

# РЕЦЕНЗИЯ

от **акад. проф. Иван Георгиев Иванов, дбн**

на дисертационния труд на д-р **Екатерини Валсаматзи-Панайоту** „*Дизайн на химерни антисенс олигонуклеотиди и начална оценка на тяхното използване за терапевтични цели*“, представен за присъждане на образователната и научна степен „**Доктор**“ в Област на висшето образование 4. „Природни науки, математика и информатика“, Професионално направление 4.3. Биологически науки, Докторска програма: „Генетика-Биоинформатика“

## 1. Обща част

Д-р **Екатерини Валсаматзи-Панайоту** разработва докторската си теза като редовен докторант в Биологическия факултет на СУ „Св. Кл. Охридски“ по докторантска програма „Генетика-Биоинформатика“, под научното ръководство на проф. дн Роберт Пенчовски. Нейният дисертационен труд обхваща 128 стандартни страници, онагледен е с 30 фигури и 4 таблици, и съдържа 169 литературни източници. Тя е зачислена на 15.01.2018 г., а дисертационният ѝ труд е допуснат за защита през м. декември 2020 г. Прегледът на документите във връзка със защитата показва, че процедурата по зачисляване, обучение и отчисляване на докторанта е спазена и документацията е изготвена съгласно изискванията на ЗРАСРБ и Правилника за неговото приложение.

## 2. Кратки биографични данни

**Екатерини Валсаматзи-Панайоту** е възпитаник на Пловдивския медицинския университет, който завършва през 2017 г. със специалност „Медицина“. По късно (2020 г.) придобива и магистърска степен по „Здравни грижи“ от Международния гръцки университет в Солун, Гърция. Тя е автор на 11 научни статии, от които 3 са свързани с докторската ѝ дисертация, а 8 са извън нея. Участвала е с доклади и постери на 4 научни форуми и е взела участие в разработването на 5 научно-изследователски проекти финансирани от ФНИ при МОН и СУ.

## 3. Актуалност на разработваната тема

Дисертационният труд на д-р **Екатерини Валсаматзи-Панайоту** е посветен на важен и актуален за съвременната бактериология, инфектология и бактериална генетика проблем - резистентност на бактериите към антибиотиците и търсенето на нови антибактериални средства с потенциал за бъдещо клинично приложение. Като се има предвид голямата социална значимост на антибиотичната резистентност за съвременната медицина, актуалността на разработваната тема е повече от очевидна.

## 4. Познаване на проблема

Докторантката е запозната много добре с литературата по разработваната тема. Литературният обзор обхваща около 50 страници и се основава на повече от 160 литературни източници. Той се състои от два основни раздела, посветени съответно на лекарствената резистентност при бактериите и търсенето на нови антибактериални средства базирани на синтетични антисенс олигонуклеотиди.

В първия подраздел са представени статистически данни за антибиотичната резистентност по света и факторите, които я причиняват; механизмите на действие на класическите антибиотици; механизмите на възникване и разпространение на антибиотичната резистентност; антибактериалните мишени и др.

Във втория подраздел е дадена обща характеристика на антисенс олигонуклеотидите и принципите на тяхното действие; подходите за модификация и въвеждане в клетката; предимства и недостатъци в сравнение с класическите антибиотици.

Обзорът е написан на лесен за четене научен език, което го прави разбираем и за по-широк кръг специалисти. Той впечатлява със задълбочения анализ на литературата, благодарение на която докторантката успява да намери изследователската си ниша и да формулира целите и задачите на своята дисертация, а те са, да осъществи дизайн, синтез и проучване на действието на три химерни антисенс олигонуклеотиди насочени към избрани мишени от генома на патогенния бактерии *Staphylococcus aureus*.

## 5. Методика на изследването

Изследванията свързани с дисертацията са проведени с помощта на разнообразна методология. Методите могат да се разделят на *биоинформатични* и *експериментални*. Първите включват различни професионални програмни пакети за геномни изследвания (Clustal W/Clustal X, RNAfold, Ecpasy Swiss Bioinformatics Resource Portal, Текст-редактор Notepad<sup>++</sup>, Motif searcher и др.), които са приложени за скрининг на общодостъпни ДНК и РНК бази от данни като NCBI, Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, Rfam 14.1., Rswitch и др., а също за дизайн на конкретните антисенс олигонуклеотиди. Експерименталните методи са описани подробно, което позволява да бъдат възпроизведени, без необходимост от използване на допълнителна методична литература. С овладяването на изброените методи, може да се каже, че докторантката е постигнала една от целите на докторантското обучение – придобиване на експериментални знания и умения за самостоятелно провеждане на научни изследвания.

## 6. Оценка на получените резултати

Раздел „Резултати“ обхваща около 30 страници. Той е структуриран в няколко подраздела, всеки от които е посветен на дизайна и изследването на биологичната активност на химерните антисенс олигонуклеотиди, обозначава като АСО 1, АСО 2, АСО 3 и АСО 4. Три от тях (АСО 1, АСО 2 и АСО 3) са предназначени за заглушаване на жизнено важни гени от генома на *Staphylococcus aureus* ATCC 25293 - клиничен изолат причиняващ вътреболнични инфекции и устойчив към множество антибиотици, а АСО 4 е създаден като негативна контрола. Два от олигонуклеотидите (АСО 1 и АСО 2) са предназначени за инактивиране на стафилококовата рибонуклеаза Р, а един (АСО 3) - на РНК полимеразата.

Приложението на антисенс олигонуклеотидите, като алтернатива на антибиотиците в борбата с човешките патогенни бактерии, е сравнително ново направление в бактериологията, чийто успех зависи от точния дизайн на олигонуклеотида и правилния избор на неговата мишена. За целта е необходимо добро познаване на молекулярната генетика на въпросния микроорганизъм и отлично владение на биоинформатичните методи. Съдейки по получените резултати (виж по-долу) докторантката Екатерина Валсаматзи-Панайоту е придобила необходимите знания и умения и в двете посоки. Нейната стратегия е била да блокира репликацията на стафилококите по два независими начина: а) Чрез инактивиране на рибонуклеаза Р (свързана със синтеза на тРНК) и б) Чрез инактивиране на бактериалната РНК-полимераза (съставена от 5 субединици). За целта е изследван генома на *Staphylococcus aureus* в търсене на подходящи прицелни места/гени свързани с двата ензима.

За мишени са избрани къси нуклеотидни секвенции в гените *rnpB* и *rnpA* на рибонуклеаза Р и в гена *groB*, кодиращ бета-субединицата на стафилококовата РНК-полимераза. Прицелните места са уточнени след прецизен биоинформатичен анализ на съответните иРНКи, целящ да открие стабилни едноверижни структури. По този начин са избрани следните секвенции за трите антисенс олигонуклеотиди: АСО 1 (21 нуклеотида) 5'-ААТССАААТТТGGTAGGAGCA-3' съответстваща на 197-ма позиция в гена *rnpB*; АСО 2 (15 нуклеотида) 5'-ТТАСАААТАСАГААТ-3' съответстващ на 286-та позиция в гена

*rnpA* и АСО 3 (22 нуклеотида) 5'-TGAAACACCTGAGGGACCAAAC-3' съответстваща на 105-та позиция в гена *proB*.

След компютърния дизайн, докторантката започва реална работа по техния синтез и изследване на антибактериалното им действие. С цел повишаване на устойчивостта им към клетъчните нуклеази и удължаване на техния полуживот в клетката, олигонуклеотидите са модифицирани чрез метилиране по 2'-ОН във въглеводородния остатък и замяна на кислорода със сяра при фосфорния атом. За по-лесно проникване в бактериалната клетка, те са конюгирани с клетъчно проникващият пептид рVЕС, съставен от 18 аминокиселинни остатъка.

Така синтезираните олигонуклеотиди са изследвани за инхибиращо действие върху растежа на *Staphylococcus aureus* в течна среда при концентрации вариращи от 1050 nM до 4500 nM. Изследванията показват, че и трите антисенс олигонуклеотиди потискат бактериалния растеж, като АСО 1 има най-силен инхибиращ ефект при концентрация 4500 nM, а АСО 2 и АСО 3 - при 3000 nM. В по-ниски концентрации (1050 и 2100 nM) АСО 3 е по-активен от АСО 2.

Прави ми добро впечатление прецизния подбор на контролите, от които зависи адекватността на изводите и интерпретацията на получените резултати. С цел да изключи евентуално неспецифичното действие на самите олигонуклеотиди като такива, докторантката синтезира нов, четвърти олигонуклеотид (АСО 4), чиято секвенция е подбрана така, че да няма никакъв таргет в генома на *Staphylococcus aureus*. АСО 1 е модифициран по същия начин и е конюгиран със същия клетъчно проникващият пептид както и олигонуклеотидите АСО 1, АСО 2 и АСО 3. С него, а също така с чист (неконюгиран) клетъчно проникващ пептид рVЕС са повторени същите експерименти както и с антисенс олигонуклеотидите. Резултатите са категорични. АСО 4 и чистият пептид рVЕС не проявяват инхибиращ ефект върху растежа на стафилококите. Оттук следва извода, че наблюдаваният ефект на синтетичните антисенс олигонуклеотиди се дължи на тяхното специфично взаимодействие с предварително избраните мишени.

Резултатите са добре онагледени с кинетични растежни криви и са обсъдени в светлината на известните литературни данни в раздел „Обсъждане“.

## **7. Приноси и научна значимост на разработката**

Изследванията свързани с дисертацията на д-р Катерини Валсаматзи-Панайоту имат научно-приложен характер. Докторантката създава три уникални, химически модифицирани антисенс олигонуклеотиди насочени към три гени от генома на патогенния бактерия *Staphylococcus aureus* и доказва, че те инхибират неговия растеж *in vitro* (в бактериални култури). Създадените антисенс олигонуклеотиди могат да се разгледат като кандидат-лекарствени препарати за лечение на стафилококови инфекции причинени от щамове с множествена антибиотична резистентност.

## **8. Публикации свързани с дисертацията**

Във връзка с дисертационния труд са публикувани 3 статии, от които 2 са глави от монографии и 1 е публикувана в реферирано списание с SJR 0.16.

## **9. Автореферат, изводи приноси**

Запознат съм с проекта за автореферат и намирам, че той отразява адекватно съдържанието и постиженията на дисертацията. Направените изводи и приноси са обективни и съответстват на получените резултати.

## **10. Критични бележки**

Към работния вариант на дисертацията на д-р Катерини Валсаматзи-Панайоту имах критични забележки и препоръки, които са взети предвид при изготвянето на крайната версия.

### **11. Въпроси**

Към докторантката имам следния въпрос: Правени ли са опити да се оцени значението на химическите модификации (метилиране и сулфониране) върху стабилността и биологичния ефект на химерните олигонуклеотиди в сравнение с немодифицирани такива?

### **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Дисертационният труд на д-р Катерини Валсаматзи-Панайоту е посветен на важния за бактериологията и медицината проблем – борбата с устойчиви към антибиотици патогенни бактерии. Като молекулярен генетик, тя се насочва към създаването на антибактериални средства от ново поколение, каквито са антисенс олигонуклеотидите, разпознаващи специфични мишени в генома на патогена. С помощта на биоинформатиката и данни от геномиката, тя успява да създаде три антисенс олигонуклеотиди насочени към гените *rnpB* и *rnpA* на рибонуклеаза Р и *groV* гена на РНК-полимеразата на патогенния бактерия *Staphylococcus aureus*. Трите олигонуклеотиди са добре охарактеризирани и могат да се разглеждат като кандидат-лекарствени препарати срещу стафилококови инфекции причинени от щамове с множествена резистентност. Във връзка с дисертационния труд са публикувани 3 статии, от които 2 са глави от монографии и 1 е публикувана в реферирано списание с SJR 0.16.

Със своя дисертационен труд д-р Катерини Валсаматзи-Панайоту се представя като добре подготвен специалист в областта на биоинформатиката и молекулярната генетика. Тя удовлетворява напълно изискванията на ЗРАСРБ, Правилника за неговото приложение и вътрешните правилници на БФ и СУ „Св. Кл. Охридски“ за придобиване на образователната и научна степен „Доктор“ по докторантска програма „Генетика-Биоинформатика“ и аз убедено препоръчам на уважаемото научно жури да ѝ я присъди.

19.02.2021 г.

**Рецензент:**

/Акад. Иван Г. Иванов/