

РЕЦЕНЗИЯ
на дисертация на тема:

"Сравнителни изследвания щамове *Pseudomonas aeruginosa*, изолирани от пациенти с муковисцидоза, преди и след инхалаторна терапия с tobramycin"
Професионално направление 4.3. Биологични науки (Микробиология)

Автор: Даяна Бориславова Борисова, докторант на свободна подготовка
Научни ръководители: Доц. д-р Стоянка Рангелова Стоицова и Проф. д-р Тания Василева Стратева, д.м.
Рецензент: доц. д-р Златка Алексиева

Даяна Борисова е завършила ОКС „Бакалавър“ по Молекулярна биология и ОКС „Магистър“ по Микробиология и микробиологичен контрол в Биологически факултет на СУ. От 2013 г. работи в Института по микробиология на БАН, като от 2016 г. е назначена като асистент, а на 01.04.2018 г. е зачислена като докторант на свободна подготовка.

Темата на представеният труд е посветена на проучването на влиянието на инхалаторната терапия с антибиотика тобрамицин върху щамове *Pseudomonas aeruginosa* в проеса на лечението на пациенти с муковисцидоза.

Представеният проект на дисертация е традиционно структуриран, в рамките на 150 стандартни страници, 15 от които заема цитираната литература. В списъка на цитираната литература са включени 239 литературни източници и 9 Уеб страници. Материалът е отлично илюстриран с 14 таблици и 51 фигури. 41 от фигурите илюстрират резултатите и могат да се определят като авторски и 10 са илюстрации към литературния обзор и методичната част, като 9 от тях са коректно цитирани, а една е авторска.

Въведението дава обща информация за характера и разпространението на заболяването муковисцидоза и водещата роля на патогенната бактерия от вида *Pseudomonas aeruginosa* върху различни етапи на заболяването. Без съмнение, темата и планираните изследвания, засягащи механизмите за овладяване на проявите на МВ са актуални, с оглед на значителният брой засегнати от това „рядко“, тежко заболяване хора, както по света, така и у нас. Световната здравна организация (СЗО) включва *P. aeruginosa* към групата ESKAPE патогени, които представляват глобален риск заради нарастващата им резистентност към лечение. Актуалността на представената дисертационна разработка се потвърждава и от факта, че над 30% /73/ от използваната литература са от последните 5 години.

До момента липсва информация за възможното участие на отделен антибиотик в развитието на адаптационни промени при *Pseudomonas aeruginosa*, което определя оригиналността на представеното изследване.

Литературният обзор започва с кратко описание на причината и особеностите на заболяването Муковисцидоза са представени бактериите, които колонизират поразения бял дроб. Като основен причинител на бронхопулмоналните инфекции са разгледани

бактериите *Pseudomonas aeruginosa*. Подчертана е ролята на щамове с мукоиден морфотип, които практически са неотстраними.

Подробно са разяснени механизмите, основно синтезирането на редица екзополisahариди, чрез които бактериите от вида *P. aeruginosa* успяват да намалят или изцяло да избегнат действието на антимикробните средства, особено когато са формирали биофилм.

Съществено внимание е отделено на множеството фактори на вирулентност на *P. aeruginosa*, както и на способността на тези щамове да се адаптират към различните етапи от протичане на заболяването, чрез формират устойчиви биофилми, увеличена мутационна честота, морфологични и биохимични промени.

Особен интерес предизвикват и щамове *P. aeruginosa*, способни да навлизат и да се размножават в еукариотни клетки - инвазивен фенотип. Представени са примери относно неизяснената роля на редица екзоензими в инвазивността на щамове. Не е изяснена и ролята на секреторната система тип III. Важна роля в инвазивността играят някои бактериални регулаторни механизми.

Авторката е обърнала сериозно внимание на молекулярните нарушения в ДНК репарацията, промяна на експресията на гените за мукоидност, формирането на персистентни клетки на щамове в бактериалните популации *P. aeruginosa*. Наблюдава се висока хетерогенност на клетъчните метаболитни пътища. В резултат на това се формират сложни и разнообразни бактериални съобщества, които променят своите характеристики в началото и следващите етапи на заболяването, както на генетично, така и на фенотипно ниво.

Голям дял в литературния обзор заема частта, посветена на лечението на МВ пациенти с бронхопулмонални инфекции, причинени от *P. aeruginosa*, с антимикробни лекарствени средства, бактериалната резистентност към широкото им използване и образуването на биофилми.

Като цяло, литературният обзор е написан компетентно, с много добро познаване на по-старата и съвременна научна литература, на решените и нерешени проблеми в проучването на ролята на *Pseudomonas aeruginosa* при пациенти с МВ и създава благоприятна информационна среда за провеждане на планираните в дисертацията изследвания.

Целта отразява ясно същността на дисертационната разработка: Да се проучи адаптацията на щамове *P. aeruginosa* към въздействието на тобрамицин, преди и след инхалаторна терапия с антибиотика, чрез сравнителен генотипен и фенотипен анализ. За изпълнението и са дефинирани 7 основни изследователски задачи, последната от които включва 4 подточки. Формулираните задачи очертават конкретният ход на изследванията.

В глава „Материали и методи“ са подробно описани използваните в научното изследване класически и най-съвременни подходи за анализ. Подходите обхващат редица микробиологични методи за култивиране, определяне на морфологични характеристики и подвижност на микробни клетки, определяне на инвазивността и вътреклетъчната преживяемост. Описани са методи за определяне на ефектите на суб-МПК тобрамицин върху микробните клетки и биофилми, молекулярно-биологични

методи (PCR, RAPD)–PCR), електронно-микроскопски (СЕМ), за морфометрична и статистическа обработка на данните и др.

В началото глава „Резултати и обсъждане“ са представени данни, получени в резултат на RAPD-PCR и последващ UPGMA анализи и илюстрираща връзката между 12 изолата *P. aeruginosa* от български пациенти с МВ и 14 референтни щамове *P. aeruginosa* от международен референтен панел. При използването на коефициента на сходство на Dice е създадено филогенетично дърво. Установено е високо сходство на щамовете, изолирани от български пациенти и щамове от международен референтен панел.

Подробно и паралелно са изследвани растежните криви на различните 6 двойки щамове на *P. aeruginosa* от серийни изолати от бял роб на пациенти с муковидцидоза. Двойките се състоят от щамове, изолирани преди и съответно след въздействие с тобрамицин. Установено е влиянието на различни по състав хранителни среди, вкл. минимални солеви среди, върху растежа, скоростта на растеж и генерационното време на щамове, изолирани преди и след лечение с антибиотика. Изследването утвърждава, че за МВ - щамове *P. aeruginosa*, ауксотрофията не е задължителен адаптивен елемент.

Установено е значително нарастване на продължителността на лаг-фазата на растеж на почти всички щамове, изолирани след инхалаторна терапия с тобрамицин в сравнение с техните чифтни щамове от преди инхалацията. Подобно наблюдение за връзка между удължаване на лаг-фазите и приложението *in vivo* в гостоприемника на антибактериално средство се съобщава за пръв път при ин хост еволюция на МВ щамове и не е описвано в литературата.

Важен принос имат изследванията, показващи възможностите на персистентните клетки в адаптацията на микробната култура и способността им да устояват на антибиотици чрез механизъм, различен от стандартната генетично-детерминирана резистентност.

В резултат на сравнителен анализ на образуването на биофилми са установени разликите в динамиката на развитието им, в зависимост от състава на хранителната среда. В изследването са установени широк диапазон на щам-специфичните реакции и не е наблюдавана определена обща тенденция в образуването на биофилм с оглед на момента на изолирането им или третирането им с тобрамицин.

Практически същият извод може да се направи и след провеждане на статистически анализ за сравнение на ефекта на трите среди върху растежа на щамовете в течна среда и като биофилм. Единствената постоянна тенденция се наблюдава при култивиране на щамовете в минимална минерална среда М63. Всички изследвани щамове имат най-слаб растеж в тази течна среда и най-добър растеж като биофилм, като това не се повлиява от проведената антибиотична терапия.

От изключителен интерес са резултатите, получени чрез проведените електронно микроскопски анализи (СЕМ) на морфологията на биофилмите. Голямата част от муковисцидозните щамове на *P. aeruginosa* са с мукоидна морфология на колониите, поради високо ниво на секреция на екзополисахариди. Този фенотип е характерен за влошеното състояние на МВ пациенти. При проведения анализ е установена ясна разлика между щамовете от различните двойки под влияние на прилагането на тобрамицин. При повечето от тях се наблюдава, че клетките не са така компактно опаковани в екстрацелуларния матрикс и биофилмът е по-неконсистентен,

но придруги двойки щамове мукозният матрикс нараства и се уплътнява. Установените структурни различия дават перспектива за изследвания, които да установят различията в състава на екстрацелуларния матрикс на биофилмите, образувани от различни щамове на *P. aeruginosa*, което ще е съществено при подхода за третирането с инхалирания тобрамицин.

Направено е много добро обсъждане на резултатите от морфометричния анализ на размера на бактериалните клетки, при което е отчетено увеличаване на размера им при четири от двойките, след въздействието с антибиотик. Тази реакция е слабо засегната в наличната литература и се отличава от стандартната, когато клетките, под влияние на неблагоприятни фактори стават по-дребни.

В следващите изследвания е проследена появата в две от двойките щамове на вариантни малки колонии (ВМК), чиято поява често е знак за увеличена устойчивост към антибиотици. Изследваните щамове на *P. aeruginosa* проявяват различна, сравнително добра степен на подвижност на клетките, която се дължи на наличието на флагели. Установено е относително слабо придвижване чрез "роене" при всички щамове, но с морфология, различна от описаната до сега в литературата за други щамове. Наблюдавано е практически отсъствие на подвижност чрез трептене, с изключение на 1 двойка щамове, при която то е по-слабо от отчетеното при референтния щам *P. aeruginosa* PAO1.

На следващ етап е изследвана инвазивността на щамове *P. aeruginosa* в белодробна карциномна клетъчна линия A549. Доказано е, че всички изследвани щамове са инвазивни и могат успешно да се размножават и вътреклетъчно в култивирани белодробни епителни клетки. Определен е щам (PaT-6), чиито характеристики на растежа го характеризират като щамът с най-добре развита способност да инвазира и да се размножава в гостоприемниковите клетки.

Оригинална информация дават експериментите за установяване на ефектите от предхождаща терапия върху растежа и развитието на оцелелите след лечението щамове в присъствието на суб-МПК (суб-минимална подтискаща концентрация) тобрамицин. От важно значение са изследванията, насочени към установяване на фенотипно-обусловена толерантност към присъствието на антибиотици, независимо от генетично-обусловената резистентност. В тази връзка е проследено влиянието на $\frac{1}{2}$ МПК и $\frac{1}{4}$ МПК на тобрамицин върху растежа и образуването на биофилми, виталност и подвижност на клетките в богата хранителна среда и в минерална среда. Въпреки известна хетерогенност в реакциите на отделни щамове, като цяло е установена по-добра приспособеност на всички изследвани щамове към присъствие на суб-МПК на антибиотика в сравнение с референтния щам *P. aeruginosa* PAO1. Трябва да се отбележи, че щамове излирани след *in vivo* третиране са по-толерантни към тобрамицина. В минерална среда, стойностите на тези параметри са сходни с данните за референтния щам.

В дисертационния труд, за първи път е проведено системно, насочено изследване за действието на субтерапевтични количества от антибиотика при МВ щамове, изолирани на различни етапи от инфекцията. По-голямата част от получените резултати имат оригинален характер и важно значение, както за продължаване на

фундаменталните изследвания в медицинската микробиология, така и за оптимизиране на прогнозите и процедурите за лечение на муковисцидозата.

В резултат на получените данни, Даяна Борисова формулира 12 изводи и 5 приноси, адекватно отразяващи получените при разработката на дисертационния труд резултати. Поставените задачи са изцяло изпълнени.

Тук е мястото да се подчертае компетентността на научните ръководители, както и на колектива на лаборатория „Клетъчна микробиология“, които от много години под ръководството на доц. Стойцова преди и по настоящем с доц. Паунова, успешно работят по теми, тясно свързани с механизмите на образуване и регулация на функционирането на микробни биофилми.

Към представената за защита дисертация нямам забележки, тъй като след вътрешната защита, препоръките ми са отразени.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

За времето на разработка на настоящия дисертационен труд, докторант Даяна Борисова е набрала 437 кредита, което е значително по-висок резултат от изисквания минимум от 250. Част от резултатите, включени в докторската разработка са публикувани в 2 статии, едната от които в Доклади на БАН, с ИФ – 0.321 и втората е в *Acta Microbiologica Bulgarica*. По темата на дисертацията е написана и глава от книга, издадена от международно издателство. Публикациите са цитирани 17 пъти. Изнесени са три доклада на 3 международни научни форума. Даяна Борисова е участник в 6 научни проекта, на 2 от които е ръководител. Общият брой публикации в които е съавтор, вкл. представените за защитата, е 12, 6 от тях са индексирани и реферирани в международни бази данни.

Поставените проблеми в представената разработка са оригинални, актуални и значими, основно за областта на фундаменталните микробиологични и медицински изследвания. Получените резултати, формулираните изводи и приносите са съответно оригинални и с висока научна стойност.

Докторант Даяна Борисова е използвала богат арсенал от класически и съвременни аналитични, биохимични, микробиологични и молекулярно-генетични методи, което я е изградило като високо квалифициран, методологично подготвен специалист.

Представеният за официална защита дисертационен труд на тема „Comparative investigations on *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from cystic fibrosis patients prior- and post- inhalatory tobramycin therapy“, на докторант Даяна Борисова напълно съответства на всички основни и допълнителни критерии, отразени в ЗРАСБ и Правилниците за приложението му в БАН и в Институт по микробиология към БАН. На основата на всичко изтъкнато до тук, убедено предлагам на колегите от Научното жури да гласуват за присъждане на научната и образователна степен „Доктор“ на Даяна Бориславова Борисова в професионално направление 4.3. Биологически науки.

05.02.2025

Изготвил рецензията:

/доц. д-р Златка Алексиева/