

С Т А Н О В И Щ Е

от проф. Мария Богомилова Ангелова, дбн, Институт по микробиология „Стефан Ангелов“ при БАН

върху дисертационен труд, представен пред научно жури, сформирано със заповед № I-163/26.11.2024 г на Директора на Институт по микробиология „Стефан Ангелов“ за получаване на образователната и научна степен “доктор” в Професионално направление: 4.3. Биологични науки (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

проф. д-р Тая Василева Стратева, д.м.

Муковисцидозата (МВ) е генетично заболяване, силно застрашаващо живота на заболелите чрез блокиране и усложнения в дихателната и храносмилателната система. Преди 80-те години на миналия век много пациенти с муковисцидоза не са оцелявали до 20-те си години. Понастоящем, прилагането на различни антибиотици заедно с нови терапевтични интервенции води до постепенно повишаване продължителността на живота и дава надежда за по-значими успехи. Антибиотичното лечение е основен елемент в терапията, особено по време на белодробни екзацербации на заболяването. Една съвременна терапевтична стратегия е аерозолното прилагане на антибиотици, която значително повишава качеството на живота при МВ. Въпреки постигнатия напредък, в тази област се очертават и сериозни проблеми. Наличните терапевтични стратегии често са неадекватни за пълното унищожаване на засегнатите патогени, което е предпоставка за появата на феномена антимикробна резистентност (АМР). Важна причина за АМР е използването на субтерапевтични нива на антибиотиците, в резултат на което се повишава риска от неуспешно лечение. Проблемът тук е адаптацията на основните патогени, колонизиращи бронхиалното дърво на пациентите, като напр. *Pseudomonas aeruginosa*, към прилаганите лекарствени средства. Именно това е основната теоретична насоченост в разработката на Даяна Борисова. Научните ръководители и докторантката предлагат нов подход в изследването на заболяването, който дава възможност да се получат данни за участието на антибиотици в развитието на бактериалната резистентност. В литературата липсват данни за ефекта на конкретен антибиотик в механизма на адаптация на *P. aeruginosa* при случаи с МВ, каквито представя настоящата дисертация. Тя е фокусирана върху генотипните и фенотипни промени при двойки щамове, изолирани от пациенти с МВ преди и след инхалаторна терапия с тобрамицин. Въз основа на всичко отбелязано по-горе, оценявам темата като актуална и теоретично значима с перспектива за приложение.

Дисертационният труд е конструиран в традиционна форма със съответните раздели. Написан е на 148 стандартни компютърни страници, включващи 133 страници текст и 15 страници литература. Литературният обзор е изготвен целенасочено и конкретно и отчита

всички аспекти на изследването. В него са отразени 240 литературни източника (238 са на латиница) и 8 сайта, които кореспондират с всяка една от поставените задачи. Обзорът представя състоянието на проблема в момента, като коректно отчита развитието в исторически план и постигнатото до този момент. Изключително подробно са обсъдени наличните литературни данни относно заболяването, етиологичната прогресия на бактериалните инфекции при пациентите с МВ, ролята на водещия причинител *P. aeruginosa*, образуването на биофилми и детерминантите на вирулентност. Сериозно внимание е отделено на адаптацията на *P. aeruginosa* към хронично инфектиране на белия дроб, както и на терапията на заболяването с антимикробни лекарствени средства. В края на обзора е включен раздел „Обобщение на литературната справка“, в което са изтъкнати нерешените въпроси и е обусловена необходимостта от проведеното изследване. Подчертано е новото в разработката и основанията за тази оценка. Според мен това е много добра идея, която още веднъж подчертава актуалността на дисертационната теза. Материалът е представен ясно, четете се с лекота и с интерес, за което допринасят включените таблици и фигури.

Целта на дисертационния труд съответства на актуалността на проблема, подчертава иновативния характер на разработката. Тя е ясна, добре формулирана и обединява всички направления на експерименталната работа. За реализиране на тази цел са формулирани 7 конкретни, взаимно обвързани и логически следващи задачи, които включват всички задължителни етапи на подобно проучване. Още тук се вижда сериозният обем работата, поставена пред докторантката.

Разделът „Материали и методи“ отговаря на мултидисциплинарния характер на разработката, използвани са рутинни и съвременни микробиологични, морфологични, молекулярно-биологични методи, както и генотипни и фенотипни анализи. Всички те са адекватни на изследванията и създават предпоставка за коректни резултати. Освен това, методите са представени разбираемо, достатъчно пълно, за да бъдат възпроизведени. Тук искам да отбележа RAPD-PCR анализите и конструирането на дендрограми, характеристиката на биофилмообразуването, проучването на инвазивността и вътреклетъчния растеж на *P. aeruginosa* в белодробна аденокарциномна клетъчна линия и др. Всички те са достатъчно основание за достоверност и прецизност.

В раздел „Резултати и дискусия“ е включен обширен експериментален материал, който се характеризира с логическа последователност и очертава едно задълбочено научно изследване. Чрез сравнителен анализ на двойки щамове *P. aeruginosa*, изолирани от един и същи пациент преди и след третиране с тобрамицин при вариране на възрастта и цикъла на инхалаторното лечение са получени данни за различните фази на инфекцията. Проведеното молекулярно епидемиологичното типизиране на изолатите е отправна точка за характеризиране на патогена и за избора на антибиотичното лечение.

Следващият етап от разработката включва детайлна фенотипна характеристика на щамовете, възникнали или селектирани в резултат на инхалаторната терапия с тобрамицин. Проследено е значението на фенотипните различия между тях за развитието им

при култивиране в 3 хранителни среди, както и ефекта на третирането с инхалаторен тобрамицин върху характеристиките на двойките, изолирани от един и същ пациент. Докторантката представя данни за промените в 6 двойки щамове относно растежните фази, скоростта на растеж и генерационното време, продължителността на лаг-фазите и формирането на биофилми. Направеният статически анализ дава информация за тенденциите в растежното поведение на щамовете и повишава нивото на достоверност на резултатите. В логическа последователност следват експериментите за морфологичната характеристика на щамовете чрез сканираща електронна микроскопия. Получена е информация за структурата на биофилмите, както и за качествения и количествения състав на матрикса. Докторантката предполага, че установените различия са следствие от третирането с инхалаторния тобрамицин.

В търсене на връзката между антибиотика и толерантността на изолираните щамове *P. aeruginosa* е проведено морфометрично изследване на размера на бактериалните клетки след антибиотичната терапия. Доказано е наличие на уголемени клетки, характерни за неблагоприятни условия на развитие, което вероятно е адаптивна промяна на фенотипно ниво след въздействие с антибиотика. Подобна връзка между подвижността на щамовете и третирането на пациентите с тобрамицин, обаче не е установена.

Важна съставна част на изследванията в дисертацията са експериментите за определяне инвазивността на щамовете *P. aeruginosa* в белодробна аденокарциномна клетъчна линия A549. Резултатите показват, че всички тествани щамове са способни да проникват, оцеляват и се възпроизвеждат в култивираните клетки. Един от тях (PaT-6) се характеризира с много висока степен на размножаване, което предполага, че инвазивността е част от механизма на адаптация за оцеляване при терапия. Искам да отбележа значимостта на представеното сравнение между характеристиките на двойките щамове, получени в настоящата дисертация с литературните данни за други серийни изолати. Този подход позволява на докторантката да обясни липсата на висок коефициент на сходство между ранните и по-късно изолираните щамове с проявата на генетична диверсификация.

В следващия подраздел, Даяна Борисова проучва ефектите от предхождаща терапия върху растежа и развитието на оцелелите след лечението щамове в присъствието на антибиотика. Подобни изследвания не се откриват в достъпната литература, което придава на дисертацията иновативен акцент. Използваният оригинален подход, разработен в този труд, дава възможност да се получи нова информация относно процесите на адаптация при персистенцията на бактерията. Проследена е връзката между терапията с тобрамицин, *in host* еволюцията на бактериите от чифтните щамове и промените във фенотипния отговор при третиране със суб-МПК на същия антибиотик. Резултатите подкрепят хипотезата, че протективна адаптация на бактериите включва образуването на биофилми.

Много добра идея е включването на подраздел „Обобщение на резултатите“, в който докторантката представя синтезиран прочит на постигнатото в дисертационния труд. Това улеснява читателите и дава възможност за по-добро възприемане на резултатите. Едновременно с коректното отразяване на получените данни е направено задълбочено и професио-

нално обсъждане на базата на подходящи литературни източници. Дискусията е умело преплетена със собствените данни, което създава впечатление за увереност и съизмеримост с публикуваното от други автори.

Издавам отличното си впечатление от оформлението на дисертацията, от научния стил на който е написана, правилното отразяване на резултатите в таблици и фигури, както и тяхното професионално представяне.

Докторантката представя 12 извода, които са логично следствие от получените данни и дават необходимата информация за стойността на проведените изследвания. Приемам и формулировката на приносите и искам още веднъж да подчертая иновативния характер на темата и подходите при разработването ѝ.

Всъщност, това е една дисертация на високото теоретично ниво с бъдещо приложно значение, носеща почерка на водещи учени в областта – доц. Т. Стоицова и проф. Т. Стратева, което е предпоставка за актуалност и значимост на изследванията.

Данните от дисертацията са включени в 2 журнални научни статии, 1 от които е с импакт фактор, 1 е със SJR (квартил Q4) и 1 глава от книга. В две от тях докторантката е на първо място, което е указание за нейния личен принос. Публикациите са цитирани 17 пъти.

Представеният автореферат е изготвени според съответните изисквания.

В заключение искам да подчертая, че представеният материал е дисертабилен, разработена е много актуалната тема, която предлага нова информация по важен проблем от инфекциозната микробиология. Експериментите са поставени методично правилно, получените резултати са достоверни и са солидна база за следващи научни и приложни разработки, направени са съществени научни и методични приноси. Разработеният дисертационен труд напълно отговаря на изискванията на Закона за развитие на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ), Правилника за прилагане на ЗРАСРБ и Правилника на ИмикБ-БАН за приложение на ЗРАСРБ, както и на специфичните изисквания и количествени критерии в Правилника на ИмикБ-БАН.

Въз основа на направения разбор и на доказаното израстване на докторантката, предлагам на уважаемите членове на научното жури, сформирано със заповед № I-163/26.11.2024 г на Директора на Институт по микробиология „Стефан Ангелов“, да присъдят на **Даяна Бориславова Борисова** образователната и научна степен “**доктор**” по научно направление 4.3 Биологични науки (Микробиология).

05. 02. 2025 г

София

Изготвил становището:.....

/проф. Мария Ангелова, дбн/