



До Председателя на научно жури,
определено със заповед 582/01.12.23 на
Директора на НЦЗПБ

РЕЦЕНЗИЯ

от доц. д-р Таня Георгиева Димова, Институт по биология и
имунология на размножаването "акад. К. Братанов", Българска академия на
науките, София

на дисертационен труд за присъждане на образователната и научна степен „ДОКТОР”
по научна специалност "Микробиология", 4.3. Професионално направление Биологични
науки, Област на висше образование 4. Природни науки, математика и информатика

На редовен докторант Борислава Илиева Цафарова, отдел Микробиология,
НАЦИОНАЛЕН ЦЕНТЪР ПО ЗАРАЗНИ И ПАРАЗИТНИ БОЛЕСТИ, София

Тема на дисертационния труд: "Микробиологични, електронномикроскопски и
молекулярно-биологични методи за изследване на патогенезата при саркоидоза",
научен ръководител: **проф. Стефан Панайотов**, дн

Рецензията е изготвена в съответствие с изискванията на Закона за развитие на
академичния състав в Р България и Правилника за неговото приложение.

Актуалност и значимост на тематиката

Саркоидозата е рядко възпалително заболяване, характеризиращо се с развитие на
грануломи в различни органи, особено в белите дробове и лимфните възли. Клиниката на
заболяването до голяма степен зависи от засегнатия орган и може да варира от леки
симптоми до животозастрашаващи прояви. Въпреки значителния напредък през
последните две десетилетия в диагнозата, клиничната оценка и лечението на саркоидозата
за съжаление точната етиология на това заболяване остава неизвестна. Предполага се
инфекциозна етиология с участието на основно *M. tuberculosis* и *C. acnes*. Настоящи данни
сочат като възможни етиологични фактори генетично предразположение, също така
автоимунна реакция, тъй като симптомите и болките се облекчават в отговор на
кортикостероиди или имunosупресивни лекарства. Редица най-нови епидемиологични и
микробиологичните изследвания издигат хипотезата, че поне при част от пациентите
микробиотите или техни продукти могат да предизвикат имуноен отговор, водещ до
образуване на саркоиден гранулом. Цялата тази неяснота около етиологията на

заболяването силно аргументира изследванията - обект на настоящия дисертационен труд. Авторката е отделила подобаващо внимание и на българския принос в изучаването на това заболяване от д-р Емил Калфин, който е въвел модифициран метод за култивиране на кръвна микробиота, използван и в тази дисертация.

Характеристика и оценка на дисертационния труд

В дисертационния труд е проучена възможната инфекциозна етиология на саркоидозата и такава, базирана на микробиомен дисбаланс. Трудът е написан на 169 страници, има 42 фигури и 11 таблици и 213 литературни източника. Трудът е структуриран със следните раздели – Увод (1 стр.), Литературен обзор (36 стр.), Цел и задачи (1 стр.), Материали и методи (36 стр.), Резултати и дискусия (65 стр.), Заключение и изводи (1 стр.), Литература (21 стр.).

Литературният обзор е информативен и стегнат, оформен в отделни параграфи. Авторката запознава с разнообразната симптоматика на заболяването, както и неизяснената му етиология и патогенеза. Всичко това затруднява диагностиката на саркоидозата и логично мотивира настоящето изследване. В заключение е посочено сравнително слабо изследваната роля на микробиома в патогенезата на заболяването, с което читателят е подготвен за новите и интересни данни в тази насока, получени при разработването на дисертационния труд.

Целта на дисертационния труд е ясно формулирана. Посочени са 2 задачи с по 2 подзадачи за реализирането на целта. Имам забележка към формулирането на задача 1б:

1б) 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.

Според мен задачата е могла да бъде формулирана като: **Провеждане на микробиомен анализ чрез секвениране** от ново поколение на пациенти със саркоидоза и контролни лица..... Секвенирането така или иначе изисква изолиране на ДНК.

В раздел **„Материали и методи“** прави впечатление добрия набор материали за изследване като кръв, тъканна биопсия и белодробен лаваж от пациенти, суспектни за саркоидоза и кръв от здрави доброволци, както и архивни парафинови срези от пациенти със саркоидоза и туберкулоза. Изследването включва общо 44 пациента, постъпили в УМБАЛББ „Св. София“ за потвърждаване или отхвърляне на диагнозата белодробна саркоидоза, които са обобщени надлежно в таблица по пол, възраст, основна диагноза и придружаващи заболявания. Оформени са пациентски групи (суспектни и доказано болни от саркоидоза), болни от рак и суспектни за саркоидоза, болни от туберкулоза, както и контролна група – здрави доброволци. Материалите са получени след попълване на информирано съгласие и спазване на установените регулации. Използвани са релевантни и разнообразни методи, които са описани изчерпателно и биха могли да бъдат повторени без проблем от други изследователи. Използвани са методи като изолиране на ДНК от кръв, тъкани и архивни парафинови блокчета, PCR, агарозна електрофореза,

микробиологично култивиране на микробиоти, специфични техники за оцветяване на Хайнцови телца и импрегниране на саркоидни грануломи със сребро, имунохистохимия, светлинна микроскопия, електронна микроскопия – трансмисионна и секвенираща, секвениране - 16S и 18S метагеномно таргетно и метагеномно случайно, биоинформатични анализи. Прави приятно впечатление, че информацията относно видовете проби за изследване и използваните методи е представена чрез инфографика – атрактивен начин за визуализиране на текст за по-лесно възприемане от читателя.

Данните в раздел **“Резултати”** включват и дискусия по резултатите и според мен е по-правилно разделът да е бил наречен **“Резултати и дискусия”**. Представянето на резултатите по групи с последваща дискусия върху тях не е необичайно и е въпрос на избор на дисертанта и неговия ръководител. Това е по-лесния и бърз начин да съпоставиш собствените си резултати с тези на други автори. Дискусията е най-трудната и същевременно най-интересната част от всеки дисертационен труд и е показателна за професионалната подготовка на докторанта. В дискусията непосредствено след всяка група резултати докторантката коректно е отразила чуждите публикувани данни във връзка с нейните резултати и ги съпоставя с необходимата доза критичност. Резултатите и дискусията към тях са групирани според поставените задачи. Показани са резултатите от микробиологично, електронномикроскопско и генетично изследване на микробиоти на здрави доброволци срещу такива от пациенти със саркоидоза – в нативни и култивирани в условия на стрес кръвни проби. Резултатите са онагледени с информативни и в достатъчен набор светлинно- и електронномикроскопски изображения. Доказано е, че кръвната микробиота в некултивирани проби е недоказуема чрез светлинната микроскопия и в този случай ТЕМ е изключително важна методология за изучаване на кръвната микробиота. Интересен резултат е тестването на специфична среда за реанимация и култивиране на кръвната микробиота като се доказва, че по-голямата част от кръвната микробиота може да се култивира и да бъде изучавана. Въпреки че основният замисъл е да се изследва кръвната микробиота при пациенти със саркоидоза, интерес представлява относително високото микробното количество в кръвта на здрави индивиди. Докторантката доказва кръвна микробиота във всички тествани кръвни проби от здрави донори като те са с богато микробно биоразнообразие, чрез секвениране са доказани общо 55 бактериални и 39 гъбични рода. Култивираните кръвни проби показват значителен брой микробни таксономични единици, които не се откриват при некултивираните, което налага необходимостта при тестване на микробното биоразнообразие да се използват двойки култивирани-некултивирани проби. Подобно на L-формите, кръвната микробиота може да се възпроизвежда по различни начини, които са подробно описани от докторантката и подкрепени със снимков материал. Тя показва и нов феномен на разпространение, подобен на матрьошка, наречен „клетка в клетка“. Съществуването на кръвна микробиота при клинично здрави индивиди е много интересен факт, като това не се асоциира задължително с инфекция или с болестно състояние. Тези находки са предмет на дебат в научната общност особено през последните години. Тези микробни структури се приемат

като нормални резидентни микроорганизми в кръвта - коменсали. Авторката акцентира, че към момента в научната литература не са били открити проучвания, изучаващи паралелно микробното изобилие на кръвния и тъканен микробиом при саркоидоза. В настоящето пилотно изследване е наблюдавано оформяне на “характеристичен микробен профил” на белодробната тъкан и “характеристичен микробен профил на кръвта”, но не е било открито клъстериране между кръвните и биопсични проби от един и същ пациент със саркоидоза. Думичката характеристичен спокойно би могла да се замени със специфичен. Подобни данни заслужават по-обстойно изследване.

С цел изясняване възможното участие на *C. acnes* и *M. tuberculosis* в етиологията на саркоидозата са изследвани биопсични проби, фиксирани във формалин и включени в парафин. Сравнени са два метода за изолиране на ДНК от парафинови блокчета с включена тъкан от пациенти със саркоиден гранулом за последващо използване за PCR детекция на *C. acnes* и *M. tuberculosis*. Последните не са доказани и е възможно 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. Ето защо авторката подробно дискутира недостатъците на подобен тип изследване за диагностика и молекулярно-биологични изследвания на етиологията на саркоидозата. Добро впечатление прави отчитането на лимитите на собственото си проучване и очертаването на нови перспективи на изследване.

Формулирани са **седем извода**, които според мен биха били по-добре групирани в четири или пет. Изводи 2 и 3 например биха могли да се обединят. Изводите трябва да бъдат категорични и точно да отразяват получените резултати.

Имам следните **забележки и въпроси** към докторантката:

1. Изводи 2, 3 и 4 касаят микробиотите на болни от саркоидоза, на здрави донори, или на всички?

На мен лично ми липсват данни за сравнението на многообразието на кръвния микробиом при болни от саркоидоза срещу това при нормален кръвен микробиом на клинично здрави лица. А такива данни има в дисертацията.

2. По отношение на извод 6 - не е ли логично микробиомния профил на кръвта да се различава от който и да е тъканен микробиом?
3. Пояснете, моля ви, извод 7: Микробиомният анализ показва, че други микробни видове също биха могли да имат участие в патогенезата на саркоидозата - други, освен кои, трябва да има яснота в изказа.
4. Въз основа на всички знания и умения, приети и отхвърлени хипотези по време на разработването на дисертационния си труд, какво е мнението на редовен докторант Борислава Цафарова за инфекциозната етиология на саркоидозата? Вярвате ли в съществуването на *Kalfnela sarcoides*?

Посочените малки забележки ни най-малко не омаловажават значението и актуалността на дисертационния труд, още повече, че резултатите от него са намерили широко разпространение и дискусия в международната научна общност чрез публикуването им в импактови научни списания. Резултатите по дисертацията са публикувани в 7 статии, това е изключително рядко явление напоследък и поздравявам докторантката, нейния научен ръководител и цялата група, работеща по този проблем. Две от статиите са публикувани в списания от Q1 (IF – между 4 и 6), една – Q2, три – Q4. Една статия е публикувана в списание без квантил. В четири от статиите докторантката е първи автор, две са обзорни с единствен автор докторантката. Тези резултати са получили оценка от общността чрез 13 цитирания до момента.

Авторефератът правилно отразява основните резултати на дисертационния труд и е оформен адекватно на 67 страници.

Докторант Борислава Цафарова е изпълнила изискванията за събрани кредити по кредитната система за оценка на докторанта в НЦЗПБ. Тя има натрупани 667 точки, което многократно надхвърля изискуемите от ЗРСРБ и неговия Правилник.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ: В заключение бих казала, че дисертационният труд на редовен докторант Борислава Цафарова е изработен и представен с необходимата научна компетентност върху тематиката. Този научен труд отговаря на изискванията за придобиване на образователна и научна степен „Доктор”, заложи в Закона за развитие на академичния състав в РБ, Правилника за неговото приложение и Правилника на НЦЗПБ. Убедено давам положителна оценка и препоръчвам на уважаемите членове на Научното жури да вземат решение за присъждане на образователната и научна степен ”Доктор” на Борислава Цафарова по научната специалност ”Микробиология” в Професионално направление “Биологични науки” и Област на висше образование “Природни науки, математика и информатика”.

15.01.2024 г.

Доц. д-р Таня Димова, DVM, PhD

