

СТ А Н О В И Щ Е

О Т

доц. д-р Роберт Димитров Пенчовски от катедра Генетика, Биологически факултет, Софийски Университет „Свети Климент Охридски“

*Относно дисертационен труд със заглавие “Инженерство на функционални нуклеинови киселини и приложението им в областите на молекулярната генетика и синтетичната биология” с автор **Мартина Трайковска** за присъждане на образователна и научна степен “ДОКТОР” в областта на „Природни науки, математика и информатика”, Професионално направление: „Биологични науки”, шифър 4.3, Научна специалност: „Генетика- Синтетична биология” с научен ръководител доц. д-р Роберт Димитров Пенчовски.*

Като научен ръководител на *Мартина Трайковска* мога да уверя, че нейната дисертация е структурирана съгласно Закона за развитие на академичния състав в Република България. Дисертационният труд съдържа 133 страници, 37 фигури, 7 таблици, като са цитирани 146 литературни източника. Дисертацията съдържа следните части: въведение, литературен обзор, цел и задачи, материали и методи, резултати, дискусия, изводи, научни приноси, използвани съкращения; литература, списък на публикации, върху които е основана дисертацията, както и автобиография на докторанта.

Като цяло, дисертацията е много добре написана, което улеснява нейното четене, разбиране и оценяване. Всички фигури са оригинални и прегледно направени с висока резолюция. Целите и задачите, изводите и научните приноси са ясно и убедително формулирани. Резултатите са представени с необходимия доказателствен материал.

Дисертацията прилага методите на антисенс технологията за създаване на нови антибактериални агенти, които използват като мишени мРНКи, съдържащи бактериални рибопревключватели. В литературния обзор са много добре обяснени основните теми на дисертацията, включително антисенс технологията, структурата и функцията на бактериални рибопревключватели, видове антибиотици и механизми на тяхното действие, причини и механизми за възникване на антибактериална резистентност.

Основната цел на дисертацията на *Мартина Трайковска* е създаването на нови антибактериални агенти базирани на антисенс олигонуклеотиди, които специфично да се свързват с два определени вида бактериални рибопревключватели и да инхибират растежа на определени видове бактерии, които съдържат съответните рибопревключватели.

Актуалност, значимост и оригиналност на темата на дисертацията: Проблемът с възникването и разпространението на нови щамове бактериални патогенни, които притежават резистентност към съществуващи антибиотици е едно от най-големите предизвикателства при съвременното лечение на бактериални инфекциозни заболявания. Това е признато от Световната здравна организация като едно от най-големите предизвикателства в съвременната медицина водещо до смъртта на все повече хора в световен мащаб. Това потиква все повече изследователи и фармацевтични компании да разработват нови антибактериални средства за преодоляване на множествената антибактериална резистентност. За съжаление, нови антибиотици не се създават достатъчно бързо за да осигурят ефективно лечение срещу новите бактериални щамове, развили устойчивост към съществуващите антибиотици. Необходимо е да се развиват и използват нови стратегии за бързо създаване на антибактериални агенти, чрез които да се води успешна борба с резистентните патогенни бактерии.

В този контекст тема на дисертацията е много актуална, както от чисто научна гледна точка така и от научно-приложно естество. Създаването на синтетични антисенс олигонуклеотиди (АСОи), насочени срещу специфични мРНК с жизнено-важни регулаторни функции в бактериите, има голям потенциал за използването им като нови антибактериални агенти. Този потенциал е разкрит за първи път в дисертацията на *Мартина Трайковска*. Тук за първи път е доказано инхибирането на бактериален растеж в резултат на действието на АСОи, които изпулват като мишени бактериални рибопревключватели. Поради това, тези дисертация заслужава да се възприеме като иноваторска и напълно оригинална в своята същност.

Използваните методи в дисертацията на *Мартина Трайковска* са не само разнообразни но и интердисциплинарни. Те напълно съответстват на поставените цели и задачи и включват: 1) биоинформатични анализи на

биохимични пътища за синтезата на флавиномононуклеотид (ФМН) и С-аденозилметионин (САМ) при бактерии; 2) биоинформатични анализи на консервативни секвенции при бактериални рибопревключватели за ФМН и САМ-1; 3) биоинформатични анализи на вторични структури на мРНК на бактериални рибопревключватели за ФМН и САМ-1; 4) Дизайн на АСОи; 5) Дизайн на праймери за ПиСиАр; 6) Изолиране на мРНК от бактерии; 7) АрТи-ПиСиАр; 8) ПиСиАр; 9) Измерване кинетиката на растеж на бактерии; 10) Тестове за преживяемост на еукариотни клетки и други.

Резултати: Използваните АСОи са свързани с рVEC, които е клетъчно проникващ олигопептид. Проведените прецизни експерименти доказват убедително инхибиторен ефект на АСО1 и АСО3 върху бактериалния растеж на безусловно патогенна бактерия при човека - *Lysteria monocytogenes* и при условно патогенните бактерии *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli*. Инхибирането на бактериалния растеж е чрез специфично хибридизиране на конструираните АСОи с комплементарни секвенции на аптамерните домени на съответните рибопревключвателите – АСО-1 се свързва специфично с рибопревключвателя за ФМН, а АСО-3 – с този на САМ-1. В резултат на това съответната мРНК се разгражда от ензима РНКаза Н. Всички експерименти с АСОи са повторени пет пъти, като резултатите са осреднени. Този ензим разпознава ДНК/РНК хибридни участъци.

Докторанта е определил и минималната инхибираща концентрация на АСОи за 80% инхибиране на бактериалния растеж от 4,5 µg/ml за ФМН рибопревключвателя и от 4,4 µg/ml за САМ-1 рибопревключвателя. Проведени са експерименти *in vitro* на клетъчни линии, които показват, че тези АСОи не са токсични при тези концентрации. Освен това са проведени и всички необходими контролни експерименти само с рVEC и с неспецифични АСОи, които нямат инхибиращ ефект за бактериите.

Тези резултати имат важно научно-приложно значение, тъй като доказват че тези АСОи могат да се използват по този начин като антибактериални агенти с бактериостатичен ефект, срещу които по-трудно се развива резистентност в сравнение с бактерицидните антибиотици. Важно е да се подчертае, че всички АСОи работиха успешно и не се правени никакви допълнителни дизайни на АСОи. Това говори много добре за ефективността на създадения метод.

Обсъждането е направено адекватно на получените резултати и в съответствие с литературните данни от използваната библиография. Изводите и научните приноси съответстват пълно на получените резултати.

В заключение като се вземе предвид значимостта, актуалността и иновативността на темата на дисертационния труд, използваните съвременни методи, получените резултати с важен научен и научно-приложен принос за използване на АСОи като антибактериални агенти, аз определям дисертационният труд като успешно разработен и научно обоснован, отговарящ на всички изисквания на Закона за развитие на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ) и специфичните изисквания на Софийски Университет „Св. Климент Охридски“, включващи две публикации, които са реферирани в научната база данни SCOPUS, една от които е с импакт фактор от 3.8 единици.

Във връзка с гореизложеното, аз оценявам високо постигнатите иновативни резултати в дисертацията на *Мартина Трайковска* и препоръчам напълно убедено на членовете на уважаемото Научно жури да присъди на *Мартина Трайковска* образователна и научна степен “ДОКТОР” в област на висше образование: „Природни науки, математика и информатика”, професионално направление: „Биологически науки”, Шифър 4.3, Научна специалност: „Генетика – синтетична биология”.

28.09.2017

гр. София

Изготвил становището:/подпис/

доц. д-р Роберт Димитров Пенчовски

катедра Генетика, Биологически факултет,

Софийски Университет „Св. Климент Охридски“