

## **РЕЦЕНЗИЯ**

**На дисертационен труд за придобиване на научната и образователна степен „доктор“ в професионално направление „4.3. Биологически науки“, Специалност „Генетика – Биоинформатика“**

**на Катерини Николаос Валсаматзи-Панайоту, редовен докторант към катедра Генетика на Биологически факултет на Софийски университет „Св. Климент Охридски“ на тема:**

**„ДИЗАЙН НА ХИМЕРНИ АНТИСЕНС ОЛИГОНУКЛЕОТИДИ И НАЧАЛНА ОЦЕНКА НА ТЯХНОТО ИЗПОЛЗВАНЕ ЗА ТЕРАПЕВТИЧНИ ЦЕЛИ“**

**С научен ръководител проф. д-р Роберт Димитров Пенчовски, катедра Генетика на Биологически факултет, Софийски университет „Св. Климент Охридски“**

**Изготвил: доц. д-р Таня Иванова Топузова-Христова, катедра Цитология, хистология и ембриология, Биологически факултет на Софийски университет „Св. Климент Охридски“**

### **Данни за докторанта и докторантурата.**

Екатерини Николаос Валсаматзи-Панайоту е родена на 9 май 1993 г. в град Солун, Гърция. Завършила е Медицински университет, Пловдив, специалност Медицина с отличен успех през 2017 г. На 15.01.2018 г. е зачислена за редовен докторант в професионално направление 4.3. Биологически науки, Генетика – Биоинформатика, (научен шифър 01.06.06) към катедра „Генетика“ на Биологически факултет към Софийски университет „Св. Климент Охридски“ за период от три години със Заповед № РД-20-86/12.01.2018г., на основание чл. 67 от Закона за развитие на академичния състав в Република България, чл. 11 от Правилника за прилагане на Закона за развитие на академичния състав в Република България, чл. 22 от Правилника за условията и реда за придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности в Софийски университет „Св. Климент Охридски“ и решение на Факултетния съвет на Биологически факултет от 19.12.2017 г. За срока на редовната докторантура, Катерини Валсаматзи успешно е положила всички необходими изпити

и е изпълнила задачите, съгласно одобрения индивидуален план. Докторантката е отчислена с право на защита и на 14.01.2021 е проведен разширен катедрен съвет на катедра Генетика, съгласно Заповед № РД 38-3/5.01.2021 на който е направено предварително обсъждане на дисертационния труд и е взето решение за насочване към официална защита. Научното жури за защитата е избрано от Факултетен съвет на Биологически факултет от 26.01.2021 и е назначено със заповед № РД-38-74/08.02.2021, съгласно чл. 4 от ЗРАСРБ, във връзка с параграф 7 от Преходните и заключителни разпоредби на Правилника за условията и реда за придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности в Софийски университет „Св. Климент Охридски“. Спазени са всички срокове и минималните национални изисквания, като представената документация напълно отговаря на изискванията на ЗРАСРБ и Правилника за условията и реда за придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности в Софийски университет „Св. Климент Охридски“, а дисертационният труд и авторефератът успешно са преминали проверката за превенция на плагиатство в СУ. Няма установени нарушения при реализирането на процедурите по изработване, отчисляване и предварително обсъждане на дисертационния труд.

Освен работата си по дисертационния труд, Екатерина Валсаматзи е повишавала научния си капацитет, като е била участник в общо 5 научни проекта, свързани с областта на дисертационната ѝ тема, част от които са финансирани от ФНИ на Софийски университет „Св. Климент Охридски“, а друга част от ФНИ на МОН. Извън дисертационния си труд, докторант Валсаматзи-Панайоту е съавтор още в 8 научни публикации в областта на биомедицинските изследвания и научната комуникация в областта на медицината. През 2020 г. е придобила магистърска степен по програма „Здравни грижи“ - Master of Science in Health & Welfare Units“ в Международен Гръцки Университет, гр. Солун, Гърция (International Hellenic University (IHU) of Thessaloniki).

#### **Данни за дисертацията.**

**Темата** на дисертационния труд „Дизайн на химерни антисенс олигонуклеотиди и начална оценка на тяхното използване за терапевтични цели“ изцяло отразява същността на работата, която е в една бързоразвиваща се област на биомедицинските науки. Темата е актуална с оглед на все по-нарастващата заплаха от възникване на мултирезистентни патогенни щамове под еволюционния натиск на широката и често излишна употреба на широкоспектърни антибиотици в медицинската практика. В тази връзка, е изключително актуално и важно разработването на нови стратегии за борба с

инфекциозните заболявания. Екипът на проф. Пенчовски е водещ в България по отношение на дизайн и тестване на антисенс олигонуклеотидите с евентуално терапевтично приложение и дисертационния труд на Катерини Валсаматзи-Панайоту логично се вписва в общия план на работа на екипа, като едно комплексно изследване, включващо методи от областта на синтетичната биология, биоинформатиката и микробиологията, което води до резултати както с фундаментално, така и с приложно значение.

**Основните части на дисертацията** спазват общоприетият за такъв труд план и включват: Въведение – 2 страници, Литературен обзор – 46 страници, Цел и задачи – 1 страница, Материали и методи – 9 страници, Резултати – 30 страници, Обсъждане – 4, Изводи – 1 страница и Приноси – 1 страница. За онагледяване са използвани общо 30 фигури и 4 таблици. Обсъждането на получените резултати е твърде кратко и би могло да се разшири с оглед на приложността им и актуалността на проблема. Така дисертационният труд би бил с по-добър баланс и перспективите за бъдещи приложения биха били по-добре обосновани. Към дисертационния труд и автореферата са приложени списък на фигурите и таблиците, както и автобиография, което считам за излишно повтряне, тъй като автобиографията е част от документите с които се кандидатства за защитата, а фигурите и таблиците са част от текста на самата дисертация. Общо дисертационния труд съдържа 128 страници, но без посочените повторени части е 120 страници.

Литературният обзор съдържа две почти равностойни части, първата от които разглежда проблема за антибиотичната резистентност, механизмите за възникването ѝ, разпространението ѝ, както и възможните нови антибактериални мишени, към които могат да се насочат стратегии за търсене на нови лекарствени препарати. Във втората част е направен преглед на съвременните знания за антисенс олигонуклеотидите, техният принцип на действие, както и възможностите за приложения и ограниченията, наложени от недостатъците и възможните нежелани ефекти на тази обещаваща нова биотехнология. Обзорът е направен на достъпен език, стегнато и ясно и е онагледен с 12 фигури и 3 таблици. Добро впечатление прави използването на правилен български език и граматически конструкции в текста.

Като основен обект за прилагане на антисенс олигонуклеотиди с антибиотично действие е избрана бактерията *Staphylococcus aureus*, широко разпространен патоген при хората, който причинява редица кожни инфекции и инфекции на меките тъкани с

продължително третиране и който по тези причини има потенциал да развие антибиотична резистентност при неправилна терапия. Целта на дисертационния труд е изведена логично и към нея са формулирани 6 задачи, очертаващи логиката и плана, по който е проведена експерименталната част на дисертационния труд, с прилагане на комплексен подход, включващ инструменти от биоинформатика, синтетична биология и класическа микробиология.

В частта Материали и методи са посочени биоинформатичните бази данни (общо пет, свободно достъпни) и програми, две от които авторски на ръководителя на докторанта, проф. Роберт Пенчовски, с цитирани интернет страници, чрез които е проучен генома на избрания патоген и са подбрани мишени, които да се атакуват с антисенс олигонуклеотиди, както и са направени необходимите изчисления за вторична структура и анализ на метаболитни пътища. Освен тях са посочени и уеб сървър и BLAST – виртуален инструмент за сравняване на нуклеотидни или белтъчни последователности, както и редица софтуери, но са в раздел Използвана апаратура, вместо към съответния метод, в който са прилагани, последвани от излишно подробен списък на рутинна апаратура като автоклав, хладилник, фризер, везна, вортекс и др., с описание за какво са използвани. Препоръчвам в следващ научен текст да се ограничи споменаването на лабораторна техника само до уникална такава. От друга страна, биоинформатичните методи са бегло споменати, без да се посочат параметри за провеждания анализ, което считам за известна слабост на тази част от дисертационния труд. Методите, свързани с микробиологичната част на експериментите са достатъчно добре описани, за да могат да се повторят.

Резултатите от биоинформационния анализ са добре мотивирани и илюстрирани, като показват отделните стъпки от дизайна на подбраните 3 антисенс олигонуклеотида, които имат специфична мишена в патогенните стафилококи, както и контролен олигонуклеотид, който не съответства на нито един участък от генома на прицелната бактерия. Получените антисенсолигонуклеотиди са тествани за ефективност в лабораторни условия. Подробно описаните етапи на култивиране на бактериите и проследяване кривата на растеж в тази част е по-удачно да бъдат в раздел Материали и методи. Отчетеното инхибиране на бактериалния растеж в присъствие на антисенсолигонуклеотиди е впечатляващо и дава надежда за възможностите на този подход в разработването на нови антибиотични агенти. Контролният четвърти олигонуклеотид, който не се свързва с никой участък от генома на прицелната

бактерия, както и клетъчнопроникващия пептид, не показват инхибиращ ефект върху растежа на бактериите.

В частта Обсъждане е направено обобщение на получените резултати, но липсва дискусия и сравнение с публикувани други изследвания с подобни генни мишени или прицелни бактерии. Изследванията на колегите от групата на проф. Пенчовски са пилотни в тази област за България. Опити за терапевтично приложение на антисенс олигонуклеотиди има, обаче, при редица други заболявания при човек, както инфекциозни, така и генни и би било полезно да се сравнят стратегиите при търсене на мишена, ефикасност и продължителност на въздействието, фактори, които повлияват успеха на една такава експериментална терапия.

От получените резултати са направени седем извода, които частично преразказват и обобщават резултатите и биха могли да се представят по-стегнато.

**Научен апарат.** Цитирани са общо 169 източника, от които 82 (48.5%) са от последните 5 години, а 34 (20%) са от 2020 година. Това е отличен атестат за актуалността на разработваната тематика и иновативността на прилаганите в дисертационния труд подходи. Към цитираните източници са включени и два от тези, в които са публикувани части от самата дисертация, което не е прието за подобен научен труд. Бих препоръчала тези цитирания да се заменят с други подходящи или да се изключат от списъка. Всички източници имат пряко отношение към изследваната тема, което показва отличната осведоменост на докторанта. Повечето от цитиранията са направени при спазване на утвърдените стандарти за цитиране на научна литература, но в някои от тях не са посочени всички автори. Този начин на цитиране е приет в редица научни издания, с цел да се намали обема на печатното издание, но при дисертационни трудове се препоръчва БДС или подобен стандарт на цитиране, при който са изброени имената на всички автори в цитираните източници и пълното библиографско описание. Препоръчвам на докторанта да се придържа към единен стандарт за цитиране в бъдещите си трудове.

**Приложения.** Няма специално посочени Приложения към дисертацията и автореферата, но като такива могат да се приемат Списък на използваните съкращения, Списък на фигурите, Списък на таблиците и Автобиография на докторанта. Списъкът на използваните съкращения е полезен и облекчава четенето на дисертационния труд.

Останалите не са обичайна практика и не допринасят за по-добро възприемане или изясняване на резултатите в текста.

**Авторефератът** съдържа 68 страници и отразява съдържанието на дисертационния труд. Коректно са представени основните резултати, илюстрирани с общо 18 фигури. Частите Материали и методи, Резултати, Изводи и приносите копират до голяма степен текста на тези части от дисертацията, което води до сравнително голям обем на Автореферата. Обичайната практика е те да бъдат редактирани и преразказани по-сбито, но да се съхрани съществената информация в тях.

**Публикации.** Резултатите от дисертационния труд, както и части от направения литературен обзор, са включени в 2 глави от книги, публикувани от престижни международни научни издателства като Springer и Elsevier и в една статия, публикувана в списание с импакт фактор 0,16 и квантил Q4 - Arch Clin Microbiol. Тези публикации напълно покриват и надвишават минималните национални изисквания за защита на дисертация за научната и образователна степен Доктор в научно направление 4.3. Биологични науки, съгласно Приложение 1 на ЗРАСРБ.

Освен посочените публикации, Катерини Валсаматзи е съавтор и в още 8 публикации с медицинска и медико-биологична насоченост, което я определя като амбициозен и активен млад учен.

**Научни и научно-приложни приноси.** Приносите от дисертационния труд са общо четири и са с научно-приложен характер, като показват възможността изследваните антисенсолигонуклеотиди успешно да се внедрят в медицинската практика след преминаване през необходимите предклинични и клинични изпитания. Не приемам като част от принос 2 антисенсолигонуклеотида АСО4, който не се среща при някой организъм и е използван като контрола, доказваща липсата на токсичност на АСО сами по себе си. Подобен принос беше заявен в наскоро защитена дисертация от същата група и не е редно да бъде заявяван и в следващ дисертационен труд. Има ли разлика между тези два контролни олигонуклеотида или се касае за една и съща контролна проба използвана при различните изследвания за ефикасност на АСО? Допълнителен въпрос е дали избраната мишена в *Staphylococcus aureus* е подходяща и при други патогенни за човека бактерии?

**Заклучение.**

Представеният ми за рецензия труд е част от едно пилотно изследване на възможностите на химерните антисенс олигонуклеотиди за преодоляване на множествената лекарствена резистентност при патогенни бактерии. Дисертационният труд е фокусиран върху стратегия за откриване на подходящи мишени в конкретен патоген, дизайн на антисенс олигонуклеотиди и валидирането на бакрелициндното им действие в лабораторни условия. Тази стратегия би помогнала за преодоляването на множествената лекарствена резистентност при патогенните бактерии, която се оформя като сериозен проблем за съвременната медицина. Направените забележки имат по-скоро редакционен характер и не омаловажават постигнатите приносни резултати. Екатерина Валсаматзи-Панайоту е изпълнила поставените в дисертацията цели и задачи и има изискваните по Приложение 1 на ЗРАСРБ публикации.

В заключение, считам, че докторантът напълно отговаря на изискванията на ЗРАСРБ за присъждане на научната и образователна степен „доктор“ и давам своята положителна оценка да бъде присъдена научната и образователна степен „доктор“ в научно направление 4.3. Биологични науки на Екатерина Валсаматзи-Панайоту.

30.03.2021

Изготвил рецензията:

Гр. София

/доц. д-р Таня Топузова-Христова/