

РЕЦЕНЗИЯ

НА ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД ЗА ПРИСЪЖДАНЕ НА ОНС „ДОКТОР“

в професионално направление 4.3. „Биологически науки“, спец. „Генетика“

НА ТЕМА:

**„БИОИНФОРМАТИЧЕН И ГЕНОМЕН АНАЛИЗ НА
РИБОПРЕВКЛЮЧВАТЕЛИ И СВЪРЗАНИ С ТЯХ БИОХИМИЧНИ ПЪТИЩА
ПРИ ЧОВЕШКИ ПАТОГЕННИ БАКТЕРИИ И ИЗПОЛЗВАНЕТО ИМ КАТО
МИШЕНИ ЗА СЪЗДАВАНЕ НА НОВИ АНТИБАКТЕРИАЛНИ АГЕНТИ“**

Докторант: *Николет Илиева Павлова, Катедра „Генетика“, Биологически факултет на СУ „Св. Климент Охридски“, с научен ръководител доц. д-р Роберт Димитров Пенчовски*

Изготвил: *доц. д-р Светослав Георгиев Димов, Катедра „Генетика“, Биологически факултет на Софийски университет „Св. Климент Охридски“*

Биографични данни за докторанта. Николет Павлова е родена на 06.03.1991 г. в гр. София. През 2010 г. завършва средното си образование в НПМГ „Акад. Любомир Чакалов“ - София в паралелка с интензивно изучаване на биология. През 2014 г. придобива бакалавърска степен в Биологически факултет на СУ „Св. Климент Охридски“ по специалност „Молекулярна биология“, а през 2016 г. – магистърска степен по Генетика и геномика в в Биологически факултет на СУ „Св. Климент Охридски“, защитавайки дипломна работа на тема “Биоинформатичен и геномен анализ на рибопревключватели за FMN, GlmS, sobalamine и lysine и свързаните с тях информационни РНК при човешки патогенни бактерии за откриване на нови аантибиотици”. През периода 2016 – 2019 г. е редовен докторант в Катедра „Генетика“, Биологически факултет на Софийски университет „Св. Климент Охридски“. Основните ѝ научни интереси са в областта на биоинформатиката, метагеномиката, генетиката и микробиологията. Участник е

в 6 научни проекта към Фонд „Научни изследвания“ към Министерството на образованието, науката и младежта и Фонд „Научни изследвания“ на Софийски университет „Св. Климент Охридски“, повечето от които имат пряко отношение или връзка към темата на представения ми за рецензиране дисертационен труд. От представените данни се вижда изключителен интерес и последователност при изследванията на рибопревключвателите при патогенни бактерии.

Научна актуалност на дисертационния труд.

След откриването и въвеждането в масова употреба на пеницилина, се е смятало, че за няколко десетилетия процентът на смъртни случаи след хората, които се дължат на бактериални инфекции, ще спадне значително и дори ще започне да клони към нулата, тъй като употребата на антибиотици прави революция в терапията на бактериалните инфекции. Реалността обаче за съжаление се оказва коренно различна – днес процентът на смъртни случаи, дължащ се на бактериални инфекции, не само, че не е намалял, но според някои автори показва и склонност към увеличаване. Причината е във възникването на резистентни към антибиотици щамове патогенни бактерии. Изчислено е, че средно са необходими между 5 и 10 години от откриването на даден нов клас антибиотик с принципно различен механизъм на действие до появата на първите резистентни към него щамове. Причината от една страна се крие в изключителната адаптивна способност при бактериите, дължаща се на бързото им развитие и висока мутационна честота, но от друга в десетилетията неправилна терапия със сублетални дози антибиотик или презастраховането срещу усложнения след вирусни инфекции на някои общопрактикуващи лекари, които предписват широкоспектърни антибиотици без да има необходимост от това. Може би дори още по-сериозен се оказва и проблемът с третиране на селскостопанските животни с антибиотици с цел превенция, а не лечение от инфекции. Всичко това, често пъти съчетано с недобра хигиена, води до създаден от човека и по вина на човека селективен натиск върху еволюцията на патогените по посока придобиване на резистентности към различни антибиотици. Всички тези фактори, в комбинация с

възможността за вътре- и междувидов хоризонтален генен пренос при бактериите, доведе до възникването на т. нар. multiple drug resistant (MDR) щамове, които са устойчиви към повечето класове антибиотици, както до т.нар. extensively drug resistant (XDR) щамове, които са устойчиви към всички разрешени за употреба при човека класове антибиотици. Арсеналът на съвременната медицина срещу тях е силно ограничен или липсва, което налага спешните търсения в цял свят на нови, принципно различни от антибиотичите, бактериални агенти. В тази светлина актуалността на представения ми дисертационен труд се проявява в две направления: 1. Резултатите от изследването на рибопревключвателите при патогенни бактерии би позволило създаването на нови подходи за потискане на развитието на патогенните бактерии по принципно различен начин от този при антибиотичите ; 2. От чисто теоретична еволюционна гледна точка възникването на механизми за първенция на атаките, осъществявани на основа на блокиране на правилното действието на даден рибопревключвател, биха били много по-трудни, ако не и дори невъзможни.

Обща структура на дисертационния труд. Същинската част на дисертационният труд е развита в рамките на 130 страници (след като бъдат извадени различни списъци и автобиографията на докторанта, чието място по мое мнение не е в изложението на дисертацията), като той е структуриран по стандартен начин, като включва следните основни раздели: „литературен обзор“, „материали и методи“, „резултати“ и „обсъждане“. Отделно са представени кратко „въведение“, „цел и задачи“, „изводи“ и „приноси“, както и „библиографска справка“ на използваната литература, включваща около 168 източника, основно от последните години.

Дисертационният труд започва с кратко „**въведение**“ в рамките на 4 страници, в което се обосновават интереса към тематиката на работата и механизмите на регулация на генната експресия с помощта на рибопревключватели.

„Литературният обзор“ е развит в рамките на 26 страници. Той е разделен съдържателно на две части. Първата част заема малко над 50% от него и в нея се прави преглед на същността на рибопревключвателите, класификацията им, структурата, разпространението и механизмите им на действие. Във втората част се разглеждат бактериите като вредни или полезни за човека, прави се преглед на най-разпространените методи за борба срещу патогенните видове с акцент върху употребата на антибиотици и перспективите за алтернативни на антибиотичните средства за третиране на бактериални инфекции, включително и такива, основаващи се на таргетирането на рибопревключватели, които контролират основни жизнено важни метаболитни процеси. Разделът е онагледен с 6 фигури с добро графично качество и една таблица. От изложението на този раздел личи навлизането в дълбочина на докторантката в тематиката на дисертационния ѝ труд, както и че тя се е запознала с достатъчни по обем най-съвременни литературни източници по темата на работата ѝ. От него също така личат и уменията ѝ да интерпретира и пише научен текст на добър научен език. Въпреки положителните ми впечатления от написването на този основен раздел на дисертацията, имам и някои забележки, които не мога да пропусна. Условно мога да ги разделя в две групи: по структурата на изложението и съдържателни забележки.

По отношение на структурата щеше да е смислово по-логично, ако подточки 2.1. и 2.2. бяха обединени в една обща, обхващаща рибопревключвателите, а подточка 2.3 беше разделена на две отделни – една, обхващаща прегледа на микробиома при човека и втора, която да е фокусирана върху класическите методи за лечение и разработваните в последните няколко години модерни алтернативи на антибиотичите. Също така легендата на фиг. 3 не е прецизирана, тъй като на стр. 27, където текстът ни насочва към нея, се говори за 2 структури, а на фигурата са представени 4, без да е ясно обозначено, че 3 от тях засягат т.нар. “junctional” структура, а само една алтернативната “pseudoknotted”

структура. Отделно в изложението се откриват и две-три съдържателни повторения.

По отношение на съдържанието се откриват и някои неточности и грешки: 1. На стр. 26 е написано, че „тРНК се транслира“; 2. На стр. 27 пише, че „има само един нуклеотид разлика между гуаниновата и адениновата база“; 3. На стр. 32 се твърди, че *Neurospora crassa* представлява водорасло, като това твърдение не би могло да мине за техническа грешка, тъй като се повтаря и на стр. 52 в раздел „Резултати“. Срещат се и някои грешки при изписването на латинските наименования на някои бактериални видове, като например "*Streptococcus thermophilEs*" или главна буква след "subsp." (стр. 43). Също така за един от бактериалните видове се използва името *Lactobacillus bifidus* от времето на Иля Мечников, вместо актуалното му латинско наименование *Bifidobacterium bifidus* след прекласификацията на вида преди около 50-60 години. Повечето от тях, разбира се, могат да се обяснят като чисто технически, но за съжаление не са били отстранени в крайния вариант на текста на дисертацията.

Към този раздел нямам въпроси.

„Цел и задачи“. Поставена е една цел, за чието изпълнение са предвидени три експериментални задачи, които обаче се явяват напълно достатъчно за постигането ѝ, тъй като всяка задача е разделена на различен брой по-малки, като общият брой на задачите брой е 14, което напълно удовлетворява по обем изискванията за един дисертационен труд за придобиване на ОНС „Доктор“. Към този раздел имам една забележка – чисто хипотетично разделянето на целта на две свързани, но отделни изброени вероятно би било по-удачно: една обхващаща анализа на рибопревключвателите с потенциал за мишени за антибактериални агенти, а другата – оценка на възможността конкретни рибопревключватели да бъдат таргетирани. От чисто съдържателен аспект такова разделяне би систематизирало изложението в по-висока степен.

„Материали и методи“. Разделът е развит в рамките на 5 страници. Разделен е логически на две части – работа с общодостъпни бази данни, обединена в подраздел озаглавен „материали“, и работа със софтуерни продукти, обединена в подраздел „методи“. Обемът на този раздел в процентно отношение спрямо целия обем на докторския труд се явява доста под общоприетите, но той е напълно достатъчен предвид изцяло биоинформатичната специфика на дисертацията, в която отсъства лабораторна експериментална работа и в никакъв случай не омаловажава или принижва обема на извършената от дисертантката работа.

Към този раздел нямам забележки и въпроси.

Разделът **„Резултати“** е развит в рамките на 73 страници и е разделен на 3 подточки, като в първата, с помощта на анализ на базите данни, се прави систематизиране на разпространеното на рибопревключвателите при различните бактерии, във втората с помощта на биоинформатичен анализ се разглежда структурната организация на различни рибопревключватели, а в третата се обсъжда възможността за използването на различни рибопревключватели като мишени за разработването на нови антибактериални агенти. Разделът съдържа 36 фигури и 4 таблици. Забележките ми по отношение на изложението в този раздел отново мога да подреда в 2 групи:

1. Технически забележки. По отношение на фигурите правят впечатление: графичното качество на фигури от 8 до 19, което не позволява разчитането на надписите на в частта им за разпространението отделните рибопревключватели при различните организми, както и при някои от филогенетичните дървета, в повечето случаи съществува голямо разминаване между цитирането на фигурите в текста и тяхното местоположение, налагащо прелистване на много страници, както и това, че не е ясно посочено кои фигури и части от фигури са авторски и кои са взимствани (при някои се посочва, че са взети от статии, но е посочено само списанието и годината, но не и авторите). Срещат се и някои смущаващи твърдения като например това на стр. 75, където е написано

„Днес има само три аминокиселини, които не се получават директно от РНК...“ или на стр. 105 - „... да инициира транслацията на белтъците от thiCEFSGH-thiMD-thiBPQ полицистронния локус“, като тук бих споменал допълнително, че прилагателното „полицистронен“ е прието да се използва за иРНК, а съществителното „локус“ за ДНК. Срещат се и дребни технически грешки, като например на стр. 110 се цитира фиг. 1, а се има предвид фиг. 35, а на стр. 98 е написано „концентрация на сол“, вместо „концентрация на соли“, тъй като тя не е само една. Също така дразнещо се явява използването на чуждици, от които „секвенция“ би могла да бъде приета за лабораторен жаргон, то за „стем“ това не е така и тя може да бъде преведена грамотно на едновременно литературен и научен език. Позволявам си да препоръчам също така на докторантката да избягва абсолютизиращи твърдения от рода на „при всички патогени при човек“, като ги замени с „най-често срещаните“, тъй като ако не сега, то в бъдеще може да бъде опровергавана при развитието на науката, както и да ѝ препоръчам да не използва първо лице множествено число, а безличната форма, тъй като дисертационният труд е авторски, въпреки че работата е осъществена в колектив и под научно ръководство.

2. Съдържателни забележки. Категорично смятам, че мястото на точка 5.3. е в раздел „обсъждане“, а не „резултати“, като най-големите ми основания за това са, че в точка 5.3.1. не са представени никакви извършени биоинформатични анализи, в точка 5.3.2. като резултат може да се приеме само авторската класификация за пригодност, а в точка 5.3.3., която се явява най-обширна в този раздел, се прави задълбочен и същевременно изключително коректен анализ и съпоставка с литературни източници.

Раздел „**Обсъждане**“ представлява последния основен раздел на дисертационния труд, който е развит само в рамките на 5 страници. Тази цифра формално погледнато може се стори донякъде стряскаща, но като цяло обаче, при оценката ми на дисертационния труд, като част от обсъждането, аз приемам, както вече споменах, цялата точка 5.3. от раздел „резултати“, която е цели 45 страници. Така в смислово отношение раздел „обсъждане“, чието написване говори най-

много за научната зрялост на докторантката, тъй като показва способностите ѝ да интерпретира научна информация, става около 40% от общия обем на дисертационния труд и негово най-значимо достойнство, особено като се вземе предвид факта, че той е на основата на *in silico* анализи, изискващи много задълбочени теоретични познания и обработката на огромна по обем информация. Единствената ми забележка към разграничения в дисертационния раздел „обсъждане“ е, че изложението в него доста често повтаря смислово части от останалата част на дисертацията в предишните раздели, докато в същинското обсъждане на резултатите, присъстващо в точка 5.3. се правят много по-задълбочени и във връзка с получените от докторантката данни анализи и обосновки на изказаните от нея хипотези. В така обособения раздел не се съдържат фигури и таблици и към него нямам забележки и въпроси.

След раздел „обсъждане“ докторантката е включила раздел с обем от 5 страници, който е озаглавила **„Заключение“**. По мое мнение той се явява излишен, като основанията ми за това са, че в него се правят изводи, за които има отделен раздел, като в изложението изрично е посочено няколко пъти, че се правят изводи. Отделно в този раздел се срещат доста повторения на вече изложени в раздел „резултати“ факти. Въпреки моите забележки, този раздел не се отразява на цялостната ми оценка на представената ми за рецензиране работа.

„Изводи“. Формулирани са общо 11 извода. По мое мнение не се забелязват изводи с приносен характер. единствената ми забележка към този раздел е, че изводи № 1 и № 11 не могат да бъдат разглеждани изцяло като резултат от извършените биоинформатични и геномни анализи, които са обект на дисертационния труд, тъй като информацията в тях е частично основана на публикувани литературни данни.

„Приноси“. Формулирани са 6 приноса. Към тях имам следните забележки: 1. Някои от тях, особено № 5 и № 6, макар и да са на мястото си, би могло да бъдат формулирани по доста по-кратък и ясен начин, както е прието; 2. в принос № 4 е посочено, че са анализирани биохимични пътища, което не е

коректно, тъй като докторантката не е анализирала самите биохимични пътища, а възможността за използването на рибопревключватели за тяхното блокиране.

Общи забележки върху дисертационния труд. Като цяло представената за разглеждане работа оставя добро впечатление на едно завършено цялостно научно изследване по актуален проблем, осъществено с едни от най-модерните биоинформатични методи в геномиката. Дисертацията е написана на добър научен стил и грамотен език, като количеството на правописните и граматически грешки е малко. За съжаление изключително добрите ми впечатления се замъгляват от използването на чуждици, за някои от които вече споменах, когато термините имат общоприет превод на български език, както и от все по-често употребявания от младите изследователи у нас т. нар. „Bulgish“-словоред, който е привнесен от английския език, като например „ФМН рибопревключвателя“ или „fmpP гена“. Също така си позволявам да направя и забележката, че „докторска дисертация“ и „магистърска теза“, както и наименованията на белтъци и химични съединения, се пишат с малки букви, освен когато са в началото на изречението.

Към докторантката имам два въпроса по отношение на същността на дисертационния му труд, на които очаквам да отговори в резултат на натрупания от нея опит: 1. Смята ли, че при евентуално приложение на антибактериални агенти, които блокират метаболитни пътища посредством взаимодействието им с рибопревключватели, биха се повлияли и полезните за човека бактерии, които тя цитира, че при здрави индивиди са 4 пъти повече; и 2. Правени ли са геномни проучвания, данните от които да позволяват да се създават антибактериални агенти, таргетиращи рибопревключватели в биохимични пътища, които да ги блокират единствено патогенните бактерии, но не и в полезните?

Автореферат. Като цяло той повтаря в съкратен вариант дисертационния труд и позволява да се добие добра представа за неговата същност. Развит е в рамките на 32 страници и съдържа разделите „Въведение“ (3 стр.), „Цел и задачи“, „Материали и методи“ (3 стр.), „Резултати“ (61 стр.) и

„Обсъждане“ (5 стр.), „Заключение“, „Изводи“ и „Приноси“, последвани отново, според мен не на място, от автобиографията на докторантката, която е вмъкната преди библиографската справка. По отношение на разделите „Резултати“ и „Обсъждане“ имам същите коментари и забележки, които вече направих за самия дисертационен труд. В автореферата са представени 35 фигури и 4 таблици.

Научни публикации по темата на дисертацията. Представени са и две научни публикации по темата на дисертацията, като и двете са в реферирани специализирани списания с добър импакт фактор, както и три участия в специализирани научни форуми, един от които в чужбина. Наличните публикации покриват законовите изисквания, както и приетите от Биологически ф-т на СУ „Св. Климент Охридски“ критерии за придобиването на образователната и научна степен „доктор“.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. *Въпреки поставените от мен забележки, ще изразя мнението си, че представената ми за разглеждане работа представлява едно завършено и цялостно научно изследване, поради което ще гласувам ПОЛОЖИТЕЛНО за присъждането на образователната и научна степен „доктор“ на докторант НИКОЛЕТ ИЛИЕВА ПАВЛОВА и ще препоръчам и на уважаемите колеги от научното жури също да гласуват по същия начин.*

София, 2 септември 2019 г.

доц. д-р Светослав Димов