



РЕЦЕНЗИЯ

По документите на конкурс за академична длъжност „Доцент“ в област на висше образование 4. Природни науки, математика и информатика, професионално направление 4.3. Биологични науки, научна специалност „Микробиология“, обявен в ДВ, бр. 12 от 12.02.2021 год.

РЕЦЕНЗЕНТ: проф. д-р Петя Койчева Христова

1. **Общо представяне на процедурата:**

Конкурсът за “Доцент” в област на висше образование 4. Природни науки, математика и информатика, професионално направление 4.3. Биологични науки, научна специалност „Микробиология“ е обявен за нуждите на Лаборатория „Клетъчна биология“, Департамент „Обща Микробиология“, при ИМикБ-БАН в ДВ бр. 12 от 12.02.2021 г. Научното жури е сформирано със ЗАПОВЕД № I-30/29.03.2021 г. на основание чл. 4 и чл. 29а от ЗРАСРБ, чл. 60 от Правилника за прилагане на ЗРАСРБ и Правилника за условията и реда за придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности в ИМикБ при БАН. Предвидената в закона и Правилника процедура по разкриване и обявяване на конкурса е спазена и всички необходими документи са предоставени в срок. Документацията по конкурса е много добре организирана и отразява в пълен обем многостранната научно-изследователска дейност на кандидата.

2. **Биографични данни, кариерно израстване и професионални качества на кандидата**

Единствен кандидат подал документи за участие в конкурса за академичната длъжност „Доцент“ по Професионално направление 4.3. Биологически науки, специалност Микробиология е **гл. ас. д-р Цветелина Паунова-Кръстева**.

Кандидатът завършва ОКС “Бакалавър“, специалност Биология през 2003 год. в Биологически факултет. През 2005 год. придобива специалност Молекулярен биолог след успешно завършване на ОКС “Магистър“ в МП “Микробиология и микробиологичен контрол“ към катедра „Обща и промишлена микробиология“ в БФ. Още същата година Цветелина Паунова-Кръстева постъпва като биолог в секция "Морфология на микроорганизмите и електронна микроскопия" в ИМикБ при БАН, където се развива нейната научна кариера и до днес. Изследванията на секцията през този период са

насочени към изучаване на ултраструктурата, цитохимията и морфологичните промени на микроорганизми от различни филогенетични групи: вируси, бактерии и еукариоти, на основата на електронната микроскопия. В това направление протича израстването на кандидата като специалист в областта на микроскопските техники, морфологията, микротомията и приложението на различни методи за обработка на проби за трансмисионна и сканираща електронна микроскопия.

През 2011 год. кандидатът печели конкурс за асистент и след успешна защита на докторска дисертация на тема: „ Фенотипни вариации свързани с полизахаридните антигени при E.coli O157“ (2015 г) продължава своето развитие като главен асистент (2016 г.). От 07.12.2020 е ръководител на лаборатория „ Клетъчна биология“ в ИМикБ при БАН.

Следователно, гл.ас.д-р Цветелина Паунова-Кръстева отговаря на чл.56 от Правилника за условията и реда за заемане на академични длъжности на ИМикБ, тъй като е заемала достатъчно време всяка академична длъжност, което гарантира усвояване на специфичните задължения и отговорности, разписани в съответните за тях длъжностни характеристики.

От представената автобиография и научни трудове личи задълбочен интерес и натрупан професионален опит към различни актуални проблеми на клетъчната биология и молекулярната микробиология.

Професионалното израстване на кандидата е свързано с разширяване и надграждане на познанията в областта на конкурса чрез целенасочени квалификации. Още като магистър (2005 г) д-р Паунова участва в специализация по „Хранителна микробиология“ в Гент, а след постъпване на работа в ИМикБ продължава своето развитие в повече от десет краткосрочни обучения и тренировъчни курсове в сферата на трансмисионната-електронна и конфокално-лазерна сканираща микроскопия, изучава молекулни методи за идентификация и типизиране на бактерии, теми от клетъчната биология и бактериалните инфекции. Опитът и новостите в сферата на микроскопските техники са представени пред широка аудитория, като гост лектор в Младежка школа по електронна микроскопия. Един от основните приноси на кандидата за развитието на звеното е свързан с апробирането на нови за звеното методологии, в областта на флуоресцентната микроскопия, в подбора на подходящи флуорохроми за маркиране, в подготовката на бактериални и биофилмни проби за флуоресцентна микроскопия, вкл. двустепенни и тристепенни протоколи за имунофлуоресцентно беляване за наблюдение при два различни режима – епифлуоресценция и/или конфокално-лазерна сканираща микроскопия

Получените знания и опит в рамките на тези специализации са от съществено значение за утвърждаването на кандидата като отличен микробиолог, стремящ се към нови аспекти на съвременната микробиология.

Д-р Паунова активно участва в разпространение на научната информация като член на организационните комитети на пет научни форума и членува в Съюза на учените в България. Доказателство за професионалното ѝ развитие са получените множество награди от 2007 до 2019 год. В този показател се отличават грантовете на Световната федерация на учените, на FEMS за млад учен и на Съюза на учените в България. Тези постижения показват професионалното изграждане на един млад учен, който непрекъснато се усъвършенства и развива.

3. Оценка на научната продукция и наукометричните показатели на кандидата

Гл.ас.д-р Цветелина Паунова- Кръстева представя всички документи, необходими за конкурса в изпълнение изискванията на ЗРАСРБ и Правилника на ИМикБ. Те са предложени за рецензия прегледно и систематизирано с ясно разграничаване.

3.1. Характеристика и оценка на научно-публикационната дейност

За участие в конкурса са представени общо **32** научни публикации, **46** участия с постери в национални и международни форуми и **16** участия с доклади. На **9** от тях е представена като първи автор. Прави впечатление, че публикациите са предимно в три основни области в научната тематика, засягаща различни актуални проблеми на микробиологията и клетъчната биология, които са в строго съответствие с темата на конкурса.

Публикациите в специализирани, реферирани и индексирани чуждестранни и наши научни **списания с IF/ SJR** и квартали **Q1-Q4** са **19**; глави от книги са **3**. Научните и образователни публикации в реферирани **списания без IF и SJR** са **11**. Участията в международни и национални научни форуми с **доклади и постери** са **общо 65**;

Много добро впечатление правят представените публикации на кандидата в издания с висок IF, SJR и квартали (Q1-Q4), включени в международните бази данни SCOPUS и WEB of Science. Общият IF на всички публикации е **22.091**, което показва значимостта на изследванията.

3.2. Оценка на цитиранията на научните трудове

Публикуваните научни резултати от **16** статии на кандидата са цитирани 63 пъти в Scopus и Web of Science. Индексът на цитиране **h фактора е 5** (по Scopus), като за цялата научна кариера според останалите бази данни е **h-index е 6**.

3.3. Оценка на изпълнение на минималните национални изисквания за съответната научна област и допълнителните изисквания на СУ „Св. Климент Охридски“

Минималните национални критерии съгласно ЗРАСРБ са напълно изпълнени от представените наукометрични показатели:

По Показател В изискването от 100 т. е напълно изпълнено от представянето на **6** публикации с Q2, които определят **120** точки.

По Показател Г са представени доказателства за **264 точки** от изискваните **200** минимални точки, които се формират от **13** статии, от които **1 - Q1, 4 - Q2, 6 - Q3** и **2 - Q4** и **3** глави в книги.

По **Показател Д** са представени доказателства за **63** цитата, които дават **126** точки и преизпълняват минималния критерий от 50 т.

Особено добро впечатление правят доказателствата по **Показател Е**, които не са задължителни за академичната длъжност „Доцент“. В този параграф кандидатката **формира 338 т.** при минимални необходими **150 т.** като участник в 9 национални научно-изследователски проекти и 4 международни проекта и като **ръководител** на 3 национални и 2 международни поректа.

Д-р Паунова представя 24 публикации (без включените за получаване на научната степен „Доктор“) в реферирани списания с импакт фактор, с което покрива допълнителните изисквания от минимум 20 статии за заемане на длъжността „Доцент“ определени в Правилника за условията и реда за придобиване на научни степени и за заемане на академични длъжности в ИМик- БАН.

3.4. Оценка на учебно-преподавателската дейност, научното ръководство на студенти и административно-управленски опит

Д-р Паунова активно участва в подготовката на студенти и дипломанти. Понастоящем, под нейното ръководство двама студента са защитили успешно дипломни работи (един бакалавър и един магистър). Също така, тя участва активно в програмата „Студентски практики“, където е била ментор на 13 специализанта.

Преподавателската дейност на кандидата е свързана с извеждане на практически занятия като хоноруван преподавател в МП „Клетъчна биология и патология“ към курса „Клетъчни патогени“ за студенти от БФ и „Микробиология и вирусология“ за студенти от спец. Фармация на ФХФ.

3.5. Оценка на проектната дейност на кандидата

Представената справка показва активно участие на кандидата в национални и международни проекти. Представени са доказателства за **19** проекта, като на **4** от тях д-р Паунова е ръководител и на един е консултант. Тази проектна активност доказва не само научните, но и организационните качества на кандидата.

Заключение по т.3: *Кандидатът по настоящия конкурс за академичната длъжност „Доцент“ Д-р Цветелина Паунова- Кръстева покрива минималните критериите на ЗРАСРБ и Правилника за неговото приложение и ги надвишава (898 общ брой точки).*

4. Оценка на оригиналните научни приноси на кандидата

Изследователската работа на д-р Цветелина Паунова-Кръстева в Лаборатория по "Клетъчна микробиология, се характеризира с научни разработки, групирани в три основни тематика:

✓ *Бактериални биофилми - развитие, структурно - функционални характеристики, инхибиране;*

✓ *Фенотипи и фенотипни вариации при микроорганизмите - антигенни, повърхностни*

✓ *Клетъчни взаимодействия между про- и еукариоти, структурно - функционални изследвания.*

Изследванията върху структурата на биофилмите, динамиката на тяхното развитие, както и оценката на факторите, влияещи върху скоростта на образуване е едно от основните направления, в които работи д-р Паунова. В тези проучвания се открояват редица **оригинални приноси**, които имат научен и приложен принос в тази тематика. Въвеждането на оптимизирана и стандартизирана процедура при изследване на бактериалните биофилми, основана на комплексна методология, позволява нейното стандартизиране както

за Грам – отрицателните, така и за Грам - положителните бактерии. Методиката е успешно приложена за изследване на ефекта на новосинтезирани природни продукти върху процеса на образуване на бактериалните биофилми. От особен научен интерес представлява определянето на щамово специфичните ефекти на секреторните метаболитни продукти, върху формирането на биофилми от 17 щама *E. coli*, в това число уропатогенни, ентероагрегативни, ентерохеморагични, ентеротоксигенни и ентеропатогенни. Този подход е приложен и за изучаване на модели на образуване на биофилми от 42 щама на *P. aeruginosa*, изолирани от пациенти с муковисцидоза от географски отдалечени райони. За първи път е доказан ефектът на култивационната среда върху динамиката на образуване на биофилмите (прикрепване, нарастване, зреене, отлющване). От значение е първото по рода си сравнително изследване върху фенотипните характеристики (растеж, биофилм образуване и подвижност) на щамове *P. aeruginosa* от български пациенти с муковисцидоза изолирани преди и след инхалаторно лечение с тобрамицин. Кандидатът задълбочава изследванията си в приложен аспект посредством търсене на полимери за разрушаване на зрели биофилми. След скрининг на 26 новосинтезирани катионни полимерни мицели се установява висок потенциал на полимери, изградени на базата на PDMAEMA poly (2-(dimethylamino) ethyl methacrylate), срещу активни зрели биофилми от Грам-положителни и Грам-отрицателни щамове. Оригинален принос и научно-приложно постижение в работа на д-р Паунова са проучванията за активността на новосинтезирани полимерни мицели натоварени със сребърни наночастици. Така на практика е реализирана нова концепция за преодоляване на бариерата на биофилмния, екстрацелуларен матрикс чрез създаване на синергичен ефект от разрушаваща активност и бактерицидно действие. За определяне на метаболитната активност на третирани биофилми д-р Паунова-Кръстева разработва и прилага нова методика с редокс индикатор Аламар блу. Получените нови данни имат фундаментален принос в научната литература.

Тенденциите за увеличаване на инфекциите причинени от резистентни микроорганизми се отчитат и при биофилмните бактерии. Прилагането на суб-минимални инхибиторни концентрации (суб-МИК) от антибиотици, пептиди, растителни или синтетични вещества върху биофилми има разнопосочен ефект: от подтискане на биофилм образуването, до отсъствие на ефект или проявление на стимулиращ ефект. Това са съществени концептуални точки, които д-р Паунова-Кръстева разглежда в своята обзорна статия за модулиране на биофилмите от суб-инхибиторни концентрации на антимикробни вещества. Направеният обзорен преглед на литературните данни очертава ролята на антимикробните пептиди за промяна в генната регулация на кворум-сенсинг сигнализацията, синтеза на липополизахариди, подвижността и др. Голяма част от растителните екстракти и/или техните метаболитни продукти (етерични масла, фракции и др.) подтискат биофилмния растеж, а други напълно го инхибират. Затова, по отношение на приложението на растителните екстракти, кандидатът има оригинален принос в изследванията на сескитерпеновите лактони от *Arnica*, инхибиращи кворум-сенсинг сигнализацията при *Vibrio harveyi*, които ще дадат отговор за автоиндукторните системи на биорепортерни щамове.

Друга значителна част от изследванията на д-р Паунова са носочени към една много актуална тематика, свързана с изучаване на промените в структурно-функционалните характеристики на повърхностния гликом и най-вече с характеристиката на въглехидрат-

свързващите протеини - лектините. За пръв път е приложена комплексна методология за анализ на повърхностните гликоконюгати при патогенните микроорганизми, чрез която са установени значителни разлики между индивидуалните клетки по отношение на лектин-свързващите епитопи. Друг оригинален принос на кандидата в тази област, е свързан с изучаване на двете циклични форми на ентеробактериален общ антиген ЕСА (тетрамер и пентамер), които за пръв път са изолирани при щам *E. coli* O157:H(-) от водни и фенолни фракции. За изучаване на фенотипните вариации при *E. coli* O157:H (-) кандидатът разработва нов молекулно-генетичен подход за типизиране на гените, отговорни за синтеза на повърхностни полизахаридни антигени, най-вече с оглед на изследване на ко-експресията на ЕСА и О-антигена в реално време, върху патогенен щам от този серотип. В обсега на тази сфера са и приложените изследвания на д-р Паунова-Кръстева за използване на биосърфактанти, които да повлияват растежа, морфологията и ултраструктурата на друг условно патогенен вид - *Pseudomonas aeruginosa*. Получените данни, че синергичната комбинация от рамнолипид и антиминобен агент (метилтиосулфонат) е подходяща за производството на нови, по-ефективни антиминобни препарати, са важен практико-приложен принос на кандидата.

В третото направление от научно-изследователската дейност на кандидата са представени изследвания върху клетъчните взаимодействия между прокариоти и еукариоти и произтичащите от тях ултраструктурни промени. Изясняването на механизмите на адхезия са от особено значение за разбиране на патогенезата на много заболявания и проучванията на д-р Паунова имат съществен принос в тази област. С фундаментален и приложен принос са резултатите, доказващи двата различни модела на адхезия при Шига непродуциращи щамове *E. coli* O157 (*E. coli* O157:H (-) и *E. coli* O157:H7). Разработването и прилагането на флуоресцентно-микроскопски FAS тест обогатява набора от микроскопски техники, които въвежда д-р Паунова в лабораторията по Клетъчна биология и разкрива важна информация както за механизмите на адхезия на *E. coli* O157, така и за протичащите ултраструктурни промени в клетките на гостоприемника. В серия от изследвания е проучена структурата и организацията на компонентите на чревния гликокаликс при новородени, в пренатален период и възрастни мишки. Прилагането на биотинилирани или флуоресцентно белязани лектини доказват чрез ТЕМ и КЛСМ специфичността и локализацията на важни въглехидратни компоненти от апикалната мембрана на ентероцитите, както и тяхната биологична роля при взаимодействието им с микроорганизмите.

След успешната адхезия на патогена започва колонизация в чревния тракт. Това са задължителни компоненти за протичане на инфекциозния процес. Д-р Паунова изследва хранителните фактори, които осигуряват ефективността и баланса на тези два процеса в зависимост от вида на растежните фактори. Оказва се, че при хранителна стимулация с растежни фактори адхезията на патогенните щамове *E. coli* се повишава. Нещо повече, при стимулиране с някои растежни фактори (EGF и TNF-алфа), адхезията на бактериите е значителна. Тези данни оформят важен научен принос, че независимо от ползата за процесите на диференциация на червата, хранителните добавки не са препоръчителни за храна при новородени. За изучаване на инвазивността и вътреклетъчното оцеляване на *P. aeruginosa* PAO1 за първи път д-р Паунова-Кръстева прилага трипарентална моделна система чрез белязане със зелен флуоресцентен протеин (GFP). Получените оригинални

резултати за вътреклетъчното размножаване на щама и неговото влияние върху актиновия цитоскелет определят *P. aeruginosa* PAO1 като инвазивен шам, който не само оцелява в клетките-гостоприемници, но също така се размножава вътреклетъчно. Приложеният флуоресцентно-микроскопски анализ показва ясна дезинтеграция на актиновия цитоскелет, а съвместно ко-култивиране с други щамове от този вид води до повишаване на клетъчната пропускливост и наличие на некротични участъци в еукариотните клетки.

Успоредно с горе изброените методологии и насочения интерес на д-р Паунова-Кръстева към все по-актуални области, кандидатът провежда и редица изследвания в областта на микробната морфология като изучава ултраструктурните и повърхностни характеристики на бактерии и плесени в процесите на диференциация и при въздействие на стрес-фактори.

Така, за изследване на локализацията на хитин в клетъчната стена на *Aspergillus niger* 26 кандидатът разработва цитохимични методи на белязане с лектин от *Triticum vulgaris*, които позволяват да бъдат уловени ултраструктурните промени в мицела по време на растеж, диференциация и стареене на хифите. Този метод има важно практическо приложение при проследяване на щамове, които намират широко приложение в производството на ферментирани храни, органични киселини и ензими. От особен интерес също така представляват изследванията свързани с морфологичните и физиологичните промени по време на температурен стрес при *Aspergillus niger* 26 и на мед-индуциран оксидативен стрес при *Humicola lutea* 103. Данните за два модела на поведения на *Aspergillus niger* 26 при различни температури имат своето научно-приложно значение, тъй като при култивиране при ниски температури моделния шам може да бъде добър продуцент на Cu/Zn супероксид дисмутаза. Присъствието на медни йони подтиска натрупването на биомаса от *Humicola lutea* 103, без да се наблюдава вътреклетъчно натрупване. Ултраструктурните промени на този шам при по-ниски концентрации мед са насочени към руптура на клетъчната стена и натрупване на липидни капки като се запазва способността за адаптация към този стрес. При по-високи нива се наблюдава тежка интоксикация, съпроводена от дегенерация на клетките, автофагия и вероятна клетъчна смърт, което се потвърждава от ниските нива на продукция на биомаса. С фундаментално значение са данните за морфологичните промени в митохондриите, по които се съди за нивата на токсично действие и се внася повече разбиране за ролята на мед-индуцирания оксидативен стрес в толерантността на фунгите при въздействие с високи концентрации.

В представените за рецензия научни публикации важно място заемат и изследванията на кандидата свързани с тестването на различни субстрати с цитопротективно действие срещу оксидативния стрес. Протеините в млечната суроватка имат силно изразен антиоксидантен ефект и подпомагат повишаване на нивата на глутатиона. Установените цитопротективните ефекти на млечната суроватката върху оксидативния стрес, предизвикан от лечение с доксорубицин, са важен приложен принос. Разработването на различни химиотерапевтици на основата на платина е една от последните новаторски стратегии в борбата с раковите заболявания. В тази връзка, проучванията на кандидата за приложение на супрамолекуларна нанокapsула отразява най-новите тенденции в тази област. TEM дава доказателства за морфологични промени на раковите клетки изразени в удебеляване на матрикса на митохондриите, уплътняване на цитоплазмата и поява на некротични участъци. Продължителното въздействие води до

образуване на вакуоло-подобни телца и на еухроматично ядро. Добрите фармакологични характеристики на нанокапсулата са добра основа за създаване на нови химиотерапевтици.

В пред вид на голе изложените данни може да се направи следното заключение:

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Давам висока оценка на научно-изследователската и проектна дейност на гл. ас. д-р Цветелина Паунова-Кръстева. Считам, че кандидатката изпълнява всички изисквания на ЗРАСРБ и Правилника за неговото прилагане.

Убедено предлагам на уважаемото научно жури и на членовете на Научния съвет на Института по Микробиология при БАН да оценят по достойнство кандидатурата на гл. ас. д-р Цветелина Паунова-Кръстева и да гласуват положително за заемане на научната длъжност „Доцент” по професионално направление 4.3. Биологически науки, специалност Микробиология.

гр. София
31.05.2021 г.

РЕЦЕНЗЕНТ:
проф. д-р Петя Христова