### **4. Методика на изследването**

В дисертационния труд са включени пациенти, диагностицирани с белодробна саркоидоза за периода 2020-2022 г. За изследване на таксономичния състав на кръвния микробиом са подбрани и здрави възрастни лица. Критериите за подбора на пациентите и здравите лица са описани подробно и ясно. За проучване на микробиома клиничните проби от пациентите включват венозна кръв, БАЛ, биопсия, смив и контрола от вода и реактиви. Събраните кръвни проби от здравите лица са изследвани без предварително култивиране и след култивиране. Общият дизайн на проучването включва няколко етапа, които са съобразени с поставените задачи. В дисертационния труд са използвани методи за секвениране на ДНК, които са съвременни, както се вижда и от литературните източници. Оригинален и новаторски е разработеният анализ на машинното обучение за обогатяване на информацията за промените в микробиома при саркоидозно болни.

За статистическа обработка на резултатите е приложен статистически софтуер R, версия 3.6.0, като с негова помощ е извършено сравнение на микробните видове между култивирани и некултивирани проби. Освен това сравнението между пробите е извършено чрез клъстерен анализ на база на анализа на главните координати (PCoA),

както и с използване на метода за дивергенция Jensen - Shannon за определяне на разстояние и пермутация ANOVA (PERMANOVA) за статистическо валидиране. Анализът и визуализацията на данните за микробиома са извършени посредством интернет базираната платформа „*Microbiome Analyst*“. Платформата дава възможност за профилиране на ампликонни секвенционни данни, като предоставя онлайн приложение за графичен потребителски интерфейс, R версия 3.5.1 и осигурява многобройни алгоритми за анализ на метагеномна информация.

## **5. Характеристика и оценка на дисертационния труд и приносите**

Собствените данни от проведените проучвания са представени в обобщен раздел „Резултати и Обсъждане“ и заема 30% от обема на дисертационния труд. В отлично оформен табличен вид и фигури са описани резултатите от изпълнението на всяка от 4-те задачи, заложи в тезата на Йордан Ходжев.

По първата задача резултатите показват, наличието на добре култивирани се бактерии и гъбички, като част от нормална кръвна микрофлора при здрави индивиди. Чрез комбинирането на операционните таксономични единици (OTU) от всички култивирани и некултивирани проби, са идентифицирани общо 105 бактериални и 133 гъбични рода.

Във втората задача чрез 16S метагеномен подход са получени 937 секвенции на проба от пациент със саркоидоза. Извършеният с различни методи микробиомен анализ показва значително увеличение на пет бактериални рода при пациенти със саркоидоза: *Veillonella*, *Prevotella*, *Cutibacterium*, *Corynebacterium* и *Streptococcus*.

По третата задача разграничаването на потенциалните причинно-следствени връзки между дисбиоза на микробиома на кръвта и патогенезата на белодробната саркоидозата е осъществено чрез PCoA анализ. Данните от него показват значително увеличение на богатството на бактериалното разнообразие при пациенти със саркоидоза, в сравнение със здрави контроли

По четвъртата задача прилагането на класификационен модел за машинно обучение идентифицира таксоните с най-голям възможен принос в патогенезата на саркоидозата. На базата на ампликонен метагеномен анализ са идентифицирани типове и родове бактерии с най-висок изчислен коефициент на принос при саркоидозно болни, за да може те да бъдат диференцирани от клинично здравите лица.

Проучванията на докторанта показват, че кръвната микрофлора е жизнеспособна екологична ниша със скрито микробно разнообразие (*Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Firmicutes* и *Bacteroidetes*), идентифицирано при култивиране. Заслуга на Йордан Ходжев

са и описаните резултати в дисертационния труд за гъбичния микробиом в кръвта на здрави лица.

Напълно одобрявам предложените от дисертанта осем приноси, от които четири са с фундаментален и четири са с приложен характер. Според мен значителен научен принос имат: а) Хипотезата за взаимодействие между кръвния и белодробния микробиом в патогенезата на саркоидозата; б) Културелното и метагеномно доказване на присъствието на гъбичен микробиом в кръвта при здрави лица; в) Разработването на 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; г) Приложеният класификационен модел за машинно обучение.

#### **6. Преценка на публикациите и личния принос на докторанта**

Във връзка с дисертационния си труд Йордан Ходжев е приложил **шест** публикации, в списания с импакт фактор и импакт ранг, като на четири от тях тя е първи автор. Общият импакт фактор на докторанта е 22,559. При разработването на дисертационния труд докторантът е събрал 1239 кредитни точки, които многократно надхвърлят изискванията на НАЦИД за ОНС „Доктор“. Освен това е представил и 22 резюмета от участия с доклади и постери в научни форуми по темата, от които 15 са изнесени в чужбина.

**Авторефератът** е структуриран в **41** страници, включва всички резултати от дисертационния труд и тяхното обсъждане.

#### **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Дисертационният труд съдържа научни и научно-приложни резултати, които представляват оригинален принос в науката, като отговарят и надхвърлят изискванията на Закона за развитие на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ), Правилника за прилагане на ЗРАСРБ и Правилника на НЦЗПБ. Дисертационният труд показва, че докторантът Йордан Красимиров Ходжев притежава задълбочени теоретични знания и професионални умения по научната специалност „Микробиология“, като демонстрира качества и умения за самостоятелно провеждане на научно изследване.

Поради гореизложеното, убедено давам своята **положителна оценка** за присъждането на образователната и научна степен ‘**ДОКТОР**’ на **Йордан Красимиров Ходжев** в докторска програма по „Микробиология“.

11.01.2024 г.

Изготвил становището:

Професор д-р Искра Георгиева Райнова, дн