

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 38-59/01.02.2021 г. на Ректора на СУ «Св. Климент Охридски»

Относно дисертационен труд на тема: *„Дизайн и приложения на функционални нуклеинови киселини за контрол на генна експресия и създаване на нови терапевтични 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“ – докторска програма „Биоинформатика“)

на докторанта Катя Бисерова Попова, 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 бактериите към антибиотици е едно от най-големите биомедицински и обществени предизвикателства на нашето време, което поставя в риск здравето, безопасността на храните и развитието. Тиха „пандемия“, която се разраства и заплашва да ни върне столетия назад, в годините, когато медицината е била безсилна дори пред най-баналните от днешна гледна точка инфекции и „безобидни“ наранявания. В опит да бъде спряно разрастването на този нежелан процес и да „обърнем“ ситуацията в наша полза, Световната здравна организация (СЗО) предприема редица стъпки, сред които е резолюция WHA67-25 от 2014 г. за „Борба с микробната лекарствена резистентност, включително антибиотичната резистентност“. Година по-късно, на Световната здравна асамблея правителствата приеха глобален план за действие в тази посока, а през 2016 г. темата влезе в дневния ред на Общото събрание на ООН и доведе до приемане на политическа декларация. Тези усилия никак не са случайни. Достатъчно е да споменем, че на 20 януари 2018 г. Глобалната система за антимикубно 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. При това в доклада не са включени данните за устойчивостта на *Mycobacterium tuberculosis*, която подлежи на самостоятелно проследяване от страна на СЗО. Всяка година стотици хиляди хора губят живота си поради невъзможност да бъдат повлияни от действието на стандартните антибиотици, в опасност са и новите поколения антибиотици.

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.

Постоянното увеличение на броя на резистентните към антибиотици бактериални щамове и свързаните с това неблагоприятни последици от една страна, както и ограничените възможности на класическите подходи за създаване на ефективни антибактериални средства, налага спешното идентифициране и въвеждане на работещи подходи за справяне с проблема. Особено обещаващи в това отношение са антисенс олигонуклеотидите (АСО), които може да бъдат насочени срещу специфични бактериални РНК мишени и да предизвикат тяхното ензимно разграждане. Проведените във водещи лаборатории проучвания в тази област, както и клиничната практика с вече одобрени за приложение АСО при други заболявания у хора, убедително илюстрират добрата поносимост и високата ефективност на тези агенти. Това, заедно с бързината на синтезирането и сравнително невисоката цена на получаването на АСО, превръща тази технология в алтернативен иновативен подход за създаването на изцяло нов клас антибиотични препарати.

Темата е в съответствие с целите на 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 156 страници и включва: Заглавна страница (1 стр.), техническа информация за дисертационния труд и защитата, включително списък на публикациите по темата на дисертацията (2 стр.), Списък на използваните съкращения (2 стр.), Съдържание (3 стр.), Въведение (3 стр.), Литературен обзор (41 стр.), Цели и задачи (2 стр.), Материали и методи (16 стр.), Резултати (64 стр.), Дискусия (8 стр.), Изводи (2 стр.), Приноси (2 стр.), Списък на участията в научни форуми в областта на дисертационния труд (1 стр.), Благодарности (1 стр.), Използвана литература (9 стр.). Илюстрирана е с 5 таблици и 50 цветни или черно-бели фигури с високо качество.

Още във **Въведението** докторантът Катя Попова грабва вниманието на читателите с високата летва, поставена пред дисертационния труд, с който предстои да се запознаят. Накратко са представени актуалността, същността и основните достижения на проведеното интердисциплинарно проучване, уверено стъпило на достиженията на едни от най-привлекателните и бързоразвиващи се области на биомедицината: биоинформатика, синтетична биология, молекулярна биология, генетика, геномика, биохимия, микробиология и експериментална фармакология. Веднъж навлязъл в света на представения дисертационен труд, читателят нито за миг не губи интереса си към него до изчитането на последното изречение.

Литературният обзор включва два основни раздела. Първият от тях е посветен на антисенс олигонуклеотидите. Той започва с исторически преглед, проследяващ всички онези стъпки в зараждането и развитието на молекулярната биология и биоинформатиката, спомогнали да бъде разкрит потенциала на АСО и допринесли за развитието на тази технология. Подробно са разгледани модификациите на АСО, които

повишават устойчивостта им към действието на ензимите; описани са предимствата и недостатъците на трите поколения АСО; систематизирана е информация за механизма на действието им, техния пренос и приема им в клетките. Специално внимание е отделено на приложенията на АСО, 6 от които вече са одобрени от Американската агенция по храните и лекарствата (FDA) и/или от Европейската медицинска агенция (EMA). Втората част на обзора запознава с проблема антибиотична устойчивост – обсъдени са механизмите на възникването ѝ в бактериите, като с помощта на подходящи примери е илюстриран всеки един от тях; намерили са място факторите, които допринасят за появата и разпространението ѝ. Съвсем очаквано ударението е поставено върху на възможностите на АСО като потенциални антибактериални агенти и подходящите за тях гени-мишени в бактериалните клетки. Тази част на дисертационния труд е онагледена с 6 фигури и 2 таблици.

Литературният обзор е написан на висок научен стил, но в същото време се чете с лекота. Той показва отличната осведоменост на докторанта в областта на дисертационната тема, умението ѝ да борави с литературни източници, да обобщава и анализира, да поднася дори „сухите“, строго научни факти по интересен и запомнящ се начин. Зад подготвянето му стоят много знания, мисъл, труд, професионален интерес и любопитство, любов към избраната специалност – всички те са го превърнали не само в ценен източник на съвременна информация за широк кръг специалисти, но и в увлекателно четиво.

Цели и задачи. Целта (1 брой) и задачите (7 на броя) са ясно и точно формулирани, което свидетелства за предварително добре обмислен и задълбочен подход към осъществяване на амбициозно и комплексно интердисциплинарно проучване.

Интересите на докторантката и научния ръководител са насочени към създаването на нови химерни антисенс олигонуклеотиди с антибактериална ансоченост при патогенни бактерии, които се свързват специфично с glmS рибопревключвателя (глюкозамин 6-фосфат активираната рибозима) или с бактериалните иРНК, кодиращи ензимите N-ацетилглюкозамин-6-фосфат деацетилаза и гуанилат киназа, както и изпитване на тяхната цитотоксичност в туморни и нетуморни постоянни клетъчни линии с човешки произход. Изборът на glmS рибопревключвателя не е случаен поне по три причини: 1) това е един от най-широко разпространените рибопревключватели 2) Среща се единствено сред бактериални представители и отсъства в еукариотните организми, което го прави отлична мишена на АСО; 3) Консервативният му характер свежда риска от появата на мутации, водещи до резистентност и/или неефективност на създадените АСО, до минимум, а приспособимия характер на самата АСО технология позволява бързата редакция на нуклеотидната последователност, ако такава мутация все пак се появи.

В Раздел **Материали и методи** прецизно са описани използваните при проведеното проучване бази данни и търсачки, химикали и консумативи, антисенс олигонуклеотиди и праймери, експерименталните модели – бактериални видове и човешки клетъчни линии с туморен и нетуморен произход, апаратурата. Изследването е осъществено с помощта на подходящи за постигане на поставените цели и задачи класически и съвременни методи – микробиологични, генетични, биоинформатични, работа с клетъчни култури, цитотоксични тестове и други. Методите и техниките са описани изключително подробно, което би позволило да бъдат успешно

възпроизведени от всеки, който би проявил интерес. Разделът е илюстриран с 3 фигури и 1 таблица.

Резултатите следват хода на поставените цели и задачи. Те са подробно представени и отлично онагледени чрез 2 таблици и 41 фигури с високо качество, които улесняват възприемането им.

Проектирани са общо 7 антисенс олигонуклеотида, за чиито дизайн са приложени модификации от първо и второ поколение с цел осигуряване на по-висока устойчивост на АСО към действието на клетъчните ендо- и екзонуклеази, както и за стабилното хибридиране на АСО с избрания мишенен участък и неговото разпознаване от ензима РНКаза Н. Техният успешен прием както в прокариотни, така и в еукариотни клетки, е гарантиран от прикрепянето на клетъчно- проникващия белтък рVЕС в 5' края на нуклеотидната последователност на всеки един от разработените АСО.

Извършено е обстойно проучване в научните бази данни и достъпната литература, последвано от щателен биоинформатичен анализ на избраните мишени, техните нуклеотидни последователности и вторични структури. Избраните мишени се отличават с това, че към момента те не представляват обект на прицелване от страна на съществуващите антибиотици и се използват за първи път: в glmS рибопревключвателя и в иРНК-и на гените, кодиращи ензимите N-ацетилглюкозамин-6-фосфат деацетилаза (pagA) и гуанилат киназа (gmk) на човешки патогенни бактерии. Установено е, че изследваните мишени се откриват в голям брой патогенни за човека бактерии: в 26 вида за glmS рибопревключвателя, в 106 вида за pagA гена и в 109 вида за гена gmk.

При избора на гореспомнатите мишени и дизайна на четири антисенс олигонуклеотида (АСО1-АСО4) са анализирани метаболитните пътища, които се очаква да бъдат засегнати под тяхното действие. Разработени са и два броя антисенс олигонуклеотиди (АСО5 и АСО6), които имат неспецифичен характер и са подходящи за анализиране на влиянието, което подобни последователности биха предизвикали върху преживяемостта и растежа на клетките от три постоянни човешки клетъчни линии. Разработен е и още един антисенс олигонуклеотид (АСО7), който не притежава сходни последователности сред организмите и е подходящ за сравнение на ролята на дизайна и предизвикания от него ефект с всички предходни специфични и неспецифични антисенс олигонуклеотиди.

В допълнение на изпълнената *in silico* работа, докторантката е извършила убедителна и значителна по своя обем лабораторна експериментална работа, с която демонстрира ефикасността на разработените от нея антисенс олигонуклеотиди *in vitro*. За пръв път са синтезирани 4 АСО, насочени срещу функционално значимите бактериални мишени glmS, pagA и gmk, които потискат *in vitro* растежа на *Staphylococcus aureus*. Сред тях впечатление прави доказаният специфичен бактериостатичен ефект на АСО1, който в комбинация с АСО2 предизвиква бактерициден ефект в *S. aureus*. Проследена е и негативната роля на неспецифичното хибридиране на антисенс олигонуклеотиди при клетки от човешки клетъчни линии, с което докторантката е подчертала значимостта от специфичността при дизайна на подобни терапевтици за тяхната безопасна бъдеща употреба в клиничната практика. Съвсем очаквано е доказана и липсата на свързване на АСО7 в геномите на използваните като модели бактериални и нормални човешки клетки.

Демонстриран е консервативният характер на използваните мишени чрез базата данни CARD, като е проверено за наличието на установени към момента резистентни гени в изследвания моделен организъм, както и за предвиждането на бъдещи мутации в тях. При самостоятелното тестване на използвания АСО преносител рVЕС е

демонстрирана липсата на инхибиращ или цитотоксичен ефект в изследваните моделни организми, което потвърждава, че всички наблюдавани ефекти се дължат на нуклеотидната последователност на разработените АСО.

Проведеният биоинформатичен анализ на патогенни за човека бактерии и жизненоважни за тях биохимични пътища разкрива ценна информация за потенциалното им използване като мишени при разработване на иновативни и отличаващи се с висока ефективност антибактериални агенти от ново поколение.

Разделът „Дискусия“ безспорно е най-сериозното изпитание за зрелостта на докторанта и умението му не просто да трупа информация, а активно да използва придобитите нови знания. Смятам, че Катя Попова успешно се е справила с това предизвикателство, което на свой ред говори за отлично изпълнената учебна работа от страна на научния ѝ ръководител. В този раздел авторката ни въвежда в „кухнята“ на експерименталната работа, стояща в основата на експерименталната обстановка, избора на мишените и моделните системи, а получените собствени резултати са аналитично и критично обсъдени в светлината на известните от литературата данни.

Изводите Въз основа на получените резултати са систематизирани 7 извода, които напълно приемам.

Съгласна съм и с обособените 2 **приноса**, посочващи новаторските елементи в дисертационния труд.

Цитираната литература обхваща общо 189 източника (3 са на кирилица, а останалите на латиница), преобладаващата част от които са от последните 5-10 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

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“. Трета обзорна публикация е приета за печат в списание “Environmental Chemistry Letters” – изданието се реферира и индексира в Scopus (с импакт фактор 5.92 и квантил Q2). Катя Попова е първи автор и в трите публикации. Тя е представила две научни съобщения на 14^{ия} Конгрес на микробиолозите в България с международно участие, проведен на 10-13 октомври 2018 г. в гр. Хисаря, България.

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

Нямам забележки по същество.

Забелявах някои дребни технически грешки (погрешно написани буквички), включване на авторите на кирилица сред тези на латиница, а не отделно и др. Под фигурите с данни от проведения МТТ тест за установяването на потенциалната

цитотоксична активност на използваните АСО не е посочена статистическата значимост на получените резултати.

Изброените пропуски по никакъв начин не намаляват качествата на дисертационния труд.

Препоръката ми е получените експериментални резултати да бъдат систематизирани час по-скоро в поне една статия, която да бъде предложена за публикуване в авторитетно международно издание с висок импакт фактор и квантил, за да може да достигнат до всички онези специалисти, за които представляват интерес (а техният брой не е никак малък).

Към докторанта имам следните въпроси:

- Част от създадените АСО (АСО1 и АСО2) проявяват в комбинация бактерициден ефект по отношение на *S. aureus*. Може ли да очакваме подобно въздействие и при *MRSA S. aureus*?
- От литературата е известно за проведени изпитвания върху потенциалната антивирусна активност на АСО срещу различни вируси, включително SARS-CoV-1. Можем ли да очакваме агент, насочен срещу пандемичния SARS-CoV-2, разработен на основата на АСО?
- Искате ли да продължи да работи върху създаване на антисенс олигонуклеотиди за приложение в лечението и на други групи заболявания? Кой и защо?

6. Автобиографични данни и лични впечатления от докторанта

Катя Попова е завършила Националната природо-математическа гимназия „Акад. Любомир Чакалов“ в гр. София. Притежава ОКС „Бакалавър“ по „Биология“ (2014 г.) и ОКС „Магистър“ по „Генетика и Геномика“ (2016 г.) от Биологическия факултет на СУ „Св. Кл. Охридски“. В периода 2017-2019 г. е редовен докторант в Биологическия факултет на СУ „Св. Кл. Охридски“. Асистент е в Института за ядрени изследвания и ядрена енергетика (ИЯИЯЕ) – БАН. Автор е на 9 публикации, участва в работните колективи на 4 научноизследователски проекта, финансирани от Фонд „Научни изследвания“ (два) и Научен фонд „Изследвания“ към СУ „Св. Кл. Охридски“ (два), притежава сертификати за 4 успешно приключени курса в областта на биомедицината. Участва в младежките организационни комитети на работни срещи, проведени в ИЕМПАМ.

Познавам Катя Попова от 2013 година, когато се включи в ръководения от мен кръжок в секция „Патология“ на ИЕМПАМ-БАН, в продължение на 6 месеца е била на стаж при нас по програмата „Студентски практики“ на МОН, дипломната ѝ работа за придобиване на ОКС „Магистър“ е изготвена под мое ръководство.

Катя Попова е мислещ, изпълнен с любознателност и кипящ от енергия млад учен, с отлична подготовка в областта на биомедицината и широк кръг интереси в различни области, включително изучаване на екзотични чужди езици и култури. Прецизна и отговорна в работата си, винаги търсеца (и намираща!) оригинални решения на поставените задачи, водена от благородната амбиция във всеки един момент да даде най-доброто от себе си, винаги готова да помогне, със своите човешки и професионални качества и достойнства и със слънчевия си характер, Катя Попова е желан партньор във всеки научен екип, любим приятел и интересен събеседник.

7. Заключение

Представеният дисертационен труд е посветен на актуална и значима тема, заложените в него цели и задачи са изцяло постигнати, при това на високо научно ниво, а получените оригинални резултати са безспорен принос в областта на биоинформатиката, синтетичната биология, генетиката и геномиката, биохимията, микробиологията и експерименталната фармакология.

В хода на подготовката, докторантът Катя Попова е разширила и надградила своята биомедицинска култура, приложила е богата палитра от съвременни методи и техники, включително в областта на една от най-обещаващите и привлекателни, но и трудни области на човешкото познание – биоинформатиката, израснала е като способен и перспективен учен. Активно се е включила в подготовката и успешното изпълнение на амбициозен научноизследователски проект, който със своите замисъл и размах, иновативен заряд и професионално осъществяване е стъпка напред към по-добрата интеграция на българската наука в европейското и световно научно пространство. И най-важното: получените при изпълнението на дисертационния труд нови резултати допринасят за решаването на едно от най-парещите биомедицински и обществени предизвикателства на нашето време – антибиотичната устойчивост на бактериите. Положеният от докторанта и научния ръководител усилия при подготовката на дисертационния труд и полученият краен продукт заслужават висока оценка.

Всичко това ми дава основание да смятам, че представеният дисертационен 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 Катя Бисерова Попова образователната и научна степен „Доктор” в област на висше образование 4. Природни науки, математика и информатика; професионално направление 4.3 Биологически науки (Генетика - Биоинформатика).

31 март 2021 г.

.....
/Проф. Р. Александрова/