

СПРАВКА ЗА НАУЧНИТЕ ПРИНОСИ

на доц. Светлозара Любомирова Петкова, доктор

Секция „Експериментална паразитология“ – ИЕМПАМ-БАН

Научните приноси на доцент Светлозара Петкова, доктор, са в областта на паразитологията. Те са резултат от задълбочени изследвания на системата паразит – гостоприемник в продължение на повече от двадесет години. Получените резултати разкриват нови възможности за определяне на видовата специфичност, имунодиагностика, терапия и профилактика на зоонози.

В методологично отношение, приносите на доц. Петкова се базират на съвременни и класически биохимични и морфологични методи (PCR, PAGE, изоелектрофокусиране, имунохистохимия, сребърна импрегнация, електронна и светлинна микроскопия и др.), както и на разработване на нови и прилагане на рутинни методи за таксономия, диагностика и терапия на трихинелоза, приложими и за други хелминтози и паразитози.

I. Научни приноси свързани с придобиването на образователната и научна степен „доктор“.

Дисертационният труд на доц. Петкова е посветен на разработване и приложение на нови методи за скрининг, диагностика и терапия на мускулна фаза на трихинелоза.

- Създаден е биосензор с подобрени диагностични параметри с приложение за скринингови полеви изследвания и лабораторна диагностика на трихинелоза (2).
- Създаден е уникален имунолипозомен диагностикум (течен и лиофилизиран) с подобрени диагностични параметри за лабораторна диагностика на трихинелоза (3).
- Разработени са нови липозомни антитрихинелни средства на база мебендазол и албендазол, които се отличават с по-висока терапевтична ефективност в сравнение с рутинно използваните при експериментална мускулна трихинелоза (4).
- Получени са резултати от патохистологични изследвания, които позволяват да се визуализира степента на деструкция на паразита и потвърждават по-добрата ефективност на действие на липозомните средства при лечение на мускулна трихинелоза (4).

II. Научни приноси свързани с придобиването на академичното звание „доцент“

Таксономия

- За първи път в България е установен нов безкапсулен вид *T. pseudospiralis* (в мускулатура от диви свине и язовец), който циркулира сред дивеча в България. Този безкапсулен трихинелен вид заразява и птици, за разлика от всички капсулни трихинелни видове. С установяването му в България е извършено преосмисляне на диагностиката, профилактиката и борбата с трихинелозата при животните и човека.

Въведен е задължителен дигестивен метод на изследване, тъй като микроскопският метод не е достатъчен за установяването на този нов безкапсулен вид (7,8,25).

- За първи път е установено началото на инвазиоспособността на африканския вид *T. nelsoni* - 23 ден след заразяването. Това е най-дългият период на начало на инвазиоспособност при всички трихинелни видове и е от голямо значение за лечението на хора в районите (Африка), където е разпространен този вид (15).

Имунодиагностика и терапия на модели на трихинелоза и ехинококоза

- Изследвани са 24 трихинелни щамове от различни домашни и диви животни предизвикали трихинелозни епидемии сред хората (236 души) с методите на PCR, cross-breeding, ELISA, РНА и IF, и са установени видовете *T. spiralis* и *T. britovi*, които циркулират при домашни и диви животни в България (9, 16).

- Диагностицирани са 336 болни от ехинококоза хора чрез методите на ELISA, ИНА, IFA и Western blot. Най-висока чувствителност е установена при индиректния хемаглутинационен тест 94%, ELISA - 90,4% и IFA 89,6% (13).

- Направен е мониторинг и оценка на ефективността на липозомна терапия и възстановяване на засегнатите органи върху експериментален модел на мускулна трихинелоза. Определени са клиничнолабораторните показатели, които достоверно могат да служат като критерии за ефективността на терапията и степента на възстановяване на засегнатите органи (26).

Биохимия

- С помощта на сравнителни електрофоретични изследвания на водни белтъчни екстракти от шест трихинелни изолата (ISS03, ISS13, ISS10, ISS02, ISS029, ISS035) е установена хетерогенност в броя на водоразтворимите белтъци и електрофоретичната им подвижност (различно IP). Това позволи да се определи видовата специфичност на изолатите ISS03, ISS13, ISS10, ISS02, ISS029, ISS035 съответно към видовете *T. spiralis*, *T. pseudospiralis*, *T. nativa*, *T. britovi*, *T. nelsoni*, *T. murrelli*. Показано е, че тези видове съдържат както общи, така и характерни белтъчни компоненти, които могат успешно да бъдат използвани за определяне на различни щамове и изолати на род *Trichinella* (10,18,23).

- Методът за оцветяване със сребро на PAGE се прилага за първи път при представители на род *Trichinella*, като резултатите дават възможност той да се използва при изследване и установяване на видовата принадлежност (24).

- Доказано е, че хемоцианините, изолирани от *Helix vulgaris* са високо имуногенни гликопротеини, които стимулират паралелно клетъчния и хуморалния имунитет и са подходящи като молекулни носители и адюванти при профилактични и терапевтични имунологични препарати. HvH (хемоцианин от *Helix vulgaris*) е високо ефективен при специфичната имунотерапия на трихинелозата, когато се прилага под формата на конюгат с тотален трихинелен антиген, изолиран от мускулни ларви на *T. spiralis*. Наблюдаваната инхибиция на трихинелната инвазия достига до 89% (12).

- Изолирана и пречистена е ДНК от изолати на род *Haemonchus* (Nematoda: Trichostrongylidae), род *Dictyocaulus* (Nematoda: Dictyocaulidae), род *Notocotylus* (Trematoda: Notocotylidae), род *Trichinella* (Nematoda: Trichinellidae). Получената ДНК

от съответните изолати е качествено и количествено анализирана чрез методите на спектрофотометрия и гел електрофореза (31).

- Изследвано е действието на термостабилни и термолабилни биологично активни вещества изолирани от черен дроб и слезка на инвазирани с *Trichinella spiralis* плъхове върху пролиферацията на фитохемаглутинин активни и неактивни лимфоцитни култури и първична клетъчна култура от тумор на Graffi *in vitro*. Установено е потискане в различна степен на клетъчната пролиферация на изследваните култури (5, 28, 30, 32).

- Въз основа на получени данни от експериментални инвазии на трихинелоза при плъхове и мишки, третирани с нови метални съединения - Sel-plex и Alltech е разработен математически модел за количествена оценка на растежа на гостоприемника. За охарактеризиране на изследваните паразити са използвани следните параметри: паразитна инвазия в гостоприемника, растеж на инвазирани и неинвазирани животни, третирани и нетретирани с микроелементи, концентрация на микроелементи в тъкани на гостоприемника и хелминта, антиоксидантен статус на гостоприемника. За количественото описание на растежа на гостоприемника за първи път е приложено логистично уравнение, което до момента беше прилагано само в популационните кинетични модели (21,33).

- Посредством лектинова имунохистохимия и афино-блот, детайлно са охарактеризирани топологията, структурата и приблизителната молекулна маса на O-свързани гликопротеини през различни стадии от развитието на експериментална трихинелоза. За първи път е показано, че муциновият тип O-гликозилиране (Tn- и T-антигени, както и ABO кръвно-групови последователности) е широко разпространен сред представителите на род *Trichinella*. Получените резултати допринасят за по-добро разбиране на гликобиологията на този паразит и дават нови насоки в изследването на използваните от него инвазивни механизми (19,20).

- Доказано е участието на апоптоза - индуциращия фактор (АИФ) в процеса на трансформация на засегнатата част от мускулното влакно в т. нар. Nurse cell след инвазия от новородени трихинелни ларви. Системата мускулно влакно-трихинела може да послужи като много успешен *in vitro* модел за детайлно изследване на ролята на АИФ в апоптичните процеси както в скелетен мускул, така и в други тъкани (22).

- За първи път е описана поява на вътреклетъчни сиалилирани гликопротеини в мускулно влакно след трихинелна инвазия. Доказана е и повишена активност на определени ензими от групата на сиалил-трансферазите, като един от ензимите не се експресираща в нормални мускулни влакна. По косвен път се изяснява структурата на олигозахаридните компоненти на тези новопоявили се гликопротеини. Направени са и опити за идентифициране на белтъчната част (34).

III. Научни приноси след хабилитацията.

В ИЕМПАМ от 2005 г. досега се поддържа Трихинелен модел:

- Шест трихинелни изолата: ISS03, ISS13, ISS10, ISS02, ISS029, ISS035, любезно предоставени от Проф. Едоардо Поцио - световна референтна лаборатория по трихинелоза - Рим, Италия.

- Моделът се поддържа от доцент Петкова и нейният екип. Провеждат се изследвания и се получават доказателства за видовата характеристика на трихинелите в България, както и нови данни за досега известните трихинелни видове.

- Чрез успешна колаборация и многобройни изследвания е установен нов вид трихинели за България - *Trichinella pseudospiralis*.

- Предоставени са материали, с които през последните години са изработени и успешно защитени *четири дисертационни труда* и са спечелени *два проекта* на тази тематика, които са текущи.

Приноси в направление таксономия (трихинелоза, токсокароза, гиардиаза)

- Установени са биологичните свойства на трихинели, изолирани от мускулатура на лисица от Централните части на Русия (38):

- Проследено е развитието на трихинелните ларви чрез препасиране на лабораторни мишки и плъхове и е наблюдавана вариабилността на морфометричните показатели в зависимост от промяната в средата на обитание /устойчивост на ниски температури, форминдекс и PCR/.

- Доказано е, че формата и размерът на трихинелните капсули в мускулите зависят от вида на паразита и вида на гостоприемника.

- Идентификацията чрез морфологични и молекулярни методи подкрепя принадлежността на изолата към вида *Trichinella nativa*.

- Проследен е интензитетът на заразяване с токсокара за период от 6 г. (2011 – 2017). Изследвани са 1632 проби от домашни кучета и 1146 от домашни котки. Резултатите показват, че инфекцията на котки е 2 пъти по-висока в сравнение с кучетата, както в групата на възрастните животни, така и в групата на малките. Постоянната зараза на домашни животни с този вид хелминти ги прави постоянен източник на разпространение на заболяването в градската среда и носи голям риск от инфекции при хора (54).

- Създаден е лабораторен модел на гиардиаза и е проследена инвазията в експериментални животни. Проведени са сравнителни изследвания за установяване ефективността на различни диагностични тестове за откриване на *Giardia*. Установено е, че тези тестове са особено надеждни в комбинация с класическите копроскопски методи за предварителен анализ. Получените резултати дават възможност да се провеждат разнообразни изследвания *in vivo* и *in vitro* и да се запазят изолати на *Giardia* в жизнеспособно състояние (43,55).

Проведени са редица молекулярнобиологични анализи с метода на PCR. Тяхната чувствителност и специфичност ги прави изключително надеждни за диагностични проучвания на трихинелоза. PCR-анализите допълват и обогатяват основополагащите микроскопски, морфологични и патологични методи.

Методите могат успешно да се прилагат за идентифициране и доказване на видовете от род *Trichinella*. Резултатите са от значение за медицинските и ветеринарните експерти по отношение прилагането на ефикасни мерки за превенция и лечение.

- Изолирана е ДНК от хелминти (р. *Haemonchus* и р. *Fasciola*) с различна таксономична принадлежност и са амплифицирани отделни видово специфични фрагменти. Методиката за амплифициране на търсените от нас ДНК последователности посредством полимеразно-верижна реакция и реактиви PCR Master Mix (2X) на Thermo scientific се оказва особено подходяща за приложение при хелминти (58).

- Чрез PCR анализ са получени нови данни за таксономията и генетичните характеристики на трихинелни изолати от различни региони на България и други страни. Това е нова техника за откриване и идентификация на видовете въз основа на специфичната хибридизация на дадена сонда, проектирана за определен вид с ДНК в пробите за анализ. Избраният метод е точен, бърз и много подходящ за специфична идентификация на видовете от род *Trichinella* (69).

- Проведени са молекулярногенетични изследвания на шест трихинелни изолати (ISS03, ISS13, ISS10, ISS02, ISS029, ISS035). За първи път са установени криви на топене за всеки от изследваните видове от род *Trichinella* за диагностичен анализ HRM (high resolution melting analysis) при мултиплексно изследване. Те са индивидуални и могат да се използват за геномни контроли при диагностични изследвания. Данните от това проучване предоставят допълнителна информация и могат да послужат за подобряване подхода за превенция и борба с болестта (44).

- Извършени са сравнителни електрофоретични изследвания в 10,5% PAGE на 5 изоензима (PEP, EST, MPI, ACP, AK). Те индивидуално характеризират всеки един от шестте трихинелни вида и успешно могат да се прилагат при определяне на видове на род *Trichinella* (66).

Приноси в направление имунодиагностика и терапия на модел трихинелоза

- Изследван е имунологичният статус на поколението при експериментално заразени с *Trichinella spiralis* бременни лабораторни плъхове. Проследена е миграцията на ларвите в кръвни проби от новородени плъхове. Динамиката на специфични антитела при възрастни плъхове и новородени е наблюдавана в поколението и в последваща инвазия с *T. spiralis*. Показано е, че антителата, произведени от майката в отговор на мигриращите ларви, са насочени към ефективна защита на плода от заразяване и повишаване на имунния статус на потомството, осигурявайки защита срещу повторно заразяване. Получените данни показват, че пасивният имунитет, предаван от майката на поколението, може да повлияе на развитието на епидемиологичните и епизоотичните процеси в естествените и синантропни огнища на трихинелоза (41).

- Проведени са изследвания за установяване на по-доброто терапевтично действие на липозомния албендазол (LA) върху експериментален миши модел на мускулния стадий на трихинелоза, когато рутинната терапия се оказва неефективна.

Липозомният албендазол (LA) е два пъти по-ефективен в сравнение със свободно прилагания албендазол (A) при еднакви прилагани дози (52).

- Наблюдавани са хематологични промени, настъпващи по време на експериментално индуцирана инфекция с *Trichinella spiralis*, *T. britovi* и *T. pseudospiralis* при мишки. Направен е хематологичен кръвен профил, проследяващ 15 кръвни показателя. Статистическият анализ с двупосочна ANOVA показва значителни разлики в стойностите на HGB, MCHC, PLT, Lymph, Gran при трите вида трихинелоза в сравнение с контролните животни. Капсулообразуваният вид *T. spiralis* показва статистически значими разлики при HGB, MCHC, Lymph и PLT. Безкапсулният вид *T. pseudospiralis* показва статистически значими разлики в Lymph и Gran спрямо контролата, и в Gran спрямо *T. spiralis* (64).

Приноси в направление биохимия

- Чрез имунохистохимия е изследвано възможното активиране на апоптотични механизми в лигавицата на тънките черва след инфекция с ларви и възрастни на *Trichinella spiralis*. Трихинела спиралис активно преминава през епителните клетки на чревната лигавица. От морфологична гледна точка тези клетки не проявяват видими увреждания. Наличието на трихинели засяга чревните епителни клетки, но за разлика от мускулните клетки, нахлуването им не инициира активиране на апоптотични фактори (36).

- Сиаловите киселини играят важна роля в много физиологични и патологични процеси като улесняват комуникациите между клетките, взаимодействието между клетките и субстратите, адхезията, поддържането на серумните гликопротеини в циркулацията, регулирането на имунния отговор и насочването на протеините:

- В тази връзка, са проследени промените в сиалилирането в скелетната мускулатура на мишки след инвазия с паразитния нематод *Trichinella spiralis*. Количествата свободна сиалова киселина, сиалилирани гликопротеини и обща активност на сиалилтрансферазата са определени количествено (37).

- Проведен е хистохимичен скрининг с лектини, специфични за сиалова киселина, за да се локализира разпределението на сиалилираните гликоконюгати и да се изясни типа на свързване на остатъците сиалова киселина с въглехидратните вериги (37).

- Отчетено е сиалилиране, което потиска контрактилитета на засегнатите мускулни клетки чрез намаляване йонизирането на сарколемата спомагащо за процеса на настаняване на паразитите (37).

- Установено е, че серумната сиалова киселина може да бъде ценен показател за диагностика и прогнозиране на много инфекциозни заболявания (39).

- Доказано е, че концентрациите на серумната сиалова киселина в заразените с трихинела плъхове са значително по-високи от тези в здравите контроли. Установи се силна положителна корелация между серумните нива на различните форми на сиалова киселина и развитието на заболяването (39).

- За първи път са описани вътреклетъчните промени в сиалилирането на фибри на скелетната мускулатура по време на процеса на нейното превръщане в кърмеща клетка /nurse cell/ след заемане от паразитния нематод *Trichinella spiralis* (67).

- Комплектът от Nurse cell при *Trichinella spiralis* е биологична система и отличен модел за изследване на капацитета на напречно набраздената мускулна тъкан. Проследено е регулирането на двата ядрени протеина поли (ADP-рибоза) полимераза-1 (PARP-1) и пролифериращ клетъчен ядрен антиген (PCNA) в ядрото на окупираната част на скелетните мускули във времето на трансформацията им към Nurse cell след инвазия с *T. spiralis*. Получените резултати дават нови възгледи относно пластичността на клетките на скелетните мускули (40).

- Термостабилни биологично активни субстанции (БАС) са изолирани от черния дроб на плъхове, заразени с *Trichinella spiralis*. Техните ефекти върху клетъчната жизнеспособност на миелоидни клетки от първичен тумор на Графи, HeLa и T-24 туморни клетъчни култури бяха изследвани в различни дози. БАС изолирани от черния дроб на здрави плъхове, показват по-слабо инхибиране на клетъчната жизнеспособност на изследваните туморни клетки в сравнение с БАС, изолиран от черния дроб на заразени с *T. spiralis* плъхове, с изключение на T-24 туморни клетки, при които и двете БАС не индуцират вариации (42, 63, 65).

- Направена е биохимична характеристика на термостабилно биологично активно вещество, инхибитор на клетъчната пролиферация изолирано от черен дроб на инвазирани с *Trichinella spiralis* плъхове (59).

- Разработен е експериментален модел за изследване на антиоксидантния / оксидантния статус при експериментална трихинелоза след третиране с метални съединения (61).

- Изследвани са активностите на ензимите супероксид дисмутаза (SOD), глутатион пероксидаза (GPx), нивото на витамините А, С и Е, и съдържанието на малондиалдехида (MDA) в мишки, инвазирани с *T. spiralis* (61).

- Доказана е ролята на оксидативния стрес в механизмите на патогенезата при трихинелоза на мишки. Прилагането на цинк подобрява растежа, нормализира антиоксидантния статус, и намалява броя на ларвите в мускулите без развитие или проявяване на токсичност (45).

- Наблюдаван е оксидативен/антиоксидантен дисбаланс, изразен с хиповитаминози С и Е, промени в активността на антиоксидантните ензими и усилена липидна пероксидация. Тези промени играят важна роля в защитните биохимични механизми на мишките, инвазирани с *T. spiralis*. Данните за хиповитаминозите са основа за суплементиране с необходимите витамини едновременно с прилагането на антипаразитните средства (61).

Приноси в направление Морфология

- Установен е ефектът на цитостатиците циклофосфамид (CP) и епирубицин (ERb) самостоятелно и в комбинация с милтефозин като антитуморни агенти върху мишки. Проведени са морфологични, ултраструктурни, цитогенетични и автордиографски изследвания на мъжки полови клетки, тимус и стволони клетки. Получените резултати показват, че комбинираният прием на милтефозин в комбинация с епирубицин или циклофосфамид намалява деструктивния цитотоксичен ефект при сперматогенеза и хемопоеза (35, 46).

- Проучен е екотоксичният ефект на действие на индустриален полиметален прах богат на Mn, Fe, Al, Mg, Ca, Si и други, от района на Кремиковци върху бели

мишки. Мишките са инжектирани с белязан тимидин за автордиографско изследване. Проведени са морфологични изследвания на черен дроб, бъбрек, далак, тестиси и костен мозък. Установените морфологични промени в изследваните органи показват, че индустриалният полиметален прах оказва токсичен ефект върху ключови органи от кръвоносната, храносмилателната и отделителната система на опитните животни по време на експеримента (48).

- Бели мишки са подложени на въздействието на полиметален индустриален прах от района на оловно-цинковия завод край Асеновград за различен период от време. Проследени са ултраструктурните промени в мъжки полови клетки и хромозоми под въздействие на Cd, Pb, Cu и Zn. Най-чувствителни към това въздействие са сперматоцитите и сперматогониите, а хромозомните аберации са завишени във всички изследвани групи (49,50).

- Проследено е патоморфологичното въздействие, получено в резултат на прилагане на липозомно инкапсулиран и свободен албендазол по време на мускулна фаза на трихинелоза. Действието на антихелминтиците, показва, че в групите се установяват разлики само по отношение на броя на живите и мъртви трихинелни ларви. Съгласно патоморфологичните промени капсулите, паразитите и пространствата около тях са идентични както за липозомно инкапсулирания така и за свободно приложения албендазол (51).