

## РЕЦЕНЗИЯ

от проф. Радостина Ивайлова Александрова, доктор (секция „Патология”, Институт по експериментална морфология, патология и антропология с музей – БАН) - член на Научно жури съгласно заповед № РД 38-546/23.11.2020 г. на Ректора на СУ «Св. Климент Охридски»

Относно дисертационен труд на тема: „*Дизайн и експериментално тестване на химерни антисенс-олигонуклеотиди като антибактериални агенти*”

за присъждане на образователна и научна степен „ДОКТОР” в област на висше образование 4. Природни науки, математика и информатика, професионално направление 4.3. “Биологически науки” („Генетика – генно инженерство“) на докторанта Лозена Адриянова Отчева, Биологически факултет, СУ „Св. Климент Охридски“, София, България;

с научен ръководител: проф. д-р Роберт Димитров Пенчовски, Биологически факултет, СУ „Св. Климент Охридски”

### **1. Актуалност и значимост на дисертационния труд**

Устойчивостта на микроорганизмите към антибиотици е разпозната от Световната здравна организация (СЗО) като една от най-големите съвременни заплахи за здравето, безопасността на храните и развитието. Тя може да засегне всеки един от нас, независимо от възрастта и държавата, в която живее. Води до необходимост от по-дълъг престой в болнично заведение, до по-високи медицински разходи и увеличена смъртност. Само един пример, на 20 януари 2018 г. Глобалната система за антиминобно наблюдение GLASS (Global Antimicrobial Surveillance System) на СЗО съобщи данни за нарастваща устойчивост към антибиотици сред 500 000 души с бактериални инфекции в 22 държави. Бактериите, при които най-често се съобщава за антибиотична резистентност са *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, следвани от *Salmonella spp.*

При това, системата GLASS не включва данни за резистентността на *Mycobacterium tuberculosis*, тъй като СЗО я проследява от 1994 г. и предоставя ежегодно актуализира информация в доклада за туберкулозата в световен мащаб.

Според прогнозите на експертите, ако проблемът с лекарствената устойчивост при бактериите не бъде овладян в най-скоро време, това ще бъде причина през 2050 г. от бактериални инфекции да умира по един човек на всеки три секунди. Включително и от инфекции, които съвсем до скоро са били „банални“ и напълно лечими. Според статистиката, в наши дни близо един милион души умират всяка година от бактериални инфекции, които не могат да бъдат лекувани с обикновени антибиотици. Това е изключително тревожно, защото не разполагаме с алтернативи на тези антибиотици.

Именно благородното желание на докторантката и нейния научен ръководител да дадат своя принос за изработването на ново поколение иновативни антиминобни агенти (каквито са антисенс олигонуклеотидите), способни да направят крачка напред в

борбата с предизвикателствата на антибиотичната устойчивост при бактериите, ги е вдъхновило за подготвянето на представения дисертационен труд.

Темата е в съответствие с Националната програма за Развитие на научните изследвания в Република България 2017-2013, както и с приоритетите на Европейската програма „Хоризонт 2020”, тъй като ще допринесе за подобряването на здравето и повишаването на качеството на живота.

## **2. Преглед на дисертационния труд**

Дисертационният труд е написан на 140 страници и включва: Заглавна страница (1 стр.), техническа информация за защитата (1 стр.), Списък на публикации и участия в научни форуми във връзка с дисертационния труд (1 стр.), Съдържание (2 стр.), Въведение (2 стр.), Литературен обзор (35 стр.), Цели и задачи (1 стр.), Материали и методи (13 стр.), Резултати (46 стр.), Дискусия (17 стр.), Изводи (2 стр.), Приноси (2 стр.), Списък на използваните съкращения (2 стр.), Използвана литература (15 стр.). Илюстрирана е с 14 таблици и 39 цветни или черно-бели фигури с високо качество.

Още във **Въведението** Лозена Отчева запознава читателите със същността на проблема лекарствена устойчивост при микроорганизмите и неговите медицински, социални и икономически измерения – фактори, които са я насочили към избора на темата на дисертационния труд.

**Литературният обзор** условно може да се раздели на три части: В **първата част** последователно са разгледани класификацията на антибиотиците въз основа на техния механизъм на действие; механизмите на създадената срещу тях устойчивост; обещаващите нови подходи за преодоляването на този проблем – с помощта на фаги, моноклонални антитела, растителна терапия, пробиотици и други. Във **втората част** специално внимание е отделено на антисенс олигонуклеотидите (АСО) – систематизирани са наличните данни за тяхната фармакодинамика, основните модификации при отделните поколения, начините за доставянето им в клетките, предимствата им като антибактериални агенти, възможните лекарствени взаимодействия и странични ефекти при употребата им. **Третата част** е посветена на рибопревключвателите като мишена за антибактериална терапия с АСО.

Литературният обзор е изключително подробен, написан е на висок научен стил, обобщава съвременни данни в няколко бързоразвиващи се области на биомедицината, като биоинформатика, генетика, фармакология, микробиология.

**Цели и задачи.** Целта (1 брой) и задачите (5 броя) са ясно и точно формулирани. Планирано е амбициозно комплексно проучване, при което е обхванат цялостният процес – от извършването на биоинформатичен анализ за установяване на най-подходящите мишени до изпитване на антибиотичната активност на създадените АСО върху култивирани в лабораторни условия патогенни (3 вида) и непатогенни (един вид) бактерии.

В Раздел **Материали и методи** последователно и подробно са описани приложените биоинформатични инструменти – представена е кратка характеристика на он-лайн бази данни и възможностите, които те предлагат – информация, която е полезна за всички, които работят в областта на биоинформатиката, и не само. Представени са използваните при проучването нуклеотидни / пептидни последователности и тяхното предназначение. Посочени са използваните като моделни системи щамове бактерии, с кратко описание на всеки един от тях, включително

информация за неговата патогенност и факторите, които я обуславят, заболяванията, които предизвиква. Подборът на моделните системи не е случаен – става дума за три патогенни щама (*S. aureus*, *L. monocytogenes*, *E. coli*) и един непатогенен за човека щам (*B. subtilis*). Докторантката и научният ръководител са се насочили към Грам-положителни и Грам-отрицателни микроорганизми, които са сред най-често използваните при провеждане на *in vitro* експерименти, много добре проучени, предизвикващи широк кръг болестни състояния при хората, някои от които може да са животозастрашаващи, при тях е позната лекарствена устойчивост. Достатъчно е да споменем, че устойчивият към метицилин *S. aureus* (MRSA) се приема за една от водещите заплахи за здравето и качеството на живот на населението в световен мащаб, свързана и със сериозни икономически последици и финансови загуби. Методите и техниките са описани изключително подробно. При изработването на дисертацията са използвани съвременни биоинформатични, генетични и микробиологични методи, които напълно отговарят на поставените цели и задачи.

**Резултатите** следват хода на поставените цели и задачи. Те са подробно описани и отлично онагледени са със 7 таблици и 24 фигури с високо качество, които улесняват възприемането им.

С помощта на обстоен преглед на достъпната литература и биоинформатичен анализ са избрани мишени (нуклеотидни последователности), които до този момент не са били прицел на съществуващите антибиотици и се използват за първи път: в иРНК на гена, кодиращ ензима аденилат киназа (регулира равновесието в клетките на прокариоти и еукариоти и е важна за оцеляването на *S. aureus* и други патогенни бактерии) и рибопревключвателя в тиамин пирофосфата (активната форма на витамин В1, важен за функционирането на редица ензими с ключово значение).

Проектирането и изборът на АСО са направени след анализ на метаболитните пътища, които биха били инактивирани с тяхно участие, както и на зависимостта „структура – биологична активност“. Така за работа са избрани четири АСО, означени като АСО1, АСО2, АСО3 и АСО4. Синтезираните АСО са с модификации за АСО от първо и второ поколение, които са подходящи за целите на проекта, тъй като:

- Осигуряват устойчивост на АСО към действието на ендонуклеазите в клетката;
- Спомагат за разпознаването на хибридният двойноверижан участък, образуван от АСО и прицелната нуклеотидна последователност;
- Не предизвикват нежелани ефекти (потискане на ензима РНКазата H).

Установени са клетъчно-проникващите пептиди (КПП) – рVЕС при АСО1, АСО2 и АСО4 и bac7 при АСО3, за които в достъпната научна литература няма данни, че са в състояние самостоятелно да предизвикат антибактериален ефект.

В хода на собствените проучвания е доказано, че рVЕС са по-подходящи КПП за терапия с АСО поне по три причини: 1) Свързани с рVЕС изпитваните АСО показват по-силно изразена антибактериална активност в сравнение с тази при свързването им с bac7; 2) фактът, че рVЕС може да навлезе както в еукариотни, така и в прокариотни клетки, което ги превръща в потенциален кандидат за терапия на вътреклетъчни и извънклетъчни бактериални клетки; 3) в клетките се разгражда от намиращите се там ензими.

Биологичната активност и ефективността на проектираните АСО е проверена в експерименти с култивирани в лабораторни условия бактериални клетки, при което е разкрито, че:

- АСО1 в концентрация 1000 nM спира клетъчното делене и упражнява бактерициден ефект вследствие на специфично свързване с нуклеотидната

последователност - мишена при *S. aureus* – тази мишена се открива в поне 100 щама *S. aureus*;

- АСО2 - уникална последователност, която не се открива в нито един организъм, съвсем очаквано не се свързва никъде в генома на използваните като модели бактериални клетки и не оказва антибактериално действие;
- Ниската антибактериална активност на АСО3 в сравнение с АСО1 най-вероятно се дължи на по-слабата способност на КПП *bac7* да въвежда АСО в бактериалните клетки;
- АСО4 потиска бактериалния растеж на *L. monocytogenes* и *B. subtilis*, които съдържат специфични прицелни последователности, но не и на *E. coli* поради липсата на специфично свързване (*E. coli* може да се свърже само с част от базите по дължината на АСО4). Нещо повече, резултатите от множественото подравняване демонстрират, че АСО4 може да бъде ефективен в терапията и на инфекции, причинени *Bacillus anthracis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Streptococcus pneumoniae*, а след заместване на някои от базите и при инфекции с други патогени, включително *Brucella abortus*, *Helicobacter pylori*, *Clostridium tetani*, *Yersinia pestis*, *Neisseria meningitidis*, *Micobacterium tuberculosis*, *S. aureus*, *E coli* и др.

Подготовката на „Дискусията“ е своеобразен изпит както за всеки докторант, така и за научния му ръководител. Именно в нея най-добре си проличават придобитите знания, усвоените умения, таланта на учения. Мъдростта на учителя и ученика, намерила израз не само в споделяния опит, но и в предаването от поколение на поколение на искрата на професионалното любопитство, която поддържа неугасващия пламък на познанието. Смятам, че докторантът и научният ръководител са се справили отлично. В този раздел е направено нещо много повече от това да бъдат обсъдени собствените резултати в контекста на известните към момента от достъпната литература данни за други антисенс олигонуклеотиди с медицинска насоченост. Стегнато, на висок научен език, но в същото време увлекателно, са представени основните етапи при разработването на нови лекарствени продукти, съвсем естествено разгледани през призмата на антисенс олигонуклеотидите. Авотрът компетентно ни повежда стъпка по стъпка, следвайки хода на създаването и внедряването им – от избора на мишена, през оценяването в предклинични експерименти *in vitro* и *in vivo* на молекулно, клетъчно, тъканно/органно и организмово ниво при лабораторни животни, представени са фазите на клиничните изпитания за безопасност и ефективност при хора, до получаването на одобрение за приложение в медицинската практика от съответните регулаторни органи и по-нататъшните постмаркетингови проучвания (Фаза 4). Всичко това е илюстрирано с примери от света на антисенс олигонуклеотидите. Последната част на дискусията е насочена изцяло към задълбочено обсъждане и анализиране на собствените резултати, което помага на читателя да осмисли пълноценно смисъла и значението им. Дискусията, както и обзорът, са изключително полезно професионално четиво за широк кръг студенти, докторанти и специалисти в различни области на биомедицината и ще бъде хубаво, ако бъде намерена подходяща форма да достигнат до по-широка аудитория.

**Изводите** Въз основа на получените резултати са формулирани 6 извода, които напълно приемам.

Съгласна съм и с обособените 5 **приноса**, посочващи новаторските елементи в дисертационния труд.

Цитираната литература обхваща общо 327 източника, голяма част от които са от последните 5 години.

### **3. Оценка на съответствието между Автореферата и дисертационния труд**

Авторефератът е изработен в пълно съответствие с дисертационния труд и представя в съкратен вариант същността на проучването, последователността на експерименталната работа, получените резултати и направените на тяхната основа изводи и приноси.

### **4. Публикации на докторанта по темата на дисертационния труд**

До момента по темата на дисертационния труд са публикувани две обзорни статии в международни списания, които са реферирани и индексирани в световно известни бази данни за научна информация: „Biomedical Journal of Scientific and Technical Research“ (с импакт фактор 0.548) и „EC Microbiology“. В едната от тях Лозена Отчева е първи автор. Получените знания и резултати са популяризирани и с три съобщения на конгрес с международно участие, проведен в България – единият от тях е награден с Второ място за отлично представяне.

### **5. Критични бележки и коментари, препоръки, въпроси към докторанта**

Нямам забележки по същество.

Смятам, че дисертационният труд само би спечелил от едно по-внимателно стилистично редактиране – на места текстът следва английския словоред и/или преводът е прекалено буквален, срещат се ненужни повторения, както и някои технически грешки. Някои фрази (включително в приносите) би могло да бъдат редактирани, за да звучат по-концентрирано и насочено.

Посочените пропуски и технически грешки по никакъв начин не намаляват качествата на дисертационния труд.

Горещо препоръчвам получените оригинални резултати да бъдат оформени в (поне една) статия и предложени за публикуване в авторитетно международно издание с висок импакт фактор (каквото заслужават!), за да станат час по-скоро достояние до световната научна общност.

**Към докторанта имам следните въпроси:**

- При наличие на необходимото финансиране и условия в каква посока според нея трябва да продължат проучванията върху представените в дисертационния труд антисенс олигонуклеотиди?
- При евентуално клинично приложение на синтезираните АСО, какъв би бил най-подходящият подход – като тясноспектърна или широкоспектърна терапия?
- Очакваме ли странични ефекти и възможно ли е те да бъдат намалени?
- Възможно ли е бактериалните клетки да „избягат“ от насоченото срещу тях действие на антисенс олигонуклеотидите? Можем ли да се противопоставим?
- Има ли желание да работи върху създаване на антисенс олигонуклеотиди за приложение в лечението и на други групи заболявания? Кои и защо?

## **6. Автобиографични данни и лични впечатления от докторанта**

Лозена Отчева е завършила гимназия с изучаване на чужди езици в гр. Видин, България. Има магистърска степен по фармация и индустриална фармация от Университета „Ла Сапиенца“ в Рим (2013 г.). От юли 2016 до юли 2019 г. е докторант в Биологическия факултет на СУ „Св. Климент Охридски“, по време на което е преминала през 8 допълнителни курса на обучение. Участвала е в изпълнението на 4 научноизследователски проекта, финансирани от Фонд „Научни изследвания“ при МОН. Владее английски и италиански език. Съавтор е на постер, за чието представяне е наградена с 2-ро място на 14<sup>ия</sup> конгрес на микробиолозите в България, проведен през 2018 г.

Не познавам лично докторанта, първата ни среща стана по време на вътрешната защита на дисертационния труд. Пред себе си видях млад учен, който с видимо удоволствие и удовлетворение споделя постигнатите резултати, наясно е с всеки етап от получаването им – от планирането на експеримента до обсъждането на експерименталните данни, работила е не само с мозъка и ръцете си, но и със сърцето си.

## **7. Заключение**

Дисертационният труд е изпълнен и написан на високо научно ниво и има своите несъмнени достойнства. В хода на подготовката, докторант Лозена Отчева е натрупала нови знания, усвоила е богат набор от съвременни методи и техники, включително работа с редица биоинформатични ресурси, станала е част от подготовката и изпълнението на мащабен проект, който по своя замисъл, иновативен заряд и осъществяване, е достоен за всяка авторитетна академична институция по света.

Актуалната тема, прецизното изпълнение на поставените задачи, убедително получените оригинални резултати, безспорните и значими приноси в областта на биоинформатиката, генетиката, фармакологията и микробиологията, които ще подпомогнат борбата с едно от най-големите обществени предизвикателства на нашето време – устойчивостта на бактериите към антибиотици, и, не на последно място – израстването на докторанта като способен и перспективен учен, заслужават най-висока оценка. Всичко това ми дава основание да смятам, че дисертационният труд отговаря напълно на Закона за развитие на академичния състав в Република България, както и на правилника за неговото приложение в СУ „Св. Кл. Охридски“, за присъждане на образователната и научна степен „Доктор“. Убедено давам своята положителна оценка и препоръчвам на членовете на Уважаемото Научно жури да присъдят на Лозена Адриянова Отчева образователната и научна степен „Доктор“ в област на висше образование 4. Природни науки, математика и информатика; професионално направление 4.3. „Биологически науки“ (Специалност „Генетика – генно инженерство“).

26 януари 2021 г.

.....  
/Проф. Р. Александрова/