

РЕЦЕНЗИЯ

от д-р Анелия Михайлова Стоянова – доцент в Пловдивски университет „Паисий Хилендарски“, Биологически факултет, Катедра Зоология

на дисертационен труд за присъждане на образователната и научна степен „доктор“

по: област на висше образование 4. Природни науки, математика и информатика
професионално направление 4.3. Биологически науки
докторска програма Медицинска биология

Автор: Александър Божидаров Блажев

Тема: „Проучване на заразеността с *Borrelia burgdorferi sensu lato* при иксодови кърлежи в Плевенска област“

Научни ръководители: проф. д-р Милена Карчева, д.м. и доц. Милена Атанасова, д.б. от Медицински университет – Плевен.

1. Общо описание на представените материали

Със заповед № 1247 от 25.04.2023 г. на Ректора на Медицински университет – Плевен (МУ) съм определена за член на научното жури за осигуряване на процедура за защита на дисертационен труд на тема „Проучване на заразеността с *Borrelia burgdorferi sensu lato* при иксодови кърлежи в Плевенска област“ за придобиване на образователната и научна степен „доктор“ в област на висше образование 4. Природни науки, математика и информатика, професионално направление 4.3. Биологически науки, докторска програма Медицинска биология. Автор на дисертационния труд е Александър Божидаров Блажев – докторант на самостоятелна подготовка към катедра „Анатомия, хистология, цитология и биология“, с научни ръководители проф. д-р Милена Карчева, д.м. и доц. Милена Атанасова, д.б. от Медицински университет – Плевен.

Представеният от Александър Божидаров Блажев комплект материали на електронен носител е в съответствие с чл. 34 и Приложение №2 от Правилника за развитие на академичния състав на МУ – Плевен и включва следните документи:

- заявление до Ректора на МУ-Плевен за допускане до защита на дисертационен труд пред Научно жури;
- автобиография европейски формат;
- диплома за завършено висше образование за образователно-квалификационна степен “магистър”;
- диплома за призната специалност;
- протокол от Катедрен съвет (КС) с предложение за зачисляване в докторантура;
- заповед на Ректора за зачисляване в докторантура;
- индивидуален учебен план, приет на Факултетен съвет;
- протокол от изпит за докторски минимум по специалността и конспект;
- протокол от КС с предложение за разкриване на процедура за апробация;
- протокол от разширения КС от апробацията;
- заповед на Ректора за отчисляване с право на защита;
- авторска справка за съответствие и изпълнение на минималните национални изисквания в съответното професионално направление и научна специалност;
- списък на публикации в пълен текст, свързани с дисертационния труд;
- справка за цитирания;
- списък на участия в научноизследователски проекти;

- списък на участия в научни форуми;
- дисертационен труд за присъждане на ОНС "доктор";
- автореферат.

Докторантът е приложил три броя публикации, тематично свързани с дисертационния труд и публикувани в реномирани научни списания, реферирани и индексирани в световни бази данни с научна информация (Scopus и Web of science). Александър Блажев е първи автор в трите статии.

Представени са всички необходими документи, изготвени прецизно, съгласно Правилника за развитие на академичния състав на МУ – Плевен.

2. Кратки биографични данни за докторанта

Александър Блажев е магистър по „Биология“ със специализация „Музейно дело, зоологически и ботанически градини“, придобити в Биологическия факултет на Пловдивски университет „Паисий Хилендарски“ в периода 1994 – 1999 година. През 2009 година придобива специалност „Медицинска биология“ в МУ – Плевен. Двете придобити специалности, „биология“ и „медицинска биология“, осигуряват отлична теоретична основа за реализиране на изследванията по избраната тема на дисертационния труд. От 2018 до 2022 година е докторант на самостоятелна подготовка към катедра „Анатомия, хистология, цитология и биология“ на МУ – Плевен в докторска програма „Медицинска биология“. Докторантът е положил с „Отличен“ изпита по докторантски минимум, а от Удостоверението, издадено от Заместник-Ректора по Научноизследователска дейност на МУ, става видно, че ас. Александър Блажев е изпълнил всички заложи в Индивидуалния план дейности по обучение в докторската програма и е придобил 281 кредита, при изискуеми 220 кредита.

От 2002 година до настоящия момент Александър Блажев работи като асистент в сектор „Биология“ на катедра „Анатомия, хистология, цитология и биология“ на МУ – Плевен. Участва активно в проекти, национални и международни конференции, образователни програми и семинари.

Докторантът представя списък със забелязани цитирания в периода 01.01.2022 г.- 25.04.2023 г. Позоваванията касаят публикации извън темата на дисертацията, основно в областта на имунологията.

Александър Блажев представя справка за общо 8 участия в научни форуми в България и чужбина, като пет от участията са в периода на неговото обучение като докторант и са свързани с тематиката на дисертационния труд.

Докторантът е участвал в два научноизследователски проекта, финансирани от МУ – Плевен и целящи проучвания върху разпространението и заразеността с *Borrelia burgdorferi* s.l. при иксодови кърлежи в Плевенска област.

3. Актуалност на тематиката и целесъобразност на поставените цели и задачи

От увода на дисертацията и литературната справка по тематиката става ясно, че изучаването на векторите на трансмисивните зоонози, в конкретния случай кърлежи и тяхната заразеност с борелия, е актуално и има голяма практическа и социална значимост. Лаймската борелиоза (ЛБ), която е инфекциозно заболяване с природна огнищност, е водеща трансмисивна зооноза в България с голямо значение за общественото здравеопазване. Вектори са кърлежи от род *Ixodes*, а видът *Ixodes ricinus* е широко разпространен в градски и крайградски хабитати, като паркове, екопътеки, места за отдих и туризъм, което силно повишава епидемиологичния риск за хората.

Кърлежите като вектори на трансмисивни зоонози при човек имат голямо медицинско значение и изучаването на популационната им плътност и взаимодействие с природната и социална среда в условията на променящите се климатични фактори, съществено би подпомогнало оценката на епидемиологичния риск.

Целта на дисертацията е формулирана ясно, а именно да се проучи и характеризира инфектираността на *I. ricinus* с *B. burgdorferi* s.l. в Плевенска област чрез молекулярно-биологични методи и да се установят огнища с висока популационна плътност на иксодови кърлежи за оценка на риска от заразяване на населението в областта. Тя напълно съответства на тематиката на дисертационния труд и е в услуга на решаване на актуални проблеми. Във връзка с изпълнението на целта са поставени няколко конкретни задачи за проучване на иксодофауната в района на изследване и заразеността с *B. burgdorferi* s.l., определяне и картиране на територии с висока популационна плътност на иксодови кърлежи и представляващи повишен епидемиологичен риск за населението, изолиране на ДНК от векторите и извършване на PCR анализ за позитивност към комплекса *B. burgdorferi* s.l., оценяване на риска от заразяване на населението. Постигнатите резултати в дисертацията отговарят на поставените цел и задачи и подкрепят необходимостта от съвременни изследвания върху кърлежите като вектори.

Освен това, тематиката на дисертацията е в съзвучие със стратегиите на Европейски център за профилактика и контрол върху заболяванията (ECDC) срещу векторно-преносимите инфекции.

Всичко това безспорно определя актуалността на разработвания в дисертационния труд проблем в научно, научно-приложно и медицинско отношение.

4. Познаване на проблема

Александър Блажев демонстрира задълбочено познаване на състоянието на проблема на научното изследване, което се доказва от прецизия и подробен литературен преглед, от умелото ползване на информацията от литературните източници по тематиката, от анализа и критично оценяване на предходни изследвания и от избора на подход за представяне на известната до сега информация по темата. Особен интерес тук представлява детайлният преглед касаещ биологията на *B. burgdorferi* s.l., морфолого-анатомичната характеристика на иксодовите кърлежи, клиничните прояви на инфекцията и данните за ЛБ в България. Литературният преглед поднася в добър стил полезна, систематизирана и актуална информация, която може да се използва от различни специалисти.

Навлизането в проблема и способността на докторанта творчески да използва съществуващата информация се демонстрира и в следващите глави на дисертацията, където литературата се използва критично при интерпретацията на получените резултати.

5. Методика на изследването

Избраните методи и подходи на изследване в дисертационния труд позволяват постигане на поставената цел и получаване на адекватен отговор на задачите, решавани в дисертационния труд.

За ретроспективното епидемиологично проучване за разпространението на ЛБ в Плевенска област и България са събрани, обработени и анализирани данни от Националния статистически институт, Националния център по общественото здраве и анализи и РЗИ – Плевен и обхващат периода от 2001 до 2021 година. Изследването на кърлежовите популации е проведено в рамките на 7-годишен период между 2016 и

2022 г., през пролетно-летния сезон от март до края на юни. Проведени са общо 75 кампании на събиране, при които са събрани 1459 екземпляра, от които 1376 екземпляра при използване на стандартен метод на флагиране с бял памучен плат. За район на изследването са подбрани територии в Плевенска област, които не са били във фокуса на задълбочени проучвания през последните десетилетия по отношение на иксодовите кърлежи. За детекцията на *B. burgdorferi* s.l. в чревното съдържимо на *I. ricinus* е приложена тъмнополева микроскопия, а изолирането на ДНК от кърлежи и последвалата гнездова полимеразна верижна реакция (nested PCR) са по стандартна методика. Много добро впечатление прави прилагането на съвременни статистически методи и програми за обработване на данните, което осигурява коректно интерпретиране на получените резултати.

Смятам, че всички методи подбрани и използвани в дисертационния труд за решаване на поставените задачи, са адекватни, съвременни, използвани са правилно в хода работата и дават възможност за получаване на стойностни резултати и постигане на поставената от докторанта цел.

6. Характеристика и оценка на дисертационния труд

Дисертационният труд е написан на 175 страници и е илюстриран с 29 таблици, 39 фигури и 13 епизоотологични карти. Библиографската справка включва 266 източника на латиница и 17 на кирилица. Структуриран е 10 глави, съответно:

1. Увод; 2. Литературен обзор; 3. Цел и задачи; 4. Материали и методи; 5. Резултати; 6. Дискусия; 7. Обобщени изводи; 8. Приноси; 9. Приложения; 10. Литература.

-1. Увод. В уводната глава докторанта представя изследваната група на иксодовите кърлежи, видовото разнообразие, медицинското им значение като вектори на трансмисивни зоонози и необходимостта от по-задълбочено изучаване на кърлежовите популации и свързаните с тях патогени. Без да е обемен, Уводът въвежда читателя в проблема и тематиката на дисертационния труд.

-2. Литературен обзор. В настоящата глава докторантът прави задълбочена литературна справка по темата на дисертационния труд и структурира изложението в няколко подглави, касаещи: патогена *B. burgdorferi* s.l. – морфология, мембранни протеини, геном и таксономия; кърлежите от семейство Ixodidae – таксономия, систематика, морфолого-анатомична характеристика, екология и жизнен цикъл; взаимодействие между кърлежите и *B. burgdorferi* s.l.; географско разпространение на ЛБ и данни за разпространението и епидемиологията на ЛБ в България; клинични прояви на инфекцията, диагноза, лечение и профилактика. Литературният обзор е подробен, прецизно направен, обхваща различните аспекти, касаещи тематиката на проучването, представен е в много добър стил и би могъл да се използва от специалисти, интересувани се от проблема.

-3. Цел и задачи. Целта на изследването – чрез идентификация и анализ на иксодофауната в Плевенска област и характеризиране инфекциозността на *I. ricinus* с *B. burgdorferi* s.l. да се установят огнищата с кърлежови популации и да се направи оценка на риска от заразяване на населението в областта, е ясно формулирана и за нейното постигане са представени осем задачи; конкретните задачи са подходящо избрани и изпълнението им дава възможност да се разработи проблема.

-4. Материали и методи. Настоящата глава обхваща 26 страници и в добър порядък представя всички методи и подходи, които са приложени при работата по дисертацията. Методите са удачно подбрани, характеризирани са районите на изследването; материалът е събиран лично от докторанта и обемът му е достатъчен за осигуряване на стойностна извадка, която да бъде обективно интерпретирана по отношение на реални резултати и изводи.

-5. Резултати. Представени са получените резултати по дисертацията, подредени в съответствие с поставените задачи, което прави много добро впечатление. Резултатите са прецизно илюстрирани с фигури и таблици, които дават възможност лесно да бъдат анализирани, обобщени и дискутирани. Изготвените эпизоотологични карти (13 на брой) представят коректно резултатите за популациите на *I. ricinus* и могат да се ползват успешно за оценка на риска от ухапване при хората в изследвания район.

-6. Дискусия. Дискусията в дисертационния труд е представена по отдели, съответстващи на структурата на резултатите и поставените задачи, което дава много добра възможност за възприемане на текста от читателя. Тук проличава компетентността на докторанта, способността му творчески да анализира резултатите и да съпоставя получените от него данни с публикуваната информация в светлината на съвременните научни постижения. Много добро впечатление прави стила и езика на изложението.

-7. Обобщени изводи. На основата на обобщените резултати и обсъждане са направени 10 извода. Част от тях (№№ 5, 6, 7 и 8) не са формулирани правилно и отразяват резултати, а не дават основа за научни заключения.

-8. Приноси. Приносите в дисертацията са ясно формулирани и представени в две отделни групи: 1/ Приноси с оригинален характер: извлечени са от обобщените резултати и са общо осем на брой; 2/ Приноси с потвърдителен характер: потвърждава се медицинското значение на *I. ricinus* като вектор на ЛБ.

-9. Приложения. Докторантът прилага списъци с научните публикации във връзка с дисертацията и участия в научни форуми и проекти.

-10. Литература. Цитираната в дисертацията литература обхваща 283 литературни източника, от които 17 са на български език. Те са номерирани в референтния литературен списък и подредени по реда на цитиране в текста. Прави впечатление широкият кръг използвана литература, което несъмнено дава реална основа за оценка и представяне на оригиналните изследвания на докторанта.

7. Приноси и значимост на разработката за науката и практиката

Дисертационният труд позволява да се очертаят следните по-важни приноси:

Приноси с оригинален характер – обобщени са данните от ретроспективно епидемиологично проучване на хора с доказана ЛБ; за първи път в Плевенска област е направено проучване на популациите от иксодови кърлежи в зони с регулярно третиране на тревните площи и естествени неподържани райони; проведени са проучвания върху популациите на *I. ricinus* и са изследвани за носителство на спирохети от комплекса *B. burgdorferi* s.l.; съобщава се редкия за България орнитофилен вид *Ixodes frontalis*.

Приноси с потвърдителен характер – потвърждава се важното епидемиологично значение на *I. ricinus* в цикъла на *B. burgdorferi* s.l. и трансстадийния път на предаване на патогена; потвърждава се унимодален модел на активност на *I. ricinus* и влиянието на абиотичните фактори.

Приноси с приложен характер – изготвени са карти на разпространението на *I. ricinus* и инфектираните с борелии вектори в Плевенска област, базирани на 7-годишно проучване, които доказват, че в региона има огнища с повишен риск за човешкото здраве.

8. Преценка на публикациите по дисертационния труд

Александър Блажев представя три публикации по темата на дисертацията, които носят общо 44 точки, при изискуеми 30 точки, според минималните национални

изисквания по група показатели „Г“. Две от публикациите са отпечатани на български език в списанието „Обща медицина“, което е реферирано в световните бази данни за научна литература Web of Science (CABI) и Scopus и има квантил Q4 за 2018 г. Третата публикация е отпечатана в научното списание „Microorganisms“, което има импакт фактор 4,926 и квантил Q2 за 2022 г. Макар, че публикациите са колективни, водещ автор е докторантът, който е участвал активно в методичното и теоретично разработване на статиите.

Публикациите, съдейки по техните заглавия, отразяват част от резултатите в дисертацията. Няма забелязани цитирания, тъй като те са представени на вниманието на научната общност неотдавна; в бъдеще несъмнено се очакват позовавания.

Приложените публикации покриват минималните национални изисквания и специфичните изисквания на МУ – Плевен (минимум 3 статии реферирани и индексирани в Scopus и Web of science за професионално направление 4.3) за придобиване на ОНС Доктор.

9. Лично участие на докторанта

Разработеният дисертационен труд е лично дело на докторанта. Получените резултати и формулираните приноси с научен и научно-приложен характер са негова лична заслуга. Александър Блажев израства като специалист в изследването на кърлежи като вектори на трансмисивни зоонози с важно теоретично и практично значение. Усвоил е разнообразни методи, които успешно прилага, а получените резултати творчески анализира и интерпретира. Личният принос на докторанта в осъществяването на всеки един етап от дисертационния труд е подчертан и не буди съмнение.

10. Автореферат

Авторефератът е с обем от 71 страници, изготвен е прецизно и съобразно изискванията. Неговото съдържание отразява коректно всички раздели на дисертационния труд, основните резултати, постижения и приноси с научен и научно-приложен характер. В Приложенията са включени списъци с публикациите по темата на дисертацията и участията в научни конференции и проекти на автора.

11. Критични забележки и препоръки

Към работата имам следните критични бележки и препоръки:

Допуснати са грешки в номерирането на страниците на дисертацията (след 69 страница номерирането започва от страница №2), което е свързано и с грешки в Съдържанието. Предполагам, че това е техническа грешка, свързана с автоматичното извличане и съставяне на Съдържанието чрез текстови редактор, но това създава трудности за читателя.

Има несъответствие по отношение на периода на събиране на материала, представен в главата „Материал и методи“ – „5-годишен период между 2016 и 2021 г.“ и в главата „Резултати“ – „7 години (2016-2022 г.)“. Същата грешка се открива и в Автореферата.

По структурата на дисертационния труд – „Приложенията“ принципно трябва да стоят след главата „Литература“. Добре би било да се оформи самостоятелна глава „Обобщени резултати“, която да предхожда „Изводи“ и да представя в съкратен вид постигнатите резултати по заложените от докторанта задачи. Въпреки, че в главата „Резултати“ в края на всеки подотдел са синтезирани конкретните резултати, считам, че отделянето им в самостоятелна глава ги прави по-леснодостъпни за читателя.

В глава „Литература“ не са представени целите авторски колективи при литературните източници с повече от трима автори, а е даден само първи автор et al., което считам че е грешка. Според правилата за цитиране, авторските колективи трябва да са изписани изцяло, като изключения се допускат при колективи с повече от 21 автора (напримар при АРА стила).

Смятам, че Авторефератът е твърде обемен – 71 страници. Би могло част от главата „Материал и методи“ да бъде редуцирана, тъй като касае стандартни методи и протоколи (изолиране на ДНК, полимеразно-верижна реакция (PCR) и др.)

В предоставения от докторанта списък със забелязани цитирания, откривам два автоцитата на публикацията, номерирана под №8 (Atanasova M, Petkova Z, Pechlivanova D, Dragomirova P, Blazhev A, Tchekalarova J. Strain-dependent effects of long-term treatment with melatonin on kainic acid-induced status epilepticus, oxidative stress and the expression of heat shock proteins. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 2013; 111: 44-50), тъй като цитираната и цитиращите публикации имат по един общ автор.

Имам препоръка по отношение на публикациите на докторантите по темата на дисертацията. Установявам, че такова изискване за предоставяне на пълните текстове на публикациите, не е включено в Правилника за развитие на академичния състав на МУ – Плевен, но би било много полезно за рецензентите да могат да се запознаят с тях и да оценят научната им стойност.

12. Лични впечатления

Познавам докторанта единствено от контактите ни свързани с процедурата по придобиване на ОНС Доктор и заседанието по апробиране на дисертационния труд. Личните ми впечатления, които съм изградила за този кратък период, са отлични. Александър Блажев е отговорен и всеотдаен в работата си, трудолюбив като изследовател и отзивчив като човек. Убедена съм, че тези негови качества са гаранция за бъдещото му професионално развитие и постигане на успехи в научноизследователската работа.

13. Препоръки за бъдещо използване на дисертационните приноси и резултати

Препоръчвам представените в дисертацията резултати да се предоставят на РЗИ – Плевен, за да се прилагат научно-обосновани подходи при оценка на риска от заразяване на населението с ЛБ в региона и прилагането на програми за контрол и превенция. Въпреки, че дисертацията представя едно регионално проучване, то може да послужи като модел за провеждане на подобни изследвания в други части на страната и чрез прилагане на комплексна методика да се очертаят по-точно ендемичните по отношение на ЛБ райони в България.

Препоръчвам на докторанта да разшири своите популационно-генетични изследвания, прилагайки вече усвоени методи и върху други кърлежово-преносими инфекции срещащи се в България като марсилска треска, ку-треска и кримска-конго хеморагична треска.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Всичко горепосочено безспорно показва, че в процеса на разработване на дисертационния си труд Александър Блажев е придобил задълбочени теоретични знания и практически умения за работа в областта на акарологията и епидемиологията. Той демонстрира качества и умения за самостоятелно провеждане на научно изследване, да анализира и обобщава резултати, да прави обосновани

заклучения. Дисертационният труд съдържа оригинални научни и научно-приложни резултати със съществено значение за общественото здраве, и притежава характеристиките на ценно фундаментално изследване с потенциал за бъдещо развитие. Представените от докторанта документи отговарят на всички изисквания на Закона за развитие на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ), Правилника за прилагане на ЗРАСРБ и съответния Правилник на МУ – Плевен за придобиване на ОНС Доктор.

Убедено давам своята **положителна оценка** за проведеното изследване, представено от рецензираните по-горе дисертационен труд, автореферат, публикации, постигнати резултати и приноси, и **предлагам на почитаемото научно жури да присъди образователната и научна степен „доктор“** на Александър Божидаров Блажев в област на висше образование: 4. Природни науки, математика и информатика, професионално направление 4.3. Биологически науки докторска програма Медицинска биология.

20.05.2023 г.

Рецензент: **На основание чл. 59 от ЗЗЛД**
.....

(доц. д-р Анелия Стоянова)

REVIEW
by Anelia Mihaylova Stojanova, PhD
Associate Professor at the Department of Zoology, Faculty of Biology, University of Plovdiv "Paisii Hilendarski"

of a dissertation for awarding the educational and scientific degree "**Doctor of Philosophy**"

Field of higher education: 4. Natural sciences, mathematics and informatics

Professional direction: 4.3. Biological Sciences

Doctoral program: Medical biology

Author: Alexander Bozhidarov Blazhev

Topic: „Investigation of *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato Infection in Ixodid Ticks in the Pleven Region“

Scientific supervisors: Prof. Dr. Milena Karcheva, M.D. and Assoc. Prof. Milena Atanasova, M.D. from Medical University – Pleven.

1. General description of the presented materials

By order No. 1247 of 25 April 2023 r. of the Rector of the Medical University – Pleven (MU), I have been appointed as a member of the scientific jury to participate in a procedure for the defense of the PhD thesis titled „Investigation of *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato Infection in Ixodid Ticks in the Pleven Region“ for awarding the educational and scientific degree "Doctor of Philosophy", in the field of higher education 4. Natural sciences, mathematics and informatics, professional direction 4.3. Biological Sciences, Doctoral program Medical biology. The author of the PhD thesis is Alexander Bozhidarov Blazhev – a PhD student in free form of education at the Department of Anatomy, Histology, Cytology and Biology, with scientific supervisors Prof. Dr. Milena Karcheva, M.D. and Assoc. Prof. Milena Atanasova, M.D. from the Medical University – Pleven.

The presented set of materials by Alexander Bozhidarov Blazhev in electronic form is in accordance with Article 34 and Annex No. 2 of the Regulations for the Development of the Academic Staff of MU – Pleven and includes the following documents:

- application to the Rector of MU - Pleven for admission to the defense of a dissertation in front of a Scientific Jury;
- CV;
- Master's degree certificate;
- diploma of a recognised speciality;
- protocol of the Departmental Council (DC) with a proposal for enrolment in a doctoral program;
- order of the Rector for enrolment in doctoral program;
- individual curriculum approved by the Faculty Council;
- protocol of the examination for the doctoral minimum in the specialty and a list of examined topics;
- protocol of the DC with a proposal to open an approbation procedure;
- protocol from the extended DC of the approbation;
- Order of the Rector for completion of studies with the right of defense of the PhD thesis;
- author's reference for compliance and fulfillment of the minimum national requirements in the respective professional field and scientific specialty;
- list of publications in full text related to the PhD thesis;
- list of citations;

- list of participations in research projects;
- list of participations in scientific forums;
- Dissertation for the award of PhD;
- Abstract.

The PhD student has presented three publications thematically related to the thesis and published in renowned peer reviewed scientific journals, indexed in the Web of Science and Scopus databases. Alexander Blazhev is the first author in all three articles.

All necessary documents have been submitted and prepared accurately, according the Regulations for the Development of the Academic Staff of the MU – Pleven.

2. Brief biographical data of the PhD student

Alexander Blazhev has a Master's degree in Biology with specialisation in Museums, Zoological and Botanical Gardens from the Faculty of Biology of University of Plovdiv "Paisii Hilendarski" (1994 – 1999). In 2009 he obtained a degree in Medical Biology at MU - Pleven. The two acquired specialties, "biology" and "medical biology", provide an excellent theoretical basis for execution of the research on the topic chosen for the thesis. From 2018 to 2022 he is a PhD student in free form of education at the Department of Anatomy, Histology, Cytology and Biology of MU - Pleven in the PhD program "Medical Biology". The PhD student has achieved distinction in the examination on doctoral minimum, and from the Certificate issued by the Vice-Rector for Research of MU, it is evident that Alexander Blazhev has fulfilled all the activities of the doctoral program set out in the Individual Plan and has acquired 281 credits (220 credits required).

Since 2002 Alexander Blazhev has been employed as an assistant professor in the area of Biology of the Department of Anatomy, Histology, Cytology and Biology of MU - Pleven. He has actively participated in projects, national and international conferences, educational programs and seminars.

The PhD student has submitted a citations list from the period 01.01.2022 - 25.04.2023 containing journal articles outside the topic of the thesis, mainly in the field of immunology.

Alexander Blazhev has presented a list of 8 participations in scientific forums in Bulgaria and abroad, five of which were during his education as a PhD student and are related to the topic of the dissertation.

The PhD student has participated in two research projects funded by MU - Pleven and were aimed at studying the distribution and infection with *Borrelia burgdorferi* s.l. in Ixodid ticks in the Pleven region.

3. Relevance of the topic and suitability of the set aim and objectives

From the introduction of the dissertation and the literature review on the subject, it is clear that the study of vectors of transmissible zoonoses, in this case ticks, and their infectivity with *Borrelia*, is topical and has great practical and social relevance. Lyme borreliosis (LB), which is an infectious disease of natural prevalence, is a leading transmissible zoonosis in Bulgaria with major public health significance. The vectors for the disease are ticks of the genus *Ixodes*, and the species *Ixodes ricinus* is widely spread in urban and suburban habitats, such as parks, eco-trails, recreational and tourism areas, which significantly increases the epidemiological risk for humans.

Ticks, as vectors of transmissible zoonoses in humans, are of great medical importance and investigating their population densities and interactions with the natural and social environment in the face of changing climatic factors would substantially assist epidemiological risk assessment.

The aim of this thesis is clearly stated, namely to study and characterise the infectiousness of *I. ricinus* with *B. burgdorferi* s.l. in the Pleven region by molecular and

biological methods and to identify outbreaks with high population densities of Ixodid ticks to assess the risk of infection of the population in the region. It fully corresponds to the thesis topic and is aimed at solving relevant problems. In relation to the implementation of the aim, several specific objectives were set: investigation the ixodofauna in the geographical study area and the infestation with *B. burgdorferi* s.l., identification and mapping of geographical areas with high population densities of Ixodid ticks, posing an increased epidemiological risk to the population, isolation of DNA from the vectors and performing PCR analysis to confirm the presence of *B. burgdorferi* s.l. enabling to assess the risk of infection of the population. The results achieved in this dissertation meet the stated aim and objectives and support the need for current research on ticks as vectors.

Furthermore, the thesis topic is in line with the European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) strategies against vector-borne infections.

Therefore, the relevance of the problem researched in the dissertation in scientific, applied and medical aspects can be undoubtedly determined.

4. Comprehension of the research question

Alexander Blazhev has demonstrated a profound understanding of the current state of the research problem, which is evidenced by the accurate and detailed literature review, by the skillful use of information from literature sources on the topic, by the analysis and critical evaluation of previous studies, and by the chosen approach for presenting the known information on the topic to date. Of special interest here is the detailed review concerning the biology of *B. burgdorferi* s.l., the morphological and anatomical characteristics of the Ixodid ticks, the clinical symptoms of the infection and the data on LB in Bulgaria. The literature review presents useful, systematic and up-to-date information in an appropriate style that can be used by specialists from different fields.

The PhD student's understanding of the problem and ability to use available information creatively is demonstrated in the following chapters of the thesis, where the literature is used critically in the interpretation of the results.

5. Research methodology

The selected methods and approaches of research in the dissertation allow to for the stated aim and to be achieved and to obtain an appropriately address the objectives stated in the dissertation.

For the retrospective epidemiological study on the prevalence of LB in Pleven region and Bulgaria, data were collected, processed and analysed by the National Statistical Institute, the National Center for Public Health and Analyses and the Regional Health Inspectorate - Pleven and cover the period from 2001 to 2021. The tick population survey was conducted over a 7-year period between 2016 and 2022, during the spring-summer season from March to the end of June. A total of 75 collection campaigns were conducted, collecting 1459 specimens, of which 1376 specimens were collected using the standard white cotton cloth flagging method. Areas in Pleven district, which have not been the focus of in-depth surveys in recent decades for Ixodid ticks, were selected as the geographical study area. For the detection of *B. burgdorferi* s.l. in the intestinal contents of *I. ricinus*, dark-field microscopy was applied, and the isolation of tick DNA and subsequent nested PCR analysis were performed according to standard methodology. The application of modern statistical methods and data processing programs, which ensures correct interpretation of the obtained results, has been performed to a high standard.

I consider that all the methods selected and used in the dissertation work for solving the set objectives are appropriate, modern, are used correctly in the course of the work and enable obtaining valuable results and achieving the aim set by the PhD student.

6. Characterisation and evaluation of the dissertation work

The dissertation contains 175 pages and is illustrated with 29 tables, 39 figures and 13 epizootological maps. The bibliographic reference list includes 266 sources from the literature, of which only 17 are in Bulgarian. The PhD thesis is structured in 10 chapters, respectively:

1. Introduction; 2. Literature review; 3. Aim and objectives; 4. Materials and methods; 5. Results; 6. Discussion; 7. Summary conclusions; 8. Contributions; 9. Appendices; 10. References.

-1. Introduction. In the introductory chapter, the PhD student presents the studied group of Ixodid ticks, their species diversity, their medical importance as vectors of transmissible zoonoses and the need for a more detailed study of tick populations and associated pathogens. Without being voluminous, this section introduces the reader to the researched problem and the topic of the thesis.

-2. Literature review. In this chapter, the PhD student makes a comprehensive literature review on the topic of the dissertation and structures the presentation in several subchapters concerning: the pathogen *B. burgdorferi* s.l. - morphology, membrane proteins, genome and taxonomy; ticks of the family Ixodidae - taxonomy, systematics, morpho-anatomical characteristics, ecology and life cycle; interaction between ticks and *B. burgdorferi* s.l.; geographical distribution of LB and data on the distribution and epidemiology of LB in Bulgaria; clinical symptoms of the infection, diagnosis, treatment and prophylaxis. The literature review is detailed, accurately done, covering the different aspects concerning the topic of the study, presented in a very good style and could be used by specialists interested in the problem.

-3. Aim and objectives. The aim of the study - through identification and analysis of the ixodofauna in Pleven region and characterisation of the infectiousness of *I. ricinus* with *B. burgdorferi* s.l., to identify outbreaks with tick populations and to assess the risk of infection of the population in the district, is clearly formulated and eight objectives are presented for its achievement; the specific objectives are appropriately chosen and their implementation allows to develop the problem.

-4. Materials and Methods. This chapter contains 26 pages and presents in good order all the methods and approaches that have been applied in the work of this thesis. The methods are well chosen, the areas of study are characterised; the biological material was collected personally by the PhD student and the volume is sufficient to provide an appropriate sample size that can be objectively interpreted in terms of real results and conclusions.

-5. Results. The results obtained in this dissertation are presented and arranged in accordance with the set objectives, giving a very good impression. The results are accurately illustrated with figures and tables that allow them to be easily analysed, summarised and discussed. The 13 epizootological maps correctly present the results for the populations of *I. ricinus* and can be successfully used to assess the bite risk in humans in the study area.

-6. Discussion. The discussion in this dissertation is presented in sections corresponding to the structure of the results and the set objectives, which allows the reader to easily follow the covered topics. Here the competence of the PhD student, his ability to analyse the results and compare the data obtained with the published literature in light of modern scientific advances is evident. The style and language of the presentation are very good.

-7. Summary conclusions. Based on the summarised results and discussion, 10 conclusions are drawn. Some of them (Nos. 5, 6, 7 and 8) are not formulated correctly and reflect results rather than providing a basis for scientific conclusions.

-8. Contributions. The contributions in the thesis are clearly formulated and presented in two separate groups: 1/ Contributions of original character: they are derived from the summarised results, eight in total; 2/ Contributions of confirmatory character: the medical significance of *I. ricinus* as a vector of LB is confirmed.

-9. Appendices. The PhD student has attached lists of scientific publications related to the dissertation and participation in scientific forums and projects.

-10. References. The literature cited in the dissertation comprises of 283 literary sources, of which 17 are in Bulgarian. They are numbered in the reference list and arranged in order of citation in the text. The wide range of literature used is noteworthy, which undoubtedly provides a real basis for the evaluation and presentation of the PhD student's original research.

7. Contributions and significance of the work for science and practice

The thesis allows for the following contributions to be outlined:

Original Contributions - data from a retrospective epidemiological study of people with proven LB are summarised; for the first time in the Pleven region a study of populations of Ixodid ticks in areas with regular grass treatments and natural unmaintained areas is made; studies on populations of *I. ricinus* have been conducted and ticks have been tested for the presence of spirochetes of the *B. burgdorferi* s.l.; a rare for Bulgaria ornithophilous species *Ixodes frontalis* is reported.

Confirmatory contributions - the important epidemiological significance of *I. ricinus* in the cycle of *B. burgdorferi* s.l. and the transstadial transmission route of the pathogen have been confirmed; the unimodal activity pattern of *I. ricinus* and the influence of abiotic factors have also been confirmed.

Applied science contributions - distributional maps of *I. ricinus* and vectors infected with *Borelia* in the Pleven region, based on a 7-year survey have been prepared; maps demonstrate that the region has outbreaks with increased risk to human public health.

8. Assessment of publications related to the dissertation

Alexander Blazhev has submitted three publications on the topic of the dissertation, carrying 44 points (30 points required), according to the minimum national requirements under indicator group "D". Two of the publications were published in the journal "General Medicine" (in Bulgarian) which is a peer reviewed scientific journal, indexed in the Web of Science (CABI) and Scopus databases (quartile Q4 for 2018). The third publication was published in the scientific journal Microorganisms, which has an IF 4.926 (quartile Q2 for 2022). Although the publications are collaborative, Alexander Blazhev is the first author who was actively involved in the methodological and theoretical work on the articles.

According to their titles, the publications reflect some of the results in this dissertation. There are no citations noted as they have been published recently; future references are undoubtedly expected.

The enclosed publications meet the minimum national requirements and the specific requirements of MU - Pleven (minimum 3 articles refereed and indexed in Scopus and Web of science for professional field 4.3) for awarding the educational and scientific degree "Doctor of Philosophy".

9. Contribution of the PhD student

The dissertation is a personal work of the PhD student. The achieved results and formulated contributions are a personal merit of Alexander Blazhev. He has developed as a specialist in the research of ticks as vectors of transmissible zoonoses with important theoretical and practical significance. He has mastered a variety of methods, which he has

successfully applied, and creatively analysed and interpreted the results obtained. The personal contribution of the PhD student to the implementation of each stage of the dissertation work is evident.

10. Abstract of the PhD thesis

The Abstract consists of 71 pages and is prepared accurately and according to the requirements. Its content correctly presents all sections of the dissertation work and reflects the results and original scientific and applied-scientific contributions achieved in the dissertation.

The Appendices include lists of publications on the topic of the dissertation and the author's participation in scientific conferences and projects.

11. Critical remarks and recommendations

I have the following critical remarks and recommendations:

There are some errors in the numbering of the pages of the thesis (after page 69 the numbering starts from page 2), which is related to mistakes in the Table of Contents. I assume this is a technical error related to the automatic extraction and composition of the Table of Contents by a text editor, but this creates difficulties for the reader.

There is a discrepancy in the collection period presented in the Material and Methods chapter - "5-year period between 2016 and 2021" and in the Results chapter - "7 years (2016-2022)". The same mistake is also found in the Abstract.

According to the structure of the dissertation - "Appendices" should generally follow the chapter "References". It would be good to compile a separate chapter "Results Summary", which should precede "Conclusions" and present in a concise form the achieved results in relation to the objectives set by the PhD student. Although the "Results" chapter at the end of each sub-section synthesises the specific results, I believe that separating them into a separate chapter makes them more accessible to the reader.

In the "References" chapter, the entire author collectives are not presented for references with more than three authors, but only the first author et al. are given, which I believe is not correct. According to the citation rules, author collectives should be listed in full, with exceptions allowed for collectives with more than 21 authors (e.g. APA style).

I think that the Abstract is too large - 71 pages. To remedy this part of the chapter "Materials and Methods" could be reduced as it concerns standard methods and protocols (DNA isolation, PCR, etc.).

In the list of citations of published articles by the PhD student, I have found two autocitations, numbered under No. 8 (Atanasova M, Petkova Z, Pechlivanova D, Dragomirova P, Blazhev A, Tchekalarova J. Strain-dependent effects of long-term treatment with melatonin on kainic acid-induced status epilepticus, oxidative stress and the expression of heat shock proteins. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 2013; 111: 44-50), as one of the authors appears both in the article authored by the PhD student and the provided citation, making it an autocitation, which should not be included.

While the full texts of the publications of PhD students on the topic of the dissertation are not required to be provided according to the Regulations for the Development of the Academic Staff of the MU – Pleven, but it would be very useful for the reviewers to be able to read them and assess their scientific value. Thus I recommend the full published articles are included in an appendix.

12. Personal impressions

I have known Alexander Blazhev only from our contacts related to the procedure for acquiring the PhD degree and the thesis approbation meeting. My personal impressions,

which I have built during this short period, are excellent. Alexander Blazhev is responsible, organised and dedicated to his work, hardworking as a researcher and cooperative as a person. I am convinced that these qualities will ensure his professional development and achieve success in research work.

13. Recommendations for future use of dissertation contributions and results

I recommend that the results presented in this thesis be provided to the Regional Health Inspectorate - Pleven in order to apply science-based approaches in assessing the risk of LB infection of the population in the region and implementing control and prevention programs. Although the dissertation presents a regional study, it can be used as a model for conducting similar studies in other parts of the country and by applying a complex methodology to map more precisely the LB endemic areas in Bulgaria.

I recommend the PhD student to extend his population-genetic studies by applying already mastered methods to other tick-borne infections occurring in Bulgaria such as Marseille fever, Ku-fever and Crimean Congo haemorrhagic fever.

CONCLUSION

Everything presented above undoubtedly shows that in the process of developing his dissertation, Alexander Blazhev acquired an in-depth theoretical knowledge and practical skills for work in the field of acarology and epidemiology.

He demonstrates abilities for independently conducting scientific research, analysing and summarising results, and drawing reasonable conclusions.

The dissertation contains scientific and applied-scientific results essential to public health, and has the characteristics of valuable research with potential for future development. The submitted documents meet all the requirements of the Law on the Development of the Academic Staff in the Republic of Bulgaria, the Regulations for its implementation and the relevant Regulations of the Medical University – Pleven for the acquisition of the educational and scientific degree "Doctor of Philosophy".

I confidently give my **positive assessment** of the conducted research, presented by the above-reviewed dissertation, abstract, publications, the achieved results and contributions, and **I propose to the respected scientific jury to award the educational and scientific degree "doctor" to Alexander Bozhidarov Blazhev** in the field of higher education 4. Natural sciences, mathematics and informatics, professional direction 4.3. Biological Sciences, Doctoral Program Medical Biology.

20.05.2023 г.

Review prepared by: **На основание чл. 59 от ЗЗЛД**

(Assoc. Prof. Anelia Stojanova, PhD)