

РЕЦЕНЗИЯ

на дисертационния труд на **Даяна Бориславова Борисова**

За защита и придобиване на образователна и научна степен "Доктор" в професионално направление Област 4. "Природни науки, математика и информатика", професионално направление 4.3 "Биологични науки", научна специалност "Микробиология"

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

Рецензент: проф. дн Пенка Петрова

Департамент „Обща микробиология“,

Институт по микробиология „Стефан Ангелов“ – БАН, член на Научното жури, определено със заповед I-163/26.11.2024 г.

1. Биографични данни за докторанта

Даяна Борисова е родена в София. През 2013 г. е завършила бакалавърска степен със специалност Молекулярна биология, а през 2015 – магистратура „Микробиология и микробиологичен контрол“ в Биологически факултет на Софийски университет „Св. Климент Охридски“. Веднага след завършване на бакалавърската степен, Даяна постъпва в Института по микробиология, през 2013 г. като специалист, а от 2016 г. – като асистент в Лаборатория „Клетъчна микробиология“ на Института по микробиология. От 2022 г. е на длъжност „Асистент“ и в Нов български университет. От 2018 г. е зачислена като докторант на самостоятелна подготовка с научни ръководители доц. д-р Стоянка Стоицова и проф. дн Таня Стратева.

2. Актуалност на темата на дисертационния труд

Муковисцидозата, позната още като кистозна фиброза, е генетично заболяване, засягащо белите дробове. То се дължи на автозомно-рецесивна мутация, като болните наследяват две копия на дефектния CFTR ген. До сега в света са доказани над 1300 мутации в CFTR-гена, разделени в 6 големи групи, а различните генни мутации водят до различна тежест на протичане на

муковисцидозата, като количеството функциониращ CFTR, който се произвежда, е свързан с клиничния статус. Симптомите на това нелечимо заболяване са отделяне на слуз в дихателните пътища, което води до чести инфекции. Кистозната фиброза е най-разпространена сред лица от северноевропейски произход, където приблизително 1 на 2500 до 3500 новородени са диагностицирани със състоянието. Честотата на носителство на мутации в CFTR гена в България се изчислява на 1/3400, като всяка година у нас се раждат по 20 деца с клинични прояви. Заболяването се съпътства с персистираща инфекция с типични за муковисцидоза патогени като *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Burkholderia cepacia* и мукоиден и немуктоиден *Pseudomonas aeruginosa*. При лечението винаги се използват противовъзпалителни лекарства и антибиотици перорално, инхалаторно или интравенозно. Инхалаторните лекарства са от решаващо значение за преодоляване на бактериалната инфекция, тъй като помагат за отваряне на дихателните пътища, намаляват вискозитета на слузта и улесняват нейното изчистване. Опасностите от микробиологична и здравна гледна точка са свързани с развитието на антибиотично-резистентни бактериални щамове, в много случаи - от вида *Pseudomonas aeruginosa*. Темата за инхалаторната терапия с антибиотика тобрамицин върху щамове *Pseudomonas aeruginosa* за лечението на пациенти с муковисцидоза е актуална и с голяма обществена значимост, още повече, че заболяването зачестява и се очаква то да бъде извадено от списъка на редките болести поради все по-широкото му разпространение.

3. Данни за дисертационния труд

Дисертационния труд е написан на 148 страници със следните раздели: 37 стр. литературен обзор с обобщение на литературната справка, 1 стр. „Цел и задачи“, 14 стр. „Материали и методи“, 69 стр. „Резултати и обсъждане“, 2 стр. „Изводи“ и 1 стр. „Приноси“. Цитираните източници са около 240, като повечето от тях са от последните десет години, една трета – от последните пет години. Материалът е онагледен с 15 таблици и 48 фигури, половината от които са съставни.

От литературния обзор личат отлична информираност на докторантката по темата и аналитичен подход към прочетената информация. Както от научни статии, така и от медицински сайтове са извлечени съвременни статистически

данни за разпространението на муковисцидозата в Европа и в нашата страна. Най-голяма част от обзора е посветена на описанието на водещия причинител на бронхопулмоналните инфекции при болни от муковисцидоза - *Pseudomonas aeruginosa*, като е направена обща характеристика на вида като патоген, структурата и характеристики на биофилмите, секретираните фактори на вирулентност, органелите за подвижност и адхезия, и адаптацията на микроорганизма към хронично инфектиране на белия дроб на пациенти. Проучванията на метаболитния спектър на клиничните изолати на *P. aeruginosa* разкриват хетерогенност в метаболитните пътища, подчертавайки ролята на пространственото и химичното разнообразие в средата по време на еволюционния процес в белите дробове, в съответствие с разширената фенотипна и генотипна хетерогенност. Разделът завършва с описание на лечението на муковисцидоза с антимикробни лекарствени средства на пациенти с бронхопулмонални инфекции, причинени от *P. aeruginosa*. Литературният обзор е онагледен с авторски схеми с много добро качество, а част от цитираните източници, свързани с инхалаторното лечение с тобрамицин са на публикации на единия от научните ръководители – проф. Стратева - и показват българския принос в световните изследвания по темата.

Разделът „Цел и задачи“ ясно очертава целта на дисертацията: чрез сравнителен генотипен и фенотипен анализ на двойки щамове *P. aeruginosa*, изолирани от пациенти с муковисцидоза преди и след инхалаторна терапия с тобрамицин, да се проучат адаптациите на патогена към въздействието на антибиотика. Очертани са основните хипотези и етапи в процеса на работа. Формулираните 7 задачи, последната от които от 4 подзадачи.

Раздел „Материали и методи“ описва двойките щамове *P. aeruginosa*, (предоставени от Катедра „Медицинска микробиология“ на Медицински факултет, МУ-София), изолирани преди и след инхалаторно третиране с тобрамицин, както и редица референтни щамове. Следват описания на класически методи за култивиране и растежни характеристики на изучаваните щамове (определяне на минимална и субминимална потискащи концентрации на тобрамицин) и подробен раздел за генетично типизиране на изолатите с молекулярни подходи. При изследването на бактериалните клетки е използвана сканираща електронна микроскопия. Данните са обработени статистически достоверно.

В раздел „Резултати и обсъждане“ ясно и систематизирано са описани стъпките за постигане на целта на дисертацията. Щамовете са типизирани генетично чрез метода RAPD и е установено филогенетичното разнообразие на *P. aeruginosa* от различни географски райони сред българските пациенти с муковисцидоза. Щамовете, изолирани след хронични инфекции имат намалена скорост на растеж, удължено генерационно време и по-дълга лаг-фаза в сравнение с щамовете преди третирането с тобрамицин. Анализите на растежа, биофилм-образуването и виталността на щамовете, изолирани след третиране с антибиотика показват, за съжаление, по-добра приспособимост на патогена към препарата.

В дисертацията умело са съчетани резултати и дискусия. Направени са аналогии с други персистиращи бактериални инфекции, напр. авторката забелязва, че по-дългата лаг фаза често допринася за способността на бактериите да избягват имунния отговор на гостоприемника. В труда си Даяна Борисова разкрива, че под натиска на инхалаторната терапия с антибиотика тобрамицин в повечето двойки щамове се наблюдава еволюция на патогенните бактерии в самия гостоприемник, в белодробните пътища на пациенти с муковисцидоза. Една от впечатляващите глави се отнася за характеризирането на структурата на биофилмите чрез сканираща електронна микроскопия, като е направена връзка между морфологията на *P. aeruginosa* и синтеза на три различни вида екзополисахариди. Освен това са изследвани големината на клетките и вариациите в големината на колонииите, както и разнообразните механизми, с които се постига подвижност на бактериите и по-голяма инвазивност с цел избягване от ефектите на антибиотичното действие. Много важен резултат е наблюдаваната тенденция към нарастване на толерантността към тобрамицин при щамовете, изолирани след третирането с антибиотика, както и стимулирането на образуването на биофилм от сублеталните дози антибиотик. Дисертацията завършва с 12 извода и 4 приноса, които се базират на огромен експериментален материал.

4. Публикации по темата на дисертацията

Общият брой публикации на Даяна Борисова до момента е 12, като шест са в реферирани списания, има 17 цитирания.

Резултатите по дисертацията са публикувани в две научни статии в реферирани списания (в „Доклади на БАН“ и *Acta Microbiologica Bulgarica*) и една глава от книга. Даяна Борисова е първи автор на две от статиите по дисертацията, а към доброто ѝ представяне като докторант трябва да бъдат добавени и участията в конгреси и конференции: 3 участия в международни научни форуми.

Даяна Борисова е участник в 6 научни проекта, на два е ръководител.

5. Забележки и въпроси:

Макар, че е написана увлекателно и с добър стил, в дисертацията има някои пасажки, които звучат популярно, напр. на стр. 74 се твърди, че „колкото по-дълго е генерационното време, толкова по-бавен е растежа на бактериите“ – факт, който е очевиден за микробиолозите. Като представяне Таблица 12 е с по-лошо качество и се отличава от останалия текст, а Фиг. 48 е с твърде дребни символи и не се чете. Със споменаването на тези дребни забележки по оформлението на дисертацията в никакъв случай не искам да омаловажавам иначе прекрасното представяне на резултатите и пространната, подробна и интересна дискусия.

Към докторанта имам следния въпрос:

Тъй като споменавате, че има множество неизяснени факти около адаптивните механизми на *P. aeruginosa* като персистиращ патоген, предвиждате ли продължение на темата с бъдещи протеомни или транскриптомни изследвания? В какви условия бихте поставили двойките щамове *P. aeruginosa*, за да наблюдавате значими разлики в транскриптомния отговор?

6. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Дисертационният труд на Даяна Борисова е посветен на актуална здравна тематика, свързана рядкото заболяване муковисцидоза и усложненията при бактериална инфекция от *P. aeruginosa*, третирана инхалаторно с антибиотика тобрамицин. Получените резултати са нови, значими и имат приносен характер за изясняване на механизмите на адаптация на персистиращи патогени като *P. aeruginosa*. Ясно личи, че дисертацията е лично дело на докторанта, подкрепено с идеи, щамове, материали и финансиране от научните ръководители.

Дисертационният труд и всички предоставени материали, свързани с научната и образователната програма на докторанта (публикации и участия в конгреси и конференции), са в пълно съответствие с изискванията на ЗРАСРБ и Правилниците за прилагането му в Република България, БАН и Института по микробиология "Стефан Ангелов". **Изразявам своето изцяло ПОЛОЖИТЕЛНО становище и препоръчвам и на останалите членове на Научното жури да подкрепят присъждането на ОНС „Доктор“ на Даяна Бориславова Борисова.**

09.02.2025 г.

Рецензент:

(проф. дн Пенка Петрова)