

## РЕЦЕНЗИЯ

**на дисертационния труд на редовния докторант Мартина Трайковска на тема “Инженерство на функционални нуклеинови киселини и приложението им в областите на молекулярната генетика и синтетичната биология“ за присъждане на образователна и научна степен “ДОКТОР” в област на висше образование: „Природни науки, математика и информатика”, Професионално направление: „Биологични науки”, шифър 4.3, Научна специалност: „Генетика” и научен ръководител доц. д-р Роберт Пенчовски, Катедра по генетика към Биологически факултет при СУ 'Св. Климент Охридски'.**

**от чл.-кор. проф. д-р Иван Гергов Митов, дмн, Ръководител Катедра по медицинска микробиология при Медицински факултет, МУ-София**

Наред с ваксините, антибиотиците и химиотерапевтиците са основните лекарствени средства в профилактиката и лечението на инфекциозните заболявания. За разлика въведените в практиката ваксини, които запазват своята ефективност, в относително кратък срок пред медицината възникна сериозният проблем на лекарствената резистентност на инфекциозните причинители. Класически е примерът за развитието на резистентност към първия открит и използван в лечението на стафилококовите инфекции антибиотик – пеницилина. Смъртността в случаите на стафилококов сепсис в преантибиотичната ера е била над 80%. С приложението на пеницилина в началото на 1940-те години смъртността намалява драматично. За съжаление още през 1942 г. се откриват първите пеницилин-резистентни стафилококи. В нобеловата си реч през 1945 г. откривателят на пеницилина Александър Fleming предсказва възможността за бързата появата на антибиотико-резистентни бактерии към всеки нов антибиотик и опасността от свободната продажба на тези медикаменти. Към 1948 г., в болниците с масивно приложение на пеницилина,  $\beta$ -лактамаза продуциращите стафилококи достигат 65-85%. В същия темп се развива резистентността на бактериите към повечето от навлизащите в практиката антибиотици – първоначално в болниците и впоследствие разпространявани в обществото.

Високата пластичност на микроорганизмите за приспособяването им към неблагоприятните условия на околната среда чрез мутации и рекомбинации и селекция на резистентните щамове чрез прекомерно широката, неконтролирана и нерационална употреба на антибиотиците доведе до тревожните изводи на СЗО за загуба ефективността на този клас лекарства в недалечно бъдеще. Ежедневие е в диагностичната практика да изолираме множество резистентни щамове, причинители на вътреболнични инфекции, включително към повечето налични антибактериални препарати. Проблемът се усложнява и от липсата на нови антибиотици, получени по класически път от природни биопродуценти или лабораторно синтезирани химиотерапевтици. В последните 15 години в практиката не е въведен нито един нов препарат. Всичко това обуславя високата актуалност на дисертационния труд – създаването и изследване на антибактериалната активност на антисенс олигонуклеотиди (АСО), блокиращи важни общи регулаторни механизми при широк кръг медицински важни бактерии. Работата в това ново стратегическо направление е с важно практическо значение в лечението на инфекциите.

Трудът е написан на 133 страници. Заглавието отразява точно същността на работата. Изложението е съразмерно разпределено в общоприетите раздели за списване на дисертационен труд. Онагледен е с 37 много добре изработени фигури и 7 таблици. Литературна справка за това ново научно направление е изчерпателна и включва 146 източника.

**Обзорът на литературата** отразява обстойно съвременното състояние на проблема антибиотична резистентност и постиженията в опитите за създаване на нови антибактериални средства на базата на последните достижения на генетиката и молекулярната биология. Подробно са разгледани механизмите на лекарствената резистентност на бактериите и необходимостта от разработване на нови стратегии за получаване на ефективни антибактериални средства. Представена е структурата и функцията на рибопревключвателите като

участъци от иРНК, регулиращи експресията на гени, респ. клетъчния метаболизъм. Надлежно са изброени известните 58 патогенни и опортюнистични бактерии, при които са открити рибопревключватели. Представени са изследванията върху бактериални рибопревключватели като мишени на антисенс олигонуклеотидите блокиране на важни метаболитни процеси и функции (напр. вирулентност) на бактериите и от тук е изведена идеята и основната **цел на труда** – АСО да бъдат използвани за създаване на нови антибактериални средства, което е .

Представеният в обзора технологичен напредък в областта на геномиката, структурна модификация и системите на доставка естествено води към прецизно формулираните **задачи** - чрез биоинформатичен анализ да бъдат открити общи за бактериите рибопревключватели, да се синтезират специфични към тях антисенс олигонуклеотиди и да се изпита антибактериалната им ефективност.

В изследванията са използвани множество генни бази данни (Rfam 12.0; NCBI data base; Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes ExPASy и Bioinformatic Resource Portal) и програми (Blast, Cluster W/Cluster X; Vienna RNAfold web server). Посочени са протоколите за изолиране и пречистване на бактериална ДНК и РНК, на PCR и агарозна гел електрофореза и методите на пептидна конюгация и тиол-модифициране на антисенс олигонуклеотиди. Ефективността на получените АСО е изпитана *in vitro* чрез инхибиция на растежа на три опортюнистични причинители на инфекции в човека - *Staphylococcus aureus*, *Lysteria monocytogenes* и *Escherichia colli* и един непатогенен сапрофит - *Bacillus subtilis*. Липсата на токсичност на АСО е доказана върху преживяемостта на клетъчна линия A549 от белодробен карцином.

Извършена е значителна по обем *in silico* и лабораторна експериментална работа, в резултат на което са постигнати значителни **резултати и приноси**.

- За първи път са използвани рибопревключвателите като мишени за свързване с АСОи с цел потискане на бактериалния растеж. В резултат на извършен пълен биоинформатичен анализ са подбрани два широко разпространени рибопревключватели – флавин мононуклеотид (**ФМН**) рибопревключвател, доказан в над 3000 бактерия, 30 от които важни за човека и S-аденозилметионин (**САМ-1**) известен при някои Грам-положителни човешки причинители.
- На базата на определени от докторанта консервативни последователности в аптамерните домени на рибопревключвателите са проектирани антисенс олигонуклеотидни последователности АСО-1 и АСО-2 за ФМН и АСО-3 за САМ-1. Получените АСО са модифицирани химически с ковалентно свързан рVЕС протеин , който подпомага пенетрацията на комплекса в бактериалната клетка. Получените АСОи не са токсични в МИК за потискане 80% на бактериалния растеж.
- Доказано е, че АСО-1 и АСО-3 се свързват специфично с комплементарните участъци на съответните рибопревключватели и инхибират растежа на *Staphylococcus aureus*, *Lysteria monocytogenes* и *Escherichia coli*.

Получените резултати дават основание експериментите в това ново направление да продължат и са основателна надежда за създаване на нови антимикробни лекарства.

Приемам направените 11 извода, които съответстват напълно на получените резултати.

Съществена част от труда на Мартина Трайковска са публикувани в две статии в международни списания, едната с висок импакт фактор 4,762. Резултати са представени и на международна научна конференция

**Заключение.** Дисертационният труд на Мартина Трайковска представлява задълбочено иновативно изследване за създаване на нов клас

антибактериални средства с цел разширяване възможностите за борба с лекарствената резистентност в терапията на инфекциите. Доказана е оригиналната идея за използване на обци за бактериални причинители на инфекции рибопревключватели като мишена на АСОи с инхибиращо бактериалния растеж действие. Резултатите от изследванията са публикувани в престижни списания, едното с висок импакт фактор, с което изпълнява изискванията за защита на дисертационен труд. Всичко това ми дава основание да препоръчам на научното жури да гласува положително за присъждане научно-образователната степен “Доктор” по научната специалност „Генетика” на Мартина Трайковска.

РЕЦЕНЗЕНТ:

(Чл.-кор. проф. д-р И. Митов, дмн)

27.09.2017 г.