

СТАНОВИЩЕ

от доц. д-р Мариана Иванова Мърхова-Косева

катедра Биохимия и микробиология

Биологически факултет на Пловдивски университет „Паисий Хилендарски“

Член на Научно жури, сформирано със Заповед № I-163/26.06.2024 г. на Директора на Институт по Микробиология "Стефан Ангелов" – БАН

Относно: дисертационен труд за присъждане на образователната и научна степен „доктор“

по: област на висше образование 4. Природни науки, математика и информатика

професионално направление 4.3. Биологически науки

научна специалност Микробиология

Автор: Даяна Бориславова Борисова

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

Научни ръководители: доц. д-р Стоянка Рангелова Стоицова – Институт по микробиология БАН и проф. д-р Таня Василева Стратева, д.м. – Медицински университет – София

1. Актуалност и значимост на дисертационната тема

Темата на представения дисертационен труд от Даяна Борисова е свързана с проследяване ефектите на инхалаторна терапия с тобрамицин при пациенти с муковисцидоза върху морфологията и физиологията на изолирани двойки щамове *Pseudomonas aeruginosa* на различни етапи от лечението. Тематиката попада в пресечната точка на множество актуални и бързо развиващи се научни направления, свързани с космополитния характер и впечатляващата метаболитна, регулаторна и генетична адаптивност на *P. aeruginosa*. През последните години *P. aeruginosa* се превърна в моделен организъм при изучаването на вирулентността и патогенността при опортюнистични инфекции, системите за множествена лекарствена устойчивост, формирането на биофилми, кворумната сигнализация и др. Включването на *P. aeruginosa* в групата ESKAPE от Световната здравна организация в резултат на отчетената нарастваща множествена и широка устойчивост подчертава необходимостта от продължителни и разгънати изследвания на поведението, характеристиките и адаптацията на вида при различни по тип инфекции и прилаганите терапии. Натрупаните данни от изследвания върху протичането на сравнително рядкото генетично заболяване муковисцидоза (МВ) свидетелстват за пряко участие на *P. aeruginosa* като опортюнистичен патоген при белодробни инфекции на пациенти с МВ, а високата устойчивост към лекарствени препарати както и способността да формира биофилми са отчитани като едни от основните причини за затруднената терапия. С оглед на изложеното темата на дисертационния труд на Даяна Борисова е актуална и допринася за попълване неяснотите относно ефектите на инхалаторната антибиотична терапия като подход в лечението на бактериални инфекции при пациенти с муковисцидоза.

2. Структура на дисертационния труд и оценка на резултатите и приносите

Представената дисертацията е написана на 148 стандартни А4 страници текст по общоприетата схема, както следва: Увод, Литературен обзор, Цел и задачи, Материали и методи, Резултати и обсъждане, Изводи, Приноси, Литература. Спазени са препоръчителните съотношения между отделните части на труда. Добро впечатление

правят стегнатия научен стил и техническото оформление на дисертацията. Работата е богато илюстрирана с 15 таблици и 51 фигури, обобщаващи получените резултати.

В литературния обзор докторантката обосновава избраната тема като представя накратко данни относно характеристиките на муковисцидозата като генетично заболяване. Основен елемент от изложението е информацията относно биологията на *P. aeruginosa* като основен етиологичен агент в бронхопулмоналните инфекции при пациенти с МВ. Систематизирано е представена актуална информация относно способността на *P. aeruginosa* да формира биофилм и внушителния набор от вирулентни характеристики, които го правят успешен в опортюнистичните инфекции. Докторантката е съставила ясна информационна картина относно адаптационните стратегии на този успешен патоген при възникването и хронифицирането на инфекции при пациенти с МВ. В раздела е предоставената справка за прилаганите днес протоколи за терапия на такива състояния както и отчетените опасности от ефекта на неадекватно подбрани субинхибиторни терапевтични концентрации.

В светлината на литературния обзор поставената цел ясно оформя насоките за работа в дисертационния труд. За постигането и са формулирани седем задачи, които логично задават хода на проведените изследвания.

В раздела Материали и методи са описани подробно използваните научни съвременни и класически методи от областта на микробиологията, молекулярната и клетъчна биология. Впечатляващи са адекватният подбор на щамове и адаптирането на *in vitro* протоколи за максимално реална оценка на „ин хост“ еволюцията и адаптацията на щамове при инфекции на пациенти с МВ. Приложени са култивиране в различни среди и условия; определяне на минимална потискаща концентрация (МПК) на тобрамусин за изследваните двойки щамове, изолирани преди и след няколко цикъла на инхалаторна терапия, както и отчитане ефектите от субинхибиторната му концентрация върху бактериалния фенотип; формиране на биофилм; случайна амплификация на полиморфна ДНК (RAPD – PCR); сканираща електронна микроскопия (SEM); изследване на инвазивност и вътреклетъчна преживяемост. Докторантката е описала използваните методи за морфометрична и статистическа обработка на получените резултати и данни.

В раздел Резултати и обсъждане са представени оригинални данни от осъщественото молекулярно епидемично типизиране чрез RAPD-PCR на избраните щамове *P. aeruginosa* от пациенти с МВ в България. Приложеният UPGMA анализ изявява висок процент на сходство с приложен референтен панел щамове от различни географски райони. Подобни данни определено допринасят за утвърждаване прилагането на RAPD-PCR в молекулярното типизиране на щамове *P. aeruginosa* и повишаване ефективността на контрола върху инфекциите при пациенти с МВ.

Детайлно са представени резултатите от изследването на фенотипни характеристики на подбраните щамове като са проследени и определени генерационното време, растежните криви, планктонния растеж, растежа в биофилм, морфологичните характеристики и подвижността при култивиране в различни хранителни среди и условия. Данните от тези оригинални изследвания за първи път свидетелстват за удължена *lag* фаза при ”ин хост“ еволюцията на МВ щамове *P. aeruginosa* във връзка с инхалаторната терапия с тобрамицин като към момента не е съобщавана връзка между провеждана антибиотична терапия на пациенти и промени в *lag*-фазата. Получените най-високи стойности на образуване на биофилм в минимална среда М63, независимо от

етапа на изолиране на щамовете, имат значителен принос за потвърждаване на вероятността персистиращите клетки да участват в адаптацията и персистирането на *P. aeruginosa* в белите дробове на пациенти с МВ.

Наблюденията върху морфологията на бифилмите, формирани от изследваните щамове *P. aeruginosa*, проведени с прилагане на сканираща електронна микроскопия (SEM), изявяват значима разлика между двойките щамове в резултат на прилаганата терапия с тобрамицин. Докторантката е направила много добър морфометричен анализ на резултатите от определяне размера на клетките. За разлика от често съобщаваното в литературата намаляване размера на клетките при неблагоприятни условия при изследваните тук щамове *P. aeruginosa* от пациенти с МВ се отчита тенденция на увеличение в размерите на клетките след терапия с антибиотик. Тези резултати създават добра основа на бъдещи изследвания на състава и промените в биофилмния матрикс при инхалаторната терапия с тобрамицин. Данните от подобни изследвания биха допринесли за увеличаване ефективността на този подход на лечение на инфекции при пациенти с МВ.

За оценка на промените в инвазивността докторантката е приложила съвместно култивиране на избраните щамове *P. aeruginosa* и белодробна аденокарциномна клетъчна линия A549, използвана като модел на алвеоларни клетки тип II. Изборът на този модел заслужава похвала, тъй като позволява максимално приближение и възпроизвеждане на кръстосаното взаимодействие между *P. aeruginosa* и човешкия гостоприемник и отчитане на хетерогенността в адаптивния отговор на щамовете при инфекции в бял дроб на пациенти с МВ преди и след терапия. Отчитането на инвазивността на избраните щамове е свързано с един от забележителните „трикове“ на патогенните бактерии да избягват антибиотичната терапия и да участват в хронифицирането на инфекциите - проникване, оцеляване и репликация в еукариотни клетки. Изключително показателна в това отношение е установената силна инвазивност на щам (PaT-6), изолиран след множество цикли на инхалаторна терапия с тобрамицин. Представяват интерес бъдещи изследвания относно генетиката на подобна инвазивност с оглед оптимизирането на настоящи и разработването на нови терапевтични подходи.

Съществен дял от дисертацията е посветен на изследването ефектите на субтерапевтични концентрации на тобрамицин - $\frac{1}{2}$ МПК (минимална потискаща концентрация) и $\frac{1}{4}$ МПК - спрямо растежа, формирането на биофилм, подвижността и виталността на подбраните двойки щамове *P. aeruginosa*. Комплексната оценка на резултатите показва нарастване на толерантността към антибиотика при щамовете, изолирани след терапия, в сравнение с чифтните им щамове, и потвърждава значението на субтерапевтичните концентрации като рисков фактор. В светлината на отчитаната нарастваща лекарствена устойчивост на патогенните микроорганизми в световен мащаб и отсъствие на изследвания за ефектите на субтерапевтични антибиотични концентрации при щамове, свързани с инфекции при пациенти с МВ, представените в дисертацията на Деяна Борисова системни данни са оригинални и с потенциален принос при оптимизиране терапевтичния избор и процедурите при лечение на пациенти с МВ.

В резултат на проведените изследвания и получени данни докторантката формулира 12 извода и 4 приноса, които напълно съответстват на поставените цел и задачи. Темата и разработката на дисертацията са оригинални и значими, с потенциал за развитие и обмен на резултати както във фундаментални микробиологични така и клинични направления. Използваните в настоящата разработка щамове *P. aeruginosa*

могат да бъдат предоставени за обогатяването на съществуващия международен референтен панел от изолирани в различни географски райони от пациенти с МВ.

3. Преценки, мнения, препоръки и бележки

Докторант Даяна Борисова е приложила в разработването на дисертацията си богат набор от съвременни и класически микробиологични, биохимични, молекулярно-генетични методи, което е направило от нея високо квалифициран научен специалист с голям потенциал за участие в изследователски екипи при изпълнението на проекти както с фундаментална така и с практическа насоченост.

Актуалността на разработката и резултатите, представени в дисертацията на Даяна Борисова създават добра основа за бъдещи изследвания с приложението на транскриптомен анализ с оглед получаването на задълбочени данни относно молекулните механизми, чрез които *P. aeruginosa* адаптира своя метаболизъм и поведение при условия на инхалаторна терапия с антибиотик като тобрамицин. Транскриптомният анализ би позволил проследяване на измененията в генната експресия в отговор на антибиотичната терапия, като така ще се разкрият ключови биологични процеси, свързани с резистентността, биофилм - формирането и инвазивността. Такива данни биха допринесли за разбирането за бактериалните адаптационни механизми и оптимизирането на лечението на инфекции, причинени от *P.aeruginosa*, при пациенти с муковисцидоза.

Даяна Борисова е надвишила почти два пъти минималните изисквания за кредити по група показатели в областта на природните науки по ЗРАСРБ. Получените резултати са оповестени частично в две публикации, едната от които в списание с ИФ. Значимостта им е подчертана с отчетените досега 17 цитата. Допълнително с работата по дисертацията е свързано и участието в публикуването на глава от книга на международно издателство. Докторантката има участия с 5 доклада и 4 постера в научни форуми в страната и чужбина. За периода на разработване на дисертационния труд е научен ръководител в два и участник в шест научни проекта.

4. Заключение

Представеният от Даяна Борисова дисертационен труд съдържа научни и научно-приложни резултати, които представляват оригинален принос в науката и отговарят на всички изисквания на Закона за развитие на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ) и Правилника за условията и реда за придобиване на научни степени и академични длъжности на Института по Микробиология „Стефан Ангелов“ – БАН. Представените материали и дисертационни резултати по актуалност, обем на изследванията, постигнати научни приноси и публикационна дейност напълно съответстват и на специфичните изисквания, приети във връзка с Правилниците на БАН и на ИМикБ-БАН за приложение на ЗРАСРБ.

Въз основа на гореизложеното, убедено давам своята положителна оценка на проведеното изследване и предлагам на уважаемото научно жури да присъди на Даяна Борисова образователната и научна степен „доктор“ в област 4.3. Биологични науки (Микробиология).

4 февруари 2025 г.

Изготвил становището:
/доц. д-р Мариана Мърхова-Косева/