

РЕЦЕНЗИЯ

на научната дейност на гл. ас., д-р Цветелина Паунова - Кръстева, участник в конкурс за доцент по научно направление 4.3. Биологически науки (Микробиология), обявен в ДВ брой 12 от 12.02.2021, за нуждите на Департамент по „Общамикробиология“, лаборатория „Клетъчна микробиология“ към Институт по микробиология „Стефан Ангелов“, БАН

Рецензент: доц., д-р Златка Милчева Алексиева, Институт по микробиология, БАН

Д-р Цветелина Паунова - Кръстева, гл. ас. в лаборатория „Клетъчна микробиология“ към Департамент по „Обща микробиология“ в И-т по микробиология, БАН е единственият кандидат, подал документи по обявения конкурс.

ПРОФЕСИОНАЛНА БИОГРАФИЯ

Д-р Цветелина Паунова – Кръстева придобива магистърска степен по „Микробиология и микробиологичен контрол“ към Катедра „Обща и промишлена микробиология“ на Биологически факултет, СУ „Св. Климент Охридски“ през 2005 година. Постъпва като специалист биолог в Института по микробиология на БАН през същата година, а от началото на 2011 е асистент. През 2015 година защитава дисертация на тема „Фенотипни вариации свързани с полизахаридните антигени при *Escherichia coli* O157“, а през 2016 г. печели конкурс за научната длъжност „Главен асистент“.

През цялата си кариера в Института, д-р Цветелина Паунова работи в секция „Морфология на микроорганизмите и електронна микроскопия“, която влезе в новата структура на Института под название лаборатория „Клетъчна микробиология“ към Департамент по Обща микробиология. От края на 2020 г. д-р Цветелина Паунова е ръководител на лабораторията.

Д-р Цветелина Паунова е осъществила 11 специализации в това число 8 специализирани тренировъчни курсове в редица европейски научни институции като: Университет Федерико II, Неапол; Хеленик Институт Пастьор; Университет Вроцлав; Научно изследователски институт San Raffaele, Милано; Университет в Тюбинген; Институт по Молекулярна патология“, Виена; FEI NanoPort –FEI Academy, Айндховен. Провела е 2 специализации по Програма Еразъм в Университета в Гент, Белгия и Обединено звено на Институт по молекулярна биотехнология на Грегор Мендел, Института по молекулярна биотехнология (IMBA), Изследователския институт по молекулярна патология (IMP), Виена, Австрия и 1 специализация по проект PTR-43-16 „Роля на нуклеотидил циклазата EhoY при инфекции с *Pseudomonas aeruginosa*“, Институт Пастьор, Париж.

Д-р Цветелина Паунова е получила 7 награди, сред които FEMS – Грант за мобилност на млад учен – 2007 г.; Едногодишен грант от Световната Федерация на учените. „National Scholarship Competition 2013“; Високи научни постижения в дисертации за 2015“ от Съюз на учените в България; Най-успешен проект, финансиран по „Програма за подпомагане на младите учени и докторанти в БАН – 2017; награда за 2014 г. от фондация „Стефан Ангелов“ и др.

Д-р Цветелина Паунова е ръководител на 5 научно-изследователски проекти, 2 от които международни, 2 по – Програма за подпомагане на младите учени в БАН и 1 финансиран от МОН. Участник е в 10 национални и 3 международни проекта. Тя е секретар и член на ръководството на 5 научни форуми. Участвала е с 16 доклада (в 9 – I-ви автор) и 46 постера (в 20 – I-ви автор) в редица национални и международни научни форуми. Член е на Секция Микробиология към Съюз на учените в България.

ПРЕПОДАВАТЕЛСКА ДЕЙНОСТ

Д-р Цветелина Паунова е ръководила 2-ма дипломанти (магистър, бакалавър) от СУ „Св. Климент Охридски“. Участвала е в подготовката на 13 специализанти, била е ментор по програма „Студентски практики“. От 2016 г. до настоящия момент е хоноруван преподавател по специалност „Клетъчна биология и патология“ в СУ „Св. Климент Охридски“.

ОСНОВНИ НАУКОМЕТРИЧНИ ПОКАЗАТЕЛИ

Гл. Ас. Цветелина Паунова – Кръстева представя за настоящия конкурс научната си продукция, която може да бъде систематизирана според минималните национални изисквания към научната и др. дейности на кандидатите за заемане на академичната длъжност "доцент".

По групата показатели А е представен Автореферат на дисертационен труд за присъждане на ОНС „Доктор“ на тема: „Фенотипни вариации свързани с полизахаридните антигени при *Escherichia coli* O157“.

За конкурса са представени **30** научни публикации, които не повтарят представените за придобиване на ОНС „доктор“. Общият им ИФ е **22.556**. Към изискванията по група В, показател 4, кандидатката е представила 7 научни публикации. Те са публикувани в престижни международни научни издания, реферирани и индексирани в световни бази данни Scopus и Web of Science (6 - Q2 и 1 – глава от книга). Сумата от набраните точки е **125**, при изискуеми минимум **100** в Правилника за прилагане на Закона в РБ в Институт по Микробиология - БАН. По показателите от група Г са представени 23 научни труда (21 публикации и 2 глави от книги). Изискуемият брой точки в Правилника за прилагане на ЗРАСРБ в Институт по Микробиология – БАН е 200, а кандидатката в конкурса набира общо **249** точки. По група показатели Д, към показател Д11, „Цитирания в научни издания, монографии, колективни томове и патенти, реферирани и индексирани в световно известни бази данни с научна информация (Web of Science и Scopus)“ е представен списък на **9** цитирани статии от представените за оценка в конкурса, с общо **58 броя** цитирания. Изчисленията показват, че гл. ас. Цветелина Паунова – Кръстева набира **116** точки, при изискуеми минимум **100**.

Резултатите ясно доказват значимостта на научните резултати и достижения на кандидатката, както и международната популярност на публикациите.

Данните на кандидатката по показателите от група Е в най-висока степен надхвърлят минималните национални изисквания. Гл. ас. Цветелина Паунова – Кръстева е ръководител на българския екип в **2** международни и на **3** национални научни проекти, и участник в **10** национални и **4** международни научни проекти.

Привлечените средства в резултат от тези проекти е **40196 лв.** Този показател носи **338 т.** , при изискуем минимум от **150 т.**

В заключение може да се види, че сумата от минимално изискуемите според ЗРАСРБ 400 точки, е значително надвишена. Общият брой точки по показатели от А до Е е 878.

Относно „ **Допълнителни критерии за израстване на академичния състав в ИМикБ**“ също може да се отбележи, че критериите са преизпълнени. За цялостната си научна дейност гл. ас. Цветелина Паунова – Кръстева е публикувала общо 32 научни публикации със H-индекс – 6, до момента на представяне на документите. Изискването в критерий „Брой публикации в списания с IF, монографии, глави от монографии, сборници публикувани в пълен текст, патенти“ е 20 бр. (без включените за „доктор“) са представени 25, като в 7 тях кандидатката е водещ или кореспондиращ автор. По следващият критерий „Цитати“ се изискват 100 за цялата научна кариера, а кандидатът представя над 111 цитирания, Изискването за H фактор е 5 за целият научен стаж е изпълнено. Надхвърлена е и стойността на изискуемият ИФ - общо **20. 61.** Относно броят на ръководените научно-изследователски проекти, както и на участието в такива, подробно е казано по-горе, но надвишените изисквания са неоспорими.

НАУЧНИ ПРИНОСИ

Един от основните обекти на анализ в научните изследвания на д-р Цветелина Паунова-Кръстева са щамове на *Escherichia coli*, особено със серотип O157 LPS, които често са свързани с хранителни инфекции и могат да увреждат здравето с различна тежест. Изследванията с тези обекти са разнообразни и многопосочни и имат съществен принос за все по-пълното характеризиране на тези най-широко разпространени и значими клонизатори на човешкия организъм.

Осъществено за първи път проучване, в което чрез ЯМР е показано, че при две изолирани и пречистени от *E. coli* O157: H циклични форми на ентеробактериалния общ антиген - ECACYS-4 и ECACYS-5 не се наблюдава прикрепване на следващи заместващи групи, което ги отличава от по-рано описвани циклични антигени от други ентеробактерии. Цикличната им структура и степен на полимеризация е доказана с MALDI MS спектрометрия. Създадена е обоснована хипотеза, че ECACYS може да представляват микробно асоциирани молекулни структури, които могат да бъдат разпознати от човешките хуморални механизми.

Важни оригинални резултати са получени при регистрираните промени в цитоскелета в резултат от коинкубация на HeLa клетки с щам на *E. coli* O157: H7. Анализите с конфокална микроскопия с лазерно сканиране е показала необичайно пренареждане и поведение на цитоскелетния актин и асоциираните протеини ZO-1 и вилин в клетъчната линия на HeLa в сравнение с поляризираните епителни клетки. Липсата на F-актинови струпвания предполага различен модел на бактериална патогенеза в неполяризираните епителни клетки.

При сравняване на моделите на адхезия, характерни за един щам *E. coli* O157: H-и щам *E. coli* O157: H7 е разкрито наличието на различни модели на адхезия, характерни за всеки от двата щамове. Наблюдава се, че и в двата случая е налице селективност и не всички HeLa клетки са свързани с бактерии. Резултатите предполагат

различна степен на изменение на цитоскелета на гостоприемника от двата щамове. Предполага се, че *E. coli* O157: H-изглежда способен да модулира тубулиновия цитоскелет и да промени локализацията на динеин и VDP, две участващи молекули с вътреклетъчния транспорт на везикули.

Изследвана е и способността на уропатогенни щамове *E. coli* (UPEC) да образуват биофилми и върху тях са установени разнообразните ефекти на биогенни фактори (среда, съдържаща сигнали за quorum sensing и епинефрин) върху образуването на биофилми. Изследвано е влиянието на екстракти от растението *Arnica montana* (сескитерпенови лактони) върху QS сигнали. Използвана е система за биорепортер-щам на *Vibrio harveyi* за сравняване на ефектите от фракциите върху QS-регулираната биолуминесценция. Резултатите за две богати на сесквитерпен фракции от *A. montana* - Am2 и Am3, са показали добрия им потенциал на QS инхибитори на експресията на някои фактори на вирулентност с цел за инхибиране развитието на патогени.

Голяма част от поучванията са посветени на въпроса дали патогените могат да повлияят на прикрепения растеж на непатогенни щамове на *E. coli* чрез секретирани фактори. Сравнени са биофилми на непродуциращ щам на *E. coli* O157: H, лабораторен щам на *E. coli* K-12, произвеждащ биофилм, и биофилмообразуващ щам на патогена *Yersinia enterocolitica* O: 3. Установено е, че само секретираните от патогените продукти индуцират увеличаване на биомасата в някои щамове K-12 с „дефицит на биофилм“. Доказано е, че протеиназа K значително намалява стимулиращите ефекти на всички модулиращ супернатанти, което показва важната роля на протеиновия/пептидни фактори за състоянието на биофилмите. Използването на секретирани полизахариди (rPS) има значими, но специфични за целевия щам на *E. coli* K-12 ефекти в зависимост от източника на rPS.

В редица други прецизно проведени изследвания са постигнати оригинални резултати. Показаниса промени в повърхностната експозиция на антигените на патогенни щамове на *E. coli* в резултат на температурата на растеж и разликите между отделните клетки. Изследването е извършено със специфично маркирани с злато лектини, които могат да разграничат повърхностните полизахаридни антигени. Резултатите получени чрез имунофлуоресцентен електронно микроскопски анализ е показано, ченяма корелация между свързването сконкавалин А (ConA) и имунореактивността на индивидуалните клетки в бактериалната популация. Доказано е, че растежните температури оказват съществено влияние върху свързващия капацитет на конкавалин на бактериалния гликокаликс във връзка с афинитета към лектина и прилепването на бактериите към култивирани HeLa клетки. Изпитано е влиянието на времето на култивиране, растежната среда и температура върху развитието на биофилми от набор от моделни Грам-положителни (*Staphylococcus aureus* ATCC 29213 и *Bacillus subtilis* 168) и Грам-отрицателни щамове (*Pseudomonas aeruginosa* PAO1 и шест щамове *Escherichia coli* K-12).

Важна и с изключително здравно и обществено значение е посоката на изследвания на заболяването муковисцидоза, при което инфекциите, много често причинени от *Pseudomonas aeruginosa*, са водещата причина за обостряния и ранна смърт на пациентите.

Едно от най-мощните изследвания включва организирането в един референтен панел на 42 щамове на *P. aeruginosa* с различен произход, с цел да се хармонизират и сравняват данните от изследванията върху този патоген. Изследванията са провеждани в ларвите на восъчен молец *G. mellonella*, който често се използва като моделен организъм за изследвания. Проследявайки редица растежни, физиологични и биохимични параметри на различните щамове е потвърдена и характеризирана високата вариабилност на този патоген. Установено е голямо разнообразие в динамиката на биофилм образуването и предпочитанията към различни условия на биофилм-култивиране между отделните щамове. Изследването увеличава знанията за вирулентността и патогенезата на *P. aeruginosa* и осигурява база за изпитване на нови терапии за сериозните заболявания, които причинява този патоген.

За първи път е проведено сравнително фенотипно изследване върху панел от 6 двойки сдвоени ("чифтни") щамове на *Ps. aeruginosa*, изолирани от български пациенти с муковисцидоза преди и след антибиотично лечение с тобрамицин. Регистрирани са разлики, които характеризират способността на бактериите към адаптация и удължаването на лаг-фазата на растеж на бактериите след лечение.

При работата с *P. aeruginosa* е изследвано въздействието на редица агенти и вещества върху развитието на патогена. В тази връзка е изследвано влиянието на биосърфактанти (рамнолипид и трехалозенлипид) на антибактериалната активност на метилтиосулфонат. Чрез прилагането на сканираща и конфокална електронна микроскопия е установено, че комбинацията от метилтиосулфонат и рамнолипид-биосърфактант значително повишава терапевтичния потенциал на метилтиосулфоната.

Доказани са високи *in vitro* цитотоксични ефекти в резултат на различни механизми на действие при съвместното култивиране на белодробни епителни клетки A549 с два клинични щамове на *P. aeruginosa*, изолирани от един и същ пациент с муковисцидоза преди и след лечение с тобрамицин. Характеризирано е взаимодействието на щам *P. aeruginosa* PAO1 с човешка белодробна карциномна клетъчна линия A549. Флуоресцентно микроскопски анализ на щам PAO1-GFP, специфично белязан със зелен флуоресцентен протеин, след съвместно култивиране с клетки A549 потвърждава вътреклетъчното оцеляване и репликация на бактериите, както и прогресивно нарушаване на актиновия цитоскелет.

Изследвана е ефективността на катионни полимерни мицели (CPM) срещу предварително образувани биофилми от *Escherichia coli* 420, *Ps. aeruginosa* PAO1, *Staphylococcus aureus* 29213 и *Bacillus subtilis* 168. Установено е, че най-ефективни за намаляване биомасата на биофилма (3-4 пъти) са CPM на базата на поли (2-(диметиламино) етил метакрилат) съполимери. Резултатите са показали приложимостта на CPM за дезинфекция на замърсени с биофилм повърхности и лечение на рани.

С цел премахване на биофилми, свързани със сериозни инфекции е създадена оригинална комбинация от катионни полимерни мицели, образувани от поли (2-(диметиламино) етил метакрилат) -b-поли (екапролактон) -b-поли (2-(диметиламино) етил метакрилат) (PDMAEMA-PCL-PDMAEMA) триблок съполимер. Резултатите показват, че и съполимерът и комбинацията му със сребърни наночастици (M_AgNPs) действат бактерицидно, предизвиквайки промени в бактериалната повърхност,

значително намаляват обема на биофилма и имат потенциал за лечение на инфекции с биофилм от *P. aeruginosa*.

Обект на изследване са и ултраструктурните промени в еукариотни микроорганизми, в които се наблюдава предизвикан оксидативен стрес.

Предизвикването на значително увеличение на нивото на оксидативен стрес при повишаването на растежната температура до 40–45 °C за *A. niger* 26 се характеризира с различни промени в хифалната морфология, като образуване на интрахифални хифи, увреждане на митохондриите и ускорена хифална автолиза. Практическият извод от това е, че намаляването на биомасата и вътреклетъчно съдържанието на протеин, въпреки увеличение на биосинтеза на SOD, предизвиква значително намаляване на добив на Cu/Zn – SOD в моделният щам *A. niger* 26. Високите концентрации на тежки метали (Cu^{+2}) причиняват отчетливи и широко разпространени ултраструктурни промени и в мед-устойчив гъбичен щам *Humicola lutea* 103. Митохондриите са първата и основна цел на токсичното действие. За изследване на ултраструктурните промени и локализацията на хитина в мицелите на щам на *Aspergillus niger*, е направено цитохимично белязване с лектин от *Triticum vulgare*, подходящ за маркиране на хитина.

Друго важно направление в изследванията, в които участва активно д-р Цветелина Паунова - Кръстева е подобряване на фармакологичните профили на противоракови платинени лекарства. Демонстрирана е силното противораково въздействие на супрамолекулни нанокапсули, образуващи се чрез самостоятелно сглобяване на четири бис-антраценови лиганди с два метални йона, или Pt (II), или Pd (II). Проведените проучвания върху Pt (II) нанокапсулата и нейното усвояване в суспензионни култури от два вида ракови клетки, показват много висока цитотоксичност на нанокапсулата, по-добра селективност и липса на кръстосана резистентност с цисплатин. На базата на морфологични промени в HL-60 клетките (ултраструктурни промени в клетъчната цитоплазма), индуцирани от нанокапсулата Pt (II), изследвани чрез трансмисионна електронна микроскопия (ТЕМ), се предполага се, че ендоцитозата е най-вероятният начин за интернализация на 1Pt.

Изследван е защитния ефект на суроватъчен протеинов концентрат срещу токсичността и оксидативния стрес, предизвиквани от антитуморния химиотерапевтик Доксорубицин (DOX) чрез стимулиране на биосинтезата на глутатион. С помощта на трансмисионна електронна микроскопия е доказано, че настъпващите биохимични и хистологични промени са ефективно отслабени при предварителна обработка с този концентрат, което има цитопротективен ефект срещу оксидативния стрес, предизвиканот DOX лечение.

Трябва да се отбележат изследванията, свързани с особеностите и фината структура на чревния гликокаликс.

Белязани с флуоресцеин лектини, свързващи различни нередуциращи въглехидратни остатъци, са идентифицирани с помощта на конфокална лазерна сканираща микроскопия в гликокаликса на тънките черва на мишки. Използвани са биотинилирани лектини за електронно-микроскопско проследяване на съставките на гликокаликса на червата в различни периоди на постнатално развитие при мишки. Разпределението и гликозилирането на муцини представлява интерес при анализа на отговора на лигавичната бариера към чревни патогени, причиняващи

инфекция или възпаление. Олигомери на N-ацетил-β-глюкозамин се наблюдават в изобилие във всички повърхности на микровилусния гликокаликс, а остатъци от α-L-фукозил не се откриват в гликокаликса на дванадесетопръстника, йеюнума или илеума на възрастни мишки.

Резултатите от изследвания за влиянието на набор от растежни фактори върху бактериалната колонизация с щамове на *E. coli* при чревни експланти от 5-дневни новородени мишки показва, че стимулирането на експлантатите на червата с растежните фактори на фибробластите повишава значително адхезията на бактериите. Поради това те не се препоръчват като добавка за изкуствени формули за храна за новородени.

Към представените за конкурса разработки са включени и три обзорни глави от книги: Модулация на растежа на биофилм чрез суб-инхибиращи количества антибактериални вещества; Многоклетъчното поведение на *Escherichia coli*: мишена за въздействия; Изменчивост на повърхностния гликом като адаптация във взаимодействията гостоприемник и патоген.

Д-р Цветелина Паунова-Кръстева е изграден специалист в областта на електронната микроскопия, микротомията, обработка на проби за трансмисионна електронна микроскопия (ТЕМ) и сканираща електронна микроскопия (СЕМ). Един от основните приноси на кандидата е свързан с апробирането на нови за звеното методологии, в областта на флуоресцентната микроскопия. Оригиналният методичен принос на д-р Паунова-Кръстева е демонстриран с подбор на подходящи флуорохроми за маркиране, при подготовката на микробни проби за флуоресцентна микроскопия, включващо имунофлуоресцентно белязване за епифлуоресценция и/или конфокално-лазерна сканираща микроскопия (КЛСМ).

Основните оригинални приноси, изтъкнати по-горе могат да бъдат групирани в три основни групи, на основата на тематиките, формулирани от д-р Цветелина Паунова – Кръстева като: Приноси в проучването на бактериални биофилми – развитие, структурно-функционални характеристики, инхибиране; Приноси в изследването на микробни фенотипи и фенотипни вариации – антигенни, повърхностни; и Приноси в установяване на механизми на клетъчни взаимодействия между про- и еукариоти, свързани със структурно-функционални изследвания.

Ще изтъкна едни от най-значимите от тях:

- Основен научен принос на д-р Цветелина Паунова-Кръстева е модифицирането и стандартизирането на методики за анализ на биофилм образуването.
- За пръв път е разработен иновативен подход за разрежаване и/или разрушаване на зрели биофилми, чрез катионни полимерни мицели, но допълнително натоварени със сребърни наночастици.
- Определна е метаболитната активност на третираните биофилми, с ново въведена за звеното от д-р Паунова-Кръстева, методика с редокс индикатор Аламар блу.
- Като оригинален научен принос на кандидата в тази посока, е охарактеризирането на биофилмния потенциал на панела от щамове на *P. aeruginosa* изолирани от различни географски региони и последващо разработване на нови стратегии в борбата с тях.
- За пръв път е включена комплексна методология за анализ на повърхностните гликоконюгати, чрез лектини при патогенните микроорганизми. Установени са

големи разлики между индивидуалните клетки по отношение на лектинсвързващите епитопи, достъпни по повърхността.

- Оригинален принос на кандидата в тази област, е свързан с изучаване на двете циклични форми на ЕСА (тетрамер и пентамер), които за пръв път са изолирани при щам *E. coli* O157:H(-) от водни и фенолни фракции.
- За проследяване на вътреклетъчната локализация на бактериалните клетки на *P. aeruginosa*, д-р Цветелина Паунова-Кръстева прилага за пръв път трипарентална, моделна система за белязане на PAO1 със зелен флуоресцентен протеин (GFP). Успешно са изолирани трансформирани щамове PAO1-GFP.
- Установени са цитопротективните ефекти на суроватката върху оксидативния стрес, предизвикан от лечение с доксорубицин

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Наукометричните данни на д-р Цветелина Паунова – Кръстева надвишават минималните национални и допълнителните изисквания на ЗРАС РБ, и съответния Правилник на ИМикБ за заемане на академичната длъжност „Доцент” в Професионалното направление 4.3. Биологически науки. Изследванията и резултатите се отличават с оригиналност, актуалност, фундаментално и приложно значение, изцяло съответстват на научната област и научно направление на настоящия конкурс.

Постиженията на д-р Цветелина Паунова-Кръстева са публикувани в различни авторитетни научни списания, намерили са отражение в многочислените и добре финансирани научно-изследователски проект и са намерили широк положителен отзвук в научната общност у нас и по света, което безспорно потвърждава значимостта на разработваните задачи и приложимостта на получените резултати.

Анализът на представените документи и материали ми дава основание да подкрепя кандидатката и убедено да препоръчам на уважаемите членове на Научното жури да оценят положително и да предложат на НС на ИМикБ да присъди на гл. ас. д-р Цветелина Паунова-Кръстева, академичната длъжност „Доцент ”.

София, 26.05.2021

. РЕЦЕНЗЕНТ:

(доц. д-р Златка Алексиева)