РЕЦЕНЗИЯ

от проф. д-р Петя Койчева Христова

Софийски Университет, Биологически факултет

Тема на дисертационния труд: „Създаване на нови антибактериални агенти, базирани на антисенс олигонуклеотиди, с използване на различни молекулни механизми на действие “ за присъждане на образователна и научна степен „Доктор“ в Професионално направление 4.3. Биологически науки (Генетика - Синтетична биология).

Автор на дисертационния труд: Антония Велчева Георгиева

Научен ръкаводител: проф. д-р Роберт Димитров Пенчовски

Със заповед на Ректора на СУ № РД 38-467/25.07.2025 г. съм определена за Член на научното жури за провеждане на процедура по защита на дисертационен труд на Антония Велчева Георгиева. Представените документи и материали отговарят на минималните изисквания на Закона за развитие на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ) и Правилника за неговото прилагане.

1. Кратки данни за докторанта

Антония Велчева Георгиева завършва през 2020 год. ОКС „Магистър“ в МП “Растителни биотехнологии“ към специалност Биотехнологии при Биологически факултет, на СУ „Св. Климент Охридски“. От юли 2021 е зачислена като редовен докторант по професионално направление 4.3. Биологически науки, докторска програма „Генетика“ - Синтетична биология към катедра „Генетика“ в Софийски университет „Св. Климент Охридски“. Отчислена е с право на защита поради изтекъл срок на докторантурата през юли 2024 год.

2. Актуалност и значимост на дисертационната тема

Антимикробната резистентност е обобщено понятие, което описва устойчивостта на патогенните микроорганизми към антимикробни медикаменти. Всеки един основен клас микроорганизми може да развие такава устойчивост.

Важността на антибиотичната резистентност се изразява във факта, че все по-често се срещат инфекции, чиито причинители са резистентни към различните класове антимикробни препарати. Зачестяват случаите на смъртност от инфекции, които досега са били лекувани с успех. Проблемът е глобален и се счита, че сме на прага на постантибиотичната ера - понятие, което се използва за означаване на плашещата възможност един ден да няма с какво инфекциите да бъдат лекувани и всяко такова състояние да се превърне в животозастрашаващо. Само през 2019 година в световен мащаб 5 милиона смъртни случая се свързват с антибиотична резистентност, като 1,27 милиона от тях са пряко причинени от нея. Нещо повече, в близките 10-15 години не се очаква въвеждане на нови ефективни антибиотици. Затова антибиотичната резистентност представлява огромно предизвикателство пред човечеството, засягащо пряко здравето на човека, животните, растенията и околната среда. В случай, че развитието и разпространението на антибиотичната резистентност не бъде ограничено, активността на антибиотиците ще бъде загубена за бъдещите поколения.

Затова считам, че избраната тема за създаване на нови антибактериални агенти, базирани на антисенс олигонуклеотиди, е актуална и с голямо практическо значение.

Съдържанието на дисертационния труд напълно покрива обявената номенклатурна специалност по професионално направление 4.3 Биологични науки, научна специалност "Генетика – Синтетична биология" за присъждане на ОНС "Доктор".

3. Оценка на структурата на дисертационния труд

Дисертационният труд е написан на 129 стандартни страници – формат А4, резултатите са обобщени и представени в 4 таблици и 31 фигури. Структуриран е по класическата схема и е балансиран по отношение на обема на всеки раздел: Увод (3 стр.), Литературен обзор (42 стр.), Цел и задачи (1 стр.), Материали и методи (12 стр.), Резултати и обсъждане (50 стр.), Изводи (1 стр.), Приноси (1 стр.) и Литература (12 стр.). В написването на дисертацията са използвани цитати от 140 научни публикации. Много добро впечатление правят приложените списъци на използваните съкращения, фигури и таблици.

Дисертацията е написана в добър научен стил, с използване на съответната терминология което показва, че докторантката познава задълбочено тематиката. Необходимо е да се отбележи, че представената литературна справка предлага един сериозен анализ на състоянието на проблема. Докторантката се е запознала много добре с литературните данни и умело ги използва при интерпретиране на резултатите.

3.1. Литературен обзор

Литературният обзор е структуриран с пряко отношение към целта на дисертацията и поставените задачи. В първата си част, обзорът на дисертационния труд представя механизмите за възникване на антибиотичната резистентност и прави общ преглед на антисенс технологията и на историята и развитието на антисенс олигонуклеотидите. Във втората част са разгледани молекулярната структура на антисенс олигонуклеотидите, тяхната класификация според химичните модификации, механизмите на тяхното действие и клетъчен транспорт. Отделено е специално внимание на рибопревключвателите относно техния потенциал като мишени за разработване на антибактериални терапии прилагани срещу човешки патогенни бактерии. В третата част са представени предизвикателствата при разработването и въвеждането на антисенс олигонуклеотидите като нов клас терапевтични средства. Представен е техния потенциал като селективни агенти за персонализирана медицина, в лечение на генетични, онкологични и нервно-дегенеративни заболявания. Трябва да отбележа, че в „Литературния обзор“ има неточности в номерирането на отделните глави. Съдържанието също е представено непълно.

3.2.Цел и задачи

Целта на настоящата дисертация е да се да се проектират нови антисенс олигонуклеотиди (АСО) с потенциал за антибактериално приложение, върху чиято нуклеотидна последователност да бъдат въведени седем химически и структурни модификации. Заложено е да бъде направена оценка на ефективността на тези модификации върху инхибиторния ефект на антисенс нуклеотидите, както върху експресията на целеви ген, така и върху растежа и развитието на *Staphylococcus aureus.* Считам обаче, че целта може да бъде формулирана по-ясно и разбираемо.

За постигането на определените цели докторантката си поставя 5 основни задачи, които включват: конструиране на репортерна система за контролиране на генната експресия в *Escherichia coli*, включваща репортера LacZ*;* проектиране на антисенс

олигонуклеотид за ефективно инхибиране на генната експресия при *E. coli*; химическа и структурна модификация на проектираните антисенс олигонуклеотиди (АСО); анализ на инхибиращия ефект на химически модифицираните АСО върху целеви ген; проектиране и тестване на АСО като средство за инхибиране на бактериалния растеж на *S. aureus*.

3.3. Материали и методи

Това е една важна част от дисертационния труд, която показва нивото на проведените научни изследвания. Представени са съвременни молекулни, биоинформатични и микробиологични методи, чието разработване и успешно прилагане е вече един безспорен успех и показва сериозната методична подготовка на докторанта. Представени са широк набор от биоинформатични програми (BLASTn, Rfam, RevComOligo, ENA, RNAfold, Mfold, PyMol, Notepad++, OriginLab) за дизайн на АСО и обработка на данните. Проектираният АСО е със секвенция 5′- AGCACTCTTTTCCTCTCC-3′ и дължена 18 нб. Мултидисциплинарният характер на изследването е позволило на докторантката да придобие нови методически и практически умения. Като забележка бих искала да отбележа неправилната формулировка на някои от анализите.

3.4. Резултати, обсъждане и изводи

Основните резултати са представени съгласно поставените задачи и избраните методични подходи. Всички резултати са анализирани и съпоставени с литературните данни в самостоятелен раздел.

Изследването съвсем логично започва с дизайн на антисенс олигонуклетиди, като върху проектираната секвенция са приложени седем типа модификации - химични и структурни промени. За да се определи количествено ефективността на инхибиране от антисенс олигонуклеотидите е разработена успешно lacZ репортерна система. Затова първоначално докторантката конструира плазмид за контрол на генната експресия при *E. coli*, съдържащ LacZ репортена система. Нивото на експресия на LacZ гена, определено посредством бета-галактозидазен анализ, дава информация за степента на инхибиране от АСО. Проведените анализа показват, че проектираният АСО успешно хибридизира с целевата РНК-ова последователност. Тези резултати потвърждават прецизността на приложените биоинформатични и софтуерни програми. Анализите на инхибиторния ефект от приложените седем типа химични модификации показват значими разлики в стабилността и афинитета на АСО към целевата иРНК в зависимост от типа и позицията на

модификацията. Докторантката установява, че модификациите оказват съществено влияние върху свойствата на антисенс олигонуклеотидите (АСО), които включва ефект върху хибридизационната способност на дуплекса АСО:РНК, ефективността на РНКаза Н, устойчивостта на АСО към нуклеази, както и подобряване на клетъчния транспорт на АСО. Сравнителният анализ между седемте АСО (АСО1-АСО7) прилагани в концентрация от 120 μg/ml показва следните резултати: Фосфоротиотно модифицираният АСО1 показва 92% инхибиращ ефект на експресията на LacZ гена, което го определя като един от най-ефективните агенти. 2-О-метил модифицираният АСО2 проявява по-слаб ефект и максималните нива на генна експресия са около 60%. Третият вариант - АСО3 демонстрира слабо изразен ефект близък до резултата отчетен при АСО2, тъй като експресията на LacZ гена е 63%. Оказва се, че нивата на взаимодействие между иРНК и АСО4 са много ниски, поради което експресията на LacZ гена е 77%. С най-нисък терапевтичен потенциал се явява АСО5, като резултатът показва, че този тип модификация не променя нивата на експресия на репортерния ген. Гаптамерът АСО6, при който рибозата е заменена с тиоморфолинов пръстен, показва най-силен ефект. При наличието на АСО6 в пробите се отчита едва 3% от експресията на експресията на LacZ. Последният модифициран антисенс олигонуклеотид - АСО7 проявява слаб ефект на инхибиране и експресията на LacZ е 42%. Проучването на влиянието на различните химични модификации показва, че най-положителни резултати се получават при използване на тиоморфолинова модификация (ТМО). Затова в следващата част на дисертационния труд е проектиран нов АСО, върху който е приложена ТМО модификация. Новият АСО8 е проектиран така, че да хибридизира с аптамерната последователност на ФМН рибопревключвателя на *S. aureus* subsp. *aureus* Rosenbach (ATCC 25923). Чрез въвеждането на тази химична модификация се предполага, че са подбрени фармакокинетичните свойства на антибактериалния агент. Комплементарното свързването на АСО с целевата РНК води до образуване на двуверижен хибрид, който активира РНКаза Н1 с последваща деградация на иРНК. Липсата на ФМН в клетката нарушава множество процеси, които рефлектират върху метаболизма и се нарушава клетъчното делене. Създаденият нов АСО8 е с подобрена биологична активност и показва силно инхибиране на растежа на патогенната бактерия *S. aureus.*

На база на получените резултати са формулирани 5 извода, които като цяло отразяват съществената част от изследванията. Считам, че извод 5 може да се преформулира за да се подчертае ролята на подбора на химичните модификации.

4. Приноси с научен и приложен характер

В извършените изследвания могат да се очертаят както фундаментални, така и приложни приноси, които доказват значимостта на научната разработка.

Приемам формулираните от докторантката приноси на дисертационния труд. От съществено практическо значение е факта, че това е първото задълбочено изследване на инхибиране на целеви ген от антисенс олигонуклеотиди с една и съща секвенция, но с различни химически модификации. Установена е модификацията, което показва най-висока ефективност. Това постижение формира и фундаментален принос за универсална приложимост на метода за ефективно инхибиране на различни видове РНК-и. Смятам обаче, че приносите имат нужда от редакция за по-ясно формулиране и подчертаване на тяхната значимост.

5. Участие на докторанта в изработването на дисертацията

Считам, че изпълнението на дисертационния труд е изцяло дело на докторанта.

6. Публикации във връзка с дисертационния труд

Докторантката е представила списък с две научни публикации (с Q1 и Q2, общ IF $_{2024}$ = 8), свързани с дисертацията. Двете статии имат 11 цитата, което е доказателство за научната стойност на дисертационния труд.

7. Автореферат

Авторефератът е изготвен, съобразно изискванията и отразява резултатите от дисертацията като в съкратен вид са представени най-важните елементи от всички раздели (без литературния обзор).

8. Препоръки, забележки и въпроси

В дисертационния труд няма съществени грешки относно използваните подходи и представяне на резултатите, поради което нямам препоръки или забележки. Мога да отбележа редица технически грешки, които не намаляват стойността на работата.

9. Придобита компетентност и съответствие с изискванията на образователната и научна степен „Доктор”

В хода на изпълнението на експерименталната работа и оформянето на

дисертационния труд Антония Георгиева е придобила компетенции и умения, които могат да бъдат групирани по следния начин:

- разширила е теоретичната си компетентност в специфична област като синтетичната биология;

- придобила е умения за работа с научна литература, анализирайки и обобщавайки научна информация;

- обогатила е методичните си умения, особено в частта на прилагането на съвременни биоинформатични методи

- придобила е умения самостоятелно да оформя и дискутира резултатите, получени в хода на разработването на дисертацията, както и да прави изводи на базата на тях.

10. Заключение

Представеният дисертационен труд е едно завършено изследване, което предоставя ценна научна информация и разкрива възможности за практическо приложение. Много добрата теоретична подготовка е дала възможност на докторантката да подбере и съчетае набор от методи, които осигуряват изпълнение на поставените задачи и постигане на целта.

Въз основа на посочените аргументи оценявам положително предложения за рецензия дисертационен труд, който удолетворява изискванията на ЗРАСРБ, Правилника за неговото приложение и Правилника на СУ и предлагам на Научното жури да присъди на Антония Велчева Георгиева образователната степен „Доктор“.

15.10.2025 Рецензент:

проф.д-р Петя Христова