РЕЦЕНЗИЯ

от **акад. проф. Иван Георгиев Иванов, дбн**

на дисертационния труд на **Антония Велчева Георгиева *„Създаване на нови антибактериални агенти, базирани на антисенс олигонуклеотиди, с използване на различни молекулни механизми на действие”***, представен за присъждане на образователната и научна степен **„Доктор”** в Област на висше образование 4. „Природни науки, математика и информатика”, Професионално направление 4.3. Биологически науки, Докторска програма: **„Генетика- Синтетична биология“**

1. Обща част

Антония Велчева Георгиева разработва докторската си дисертация в катедра „Генетика“ на Биологическия факултет при СУ „Св. Кл. Охридски“ по докторантска програма „Генетика- Синтетична биология” под научното ръководство на проф. дн Роберт Пенчовски. Дисертационният труд съдържа 129 стандартни страници, 30 фигури, 4 таблици и 140 цитирани литературни източници. Прегледът на документите показва, че процедурата по зачисляване, обучение и отчисляване на докторанта е спазена и документацията е изготвена съгласно изискванията на ЗРАСРБ и Правилника за неговото приложение.

2. Кратки биографични данни

Антония Георгиева е възпитаник на Аграрния университет - Пловдив, откъдето през 2017 г. придобива бакалавърска степен по „Растителни биотехнологии“. През 2019 г. получава втора бакалавърска степен по „Обща и приложна биология“ от Нов български университет, а през 2020 г. - магистърска степен по „Растителни биотехнологии“ от БФ на СУ „Св. Кл. Охридски“. През 2021-2024 г. е докторант в БФ. А. Георгиева е автор на 2 научни публикации свързани с докторската ѝ дисертация, с общ IF 8. Участвала е в разработването на 5 научно-изследователски проекта финансирани от ФНИ и други източници.

3. Актуалност на разработваната тема

Рецензираният дисертационен труд е посветен на изучаването на изключително важен за съвременната биология и медицина проблем – търсенето на нови подходи и лекарствени средства за борба с резистентните към антибиотици патогенни бактерии. Такава алтернатива разкриват синтетичните антисенс олигонуклеотиди (АСО) като инхибитори на генната експресия и супресори на бактериалния растеж. Имайки предвид голямата социална значимост на този проблем, актуалността на разработваната тема не подлежи на дискусия.

4. Познаване на проблема

Съдейки по качеството на литературния обзор, докторантката е отлично запозната с литературата по разработваната тема. Обзорът обхваща 35 страници и е посветен на приложението на АСО за лечение и контрол на широк диапазон от заболявания, като тежестта пада върху молекулните механизми на действието им след хибридизация с информационни и регулаторни РНК молекули. Критичният преглед на литературата е дал възможност на докторантката да намери своята изследователска ниша и да формулира целите и задачите на дисертационния си труд. Проучването на литературата, както и опита от предходни изследвания на групата по Структурна биология на проф. Р. Пенчовски недвусмислено показват, че синтетичните олигонуклеотиди са перспективни антибактериални агенти и могат да бъдат алтернатива на антибиотиците при лечението на инфекционни болести причинени от бактерии с вродена или придобита антибиотична резистентност. Слабото място на АСО терапията обаче е краткия полуживот и структурната нестабилност на олигонуклеотидите в бактериалната клетка. Тяхната ефективност може да се подобри чрез химическа модификация, но в литературата липсват системни изследвания в тази посока.

Ето защо А. Георгиева си поставя за цел да изследва в детайли влиянието на различни химични модификатори върху инхибиращото сействие на АСО проектирани да потиснат генната експресия на референтния (*lac Z*) ген. Той се наложи като златен стандарт в молекулярно-биологичните и молекулярно-генетичните изследвания, тъй като експресията му може лесно да се измервана количествено с биохимични тестове. Оригиналното в поставената цел е, че докторантката избира една сравнително проста, но много чиста експериментална система, а именно, един конкретен антисенс олигонуклеотид проектиран да хибридизира с точно определено (регулаторно) място на *lacZ* иРНК, който подлага на разнообразни химични модификации. Това и безупречен модел за структурно-функционални изследвания, тъй като позволява директно сравняване на експерименталните резултати.

5. Методика на изследването

Методите използвани при разработката на дисертацията на А. Георгиева могат да се разделят на две групи - *биоинформатични* и *експериментални*. Първите включват различни програмни пакети за геномни изследвания и скрининг на общодостъпни ДНК и РНК бази данни като NCBI, ENA, Rfam и др., а също специализирани програми за дизайн на АСО, структурен анализ, оценка на комплементарността и енергетичните характеристики на олигонуклеотидите. Експерименталните методи включват изолиране и рестриктазно смилане на плазмидна ДНК, провеждане на PCR, бактериална трансформация с рекомбенантни плазмиди, бета-галактозидазен тест и др. Методите са описани подробно под формата на лабораторни протоколи, което позволява експериментите да бъдат възпроизведени без необходимост от допълнителна методична литература. С овладяването на тези методи, може да се каже, че докторантката е постигнала една от целите на докторантското си обучение, а именно придобиване на експериментални знания и умения за самостоятелна изследователска работа в областта на молекулярна генетика, структурната биология и биоинформатиката.

6. Оценка на получените резултати

Резултатите са представени на 40 страници и следват логиката и последователността на проведените научни изследвания, а именно: Конструиране на рекомбинантен плазмид съдържащ *lacZ* гена за контрол на генната експресия в *E. coli;* проектиране на антисенс олигонуклеотид инхибиращ експресията на конкретен (*lacZ*) ген при *E. coli*; химична и структурна модификация на АСО с цел подобряване на неговата ефективност; оценка на инхибиторния ефект на модифицираните АСО върху целевия ген; проектиране и тестване на антисенс олигонуклеотиди специфични за инхииране на генната експресия и бактериалния растеж на *Staphylococcus aureus*.

Като базов олигонуклеотид за инхибиране на генната експресия на *lacZ* гена докторантката избира октадекануклеотида 5'-AGCACTCTTTTCCTCTCC-3', комплементарен на 18-нуклеотидна последователност разположена непосредствено след SD мястото в *lacZ* иРНК. Той е подложен на следните химически модификации: фосфоротиоатна; 2'-О-метилиране; добавяне на АССА мотив (с цел да се активира РНКаза Р); хаптамер с 2'-О-метилиране (с цел активиране на РНКаза Н); ТМО-модификация (за повишаване на термодинамичната стабилност на хибридите с целевата РНК); LNA модификация (заключени по рибозния пръстен нуклеинови киселини). В някои случай химическите модификации са комбинирани със сруктурни промени (еднонуклеотидни делеции) в нуклеотидната последователност на АСО.

Сравнителните изследвания върху заглушаването/потискането на генната експресия на референтния *lacZ* ген в *E. coli* под влияние на синтетични антисенс олигонуклеотиди показва недвусмислено, че тяхната активност зависи съществено от типа на химическа модификация, която влияе на тяхната пенетрантност, токсичност и устойчиваст в бактериалната клетка. Така фосфориотиоатна модификация води до изключително висока устой-

чивост и стабилност на олигонуклеотида и до 92% инхибиране на експресията на целевата иРНК. Друг АСО, обозначен в дисертацията като АСО4, е проектиран да активира РНКаза Р, която разпознава и срязва прекурсори на тРНК с 3′-ССА край. Затова докторантката добавя именно такъв мотив към 3′ края на АСО4 с цел да повиши неговата ефективност чрез специфичното въздействие от страна на РНКаза Р. Въпреки, че очакванията й не се оправдават, това я мотивира да добави друг 3'-краен мотив (АССА) за стабилизиране на хибридизацията с целевата РНК. Един от най-успешните конструкти в експериментите на Георгиева е 18-нуклеотидният АСО, модифициран с тиоморфолин (ТМО). При него са отчетени нива на инхибиране достигащи до 97%.

Въз основа на резултатите от експериментите с *E. coli*, А. Георгиева проектира и изследва инхибиращата активност и на тиоморфолин (ТМО) модифициран АСО, предназначен да потиска растежа на патогенен щам на *Staphylococcus aureus*. Той е проектиран за хибридизация с аптамерната последователност на ФМН рибопревключвателя 3'-AAGAGGGUAGGUCUGA-5', който пък контролира активността на гените от флавиновия биохимичен път. С него е постигнато 88% инхибиране на бактериалния растеж при концентрация от 0.120 mg/ml.

Резултатите от проведените изследвания убедително показват, че химичните модификации на АСО са от решаващо значение за тяхната инхибираща способност върху генната експресия и в крайна сметка върху очаквания терапевтичен потенциал. Така резултатите от дисертацията имат директен принос в проправянето на пътя на АСО като алтернатива на антибиотиците при лечението на трудолечимите инфекциозни болести.

За да се утвърдят АСО като фармацевтични средства са необходими още много фундаментални изследвания и в тази връзка прави добро впечатление един от последните раздели на дисертацията на А. Георгиева озаглавен *„Предложения за бъдещи дългосрочни изследвания“*. Пожелавам й успех в това благородно начинание.

7. Публикации свързани с дисертацията и справка за съответствие с минималните национални изисквания за ОНС „Доктор“

Резултатите от изследванията на Антония Георгиева са публикувани в 2 научни статии в реферирани научни списания с общ IF 8, от които 1 в списание с Q1, а другата в Q2, които й носят по Погазател Г 45 точки. Заедно с 50-те точки от Показател А, докторантката превишава формалните минимални изисквания на ЗРАСРБ за ОНС „Доктор“.

8. Автореферат, изводи приноси

Авторефератът на дисертацията отразява адекватно нейното съдържание, а направените изводи и приноси съответстват на получените експериментални резултати.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Дисертационният труд на редовният докторант Антония Георгиева е посветен на важен и актуален за бактериалната генетика и инфектология проблем – антибиотичната резистентност при бактериите и търсене на нови подходи за борбата с резистентните патогенни бактерии. Прилагайки съвременни биоинформатични методи тя успява да проектира и създаде оригинални антисенс олигонуклеотиди за in vivo инхибиране на генната експресия на референтния *lacZ* ген, които подлага на химични модификации с цел да подобри тяхната пенетрантност, стабилност и ефективност. В резултат на изследването на връзката структура-функция, та селектира АСО които инхибират генната експресия и потискат до 90% растежа както на *E. coli*, така и на *S. aureus*. Във връзка с дисертационния труд са публикувани 2 статии в реферирани списания с общ ИФ 8, с което докторантът удовлетворява формалните минимални изисквания на ЗРАСРБ за придобиване на ОНС „Доктор“ в Професионално направление 4.3. Биологически науки, Докторска програма:

„Генетика-Синтетична биология“ и аз убедено препоръчам на уважаемото научно жури да й я присъди.

18.08.2025 г.

Рецензент:

/Акад. Иван Г. Иванов/