



МИНИСТЕРСТВО НА ЗДРАВЕОПАЗВАНЕТО
НАЦИОНАЛЕН ЦЕНТЪР ПО ЗАРАЗНИ И ПАРАЗИТНИ БОЛЕСТИ
Отдел “Микробиология”,
Национална референтна лаборатория “Особено опасни бактериални
инфекции” (ООБИ), сектор “Микробиом”

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

Борислава Илиева Цафарова

АВТОРЕФЕРАТ НА ДИСЕРТАЦИЯ

за присъждане на образователна и научна степен “Доктор” по научна
специалност 01.06.12 Микробиология

Научен ръководител: проф. дн Стефан Панайотов

София, 2023 г

Дисертационният труд е изработен в Отдел „Микробиология“ към НЦЗПБ, гр. София с финансовата подкрепа на проект “САРКОИДОЗА”, финансиран от ННП “ВИХРЕН” и договор с ФНИ: КП-06-ДВ/10 от 21.12.2019.

Представен е на разширен колегиум на отдел „Микробиология“ на 25.09.2022 г. и е насочен за защита пред научно жури.

Дисертационният труд съдържа 169 страници, 42 фигури и 11 таблици. Библиографията включва 213 литературни източника.

Материалите във връзка със защитата са публикувани на интернет страницата на НЦЗПБ и се намират на разположение в библиотеката на НЦЗПБ, гр. София

Публичната защита ще се състои на 06.02.2024 г. от ч. в аулата на НЦЗПБ, бул. „Янко Сакъзов“ № 26, гр. София, на открито заседание на научното жури, назначено със заповед № 582/01.12.2023г. на Директора на НЦЗПБ, съгласно ППЗРАСРБ на НЦЗПБ и ЗРАСРБ.

Използвани съкращения

dH₂O – дестилирана вода

H-E – оцветяване Хематоксилин и Еозин

PCR – Polymerase chain reaction

БАЛ/ BAL – бронхоалвеоларен лаваж

ГКС – глюкокортикостероиди

ДНК/ DNA – дезоксирибонуклеинова киселина

ИХХ/ ICH – имунохистохимия

МТС – Mycobacterium tuberculosis complex

нб/ bp – нуклеотидни бази

НРЛ – Национална референтна лаборатория

НТМ – нетуберкулозни микобактерии

РНК – рибонуклеинова киселина

СЕМ/ SEM – Сканиращ електронен микроскоп

ТЕМ – Трансмисионен електронен микроскоп

I. Увод

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. Отличителна черта на саркоидозата е формирането на неказеозни, епителоидноклетъчни грануломи, които могат да засегнат почти всеки орган в човешкото тяло. 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 аномален 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, като етиологични причинители на саркоидозата.

Към момента все повече данни сочат за микробно участие в развитието на заболяването, чрез въздействие на отделни микробни видове или следствие от дисбиоза на микробиома. Множество изследователи доказват наличие на микроорганизми в саркоидни проби. Тъй като до момента няма определен 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*.

Настоящата дисертация бе фокусирана върху търсене на доказателства за микробно участие в етиологията на саркоидозата. Основна цел бе изследване на микробиома при пациенти със саркоидоза и контролни лица чрез молекулярни, културелни и микроскопски техники за анализ.

В изследванията бяха включени: клинични материали (кръв, белодробна биопсия и БАЛ) на 44 лица суспектни за саркоидоза, кръв от 7 здрави доброволци и архивни тъканни материали от пациенти със саркоидоза (22 бр.) и туберкулоза (19 бр.). От всеки от изброените материали бе изолирана ДНК за молекулярни анализи. Извършено бе секвениране от ново поколение и PCR за доказване на *C. acnes*, *M. tuberculosis*, други

микобактерии и *Toxoplasma gondii* в изследваните саркоидни клинични материали. За допълнително изясняване ролята на *S. acnes* в етиологията на саркоидозата, беше проведено имунохистохимично изследване със специфичното за бактерията моноклонално антитяло РАВ в засегнати от саркоидоза лимфни възли.

Изследван бе кръвният микробиом, чрез култивиране на кръв от пациенти със саркоидоза и контролни лица, при нормални и стресови условия. За изследване на микробните видове в култивирана цяла и лизирана кръв беше приложен микроскопски морфологичен анализ, включващ ТЕМ, СЕМ, светлинна и тъмнополева микроскопия. При кръвните микробиоти бяха наблюдавани и описани различни механизми на пролиферация.

Вероятно много фактори са отговорни за развитието на саркоидоза – генетична предиспозиция, антигенно дразнене, проява на Th 1 медиран имунен отговор, пол, възраст, поведенчески навици. Всички те са обект на активни проучвания. Екологичната динамика на околната среда вероятно също води до промени в общата заболяемост на населението. Сравнително слабо изследвана област при саркоидоза е ролята на кръвния и тъканен микробиом в патогенезата на заболяването. До момента не е изследван кръвният микробиом при саркоидоза. Това, че саркоидозата може да бъде открита в различни органи на един и същ човек предполага, че причинителят и се пренася от една телесна локация до друга, чрез кръвта или лимфата. Възможно е комбинираното изследване на кръвния и тъканен микробиом при саркоидоза да допринесе за по-доброто разбиране на патогенезата на заболяването.

Хипотези за етиологията на саркоидозата.

Общоприето е, че саркоидозата се предизвиква от неизвестен антиген или антигени у хора с аномален имунен отговор и генетична предразположеност (Judson, 2020; Inaoka, 2019; Moller, 2017; Valentonyte, 2005) Образуването на саркоидни грануломи е свързано с активиране на Th1 имунен отговор и повишена експресия на цитокините интерлевкин 2 (IL-2), интерлевкин 12 (IL-12), тумор-некротизиращ фактор- α (TNF- α) и гама-интерферон (IFN- γ). Повишена експресия имат и Th17 лимфоцитите и съответно индуцираните от тях интерлевкин 17 (IL-17) и интерлевкин 22 (IL-22), следствие на което се развива бавен, но постоянен възпалителен процес в засегнатите тъкани (Inaoka, 2019; Grunewald, 2019; Grunewald, 2007; Ziegenhagen, 2003). До момента етиологичният причинител на този тип

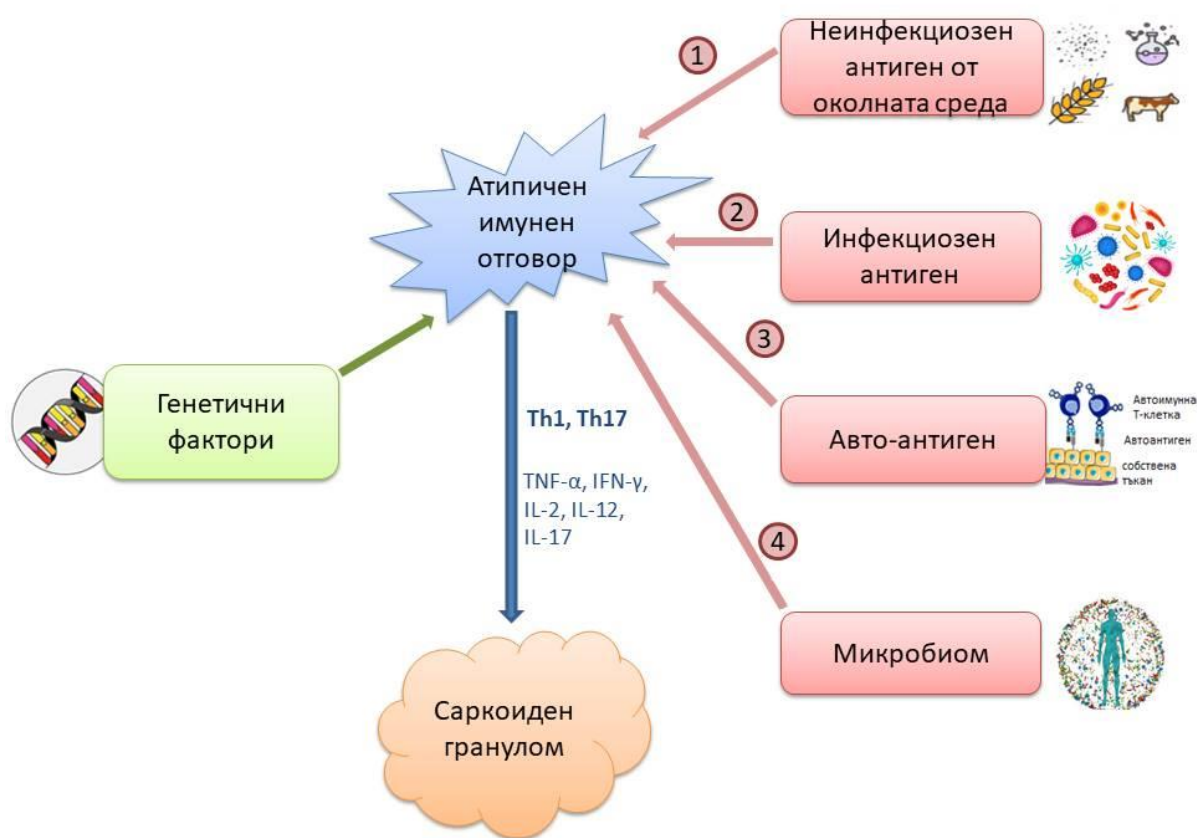
имунна реакция при саркоидоза остава неясен, но съществуват различни хипотези (фиг. 1).

Хипотеза 1: Неинфекциозна етиология – фактори от околната/работна среда. Възможно е саркоидозата да се причинява от излагане на органични (полен, смоли, органичен биоаерозол) (Judson, 2020; Gupta, 2013) или неорганични (неорганичен прах, берилий, талк) (Gorham, 2004; Newman, 2004; Barnard, 2005) субстанции от околната среда, които да отключат Th1 медираната имунна реакция. Белодробната и кожна форма на саркоидозата биха могли да бъдат свързани с действието на неинфекциозен агент вдишан в белите дробове или попаднал върху кожата. Спонтанното образуване на грануломи в органи без контакт с околната среда остава неясно.

Хипотеза 2: Инфекциозна етиология – участие на един или няколко различни микроорганизма. Множество изследователи доказват наличие на микроорганизми в саркоидни проби. До момента няма определен единствен етиологичен причинител на саркоидозата. Възможно е различни по вид микроорганизми да участват в патогенезата на заболяването. Най-много доказателства има натрупани за представители от род *Mycobacterium* (*Mycobacterium tuberculosis*) (Almenoff, 1996; Gazouli, 2002;; Gupta, 2007) и за *Cutibacterium acnes* (Eishi, 2002; Esteves, 2016; Zhao, 2017; Negi, 2012).

Хипотеза 3: Автоимунна етиология – автоантиген. Базира се на възможността автоимунна реакция да възникне чрез молекулярна мимикрия, при която поради сходство между чужд антиген и собствени за тялото молекули (пептиди) да се активират автореактивни Т или В клетки. Възможно е първоначалната грануломатозна реакция при саркоидоза да е следствие от попадане на антиген в даден орган (бял дроб), а последващите грануломатозни реакции в други органи да са резултат от молекулярна мимикрия (Zissel, 20016; Häggmark, 2015; Tchernev, 2014). Известно е, че саркоидозата наподобява, а често и съпътства други автоимунни заболявания – синдром на Съогрен, тиреоидит на Хашимото (Korsten, 2018).

Хипотеза 4: Микробиомен дисбаланс – сравнително нова хипотеза показваща възможното влияние на микробиотите от чревния, белодробен или тъканен микробиом, както и на отделяните от тях метаболити в развитието на заболяването (Fukui, 2020; Clarke, 2018; Becker, 2019).



Фиг. 1. Четирите основни хипотези за етиологията на саркоидозата

Въпреки задълбочените проучвания, етиологията на саркоидозата остава медицинска мистерия. Много вероятно е в патогенезата и да взема участие повече от един тип етиологичен агент, както и да съществуват географско-обусловени разлики.

В настоящата дисертация основен акцент е проверка на хипотези 2 и 4 или микробното участие в патогенезата на саркоидозата. Усилията са насочени в определяне на един или няколко микробни вида с потенциално значение за развитие на заболяването или доказване на микробиомна дисбиоза на ниво белодробна тъкан и кръв.

II. Цел и задачи на дисертацията

ЦЕЛ: Изследване на микробиома при пациенти със саркоидоза и контролни лица чрез молекулярни, културелни и микроскопски техники за анализ.

Задача 1. Анализ на кръвния и тъканен микробиом на пациентите със саркоидоза чрез:

а) Култивиране на кръв от пациенти със саркоидоза и контролни лица при нормални и стресови условия. Микроскопски морфологичен анализ на микробни видове в култивирана цяла и лизирана кръв.

б) 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.

Задача 2. Изследване ролята на *Cutibacterium acnes*, *Mycobacterium tuberculosis* и други микобактерии и микроорганизми за изясняване на потенциалното им участие в патогенезата на саркоидоза чрез:

а) Изследване на клинични материали (биопсия, кръв и БАЛ) от пациенти със саркоидоза за *C. acnes*, *M. tuberculosis* и други микобактерии чрез PCR.

б) Имунохистохимично изследване с моноклоналното антитяло РАВ за доказване на *C. acnes* в засегнати от саркоидоза лимфни възли.

III. Материали и методи.

1. Материали

Изследвани бяха следните **експериментални групи лица**:

- здрави доброволци
- суспектни за саркоидоза
- диагностицирани с белодробна саркоидоза,
- диагностицирани с други белодробни заболявания

Изследвани бяха следните **клинични материали**:

- кръв

- белодробна тъкан
- лимфни възли
- бронхоалвеоларна течност
- архивни тъкани

За целите на дисертацията бяха изследвани чифтни материали - кръв и тъканен биопсичен материал от 13 пациента с предполагаема саркоидоза, и кръв, тъканен биопсичен материал, и течност от бронхоалвеоларен лаваж от 31 пациента суспектни за саркоидоза. За част от експериментите включващи култивиране на кръв и електронна микроскопия беше използвана кръв от здрави доброволци (n =7).

Архивни тъкани - 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 от 2015г. Изброените материали бяха получени от Университетска многопрофилна болница за активно лечение на белодробни болести „Света София“ ЕАД, гр. София, от 2022 слята с УМБАЛ „Св. Иван Рилски“. Всички свежи тъканни и кръвни проби бяха получени след разговор с пациента относно целите на проучването и предоставяне на подписан формуляр за информирано съгласие.

Етична комисия: Проучването бе одобрено от Институционалната комисия за преглед/Институционална комисия по етика (IRB/IEC) на Националния център по инфекциозни и паразитни болести в София, България (номер IRB00006384; номер на протокол 3/27.07.2020 г.).

2. Методи

1. Изолиране на ДНК от кръв, биопсичен материал и бронхоалвеоларен лаваж (БАЛ) от 44 лица с предполагаема саркоидоза

- 1.1. Подготовка на пробите и отрицателните (реактивни) контроли
- 2.2. Изолиране на ДНК

2. Изследване на архивни биопсични и оперативни материали от пациенти със саркоидоза и туберкулоза

- 2.1 Подбор и подготовка на материали
- 2.2. Депарафиниране, рехидратация и изолиране на ДНК от парафиновите блокчета
 - 2.2.1. Първи метод - фирмен кит QIAamp DNA FFPE Advanced UNG Kit (Qiagen, Germany)

2.2.2. Втори метод - адаптиран протокол

2.3. PCR изследване на ДНК изолирана от ретроспективни тъканни материали на пациенти със саркоидоза и туберкулоза за *S. acnes* и *M. tuberculosis*

2.3.1. Положителни PCR контроли за доказване на *S. acnes* и *M. tuberculosis*

2.4. Проверка на качеството (интегритета) на изолираната ДНК от включените в парафин саркоидни и туберкулозни проби

3. Методи на култивиране

3.1. Култивиране на кръв в хранителна среда за индуциране (съживяване) на латентни кръвни микробиоти (модифициран метод на Калфин)

3.1.1. Приготвяне на хранителни среди за култивиране на кръв и тъканен материал - 53

4.1.2. Култивиране на цяла кръв и изолиране на ДНК за молекулярен анализ - 54

4. Микроскопски методи

4. 1. Трансмисионна електронна микроскопия (ТЕМ)

4.1.1. Подготовка за наблюдение с ТЕМ на периферни кръвни мононуклеарни клетки изолирани от кръв на здрави доброволци

4.1.2. Подготовка на култивирана при стресови условия лизирана кръв от здрави доброволци за наблюдение с ТЕМ и СЕМ

4.1.3. Подготовка на цяла култивирана кръв от пациенти със саркоидоза за наблюдение с ТЕМ

4.1.4. Протокол за приготвяне на кръвни проби за ТЕМ

4.1.5. Наблюдение на приготвените препарати с ТЕМ

4.2. Сканираща електронна микроскопия (СЕМ)

4.3. Светлинна микроскопия

4.4. Микроскопия в тъмно поле

4.5. Техники на оцветяване

4.4.1. Оцветяване по Грам

4.4.2. Оцветяване на хистологични срезове с Хематоксилин и Еозин - 61

4.4.3. Оцветяване на саркоидни грануломи в хистологични срезове чрез сребърна импрегнация Гомори-силвър (модификация)

5.5. Имунохистохимия за детекция на *S. acnes* в саркоидни грануломи

5. Молекулярни методи за изследване на патогенезата при саркоидоза

5.1. Таргетно 16S и 18S метагеномно секвениране на кръвни и биопсични проби взети от пациенти с доказана саркоидоза

5.1.1. Подбор на материали

5.1.2. Подготовка и изолиране на ДНК от кръв и биопсичен материал

- 5.1.3. Създаване на геномни библиотеки
- 5.1.4. Секвениране
- 5.1.5. Анализ на метагеномните данни
- 5.1.6. Статистика и визуализация на резултатите
- 5.2. Случайно (shotgun) метагеномно секвениране
 - 5.2.1. Подбор на материали
- 5.3. PCR методи за идентификация на микроорганизми имащи потенциална връзка с етиологията на саркоидозата
 - 5.3.1. Бактерии от род *Mycobacterium*
 - 5.3.2. *Cutibacterium acnes*
 - 5.3.3. *Toxoplasma gondii*

IV. Резултати и обсъждане

1. Разпределение на пациентите по диагноза

За целите на настоящата дисертация бяха изследвани клинични материали от 44 лица постъпили в МБАЛ “Св. Иван Рилски” за уточняване на диагноза. Те бяха включени в проучването след подписана декларация за информирано съгласие. От тях 15 бяха диагностицирани със саркоидоза, 6 със злокачествено белодробно заболяване (карцином), 1 с пневмофиброза, 6 с други интерстициални болести с фиброза, 4 с хроничен възпалителен процес, 3 с бронхиектазна болест и 7 с анамнеза за саркоидоза, която не беше хистологично потвърдена (Обс. саркоидоза) (фиг. 2).



Фиг. 2. Разпределение на пациентите по поставена диагноза - брой заболели и процент от всички изследвани лица (n =44).

2. PCR анализ на архивни тъканни материали от пациенти със саркоидоза и туберкулоза.

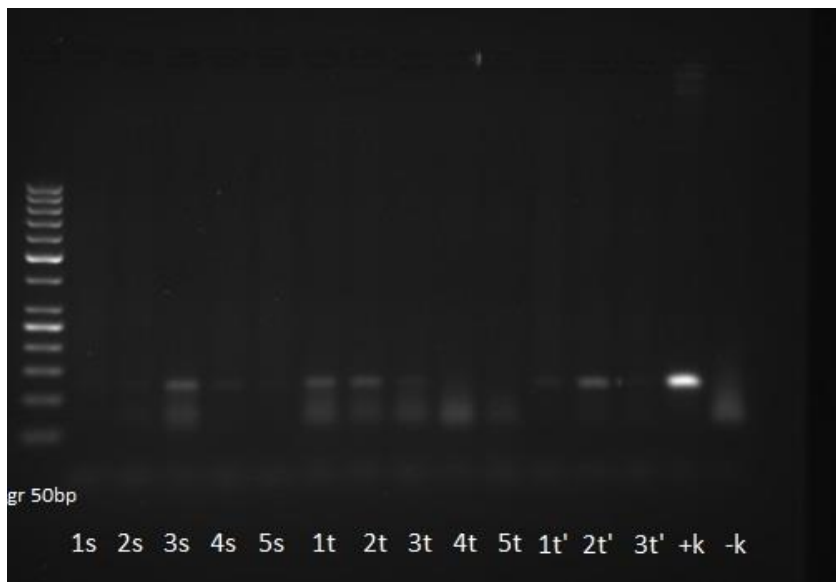
Изолираната ДНК от 39-те парафинови блокчета беше с добра чистота и количество. За 9-те туберкулозни проби, двата паралелно приложени метода - адаптиран от нас метод за изолиране на ДНК и фирмен кит QIAamp DNA FFPE Advanced UNG Kit (QIAGEN, Germany), дадоха съпоставими резултати за чистота и количество на изолирана ДНК.

2.1. Резултати от PCR анализа

Всички изследвани проби, както саркоидните, така и туберкулозните, показаха отрицателни резултати за *M. tuberculosis* и *C. acnes*. Положителни бяха само използваните PCR контролни ДНКи изолирани от култура на *M. tuberculosis* и кожна натривка за *C.*

acnes. Възможно е двата микроорганизма (*S. acnes* и *M. tuberculosis*) да нямат връзка с етиологията на саркоидозата при включените в изследването пациенти. Съмнителна обаче е липсата на ДНК от *M. tuberculosis* във всички парафинови блокчета с тъкан от туберкулозно болни.

Като контрола за качество на изолираната от парафиновите блокчета ДНК беше проверено дали 140 bp секвенция на човешкия β -глобинов ген може да бъде намножена чрез PCR. Резултатът показва, че има амплификация в едва половината от изследваните материали, независимо от вида на пробата (саркоидоза/туберкулоза), времето на формалинова фиксация (24ч/48ч) или използвания метод за изолиране на ДНК (фиг. 3). Независимо от това, че при търговския кит има стъпка на разрушаване на омрежванията в ДНК чрез инкубиране при 90°C и е включен ензима урацил-N-гликозилаза поправящ транзициите, изолираната ДНК не беше с добро качество за молекулярни анализи.



фиг 3. Резултати от амплификацията на 140bp фрагмент от човешкия β -глобинов ген с праймери $\beta 1$ и $\beta 2$. Означения: gr 50bp - ДНК маркер; 1s-5s - ДНК изолирана от парафинови блокчета със саркоидозна тъкан, чрез кит; 1t-5t - ДНК изолирана от парафинови блокчета с туберкулозна тъкан чрез модифициран протокол; 1t'-3t' - същите туберкулозни проби изолирани с кит; +k - положителна контрола - ДНК изолирана от белодробна биопсия; -k - отрицателна контрола (вода).

Отрицателните PCR резултати за *S. acnes* и *M. tuberculosis* при всички изследвани проби и слабата PCR амплификация на β -глобиновия ген в някой от тях ни накара да предположим, че изолираната от парафиновите блокчета ДНК е била твърде

фрагментирана и увредена. За проверка на качеството беше проведена 1% гел електрофореза на всяка изолирана от парафинови блокчета ДНК. Екстрахираната по двата метода ДНК, както от саркоидните, така и от туберкулозните парафинови блокчета показва фрагментираност с дължина на фрагментите под 400 bp. При сравнение на качеството на ДНК изолирана от туберкулозна тъкан включена в парафин по двата метода не се наблюдаваха значителни разлики в степента на накъсване.

3. Култивиране на кръв в хранителна среда за индуциране (съживяване) на латентни кръвни микробиоти.

Кръв от 6 пациента с доказана саркоидоза беше култивирана при стресови условия - 43 °C и хранителни среди (ВНІ и ВВ) с високо съдържание на витамин К3(1mg/ml) за 24 ч. Целта беше чрез стресиране латентните кръвни микробиоти да бъдат извадени от състоянието им на покой и да бъдат стимулирани към пролиферация. “Реанимирането” (resuscitation) на представителите на кръвния микробиом, чрез поставяне при неблагоприятни условия - температура над физиологичната (43°C) и оксидативен стрес (висока концентрация на вит. К) е техника изпитана по-рано от екипа ни, с кръв от здрави лица (Panaiotov, 2018; Panaiotov, 2021).

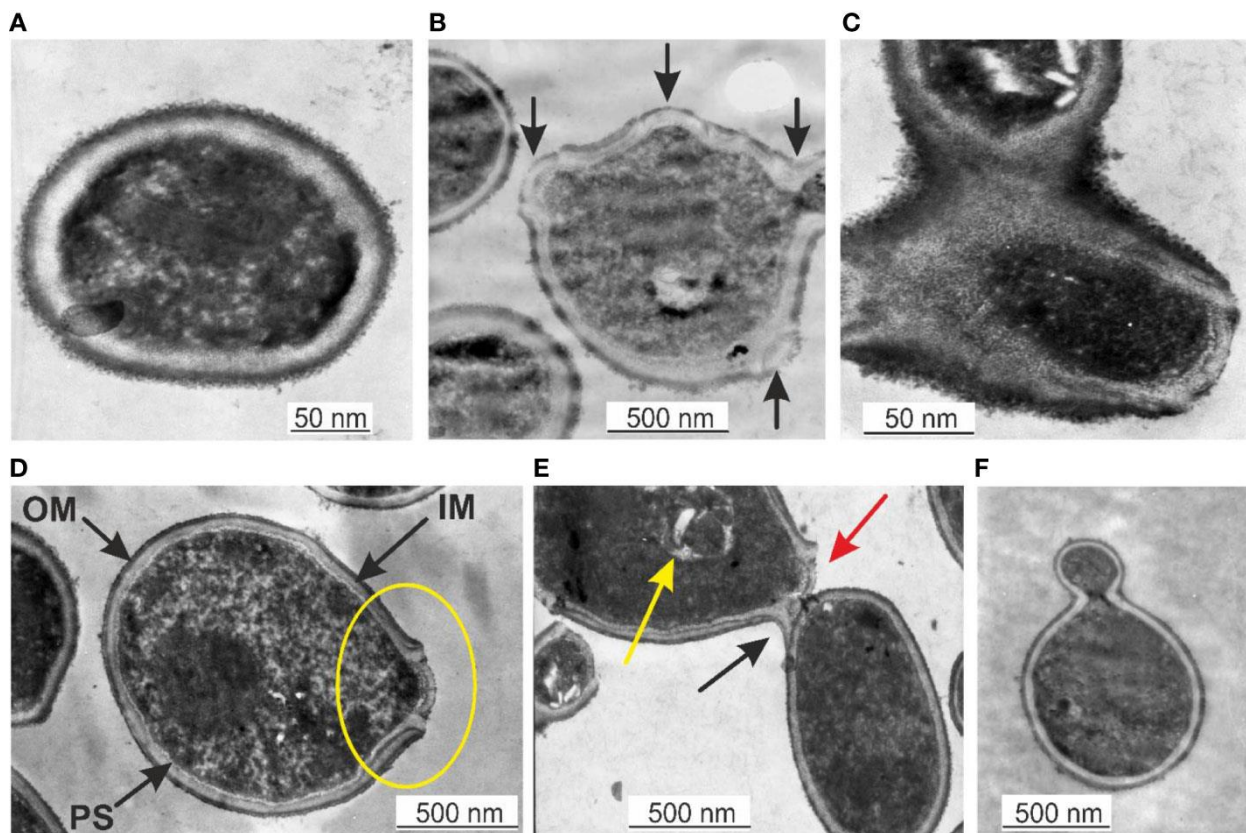
Микроскопските препарати приготвени по Грам показаха растеж в двата вида хранителна среда. Наблюдавахме Грам отрицателно оцветени едри, сферични пролифериращи клетки (майчини), даващи начало на по-дребни дъщерни клетки, подредени във верижки или гроздове.

4. Визуализация на кръвната микробиота чрез прилагане на различни микроскопски техники.

4.1 Наблюдение на кръвни микробиоти във фракцията от периферни кръвни мононуклеарни клетки изолирани от кръв на здрави доброволци с TEM.

В препаратите приготвени от периферни мононуклеарни левкоцити бяха наблюдавани микробни структури притежаващи клетъчна стена, които пролиферират. Три механизма на пролиферация бяха наблюдавани: чрез екструзия на прогениторни клетки от

“майчина” клетка, формиране на септум и пъпкуване. “Първичните” клетки или “елементарните първични” телца са сфероидални с размери от 180-200 nm и нарастват по размери. Повърхността на първичната клетка е мъхеста (фиг. 4 А) Клетъчната стена има ясно изразени вътрешна мембрана (IM), полупрозрачно периплазмено пространство (PS) и външна мембрана (OM) (фиг. 4 D). Цитоплазмата има светли и непрозрачни участъци, като светлите структури наподобяват бактериално ядро (нуклеоид). Екструзията на прогениторни клетки може да настъпи едновременно от различни части на клетъчната обвивка. Това се случва след нарастване на “първичната” клетка, която се превръща в зряла “майчина” клетка. “Майчината” клетка дава начало на по-малки прогениторни клетки, които се формират във вътрешността и се отделят навън през “отвор” на клетъчната стена (фиг. 4 В, D). Процесът на “отваряне” на клетъчната стена започва с формиране на издупчината на повърхността на клетката последвана от поява на сферичен отвор, през който се промушва прогениторната клетка, като „мехурче през уста“ (фиг. 4 D, жълт овал). За кратко прогениторната клетка може да остане свързана с “майчината” мембрана (фиг. 4 С, E). Прогениторните клетки могат да напуснат “майчината” клетка от различни участъци от повърхността и (фиг. 4 В). На фигура 4 В могат да се видят поне четири зони в които се заформя отделяне на прогениторни клетки (черни стрелки). В препаратите не беше наблюдавано формиране на верижки от свързани помежду си прогениторни клетки към “майчината” клетка. Беше наблюдаван и друг механизъм на клетъчно делене, при който „майчината“ клетка се възпроизвежда чрез образуване на септум и последващо разделяне на септума на дъщерни клетки (фиг. 4 С). Снимковият материал предполага такъв механизъм на клетъчно делене. Наблюдавана бе и класическа микробна пролиферация чрез пъпкуване (фиг. 4 F).



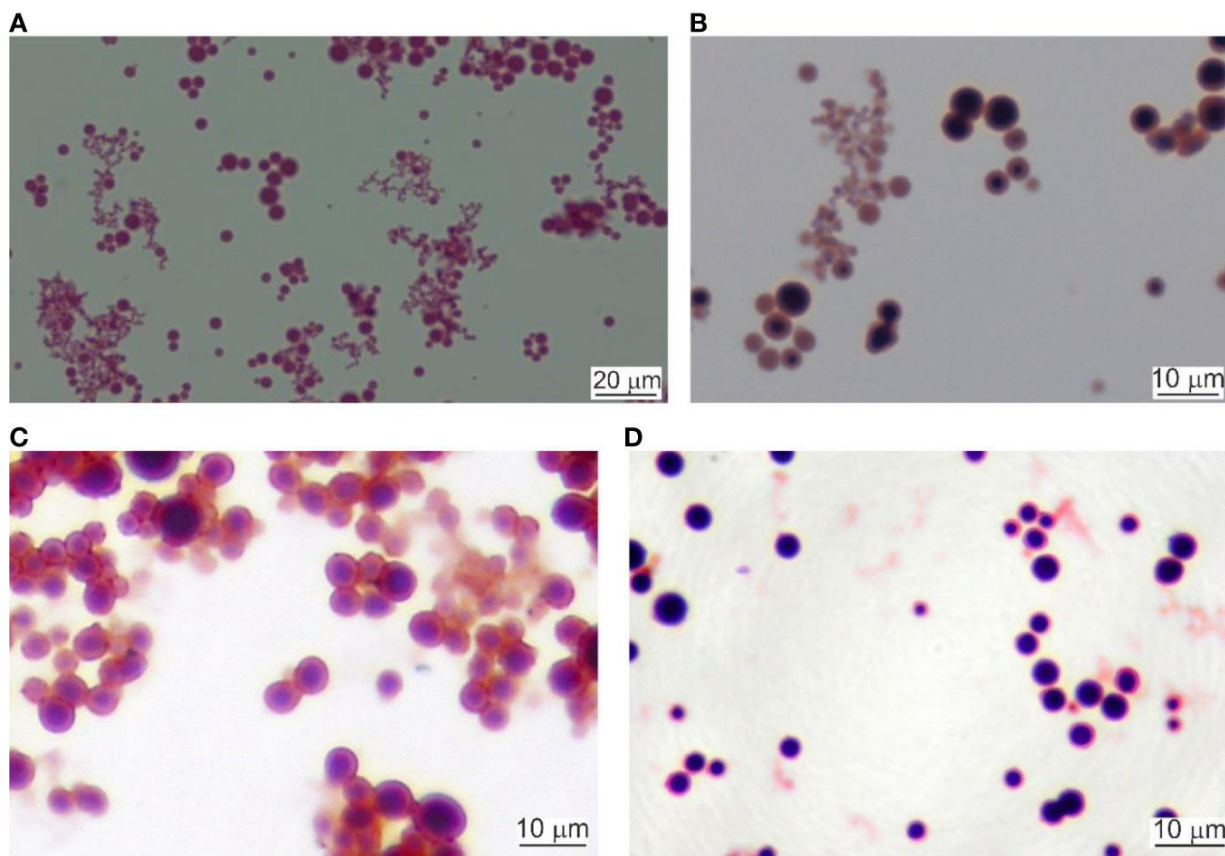
Фиг. 4. (A) Първична клетка с “мъхеста” клетъчна стена. Маркер 50 nm. (B) Протрузии на клетъчната повърхност от където ще излязат прогениторните клетки (черни стрелки). (C) Съединени прогениторни клетки (септум). (D) Ултраструктура на кръвните микробиоти. С черни стрелки са означени вътрешната мембрана (IM), интермедиерното периплазматично пространство (PS), вътрешната мембрана (OM) и зоната на екструзия на прогениторната клетка (жълта елипса). (E) Прогениторна клетка свързана към “майчината” клетка (черна стрелка), нова прогениторна клетка, готвеща се да “излезе” от първичната клетка (червена стрелка) и прогениторна клетка във вътрешността на “майчината” клетка (жълта стрелка). (F) Класическо пъпкуване.

Морфологията на клетъчната стена в наблюдаваните клетки корелира с клетъчната стена на Грам отрицателните бактерии, която е изградена от тънък слой пептидогликан (~ 5 nm) разположен между две отделни двуслойни мембрани, цитоплазмена (вътрешна) и външната мембрана. Мъхестата бактериална клетъчна обвивка вероятно е с липополизахариден произход.

4.2. Микроскопски анализ на култивирана при стресови условия лизирана и филтрирана кръв от здрави доброволци.

Лизираната и филтрирана кръв бе култивирана при стресови условия, прилагайки висока концентрация на витамин К и 43°C в рамките на 7 часа. След първия час на инкубация, на интервали през 30 минути, от инкубатора бе изваждана кръвна проба, която бе подготвена за ТЕМ, СЕМ, светлинна и тъмнополева микроскопия.

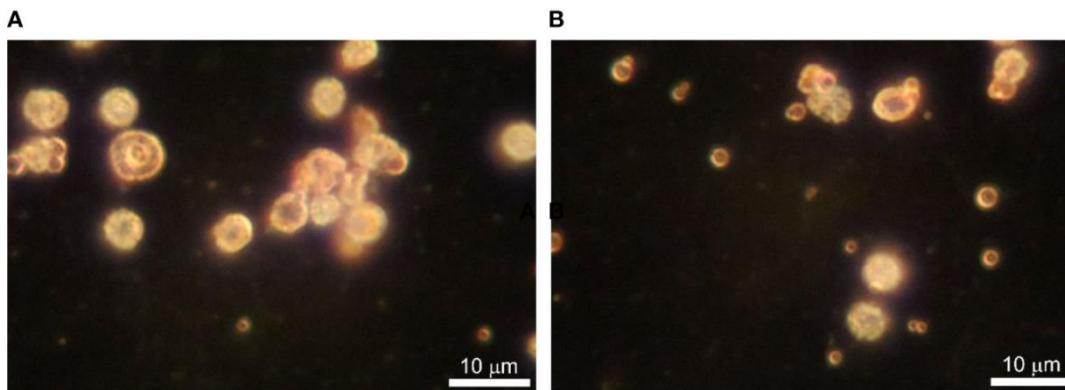
Първоначално културите бяха светлочервени. След първия час на култивиране започнаха да помътняват. Малки, оцветяващи се по Грам кръгли структури бяха наблюдавани при 100× увеличение. Цветът на културата се промени до светло кафяв. След втория час микроскопското поле беше пълно с единични клетки, верижки и групи от кръгли клетки. На третия час цветът на културата вече беше кафяв. Между четвъртия и седмия час културите бяха станали тъмнокафяви и се образува видима утайка. В предишни наши експерименти (Panaiotov, 2018) бяха идентифицирани няколко морфологични форми на оцветени по Грам кръвни микробиоти: а) "плътни тела" от Грам положително оцветени микробни структури; б) Грам положително оцветени тела, заобиколени от Грам-отрицателна обвивка и в) "плътни тела" даващи начало на Грам отрицателно оцветени потомствени клетки подредени във верижки (Фиг. 5). "Плътното тяло" може да се дели чрез просто, бинарно делене или да произвежда верижки от Грам отрицателно оцветени "първични" клетки. Светлинната микроскопия доказа бърза пролиферация на кръвната микрофлора.



Фиг. 5. Светлинна микроскопия на култивирани кръвни микробиоти. (А) Оцветяване по Грам след 4 часа култивиране, 800 ×. Машабен маркер 20 μm. (В) Оцветяване по Грам след 6 часа култивиране, 1000 ×. (С, D) Култури, оцветени след 24 часово култивиране, 1000 ×. Машабен маркер 10 μm.

4.2.1. Тъмнополева микроскопия

Чрез микроскопия в тъмно поле беше наблюдавана кръвната микробиота при по-голям контраст без необходимост от фиксиране, оцветяване и изсушаване на препаратите. Клетките се виждаха като бели петна на тъмен фон извършващи Браунови движения. В препаратите от лизирана, филтрирана и култивирана при стресови условия кръв наблюдавахме три вида обекти: а) много малки клетки, като светещи точки с размер под 500 nm, които могат да се забележат благодарение на брауновото им движение при висок интензитет на светлината, б) по-големи сфероидални структури с големина 1-2 μm с обвивка и централна част („ядро“), и в) 4-5 μm клетки, които имат зърнеста вътрешна структура и грапави ръбове (фиг. 6). Размерът на наблюдаваните от нас структури изключва възможността те да са с вирусен произход.

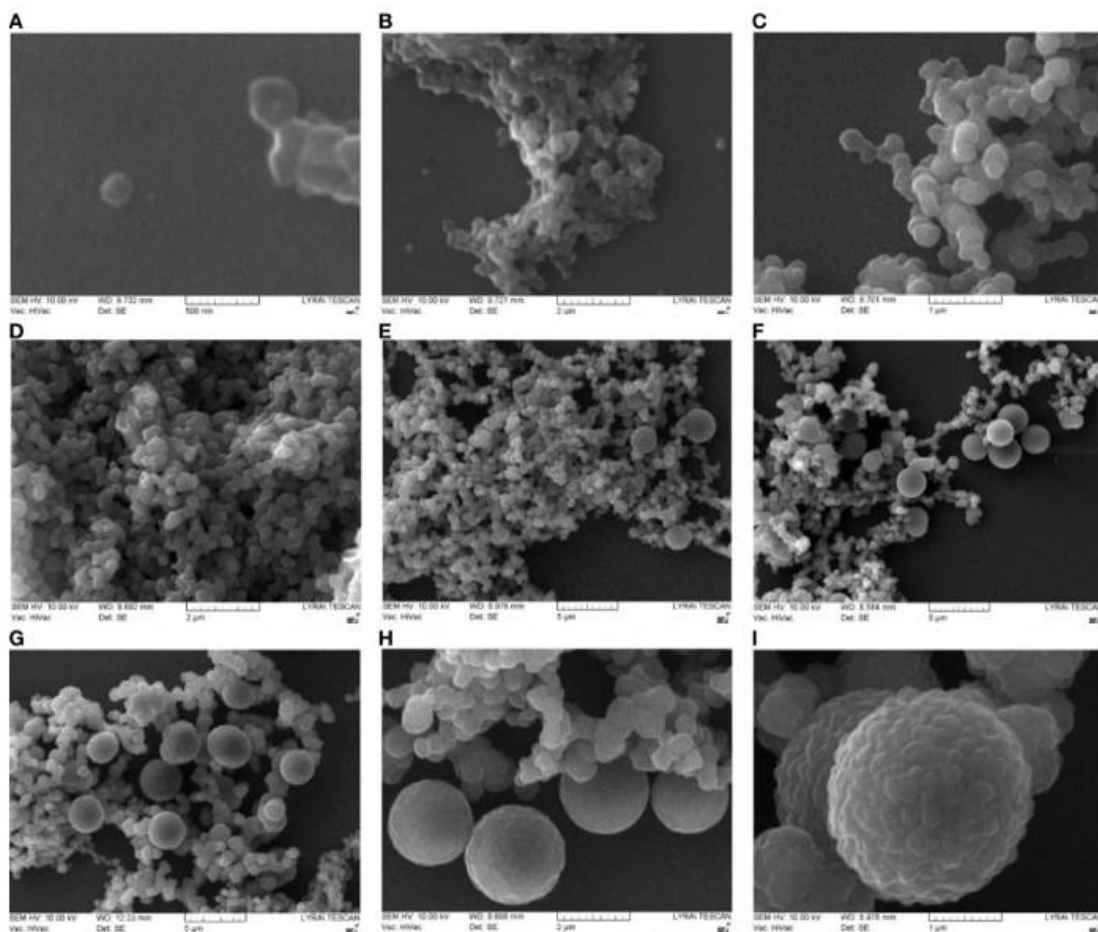


Фиг 6. (А, В) Микроскопия в тъмно поле на *in vitro* култивирана лизирана кръв. Маркер 10 µm.

4.2.2. Сканираща електронна микроскопия (СЕМ)

Лизираната и филтрирана кръв бе култивирана при стресови условия - висока концентрация на витамин К и 43°C, за 7 часа. След първия час от инкубацията, през 30 минути бяха взимани проби за приготвяне на препарати за СЕМ.

В първата, нулева проба, приготвена от некултивирана лизирана кръв не бяха наблюдавани кръвни микробиоти, а само клетъчни отломки. След 1 час на култивиране, чрез СЕМ бяха визуализирани единични клетъчни структури с размер 200 nm. (фиг. 7 А). Наблюдавана беше бърза пролиферация на клетъчна маса, като броя на частиците/клетките, нарастваше пропорционално с времето на култивиране (фиг. 7 В, С). Между първия и четвъртия час от култивирането наблюдаваните с ТЕМ препарати, показаха еднородност с леки вариации (фиг. 7 D, E). След култивиране от 5 часа и 30 минути започнаха да се наблюдават морфологично хетерогенни микробни форми, като поява на големи сферoidни клетки (> 2 µm) с грапава повърхност разположени сред групи от клетки с по-малък размер (фиг 7 F). Наблюдавана беше и пролиферация чрез пъпкуване. След 7^{ия} час на култивиране, големите клетки (> 2 µm) пролиферират чрез просто делене или чрез пъпкуване (фиг. 7 G, H). При увеличение 60.000x беше установено, че големите „майчини“ клетки имат грапава повърхност (фиг. 7 I), характеризираща се с поява на издатини (протрузии), които дават потомство на елементарни телца подредени във верижки. Може да се предположи, че клетката „майка“ е изпълнена с прогениторни клетки (“елементарни телца”). ТЕМ анализът даде подкрепа на това заключение (фиг. 8, фиг. 9)

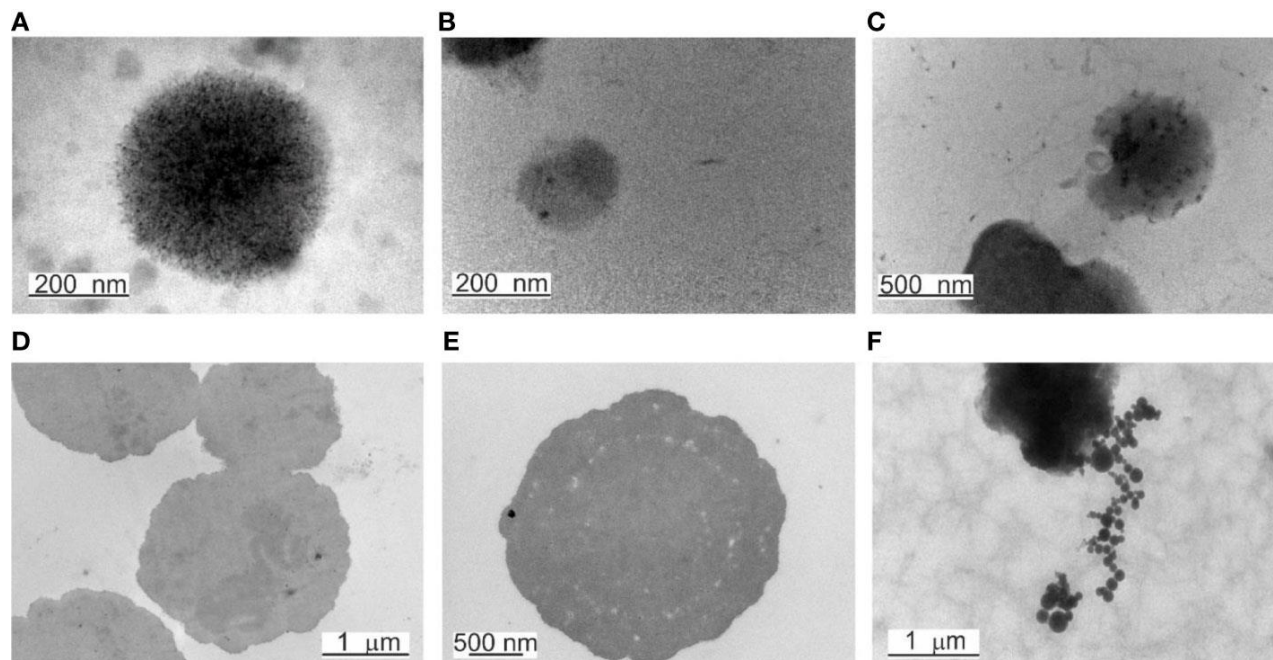


Фиг. 7. SEM изображения на култивирана кръвна микробиота на здрави лица. Кръвните проби бяха лизирани, 0.2 μm филтрирани и култивирани в продължение на 7 часа. (A, B) SEM анализ на култивирана кръв за 1 час. (C–E) култури на 2 – 4 часа. (F–H) култури на 5 – 7 часа. (I) SEM морфология на голяма клетка „майка“ след 7 часа култивиране.

4.2.3. TEM анализ на култивирана при стресови условия лизирана и филтрирана кръв от здрави доброволци.

Чрез изследванията на фината структура на лизираната и филтрирана кръв, култивирана при стресови условия, чрез TEM бяха разграничени два типа зрели „майчини“ клетки. Първият тип бяха електронно плътни големи „майчини“ клетки, които се визуализират, като непрозрачни, тъмни структури (фиг. 8 D, E) и вторият - електронно-прозрачни „майчини“ клетки, ограничени от мембрана (фиг. 9 A–D). Първичната структура е елементарно „мъхесто“ телце с размер 180 – 200 nm (фиг. 10 A, B). Серията от

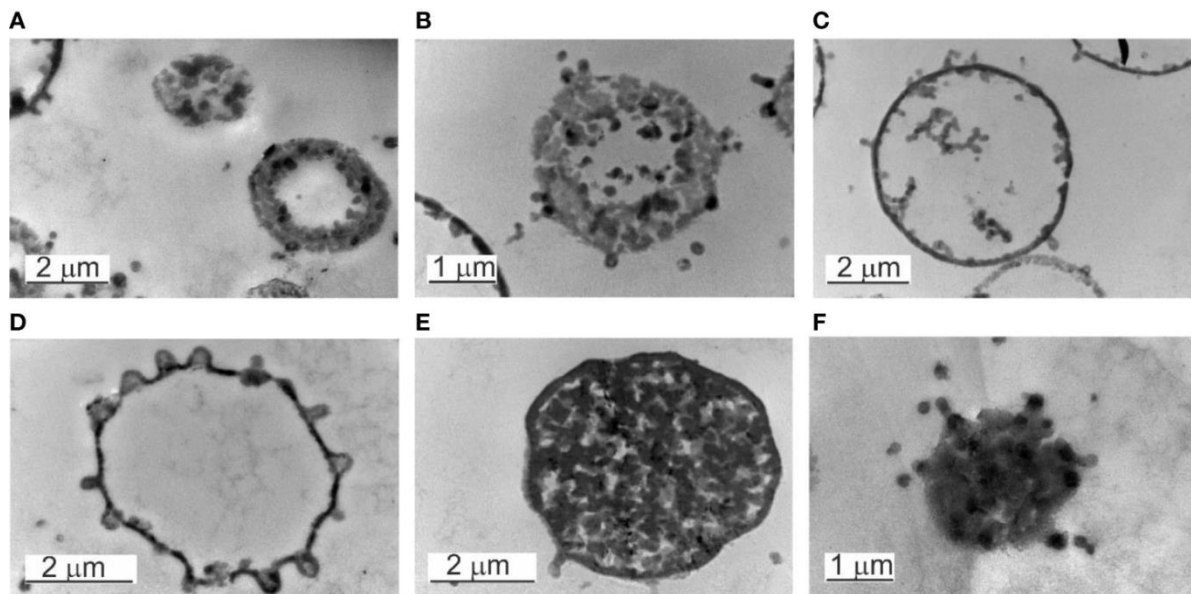
наблюдения показаха, че електронно-плътната „майчина“ клетка нараства и пролиферира чрез пъпкуване или екструзия на прогениторни (потомствени) клетки свързани във верижки (фиг. 8 F). Фигура 8 С показва рядко наблюдавана екструзия на елементарно тяло чрез вдлъбнатина на мембраната.



Фиг. 8. ТЕМ на елементарни тела и електронно-плътни тела. (А) Мъхесто елементарно тяло. (В) Елементарно тяло с размер 180 – 200 nm. (С) Екструзия на елементарно тяло. (D, E) Големи електронно-плътни тела, наречени още "майчини" клетки. (F) Пролиферация на електронно-плътни телца подредени във верижки.

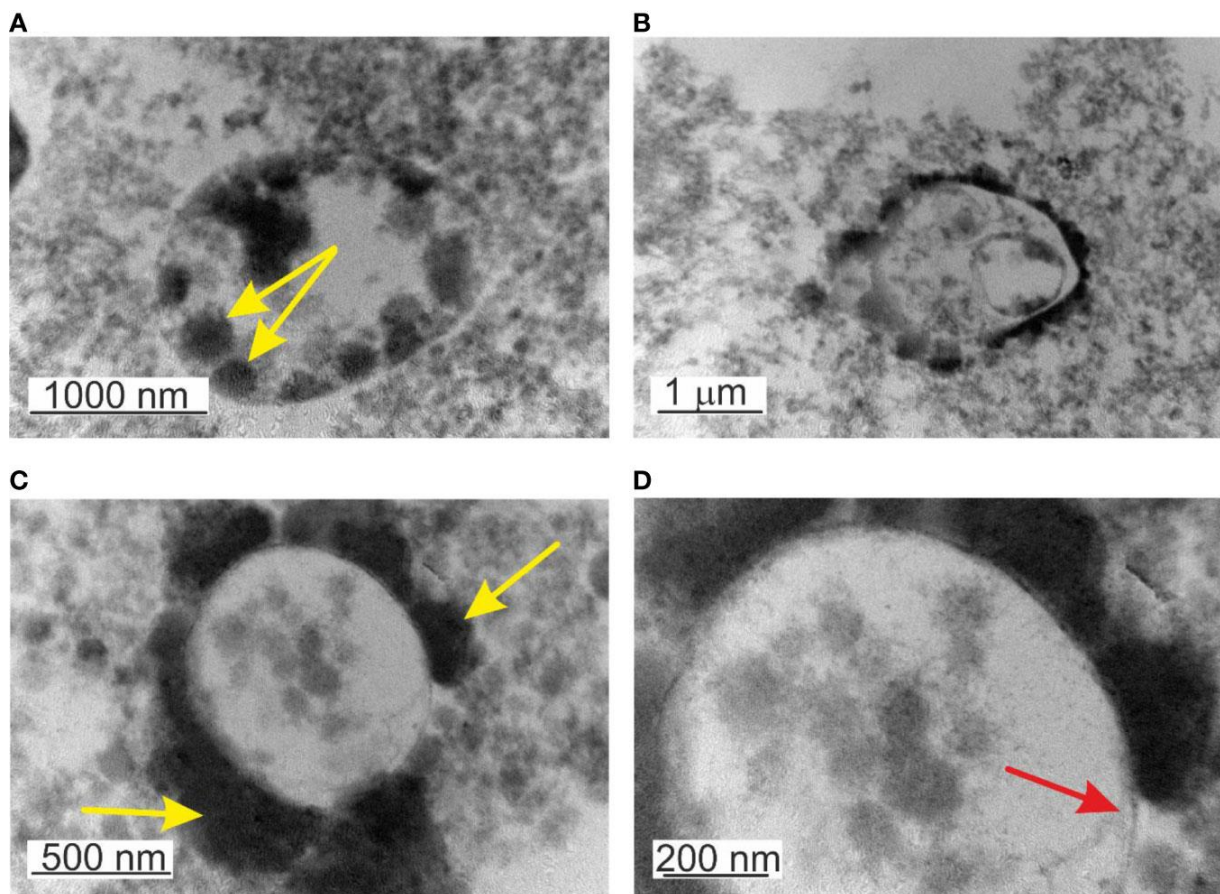
Друга серия от наблюдения показа, как "майчината" клетка нараства и се разпада на елементарни клетки (фиг. 9 E). Елементарните клетки се размножават, уголемяват се до достигане размерите на големите „майчини“ структури (>2 μm) и завършват цикъла си на пролиферация, като освобождават множество нови елементарни клетки, видими като малки гранули след спукването на "майчината" клетка (фиг. 9 F).

От повърхността на мембраната на електронно-прозрачните "майчини клетки" бяха наблюдавани пъпкувания, от които се отделят прогениторните клетки (фиг. 9 D). Преди това прогениторните клетки изглеждат се прикрепят към вътрешната страна на мембраната на клетката "майка" (фиг. 9 A). След като потомствените клетки преминават мембраната чрез пъпкуване и се освободят в околната среда, която вероятно представлява течен зол, настъпва по-нататъчен растеж и повтаряне на цикъла на пролиферация.



Фиг. 9. Електронно-прозрачни и електронно-плътни “майчини” тела. (A–D) Електронно-прозрачни тела. (B) Разпадане на електронно-прозрачно тяло. (C, D) Елементарните тела, растящи в “майчината клетка”, могат да я напуснат през различни участъци на клетъчната повърхност. (E) Електронно плътно тяло във фаза на растеж. Цитозолът е пълен с потомствени клетки. (F) Разпадане на електронно-плътно тяло и освобождаване на множество елементарни телца.

Наблюденията на ултраструктурата на култивирана кръв от друг доброволец, показаха специфични характеристики. По-голямата част от наблюдаваните “майчини” клетки бяха електронно-прозрачни. По време на съзряването “майчината” клетка се превръща в репродуктивен сак. Растящите “майчини” клетки са пълни с прогениторни клетки (фиг. 10). Наблюдавани бяха два вида “майчини” клетки: а) “майчини” клетки, ограничени само от мембрана (фиг. 10 A) и б) “майчини” клетки с мембрана, покрита с дебел извънклетъчен матрикс (фиг. 10 B, C). Възможно е този матрикс да е от пептидогликан и наподобява стената на грам-положителните бактерии.



Фиг. 10 Електронограми на лизирана и култивирана кръв. (А) Зряла клетка $>2\mu\text{m}$, запълнена с елементарни телца - жълта стрелка. (В) Растеж на прогениторни клетки в друга прогениторна клетка, която расте в "майчината" клетка. (С) Образуване на дебел капсулен материал от външната страна на мембраната или прикрепени елементарни клетки (жълти стрелки). (D) Микробоподобни структури ограничени от мембрана – червена стрелка.

Друга заслужаваща внимание структура наблюдавана в култивираната кръв бе пролиферация на "клетка в клетката". Това е нарастваща прозрачна прогениторна (потомствена) клетка, ограничена от мембрана, разположена в клетката "майка" (фиг. 10 В). Интересното е, че вътрешната потомствена клетка също е запълнена от прогениторни клетки прилепнали към вътрешната страна на мембраната. Този особено рядък случай на пролиферация на кръвни микробиоти съчетава растежа на потомствени клетки в потомствена клетка, която расте в клетката "майка". Всички структури узряват и се размножават като едно цяло. Доколкото ни е известно това е пример за нов, подобен на

матрьошка механизъм на микробна пролиферация, който не е описван за кръвната микрофлора до момента.

4.3. TEM анализ на цяла култивирана кръв от пациенти със саркоидоза.

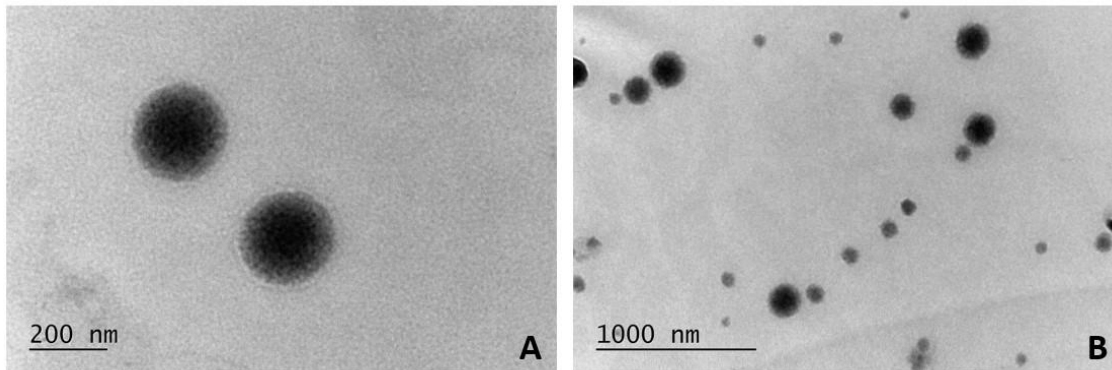
По нататък изследванията бяха насочени към изучаване на морфологията на кръвните микробиоти при пациенти със саркоидоза (С-11 и С-12) в цяла нелизирана кръв.

4.3.1. Резултати от експеримент 1

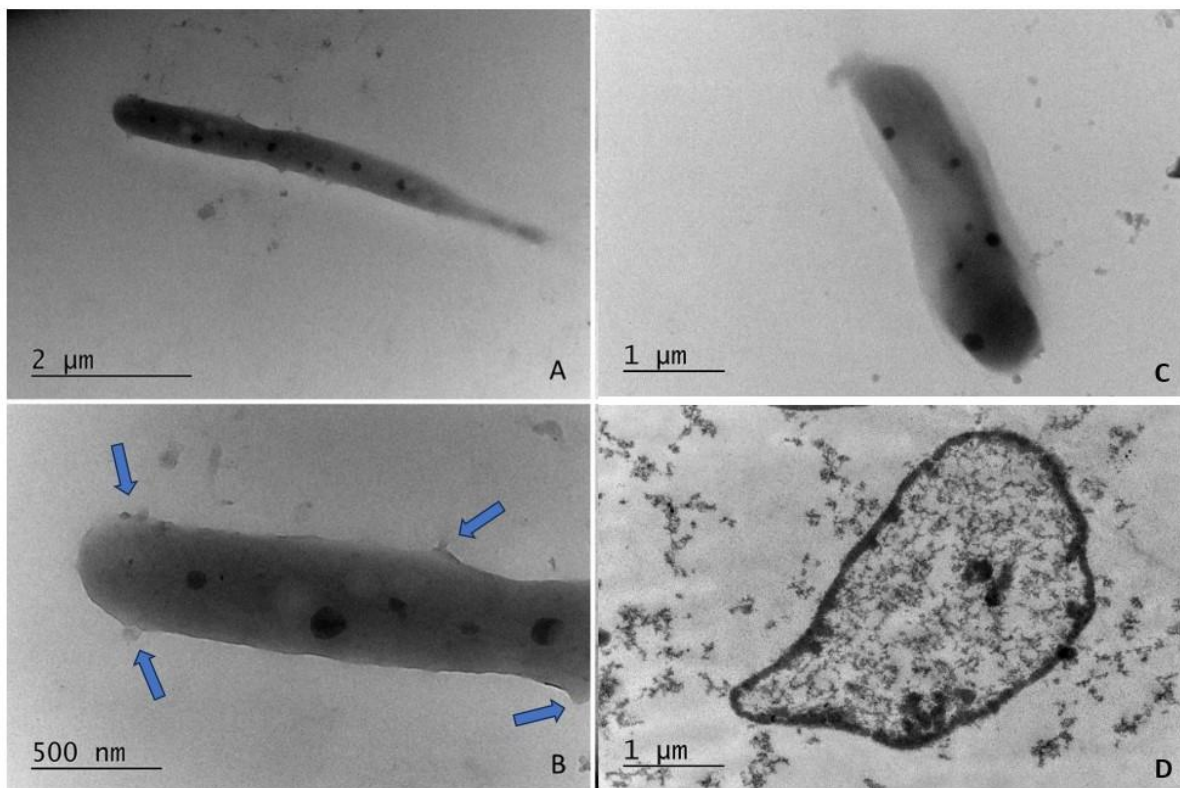
Кръв от пациент със саркоидоза беше инкубирана при 43°C в среда ВНІ + вит К (1 mg/ml) за 30 мин, 1ч, 3ч и 4ч, а за сравнение бе използвана некултивирана кръв от същия пациент. Целта беше да се проследи индуцирането на кръвни микробиоти в първите часове от поставяне на цяла, нелизирана кръв при стресови условия на култивиране.

В препаратата приготвен от цяла, некултивирана кръв не бяха открити структури наподобяващи кръвни микробиоти.

В препаратите приготвени от култивирана 30 и 60 минути цяла кръв бяха наблюдавани единични или групирани по няколко елементарни електронно-плътни мъхести телца с размери около 200 nm (фиг. 11 А). Броят на елементарните телца нарастваше пропорционално с увеличение на времето на култивиране (фиг. 11 В). Също наблюдавахме “майчини” електронно-полупропускливи клетки с пръчковидна форма (фиг. 12 А, В, С) с дължина около 4-5 μm и ширина 0,5-1 μm . Във вътрешността им се забелязват малки елементарни телца с големина 100-150 nm. По повърхността на мембраната има издутини - вероятно области на екструзия на елементарните тела. В препаратата от 4-ия час на култивиране бяха открити майчини електронно-прозрачни клетки с неправилна форма и размер 4-5 μm , с разположени по вътрешната повърхност на мембраната елементарни тела (фиг. 12 D).



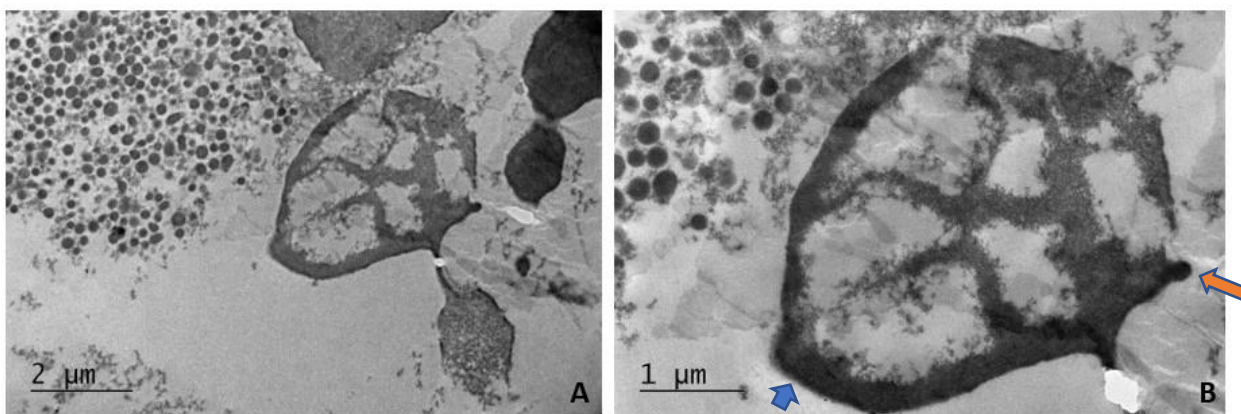
Фиг. 11. Електронограма показваща елементарни “мъхести” телца в кръв култивирана 30 мин (А) и 4 часа (В) при 43°C в среда ВНІ + вит К



Фиг. 12. ТЕМ изображение на кръв култивирана 30 мин - панел А и В и 4 часа- панел С и D. Панел А и В - “майчина” пръчковидна електронно-полупропусклива структура, изпълнена с малки (100 nm) сфероидални елементарни телца. На панел В със сини стрелки са означени местата на екструдиране на елементарни телца през мембраната на “майчината” клетка. Панел С “майчина” пръчковидна електронно-полупропусклива структура с видими елементарни телца. Панел D електронно-прозрачна “майчина” клетка с разположени от вътрешната страна на мембраната и елементарни тела. Увеличения: А- 4000х; В -12000х; С и D-5000х.

4.3.2. Резултати от експеримент 2

200 μl венозна кръв от пациент С-12 беше култивирана в 1400 μl хранителна среда ВНІ с добавен витамин К за 24 ч при 43 °С. Както беше очаквано, наблюдавахаме по-голям брой мъхести електронно-плътни телца, разпръснати из целия препарат и няколко “майчини” клетки. На фигура 13 е представена снимка направена с ТЕМ на голяма “майчина” клетка, която се е разпукала, а голям брой прогениторни елементарни телца са разположени в непосредствена близост до нея. Майчината клетка е свързана с тънък “мост” (фибриларна структура) с по-дребна също разкъсана майчина структура.

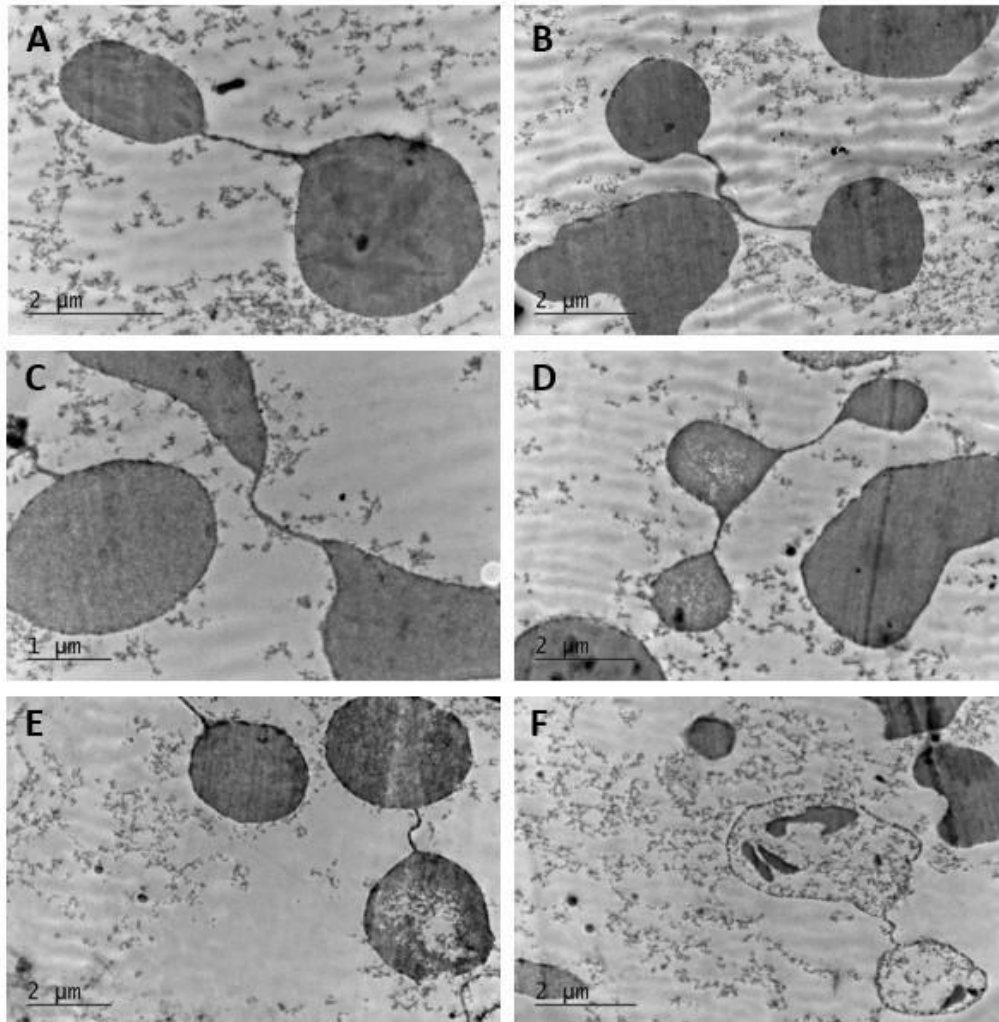


Фиг. 13. Панел **А** - Голяма ”майчина” клетка с разпукана на няколко места мембрана, с електронно-плътни и електронно-прозрачни зони на цитоплазмата, вероятно формирани след напускане на голям брой прогениторни елементарни телца видими в ляво от нея. Голямата клетка е свързана чрез нишковидна структура с по-малка майчина клетка, която е в по-напреднал стадии на разпад. Панел **В** - по-голямо увеличение. Видима е интактна зона от клетъчната мембрана - синя къса стрелка, както и напълно липсващи мембранни фрагменти. С оранжева стрелка е означено елементарно телце напускащо майчината клетка в участък, където мембраната липсва. Голямата клетка изглежда септирана във вътрешността си.

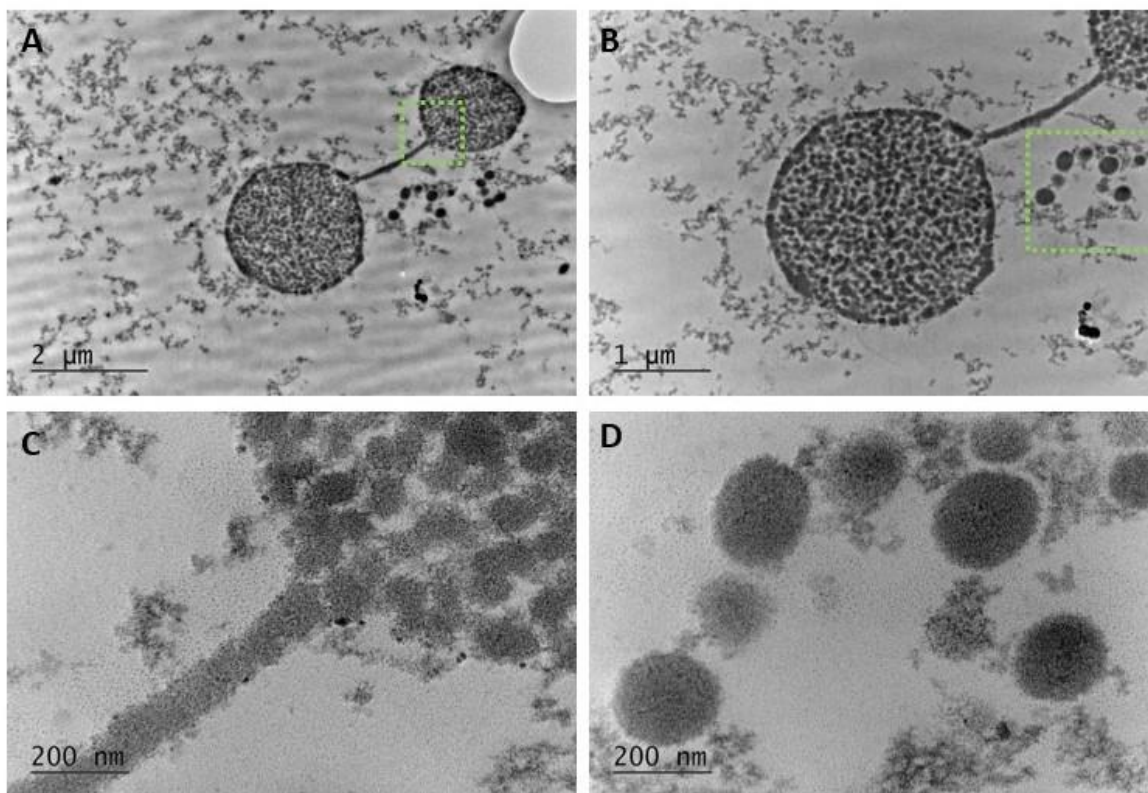
Забелязани бяха и различни по форма и големина електронно-плътни (фиг. 14 А-Д) и електронно-пропускливи структури (фиг. 14 F), свързани помежду си от фибрилна структура с диаметър едва няколко десетки нанометра и дължина варираща от 1 μm до 2,5 μm (фиг. 14, фиг. 15).

При преглед в научната литература за подобни фибрилни структури свързващи отделни клетки се оказва, че такива са описани при еукариоти (Rustom,2004; Davis,2008; Lou, 2012; Ma, 2015), бактерии (Dubey, 2011; Ducret, 2013 Pande, 2015) и археи (Soler, 2008). Те служат за комуникация и пренос на клетъчно съдържимо.

По морфология и размери наблюдаваните на фиг. 14 и фиг. 15 структури, отговарят на междуклетъчните нанотръбички свързващи бактериални клетки.



Фиг. 14. Потенциални кръвни микробиоти свързани помежду си с междуклетъчни нанотръбички.



Фиг. 15. Трансмисионна електронна микроскопия: препарат от кръв на пациент със саркоидоза (С-12), култивирана 24 часа при 43°C в среда ВНІ с добавен витамин К. Наблюдават се две големи “майчини” клетки с големина около 2 микрометра изпълнени с дребни плътни телца, вероятно прогениторни клетки. Те са свързани помежду си от дълга около 2 μm нишковидна структура, около 100 nm в диаметър (панел С). Обвивките им са нарушени и част от цитоплазмата, и групичка от елементарни телца с големина 200 nm (панел D) са освободени навън.

4.4. Дискусия

Криптични бактерии са изолирани или индиректно потвърдени при пациенти с хронични или латентни инфекции, включително нефрит (Ponig, 1972), ревматична треска (Carapetis, 2016), идиопатична хематурия (Domingue, 1993), болест на Crohn (Rathnaiah, 2017), микобактериални инфекции и много други (Domingue, 1997). Благодарение на секвенирането от следващо поколение и ултрамикроскопските изследвания е идентифициран автентичен кръвен микробиом при няколко незаразни заболявания (Potgieter, 2015) и кръвен микробиом при здрави индивиди (Paisse, 2016; Panaiotov, 2018; Castillo, 2019).

Доскоро експертите в областта на биологията и медицината смятаха, че кръвта е имунологично добре контролирана и стерилна среда и че проникването на микроби в кръвта ще доведе до преходна инфекция или развитие на инфекциозно заболяване. Това схващане се промени през последните 50 години благодарение на проучвания отчитащи наличието на кръвна микробиота и циркулиращи микробни метаболити в кръвта на хора и животни (Mandal, 2016; Vientos-Plotts, 2017; Castillo, 2019 ; Goraya, 2022). Въпреки че кръвният микробиом все още е енигма, непрекъснато се натрупват доказателства за съществуването на кръвна микробиота при здрави индивиди. В експеримента с моноклеарни клетки изолирани от периферна кръв от здрави индивиди не можем да свържем наблюдаваните микробни форми с инвазия на гостоприемника (сепсис) или патология. Ние считаме, че тези микробни структури естествено персистират в кръвта на гостоприемника си, някои вероятно от момента на неговото раждане и дори ембрионално развитие. Освен това считаме, че кръвта на здравите индивиди има своя собствена, резидентна микробиота.

Преките и косвени доказателства за съществуването на вируси, бактерии и гъбички присъстващи като нормална микрофлора в кръвта на здрави индивиди, хвърлиха светлина за влиянието и върху имунния надзор на гостоприемника и на потенциалната и роля при хронични системни възпалителни заболявания (Potgieter, 2015; Cebriá-Mendoza, 2021). Модели описващи механизмите за бактериална транслокация от стомашно-чревния тракт към екстраинтестинални локации, като междуклетъчното интерстициално пространство („междуклетъчно тъканно пространство“) на тялото и кръвния поток дават обяснение за: (а) нарушаване на екологичното стомашно-чревно равновесие позволяващо свръхрастеж на определени чревни бактерии, (б) повишена пропускливост на бариерата на чревната лигавица и (с) недостатъци в имунната система на гостоприемника (Schatten, 1955; Berg, 1999). По аналогия с микробиотата на стомашно-чревния тракт, която живее в симбиоза с гостоприемника, така и част от преминалата в кръвта чревна микробиота може да съществува в добре контролирана и балансирана симбиоза с гостоприемника си. Съвместното симбиотично съществуване би било възможно при намалена микробна антигенност, като основната полза за гостоприемника вероятно е узряването, модулирането и поддържането на имунната му система. Това може да се сравни с ваксинация с жива ваксина, например BCG (Halling-Brown, 2008). Основните механизми

на този строг контрол все още не са известни. Предполагаме, че микробната транслокация е естествено събитие, което не задължително е свързано с патология в гостоприемника. В този смисъл не е необходимо да има увреждане на чревната епителна бариера за микробна транслокация. Възможно е чревната пропускливост за микробни транслокации да представлява необходим естествен процес, чрез който вътрешните органи и системи да комуникират с външния микробен свят. Кръвната микробиота е в естествена симбиоза с гостоприемника, подобна на симбиозата между резидентната микрофлора и кожата, лигавиците, червата и т.н., като по този начин микроорганизмите съжителстват с човешките клетки, без да причиняват класическа патология.

През 2016 Paise et al. демонстрира, че в кръвта на здрави лица съществува разнообразен микробиом. По-голямата част от бактериалната ДНК в кръвта е открита в лимфоцитната кръвна фракция (93,74%), а еритроцитите съдържат повече бактериална ДНК (6,23%) от кръвната плазма (0,03%) (Paise, 2016). Някои проучвания съобщават за връзки между кръвната микрофлора и хронични заболявания (Domingue, 1997; Potgieter, 2015; Visser, 2019; Hammad et al., 2020). Сегашното мнение за произхода на кръвната микрофлора е свързано с микробна транслокация, събитие известно още като атопобиоза през червата (Gautreaux, 1994; Berg, 1999), устната кухина (Koren, 2011; Amar, 2015; Seringes, 2015; Emery, 2021) или кожата (Visser, 2019). Докладвани са патологии, свързани с микробни транслокации в мезентериални лимфни възли (Gautreaux, 1994), черен дроб (Pinzone, 2012), далак или урогенитална система (Domingue, 1993). Значителен брой проучвания визуализират микробни структури без клетъчна стена или L-форми, при болни лица (Fernandes, 1977; Errington, 2016). Скорошни проучвания показват, че вътрешните органи и тъкани на здрави и болни индивиди притежават свой микробиом (Salihoglu, 2021). Докладвани са асоциации на тъканна микробна дисбиоза с ракови, невродегенеративни и възпалителни заболявания (Pisa, 2015; Nejman, 2020; Poore, 2020). Установено е, че тъканта на рака на гърдата има специфичен микробен профил (Meng, 2018), а при някои мозъчни нарушения като болестта на Хънтингтън и болестта на Алцхаймер, микробната колонизация на мозъчната тъкан е рисков фактор (Alonso, 2019).

Нашите резултати потвърдиха наличието на естествен кръвен микробиом при клинично здрави индивиди. Той се състои от микробни структури, демонстриращи

специфични характеристики на пролиферация и жизнен цикъл. Ние наблюдавахме и документирахме различни механизми на пролиферация на кръвната микробиота.

В мононуклеарни клетки от периферна кръв, изолирани от прясно взета кръв, наблюдавахме микробни сфероидални клетки с клетъчна стена съставена от вътрешна и външна мембрана. Вероятно различните видове кръвни микробиоти притежават няколко механизма на пролиферация. Растежът на потомствените клетки вътре в "майчината" клетка и екструзията на потомствената клетка от "майчиното" тяло е преобладаващият начин на пролиферация на микробиотите. Наблюдавано бе също и пъпкуване (фиг. 4 F). Механизмът на пролиферация чрез екструзия на потомствени клетки във верижки бе наблюдаван при всички приложени микроскопски техники за анализ. Може да се заключи, че резидентните микробни видове в кръвта, съществуват като няколко морфологични форми. Плеоморфизмът на кръвните микробиоти е наблюдаван и от други автори (McLaughlin RW, 2002).

В култивираните лизирани и филтрирани кръвни проби бе наблюдавана микрофлора, ограничена само от мембрана, наподобяваща бактериалните L-форми. В част от клетките, клетъчната мембрана беше покрита с дебел извънклетъчен матрикс (фиг. 10 C), а в други не (фиг. 10 A). Жизненият цикъл на култивираната кръвна микробиота преминава през няколко етапа. Първо, сфероидалните микробни L-форми дават начало на потомство, което се развива в цитоплазмата на растящата вегетативна "майчина" клетка. По време на съзряването "майчината" клетка се превръща в репродуктивен сак. Наблюдавахме два вида "майчини" клетки - електронно-плътни (фиг. 8 D и фиг. 9 E) и електронно-прозрачни (фиг. 9 C). Потомствените (прогениторни) клетки могат да преминат през различни участъци на клетъчната мембрана на "майката" чрез протрузии (фиг. 9 D). Друга възможност е прогениторните клетки да увеличат броя си многократно и да разрушат клетъчната мембрана на майчиното тяло (Фигура 9 B, F). Заключихме, че "майчиното" плътно тяло е изпълнено от потомствени клетки, които растат в клетъчния цитозол, след което напускат чрез екструзии или като разрушат мембраната на "майчиното" тяло. Изглежда, че има преходно състояние между електронно-прозрачните и електронно-плътните тела. Вероятно различните видове кръвни микробиоти се характеризират със специфична форма на развитие, образувайки електронно-прозрачни или електронно-плътни тела. Наблюдавахме и електронно-полупропускливи майчини клетки, които

натрупват потомствени телца в цитоплазмата си, които се освобождават след “пръсване” на мембраната (фиг. 9 E, F). Подобни електронно-плътни тела и цитоплазмени частици, които наподобяват наблюдаваните от нас структури, са описани при пациенти с хронични инфекции и при здрави лица (Domingue, 1995; Domingue, 1995; Markova, 2017; Markova, 2020).

За разлика от класическите бактерии, при L-формите са описани много различни, нетипични форми на репродукция. Сред тях са неравномерно бинарно делене, пъпкуване, тубуляция, везикуляция, протрузии и екструзии на елементарни тела и гранули от големи тела, множествено делене с вътреклетъчна фрагментация на цитоплазма или комбинации от изброените (Prozorovskii, 1981; Errington, 2017). Част от тези репродуктивни модели бяха наблюдавани от нас за кръвните микробиоти.

В култивираната лизирана кръв наблюдавахме, че част от кръвните микробиоти притежаваха дебела клетъчна обвивка. (фиг. 10 C, D). Възможно е на това да се дължи фактът, че ни отне много време и опити, за разработване на надежден метод за екстракция на ДНК от кръвната микрофлора в култивирана и некултивирана кръв. Предполагаме, че дебелината извънклетъчна обвивка вероятно предпазва клетките от стрес и е ключова за механизмите на оцеляване, като латентност и агрегация, водещи до имунна неутралност, т.е. до липса на клетъчна и хуморална имунна реакция от страна на макроорганизма.

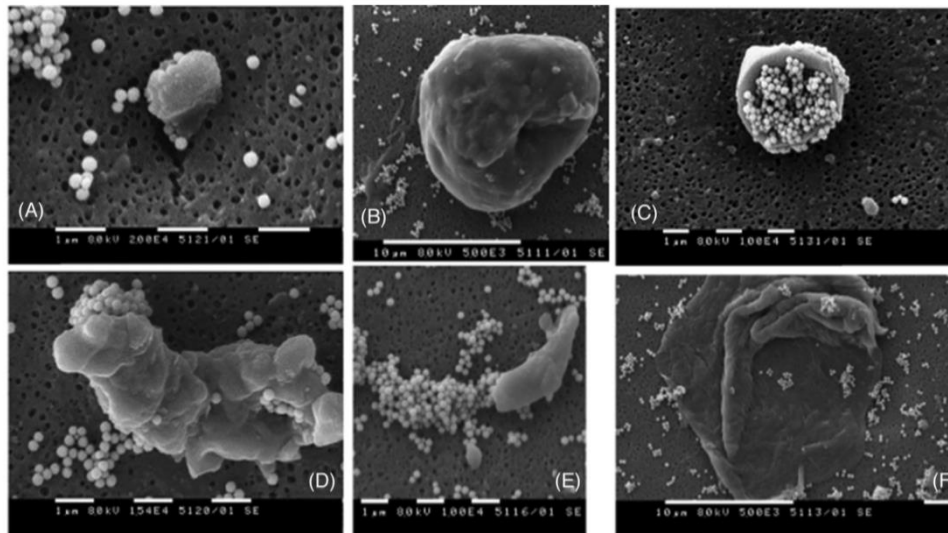
Съществуват някои сходства, но и различия между култивираната цяла кръв на пациентите със саркоидоза и лизираната и култивирана кръв от здрави доброволци. Това вероятно се дължи на спецификата на заболяването и малкия брой изследвани саркоидни материали. В първите минути (30-60 мин) от култивирането на нелизирана саркоидна кръв, рядко бяха наблюдавани елементарни мъхести телца (фиг. 11 A). С увеличаване на времето на култивиране, нарастваше и броят им (фиг. 11 B). Бяха наблюдавани електронно-полупропускливи структури с удължена (пръчковидна) форма (фиг. 12 A, B, C), с дължина около 4-5 μm и ширина 0,5-1 μm . Първоначално сметнахме структурите за еритроцити, но червените кръвни клетки са по-едри, с диаметър 7,5-8,7 μm и височина 1,7-2,2 μm (Diez-Silva, 2010). В препарата еритроцитите изглеждаха електронно-плътни за разлика от наблюдаваните структури. Във вътрешността им се забелязват малки електронно-плътни телца с големина 100-150 nm. Възможно е тези телца да са

разположени отгоре, върху удължената структура, а не вътре в нея, но това е трудно за интерпретация без сравнение със СЕМ. До плътните телца има видими 3 по-светли овални структури с приблизително същата големина. Възможно е това да са местата от които са отделени сферичните електронно-плътни телца. По повърхността на обвивката на голямата полупропусклива структура се забелязват издутини - вероятно области на екструзия. Всички тези наблюдения, ни карат да мислим, че вероятно наблюдаваните структури са големи електронно-полупропускливи "майчини" клетки с пръчковидна структура, които отделят елементарни прогениторни телца.

В препарата приготвен от култивирана 24 ч, при стресови условия нелизирана кръв от пациент със саркоидоза (С-12), чрез ТЕМ бяха наблюдавани структури, каквито не бяха открити при предходните експерименти. Особен интерес за нас представляват показаните на фиг. 15 и фиг. 13 обекти. На фиг. 13 е показана голяма "майчина" клетка, с разпукана на няколко места мембрана, с електронно-плътни и електронно-прозрачни зони на цитоплазмата, вероятно формирани след напускане на голям брой прогениторни елементарни телца, видими в ляво от нея. Голямата клетка е свързана чрез нишковидна структура с по-малка майчина клетка, която е в по-напреднал стадии на разпад. На фиг. 15 са показани две големи "майчини" клетки с големина около 2 микрометра изпълнени с дребни плътни телца, вероятно прогениторни клетки. Те са свързани помежду си от дълга около 2 μm нишковидна структура, около 100 nm в диаметър. Обвивките им са нарушени и част от цитоплазмата, и групичка от елементарни телца с големина 200 nm са освободени навън. За съжаление при този експеримент не беше проведено паралелно изследване със СЕМ, което да потвърди тълкуването на посочените електронограми. При сравнение на наблюдаваните от нас структури с публикувани от други автори ТЕМ и СЕМ изображения на бактериални L-форми, бяха направени следните изводи:

Възможно е наблюдаваната на фигура 15 структура, състояща се от две свързани чрез тънък "мост" сферични тела, изпълнени с множество електронно плътни телца, да е подобна на описаните от доц. Димова и съавтори микобактериални L-форми, изолирани от плацента и кръв на ваксинирани в детска възраст с БЦЖ ваксина - жени (фиг. 16 С) (Dimova, 2023).

На фиг. 13 процесът по освобождаване на елементарни плътни телца е в по-напреднал стадии, като майчината структура става електронно-пропусклива, т.е. празна и деформирана. Подобни аналогични структури се наблюдават на фиг. 16 D, E.



Фиг. 16. Представени са различни по размери и морфология микобактериални L-форми изолирани от човешка плацента от 6-11 г.с., визуализирани чрез СЕМ. Сред представените L-формени бактерии има големи “майчини” клетки с овална и продълговата форма, както и множество малки кръгли елементарни телца. Последните са както самостоятелно разположени фиг. 16 (A), така и намиращи се във вътрешността на големите майчини клетки фиг. 16 (C), (D), (E). (Dimova, 2023)

Наблюдаваните в множество зрителни полета тънки, нишковидни структури, свързващи две или повече тела се оказаха нова загадка. Те бяха наблюдавани само в култивираната за 24 часа кръв (нелизирана) от пациент С-12. Нанотръбички са описани за първи път в еукариотите, като са наречени **тунелни нанотръбички** (tunneling nanotubes, TNTs). Те могат да свързват клетки на големи разстояния и да прехвърлят везикули, мембранни протеини, клетъчни компоненти (включително митохондрии), приони, РНК и вируси от клетка в клетка (Rustom, 2004; Davis, 2008; Lou, 2012). Диаметърът им варира от 50 до 700 nm и са по-големи от архейните и бактериалните нанотръбички. Изградени са от актинови филаменти, на което се дължи здравната им, а някои притежават и туболин (Bénard, 2015).

Друг вид нанофиламентни структури у еукариоти са наблюдавани в мигриращи човешки клетки от различни тъкани. По време на миграция, клетката оставя ретракционни

влакна зад себе си, които завършват с везикули с диаметри до 3 μm . Тези везикули растат на върховете или в пресечните точки на ретракционните влакна и съдържат множество помалки везикули с диаметър около 50-100 nm. Комплексът от ретракционното влакно и везикулите изпълнени с везикули е наречен **мигразома**, а преносът на молекули чрез тях - миграцитоза (Ma, 2015).

При прокариоти фибрилни структури свързващи близкоразположени бактериални клетки са описани и детайлно изучени от израелските учени Dubey and Ben-Yehuda през 2011. Те ги наричат **междуклетъчни нанотръбички**. Служат за трансфер на цитоплазмени молекули - протеини, транскрипти, дори неконюгативни плазмиди. Междуклетъчните нанотръбички могат да свързват бактерии от различни щамове на един вид, но формирането им е наблюдавано и между различни видове бактерии, дори между Грам положителни (*B. subtilis*) и Грам отрицателни (*E. coli*) бактерии (Dubey; 2011).

5. Имунохистохимия за детекция на *C. acnes* в саркоидни грануломи

За проверка за наличие на *C. acnes* в саркоидни грануломи беше приложена ИХХ с анти тялото РАВ, специфично за липотейхоевите киселини от мембраната на бактерията.

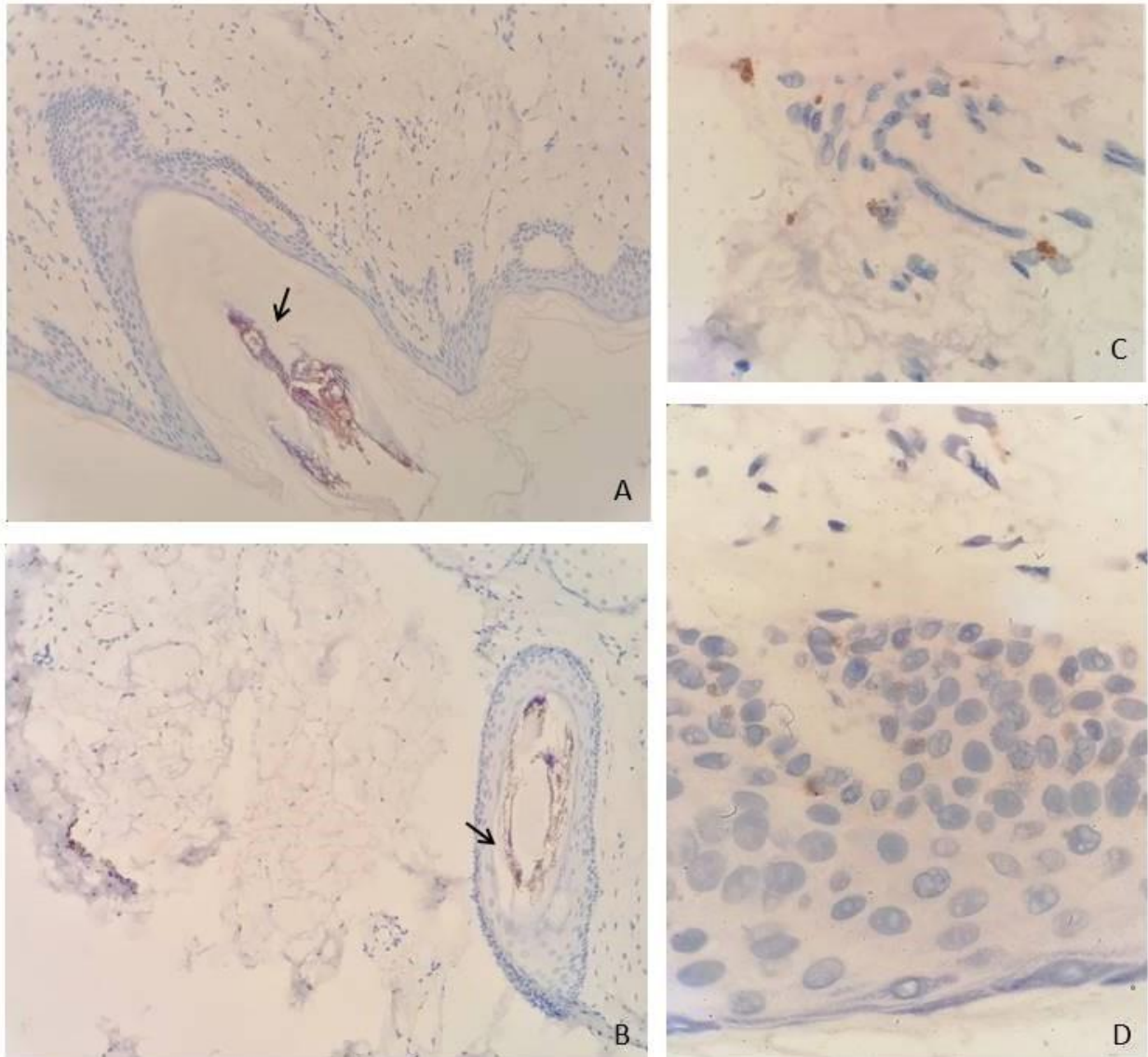
Изследвани бяха оперативно отстранени лимфни възли от две лица, суспектни за развитие на злокачествен процес (ЛВ1, ЛВ2). След резекцията, лимфните възли бяха фиксирани с формалин и включени в парафин. При патохистологичното микроскопско изследване в тях бяха открити множество неказеифициращи епителоидоклетъчни грануломи, типични за саркоидоза. ЛВ1 бе със заличена морфология, за сметка на множество саркоидни грануломи. Образецът ЛВ2, резектиран чрез Видео-асистирана торакална хирургия (ВАТС) включваше два броя лимфни възли със заличена структура за сметка на множество епителоидноклетъчни неказеифициращи грануломи и прилежащ белодробен паренхим с наличие на същите грануломи.

За положителна контрола, беше използван ретроспективен (включен в парафин) материал от човешка кожа от глабела, богат на пилосебацейни структури (фиг. 17). Като резидентен представител на човешката кожа, *C. acnes* колонизира главно себацейните жлези и космените фоликули на кожата на лицето и гърба (Rozas, 2021).

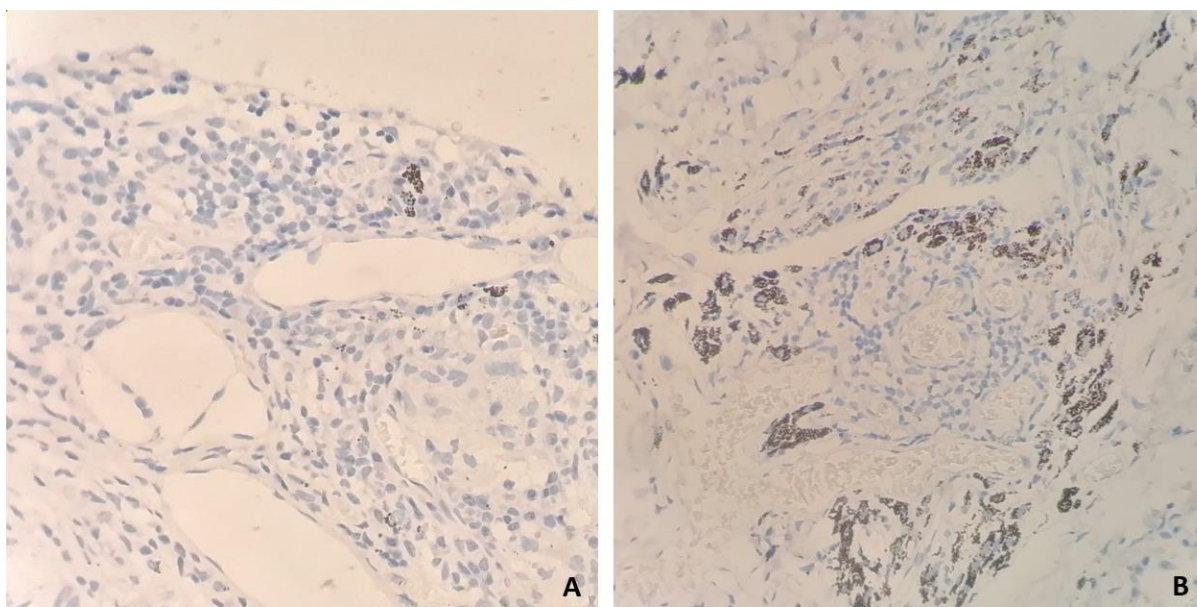
C. acnes беше открит в контролния материал от кожа (фиг. 17) и в двата изследвани саркоидни образци. РАВ-реактивни структури бяха наблюдавани както вътре в

саркоидните грануломи (фиг. 20; фиг. 22; фиг. 23; фиг. 24), така и извън тях (фиг. 19), а също и в белодробния паренхим на ЛВ2 (фиг. 18). С анти тялото РАВ реагираха, както дребни зърнисти структури (фиг. 21А,), така и по-едри, овални и плътни телца (фиг. 21В).

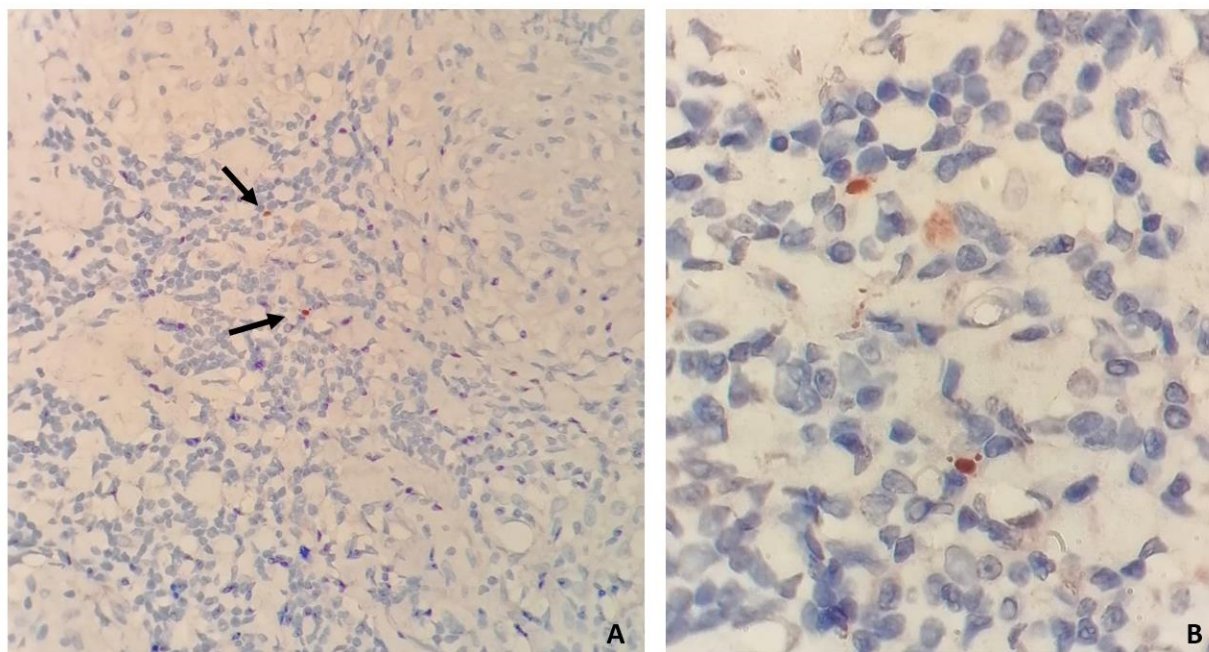
Сравнявайки резултатите от ръчно изработената ИХХ с тези от проведената с автоматизирана система Leica-Bond Max се оказа, че и с двата метода се откриват РАВ-реактивни структури отговарящи на *C. acnes*. Въпреки това с автоматизираната система бяха наблюдавани по-голям брой малки сферични (зърнисти) обекти специфично свързани с моноклоналното анти тяло РАВ. Също така със система Leica фонвата неспецифична реакция беше значително по-слаба, с което беше постигнат по-добър контраст между човешките оцветени с еозин ядра и кафяво оцветените структури отговарящи на липотейхоевите киселини в мембраната на *C. acnes*.



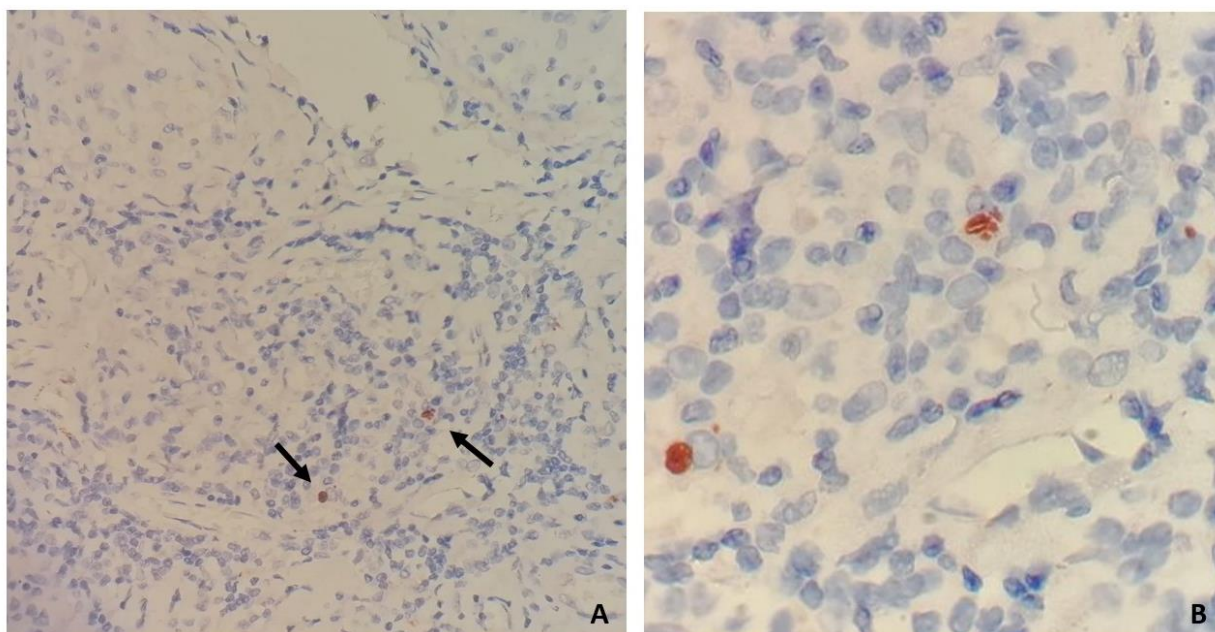
Фиг. 17 Препарат от човешка кожа в който присъствието на *Cutibacterium acnes* е визуализирано чрез ИХХ с анти тялото РАВ - кафяво оцветяване. Със синьо са оцветени ядрата на клетките изграждащи кожата. **А)** и **В)** Множество *C. acnes* локализирани в космени фоликули - черни стрелки. **С)** *C. acnes* маркирани с анти тяло РАВ в дермата и в **Д)** базалния слой на епидермиса. ИХХ с автоматизирана система Leica-Bond Max. А) и В) - увеличение 100x, С) и D) - 1000x с имерсия.



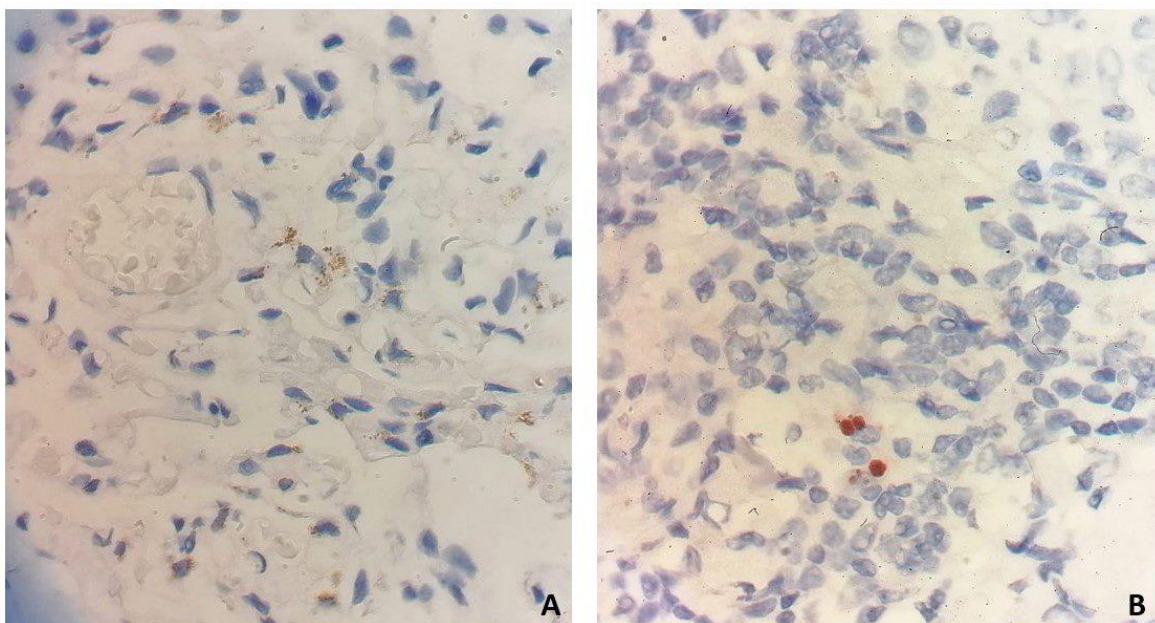
Фиг. 18. ЛВ2 - Множество структури свързали РАВ анти тялото в белодробния паренхим на ЛВ2. ИХХ с автоматизирана система Leica-Bond Max. **А)** Увеличение 200х, **В)** 100х



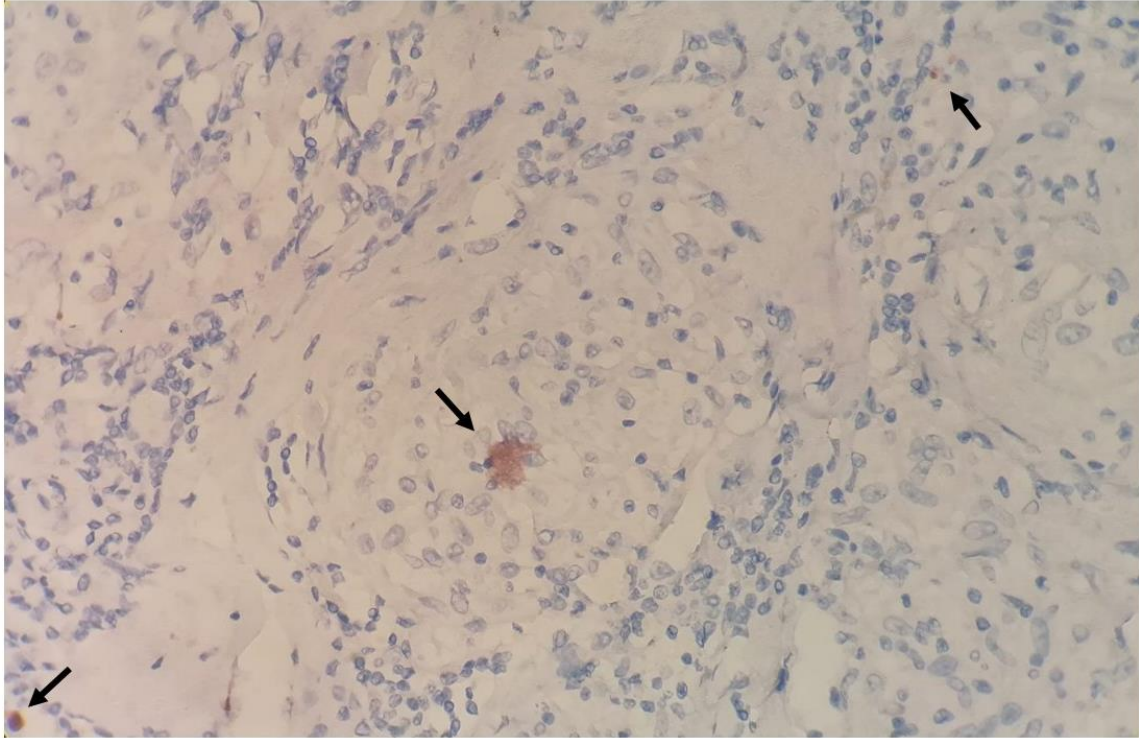
Фиг. 19. ЛВ1. РАВ-позитивни структури разположени извън саркоидните грануломи в ЛВ1. **А)** РАВ-реактивните структури (посочени с черни стрелки) се визуализират в област богата на лимфоцити, която обгражда саркоидните грануломи. **В)** Същото зрително поле при по-голямо увеличение. Разграничават се две големи овални и плътни структури и по-дребни, с неопределена морфология, разположени между тях. ИХХ с автоматизирана система Leica-Bond Max. **А)** Увеличение 100х, **В)** 1000х с имерсия.



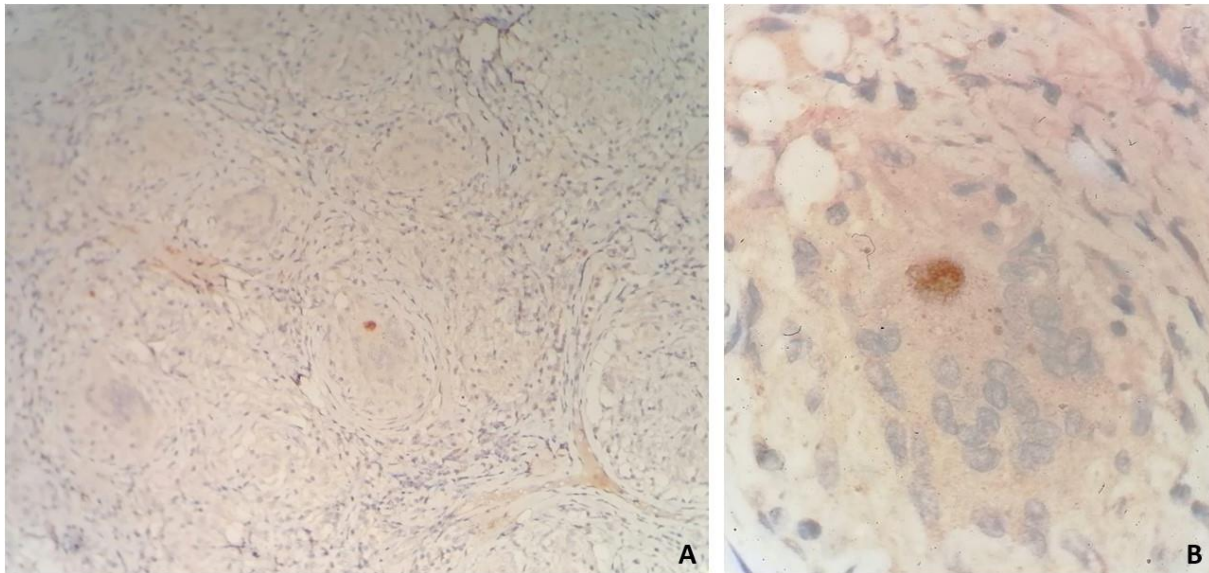
Фиг. 20. ЛВ1. А) РАВ-реактивни структури (черни стрелки) разположени във вътрешността на саркоиден гранулом. В) Същото зрително поле при по-голямо увеличение. Наблюдават се големи и малки РАВ-позитивни структури. ИХХ с анти тяло РАВ - автоматизирана система Leica-Bond Max. Увеличения: А-200х, В-1000х с имерсия.



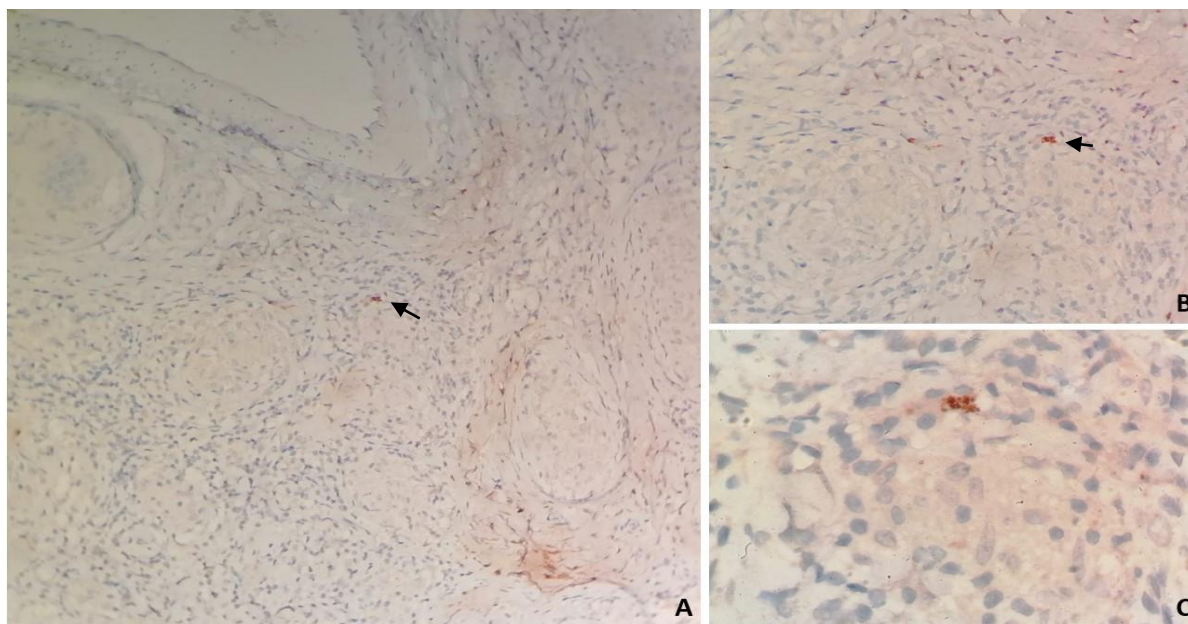
Фиг. 21 А) ЛВ2 - множество дребни, зърнисти РАВ-реактивни структури; В) ЛВ1 три големи, овални РАВ-реактивни структури. ИХХ с автоматизирана система Leica-Bond Max. Увеличение: 1000х с имерсия.



Фиг. 22. ЛВ1. РАВ-позитивни структури в центъра на гранулома и извън него (черни стрелки). ИХХ с автоматизирана система Leica-Bond Max. Увеличение: 200x



Фиг. 23. Снимки на ЛВ1. **А)** Зрително поле с множество саркоидни грануломи. В централно разположен гранулом, в гигантска многоядрена клетка тип Лангханс, се вижда голяма структура, реагираща с моноклоналното анти тяло РАВ. **В)** Същата структура, при по-голямо увеличение. Ръчна ИХХ. **А** - Увеличение 100x, **В** - увеличение 1000x с имерсия.



Фиг. 24. Снимка на ЛВ1. **А)** Нормалната морфология на лимфния възел е нарушена за сметка на множество саркоидни грануломи. Може да бъде разграничен голям кръвоносен съд в горния ляв ъгъл. В периферията на гранулома намиращ се под него се открива структура реагираща с анти тялото РАВ (черна стрелка). **В)** По-голямо увеличение на същото зрително поле. **С)** Увеличение 1000x показва струпани дребни, сферични телца реагиращи с РАВ-анти тялото. Ръчна ИХХ - ЛВ1. **А** 100x, **В** 200x, **С** 1000x с имерсия.

5.1. Дискусия

При формиране на грануломите, антигенът причинител присъства или е присъствал в гранулома (Sell, 1987). До момента *C. acnes* е единственият микроорганизъм, чието присъствие в саркоидните грануломи е доказано многократно чрез имунохистохимия. Локализацията на бактерията във вътрешността на грануломите е доказана в различни органи засегнати от саркоидоза - бели дробове (Isshiki, 2019; Suzuki, 2016), лимфни възли (Kinoshita, 2020), сърце (Asakawa, 2017), очи (Goto, 2017; Nagata, 2017) и нервна система (Yang, 2018; Akimoto, 2017). За целта е използвано специфичното за *C. acnes* моноклонално анти тяло РАВ, което реагира с липотейхоеви киселини, които са част от клетъчната мембрана на бактерията. ИХХ е проведена с тъканни проби, фиксирани с формалин и включени в парафин.

Negi и колектив (Negi, 2012) разграничават два вида структури, които свързват РАВ анти тялото в саркоидните грануломи. Това са малки кръгли телца (SRB) и големи удължени телца на Хамазаки-Весенберг (H-W), които в последствие са определени, като

инфекциозната (SRB) и латентната (H-W) форма на *C. acnes* (Eishi, 2013). Такива структури бяха наблюдавани в изследваните от нас образци ЛВ1 и ЛВ2, както в самите грануломи, така и извън тях. Откриването на *C. acnes* извън саркоидните грануломи само по себе си не е доказателство за връзка между бактерията и етиологията на саркоидозата. Причината за това е, че *C. acnes* е най-честият коменсал в периферната белодробна тъкан и медиастиналните лимфни възли на лица без саркоидоза (Ishige, 2005). При имунохистохимични изследвания с анти тялото РАВ ползващи като модел на изследване други грануломатозни заболявания - туберкулоза, свръхчувствителен пневмонит, грануломатоза с полиангиит (на Вегенер), не се откриват следи от *C. acnes* в грануломите. Такива обаче се локализируют в интерстициални и алвеоларни макрофаги извън грануломите (Isshiki, 2021). Тези констатации подкрепят хипотезата, че е възможно саркоидните грануломи да се причиняват от коменсалния за белите дробове и лимфни възли *C. acnes* у хора проявяващи Th1 свръхчувствителност към бактерията.

Проучване проведено от Suzuki и колектив показва, че в синусните макрофаги в лимфни възли на болни от саркоидоза, малките кръгли телца (инфекциозната форма на *C. acnes*) формират неразтворими имунни комплекси с IgA и IgM (Suzuki, 2018) Грануломатозната реакция представлява клетъчен отговор към продължително дразнене от неразтворима/неразградима субстанция (Sell, 1987). Това е възможно да бъде стимул за развитие на грануломатозен процес.

Формираните неразтворими имунни комплекси между *C. acnes* и имуноглобулините намаляват афинитета на свързване с РАВ анти тялото. Свързването на антигена е ключова стъпка за визуализация на бактерията чрез ИХХ. При нагряване на 97°C за 40 мин, в цитратен буфер в микровълнова фурна за медицински цели, се получават най-добри резултати за антигенно възстановяване (Isshiki, 2021). В проведената от нас мануална ИХХ няхаме достъп до микровълнова фурна за медицински цели и антигенното възстановяване беше извършено чрез термо блок, спазвайки останалите условия. Възможно е това да е причината, поради която чрез автоматизираната ИХХ получихме по-добро свързване с РАВ анти тялото, отколкото с ръчния метод. За разлика от малките кръгли телца реагирали с РАВ анти тялото, големите овални телца (H-W) не формират такива неразтворими комплекси с имуноглобулини. Negi и колектив изказват предположението, че телцата на H-W са латентната форма на *C. acnes*. Те са без клетъчна

стена и се локализируют в макрофагите. Тези твърдения се подкрепят от ултрамикроскопски (ТЕМ) наблюдения. Телцата на Н-W имат морфология на удължени бактерии без клетъчна стена, свързващи РАВ анти тялото в периферията си. От тях често се наблюдава пъпкуване на малки кръгли телца, което е нетипично делене, характерно за L-формените бактерии. Тези заключения добре корелират с наблюдаваните от нас с ТЕМ и СЕМ протрузии на повърхността на кръвните микробиоти.

Проведената ИХХ с РАВ анти тялото беше пилотно изследване целящо да се провери активността на анти тялото, да се подбере метод (ръчна/автоматизирана ИХХ) даващ оптимални резултати и не на последно място да се провери откриват ли се следи от *S. acne* вътре в саркоидните грануломи. След като беше установено, че анти тялото “работи” и по-добри резултати бяха получени чрез ИХХ с автоматизираната система Leica, следваща стъпка ще бъде всички включени в дисертацията потвърдени случаи на саркоидоза (n=15) да бъдат изследвани за наличие на *S. acne*, използвайки ретроспективните им тъканни препарати.

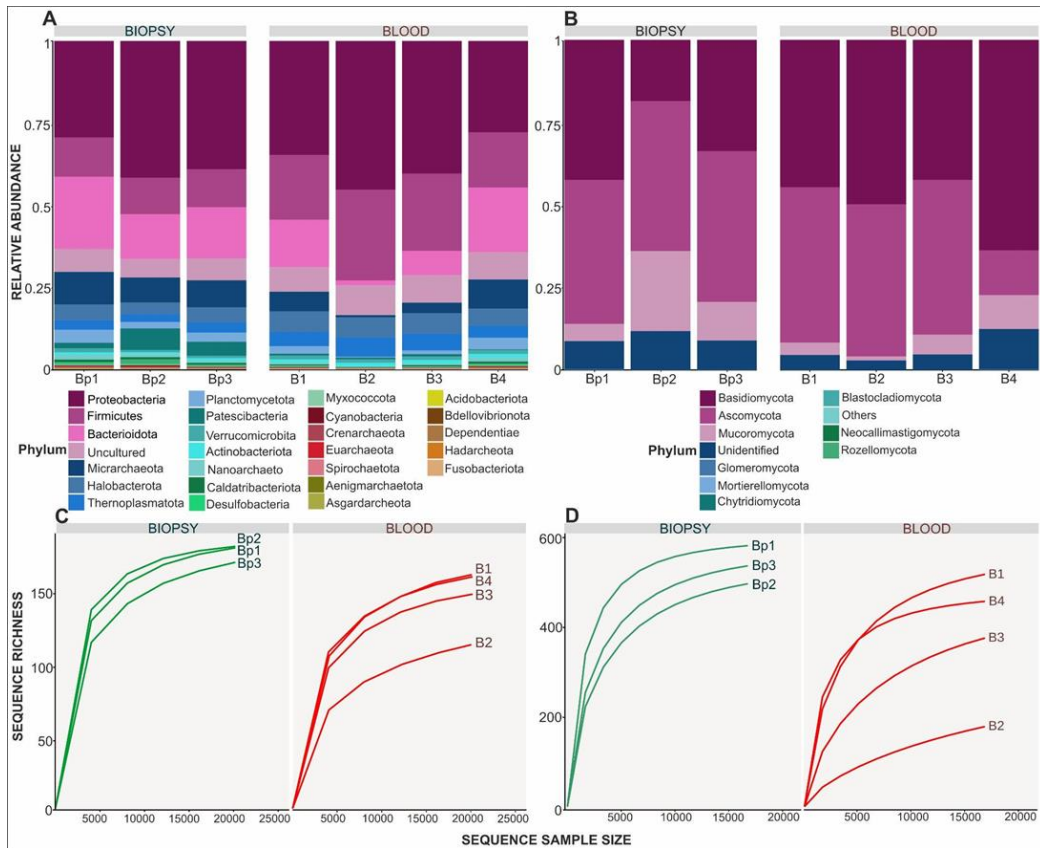
До момента публикуваните изследвания базирани на ИХХ с анти тялото РАВ са проведени основно с японски (Negi, 2012; Isshiki, 2021) и с по-малко на брой немски (Negi, 2012) и холандски (Beijer, 2021) пациенти със саркоидоза. В японската и германската група процентът на положителните за *S. acne* саркоидни грануломи е по-висок от този в холандската група пациенти. Изследването на българска група от пациенти ще внесе допълнителна светлина за изясняване до каква степен *S. acne* има отношение към саркоидната етиология в географски, расов и етнически план.

6. Резултати от приложените молекулярни методи

6.1. Таргетно 16S и 18S метагеномно секвениране на кръвни и биопсични проби на пациенти с доказана саркоидоза.

Изследвани бяха венозна кръв и биопсичен материал от 3 пациента с доказана саркоидоза и само кръв от един пациент със саркоидоза. ДНК беше успешно изолирана от всяка проба (4 кръв, 3 биопсии). Средният брой секвенции (риидове) от проведеното 16S рДНК секвениране за идентифициране на бактериалното разнообразие беше 37 784 секвенции \pm 5 387, а за идентифициране на гъбичното разнообразие чрез 18S рДНК секвениране - 302 833 секвенции \pm 65 502. Общо бяха идентифицирани 26 бактериални

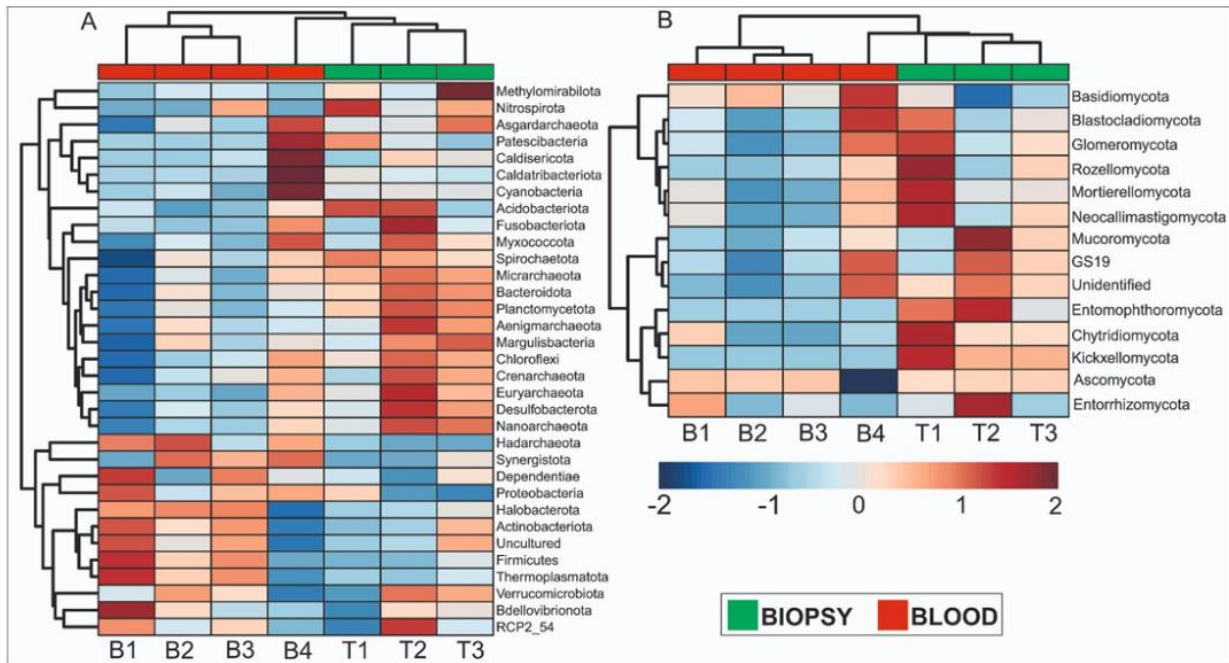
типа и 11 типа гъбички (Фиг. 25 А, В). Домиращи при бактериите бяха представители на тип Proteobacteria, следвани от Firmicutes и Bacteroidetes (фиг. 25 А), като сред биопсиите вторият най-разпространен тип бе Bacteroidetes, докато в кръвта на второ място бяха бактериите от тип Firmicutes. При гъбичките домиращи бяха представителите на типове Ascomycota Basidiomycota и Mucoromycota (Фиг 25 В).



Фиг. 25. Стълбчеста диаграма показваща относителното микробно изобилие (relative abundance) в биопсичните и кръвни проби. **A** – бактериален микробиом на ниво “тип” (phylum); **B** – гъбичен микробиом на ниво “тип” (phylum). Bp1-Bp3 – биопсии; B1-B4 – кръвни проби. **C** – криви на разреденост/рядкост (rarefaction curves), показващи бактериалното богатство и разнообразие сред биопсичните и кръвни проби. **D** – криви на разреденост/рядкост (rarefaction curves), показващи гъбичното богатство и разнообразие сред изследваните биопсични и кръвни проби.

Бактериалното богатство и разнообразие сред секвенираните биопсични и кръвни проби бе представено чрез кривите на рядкост /рерификация (rarefaction curves) (Фиг 25 C). От тях се вижда, че биопсичните проби са по-богати на секвенции от кръвните, което е валидно и при гъбичките (фиг 25 D). Богатството на гъбичните секвенции е сходно в

биопсичните проби, докато в кръвните има по-малък брой секвенции, но по-силно изразено разнообразие между отделните проби.



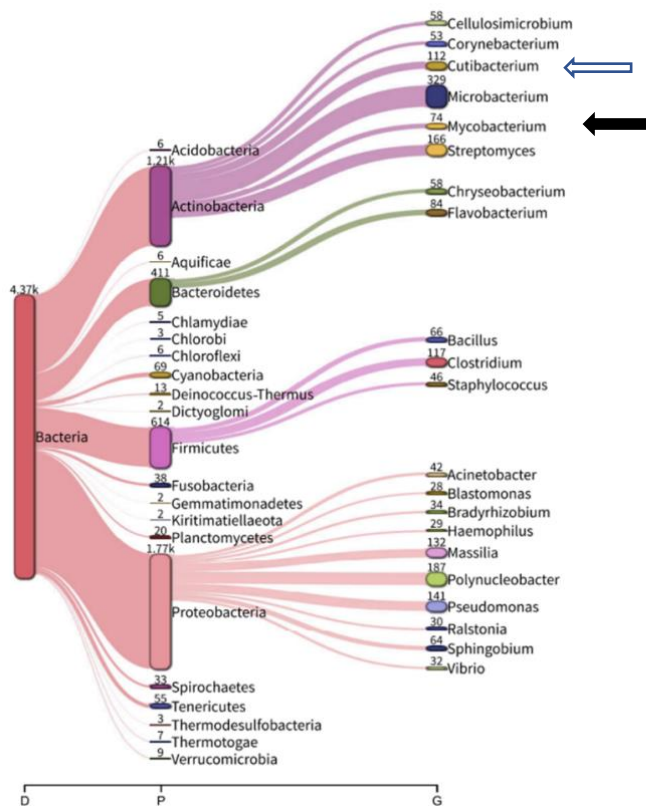
Фиг. 26. “Heatmap” диаграма представяща вариациите на микробиомното многообразие (изобилие) сред изследваните биопсични и кръвни материали. На панел (A) са показани типовете бактерии, а на панел (B) - типовете гъбички във всяка проба. B1-B4 – кръвни проби; T1-T3 – биопсични (тъканни) проби.

Представянето на резултатите от секвенирането чрез “Heatmap” диаграма дава възможност да се проследи бактериалното и гъбично изобилие във всяка проба, както и пробите да бъдат сравнени помежду си (фиг. 26). На панел A на фигура 26 се забелязва силно сходство на типовете бактерии в кръвни проби B1, B2, B3 и частично при B4. Такова сходство на бактериалните типове е в сила и за биопсични проби T2 и T3 и в по-малка степен T1. В същото време се забелязва различно микробно изобилие в кръвните и тъканни проби от един и същ пациент. По отношение на гъбичките (фиг. 26 B), много по-голямо изобилие от гъбични типове се наблюдава в тъканните проби, сравнено с кръвните.

6.2. Резултати от проведените PCR изследвания за детекция на бактерии от род *Mycobacterium* и сравнение с резултатите от Shotgun секвенирането.

При първоначалния PCR анализ с праймери специфични за *Mycobacterium tuberculosis complex* (Tb294 и Tb850) всички изследвани проби (n=35) от пациенти с доказана саркоидоза бяха отрицателни.

В резултатите от случайното метагеномно секвениране на изследваните проби бяха отчетени различен брой секвенции за микобактерии (класифицирани до род) (фиг. 27). Същите 35 проби бяха изследвани в две повторения чрез PCR с диагностични праймери Tb11 и Tb12 за род *Mycobacterium*. От тях 17 бяха положителни (7 с положителни резултати и от двете PCR реакции, 10 бяха с положителен резултат при една от двете реакции), 16 бяха отрицателни и 2 съмнителни.



Фиг. 27. Санки диаграма показваща бактериалния микробиом в биопсична тъкан на пациент със саркоидоза определен чрез случайно метагеномно секвениране. С черна стрелка са посочени броят секвенции за род *Mycobacterium*, а с бяла за род *Cutibacterium*.

6.3. Резултати от проведените PCR изследвания за детекция на *Cutibacterium acnes* и сравнение с резултатите от Shotgun секвенирането.

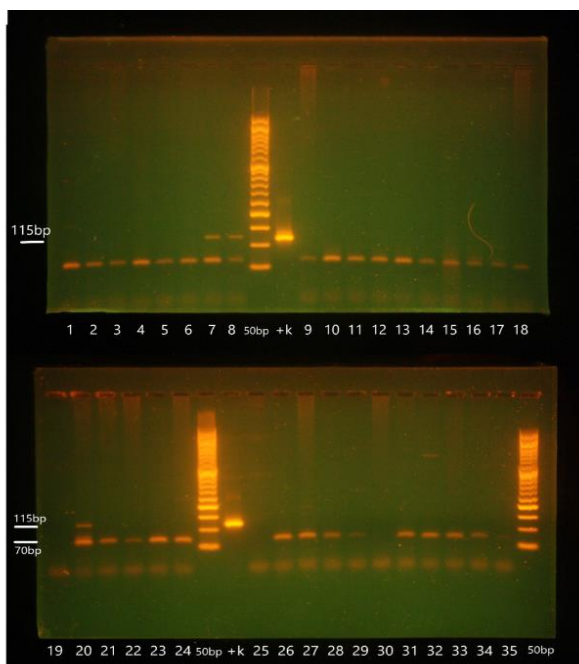
При проверка за наличие на ДНК от *Cutibacterium acnes* в събраните до момента материали - кръв, БАЛ, биопсия (n= 35) от пациенти с доказана саркоидоза (n=14), амплификация беше установена в 24 от изследваните 35 проби. Използвани бяха праймри Lip1, Lip4, а продуктът от амплификацията беше 515 нб. Риидове за *Cutibacterium acnes* бяха отчетени и при случайното метагеномно секвениране (фиг. 27).

Освен в изследваните проби, ДНК от *C. acnes* беше открита и в контролните материали - смив, продуктови контроли, както и в материали от пациенти със заболявания различни от саркоидоза. Това не е изненадващо, тъй-като *C. acnes* е резидентен представител на кожния микробиом и е чест замърсител при молекулярни изследвания.

6.4. Резултати от проведените PCR изследвания за детекция на *Toxoplasma gondii* и сравнение с резултатите от Shotgun секвенирането.

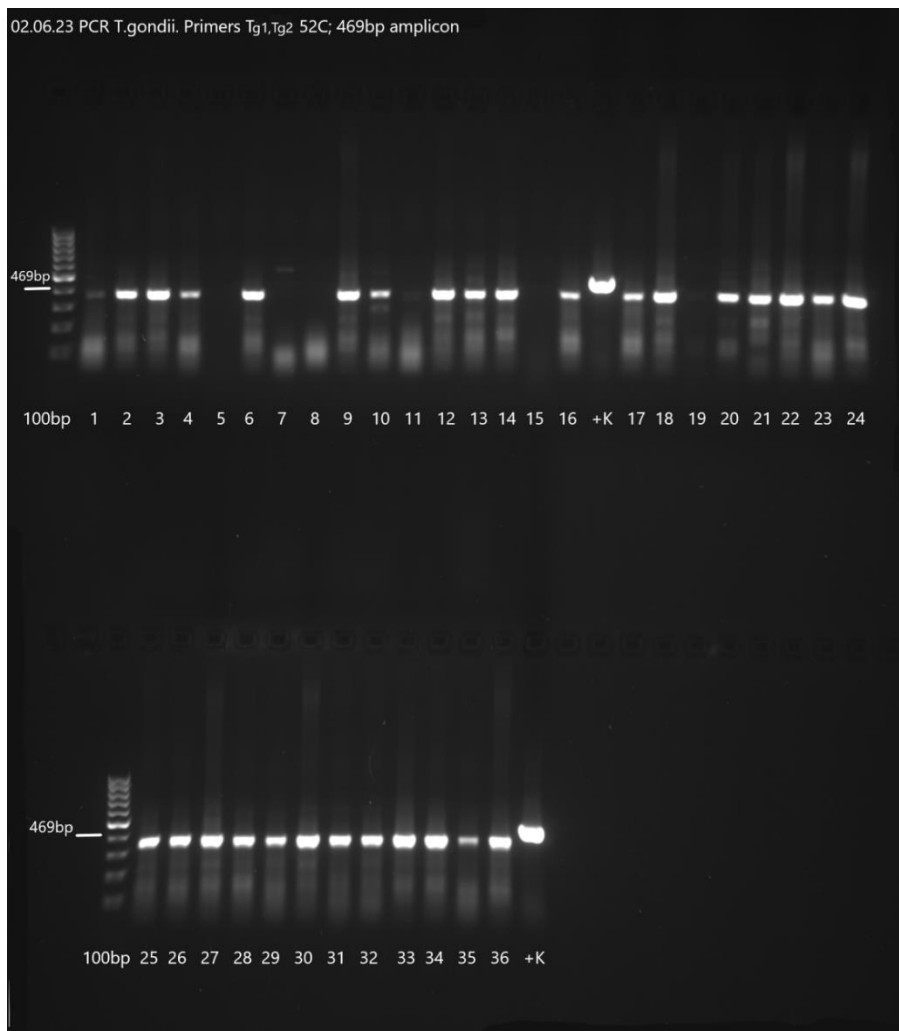
При преглед на резултатите на ниво OTU-таблица, получени от Shotgun метагеномно секвениране на общо 37 материала от 11 пациента с доказана саркоидоза, вниманието ни бе привлечено от голям брой риидове за паразитния протозой *Toxoplasma gondii* в изследваните проби - кръв, бронхоалвеоларна течност и биопсия, но не и в контролите.

При PCR анализ на изпратени в НРЛ Диагностика на паразитозите 35 саркоидни проби, амплификация на фрагмента от 115 нб на В1 генът на *T. gondii*, беше установена в 3 от тях (фиг. 28.)



Фиг. 28. PCR анализ на 35 саркоидни проби с праймери B22 и B23, специфични за фрагмент от B1 генът на *T.gondii*. Контролата (миши ексудат) и 3 от изследваните материали (7, 8 и 20) дадоха очаквания амплификационен продукт с големина 115 нб. При всички изследвани материали с изключение на 19, 25 и 30 има неспецифични ампликони с големина около 70 нб, т.е. фрагмент по-къс с 50 нб от контролата.

В същото време беше проведен PCR анализ на същите проби, но с праймери Tg1 и Tg2, специфични за фрагмент от B1 генът на *T.gondii*, с очаквана големина на ампликоните от 469 нб (Jalal, 2004). В 30 от 36 изследвани проби беше наблюдавана амплификация, но продуктът беше с около 50-70 нуклеотидни бази по-къс от този на положителната контрола (фиг. 29). Амплификацията беше проведена при максимално строги условия на хибридизация на праймерите. Получени бяха строго специфични ивици. Всички бяха с еднаква дължина на PCR фрагмента. При повторен преглед на снимките на гелове от първия PCR с праймери B22 и B23, беше забелязана амплификация на фрагмент с големина около 70 нб при 32 от 35-те изследвани материала (фиг. 28). Този резултат корелира с втория PCR, при който с праймери Tg1 и Tg2 специфични за същия ген B1, ампликоните бяха с 50-70 нб по-къси от контролата.

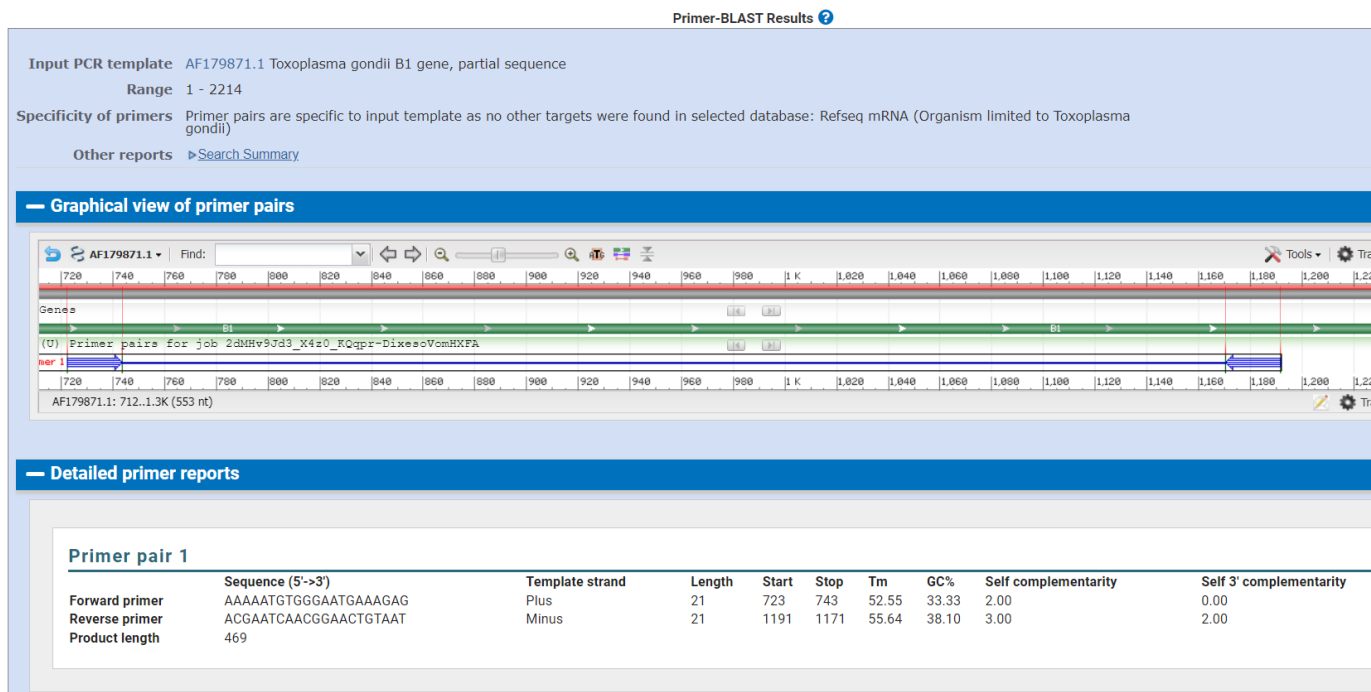


Фиг. 29. PCR анализ на 36 саркоидни проби с праймери Tg1 и Tg2 специфични за фрагмент от B1 генът на *T.gondii*. Само при положителната контрола продуктът от амплификацията е 469 нб. От изследваните 36 материала, при 30 има единичен амплификационен продукт с големина приблизително 380 нб.

Стратегиите за оптимизация на PCR протокола за идентификация на *Toxoplasma gondii* с праймери Tg1 и Tg2 включваха смяна на PCR мастър микса с DreamTaq Hot Start Green PCR Master Mix (Thermo Scientific™), както и промяна на температурата на сдвояване на праймерите. Проведен бе и градиентен PCR за установяване на оптимални температура на хибридизация на праймерите, PCR мастърмикс и добавяне на DMSO. Всички тези усилия не доведоха до промяна в дължината на репликоните.

Секвенциите и специфичността на праймерите Tg1 и Tg2 бяха проверени чрез инструмента Primer-BLAST на NCBI (Ye, 2012). При търсенето, ръчно бяха въведени

нуклеотидните последователности на използваните праймери - Tg1 и Tg2. За матрица бе въведена секвенцията на генът B1 (повторен 35 пъти в генома на *T. gondii*) AF178971, за който по литературни данни праймерите са специфични (Jalal, 2004). Първо беше зададено търсене за специфичност само в генома на *T. gondii*. Резултатът от търсенето потвърди, че двойката праймери е специфична за B1 генът на *T. gondii* (фиг. 30).



Фиг. 30. Проверка за специфичност на използваните праймери Tg1 и Tg2 с инструмента Primer-BLAST на NCBI. За референтен геном е посочен този на *Toxoplasma gondii*.

При повторно търсене, но с добавяне и на човешкия геном, като референтен, беше получен резултат, че е възможно праймерите да не са специфични за зададената матрица (B1 генът). При неспецифично сързване на праймерите към човешкия ген за phenylalanyl-tRNA syntetase 2, прогнозираният продуктът от репликацията е с големина 387 нб. Приблизително такава големина на репликоните получихме и ние.

V. Заключение и изводи

В представената дисертация бяха изследвани архивни тъканни материали; кръв, биопсия и БАЛ от пациенти със саркоидоза и други белодробни заболявания; и кръв от здрави доброволци.

Всички изследвани чрез PCR архивни тъканни материали от саркоидоза (20 бр.) и туберкулоза (19 бр.) бяха отрицателни за *M. tuberculosis* и за *C. acnes*. Съмнително беше, че във фиксираната с формалин и включена в парафин туберкулозна тъкан липсва ДНК от *M. tuberculosis*. Предположихме, че ДНК е била увредена в процеса на фиксиране с формалин и дълготрайното съхранение на тъканните парафинови блокчета при стайна температура. Проверката на качеството (интегритета) на изолираната ДНК чрез 1% агарозна гел-електрофореза и чрез PCR за детекция на човешкия β -глобинов ген доказаха, че изолираната ДНК е фрагментирана и негодна за молекулярен анализ.

За следващите изследвания бяха използвани “свежи” клинични материали. От МБАЛББ “Св. София” бяха получени кръв, биопсия и БАЛ от 44 пациента постъпили в болницата за уточняване на диагноза. От тях 15 бяха диагностицирани със саркоидоза (Таблица 1; фиг.7). ДНК от клиничните материали на всички пациенти беше изолирана, аликвотирана и замразена, като по този начин бе създадена колекция от ДНК-и за настоящи и бъдещи молекулярни изследвания. Протоколът използван в лабораторията за екстракция на ДНК от кръв беше модифициран така, че да се намали количеството на човешката ДНК и РНК и да се повиши чистотата на изолираната ДНК ($A_{260}/A_{280} \geq 1.8$), за да се постигнат по-добри резултати при секвениране.

Кръв и биопсичен материал от четирима пациента със саркоидоза бяха анализирани чрез таргетно 16S и 18S рДНК секвениране. Резултатите показаха, че доминиращи бактериални типове в кръвта и биопсиите бяха Proteobacteria, Firmicutes и Bacteroidetes (фиг. 36A), а от гъбичките доминиращи бяха представителите на типове Ascomycota Basidiomycota и Mucoromycota (Фиг 36B). Към момента в научната литература не бяха открити проучвания изучаващи паралелно микробното изобилие на кръвния и тъканен микробиом при саркоидоза. В нашето пилотно изследване наблюдавахме оформяне на характеристичен микробен профил на белодробната тъкан и характеристичен микробен профил на кръвта, но не беше открито клъстериране между кръвните и биопсични проби от един и същ пациент със саркоидоза (фиг. 37).

Проведените PCR анализи, целящи доказване на *C. acnes* в изследваните проби от пациенти със саркоидоза, дадоха положителен резултат в 24 от изследваните 35 проби. Последното беше потвърдено и от случайно метагеномно секвениране. Възможността, амплифицираната ДНК в пробите да е следствие от замърсяване, наложи да бъде проведено паралелно имунохистохимично доказване на *C. acnes* в два засегнати от саркоидоза лимфни възела. Използвахме моноклонално антитяло РАВ за имунохистохимия. РАВ реактивни структури бяха открити в грануломите на изследвани лица. Предстои провеждане на ИХХ с антитялото РАВ при всички изследвани пациенти и на база комбиниране на молекулярни и имунологични методи да бъде направено заключение до каква степен *C. acnes* има отношение към патогенезата на саркоидозата в България.

Същите материали (n=35), бяха изследвани с PCR за *M. tuberculosis complex*, но всички реакции бяха отрицателни. При повторно изследване, но с родово специфични праймери, бяха отчетени 17 положителни проби. Тези резултати бяха потвърдени и чрез случайно метагеномно секвениране и сочат, че *M. tuberculosis* няма пряка връзка с етиологията на саркоидоза при изследваната група пациенти. Възможността за влияние на атипични микобактерии трябва да бъде допълнително проучена.

Чрез случайното метагеномно секвениране на саркоидните проби бяха открити голям брой секвенции за паразита *T. gondii*. При повторното изследване на материалите чрез PCR с праймери Tg1 и Tg2 беше отчетена амплификация, но продуктът беше по-къс с около 70 н.б. от очакваното (фиг. 40). Възможно е това да се дължи на не пълна специфичност на праймерите към B1 гена на *T. gondii* и намножената ДНК да е човешка. Това ще бъде уточнено след секвениране на PCR продуктите, които се пазят замразени.

За да проучим жизненият цикъл на кръвната микробиота, приложихме техника за култивиране на кръв при стресови условия - 43°C и 1mg/ml витамин К. За визуализация на резултата, използвахме комбинация от светлинни и електронно-микроскопски методи. Експериментите проведени с цяла и лизирана кръв от пациенти със саркоидоза и здрави доброволци показаха, че кръвта притежава разнообразен по морфология микробиом с атипични механизми на пролиферация. Във фракцията от периферни мононуклеарни клетки от здрав доброволец, наблюдавахме микробни структури притежаващи добре

дефинирана клетъчна стена, които пролиферират чрез пъпкуване или чрез механизъм, подобен на екструзията на прогениторни (потомствени) тела.

За разлика от това, в култивираната при стресови условия, лизирана кръв от здрави лица, пролиферацията на микробиома наподобяваше на L-формените микроорганизми с образуване на електронно-плътни или електронно-прозрачни тела. Електронно плътните тела се размножават чрез пъпкуване, произвеждат грам-отрицателно оцветени потомствени клетки подредени във верижки или се уголемяват и пръскат, за да освободят прогениторни клетки с размер 180 – 200 nm. От друга страна, електронно-прозрачните тела нарастват и освобождават потомствени клетки от различни места на клетъчната мембрана. Наблюдавахме нов механизъм на пролиферация на кръвната микробиота, наречен от нас „клетка в клетката“. Той съчетава пролиферация на прогениторни клетки в рамките на друга прогениторна клетка, която расте в клетката „майка“.

Съществуват сходства, но и различия между култивираната цяла кръв на пациентите със саркоидоза и лизираната и култивирана кръв от здравите доброволци. Това вероятно се дължи на спецификата на заболяването и малкият брой изследвани саркоидни материали. В култивираната цяла саркоидна кръв също наблюдавахме големи “майчини” структури, освобождаващи прогениторни клетки. Открити бяха и разнообразни по морфология клетки, свързани чрез фибриларни структури. Освен микроскопски, култивируемостта на кръвта беше доказана и чрез таргтно 16S секвениране на нативна и култивирана кръв на пациент със саркоидоза.

На база на изложените резултати, бяха направени следните изводи:

1. Фиксираните с формалин и включени в парафин тъканни проби не са подходящ модел за молекулярно-биологично изследване на патогенезата на саркоидозата.

2. Доказахме, че 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 се пръскат, като отделят прогениторни клетки с размери 180 – 200 nm.

4. Наблюдавахме нов механизъм на размножаване наречен от нас „клетка в клетка“, “a cell within a cell”.

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

6. Наблюдавахме 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.

Въпреки многобройните и задълбочени проучвания на специалисти от различни области на медицината (клиницисти, патолози, микробиолози, имунолози, епидемиолози), саркоидозата продължава да бъде загадка. Някои от въпросите останали без отговор са: Защо има расови и географски различия на клиничните форми и прояви при саркоидоза? Защо симптоматиката е толкова неспецифична и различна? Защо при едни пациенти заболяването протича самоограничаващо се със спонтанна ремисия, а при други хронифицира и води до тежки органни увреждания? От какво зависи в кои органи ще се развие грануломатозният процес? Кой е етиологичният причинител на заболяването? Вероятно отговорът на последния въпрос ще помогне за осветляване на всички неизвестни около саркоидозата. Работата ни в посока търсене на този отговор продължава.

VI. Приноси

От проведените изследвания могат да бъдат направени следните фундаментални и научно-практически изводи:

Фундаментални приноси

1. Електронномикроскопски кръвните микробиоти притежават електронно плътна и електронно прозрачна компонента, която предстои да бъде изучена.

2. Доказахме няколко механизма на размножаване на кръвните микробиоти, чрез пъпкуване, формиране на верижки, или отлюспване (екструзия).

3. Доказахме нов механизъм на размножаване наречен от нас „клетка в клетка“, “a cell within a cell”.

4. Микробиомният профил на кръвта е специфичен и се различава от този на белодробната тъкан при болни от саркоидоза.

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

Научно-практически приноси

1. Разработихме надежден метод за екстракция на ДНК от кръвната микробиота в култивирана и некултивирана кръв.

2. Фиксираните с формалин и включени в парафин тъканни проби не са подходящ модел за молекулярно-биологично изследване на патогенезата на саркоидозата.

3. Микобактериите, *Cutibacterium acnes* и *Toxoplasma gondii* имат отношение към патогенезата на саркоидозата. Тази роля изисква допълнителни проучвания.

4. Съчетаването на методите за целогеномно секвениране, биоинформатичен анализ и имунохистохимия е подходящо за изследване на белодробните мултисистемни грануломатозни заболявания.

Справка за публикации, доклади и постери свързани с темата на дисертационния труд

I. Публикации по темата на дисертацията:

1. **Б. Цафарова.** Етиология на саркоидозата: Възможно участие на *Cutibacterium acnes* и *Mycobacterium spp* в патогенезата на заболяването. Медицински преглед, бр. 1, 2021г.
2. **Tsafarova, B.** SARCOIDOSIS. PROBLEMS of Infectious and Parasitic Diseases, 2021, 49(1), 32–36. https://pipd.ncipd.org/index.php/pipd/article/view/49-1-5_sarcoidosis
3. **Б. Цафарова, С. Иванова, Й. Ходжев, В. Толчков, Н. Янев, Д. Костадинов, В. Юркова, В. Миланов, С. Панайотов.** Отрицателни резултати за *Mycobacterium tuberculosis* и *Cutibacterium acnes* при анализ на включени в парафин тъканни проби

H-index 6, Q4

от пациенти с туберкулоза и саркоидоза – Обща медицина, 24, 2022, № 3, 11-18,

SJR 0,1, H-index 3, Q4

4. **Tsafarova, B.**, Hodzhev, Y., Yordanov, G., Tolchkov, V., Kalfin, R., & Panaiotov, S. Morphology of blood microbiota in healthy individuals assessed by light and electron microscopy. 2023. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 12, 1091341.

<https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.1091341>

IF 6.037, SJR 1.39, H-index 87, Q1 (2 цит.)

5. Panaiotov S., Hodzhev Y., **Tsafarova B.**, Tolchkov V., Kalfin R. Culturable and Non-Culturable Blood Microbiota of Healthy Individuals. *Microorganisms* 9(7):1464, 2021.

<https://doi.org/10.3390/microorganisms9071464>.

IF 4.167, SJR 0.91 H-index 66, Q2. (10 цит.)

6. Hodzhev, Y., **Tsafarova, B.**, Tolchkov, V., Youroukova, V., Ivanova, S., Kostadinov, D., Yanev, N., Zhelyazkova, M., Tsonev, S., Kalfin, R., & Panaiotov, S. (2023).

Visualization of the individual blood microbiome to study the etiology of sarcoidosis. *Computational and structural biotechnology journal*, 22, 50–57.

<https://doi.org/10.1016/j.csbj.2023.10.027>

IF 6.155, H-index 65, SJR 1.58, Q1

7. Hodzhev Y, **Tsafarova B**, Tolchkov, Youroukova V, Ivanova S, Kostadinov D, Yanev N, Panaiotov. Decoding microbiome dysbiosis through metagenomic alpha diversity.

Implications for sarcoidosis aetiology. *Problems of Infectious and Parasitic Diseases*.

Приета за печат за 2023.

H-index 6, Q4

Също публикуван постер от международен конгрес и цитиран в международно реферирано списание

1. Hodzhev Y, **Tsafarova B**, Tolchkov V, Panaiotov S. Relations between blood and tissue microbiome in sarcoidosis patients. *ERJ Open Res* 8: 215, 2022.

doi:10.1183/23120541.LSC-2022.215. постер. Приложен е пълен текст.

IF 4.6, SJR 1.3, H-index 35, Q1

Цитиран от:

Kim J, Lee S, Moodley Y, Yagnik L, Birnie D, Dwivedi G. The role of the host-microbiome and metabolomics in sarcoidosis. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2023 Nov 1;325(5):C1336-C1353. doi: 10.1152/ajpcell.00316.2023.

Общо импакт фактор: 16.359 (20.959)

Цитирания: 13

II. Доклади и постери от конгресни участия

1) Участие в международни научни форуми

- По темата на дисертацията:

1. **Borislava Tsafarova**, Yordan Hodzhev. Gene orthologs of Cutibacterium acnes virulence-associated proteins with a potential role in the aetiology of sarcoidosis. EMBO virtual Workshop Predicting evolution, 14-16 June 2021.
2. **B. Tsafarova**, Y. Hodzhev, V. Tolchkov, S. Panaiotov. Main hypotheses about the etiology of sarcoidosis. Joint Forum: 11th South-East European Conference of Chemotherapy, Infections and Cancer and 31st Annual Assembly of International Medical Association Bulgaria. 28-31 October 2021, Medical University-Plovdiv, Bulgaria.
3. Y. Hodzhev, **B. Tsafarova**, V. Tolchkov, S. Panaiotov. Blood microbiome: whole genome sequencing data visualization in sarcoidosis. EMBL - Visualizing Biological Data (VIZBI2021) 24 – 26.03.2021. <https://vizbi.org/Posters/2021/vD03>
4. Y. Hodzhev, **B. Tsafarova**, V. Tolchkov, Stefan Panaiotov. Sarcoidosis related granuloma formation gene orthologs across lung microbiota. 31st European Conference of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), 9-12 July 2021
5. Y. Hodzhev, **B. Tsafarova**, V. Tolchkov, Stefan Panaiotov. Bioinformatic identification of orthologous granuloma formation genes in Cutibacterium acnes associated with sarcoidosis. Oral presentation. European Respiratory Society (ERS) International Congress (Virtual) 5-8 September 2021 г.
6. Y. Hodzhev, **B. Tsafarova**, V. Tolchkov, S. Panaiotov. Blood Microbiome Analysis in Sarcoidosis. Joint Forum: 11th South-East European Conference of Chemotherapy, Infections and Cancer and 31st Annual Assembly of International Medical Association Bulgaria. 28-31 October 2021, Medical University-Plovdiv, Bulgaria.
7. „Comparison of Blood and Lung Biopsy Core Microbiome Profiles of Patients with Lung Carcinoma“ **B. Tsafarova**, Y. Hodzhev, V. Tolchkov, N. Yanev, V. Youroukova, S. Ivanova, V. Milanov, D. Kostadinov, S. Panaiotov. ERS – Barselona 04-06.09.2022.
8. Yordan Hodzhev, **Borislava Tsafarova**, Vladimir Tolchkov, Stefan Panaiotov, Relations between blood and tissue microbiome in sarcoidosis patients. ERS Lung Conference, Eshtoril March 2022.
9. Yordan Hodzhev, **Borislava Tsafarova**, Vladimir Tolchkov, Nikolay Yanev, Natalia Gabrovska, Silvia Ivanova, Dimitar Kostadinov, Stefan Panaiotov. Lung carcinoma microbiome evaluation based on blood and tissue metagenome sequencing. 32nd European Congress of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, Lisbon, Portugal from April 23-26 -ECMID International Congress 2022.
10. Yordan Hodzhev, **Borislava Tsafarova**, Vladimir Tolchkov, Nikolay Yanev, Vania Youroukova Silvia Ivanova, Dimitar Kostadinov, Stefan Panaiotov. The Microbiome and

the Lung Tumor Growth. Visualizing Biological Data - VIZBI 2022
<https://vizbi.org/Posters/2022/vA05>

11. Y. Hodzhev, **B. Tsafarova**, V. Tolchkov, N. Yanev, V. Youroukova, S. Ivanova, V. Milanov, D. Kostadinov, S. Panaiotov. Metagenomic profile of blood microbiome associated with pulmonary sarcoidosis.” ECCMID 2023, Copenhagen, Denmark 15-18.04.23.
12. Y. Hodzhev, **B. Tsafarova**, V. Tolchkov, R. Kalfin, S. Panaiotov. What does the ratio between blood bacterial and fungal microbiomes abundance tell us about fungal-bacterial interactions? Implications for microbiome modulation by gender and blood group biological factors. HCMPH 2023. 5th Annual Harvard Chan Microbiome in Public Health Center symposium. 15.05.23. Boston, USA.
13. Y. Hodzhev, **B. Tsafarova**, V. Tolchkov, N. Yanev, V. Youroukova, S. Ivanova, D. Kostadinov, S Panaiotov. Bronchoalveolar lavage (BAL) and lung tissue biopsy (LTB) microbiomes in sarcoidosis patients. 7th European Congress for Bronchology and Interventional Pulmonology (ECBIP2023) and XXVII National Congress of the Spanish Association of Respiratory Endoscopy and Interventional Pulmonology (AEER2023) from May 11 to 13, 2023 in Madrid, Spain
14. Y. Hodzhev, **B. Tsafarova**, V. Tolchkov, N. Yanev, V. Youroukova, S. Ivanova, D. Kostadinov, S. Panaiotov. Comparison of bronchoalveolar lavage (BAL) and lung tissue biopsy (LTB) procedures in the evaluation of respiratory tract microbiota in sarcoidosis (ID 101). 4th International World of Microbiome Conference. 26-28 October 2023, Sofia, Bulgaria
15. Y. Hodzhev, **B. Tsafarova**, V. Tolchkov, S. Panaiotov. Individual and geographic specificities of the human blood microbiome (ID 218). 4th International World of Microbiome Conference. 26-28 October 2023, Sofia, Bulgaria
16. **B. Tsafarova**, Y. Hodzhev, V. Tolchkov, N. Yanev, V. Youroukova, S. Ivanova, D. Kostadinov, S. Panaiotov. Resuscitation of blood microbiota in a sarcoidosis patient confirmed by transmission electron microscopy and 16s rDNA sequencing (ID 130). 4th International World of Microbiome Conference. 26-28 October 2023, Sofia, Bulgaria

2) Участие в национални научни форуми по темата на дисертацията:

1. **Б. Цафарова**, С. Иванова, Н. Янев, Д. Костадинов, Й. Ходжев, В. Толчков, В. Юрукова, С. Панайотов. „Отрицателни резултати при анализ на тъканни проби включени в парафин за *Mycobacterium tuberculosis* и *Cutibacterium acnes*.“19-ти Национален конгрес по клинична микробиология и инфектология на българската асоциация на микробиолозите. 14-16 септември 2021, София, България.
2. С. Панайотов, **Б. Цафарова**, Й. Ходжев, В. Толчков, Р. Калфин. Телцата на Хайнц имат предполагаем микробен произход. 19-ти Национален конгрес по клинична

микробиология и инфектология на българската асоциация на микробиолозите. 14-16 септември 2021, София, България.

3. Y. Hodzhev, **B. Tsafarova**, V. Tolchkov, S. Panaiotov. Metagenome Visualization and Analysis of Environmental and Host Microbiome Communities. Климентови дни 5 Ноември 2021 г., Биологически факултет на СУ “Св. Климент Охридски”, България
4. **Борислава Цафарова**, Йордан Ходжев, Владимир Толчков, Ваня Юрукова, Силвия Иванова, Димитър Костадинов, Николай Янев, Любомира Григорова, Стефан Панайотов. Проучване на микробната етиология на саркоидозата чрез таргетно 16S и 18S метагеномно секвениране на кръвни и биопсични проби. XX Национален конгрес по клинична микробиология и инфекции на БАМ – Пловдив 16-18.09.2022.
5. **B. Tsafarova**, Y. Hodzhev, V. Tolchkov, V. Youroucova, S. Ivanova, D. Kostadinov, N. Yanev, S. Panaiotov. PCR analysis for Mycobacterium tuberculosis complex shows negative results in sarcoid samples XV Национален конгрес на българските микробиолози с международно участие – Копривщица 05-08.10.2022.
6. Й. Ходжев, **Б. Цафарова**, В. Толчков, Н. Янев, С. Иванова, Д. К., В. Ю., С. Панайотов. Динамичен модел на микробиомна дизбиоза на кръвта при белодробна саркоидоза. XX Национален конгрес по клинична микробиология и инфекции на БАМ (16 - 18.09.2022), Пловдив.
7. Й. Ходжев, **Б. Цафарова**, В. Толчков, В. Юрукова, С. Иванова, Д. Костадинов, Н. Янев, Л. Григорова, С. Панайотов. Профилиране на кръвния микробиом при пациенти с белодробна саркоидоза: моделиране на микробиомната дисбиоза в момента на настъпване на заболяването. Осми конгрес на българското белодробно дружество по белодробни болести, 13-16.10.2022, Варна

Сумарно за докторант Борислава Цафарова:

Научни публикации по темата на дисертацията	6
Научни публикации извън темата на дисертацията	3
Общо научни публикации:	9
Участия в международни научни форуми с постер или презентация по темата на дисертацията	16
Общо участия в международни научни форуми:	20
Участия в национални научни форуми с постер или презентация по темата на дисертацията	7
Общо участия в национални научни форуми:	9

Общ брой кредитни точки за периода на докторантурата - 10.2020 - 10.2023: 747 т.

Участия като изпълнител в изследователски проекти:

1. „Разпространение и еволюция на ендемичен мултирезистентен генотип на *Mycobacterium tuberculosis* (SIT41, подгрупа TUR) в България, ФНИ - ДН13/4 от 15.12.2017, приключил март 2022 г., ръководител: проф. Стефан Панайотов
2. “Пещерите, като резервоар на нови и отново възникващи зоонози - екологично проследяване и метагеномен анализ в реално време” – договор ФНИ КП-06-ПН-51/8.
3. Национална научна програма „ВИХРЕН”, 2020 – 2025, проект „SARCOIDOSIS”, ФНИ - КП-06-ДВ/10 – ръководител: Проф. Стефан Панайотов
4. „Фундаментални, транслиращи и клинични изследвания в областта на инфекциите и инфекциозната имунология“ - Европейския фонд за регионално развитие чрез Оперативна програма „Наука и образование за интелигентен растеж“ 2014-2020, договор BG05M2OP001-1.002-0001-C04
5. „Формиране и структурен анализ на еритроцитните грануларни телца“ – ФНИ КП-06-Н73/5 -5.12.2023 – Ръководител: проф. Стефан Панайотов

Цитирани литературни източници

- Akimoto, J., Nagai, K., Ogasawara, D., Tanaka, Y., Izawa, H., Kohno, M., Uchida, K., & Eishi, Y. (2017). Solitary tentorial sarcoid granuloma associated with *Propionibacterium acnes* infection: case report. *Journal of neurosurgery*, 127(3), 687–690. <https://doi.org/10.3171/2016.8.JNS16480>
- Almenoff, P. L., Johnson, A., Lesser, M., & Mattman, L. H. (1996). Growth of acid fast L forms from the blood of patients with sarcoidosis. *Thorax*, 51(5), 530–533. <https://doi.org/10.1136/thx.51.5.530>
- Alonso, R., Pisa, D., & Carrasco, L. (2019). Brain Microbiota in Huntington's Disease Patients. *Frontiers in microbiology*, 10, 2622. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02622>
- Amar, S., & Engelke, M. (2015). Periodontal innate immune mechanisms relevant to atherosclerosis. *Molecular oral microbiology*, 30(3), 171–185. <https://doi.org/10.1111/omi.12087>
- Asakawa, N., Uchida, K., Sakakibara, M., Omote, K., Noguchi, K., Tokuda, Y., Kamiya, K., Hatanaka, K. C., Matsuno, Y., Yamada, S., Asakawa, K., Fukasawa, Y., Nagai, T., Anzai, T., Ikeda, Y., Ishibashi-Ueda, H., Hirota, M., Orii, M., Akasaka, T., Uto, K., ... Eishi, Y. (2017). Immunohistochemical identification of *Propionibacterium acnes* in granuloma and inflammatory cells of myocardial tissues obtained from cardiac sarcoidosis patients. *PloS one*, 12(7), e0179980. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179980>
- Barnard, J., Rose, C., Newman, L., Canner, M., Martyny, J., McCammon, C., Bresnitz, E., Rossman, M., Thompson, B., Rybicki, B., Weinberger, S. E., Moller, D. R., McLennan, G., Hunninghake, G., DePalo, L., Baughman, R. P., Iannuzzi, M. C., Judson, M. A., Knatterud, G. L., Teirstein, A. S., ... ACCESS Research Group (2005). Job and industry classifications associated with sarcoidosis in A Case-Control Etiologic Study of Sarcoidosis (ACCESS). *Journal of occupational and environmental medicine*, 47(3), 226–234. <https://doi.org/10.1097/01.jom.0000155711.88781.9>
- Becker, A., Vella, G., Galata, V., Rentz, K., Beisswenger, C., Herr, C., Walter, J., Tierling, S., Slevogt, H., Keller, A., & Bals, R. (2019). The composition of the pulmonary microbiota in sarcoidosis - an observational study. *Respiratory research*, 20(1), 46. <https://doi.org/10.1186/s12931-019-1013-2>

- Beijer, E., Seldenrijk, K., Eishi, Y., Uchida, K., Damen, J., Grutters, J. C., & Veltkamp, M. (2021). Presence of *Propionibacterium acnes* in granulomas associates with a chronic disease course in Dutch sarcoidosis patients. *ERJ open research*, 7(1), 00486-2020. <https://doi.org/10.1183/23120541.00486-2020>
- Bénard, M., Schapman, D., Lebon, A., Monterroso, B., Bellenger, M., Le Foll, F., Pasquier, J., Vaudry, H., Vaudry, D., & Galas, L. (2015). Structural and functional analysis of tunneling nanotubes (TnTs) using gCW STED and gconfocal approaches. *Biology of the cell*, 107(11), 419–425. <https://doi.org/10.1111/boc.201500004>
- Berg, R. D. (1999). Bacterial translocation from the gastrointestinal tract. *Advances in experimental medicine and biology*, 473, 11–30. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-4143-1_2
- Carapetis, J. R., Beaton, A., Cunningham, M. W., Guilherme, L., Karthikeyan, G., Mayosi, B. M., Sable, C., Steer, A., Wilson, N., Wyber, R., & Zühlke, L. (2016). Acute rheumatic fever and rheumatic heart disease. *Nature reviews. Disease primers*, 2, 15084. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.84>
- Castillo, D. J., Rifkin, R. F., Cowan, D. A., & Potgieter, M. (2019). The Healthy Human Blood Microbiome: Fact or Fiction? *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 9, 449041. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00148>
- Cebriá-Mendoza, M., Arbona, C., Larrea, L., Díaz, W., Arnau, V., Peña, C., Bou, J. V., Sanjuán, R., & Cuevas, J. M. (2021). Deep viral blood metagenomics reveals extensive anellovirus diversity in healthy humans. *Scientific reports*, 11(1), 6921. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-86427-4>
- Clarke, E. L., Lauder, A. P., Hofstaedter, C. E., Hwang, Y., Fitzgerald, A. S., Imai, I., Biernat, W., Rękawiecki, B., Majewska, H., Dubaniewicz, A., Litzky, L. A., Feldman, M. D., Bittinger, K., Rossman, M. D., Patterson, K. C., Bushman, F. D., & Collman, R. G. (2018). Microbial Lineages in Sarcoidosis. A Metagenomic Analysis Tailored for Low-Microbial Content Samples. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 197(2), 225–234. <https://doi.org/10.1164/rccm.201705-0891OC>
- Davis, D. M., & Sowinski, S. (2008). Membrane nanotubes: dynamic long-distance connections between animal cells. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 9(6), 431–436. <https://doi.org/10.1038/nrm2399>
- Diez-Silva, M., Dao, M., Han, J., Lim, C. T., & Suresh, S. (2010). Shape and Biomechanical Characteristics of Human Red Blood Cells in Health and Disease. *MRS bulletin*, 35(5), 382–388. <https://doi.org/10.1557/mrs2010.571>
- Dimova, T., Dimitrova, V., Grozdanov, P., & Markova, N. (2023). Placenta of BCG-Vaccinated Women in early Pregnancy is Colonized with Non-Immunogenic Mycobacterial L-forms. *American journal of reproductive immunology (New York, N.Y. : 1989)*, 89(1), e13650. <https://doi.org/10.1111/aji.13650>
- Domingue, G. J. (1995). Electron dense cytoplasmic particles and chronic infection: a bacterial pleomorphism hypothesis. *Endocytobiosis Cell. Res.* 11, 19–40.
- Domingue, G. J., Thomas, R., Walters, F., Serrano, A., & Heidger, P. M., Jr (1993). Cell wall deficient bacteria as a cause of idiopathic hematuria. *The Journal of urology*, 150(2 Pt 1), 483–485. [https://doi.org/10.1016/s0022-5347\(17\)35523-4](https://doi.org/10.1016/s0022-5347(17)35523-4)
- Domingue, G. J., Sr, & Woody, H. B. (1997). Bacterial persistence and expression of disease. *Clinical microbiology reviews*, 10(2), 320–344. <https://doi.org/10.1128/CMR.10.2.320>
- Dubey, G. P., & Ben-Yehuda, S. (2011). Intercellular nanotubes mediate bacterial communication. *Cell*, 144(4), 590–600. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.01.015>
- Ducret, A., Fleuchot, B., Bergam, P., & Mignot, T. (2013). Direct live imaging of cell-cell protein transfer by transient outer membrane fusion in *Myxococcus xanthus*. *eLife*, 2, e00868. <https://doi.org/10.7554/eLife.00868>

Eishi, Y. (2013). Etiologic link between sarcoidosis and *Propionibacterium acnes*. *Respiratory investigation*, 51(2), 56-68.

Eishi, Y., Suga, M., Ishige, I., Kobayashi, D., Yamada, T., Takemura, T., Takizawa, T., Koike, M., Kudoh, S., Costabel, U., Guzman, J., Rizzato, G., Gambacorta, M., du Bois, R., Nicholson, A. G., Sharma, O. P., & Ando, M. (2002). Quantitative analysis of mycobacterial and propionibacterial DNA in lymph nodes of Japanese and European patients with sarcoidosis. *Journal of clinical microbiology*, 40(1), 198–204. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.1.198-204.2002>

Emery, D. C., Cerajewska, T. L., Seong, J., Davies, M., Paterson, A., J., S., & West, N. X. (2021). Comparison of Blood Bacterial Communities in Periodontal Health and Periodontal Disease. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10, 577485. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.577485>

Errington J. (2017). Cell wall-deficient, L-form bacteria in the 21st century: a personal perspective. *Biochemical Society transactions*, 45(2), 287–295. <https://doi.org/10.1042/BST20160435>

Errington, J., Mickiewicz, K., Kawai, Y., & Wu, L. J. (2016). L-form bacteria, chronic diseases and the origins of life. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 371(1707), 20150494. <https://doi.org/10.1098/rstb.2015.0494>

Esteves, T., Aparicio, G., & Garcia-Patos, V. (2016). Is there any association between Sarcoidosis and infectious agents?: a systematic review and meta-analysis. *BMC pulmonary medicine*, 16(1), 165. <https://doi.org/10.1186/s12890-016-0332-z>

Fernandes, P. B., & Panos, C. (1977). Wall-less microbial isolate from a human renal biopsy. *Journal of clinical microbiology*, 5(1), 106–107. <https://doi.org/10.1128/jcm.5.1.106-107.1977>

Fukui, S., Morimoto, S., Ichinose, K., Nakashima, S., Ishimoto, H., Hara, A., Kakugawa, T., Sakamoto, N., Tsuji, Y., Aramaki, T., Koga, T., Kawashiri, S. Y., Iwamoto, N., Tamai, M., Nakamura, H., Origuchi, T., Ueki, Y., Suzuki, S., Mukae, H., & Kawakami, A. (2020). Comparison of lung microbiota between antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis and sarcoidosis. *Scientific reports*, 10(1), 9466. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-66178-4>

Gautreaux, M. D., Deitch, E. A., & Berg, R. D. (1994). Bacterial translocation from the gastrointestinal tract to various segments of the mesenteric lymph node complex. *Infection and immunity*, 62(5), 2132–2134. <https://doi.org/10.1128/iai.62.5.2132-2134.1994>

Gazouli, M., Ikonomopoulos, J., Trigidou, R., Foteinou, M., Kittas, C., & Gorgoulis, V. (2002). Assessment of mycobacterial, propionibacterial, and human herpesvirus 8 DNA in tissues of greek patients with sarcoidosis. *Journal of clinical microbiology*, 40(8), 3060–3063. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.8.3060-3063.2002>

Goto, H., Usui, Y., Umazume, A., Uchida, K., & Eishi, Y. (2017). *Propionibacterium acnes* as a possible pathogen of granuloma in patients with ocular sarcoidosis. *The British journal of ophthalmology*, 101(11), 1510–1513. <https://doi.org/10.1136/bjophthalmol-2016-309248>

Go Raya, M. U., Li, R., Mannan, A., Gu, L., Deng, H., & Wang, G. (2022). Human circulating bacteria and dysbiosis in non-infectious diseases. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12, 932702.

Gorham, E. D., Garland, C. F., Garland, F. C., Kaiser, K., Travis, W. D., & Centeno, J. A. (2004). Trends and occupational associations in incidence of hospitalized pulmonary sarcoidosis and other lung diseases in Navy personnel: a 27-year historical prospective study, 1975-2001. *Chest*, 126(5), 1431–1438. <https://doi.org/10.1378/chest.126.5.1431>

Grunewald, J., & Eklund, A. (2007). Role of CD4+ T cells in sarcoidosis. *Proceedings of the American Thoracic Society*, 4(5), 461–464. <https://doi.org/10.1513/pats.200606-130MS>

Grunewald, J., Grutters, J. C., Arkema, E. V., Saketkoo, L. A., Moller, D. R., & Müller-Quernheim, J. (2019). Sarcoidosis. *Nature reviews. Disease primers*, 5(1), 45. <https://doi.org/10.1038/s41572-019-0096-x>

Gupta, D., Agarwal, R., Aggarwal, A. N., & Jindal, S. K. (2007). Molecular evidence for the role of mycobacteria in sarcoidosis: a meta-analysis. *The European respiratory journal*, 30(3), 508–516. <https://doi.org/10.1183/09031936.00002607>

Gupta, D., Agarwal, R., & Aggarwal, A. N. (2013). Seasonality of sarcoidosis: the 'heat' is on.... *Sarcoidosis, vasculitis, and diffuse lung diseases : official journal of WASOG*, 30(3), 241–243.

Hägmark, A., Hamsten, C., Wiklundh, E., Lindskog, C., Mattsson, C., Andersson, E., Lundberg, I. E., Grönlund, H., Schwenk, J. M., Eklund, A., Grunewald, J., & Nilsson, P. (2015). Proteomic profiling reveals autoimmune targets in sarcoidosis. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 191(5), 574–583. <https://doi.org/10.1164/rccm.201407-1341OC>

Halling-Brown, M., Sansom, C. E., Davies, M., Titball, R. W., & Moss, D. S. (2008). Are bacterial vaccine antigens T-cell epitope depleted?. *Trends in immunology*, 29(8), 374–379. <https://doi.org/10.1016/j.it.2008.06.001>

Hammad, D., Hider, S. L., Liyanapathirana, V. C., & Tonge, D. P. (2020). Molecular characterization of circulating microbiome signatures in rheumatoid arthritis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 9, 440. doi: 10.3389/fcimb.2019.00440

Inaoka, P. T., Shono, M., Kamada, M., & Espinoza, J. L. (2019). Host-microbe interactions in the pathogenesis and clinical course of sarcoidosis. *Journal of biomedical science*, 26(1), 45. <https://doi.org/10.1186/s12929-019-0537-6>

Isshiki, T., Homma, S., Eishi, Y., Yabe, M., Koyama, K., Nishioka, Y., Yamaguchi, T., Uchida, K., Yamamoto, K., Ohashi, K., Arakawa, A., Shibuya, K., Sakamoto, S., & Kishi, K. (2021). Immunohistochemical Detection of *Propionibacterium acnes* in Granulomas for Differentiating Sarcoidosis from Other Granulomatous Diseases Utilizing an Automated System with a Commercially Available PAB Antibody. *Microorganisms*, 9(8), 1668. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9081668>

Isshiki, T., Matsuyama, H., Sakamoto, S., Honma, N., Mikami, T., Shibuya, K., Eishi, Y., & Homma, S. (2019). Development of *Propionibacterium acnes*-associated Sarcoidosis During Etanercept Therapy. *Internal medicine (Tokyo, Japan)*, 58(10), 1473–1477. <https://doi.org/10.2169/internalmedicine.2086-18>

Jalal, S., Nord, C. E., Lappalainen, M., Evengård, B., & ESCMID Study Group on Toxoplasmosis (2004). Rapid and sensitive diagnosis of *Toxoplasma gondii* infections by PCR. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 10(10), 937–939. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2004.00948.x>

Judson M. A. (2020). Environmental Risk Factors for Sarcoidosis. *Frontiers in immunology*, 11, 1340. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01340>

Kinoshita, Y., Ishii, H., Eishi, Y., Uchida, K., Yoshimura, M., Iwasaki, A., Fujita, M., Nabeshima, K., & Watanabe, K. (2020). Histological differences between sarcoidosis and lung cancer-related sarcoid reaction. *Respiratory investigation*, 58(5), 421–424. <https://doi.org/10.1016/j.resinv.2020.04.003>

Koren, O., Spor, A., Felin, J., Fåk, F., Stombaugh, J., Tremaroli, V., Behre, C. J., Knight, R., Fagerberg, B., Ley, R. E., & Bäckhed, F. (2011). Human oral, gut, and plaque microbiota in patients with atherosclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108 Suppl 1(Suppl 1), 4592–4598. <https://doi.org/10.1073/pnas.1011383107>

Korsten, P., Tampe, B., König, M., Nikiphorou, E. (2018). Sarcoidosis and autoimmune diseases: differences, similarities and overlaps. *Current Opinion in Pulmonary Medicine* 24(5), 504-512. DOI: 10.1097/MCP.0000000000000500

Lou, E., Fujisawa, S., Barlas, A., Romin, Y., Manova-Todorova, K., Moore, M. A., & Subramanian, S. (2012). Tunneling Nanotubes: A new paradigm for studying intercellular communication and therapeutics in cancer. *Communicative & integrative biology*, 5(4), 399–403. <https://doi.org/10.4161/cib.20569>

- Ma, L., Li, Y., Peng, J., Wu, D., Zhao, X., Cui, Y., Chen, L., Yan, X., Du, Y., & Yu, L. (2015). Discovery of the migrasome, an organelle mediating release of cytoplasmic contents during cell migration. *Cell research*, 25(1), 24–38. <https://doi.org/10.1038/cr.2014.135>
- Markova, N. (2017). L-form bacteria cohabitants in human blood: significance for health and diseases. *Discovery medicine*, 23(128), 305-313.
- Markova, N. (2020). Eubiotic vs. dysbiotic human blood microbiota: the phenomenon of cell wall deficiency and disease-trigger potential of bacterial and fungal L-forms. *Discovery Medicine*, 29(156), 17-26.
- Mandal, R., Jiang, T., Al-Rubaye, A., Rhoads, D., Wideman, R., Zhao, J., Pevzner, I., Kwon, Y.M. (2016). An investigation into blood microbiota and its potential association with bacterial chondronecrosis with osteomyelitis (BCO) in broilers. *Nature Scientific Reports*. 6, 25882. doi: 10.1038/srep25882
- McLaughlin, R. W., Vali, H., Lau, P. C., Palfree, R. G., De Ciccio, A., Sirois, M., Ahmad, D., Villemur, R., Desrosiers, M., & Chan, E. C. (2002). Are there naturally occurring pleomorphic bacteria in the blood of healthy humans?. *Journal of clinical microbiology*, 40(12), 4771–4775. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.12.4771-4775.2002>
- Meng, S., Chen, B., Yang, J., Wang, J., Zhu, D., Meng, Q., & Zhang, L. (2018). Study of Microbiomes in Aseptically Collected Samples of Human Breast Tissue Using Needle Biopsy and the Potential Role of *in situ* Tissue Microbiomes for Promoting Malignancy. *Frontiers in oncology*, 8, 318. <https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00318>
- Moller, D. R., Rybicki, B. A., Hamzeh, N. Y., Montgomery, C. G., Chen, E. S., Drake, W., & Fontenot, A. P. (2017). Genetic, Immunologic, and Environmental Basis of Sarcoidosis. *Annals of the American Thoracic Society*, 14(Supplement_6), S429–S436. <https://doi.org/10.1513/AnnalsATS.201707-565O>
- Nagata, K., Eishi, Y., Uchida, K., Yoneda, K., Hatanaka, H., Yasuhara, T., Nagata, M., Sotozono, C., & Kinoshita, S. (2017). Immunohistochemical Detection of Propionibacterium acnes in the Retinal Granulomas in Patients with Ocular Sarcoidosis. *Scientific reports*, 7(1), 15226. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15710-0>
- Negi, M., Takemura, T., Guzman, J., Uchida, K., Furukawa, A., Suzuki, Y., Iida, T., Ishige, I., Minami, J., Yamada, T., Kawachi, H., Costabel, U., & Eishi, Y. (2012). Localization of Propionibacterium acnes in granulomas supports a possible etiologic link between sarcoidosis and the bacterium. *Modern Pathology*, 25, 1284 – 1297.
- Nejman, D., Livyatan, I., Fuks, G., Gavert, N., Zwang, Y., Geller, L. T., Rotter-Maskowitz, A., Weiser, R., Mallel, G., Gigi, E., Meltzer, A., Douglas, G. M., Kamer, I., Gopalakrishnan, V., Dadosh, T., Levin-Zaidman, S., Avnet, S., Atlan, T., Cooper, Z. A., Arora, R., ... Straussman, R. (2020). The human tumor microbiome is composed of tumor type-specific intracellular bacteria. *Science (New York, N.Y.)*, 368(6494), 973–980. <https://doi.org/10.1126/science.aay9189>
- Newman, L. S., Rose, C. S., Bresnitz, E. A., Rossman, M. D., Barnard, J., Frederick, M., Terrin, M. L., Weinberger, S. E., Moller, D. R., McLennan, G., Hunninghake, G., DePalo, L., Baughman, R. P., Iannuzzi, M. C., Judson, M. A., Knatterud, G. L., Thompson, B. W., Teirstein, A. S., Yeager, H., Jr, Johns, C. J., ... ACCESS Research Group (2004). A case control etiologic study of sarcoidosis: environmental and occupational risk factors. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 170(12), 1324–1330. <https://doi.org/10.1164/rccm.200402-249OC>
- Païssé, S., Valle, C., Servant, F., Courtney, M., Burcelin, R., Amar, J., & Lelouvier, B. (2016). Comprehensive description of blood microbiome from healthy donors assessed by 16S targeted metagenomic sequencing. *Transfusion*, 56(5), 1138–1147. <https://doi.org/10.1111/trf.13477>

Panaiotov S, Hodzhev Y, Tsafarova B, Tolchkov V, Kalfin R. Culturable and Non-Culturable Blood Microbiota of Healthy Individuals. *Microorganisms*. 2021;9(7):1464. Published 2021 Jul 8. doi:10.3390/microorganisms9071464

Panaiotov, S. , Filevski, G. , Equestre, M. , Nikolova, E. and Kalfin, R. (2018) Cultural Isolation and Characteristics of the Blood Microbiome of Healthy Individuals. *Advances in Microbiology*, 8, 406-421. doi: 10.4236/aim.2018.85027

Pande, S., Shitut, S., Freund, L., Westermann, M., Bertels, F., Colesie, C., Bischofs, I. B., & Kost, C. (2015). Metabolic cross-feeding via intercellular nanotubes among bacteria. *Nature communications*, 6, 6238. <https://doi.org/10.1038/ncomms7238>

Pinzone, M. R., Celesia, B. M., Di Rosa, M., Cacopardo, B., & Nunnari, G. (2012). Microbial translocation in chronic liver diseases. *International journal of microbiology*, 2012, 694629. <https://doi.org/10.1155/2012/694629>

Pisa, D., Alonso, R., Rábano, A., Rodal, I., & Carrasco, L. (2015). Different Brain Regions are Infected with Fungi in Alzheimer's Disease. *Scientific reports*, 5, 15015. <https://doi.org/10.1038/srep15015>

Ponig, B., Domingue, G., & Schlegel, J. (1972). The role of in vitro induced microbial L-forms in experimental hematogenous pyelonephritis. *Investigative urology*, 9(4), 282–285.

Poore, G. D., Kopylova, E., Zhu, Q., Carpenter, C., Fraraccio, S., Wandro, S., Kosciolk, T., Janssen, S., Metcalf, J., Song, S. J., Kanbar, J., Miller-Montgomery, S., Heaton, R., McKay, R., Patel, S. P., Swafford, A. D., & Knight, R. (2020). Microbiome analyses of blood and tissues suggest cancer diagnostic approach. *Nature*, 579(7800), 567–574. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2095-1>

Potgieter, M., Bester, J., Kell, D. B., & Pretorius, E. (2015). The dormant blood microbiome in chronic, inflammatory diseases. *FEMS microbiology reviews*, 39(4), 567–591. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuv013>

Prozorovskii, S. V., Katz, L. N., Kagan, G. Y. (1981). L forms of bacteria: mechanism, formation, structure, role in pathogenicity. Moscow: Medicine Publishing, ISBN: ISBN: 50500-347.

Rathnaiah, G., Zinniel, D. K., Bannantine, J. P., Stabel, J. R., Gröhn, Y. T., Collins, M. T., & Barletta, R. G. (2017). Pathogenesis, Molecular Genetics, and Genomics of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, the Etiologic Agent of Johne's Disease. *Frontiers in veterinary science*, 4, 187. <https://doi.org/10.3389/fvets.2017.00187>

Rozas, M., Hart de Ruijter, A., Fabrega, M. J., Zorgani, A., Guell, M., Paetzold, B., & Brillet, F. (2021). From Dysbiosis to Healthy Skin: Major Contributions of Cutibacterium acnes to Skin Homeostasis. *Microorganisms*, 9(3), 628. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9030628>

Rustom, A., Saffrich, R., Markovic, I., Walther, P., & Gerdes, H. H. (2004). Nanotubular highways for intercellular organelle transport. *Science (New York, N.Y.)*, 303(5660), 1007–1010. <https://doi.org/10.1126/science.1093133>

Salihoğlu, R., & Önal-Süzek, T. (2021). Tissue Microbiome Associated With Human Diseases by Whole Transcriptome Sequencing and 16S Metagenomics. *Frontiers in genetics*, 12, 585556. <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.585556>

Sell S. Immunology Immunopathology and Immunity. Elsevier Science Publishing Company, Inc.; Washington, DC, USA: 1987. Granulomatous Reactions; pp. 529–544.

Seringec, N., Guncu, G., Arihan, O., Avcu, N., & Dikmenoglu, N. (2015). Investigation of hemorheological parameters in periodontal diseases. *Clinical hemorheology and microcirculation*, 61(1), 47–58. <https://doi.org/10.3233/CH-141892>

Schatten, W. E., Desprez, J. D., Holden, W. D. (1955). A bacteriologic study of portal-vein blood in man. *A.M.A. archives of surgery*, 71(3), 404–409. <https://doi.org/10.1001/archsurg.1955.01270150098011>

Soler, N., Marguet, E., Verbavatz, J. M., & Forterre, P. (2008). Virus-like vesicles and extracellular DNA produced by hyperthermophilic archaea of the order Thermococcales. *Research in microbiology*, 159(5), 390–399. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2008.04.015>

Suzuki, K., Hayano, Y., Nakai, A., Furuta, F., & Noda, M. (2016). Adrenergic control of the adaptive immune response by diurnal lymphocyte recirculation through lymph nodes. *The Journal of experimental medicine*, 213(12), 2567–2574. <https://doi.org/10.1084/jem.20160723>

Suzuki Y, Uchida K, Takemura T, Sekine M, Tamura T, Furukawa A, et al. (2018) *Propionibacterium acnes*-derived insoluble immune complexes in sinus macrophages of lymph nodes affected by sarcoidosis. *PLoS ONE* 13(2): e0192408. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192408>

Tchernev, G., Lotti, T., Cardoso, J. C., Kanazawa, N., Guarneri, C., & Wollina, U. (2014). Cancer, infection and disturbances of the integrity of tissue homeostasis: the most significant triggers for molecular mimicry and autoimmunity in dermatology?. *Wiener medizinische Wochenschrift (1946)*, 164(13-14), 245–246. <https://doi.org/10.1007/s10354-014-0280-2>

Valentonyte, R., Hampe, J., Huse, K., Rosenstiel, P., Albrecht, M., Stenzel, A., Nagy, M., Gaede, K. I., Franke, A., Haesler, R., Koch, A., Lengauer, T., Seegert, D., Reiling, N., Ehlers, S., Schwinger, E., Platzer, M., Krawczak, M., Müller-Quernheim, J., Schürmann, M., ... Schreiber, S. (2005). Sarcoidosis is associated with a truncating splice site mutation in BTNL2. *Nature genetics*, 37(4), 357–364. <https://doi.org/10.1038/ng1519>

Vientós-Plotts, A. I., Ericsson, A. C., Rindt, H., Grobman, M. E., Graham, A., Bishop, K., Cohn, L. A., & Reiner, C. R. (2017). Dynamic changes of the respiratory microbiota and its relationship to fecal and blood microbiota in healthy young cats. *PloS one*, 12(3), e0173818. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173818>

Visser, M. J., Kell, D. B., & Pretorius, E. (2019). Bacterial dysbiosis and translocation in psoriasis vulgaris. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 9, 7. doi: 10.3389/fcimb.2019.00007

Yang, G., Eishi, Y., Raza, A., Rojas, H., Achiriloaie, A., De Los Reyes, K., & Raghavan, R. (2018). *Propionibacterium acnes*-associated neurosarcoidosis: A case report with review of the literature. *Neuropathology : official journal of the Japanese Society of Neuropathology*, 38(2), 159–164. <https://doi.org/10.1111/neup.12411>

Zhao, M. M., Du, S. S., Li, Q. H., Chen, T., Qiu, H., Wu, Q., Chen, S. S., Zhou, Y., Zhang, Y., Hu, Y., Su, Y. L., Shen, L., Zhang, F., Weng, D., & Li, H. P. (2017). High throughput 16SrRNA gene sequencing reveals the correlation between *Propionibacterium acnes* and sarcoidosis. *Respiratory research*, 18(1), 28. <https://doi.org/10.1186/s12931-017-0515-z>

Ziegenhagen, M. W., & Müller-Quernheim, J. (2003). The cytokine network in sarcoidosis and its clinical relevance. *Journal of internal medicine*, 253(1), 18–30. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2796.2003.01074.x>

Zissel, G., & Müller-Quernheim, J. (2016). Specific antigen(s) in sarcoidosis: a link to autoimmunity?. *The European respiratory journal*, 47(3), 707–709. <https://doi.org/10.1183/13993003.01791-2015>

Summary

Sarcoidosis is a multisystemic inflammatory granulomatous disorder. Despite numerous studies, the etiology of sarcoidosis is still not fully understood. It is proposed that the disease is caused by an unknown antigen(s) in humans with abnormal immune response, and a genetic predisposition.

This Ph.D. thesis was focused on revealing the possible microbial involvement in sarcoidosis pathogenesis. A primary goal was to study the microbiome in sarcoid patients and control subjects by cultural, microscopic, and molecular techniques.

We observed clinical samples (blood, lung biopsy, and BAL) of 44 individuals suspected of sarcoidosis; blood from 7 healthy volunteers; and formalin-fixed paraffin-embedded tissue from patients with sarcoidosis (20) and tuberculosis (19). DNA for molecular analyses was extracted from each sample type. Next-generation sequencing was made to investigate tissue and blood microbiome in sarcoidosis. Conventional PCR was performed to detect *C. acnes*, *M. tuberculosis*, other mycobacteria, and *Toxoplasma gondii* in the examined sarcoid materials. The role of *C. acnes* in the etiology of sarcoidosis was further elucidated by immunohistochemistry with PAB antibody. The IHC was performed in the lymph nodes of two sarcoidosis patients. *C. acnes* was detected within the noncaseating granulomas of both patients.

The blood microbiome of sarcoidosis patients and healthy controls was investigated by culturing blood in normal and stressful conditions. TEM, SEM, light, and dark field microscopy were applied to study microbiota morphology and life cycle in cultured whole and lysed blood. We observed and described various proliferation mechanisms of the blood microbiota.

A relatively understudied area in sarcoidosis is the role of the blood and tissue microbiome in the pathogenesis of the disease. To date, the blood microbiome in sarcoidosis has not been investigated. The fact that sarcoidosis can be found in different body parts and organs of the same person suggests that the causative agent is carried from one body location to another, via the blood or lymphatic system.

