

РЕЦЕНЗИЯ

на дисертация за присъждане на образователната и научна степен „Доктор“

Автор на дисертационния труд: Катя Бисерова Попова

Тема: „Дизайн и приложения на функционални нуклеинови киселини за контрол на генна експресия и създаване на нови терапевтични агенти“

Рецензент: Доц. д-р Илияна Иванова, Биологически ф-т – СУ.

Представеният ми за рецензиране дисертационен труд съдържа 156 стр. текст, като са спазени стандартите за съотношението между отделните части (41 стрл литературен обзор, 2 стр. цел и задачи, 15 стр. материали и методи; 63 стр. резултати и обсъждане; 7 стр. дискусия, изводи 2 стр, приноси 1 стр) включващи 5 таблици, 50 фигури, приложения и списък на литература с 189 заглавия – всички на латиница. Добро впечатление прави изготвения списък на съкращенията в началото, който би могъл да се добави в подробното съдържание.

Дисертационният труд е научно изследване в областта на генетиката, докторска програма „Биоинформатика“. Разработен е по професионалното направление 4.3. „Биологични науки (Генетика)“ като редовна докторантура към Биологическия факултет на Софийския университет „Св. Климент Охридски“.

1.Актуалност на темата: Антибиотичната устойчивост на патогените, причиняващи значими заболявания нараства непрекъснато в световен мащаб. Европейската мрежа за надзор на антимикробната резистентност (EARS-Net) събира данни от всички държави в Европейския съюз (ЕС) всяка година за осем патогена. Най-често съобщаваните бактериални видове са *E. coli* (44,2%), следвани от *S. aureus* (20,6%), *K. pneumoniae* (11,3%). През 2019 г. повече от половината от изолатите на *E. coli*, докладвани на EARS-Net, и повече от една трета от изолатите на *K. pneumoniae* са били устойчиви към поне една антимикробна група под наблюдение, а комбинираната резистентност към няколко антимикробни групи е била честа. MRSA остава важен патоген в ЕС и света, като нивата все още са високи в няколко държави и често е срещана комбинирана резистентност към друга антимикробна група. Един от всеки трима души в САЩ носи *S. aureus* върху кожата си. През 2008 г. около 86% на всички инвазивни инфекции с MRSA в САЩ са свързани със здравеопазването. Данните ясно показват, че

социалната тежест на инфекциите, причинени от някои резистентни бактерии, понастоящем вече е сравнима със сумарните щети от социално значими заболявания като туберкулоза, грип и СПИН (Cassini 2018). От друга страна смъртността, асоциирана с АМР само в ЕС възлиза на 33 000 случая годишно, а загубите се измерват в милиарди. Разработването на нови средства и подходи за ограничаване и борба с тези инфекции е обект на работата на научни екипи по цял свят и е залегнало в Глобалния план на СЗО за действие срещу АМР.

Дизайнът на нови съединения с антибактериална активност е един от най-важните въпроси на съвременната биология, биотехнология и медицина. Въпреки широкия спектър от антимикробни агенти, проблемите с лекарствената устойчивост и страничните ефекти остават нерешени досега. Обещаваща стратегия за преодоляване на тези проблеми може да бъде синтезирането на ниско-молекулни антимикробни съединения, атакуващи основни бактериални биомолекули и бактериални нуклеинови киселини. Създаването на олигонуклеотиди, които специфично взаимодействат с бактериални РНК, блокират техните функции и по този начин инхибират бактериалния растеж е от особена важност. Едно от основните предимства на този подход е специфичното потискане на бактериалните клетки, осигурено от огромните разлики между еукариотни и бактериални ензими. Олигонуклеотидните инхибитори, насочени към прокариотни биомолекули, не трябва да причиняват никакви нецелеве ефекти върху еукариотните клетки. Възможността за потискане на бактериалния растеж чрез разрушаване на иРНК, пептидни нуклеинови киселини (PNA) и олигонуклеотидни инхибитори, насочени към определени ензими, е най-модерната тенденция при търсенето на антимикробни средства. Предвид посоченото считам, че работата е изключително актуална и предоставя нови и значими данни относно антимикробния ефект на антисенс-олигонуклеотидите и ефектите им върху еукариотни клетки.

Литературен обзор. Обзорът е представен на 41 страници и е логично структуриран в отделните части. Извършен е щателен преглед на научните постижения в областта в съчетание с използването на стегнат научен стил. Приложените 6 фигури две таблици са информативни и допринасят за изясняване на някои аспекти от текста. Проследено е използването на съвременните генетични методи и подходи за изследването на антибиотичната резистентност на микроорганизмите. В края на обзора са посочени направленията и модерните подходи, представляващи интерес, което логично насочва към целта на работата.

Цел и задачи. Целта и седемте задачи са добре формулирани на две страници, отразявайки основните аспекти и същността на дисертационния труд.

Материалите и методите (15 стр) са детайлно и коректно описани, допълнени с 3 фигури и таблица, от които личи високото ниво на компетентност на кандидатката. Много добро впечатление прави умелото боравене със значителен набор от традиционни микробиологични, цитологични, модерни биоинформационни и статистически методи, които докторантката е усвоила. Всички стандартни микробиологични и цитотоксични техники са детайлно представени. Използвани са седем бази данни и 5 биоинформационни програми, с които са анализирани и подбрани най-подходящите секвенции за анти-сенс олигонуклеотидите, избрани за атака на бактериалните клетки.

Резултати и дискусия. Разделянето на резултатите и дискусията в два раздела считам за правилно решение, предвид по-доброто проследяване на логиката на резултатите и новаторския характер на работата. Резултатите са описани на 63 страници, като за тяхното илюстриране са използвани 41 фигури и 2 таблици.

Резултатите започат с изследването на glmS-рибопревключвател, отговорен за кодирането на важен ензим за бактериите – глюкозамин-6-фосфат- синтаза, участващ в изграждането на предшественици на основните полимери в клетъчната стена при бактериите и регулация на гликолизата. Не е изненадващо, че мишенната последователност, избрана от докторантката, се среща при 26 патогенни бактерии. Нейните търсения продължават с други важни гени – gmK, отговорен за ензима гуанилаткиназа и присъстващ в над 100 патогена и nagA –кодиращ ензима Азот-ацетил-глюкозамин-6-фосфодацетилаза. Този ензим принадлежи към суперсемејството на амидохидролазите, действащи върху амидни връзки и по-голямата част от представителите му са металоензими. Семейството ензими е важно за метаболизма на аминокиселините и нуклеотидите, както и за биоразграждането на селскостопански и промишлени ксенобиотици. NagA участва в метаболизма на аминокиселини, по-специално в биосинтеза на аминокиселини-нуклеотиди и също се среща в над 100 патогенни бактерии. Приятно впечатление прави проверката на токсичността на синтезираните олигонуклеотиди върху други бактерии – *E coli* и *Bacillus subtilis* с цел установяване на специфичността на въздействие. Резултатите показват висока специфичност на новосинтезирания олигонуклеотид срещу *S.aureus*.

Проверката за цитотоксичност на новосинтезираните АСО 5 и 6 върху нормални и туморни клетъчни линии показват, че дори и при 95% съвпадение на тези секвенции с транскрипционни варианти в клетките могат да окажат инхибиращ ефект върху тяхната преживяемост. Това означава, че при търсене на антисенс-олигонуклеотидни секвенции в бъдеще задължително трябва да се проверява и тяхната цитотоксичност към различни клетъчни линии.

В тази връзка интересен резултат е получен при АСО-7, който оказва цитотоксичен ефект на туморна клетъчна линия и няма ефект върху нормална клетъчна линия. Би било полезно задълбочаване на изследванията в тази насока с цел проверка на други клетъчни линии и евентуално разработване на ново противораково лекарство.

Към докторантката имам следните въпроси:

1. Има ли други средства освен проникващият в клетките белтък РVЕС за пренасяне на антисенс олигонуклеотиди?
2. Какви пътища за прием на създадените антисенс нуклеотиди като лекарства предлатаге?
3. Има ли полезни бактерии с гени, сходни с мишените, които използвате?

Съответствие на придобитата компетентност с изискванията на образователната и научна степен „доктор”.

Знания:

Докторантката е усвоила нови знания в конкретна научна област: изучаване на структурата, свойствата и ефекта на антисенс-олигонуклеотиди във връзка с тяхната антимикробна активност; механизми на техния ефект и техните мишени в прокариотни и еукариотни клетки.

Умения:

Докторантката е придобила умения за прилагане на разнообразен методичен подход за разрешаване на конкретни изследователски задачи. Тя е усвоила микробиологични, цитологични, биоинформационни и молекулярно-генетични методи. В допълнение на специализираните техники докторантката е придобила умения за анализ, интерпретация и оценка на експериментални данни. Тези

умения са принос към съществуващите практики в професионалното направление.

Самостоятелност и отговорност:

Докторантката демонстрира самостоятелност при разработването на новаторски идеи и научни анализи в работен контекст; независимост и поемане на отговорност при разрешаване на научни проблеми, успешно адаптиране към работна среда и усвояване на нови знания.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Въз основа на посочените по-горе аргументи изразявам подкрепа на актуалността на проблемите, обект на дисертационната работа. По отношение на структура, специфични задачи за разрешаване на поставения научен проблем, методични подходи, експериментални решения, реализирани резултати и тяхната интерпретация, изразявам мнение, че дисертацията на докторант **Катя Бисерова Попова**, е напълно завършен авторски труд, който изцяло отговаря на критериите обем, съдържание и творчество.

Във връзка с това, препоръчвам почитаемото Научно Жури, назначено със Заповед № РД 38-59 / 01.02.2021 г., да присъди на **Катя Бисерова Попова**, образователната и научна степен „доктор”.

27.03.2021 г.

София

рецензент:

(доц. д-р Илияна Иванова)