

## СТАНОВИЩЕ

от проф. Мария Богомилова Ангелова-Дянкова, дбн

върху дисертационен труд, представен за получаване на образователната и научна степен “доктор” в професионално направление: 4.3. Биологични науки, докторска програма Микробиология

Автор: Лена Руменова Илиева

Тема: **Лекарствена чувствителност и фактори на колонизация и инвазивност при назофарингеални изолати *Staphylococcus* spp.**

Научен ръководител: проф. д-р Соня Костадинова Трифонова

### 1. Общо представяне на процедурата и докторанта

Със заповед № РД-22-1084 от 29.05.2026 г. на Ректора на Пловдивския университет „Паисий Хилендарски“ (ПУ) съм определена за член на научно жури за осигуряване на процедура за защита на дисертационен труд на тема „Лекарствена чувствителност и фактори на колонизация и инвазивност при назофарингеални изолати *Staphylococcus* spp.“ за придобиване на образователната и научна степен „доктор“ в област на висше образование 4. Природни науки, математика и информатика, професионално направление 4.3. Биологически науки, докторска програма Микробиология. Автор на дисертационния труд е Лена Руменова Илиева – редовен докторант към катедра Биохимия и микробиология, с научен ръководител проф. д-р Соня Костадинова от ПУ. Представеният от Лена Илиева комплект материали на електронен носител е в съответствие с Чл. 36 (1) от Правилника за развитие на академичния състав.

Лена Илиева е завършила средно образование през 1996 г в СОУ „Алеко Константинов“, г. Свищов. В 2001 г се дипломира като магистър по биология в ПУ, след което последователно работи като биолог в предприятие за производство на детски храни, микробиолог в медикодиагностична лаборатория и асистент в Институт по консервиране и качество на храните в г. Пловдив.

### 2. Актуалност на тематиката

*Staphylococcus aureus* е видът, който много често се свързва с нарастваща бактериална резистентност към антибиотици. Поради своята относително висока вирулентност и голямата си пластичност, той се адаптира лесно към различните условия на околната среда. Този вид заема специално място в групата на най-важните бактерии (ESKAPE), предизвикващи инфекции. Доказано е, че назалното носителство играе ключова роля в патогенезата на инфекциите със *S. aureus*. Патогенният успех се дължи главно на факторите на вирулентност, които най-често са активни повърхностно разположени протеини и му позволяват да се прилепва към тъканите, да избягва имунните отговори и да уврежда клетките на гостоприемника. Освен това, способността му да образува биофилми го предпазва от антимикробните средства. Всичко това формира сериозен здравен проблем, който изисква

цялостен подход за проучване и използването на нови биологично активни съединения. В последните години се получиха много доказателства за разнообразните ползи от млечно-киселите бактерии (МКБ) за човешкото здраве. В този контекст, постбиотиците привличат все по-голям интерес като природни антибактериални средства с перспектива за включване в нови стратегии за борба с резистентните патогени и тяхната способност да образуват биофилми.

Именно този проблем формулира научната насоченост в разработката на Лена Илиева, а това е указание за нейната актуалност и значимост. Дисертационната теза е фокусирана върху получаване на нови знания относно участието и патобиологичния потенциал на *S. aureus* в симптоматичните инфекции на горните дихателни пътища и намиране на нови средства за преодоляване на антибиотичната резистентност.

### **3. Познаване на проблема**

Дисертационният труд е конструиран в традиционна форма със съответните раздели. Написан е на 207 стандартни компютърни страници, включващи 147 страници текст, 18 страници литература и 42 страници приложения. Литературният обзор е изготвен целенасочено и конкретно и отчита всички аспекти на изследването. В него са отразени 377 литературни източника, които отразяват постигнатото по проблема до днес. Текстът се характеризира със задълбочено проучване на библиографските източници и творчески подход към отразеното в тях. Над 45% от цитираната литература е от последните 5-6 години, което придава на обзора съвременно звучене и подчертава актуалността на тематиката. Подробно са обсъдени наличните литературни данни относно ролята на *S. aureus* за инфекциите на горния респираторен тракт, механизмите на колонизация, образуването на биофилми и връзката с антибиотичната резистентност. Представени са подходите за молекулярна идентификация и геномна характеристика на вида *Staphylococcus aureus*, както и стратегиите за контрол чрез деколонизация. Искан да подчертая значението на подразделите за новите подходи в тази насока и значението на МКБ. В края на обзора е включен подраздел „Обобщение“, което е много добра идея и улеснява читателя да възприеме по-ясно идеята на докторантската теза.

Целта на дисертационния труд съответства на актуалността на проблема. Тя е ясна, и добре формулирана. За реализиране на тази цел са формулирани 5 конкретни задачи, които включват всички задължителни етапи на подобно проучване.

### **4. Методика на изследването**

Разделът "Материали и методи" демонстрира широк набор от методи, съобразени с конкретните изисквания на експеримента и отговаря на насочеността на дисертационната теза. Използвани са класически и съвременни, микробиологични, молекулярно-биологични, биохимични и статистически методи. Разработката включва огромен брой назални и гърлени проби от лица с инфекции на горния респираторен тракт, а изолираните щамове са идентифицирани чрез конвенционални и молекулярно-генетични методи. Искан да подчертая експериментите на базата на конвенционален PCR за амплификация на гена, пълно геномно ONT секвениране, геномно-базирана идентификация и многолокусно последователно

типизиране. Докторантката е приложила също конфокална лазерна сканираща микроскопия и сканираща електронна микроскопия, определяне на пробиотичен потенциал с всички негови задължителни тестове, пречистване на фракции с FPLC, електрофоретичното разделяне и др. Всички те са достатъчно основание за достоверност и прецизност.

## 5. Характеристика и оценка на дисертационния труд и приносите

В раздел „Резултати и дискусия” е включен обширен експериментален материал, който се характеризира с логическа последователност. Отделните етапи са разработени достатъчно детайлно и са онагледени с 10 таблици и 33 фигури, повечето от които комплексни.

Първият етап от разработката представя задълбочено изследване на структурата на назофарингалните инфекции за период от 4 години на базата 27 959 клинични проби, от които 6657 са с доказан микробиологичен растеж и динамика в зависимост от епидемиологични и клинично-организационни фактори. Полученият модел е сходен със световната тенденция и отчита доминиране на детската възраст, както и връзката със сезонността. В етиологичната структура на този модел ясно се очертава значението на *Staphylococcus aureus*, определено чрез корелационен анализ на относителните дялове на всички изолирани бактерии.

За идентифициране на изолатите от род *Staphylococcus* докторантката прилага комбинирана стратегия от фенотипни и биохимични тестове със секвениране на видово специфични гени и пълно геномно секвениране. Получените резултати създават сериозна научна база за коректно конструиране на филогенетичното дърво на клинични изолати, принадлежащи към вида *Staphylococcus aureus* и доказват добре изразена клонална популационна структура с множество еволюционни линии.

В отговор на поставената цел на дисертационния труд, докторантката прави оценка на актуалната ситуацията относно резистентността на локалните изолати от *Staphylococcus aureus* и сигурността на прилаганите терапевтични режими. Проведено е мащабно проучване на лекарствената устойчивост на 450 изолата към 17 антимикробни агента, подбрани съгласно EUCAST. Интерес представляват установените различни нива на резистентност в зависимост от вида на антибиотиците, които очертават конкретен антимикробен профил на *Staphylococcus aureus* със значение за неговата локална фенотипна характеристика, за способността му за колонизиране и ролята му в разпространението на устойчиви щамове. Много важна част от дисертацията е *in silico* анализът на резистома при *Staphylococcus aureus* чрез платформата ONT и доказаното значение на генетичния потенциал за устойчивост. Докторантката дискутира предимствата на пълното геномно секвениране в сравнение с генотипния анализ, очертава разликата в съответствието между генотип и фенотип и зависимостта от експресията, генетичния фон и съпътстващите мутационни механизми. Освен това, тя представя убедителни доказателства за съответствие между резистентността към определен антибиотик и наличието на отговорните гени при 10 щамове *S. aureus*, включени в експеримента за цялостно геномно секвениране. Това по същество е нова информация относно значението на резистома и необходимостта от съвместно фенотипно и генотипно проучване на проблема.

Искам да подчертая значението на следващия раздел, който на високо методично ниво добавя генетична характеристика на вирулентния потенциал на назофарингеални изолати от вида *S. aureus*. Очертан е вирулентния потенциал, значението на гените, свързани с патогенезата и разнообразието на допълнителните детерминанти при отделните щамове. Установен е ясно изразен блок от фактори, участващи във взаимодействието между патогена и гостоприемника и такива, които подпомагат избягването на локалния имунен контрол. Експерименталните данни са проверени чрез *in silico* анализ на базата на специално разработен PCR панел в широк набор от изолати. В логическа последователност са отразени резултатите относно капацитета на клиничните изолати да образуват биофилми, като основен фактор за тяхната резистентност към антибиотици. Доказана е генетичната база и зависимостта от условията на средата, както и връзката между потенциала за адаптация и потенциала за персистенция.

Следващите раздели (6, 7 и 8) са посветени на актуалната задача да се намерят нови средства с анти-стафилококова активност. На повече от 45 страници, докторантката представя детайлна характеристика на антагонистичния потенциал на селектирани щамове МКБ срещу назофарингеални изолати на *S. aureus* и механизмите на действие чрез комбиниран подход, включващ фенотипен скрининг, геномна характеристика и анализ на постбиотични продукти. След широк скрининг на антибактериалната активност на 12 щамове МКБ е направена оценка на капацитетът им да инхибират развитието на 60 изолата *S. aureus*. Проведеният пълен геномен анализ на избрани щамове МКБ показва разнообразен функционален репертоар от гени. Освен това, *in silico* анализът на геномната структура очертава стабилно ядро от гени, свързани с пробиотичния потенциал и едновременно с това присъствието на генетични елементи, обуславящи различни стратегии на антибактериално действие. Доказано е генетично детерминирано наличие на добре организирани клъстери за синтеза на бактериоцини и посттранслационно модифицирани пептиди с отношение към антимикробната стратегия. На базата на получените резултати, докторантката селектира три щамове с висок пробиотичен потенциал и допълнително го доказва чрез задължителните тестове за подобна активност.

В съответствие с най-актуалните насоки на изследване, докторантката проучва възможността за приложение на постбиотици (безклетъчни супернатанти, БС) от селектираните МКБ като анти-стафилококови средства. Експериментално е установено наличие на мастни киселини, потенциал за ограничаване на биофилм-образуването и потискане на планктонния растеж. Важна част от разработката са експериментите за доказване белтъчната природа на антибактериалната активност чрез фракциониране на БС от *L. plantarum* IZITR\_24 и *L. paraplantarum* IZITR\_13, тяхното концентриране и обогатяване. Интерес представляват данните за ролята на нискомолекулярната белтъчна фракция и наличието на бактериоцин-подобни компоненти при инхибиране развитието на *S. aureus*. Механизмът на действие на лиофилизирани безклетъчни супернатанти е доказан и на микроскопско ниво.

Представянето на резултатите е съчетано с умела дискусия по всички етапи от разработката на базата на подходящи литературни източници. Трябва да се отбележат обширните анализи на получените резултати и коректността при формулиране на заключенията от отделните експерименти. Докторантката ясно разграничава прякото доказателство и необходимостта от допълнителни изследвания. За надеждна оценка на данните тя използва съгласувано различни, допълващи се подходи на съвременен методично ниво. Обсъждането демонстрира също и задълбочените познания на Лена Илиева в тази област.

В края на дисертационния труд е обособен раздел „Заключение“, който обобщава коректно получените данни и подчертава приносите на докторантката. Това улеснява читателя да се ориентира много точно в разработката и да възприеме постиженията в нея.

Искам със задоволство да подчертая много доброто оформление на дисертацията, стегнатия научен стил, на който е написана, коректното отразяване на резултатите в таблици и фигури, както и тяхното професионално представяне.

Според мен, изводите са логично следствие от експерименталните данни и дават необходимата информация за стойността на проведените изследвания. Приемам и формулировката на приносите и искам да подчертая тяхното значение в теоретичен и в научно-приложен аспект. По същество, те се отнасят до получаване на нова информация чрез съвременни методи относно лекарствената чувствителност и патобиологичните характеристики на назофарингеалните стафилококови изолати и охарактеризиране на нови ефективно действащи природни съединения с антибактериална активност на базата на постбиотици от МКБ.

Всичко казано до тук подчертава още веднъж значимостта и актуалността на дисертационния труд.

## **6. Оценка на публикациите по дисертацията и личния принос на докторанта**

Данните от дисертацията са включени в 2 научни статии, отпечатани в реномирани специализирани списания: *Microorganisms* с ИФ 4.7 и квартил Q1 и *International Journal of Molecular Sciences* с ИФ 5.6 и квартил Q1. Това ми дава основание да считам, че резултатите на Лена Илиева са станали достояние на нашата и международната научна общност. Тя е първи автор в 1 научна публикации, което предполага нейния значим дял в разработването на дисертационния труд.

## **7. Критични бележки, препоръки и въпроси**

Нямам сериозни критични забележки, работата като тематика и изпълнение заслужава адмирации. Към докторантката имам следните въпроси:

1. Как предвиждате да разпространите разработения комплексен модел за комбинирано прилагане на съвременни подходи при характеристика на клинични изолати на *Staphylococcus aureus* в микробиологичната практика?

2. Според Вас, задължително ли е постбиотиците/лиофилизирани безклетъчни супернатанти от МКБ, предложени като средства с антибактериална активност да бъдат получени от доказани пробиотични щамове?

3. В каква насока трябва да продължат проучванията относно приложението на постбиотиците за модифициране на растежа и образуването на биофилми от *Staphylococcus aureus*?

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В заключение искам да подчертая, че докторантката е изпълнила изискванията на ЗРАСРБ, като и тези в Правилника към него на ПУ „Паисий Хилендарски“ за придобиване на образователната и научна степен ”доктор”. Материалът, който представя Лена Илиева е дисертабилен, темата е актуална и предлага съвременно ниво на важен за теорията и практиката въпрос. Проведените експерименти са поставени методично правилно, получените резултати са достоверни и са солидна база за следващи научни и приложни разработки. Извършена е огромна експериментална работа, поставеният проблем е многостранно и детайлно проучен на съвременно ниво, направени са съществени научни приноси и такива със сериозно приложно значение. Към тази характеристика на дисертационния труд искам да добавя, че според мен, Лена Илиева излиза от докторантурата като добре подготвен специалист в областта на микробиологията, усвоила е голям брой съвременни методи, получила е опит при интерпретиране на научни данни.

Поради гореизложеното, убедено давам своята **положителна оценка** за проведеното изследване, представено от рецензираните по-горе дисертационен труд, автореферат, постигнати резултати и приноси и **предлагам на почитаемото научно жури да присъди образователната и научна степен „доктор“ на ЛЕНА РУМЕНОВА ИЛИЕВА** в област на висше образование: 4. Природни науки, математика и информатика; професионално направление 4.3. Биологически науки, докторска програма Микробиология.

26.07.2026 г.

София

**Изготвил становището: .....**

/проф. Мария Дянкова, дбн/