

Институт по Микробиология "Стефан Ангелов"
БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ



Даяна Бориславова Борисова

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

АВТОРЕФЕРАТ

На дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен „Доктор“

Област: 4. Природни науки, математика и информатика
Професионално направление 4.3. "Биологически науки",
Научна специалност "Микробиология"

Научни ръководители:

Доц. д-р Стоянка Рангелова Стоицова
Проф. д-р Таня Василева Стратева, д.м.

Членове на научното жури: 1. Проф. д-р Пенка Петрова, д.б.н.
2. Доц. д-р Стоянка Стоицова
3. Проф. д-р Мария Ангелова, д.б.н.
4. Доц. д-р Златка Алексиева
5. Доц. д-р Мариана Мърхова-Косева

София,
2024

Дисертационният труд съдържа 148 страници, 51 фигури и 15 таблици. В библиографската справка са включени 240 литературни източника. Експерименталната работа е извършена в лаборатория „Клетъчна микробиология“ на Институт по микробиология „Стефан Ангелов“, БАН.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита на2025 г. на разширено заседание на национален семинар по „Обща микробиология“ към Институт по микробиология „Стефан Ангелов“ – БАН. Защитата на дисертационния труд ще се състои на открито заседание пред научно жури на от..... в заседателната зала на Институт по микробиология „Стефан Ангелов“ – БАН. Материалите по защитата са на разположение в кабинета на научния секретар на Институт по микробиология „Стефан Ангелов“ – БАН.

Въведение

В последно време вниманието на обществеността все по-често се насочва към проблемите на пациентите, страдащи от т. нар. редки болести. Това са генетично-обусловени заболявания, свързани със специални и сложни грижи за пациентите. Към тази нозологична категория спада и муковисцидозата (МВ). Това е сериозно автосомно-рецесивно състояние, предизвикано от мутация в гена на CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator), който кодира епителен йонен канал, отговорен за секрецията на хлоридни и бикарбонатни йони (Cramer *et. al.*, 2023). В Европа разпространението на болестта МВ в различните държави варира от 1/1350 до 1/25000 човека. Честотата на носителство на мутации в *CFTR* гена сред българската популация се изчислява на **1/3400** (или около 200000 човека в страната), като всяка година у нас се раждат средно по 20 деца с клинични прояви на това нелечимо заболяване (<https://www.genica.bg/test/mukoviscidoza-kistichna-fibroza-cystic-fibrosis-cftr-sekvenirane-po-sanger-chesti-zablgariya-mutacii>).

При хомозиготно състояние, в резултат на мутацията, в белия дроб на пациенти с МВ се редуцира рН и намалява секрецията на хлоридни йони. Това силно понижава ефективността на вродения имунитет при борбата с бактериите (Cramer *et. al.*, 2023). Заедно със задържането на мукозен секрет, в дихателните пътища се създават предпоставки за развитие на бактериални респираторни инфекции – основна причина за усложнения и смърт при пациентите с МВ (Ciofu *et. al.*, 2013). Водещи патогени, изолирани от бронхиалното дърво на

пациентите са щамове от вида *Pseudomonas aeruginosa*. Този вид микроорганизми притежават редица детерминанти на вирулентност, осигуряващи им преимущества при колонизацията на муковисцидозен бял дроб (Strateva *et. al.*, 2009, 2010; Mitov *et. al.*, 2010; Strateva & Mitov, 2011).

В хода на рутинното проследяване на пациентите с МВ могат да бъдат изолирани щамове от различни етапи на заболяването. Така, чрез сравнителни генотипни и фенотипни анализи на последователно изолирани щамове, е получена уникалната възможност за проследяване на микроеволюцията на *P. aeruginosa* в пациентите (т.нар. “*within host evolution*”) (Pelegriin *et. al.*, 2021). Изучаването на серийни изолати от инфекции, причинени от *P. aeruginosa* при МВ, е показало как бактерия от околната среда може да се адаптира за персистенция в едно нетипично местообитание, като успешно избягва, както защитните механизми на гостоприемника, така и антибактериалната терапия (Cramer *et. al.*, 2023). Освен информацията за конкретната система патоген-гостоприемник, този вид изследвания са с широк принос и към познанието ни за развитието на острите инфекции към хронични, персистиращи и рецидивиращи (Drevinek *et. al.*, 2022).

Съвременното лечение на бронхопулмоналните инфекции при МВ е чрез аерозолно (инхалаторно) приложение на антимикробни лекарствени средства. Един от ефективните препарати към настоящия момент е тобрамицин. Категорично е доказано, че терапията с антибиотика, включваща повтарящи се “on-off” цикли, значително повишава качеството и продължителността на живота при МВ. За съжаление, след като *P. aeruginosa* се е установила трайно в

бронхиалното дърво на пациентите, популацията ѝ може да бъде редуцирана, но ерадикацията ѝ с помощта на антибиотици засега е практически невъзможна (Cramer *et. al.*, 2023). Това поставя въпроса за адаптацията, даваща възможност на бактерията да преживява в присъствието на антибиотиците.

В литературата често се коментира възможната роля на антибиотиците при *within host* еволюцията на микробните популации в гостоприемниковия муковисцидозен бял дроб. Въпреки оценката на тази роля обаче до момента не е провеждано изследване, конкретно насочено към възможното участие на даден антибиотик в развитието на адаптационни промени при бактериите. Едно сравнително изследване на двойки щамове *P. aeruginosa*, изолирани последователно от един и същ пациент преди и след третиране с даден антибиотик, би било добра основа за проучване на тези адаптации. Това обоснова целта и задачите на настоящия дисертационен труд.

Цел и задачи

Цел на настоящия дисертационен труд е:

Чрез сравнителен генотипен и фенотипен анализ на двойки щамове *P. aeruginosa*, изолирани от пациенти с МВ преди и след инхалаторна терапия с **инхалаторен тобрамицин** да се проучат адаптациите на патогена към въздействието на антибиотика, възникнали след терапията.

За осъществяване на тази цел са поставени следните

Задачи:

1. Да се извърши молекулярно-генетично типизиране на 12 чифтни щама *P. aeruginosa* от долни дихателни пътища, изолирани от 6 пациента преди и след инхалаторна терапия с тобрамицин, и да се определи степента на филогенетичното родство помежду им и с референтни щамове от други географски райони.
2. Да се проведат сравнителни проучвания на растежа и биофилм-образуването на 12-те чифтни щама *P. aeruginosa*.
3. Да се сравни морфологията на клетките и биофилмите от 12-те щама *P. aeruginosa*.
4. Да се проучи подвижността на щамовете, свързана с флагеларната активност ("плуване" и "роене"), както и т.нар. "трептене", осъществявано с помощта на тип IV пили.
5. Да се изясни дали фенотипът на щамовете, свързан с взаимодействието им с еукариотни клетки (клетъчна линия A549 от белодробен аденокарцином), е адхезивен или инвазивен.

6. Да се определи чувствителността на щамове *P. aeruginosa* към тобрамицин и да се уточнят съответните минимални потискащи концентрации (МПК).

7. Да се изследва ефектът на стреса от култивиране в присъствие на суб-МПК тобрамицин върху следните фенотипни характеристики на щамове:

- растеж и виталност на бактериалните клетки в течни среди
- прикрепен растеж като биофилми и виталност на биофилмните клетки
- структура на биофилмите
- подвижност

Материали и методи

❖ Щамове

В изследванията бяха използвани 6 двойки щамове *P. aeruginosa*, които са ни любезно предоставени от проф. Т. Стратева (Катедра „Медицинска микробиология“, Медицински факултет, МУ-София). Щамове са изолирани в интервала 2006-2009 в рамките на рутинни изследвания на пациенти с МВ. Всяка двойка съдържа щам, изолиран преди и щам изолиран след инхалаторно третиране с антибиотик тобрамицин (Таблица 1).

Таблица 1. Моделни щамове

Щам	Дата на изолиране	Брой на пациент	Пол	Времетрае (години) при изследването	Съответствие с референтния щам на изследването на щамата
PaT-1	20.02.2006	1	М	15	0
PaT-2	13.02.2007			16	3
PaT-3	20.02.2006	2	М	15	0
PaT-4	19.02.2007			16	3
PaT-5	09.05.2006	3	Ж	13	0
PaT-6	16.07.2009			16	15
PaT-7	27.06.2006	4	Ж	25	0
PaT-8	05.03.2008			27	2
PaT-9	07.09.2006	5	М	10	0
PaT-10	05.03.2008			11	2
PaT-11	28.01.2008	6	Ж	20	0
PaT-12	03.12.2009			21	3

При всички фенотипни анализи използвахме като референтен щам *P. aeruginosa* PAO1, а за епидемиологичното типизиране – и други щамове от международен референтен панел, изолирани в различни географски райони от пациенти с МВ (De Soyza *et. al.*, 2013) (Таблица 2).

Таблица 2. Референтни щамове

Щам	Източник
Добре проучени щамове	
PA01	Широко изследван лабораторен модел, изолиран първоначално в Мелбърн, Австрия, от рана.
CHA	Гренобъл, Франция, широко изследван муковисцидозен изолат
Трансмисивни в болнична среда	
AUS23	Бризбейн, Австралия, муковисцидозен изолат
LES B58	Ливърпул, Великобритания, ранен муковисцидозен изолат
LES 431	Ливърпул, Великобритания, късен муковисцидозен изолат
C3719	Манчестър, Великобритания, муковисцидозен изолат
AES-1R	Мелбърн, Австралия, муковисцидозен изолат
Серийни изолати	
AA2	Хановър, Германия, ранен муковисцидозен изолат
AA43	Хановър, Германия, късен муковисцидозен изолат, от същия пациент като щам AA2
AA44	Хановър, Германия, късен муковисцидозен изолат, от същия пациент като щам AA2
AMT 0023-30	Сиатъл, САЩ, ранен муковисцидозен изолат от 6 месечно бебе
AMT 0023-34	Сиатъл, САЩ, ранен муковисцидозен изолат, от същото бебе като при щам AMT 0023-30, но 96 месеца след като е изолиран щам AMT 0023-30
AMT 0060-3	Сиатъл, САЩ, ранен муковисцидозен изолат
AMT 0060-1	Сиатъл, САЩ, късен муковисцидозен изолат от същия пациент като при AMT 0060-3
AMT 0060-2	Сиатъл, САЩ, късен муковисцидозен изолат от същия пациент като при AMT 0060-3

❖ **Среди и условия на култивиране**

Хранителните среди използвани в настоящия дисертационен труд са: Müller Hilton Broth (МХБ), Müller Hilton Agar (МХА), Luria-Bertani Broth (ЛБ), Luria-Bertani Agar (ЛА), Минимална хранителна среда солева М63 (М63), Tryptic Soy Broth (TSB) и Tryptic Soy Agar (TSA).

❖ **Епидемиологично типизиране на щамовете *P. aeruginosa* посредством случайно амплифициране на полиморфна ДНК чрез полимеразна верижна реакция (RAPD-PCR).**

- Изолиране на геномна ДНК
- Спектрофотометрично определяне на количеството на ДНК
- Олигонуклеотиден праймер

Дизайна и последователостта на праймера за изпълнението на PCR експериментите е според Mahenthiralingam R, (1996):

Primer 272: 5'-AGCGGGCCAA-3'

- Случайна амплификация на полиморфна ДНК (RAPD-PCR анализ) и конструиране на филогенетично дърво (дендрограма)

❖ **Определяне на растежните характеристики на бактериална култура**

- Растежни криви, ОПмакс и лаг-фаза
- Скорост на растеж и генерационно време

❖ **Определяне на растежа в биофилм чрез сравнителна оценка на биофилмната биомаса: метод „кристал виолет“**

❖ **Подвижност**

- Флагеларна подвижност – чрез посявка на бод в 0,3% TSA

- Подвижност чрез „роене” (Swarming) – чрез посявка в 0,6% TSA с добавка на 0,02 % глюкоза
- Подвижност чрез „трептене” (Twitching) – придвижване по твърда повърхност на границата на агара с дъното на петритото, чрез посевки на под в 1,5% TSA

❖ **Инвазивност и вътреклетъчен растеж на *P. aeruginosa* в белодробна аденокарциномна клетъчна линия A549**

- Култивиране на A549 клетъчна линия и ко-култивиране с изследваните щамове
- Определяне на инвазивността и вътреклетъчната преживяемост на щамове в A549 клетки

❖ **Изследване на ефектите на суб-МПК тобрамицин върху бактериалния фенотип**

- Определяне на минимална потискаща концентрация (МПК) на тобрамицин с тест-лентички (HiMedia).
- Определяне на ефекта на суб-МПК тобрамицин върху растежа на щамове в течни среди
- Определяне на ефекта на суб-МПК тобрамицин върху биофилм образуването от щамове
- Оценка на виталността на бактериите от течните и биофилмните култури, развити в присъствието на суб-МПК тобрамицин чрез редукция на резазурин (реагент Аламар блу)

- Ефекти на суб-МПК тобрамицин върху подвижността на щамовете

❖ **Морфологични методи**

- Сканираща електронна микроскопия (СЕМ)
- Морфометрични характеристики на бактериалните клетки

❖ **Статистическа обработка на данните**

Количественните данни бяха обработени с програма ЕКСЕЛ 2003 с изчисление на средни стойности и стандартни отклонения. За определяне на статистическата достоверност на разликите по различните количествени параметри, в рамките на двойките и между двойките щамове осъществихме сравнение на средните стойности чрез АНОВА с използване на онлайн калкулатор <https://www.statskingdom.com/180Anova1way.html> и приложение на пост-естимационен тест Tukey HSD.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

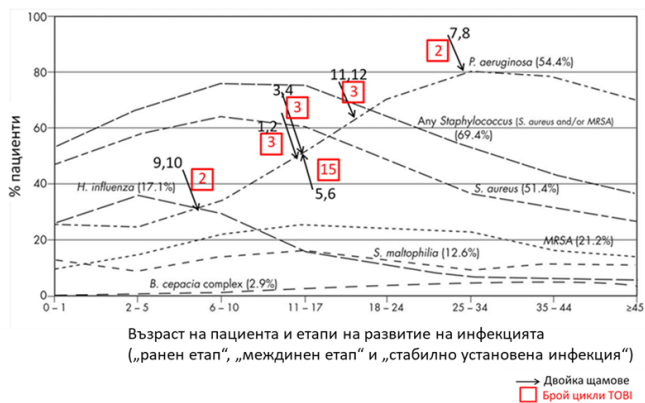
Развитието при генетичното заболяване МВ зависи от борбата с възникналите бактериални инфекции на респираторния тракт. Опитите за разработване на ефективно антимикробно лечение имат променлив успех. В последното десетилетие все повече се налага мнението, че за да има напредък на терапевтичните подходи е необходимо по-добро познаване на механизмите за адаптация на патогенните микроорганизми към специфичната среда на инфектирания муковисцидозен бял дроб.

Основен принос в съвременната представа за тези механизми имат паралелните проучвания на генотипната и фенотипната еволюция на *P. aeruginosa* в гостоприемника (така наречената “ин хост” еволюция). Те се провеждат върху серийни изолати от един и същи пациент в различни етапи от заболяването (Fisher *et. al.* 2021). Изследванията в последно време са фокусирани върху сравнението на изолати от ранни и късни етапи на инфекцията при съответния пациент и са разкрили важни характеристики на “ин хост” еволюцията и адаптациите на бактерии във времето.

В настоящото проучване са сравнени генотипните и фенотипните характеристики на шест двойки бактериални щамове, изолирани от пациенти с различна възраст и стадии на инфекцията, както преди така и след лечение с тобрамицин (Фигура 1).

Двойка PaT-9/PaT-10 е изолирана от най-младия пациент в най-ранен етап от развитието на инфекцията. Двойки щамове PaT-1/PaT-2, PaT-3/PaT-4 и PaT-5/PaT-6 са изолирани от сравнително млади пациенти, като етапът на развитие на инфекцията се счита за междинен

(David & Geller, 2009). В настоящото изследване двойки щамове PaT-7/PaT-8 и PaT-11/PaT-12, изолирани от пациенти на и над 20-годишна възраст, са представителни за по-напредвали стадии на колонизацията с патогена.

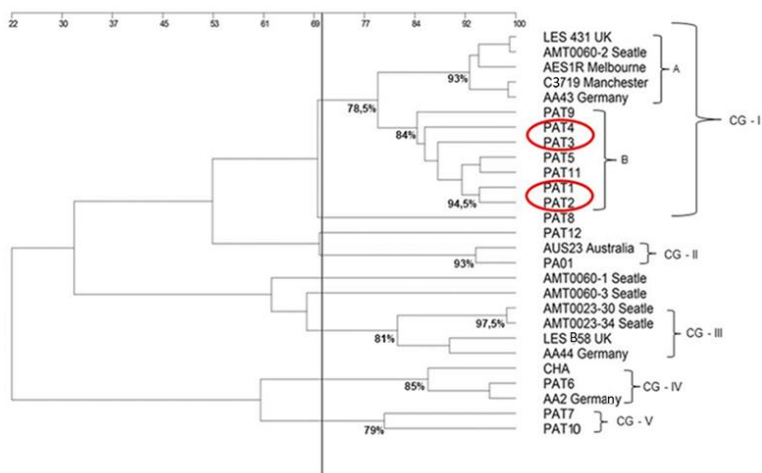


Фигура 1. Време на изолиране на двойките щамове, включени в изследването, и брой цикли TOBI®, приложени между двете изолирания, съпоставени с динамиката на развитие на инфекцията с *P. aeruginosa* според концепцията на David & Geller, 2009. Ранният етап на развитие на инфекцията е при възраст до 10 годишни пациенти; междинен етап – до 20 годишна възраст; късен етап – щамове изолираниот пациенти след 20 годишна възраст.

1.Молекулярно епидемиологично типизиране на избрани MB изолати чрез RAPD-PCR, последван от UPGMA анализ.

Методът UPGMA е използван за определяне на филогенетичното родство между 12 изолата на *Pseudomonas aeruginosa* от български пациенти с MB и референтни щамове от други региони. Анализът показва пет клъстерни групи, като има високо сходство (над 85%) между две двойки български щамове (PaT-1/PaT-2 и PaT-3/PaT-4).

Прави впечатление, че по-голяма част от нашите изолати – PaT-1, PaT-3, PaT-5, PaT-9 и PaT-11 (получени преди третиране с антибиотик) и изолати PaT-2 и PaT-4 (получени след третиране с антибиотик) попадат в обща клъстерна група – CG-I. Тази група се подразделя на 2 суб-кълъстерни групи – А и В. В суб-кълъстерна група А – попадат щамове LES431 (Ливърпул, Великобритания), АМТ 0060-2 (Сиатъл, САЩ), АЕС-1R (Мелбърн, Австралия), С3719 (Манчестър, Великобритания) от международен референтен панел, които са с показатели на особено висока вируленстност и морбидност (De Souza et al., 2013). В суб-кълъстерна група В попадат щамове, изолирани от български пациенти преди третиране с инхалаторен тобрамицин, както и два от изолираните след третиране (Фигура 2).



Фигура 2. Дендограма, базирана върху матрица с коефициент на сходство

Въпреки че представените в литературата молекулярно биологични данни за серийни изолати потвърждават широкото разпространение на диверсификация на генотиповете, изследванията върху фенотипните характеристики на *P. aeruginosa* в хода на процесите на микроеволюция в МВ бял дроб са показали някои повтарящи се специфични адаптации, установяващи се при преобладаващото количество щамове, Такива са: промените в **растежните характеристики** и забавяне на растежа (Cameron *et.al.*, 2022; La Rosa *et. al.*, 2021); намалената **подвижност** (La Rosa *et. al.*, 2021); намалената **вирулентност** (La Rosa *et. al.*, 2021; Gabrielaite *et. al.*, 2021; Rosales-Reyes *et. al.*, 2021); увеличената преживяемост в присъствието на антибиотици, която може да е свързана с генотипни промени (гени за **резистентност**), а може да представлява фенотипна характеристика (антибиотична **толерантност**).

Нашето изследване е насочено към промените в генотипа и фенотипа на щамовете, възникнали и/или селектирани вследствие инхалаторната терапия с тобрамицин. За целта, като първи етап от фенотипното изследване, сме провели фенотипни тестове, отнасящи се до по-горе изброените характеристики по двойки при щамовете, изолирани от един и същ пациент преди и след приложението на инхалаторен тобрамицин. Като следващ етап, проследихме техните промени при култивиране в присъствие на суб-инхибиторни концентрации на тобрамицин, за да се провери дали в резултат на терапията е повлияна толерантността към антибиотика.

2. ФЕНОТИПНИ ХАРАКТЕРИСТИКИ НА ЩАМОВЕТЕ

2.1.1 Растежни криви

Инфекцията на дихателните пътища при пациенти с МВ, предизвикана от *P. aeruginosa*, често се съпътства с намалена скорост на бактериален растеж в продължение на дълъг период. Предполага се, че този забавен растеж има връзка с увеличаването на устойчивостта на патогена към антибиотици (La Rosa *et. al.*, 2021). Това обоснова провеждането на анализ на растежните характеристики като първи етап от настоящото изследване.

Поставихме си въпроса дали, доколко и по какъв начин фенотипните различия между щамове, настъпили в гостоприемниковата среда, се отразяват върху растежа в три хранителни среди - ЛБ, МХБ и М63, и има ли третирането с инхалаторен тобрамицин отражение върху характеристиките на щамове, изолирани от един и същ пациент. Избраните среди се използват широко за изучаване на физиологията на този микроорганизъм (Cramer *et. al.*, 2023).

Таблица 3. ОП_{макс} на щамове в три среди със съответните стандартни отклонения

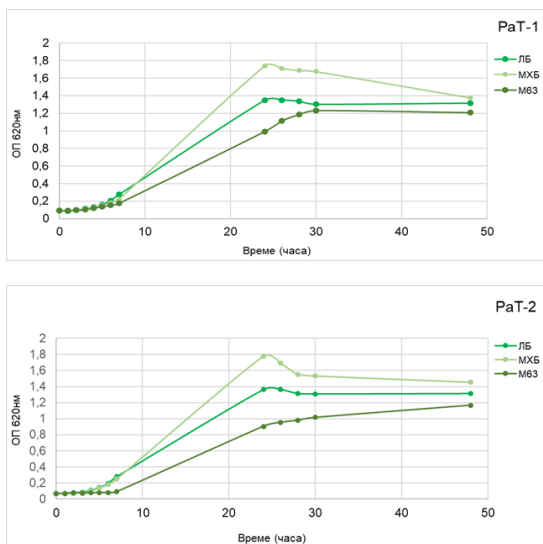
	ОП _{макс620нм}		
	ЛБ	МХБ	М63
PaT-1	1,35 ± 0,009	1,740 ± 0,04	1,23 ± 0,08
PaT-2	1,36 ± 0,05	1,778 ± 0,09	1,166 ± 0,09
PaT-3	1,58 ± 0,05	1,523 ± 0,08	1,173 ± 0,09
PaT-4	1,25 ± 0,03	1,394 ± 0,09	1,244 ± 0,01
PaT-5	1,06 ± 0,06	1,696 ± 0,03	0,803 ± 0,08
PaT-6	1,33 ± 0,01	1,637 ± 0,04	1,263 ± 0,09
PaT-7	1,33 ± 0,07	1,419 ± 0,07	0,860 ± 0,07
PaT-8	0,978 ± 0,06	1,333 ± 0,08	0,734 ± 0,08
PaT-9	1,01 ± 0,08	0,917 ± 0,09	1,09 ± 0,1
PaT-10	0,890 ± 0,06	0,524 ± 0,08	0,656 ± 0,09
PaT-11	1,142 ± 0,03	1,430 ± 0,09	1,142 ± 0,09
PaT-12	0,692 ± 0,05	0,809 ± 0,09	0,388 ± 0,09
Pa01	1,782 ± 0,09	1,625 ± 0,07	1,15 ± 0,02

Растежни характеристики на щамове двойки 1 (PaT-1/PaT-2) и 2 (PaT-3 и PaT-4)

Двойки щамове 1 (PaT-1/PaT-2) и 2 (PaT-3 и PaT-4) попадат в една клъстерна група и коефициента на сходство е най- висок в сравнение с другите двойки щамове. При двойка щамове PaT-1 и PaT-2, коефициента на сходство е 95% според проведения RAPD анализ. Изолирани от пациент на около 16 годишна възраст и между двете изолации са проведени 3 цикъла с терапия с инхалаторен антибиотик тобрамицин. Двата щам растат идентично, с единствена разлика в продължителността на лаг фазите (на която е обърнато специално внимание по-долу). При растеж в среда МХБ се достигат най-високи стойности на оптична плътност ($OP_{\text{макс}}$) и при двата щам (Фигура 3).

След проведения RAPD анализ на двойка щамове PaT-3 и PaT-4 показва коефициент на сходство около 85%. И при тази двойка както и при първата са били проведени 3 цикъла с инхалаторен тобрамицин, както и при първата двойка щамове.

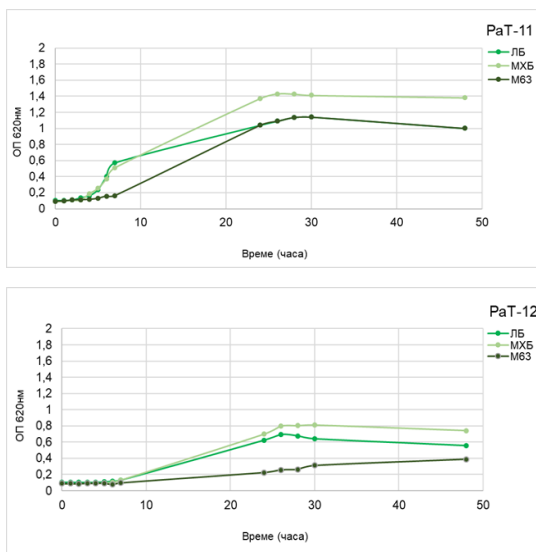
Щамът изолиран след третиране с инхалаторен тобрамицин в среда ЛБ достига по-ниски стойности на $OP_{\text{макс}}$. В солевата среда М63 и двата щам са с най-слаб растеж в сравнение с другите изследвани среди.



Фигура 3. Растежни криви на двойка шамове PaT-2 и PaT-2 в трите хранителни среди

Растежни характеристики на двойки шамове 3-6

В тази група двойки според RAPD анализа се очертава допълнително групиране: шамовете от двойки 3, 5 и 6 (Фигура 4), изолирани от трима различни пациенти преди третирането, принадлежат към една клъстерна група с 84% сходство, след което във всяка от тези двойки се регистрира значителна *диверсификация на гено типа* при шамовете, изолирани след третиране спрямо предходните изолати.



Фигура 4. Растежни криви на двойка шамове PaT-11 и PaT-12 в трите хранителни среди

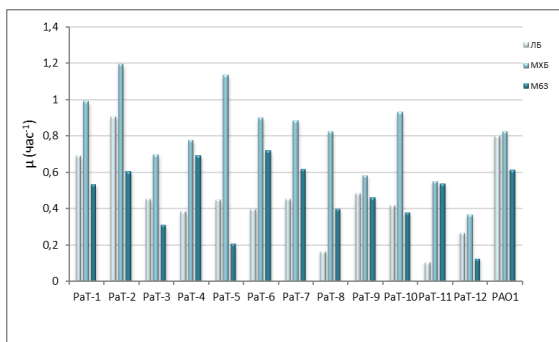
На таблица 3 са представени обобщено стойностите на $OP_{\text{макс}}$ при растеж на шамовете в трите среди.

При повечето от шамовете в среда M63 стойностите на $OP_{\text{макс}}$ са най-ниски в сравнение с другите среди (Таблица 3).

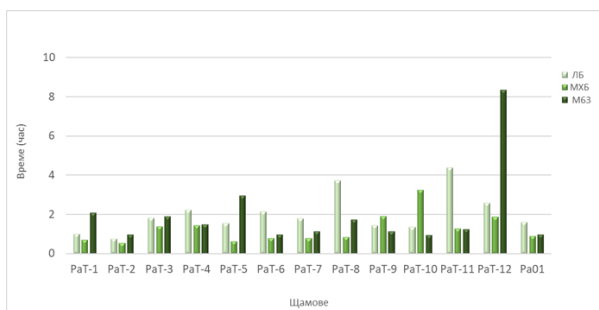
Растежът в среда M63 е интересен и по друга причина: един от тестовете за ауксотрофия, използван и при изследвания на MB изолати (La Rosa *et al.*, 2021), включва култивиране в минимални солеви среди без аминокиселини. Според литературата, ауксотрофията при някои MB патогени представлява адаптация за енергийна ефективност – вместо да синтезират енергоемко определени аминокиселини, те ги използват директно от наличната мукозна среда в MB бял дроб (La Rosa *et al.*, 2021).

2.1.2. Скорост на растеж и генерационно време

На базата на получените резултати от растежните криви бяха изчислени *скоростта на растеж* (Фигура 5) и *генерационното време* (Фигура 6) на щамовете по среди. Анализът на растежните криви показва, че щамовете от Двойка 1 имат най-бърз растеж и надминават референтния щам PAO1 във всички среди. Генерационното време е най-кратко в среда МХБ за повечето щамове, което съответства на по-бърз растеж. Особено внимание заслужава Двойка 1, където щамът, изолиран след лечение, расте по-бързо в богатите на хранителни вещества среди.



Фигура 5. Скорост на растеж на двойките щамове в трите изследвани хранителни среди



Фигура 6. Генерационно време на растеж на двойките щамове и референтния щам

2.1.3. Лаг-фаза

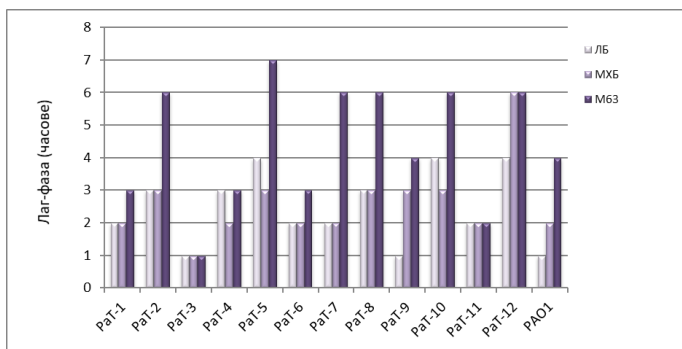
Въз основа на анализа на растежните криви бяха определени също и продължителностите на лаг-фазите при растежа на щамовете в трите среди. От проведените изследвания установихме, че в сравнение с техните чифтни щамове, в повечето случаи (с изключение на двойка 3) щамовете, изолирани след инхалаторна терапия с тобрамицин се характеризират с удължаване на лаг-фазата на растеж в поне две от трите изследваните среди

Лаг фазата е начален етап от растежа на бактериалните култури, през който бактериите се адаптират към нови среди без видима промяна в оптичната плътност (ОП) (Таблица 4 и Фигура 7). Тя е важен адаптационен механизъм, който помага на патогените да се справят с неблагоприятни условия. При щамовете, изолирани след антибиотична терапия, се наблюдава удължена лаг фаза, което може да е от полза за тяхното оцеляване след лечение. Това удължаване на лаг фазата е възможно да е свързано с наличието на персистентни клетки, които са по-устойчиви на лечение. Забавената скорост на растеж също е характерна адаптация при тези щамове, особено в по-късни етапи на колонизация.

Обаче за разлика от лаг-фазата при нея не се отчита стриктен модел на промяна в чифтовете щамове, във връзка с проведената ин хост терапия.

Таблица 4. Лаг фази на щамовете при растеж в три среди

	Лаг фаза		
	ЛБ	МХБ	МБЗ
PaT-1	2 часа	2 часа	3 часа
PaT-2	3 часа	3 часа	6 часа
PaT-3	1 час	1 час	1 час
PaT-4	3 часа	2 часа	3 часа
PaT-5	4 часа	3 часа	7 часа
PaT-6	2 часа	2 часа	3 часа
PaT-7	2 часа	2 часа	6 часа
PaT-8	3 часа	3 часа	6 часа
PaT-9	1 час	3 часа	4 часа
PaT-10	4 часа	3 часа	6 часа
PaT-11	2 часа	2 часа	2 часа
PaT-12	4 часа	6 часа	6 часа
PaO1	1 час	2 часа	4 часа



Фигура 7. Продължителност на лаг-фазите на щамовете при растеж в трите среди

2.1.4. Прикрепен растеж на щамовете (биофилми)

Една от фенотипните характеристики на патогенните бактерии, за които е прието, че са адаптации, свързани с хроничните заболявания, е формирането на биофилми (La Rosa *et. al.*, 2023).

В настоящия дисертационен труд анализът на данните за биофилм образуването целеше да се изясни дали и доколко третирането на пациентите с антибиотика тобрамицин повлиява биофилм-образуващите характеристики на щамовете, изолирани след терапията. Изследвали сме количеството на биофилма и промените му от 24-ти до 48-ми час.

На Таблица 5 са обобщени стойностите за максималното количество биофилм, регистриран в хода на изследването по среди за всеки щам. При това представяне на данните се вижда, че въпреки по-бавния растеж в бедната на хранителни вещества среда М63, в нея на 48 час се отчита тенденция за достигане на по-висока максимална стойност на биофилмната биомаса в сравнение с богатите среди (Таблица 5).

Таблица 5. Максимално количество биофилм (A_{570nm}) по среди. В скоби е показано на кой час е регистрирано показаното количество.

Щам	Среда ЛБ	Среда МХБ	Среда М63
PaT-1	0,940 ± 0,04 (48час)	0,979 ± 0,05 (24час)	1,110 ± 0,03 (48час)
PaT-2	0,651 ± 0,03 (48час)	0,602 ± 0,01 (48час)	0,896 ± 0,02 (48час)
PaT-3	0,858 ± 0,01 (48час)	0,575 ± 0,004 (24 час)	0,975 ± 0,01 (48час)
PaT-4	0,770 ± 0,02 (48час)	0,902 ± 0,05 (равни)	0,893 ± 0,02 (48час)
PaT-5	0,392 ± 0,01 (равни)	0,812 ± 0,01 (48час)	0,898 ± 0,005 (48час)
PaT-6	0,675 ± 0,01 (48час)	0,793 ± 0,01 (равни)	0,983 ± 0,02 (24час)
PaT-7	0,576 ± 0,01 (48час)	0,624 ± 0,05 (равни)	0,992 ± 0,02 (48час)
PaT-8	0,698 ± 0,01 (48час)	0,628 ± 0,01 (48час)	0,793 ± 0,003 (48час)
PaT-9	0,498 ± 0,01 (48час)	0,700 ± 0,03 (48час)	0,897 ± 0,003 (48час)
PaT-10	0,795 ± 0,01 (равни)	0,591 ± 0,03 (48час)	0,883 ± 0,003 (48час)
PaT-11	0,928 ± 0,01 (48час)	1,101 ± 0,008 (48час)	1,107 ± 0,002 (48час)
PaT-12	0,987 ± 0,008 (48час)	1,109 ± 0,01 (48час)	0,983 ± 0,05 (48час)
Pa01	1,01 ± 0,003 (48час)	1,10 ± 0,002 (48час)	1,11 ± 0,004 (48час)

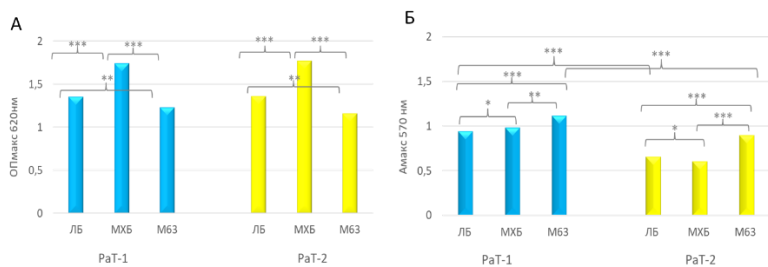
В настоящото изследване също не се отчете ясна тенденция на разлики в биофилм образуването между щамовете в двойките според момента на изолирането им, съответно не може да се даде извод за ефекта на ин виво третирането на пациентите по отношение на този фенотип.

2.1.5 Сравнителен анализ на ефекта на трите среди върху растежа на шамовете в течна среда и като биофилм

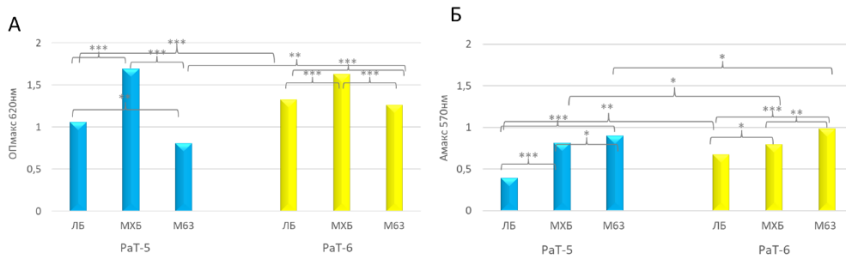
Получените количествени данни за растежа на шамовете както в течна среда, така и като биофилм показаха шам-специфични различия между шамовете в рамките на двойките, между двойките, и в сравнение с референтния шам.

Как обаче се съотнасят растежа в течна среда и като биофилм? В отговор на въпроса дали има ясно изразени тенденции в растежното поведение на шамовете при поставянето им в средите проведохме статистически анализ на достоверността на разликите при групите данни (one-way ANOVA с постестимационен тест Tukey HSD)

По-долу са представени графики, представителни за групите шамове с висок (Фигура 8) и нисък коефициент на молекулярно-биологично сходство (Фигура 9). Отразени са максималните стойности за растеж и биофилм, достигнати от шамовете.



Фигура 8. Статистически анализ на данните за растеж (А) и биофилм образуване (Б) при двойка 1 (PaT-1/PaT-2). Със "звезди" (*) е означена статистическата достоверност на разликите, като с * е означена статистическа достоверност при $P < 0,05$; с ** при $P < 0,01$; с ***- $P < 0,001$.



Фигура 9. Статистически анализ на данните за растеж (А) и биофилм образуване (Б) при двойка 3 (PaT-5/PaT-6). Със "звезди" (*) е означена статистическата достоверност на разликите, като с * е означена статистическа достоверност при $P < 0,05$; ** при $P < 0,01$; ***- $P < 0,001$.

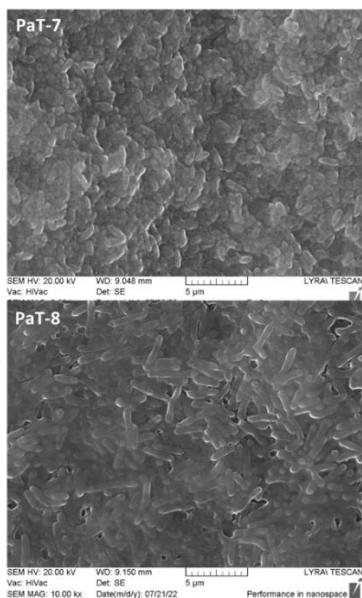
Въпреки щам-специфичните отговори на растеж и биофилм образуване, в колекция от моделни клинични щамове, при всички клинични изолати беше отчетена една обща тенденция. Тя е свързана с поведението им по отношение на минималната солева среда М63. При нея се установи тенденция за най-слаб растеж в течната среда и - противоположно на това, за най-силен растеж като биофилм.

2.2 Сравнителни морфологични характеристики на щамовете

2.2.1. Характеризиране на структурата на биофилмите чрез сканираща електронна микроскопия

Структурните характеристики на биофилмите са важен елемент на фенотипната характеристика, което беше нашето основание да предприемем СЕМ изследване на двойките щамове.

На фигура 9 като илюстрация на наблюдаваната в повечето от двойките тенденцията е представена морфологията на биофилмите при двойка щамове PaT-7 и PaT-8.



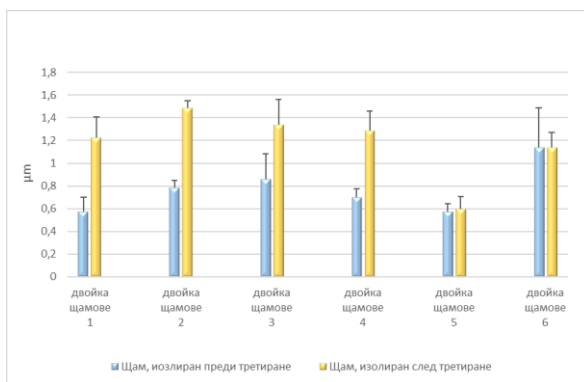
Фигура 9. Морфология на биофилмите-на двойка щамове PaT-7 и PaT-8

Структурните особености и различия между щамовете вероятно се дължат на промените в химичния състав и пропорциите на компонентите на екстрацелуларния матрикс на биофилмите. *P. aeruginosa* синтезира три основни екзополisahарида – алгинат, Psl и Pel, които влияят върху патогеността и устойчивостта на инфекциите. При четири от изследваните двойки щамове е установено визуално намаляване на мукоидността след третиране, което насочва към

различия в екстрацелуларния матрикс. В бъдеще се планира анализ на молекулярните механизми, свързани с тези адаптации.

2.2.2 Размер на клетките

При огледа на електронограмите на щамовете вниманието ни беше привлечено от възможни различия в размера на клетките на изследваните от нас клинични щамове в рамките на двойките. Проведохме морфометрично изследване на размера на бактериалните клетки се установи, че в 4 от изследваните 6 двойки щамовете, изолирани след третиране с антибиотика, клетките имат по-големи размери. Това се отнася както до дължините, така и до ширините (Фигура 10).



Фигура 10. Дължина на клетките на двойките щамове

Предполага се, че различните форми на клетките могат да предоставят различни предимства при променящите се условия. Например, удължената форма на бактериалната клетка, с увеличената си повърхност, може да осигури адаптивно предимство при промяна на хранителните източници (Farnia *et. al.*, 2018). Може да предположим,

че установеното при нашите двойки щамове удължаване на клетките на щамовете, изолирани след третиране, има адаптивна роля.

2.3. Подвижност

При изследванията на серийни изолати от МВ пациенти един от често наблюдаваните фенотипове е намалена или липсваща подвижност на бактериите (Harrison *et. al.*, 2020).

В настоящия дисертационен труд са изследвани са три вида подвижност: флагеларна подвижност, подвижност чрез „роене“ и подвижност чрез „трептене“. На таблица 6 са обобщени резултатите от проведените експерименти свързани с подвижността на щамовете.

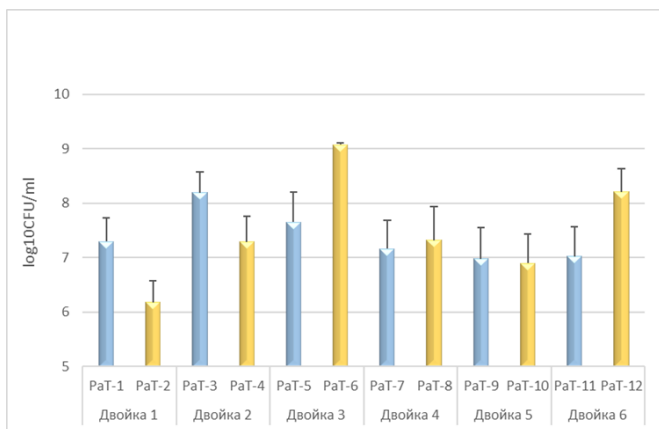
Таблица 6. Стойности на трите вида подвижност.

Щам	Диаметър на зоните на придвижване (см.)		
	Флагеларна подвижност	„роене“ (swarming)	„трептене“ (twitching)
PaT-1	2,77 ± 0,08	0,5 ± 0,08	-
PaT-2	2,8 ± 0,29	0,375 ± 0,09	1 ± 0
PaT-3	2,6 ± 0,33	0,6 ± 0,08	1,075 ± 0,09
PaT-4	2,7 ± 0,12	0,6 ± 0,08	1,125 ± 0,05
PaT-5	2,8 ± 0,21	0,65 ± 0,12	-
PaT-6	3,8 ± 0,32	0,75 ± 0,23	-
PaT-7	3,75 ± 0,16	0,825 ± 0,05	-
PaT-8	2,6 ± 0,12	0,625 ± 0,17	-
PaT-9	2,1 ± 0,27	0,45 ± 0,13	-
PaT-10	1,47 ± 0,08	0,125 ± 0,05	-
PaT-11	2,95 ± 0,1	0,08 ± 0,21	-
PaT-12	1,95 ± 0,20	0,374 ± 0,15	-
PAO1	2,5 ± 0,43	1,25 ± 0,28	2 ± 0,16

При обобщение на данните от проведените анализи за подвижност на щамовете, се оказва, че изследваната от нас колекция се характеризира с добра флагеларна подвижност и със слаба подвижност чрез „роене“ в сравнение с описаната в литературата подвижност за други щамове *P. aeruginosa*.

2.4. Инвазивност на *P. aeruginosa* в белодробна аденокарциномна клетъчна линия A549

Инфекцията с *P. aeruginosa* е водеща причина за заболяемостта и смъртността при пациенти с МВ. Проучването на инвазивността на различни щамове на *P. aeruginosa* в клетките от белодробна линия A549 показва, че всички щамове са инвазивни и се размножават вътреклетъчно. Щамът PaT-6, изолиран след 15 инхалаторни цикъла на антибиотик, показва най-висока инвазивност и способност за вътреклетъчно размножаване, което обяснява неговата устойчивост на лечение. Тази адаптация вероятно му позволява да оцелее в белия дроб въпреки антибиотичната терапия (Фигура 11).



Фигура 11. Нарастване на количеството вътреклетъчни бактерии спрямо концентрацията на инокулума ($\text{Log } 10 = 5 \text{ CFU/ml}$). Бактериите са изолирани от A549 клетки след ко-култивиране за 2 часа и последващо култивиране за 22 часа в среда DMEM, обогатена със 100 $\mu\text{g/ml}$ тобрамицин.

3. Ефекти на суб-МПК тобрамицин върху фенотипа на щамове

В белия дроб на болните от МВ се задържат големи количества мукозна секреция. Това създава микрохабитати, които се характеризират с градиенти на различни вещества, вкл. антибиотици. Друг фактор са вариациите в наличните количества на препаратите във времето (Naehrig *et. al.*, 2023). Така в някои моменти **бактериалната популация може да бъде изложена на субинхибиторни концентрации** (суб-МПК) на антибиотици (Laureti *et. al.*, 2013).

Целта на тази част от настоящото изследване е да се проследи доколко терапията на пациентите с тобрамицин, последвана от ин хост еволюция на бактериите от чифтните щамове, се е отразила върху фенотипния отговор на изолатите при **култивиране в присъствието на суб-МПК на тобрамицин**.

3.1 Определяне на минимална потискаща концентрация (МПК) на тобрамицин

Чрез тестови ленти установихме, че според стандартите на EUCAST (МПК <10 µg/ml), като се счита, че са резистентни тези щамове, при които МПК е > 2 µg/ml (EUCAST Clinical Breakpoint Tables v. 14.0, valid from 2024-01-01). Всички изследвани щамове са чувствителни към антибиотика (Таблица 7).

Таблица 7. Стойности за ½ и ¼ МПК на тобрамицин, определени с тест-лентички

Щам	PaT-1	PaT-2	PaT-3	PaT-4	PaT-5	PaT-6	PaT-7	PaT-8	PaT-9	PaT-10	PaT-11	PaT-12
МПК (µg/ml)	0,25	0,25	0,50	0,75	0,50	1	0,38	0,75	1,5	1,5	0,75	1,5
½ МПК (µg/ml)	0,125	0,125	0,25	0,375	0,25	0,5	0,19	0,375	0,75	0,75	0,375	0,75
¼ МПК (µg/ml)	0,062 5	0,062 5	0,125	0,018 75	0,125	0,125	0,095	0,018 75	0,375	0,375	0,01875	0,375

Двойката щамове PaT-1/PaT-2, с висок коефициент на сходство, се оказва най-чувствителна към тобрамицин (МПК 0,25 µg/ml и за двата щамове). При двойки PaT-3/PaT-4, PaT-5/PaT-6, PaT-7/PaT-8 и PaT-11/PaT-12 се наблюдава повишение на МПК след проведеното лечение като се запазва чувствителността към препарата. Щамовете в двойка PaT-9/PaT-10, са с еднаква стойност на МПК.

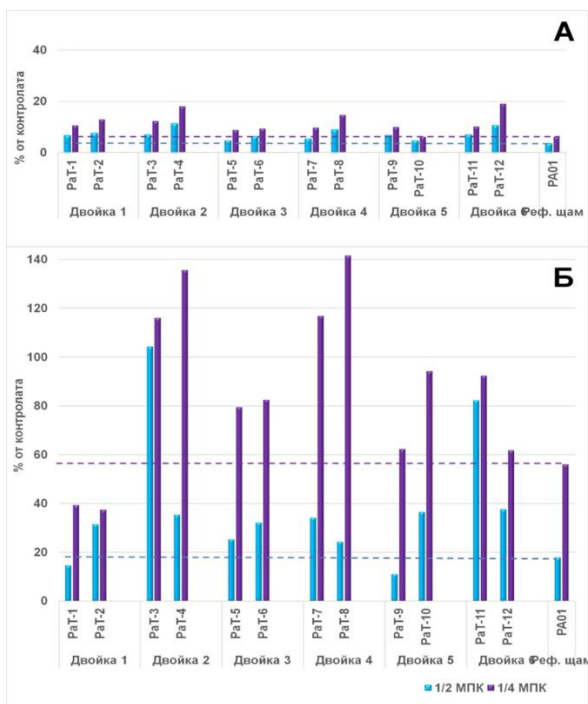
3.2. Ефект на култивирането в присъствието на суб-МПК тобрамицин върху растежа и биофилм образуването

Култивирането на щамовете в присъствие на суб-минимални инхибиторни концентрации (½ МПК и ¼ МПК, Таблица 7) показва потискане в сравнение с контролните проби, които не съдържат антибиотик. На Фигури 12-14 ефектът от това култивиране е представен в проценти от контролите - щамовете, расли в същата среда без антибиотик.

При проследяване ефекта на култивиране в присъствие на суб-МПК тобрамицин в среда МХБ, богата на хранителни вещества се наблюдава, че растежът на двойките щамове в течна среда е силно

потиснат. Независимо от това трябва да се отбележи, че при повечето шамове процентът от контролата е по-висок от този на референтния шам PAO1 и при двете изследвани суб-летални концентрации тобрамицин. Това сочи по-добра приспособеност в сравнение с лабораторния шам (Фигура 12, А).

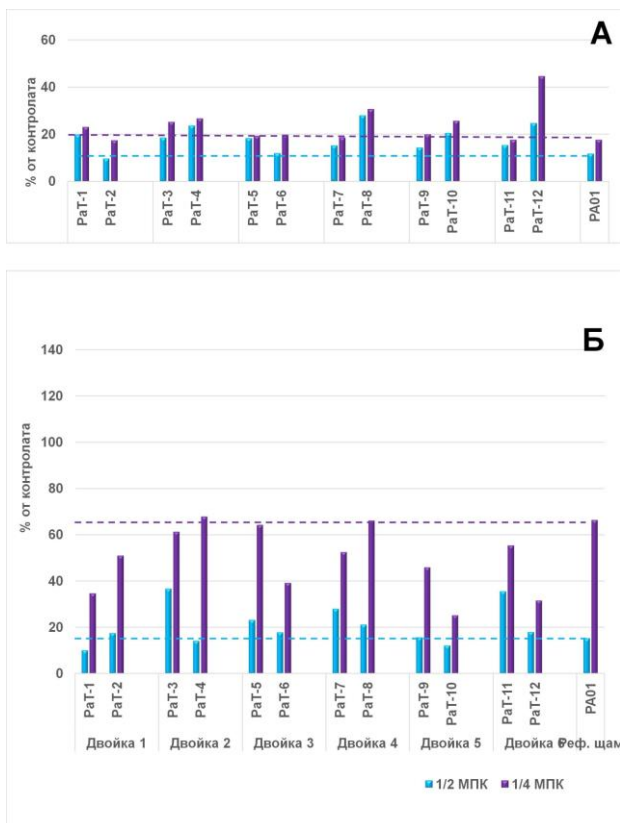
При анализиране на данните от биофилм образуването на двойките шамове в средата, богата на хранителни вещества, изолатите реагират различно (шам специфично) на третирането със суб-МПК. При 4 от изследваните шамове (PaT-3/PaT-4; PaT-7/PaT-8) се наблюдава стимулиране на биофилм образуването над 100% в присъствие на $\frac{1}{4}$ МПК тобрамицин (Фигура 12, Б), като при тези шамове биофилма се стимулира, достигайки дори до стойности 115-140%, спрямо контролите. Стимулирането на биофилм в присъствие на суб-МПК тобрамицин може да се окаже сериозен риск от възстановяване на инфекцията при МВ пациенти, като се има предвид променливото количество на антибиотика както в интервали спрямо третирането, така и в отделните микрохабитати в белия дроб.



Фигура 12. МПК-1. Ефекти на култивиране в присъствие на суб-МПК тобрамицин, добавени в среда МХБ, върху растежа (ОП_{макс}) (А) и биофилм образуването (Б). Резултатите са представени като % от нетретираните контроли. С хоризонтални пунктирани линии е маркиран ефекта на ¼ МПК (лилаво) и ½ МПК (синьо) върху референтния шам РАО1.

При анализиране на данните на растежа на двойките шамове като течни култури в минималната солева среда – Мб3, с добавени суб-летални концентрации антибиотик се наблюдава, че растежът е потиснат, но като процентно измерение потискането е значително по-слабо от това при растежа, отчетен в среда МХБ с добавени аналогични количества антибиотик (Фигура 13, А).

В присъствие на $\frac{1}{4}$ МПК тобрамицин в среда М63, процентът от контролите при биофилма на шамове РаТ-1, РаТ-3, РаТ-4, РаТ-8, РаТ-10 и РаТ-12 е по-висок от този на Ра01 (Фигура 13, А). Що се отнася до биофилмния растеж среда М63, отговорът на моделните шамове в присъствие на $\frac{1}{4}$ МПК най- често е съизмерим с този на референтния шам. в присъствие на $\frac{1}{2}$ МПК обаче потискането на биофилмния растеж е по-слабо от това при РА01, което се изразява в по-високи стойности на процентите от нетретираните контроли. Всичко това сочи, че шамовете са по-толерантни към антибиотика в сравнение с референтния шам.



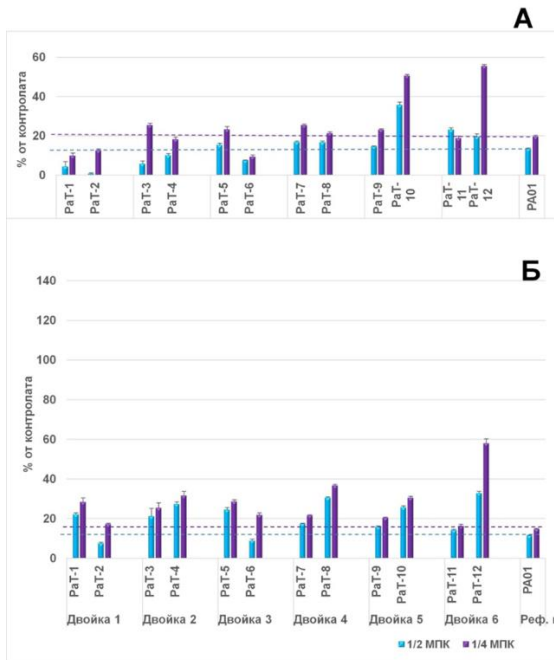
Фигура 13. МПК-2. Ефекти на култивиране в присъствие на суб-МПК тобрамицин, добавени в среда М63, върху растежа (ОП_{макс}) (А) и биофилм образуването (Б). Резултатите са представени като % от нетретираните контроли. С хоризонтални пунктирани линии е маркиран ефекта на 1/4 МПК (лилаво) и 1/2 МПК (синьо) върху референтния щам PA01.

3.3 Ефект на култивирането в присъствието на суб-МПК тобрамицин върху виталността на бактериите

По-горе описаните ефекти на суб-леталните концентрации тобрамицин се базират на дензитометрични (растеж) или спектрофотометрични (биофилм) методи за анализ. Те дават количествени данни, но регистрираните стойностите са сумарни за живи + мъртви клетки. Това оставя отворен въпроса за ***виталността на клетките, развити в присъствието на антибиотика.***

Един доказал се вече тест за оценка на виталността на бактериалните клетки е провеждането на култивиране в присъствието на резазурин, който живите клетки окисляват до резорурфин (Bleeskerge *et. al.*, 2023).

Това ни даде основание да използваме резазуриновия тест за оценка на промените във виталността на щамовете под влияние на суб-МПК тобрамицин с помощта на кит Аламар блу (Invitrogen). Данните, както и по-горе, сме представили като процент от нетретираната контрола на всеки щам (Фигура 14).



Фигура 14. МПК-3. Ефекти на култивиране в присъствие на суб-МПК тобрамицин, върху виталността на бактериите при растеж в течна среда (А) или в биофилм (Б). Резултатите са представени като % от нетретираните контроли. С хоризонтални пунктирани линии е маркиран ефекта на 1/4 МПК (лилаво) и 1/2 МПК (синьо) върху референтния шам PA01.

При повечето от щамовете, култивирани в течна среда, се установи, че ефектът на суб-МПК върху виталността (Фигура 14, А) е по-силен, отколкото върху оптичната плътност (вж. Фигура 13, А). Това вероятно се дължи на факта, че при определяне на оптичната плътност тя е сумарна и включва както живите, така и остатъците от мъртвите клетки. За разлика от това, тестът за виталност отчита активността само на живите клетки.

В данните, представени на Фигура 14 А, се открояват като особено толерантни към присъствието на антибиотика (изразено като висок % от контролите) два от щамове, изолирани след третиране. Първият е РаТ-10 - от двойка 5. Тази двойка е изолирана в начален етап от инфекцията, в нея изходният щам РаТ-9 има най-висока антибиотична резистентност сред изолираните преди третирането.

Вторият е щам РаТ-12, двойка 6, изолиран от напреднал етап на колонизацията.

Съпоставянето на данните за биофилмния растеж (Фигура 13, Б) и за виталността на биофилмните клетки (Фигура 14, Б) показват при повечето щамове по-слаб процентен ефект на третирането върху биофилмната биомаса, отколкото върху виталността. Това показва, че в биофилмите има включени известно количество мъртви клетки.

И по отношение на виталността на биофилма при щамове РаТ-10 и РаТ-12 се отчита най-висок процент от контролата, което още веднъж ги сочи като отлично адаптирани за оцеляване в присъствието на антибиотика. Към тази група обаче може да добавим и щам РаТ-8, също изолиран след третиране.

Сумарно, в рамките на експерименталната схема, отнасяща се до ефекта на суб-МПК, резултатите показаха повишение на толерантността към тобрамицин в резултат на терапията, отчетена като по-високи проценти от контролите при щамове, изолирани след терапия. Това се отчита при двойка 2 (при 3 от направените сравнителни тестове), двойка 4 (при 4 от направените сравнителни тестове), двойка 5 (при 4 от направените сравнителни тестове) и двойка 6 (при 4 от направените сравнителни тестове). Това

обосновава извода за **тенденция към нарастване на толерантността към тобрамицин при щамовете, изолирани след третирането с антибиотика.**

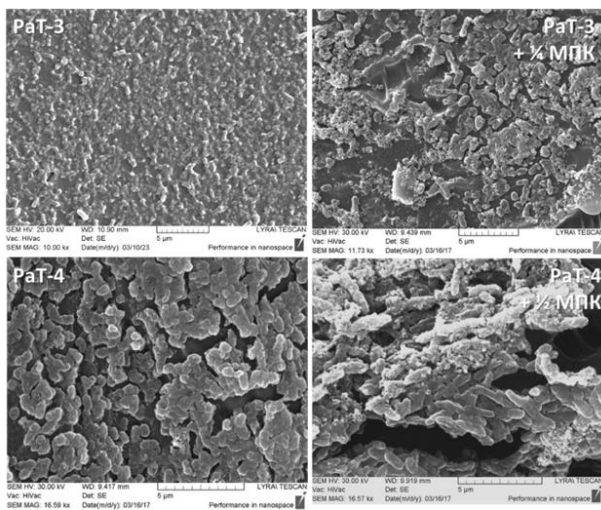
Не се отчитат промени в толерантността при двойка 1 (която и по останалите резултати от фенотипирането, с изключение на удължената лаг-фаза при РаТ-2, не се отличава много от референтния лабораторен щам), както и при двойка 3, за която по-горе беше показано, че високата инвазивност и вътреклетъчно размножаване в еукариотни клетки е водещ адаптивен механизъм.

3.4 Ефект на култивирането в присъствието на суб-МПК тобрамицин върху структурата на бактериалните биофилми

Количествените изследвания в присъствието на суб-МПК показаха при някои от щамовете съществен биофилмнен растеж, особено в среда МХБ. Следващият въпрос, който си поставихме, е доколко структурата на изградените в присъствието на суб-МПК антибиотик тобрамицин биофилми се запазва или променя.

Например при култивиране в среда МХБ, съдържаща сублеталните дози антибиотик, щамовете от двойка 2 - РаТ-3/РаТ-4, се характеризират със **стимулиране на биофилмния растеж**. Изследвахме структурата на тези биофилми чрез СЕМ.

Наблюдаваната морфологична картина сочи аберантна структура на биофилма, която е възможно да е свързана промени в екстрацелуларния матрикс в резултат на третирането (Фигура 15).



Фигура 15. Морфология на биофилмите в присъствие на $\frac{1}{4}$ МПК и $\frac{1}{2}$ МПК тобрамицин-на двойка щамове PaT-3 и PaT-4.

3.5. Ефекти на култивирането в присъствие на суб-МПК тобрамицин върху подвижността на щамовете

Подвижността е ключова за бактериалната колонизация, позволявайки на микроорганизмите да се придвижват към благоприятни условия (Saeki *et. al.*, 2021). В присъствие на суб-МПК, подвижността е потисната при повечето щамове. Под стреса на антибиотика бактериите придобиват по-неподвижен фенотип .

ОБОБЩЕНИЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

Молекулярно-епидемиологичният анализ с приложението на UPGMA метода показва, че по-голяма част от шамовете, изолирани от български пациенти с МВ преди третиране с инхалаторен тобрамицин (PaT-1, PaT-3, PaT-5, PaT-9 и PaT-11), както и шамове PaT-2 и PaT-4 (изолирани след третиране с антибиотик) попадат в една клъстерна група, CG-I, заедно с шамове LES431, AMT 0060-2, AES-1R и C3719 от международен референтен панел, които са с показатели на особено висока вируленстност и морбидност (De Soyza *et. al.*, 2013). Молекулярно биологичните различия, установени при повечето двойки между шамовете, изолирани преди и след третирането, са в подкрепа на осъществяването на ин хост генетична диверсификация, както е описано преди при сравняване на шамове от различни етапи на колонизацията на пациенти с МВ (Cramer *et. al.*, 2023; Espaillet *et. al.*, 2024)

Проведеният *фенотипен анализ* на двойките клинични изолати беше насочен към характеристиките, определяни в литературата като адаптационни за развитието на инфекциите от *P. aeruginosa* при пациенти с МВ. Оригиналната насока в изследването е търсенето на ин-хост промени в адаптационните фенотипове, свързани с терапията на пациентите с антибиотика тобрамицин. Анализът на резултатите насочи вниманието ни към няколко нови аспекта, които не са съобщавани до момента в достъпната ни литература:

1. Удължаване на лаг-фазата на щамовете, изолирани след третиране

Сравнението на растежните криви при двойките щамове показва ясна тенденция за **удължаване на периода на лаг-фазата** при щамовете, изолирани след приложението на инхалаторния антибиотик. Това е трайна тенденция, проявяваща се и в трите изследвани среди и е доказана **за пръв път в** настоящото изследване. Лаг-фазата представлява времето, през което бактериалните клетки се адаптират към променящата се среда. Въпреки че не се отбелязва увеличение в броя на бактериите по време на лаг-фазата, изследванията показват, че те са метаболитно активни и се подготвят за влизане в експоненциалната фаза на растеж. Настоящото наблюдение за удължаване на лаг-фазата при щамовете след третиране с тобрамицин показва, че антибиотикът може да влияе на този параметър на растежа. Вероятно този ефект е свързан с явлението на персистенция. Персистентните клетки са фенотипни варианти на обикновени бактериални клетки, които преживяват антибиотичното действие благодарение на по-ниска метаболитна активност или латентност. След изтичане на периода на антибиотично лечение, персистентните клетки могат да се възстановят като метаболитно активни или неактивни клетки. Настоящите резултати показват, че щамовете, изолирани след третиране, може би произтичат от персистентни клетки, а удължената лаг-фаза може да е следствие от антибиотичното действие и адаптацията на бактериалните популации за оцеляване при неблагоприятни условия. Забележителното в нашите резултати е, че *тази характеристика е запазена в поколенията и след многократни*

ре-култивирания в лабораторни условия, извън гостоприемника. В литературата до момента не са били съобщавани данни за ефекта на антибиотична терапия върху продължителността на лаг-фазата.

2. Ефект на хранителните среди: Минималната солева среда М63 е най-неблагоприятна за растежа на щамовете в течна култура, но най-благоприятна за развитието на биофилми

Един от ключовите адаптивни механизми на *P. aeruginosa* по време на колонизация на белите дробове при пациенти с МВ е формирането на биофилми. Този процес играе роля в бактериалната персистенция в заразените бели дробове. Сравнението между изолатите от преди и след лечението с тобрамицин не показва ясни модели на промяна между ранните и по-късните изолати. Сравняването обаче на параметрите на растеж в течна среда и като биофилм при всички щамове от двойките, независимо от момента на изолиране спрямо третирането, показва че в минималната солева среда М63, която е най-неблагоприятна за развитие на културите в течната фаза, се установява най-силен прикрепен растеж като биофилми. Такава тенденция не е описвана в достъпната ни литература и освен това не беше доказана при референтния лабораторен щам PAO1, при който не се регистрираха статистически достоверни различия на максималното биофилм образуване в трите сравнени среди. Може да се предположи, че става дума за *характеристика с адаптивен характер за средата на бял дроб при пациенти с МВ, запазена като фенотипна характеристика на изолатите въпреки многократните рекултивирания.*

3. Увеличаване на размера на бактериалните клетки на щамовете, изолирани след третиране

В достъпната ни литература не открихме съобщения за промени в клетъчната морфология на бактериите, изолирани от пациенти с МВ. Някои публикации, отнасящи се до въздействието на други фактори на средата, са показали, че увеличеният размер на бактериалните клетки носи преимущества в среди с бедно хранително съдържание или при други неблагоприятни условия. Това ни дава основание да направим извода, че увеличението в размерите на клетките при щамовете на *P. aeruginosa*, изолирани след антибиотичната терапия, е **адаптивна промяна, свързана с въздействието на антибиотика и запазила се като фенотипна характеристика на изолатите въпреки многократните рекултивирания.**

4. Инвазивността и вътреклетъчното размножаване в еукариотни клетки като механизъм за избягване на антибиотичното действие.

За да избегнат вродените защитни механизми на гостоприемника, много бактерии са развили способността да проникват и оцеляват в нефагоцитни еукариотни клетки (Sana *et. al.*, 2015). Моделите на инфекция, базирани на клетъчни култури, са приет подход за оценка на вирулентността на бактериите. При контакт с клетката гостоприемник различните щамове на *P. aeruginosa* проявяват различни фенотипове: те могат да останат прилепнали към повърхността на еукариотните клетки (прилепнал фенотип) или да проникват и оцеляват вътреклетъчно (инвазивен фенотип). Най-много данни относно инвазията на щамовете на *P. aeruginosa* са получени с използването на

модела на инфекция в клетките на роговицата (Cowell *et. al.*, 1995; Fleiszig *et. al.*, 1995).

Експериментите в настоящото изследване показаха, че всички тествани щамове на *P. aeruginosa* са способни да проникват, оцеляват и се възпроизвеждат в култивираните клетки. При един от щамовете, обаче, РаТ-6, това може да се окаже водещ механизъм за избягване на антибиотичната терапия. Щамът е изолиран след 15 цикъла на инхалаторно третиране, което сочи необичайно ниво на толерантност към антибиотика. Оказа се, че при рутинно тестване за определяне на МПК щамът е чувствителен към тобрамицин. Освен това характеристиките му на растеж не го открояват от другите щамове. Единственото обяснение на настоящия етап за неговата устойчивост *in vivo* в пациента е ***силната инвазивност и размножаване в еукариотните клетки, запазила се като фенотипна характеристика на izolата въпреки многократните рекултивирания.***

5. Ефекти на суб-МПК

В настоящото изследване беше приложена проверка на промените във фенотипните характеристики при култивиране на щамовете ***в присъствието на суб-летални количества от антибиотика***, чието ин-хост действие е във фокуса на изследването, в случая - суб-МПК от тобрамицин. Въздействайки със сублетални дози от антибиотика, стана възможно да се оцени промяната в толерантността към препарата при някои от щамовете, оцелели след *in vivo* срещите с него. Това е ***оригинален експериментален подход за***

сравнителна оценка на серийни и чифтни изолати, разработен в настоящия дисертационен труд.

Резултатите показаха, че тобрамицинът, приложен като $\frac{1}{2}$ МПК и $\frac{1}{4}$ МПК, определени за всеки от щамовете, при култивиране в течна среда МХБ потиска силно (90-95%) растежа. В МХБ може да се каже, че практически целите бактериални култури се пренасочват към прикрепен растеж като биофилм. Тревожен резултат е, че при две от двойките щамове в присъствието на $\frac{1}{4}$ МПК биофилмният растеж се стимулира до стойности от порядъка на 110-140% спрямо съответните нетретиранни контроли. Резултатът от една страна категорично подкрепя природата на биофилмите като протективна адаптация на бактериите. От друга страна посочва сериозния риск за пациентите в случай че бактериите се поставят в среда със сублетални количества антибиотик.

Поставени в бедна на нутриенти среда, М63, щамовете реагират по-различно. Потиска се не само растежа, но и биофилм образуването. В сравнителен план, потискането при растежа е по-слабо процентно изразено отколкото в среда МХБ

Установи се, че при повечето двойки процентът на потискането на растежа е от порядъка на процентната оценка на виталността на бактериите при растеж в течна среда М63. За разлика от това виталността в биофилмите е с по-ниска процентна стойност отколкото биофилмния растеж. Това е указание за наличието на известни количества мъртви клетки в биофилмите. Това допускане се потвърждава и от СЕМ изследването. СЕМ картината при щамовете, характеризиращи се със стимулиране на биофилмния растеж в присъствието на суб-МПК тобрамицин, са с аберантна структура.

Данните за ефектите на суб-МПК тобрамицин при четири от шестте сравнявани двойки сочат по-високи проценти на растеж, биофилм образуване и виталност на щамовете, изолирани след лечението на пациентите. Така чрез метода на култивиране в присъствието на суб-МПК става възможно да се демонстрира **тенденция за повишаване на толерантността към антибиотика в резултат на терапията**, въпреки че при стандартен тест за определяне на МПК всички сравнявани изолати се характеризират като тобрамицин-чувствителни.

6. За спецификата при някои добре адаптирани щамове

Щам РаТ-6, двойка 3

Пациентът, от който е изолирана тази двойка щамове, в продължение на 3 години има приложени 15 цикъла с инхалаторен тобрамицин, преди изолирането на РаТ-6. Изследването на фенотиповете показва, че този щам е с особено добре изразена способност да оцелява и да се репродуцира в еукариотни клетки, което е неговата специфична адаптация.

Щам 8, двойка 4

Щамът, изолиран от напреднал етап на инфекцията, се характеризира с бавен растеж, дълга лаг-фаза и достигане на ниски стойности на $ОП_{\text{макс}}$, характеристики на адаптация чрез персистенция.

Щамове РаТ-9 и РаТ-10, двойка 5

Въпреки че тези два щам са оценени като чувствителни към тобрамицин, стойността на определената за тях МПК е близка до горната граница на "чувствителност", 1.50 $\mu\text{g/ml}$. При поставяне на щам РаТ-10 в среда, съдържаща суб-МПК тобрамицин, щамът показва

сравнително по - близки до контролата стойности на растеж и виталност, което е указание за добра адаптация при условия на наличност на антибиотика.

Щам 12, двойка 6

Щамът, изолиран след третиране на пациент в напреднала фаза на колонизацията, притежава характеристики на забавен растеж, ниски стойности на $OP_{\text{макс}}$ и дълга лаг-фаза, характерни за добрите персистери. В добавка има добър инвазивен капацитет и се размножава добре в еукариотни клетки. И накрая, при растеж в присъствието на суб-МПК тобрамицин този шам се откроява с най-висок % витални клетки. Може да се обобщи, че в изследваната тук колекция този изолат съсредоточава най-много характеристики на добре адаптиран шам за условията на МВ бял дроб.

Изводи

1. Доказана е висока степен на филогенетично сходство между МВ изолати *P. aeruginosa* от български пациенти и МВ щамове от международен референтен панел, характеризиращи се с висока вирулентност и морбидност.
2. Растежът на щамовете в течни култури се благоприятства от богатия хранителен състав на средите ЛБ и МХБ, докато в минималната солева среда М63 по-силно се стимулира биофилм образуването.
3. Сравнението на растежните характеристики по двойки между щамовете, изолирани от един и същ пациент, показва ясно изразена тенденция за удължаване на лаг-фазата във връзка с проведената антибиотична терапия.
4. Сравнението чрез СЕМ на биофилмите показва ясно изразени структурни разлики в биофилмния екстрацелуларен матрикс на щамовете по двойки.
5. Установява се тенденция за увеличаване на размера на клетките от щамовете, изолирани след проведената терапия, в сравнение с чифтните им щамове.
6. Не се установява връзка между подвижността на щамовете и третирането на пациентите с тобрамицин. В присъствие на суб-МПК тобрамицин флагеларната подвижност е напълно редуцирана и само при два щамове се регистрира слаба роева подвижност.
7. Всички щамове от изследваните клинично изолирани двойки инвазират *in vitro* и се размножават вътреклетъчно в култивирани клетки А549.

8. Щам РаГ-6 се характеризира с изключително висока степен на вътреклетъчно размножаване. При него инвазивността се очертава като водещ адаптационен механизъм за оцеляване при терапията.
9. В присъствие на суб-МПК тобрамицин растежът на щамовете в течни среди се потиска силно, но е по-интензивен в сравнение с лабораторния референтен щам РАО1..
10. Ефектът на суб-МПК върху биофилмния растеж е щам-специфичен, от потискане до стимулиране. Биофилм-стимулирането при някои от щамовете показва, че суб-МПК количества антибиотик са рисков фактор, който трябва да бъде отчитан в клиничната практика.
11. Комплексната оценка (растеж в течни култури, биофилм, и виталност) на отговора на щамовете към присъствието на суб-МПК тобрамицин показва ясно изразена тенденция за нарастване на толерантността към препарата при щамовете, изолирани след терапия, в сравнение с чифтните им щамове.
12. Щамовете, изолирани след терапията с тобрамицин на пациенти в по-късни етапи на колонизацията, са по-добре адаптирани за оцеляване в присъствието на антибиотика и най-слабо се повлияват от наличието му в сублетални концентрации

Приноси

1. Получени са оригинални научни данни, показващи молекулярно-биологичното сходство на клинични щамове *P. aeruginosa*, изолирани от български пациенти с МВ, с МВ щамове от други географски райони, които са с показатели на особено висока вирулентност и морбидност.
2. За пръв път е проведено сравнително фенотипно изследване на двойки щамове, изолирани от пациенти с МВ преди и след инхалаторна терапия с тобрамицин. Чрез комплексен набор от методологии е осъществен анализ на възможните адаптации на *P. aeruginosa* към антибиотично лечение.
3. Разработен и приложен е оригинален методичен подход за изследване на развитието на толерантност към даден антибиотик, чрез сравняване на стрес-отговора (растеж, биофилм образуване, виталност) на щамове, изолирани преди и след терапия, към присъствието на суб-летални количества от този антибиотик.
4. Получени са оригинални научни доказателства за увеличаване на толерантността на МВ изолати *P. aeruginosa* към тобрамицин след проведено инхалаторно лечение на пациенти със същия антибиотик.

Публикации, свързани с дисертационния труд

1. **Stoitsova S., Paunova-Krasteva Ts., Borisova D.** (2016) Modulation of Biofilm Growth by Sub-Inhibitory Amounts of Antibacterial Substances, *Microbial Biofilms - Importance and Applications*, 21, 441-462.

2. **Borisova D.,** Strateva T., **Paunova-Krasteva Ts.,** Mitov I, **Stoitsova S.** (2018) Phenotypic investigation of paired *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from cystic fibrosis patients prior and post tobramycin treatment. *Comptes rendus de l'Academie Bulgare des Sciences*, 71, 8. ISSN:1310-1331, DOI:10.7546/CRABS.2018.08.05, 1044-1051. SJR (Scopus):0.21, JCR-IF (Web of Science):0.321, Q2 (Scopus).

3. **Borisova D.,** Jordanova V., **Stoitsova S., Paunova-Krasteva Ts.** (2019) Impact of growth conditions on biofilm formation by model Gram-negative and Gram-positive bacterial strains. *Acta Microbiologica Bulgarica*, 35, 2, ISSN:0204-8809, 60-65.

Участия в научни прояви свързани с темата на дисертацията

- **ДОКЛАДИ**

1. **Stoitsova S., Paunova-Krasteva Ts., Borisova D.,** Vacheva A., Danova S., Velinov Ts. (2017) Bacterial biofilms – formation, modulation and problems for eradication; *10th Balkan Congress of Microbiology/Microbiologia Balkanica*, Sofia, Bulgaria

2. **Borisova D.,** Strateva T., Paunova-Krasteva Ts, **Stoitsova S.** (2015) Phenotypic investigation of paired *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis strains isolated prior- and post-inhaled tobramycin treatment; *Втора национална конференция за млади учени „Биологически науки за по-добро бъдеще*, Пловдив, България.

3. Stoitsova S., Paunova-Krasteva Ts., **Borisova D.** (2018) Bacterial biofilms – adaptive mode of life. *14 Конгрес на микробиолозите в България с международно участие*, Хисаря, България.

4. Stoitsova S., Paunova-Krasteva Ts., **Borisova D.** (2016) The effects of sub-inhibitory amounts of antibacterial substances on bacterial biofilms as a risk factor; *Патогени и безопасност на храните*, София, България

5. **Borisova D.**, Paunova-Krasteva Ts., Stoitsova S., Strateva T. (2018) Influence of sub-inhibitory concentrations of tobramycin on growth, biofilm formation and mobility of clinical strains *Pseudomonas aeruginosa*, *XI Spring seminar for Young scientists and Doctors*, София, България

• ПОСТЕРИ

1. Paunova-Krasteva Ts., **Borisova D.**, Strateva T., Mitov I., Stoitsova S. (2016) “Effects of sub-MICs of tobramycin on growth and biofilm formation by clinical Cystic fibrosis paired strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated prior and post-tobramycin treatment”. *Antimicrobial resistance in microbial biofilms and options for treatment*, Ghent, Belgium.

2. **Borisova D.**, Paunova-Krasteva Ts., Strateva T., Mitov I., Stoitsova S. (2017) “Structural and functional effects of ½ MIC of tobramycin on Cystic Fibrosis clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*”. *10th Balkan congress of microbiology, Microbiologia Balkanica*, Sofia, Bulgaria.

3. **Dayana Borisova**, Tsvetelina Paunova-Krasteva, Tanya Strateva, Stoyanka Stoitsova. (2021) “Growth, motility and biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 in the presence of sub-MICs of tobramycin”. *Scientific conference, “Kliment’s days”*. Sofia, Bulgaria.

4. **Borisova Dayana**, Tsvetelina Paunova Krasteva, T. Strateva, Stoyanka Stoitsova. (2023) Effects of Sub-MICs of Tobramycin on Biofilm Formation and Motility of Clinical Cystic Fibrosis Paired Strains of *Pseudomonas aeruginosa* Isolated Prior and Post-tobramycin Treatment; *Младежка научна конференция „60 години Катедра Обща и промишлена микробиология“* София, България

ПРОЕКТИ

Ръководител на 2, участник в 6

1. **Ръководител:** Даяна Борисова, **Фонд научни изследвания;** тема: „Нови подходи за контрол на бактериални биофилми чрез полимерни мицели“; 2017-2019год.

2. **Ръководител:** Даяна Борисова ; тема: „Сравнителни фенотипни и молекулярно-генетични проучвания на клинични щамове *Pseudomonas aeruginosa*, изолирани от пациенти с муковисцидоза преди и след инхалаторна терапия с tobramycin“ - Национална програма „млади учени и постдокторанти-2“ - БАН, Проект за бъдещо научно и кариерно развитие.

Открити цитати на публикациите, свързани с дисертационния труд:

Цитирана публикация:

Stoitsova S.R., Paunova-Krasteva Ts., **Borisova D.B.**, 2016. Modulation of Biofilm Growth by Sub-Inhibitory Amounts of Antibacterial Substances. In: Microbial Biofilms - Importance and Applications, Dr. Dharumadurai Dhanasekaran (Ed.), InTech, DOI: 10.5772/62939.

Цитирано от:

1. C. Lalitha, T. Raman, S.S. Rathore, M. Ramar, A. Munusamy, J. Ramakrishnan, ASK2 bioactive compound inhibits MDR *Klebsiella pneumoniae* by antibiofilm activity, modulating macrophage cytokines and opsonophagocytosis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 2017, 7, Art 346, doi: 10.3389/fcimb.2017.00346
2. S. Rutthapol, H. Masakaze, K. Soichiro, I. Yoshikazu, S. Teerapol, T. Kazuhiro, Mupirocin at subinhibitory concentrations induces biofilm

- formation in *Staphylococcus aureus*. *Microb. Drug Resist.* 2018, doi 10.1089/mdr.2017.0290
3. А. Трифонова, Е. Савов, Т. Стратева, Биофилм образуване от *Stenotrophomonas maltophilia*: етапи, участие в патогенезата на инфекциите и възможни терапевтични подходи. *Детски инфекциозни болести* 2018, X(2), 42-51.
 4. ML Schroeder, Investigation of nutrients as treatments of bacterial biofilms, PhD Thesis, 2018, North Dakota State University of Agriculture and Applied Science, Fargo, North Dakota
 5. SI Walsh, DS Peters, PA Smith, A Craney, MM Dix, BF Cravatt, FE Romesberg, The inhibition of protein secretion in *Escherichia coli* and sub-MIC effects of arylomycin antibiotics, *Antimicrob. Agents Chemother* 2019, 63, pii: e01253-18. doi: 10.1128/AAC.01253-18.
 6. L. Machineni, Effects of biotic and abiotic factors on biofilm growth dynamics and their heterogeneous response to antibiotic challenge. *J. of Bioscience*, 2020, 45, <https://doi.org/10.1007/s12038-020-9990-3>
 7. D Berber, I Turkmenoglu, M Birbir, NC Sesal, Efficacy of *Usnea* sp. extracts in preventing biofilm formation by *Bacillus* species isolated from soaking liquor samples. *JALCA*, 2020, 115, 222-229, https://www.researchgate.net/publication/342782052_Efficacy_of_Usnea_sp_Extracts_in_Preventing_Biofilm_Formation_by_Bacillus_Species_Isolated_from_Soaking_Liquor_Samples_JALCA_115_6_222-229_1/references
 8. DC Hall, JE Krol, JP Cahill, H-F Ji, GD Ehrlich, The development of a pipeline for the identification and validation of small-molecule RelA inhibitors for use as anti-biofilm drugs. *Microorganisms*, 2020, 8, 1310, doi:10.3390/microorganisms8091310, <https://www.mdpi.com/2076-2607/8/9/1310>
 9. VV Salazar, 2022. EFECTO MICROBIOLÓGICO Y MOLECULAR DE LOS ANTIBIÓTICOS EN LA FORMACIÓN DE LA BIOPELÍCULA DE *Staphylococcus hominis*. PhD Thesis, Universidad Autonoma de Nuevo Leon, <http://eprints.uanl.mx/24581/>
 10. Nadar, S.; Khan, T.; Patching, S.G.; Omri, A. Development of Antibiofilm Therapeutics Strategies to Overcome Antimicrobial Drug Resistance. *Microorganisms* 2022, 10, 303. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10020303>
 11. MR Al-Naggar, AM Abdelgawad, R Abdel-Sattar, AA Gibriel AA, Hemdan BA, 2023. Potential antimicrobial and antibiofilm efficacy of essential oil nanoemulsion loaded polycaprolactone nanofibrous dermal patches,

European Polymer Journal 184, 111782,
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014305722007868>

12. Saha P, Rafe R, 2023. Cyclodextrin: A prospective nanocarrier for the delivery of antibacterial agents against bacteria that are resistant to antibiotics. *Heliyon* 9, e19287. [https://www.cell.com/heliyon/fulltext/S2405-8440\(23\)06495-2?returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS2405844023064952%3Fshowall%3Dtrue](https://www.cell.com/heliyon/fulltext/S2405-8440(23)06495-2?returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS2405844023064952%3Fshowall%3Dtrue)
13. Inchagova KS, Rusakova EA, Duskaev GK, 2023. Inhibition of the system quorum sensing LuxI/LuxR-type by combining of antibiotics. *AIP Conference Proceedings* 2817, 020029, <https://doi.org/10.1063/5.0149179>
14. ABA Hammad, BA Hemdan, AM Mansour, AM El Nahrawy, 2023. Improved antimicrobial and antibiofilm efficacy of adaptable BaTi₂Fe₄O₁₁-(x)NiFe₂O₄ nanoceramics: investigating microstructural and spectroscopic analysis. *SN Applied Sciences*, 5:317, <https://doi.org/10.1007/s42452-023-05547-w>
15. CM Manner, 2023. Stochastic expression of the *hecRE* module controls *Pseudomonas aeruginosa* surface colonization and phage sensitivity, PhD Thesis, Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Basel, <https://edoc.unibas.ch/96058/>
16. J Liu, T Huang, Z Xu, Y Mao, T Soteyome, G Liu, C Qu, L Yuan, Q Ma, F Zhou, G Seneviratne, 2023. Sub-MIC streptomycin and tetracycline enhanced *Staphylococcus aureus* Guangzhou-SAU749 biofilm formation, an in-depth study on transcriptomics. *Biofilm* 6, 100156, <https://doi.org/10.1016/j.bioflm.2023.100156>
17. A Omar, T E E;-Banna, FI Sonbol, MM El-Bouseary, 2024. Evaluation of the Effect of Sub-inhibitory Concentrations of Ceftriaxone on Combating Multi-drug Resistant *Staphylococcus aureus*. *J Adv Med Pharm Res.*, 2024, 05, 92-104, <http://10.21608/JAMPR.2024.283820.1066>

Литература цитирана в автореферата

- Ciofu O., Hansen CR., Høiby N. (2013). Respiratory bacterial infections in cystic fibrosis. 3.
- Cramer N., Klockgether J., Tümmler B. (2023) Microevolution of *Pseudomonas aeruginosa* in the airways of people with cystic fibrosis. *Current Opinion in Immunology*, 83.
- David E. and Geller M. (2009). Aerosol Antibiotics in Cystic Fibrosis. *Respiratory care*, 54.
- De Souza A., Ionescu M., Baccari C., da Silva A., Lindow S. (2013). Phenotype overlap in *Xylella fastidiosa* is controlled by the cyclic di-GMP phosphodiesterase Eal in response to antibiotic exposure and diffusible signal factor-mediated cell-cell signalling. *Appl. Environ. Microbiol.*, 79.
- Espaillet A., Colque C., Rago D., La Rosa R., Molin S., Johansen H. (2024) Adaptive Evolution of *Pseudomonas aeruginosa* in Human Airways Shows Phenotypic Convergence Despite Diverse Patterns of Genomic Changes. *Mol Biol Evol*, 2.
- Guillaume O., Butnarusu C., Visentin S., Reimhult E. (2022) Interplay between biofilm microenvironment and pathogenicity of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung chronic infection. *Biofilm*, 4.
- Harrison J., Almblad H., Iriel Y., Wolter D., Eggleston H., Randall T., Kitzman J., Stackhouse B., Emerson J., Mcnamara S., Larsen T., Shendure J., Hoffman L., Wozniak D., Parsek M. (2020) Elevated exopolysaccharide levels in *Pseudomonas aeruginosa* flagellar mutants have implications for biofilm growth and chronic infections, *PLOS Genetics*.
- La Rosa R., Rossi E., Feist A., Johansen H., Molin S. (2021) Compensatory evolution of *Pseudomonas aeruginosa*'s slow growth phenotype suggests mechanisms of adaptation in cystic fibrosis. *NATURE COMMUNICATIONS*, 12.
- Lauret L., Matic I., Gutierrez A. (2013). Bacterial responses and genome instability induced by subinhibitory concentrations of antibiotics. *Antibiotics*, 2.
- Mahenthiralingam E., Campbell E., Speert P. (1994). Nonmotility and phagocytic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from chronically colonized patients with cystic fibrosis. *Infect Immun*, 62.

- Mitov I., Strateva T., Markova B. (2010). Prevalence of virulence genes among Bulgarian nosocomial and cystic fibrosis isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Brazilian J Microbiol*, 41.
- Naehrig S., Hubbert B., Hafkemeyer S., Hammermann J., Dumke M., Sieber S. (2023) Chronic inhaled antibiotic therapy in people with cystic fibrosis with *Pseudomonas aeruginosa* infection in Germany. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*, 80.
- Saeki E., Yamada A., De Araujo L., Anversa L., Garcia D., De Souza H., Barros R., Martins H., Katsuko R., Kobayashi T., Nakazato G. (2021) Subinhibitory Concentrations of Biogenic Silver Nanoparticles Affect Motility and Biofilm Formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11.
- Strateva T. and Mitov I. (2011). Contribution of an arsenal of virulence factors to pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Annals of Microbiology*, 61.
- Strateva T., Petrova G., Perenovska P., Mitov I. (2009). Bulgarian cystic fibrosis *Pseudomonas aeruginosa* isolates: antimicrobial susceptibility and neuraminidase-encoding gene distribution. *Journal of Medical Microbiology*, 58.

Изказвам благодарност на научните си ръководители доц. Стоянка Стоицова за подкрепата, търпението, напътствията и съветите при осъществяване на изследванията и оформянето на дисертационния труд, както и на проф. Таня Стратева за цялостна подкрепа и съдействие.

Благодаря на доц. Цветелина Паунова-Кръстева, ръководител на лаборатория „Клетъчна микробиология“ за оказаната помощ и съдействие по отношение на експерименталната работа.

Благодаря на проф. Светла Данова ръководител на лаборатория „Млечнокисели бактерии и пробиотици“ и на гл. ас. д-р Росица Тропчева за съдействие по отношение на експериментите свързани с генетичните процеси на бактериите.

И не на последно място, благодаря на моето семейство за подкрепата, която ми оказват непрестанно.