

СТАНОВИЩЕ

От доц. д-р Стоянка Стоицова

Член на научното жури, сформирано със Заповед I-163/26.11.2024 на Директора на Института по микробиология "Стефан Ангелов", БАН

За защита и придобиване на образователна и научна степен "Доктор" в професионално направление Област 4. "Природни науки, математика и информатика", професионално направление 4.3 "Биологични науки", научна специалност "Микробиология"

На дисертационния труд на **Даяна Бориславова Борисова**

На тема: "Сравнителни изследвания на щамове *Pseudomonas aeruginosa*, изолирани от пациенти с муковисцидоза преди и след инхалаторна терапия с tobramycin"

Научни ръководители: доц. д-р Стоянка Стоицова и проф. д.м.н. Таня Стратева

Актуалност на разработвания научен проблем:

Нарастващите в глобален план проблеми, свързани с все по-големите затруднения на медицината при антибиотичната терапия на бактериални инфекции, поставят редица въпроси. Сред тях, редом с разкриването на генетично обусловените механизми на резистентност, вниманието се насочи и към явлението "толерантност", свързано с набори от фенотипни адаптации на бактериите, даващи им възможност за оцеляване в присъствието на антибиотици. Става дума за механизми, при които бактериите, въпреки че са чувствителни към даден антибиотик, оцеляват след третирането на пациентите и стават източник на хронични и рецидивиращи инфекции. Този тип поведение на патогените характеризира голяма част от случаите на хронични инфекции с *P. aeruginosa* при пациенти с генетичното заболяване муковисцидоза. В хода на рутинното проследяване на тези пациенти могат да бъдат изолирани щамове от различни етапи на заболяването. В последните години това даде възможност за установяване на нови факти за микроеволюцията на бактериалните щамове в пациентите (т.нар. "within-host" еволюция). Един от важните фактори, определящи ин хост еволюцията на патогените, е селективното налягане на антибиотиците. Въпреки това до момента насочените изследвания на ин-хост промените на бактериите под въздействието на антибиотично лечение са откъслечни. Това определя актуалността на дисертационния труд на Даяна Борисова. Фокусът в него са именно осъществените "ин хост", в белия дроб на пациенти с муковисцидоза, промени на *P.*

aeruginosa, под въздействието на инхалаторна терапия с тобрамицин. За целта е проведено сравнително изследване на 6 двойки щамове, всяка от които е изолирана от един и същи пациент преди и след терапията. Щамове за разработката са предоставени от проф.д.м.н. Т. Стратева, другият научен ръководител на докторанта.

Оценка на представените материали

Материалите, предоставени ми във връзка с процедурата, са подготвени в съответствие с изискванията на ЗРАС. Дисертационният труд е с приетата за дисертационни разработки структура. Той е с обем от 148 страници, сред които: въведение от 2 стр., литературен обзор от 37 стр., материал и методи - 14 стр., резултати и обсъждане - 69 стр., изводи и приноси. Литературната справка включва 240 заглавия и 7 уеб страници, като около 30% от цитираните статии са от последните 5 години. Дисертацията е илюстрирана с 48 фигури (от които 9 - като цитати в литературната справка и 2 схеми, илюстриращи методологичната част, а от оригиналните 37 фигури 24 включват по два и повече панелни елемента - графики или електронно микроскопски снимки) и 15 таблици (2 от тях - обобщаващи данни от литературата, 4 в методологичната част и 9 с оригинални резултати).

Резултатите са подразделени в три основни части: (1) Молекулярно епидемиологичната част показва клонална свързаност на 5 от изходните щамове, изолирани преди третирането, и генетична диверсификация спрямо тях на щамове, изолирани от същите пациенти след въздействието с инхалаторния тобрамицин. (2) Фенотипно сравнение между щамове в двойките включва характеристики, определяни в литературата като адаптивни за изолати от хронични инфекции. Изследването на растежните параметри показва тенденция към намаляване на скоростта на растеж и удължаване на генерационното време и на лаг-фазата при щамове, изолирани след терапията, в сравнение с щамове от преди третирането от съответните чифтове. Тази тенденция е изразена по-ясно, когато култивирането се провежда в минимална солева среда, както и при двойките щамове, изолирани от по-възрастните пациенти, за които се предполага по-напреднал етап на колонизацията и адаптирането на *P. aeruginosa*. Щамове са биофилм-образуващи, инвазивни, способни за размножаване в еукариотни клетки, като по тези признаци не се установява разлика между изолатите от преди- и след-третирането. (3) Изследване на фенотипния отговор на изолатите при култивирането им в присъствието на суб-летални концентрации (1/4 и 1/2 МИК) на

антибиотика тобрамицин. Проследени са растежът, биофилм образуването и виталността на щамовете. Резултатите от последната група тестове, представени като процент от нетретираните контроли, сочат по-добра приспособеност към препарата при щамовете, изолирани след третиране, спрямо съответните им чифтни от преди третирането. Установява се също потискане на подвижността.

Въз основа на резултатите са направени 12 извода и са формулирани 4 приноса. В качеството ми на научен ръководител потвърждавам, че представените експериментални резултати са оригинални и лично дело на докторанта.

Заклучение

Дисертационният труд на Даяна Борисова обобщава резултати, свързани с адаптацията на един опортюнистичен патоген, *P. aeruginosa*, към хронично колонизиране в една строго специфична среда - белия дроб на пациенти с муковисцидоза. Сравнението на характеристиките на щамове, изолирани преди и след третирането с инхалаторен антибиотичен препарат, с цел изясняване на адаптациите на щамовете за оцеляване в присъствието на антибиотика, е оригинално по замисъла си, за което трябва да се подчертае приноса на другия научен ръководител, професор д.м.н. Таня Стратева. Работа по дисертационния труд даде възможност на Даяна Борисова да придобие изследователски умения както по отношение на методологията, така и при работа с литературата. Дисертационният труд и всички предоставени ми материали по защитата, във връзка както с научната, така и с образователната програма на докторанта, са в пълно съответствие с изискванията на ЗРАС и Правилниците за прилагането му в Република България, БАН, и Института по микробиология "Стефан Ангелов". Това ми дава основание убедено да отправя предложение пред НЖ за присъждане на ОНС "Доктор" на Даяна Бориславова Борисова.

03.02.2025 г.

София

Изготвила становището:

/Доц. д-р Стоянка Стоицова/