

СТАНОВИЩЕ

ОТ

проф. д-р Роберт Димитров Пенчовски от катедра Генетика, Биологически факултет, Софийски Университет „Свети Климент Охридски“

Относно дисертационен труд със заглавие “ДИЗАЙН НА ХИМЕРНИ АНТИСЕНС ОЛИГОНУКЛЕОТИДИ И НАЧАЛНА ОЦЕНКА НА ТЯХНОТО ИЗПОЛЗВАНЕ ЗА ТЕРАПЕВТИЧНИ ЦЕЛИ” с автор Катерини Валсаматзи-Панайоту за присъждане на образователна и научна степен “ДОКТОР” в областта на „Природни науки, математика и информатика”, професионално направление: „Биологични науки”, шифър 4.3, Научна специалност: „Генетика - Биоинформатика” с научен ръководител проф. д-р Роберт Димитров Пенчовски.

Като научен ръководител на *Катерини Валсаматзи-Панайоту* мога да уверя, че нейната дисертация е структурирана съгласно Закона за развитие на академичния състав в Република България. Представеният дисертационен труд съдържа 128 страници, 30 фигури, 4 таблици, като са цитирани 169 литературни източника. Дисертацията съдържа следните части: състав на научното жури, благодарности и научни проекти, списък на публикациите на които се основава, въведение, литературен обзор, цели и задачи, материали и методи, резултати, обсъждане, изводи, научни приноси, използвани съкращения; списък на таблиците, списък на фигурите, и библиография. Има и автобиография на докторанта.

Дисертацията е добре организирана и написана, което улеснява нейното четене, разбиране и оценяване. Литературния обзор обхваща всички теми свързани с целите и задачите на дисертацията. Всички фигури са оригинални и прегледно направени с висока резолюция. Целите и задачите, изводите и научните приноси са ясно и убедително формулирани. Резултатите са представени с необходимия доказателствен материал.

Основната цел на дисертацията на *Катерини Валсаматзи-Панайоту* е създаването на нови антибактериални агенти базирани на антисенс олигонуклеотиди, които специфично да се свързват с три различни РНКи и да

инхибират растежа на определени *S. aureus in vitro*. По-конкретно целта на е бъде извършен дизайн на три химерни антисенс олигонуклеотида, които специфично да се свързват с предварително избрани три мишени от генома на човешки патогенни бактерии и един химерен антисенс олигонуклеотид, който няма специфична цел от бактериалните геноми, и да се направи последваща оценка на тяхното използване за терапевтични цели. РНК мишините в *S. aureus* са части от Рибонуклеаза П (Ribonuclease P, RNase P) – *rnpB* и *rnpA*, и последователности от иРНК за β -субединицата на полимераза (RNA polymerase).

Актуалност, значимост и оригиналност на темата на дисертацията:

Проблемът с възникването и разпространението на нови щамове бактериални патогенни, които притежават резистентност към съществуващи антибиотици е едно от най-големите предизвикателства при съвременното лечение на инфекциозни заболявания предизвикани от бактериални. Това е признато от Световната здравна организация като едно от най-голените предизвикателства в съвременната медицина водещо до смъртта на все повече хора в световен мащаб. Това потиква все повече изследователи и фармацевтични компании да разработват нови антибактериални средства за преодоляване на множествената антибактериална резистентност. За съжаление, нови антибиотици не се създават достатъчно бързо за да осигурят ефективно лечение срещу новите бактериални щамове, развили устойчивост към съществуващите антибиотици. Необходимо е да се развиват и използват нови стратегии за бързо създаване на антибактериални агенти, чрез които да се води успешна борба с резистентните патогенни бактерии.

В този контекст тема на дисертацията е много актуална, както от чисто научна гледна точка така и от научно-приложно естество. Създаването на синтетични антисенс олигонуклеотиди (АСОи), насочени срещу специфични мРНКи с жизнено-важни регулаторни функции в бактериите, има голям потенциал за използването им като нови антибактериални агенти. Тук за първи път е доказано инхибирането на бактериален растеж в резултат на действието на АСОи, които изпулват като мишени бактериални Рибонуклеаза П или мРНК, кодираща РНК **полимераза**. Поради това, тези дисертация заслужава да се възприеме като иноваторска и напълно оригинална в своята същност.

Използваните методи в дисертацията на *Екатерини Валсаматзи-Панайоту* са не само разнообразни но и интердисциплинарни. Те напълно съответстват на поставените цели и задачи и включват: 1) биоинформатични анализи на консервативни секвенции Рибонуклеаза П (Ribonuclease P, RNase P) – *gprB* и *gprA* и на мРНК на ензима РНК полимераза; 2) биоинформатични анализи на вторични структури на тези РНКи; 3) Дизайн на АСОи хибридиращи с тези таргетни РНК; 4) Измерване кинетиката на растеж на бактерии в присъствието и в отсъствието на АСОи;

Резултати: Извършен е пълен биоинформатичен анализ на генома на приоритетния според СЗО човешки бактериален патоген *Staphylococcus aureus subsp. aureus* ATCC 25923, от който след това са избрани три участъка - *gprB*, *gprA* и *groB*, отговорни за синтеза на важни метаболити като Рибонуклеаза Р и β -субединицата на РНК полимераза. Всеки един от тези участъци е с дължина от 15 до 22 нуклеотида и неговата последователност за първи път бива предлагана като потенциална мишена за прицелване с терапевтичен агент – антисенс олигонуклеотид. Нито една от трите нуклеотидни последователности не се открива в генома на човека.

2. Направен е дизайн на четири антисенс олигонуклеотида – АСО 1, АСО 2, АСО 3 и АСО 4. Първите три от тях са проектирани да се насочват към избраните последователности в *gprB*, *gprA* и *groB*, а четвъртият има уникална целева последователност, която не се открива в генома на нито един от организмите от база данни NCBI. На четирите антисенс олигонуклеотида са приложени модификации, в следствие на които те придобиват аптамерна структура и стават по-устойчиви на ензимно разграждане, с по-висок афинитет към субстрата и предизвикват РНаза Н-индуцирана хидролиза.

3. Резултатите, които специфично насочените АСО1, АСО2 и АСО3 проявяват, са обещаващи за възможно приложение като терапевтични агенти срещу човешкия бактериален патоген *Staphylococcus aureus*. След четирикратно повторени експерименти, се потвърждава бактерицидният им ефект, като се наблюдава инхибиране в растежа на бактериите в концентрации от 2100 nM до 4500 nM. стана ясно, че АСО1 проявява максимален инхибиращ ефект при високи концентрации – 4500 nM. АСО2 и АСО3 показват бактерициден ефект при концентрация 3000 nM. Мишените на АСО1, АСО2 и АСО3 не се откриват в

генома на човек, което означава, че биха могли да се прилагат *in vivo*.

4. Потвърден беше и независимият ефект на всеки един антисенс олигонуклеотид, след като се проведе самостоятелен анализ на клетъчно проникващия пептид - рVEC във висока концентрация от 4500 nM в бактериални клетки от *Staphylococcus aureus subsp. aureus* ATCC 25923. Той не проявява инхибиращ ефект върху растежа на бактериите. Това потвърждава, че бактериалният растеж е потиснат в предходните експерименти, благодарение на функциите на антисенс олигонуклеотидната терапия и по-конкретно на прецизно избраната мишена за всеки отделен АСО, правилния му дизайн, за да бъде той комплементарен и направените модификации на структурата му.

Обсъждането е направено адекватно на получените резултати и в съответствие с литературните данни от използваната библиография. Изводите и научните приноси съответстват пълно на получените резултати.

Публикации: Трудът е базиран на 2 глави от книги и 1 научна публикация с участието на докторанта с общ импакт фактор IF:0.16 и с общ Scimago Journal and Country Rank (SJR) – общо 42 точки.

1. Aikaterini Valsamatzi-Panagiotou, Katya B. Popova, and Robert Penchovsky “Drug discovery for targeting drug-resistant bacteria” (2020), Panwar H., Sharma C., Lichtfouse E. (eds) Sustainable Agriculture Reviews 46. Sustainable Agriculture Reviews, vol 46. Springer, (pp.205-228), Cham. ISBN 978-3-030-53024-2, https://doi.org/10.1007/978-3-030-53024-2_9

2. Aikaterini Valsamatzi-Panagiotou, Martina Traykovska, Robert Penchovsky - “Mechanisms of antibacterial drug resistance and approaches to overcome it” (2020), Prashant Kesharwani, Sidharth Chopra, Arunava Dasgupta, Drug Discovery Targeting Drug-Resistant Bacteria, Elsevier, (pp.9–37)., ISBN 9780128184806, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818480-6.00002-3>

3. Robert Penchovsky and Aikaterini Valsamatzi - Engineering antisense oligonucleotides as antibacterial agents – 2019, Arch Clin Microbiol, 1989-8436, Q4 – 12 т. (Medicine), IF – 0,16

<https://www.scimagojr.com/journalsearch.php?q=21100225606&tip=sid>

В заключение като се вземе предвид значимостта, актуалността и иновативността на темата на дисертационния труд, използваните съвременни методи, получените резултати с важен научен и научно-приложен принос за използване на АСОи като антибактериални агенти, аз определям дисертационният труд като успешно разработен и научно обоснован, отговарящ на всички изисквания на Закона за развитие на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ) и специфичните изисквания на Софийски Университет „Св. Климент Охридски“.

Във връзка с гореизложеното, аз оценявам високо постигнатите иновативни резултати в дисертацията на Катерини Валсаматзи-Панайоту и препоръчам напълно убедено на членовете на уважаемото Научно жури да присъди на Катерини Валсаматзи-Панайоту образователна и научна степен “ДОКТОР” в областта на „Природни науки, математика и информатика”, професионално направление: „Биологически науки”, Шифър 4.3, Научна специалност: „Генетика – биоинформатика”.

28.03.2021 **Изготвил становището:**/подпис/
гр. София *проф. д-р Роберт Димитров Пенчовски*
 катедра Генетика, Биологически факултет,
 Софийски Университет „Св. Климент Охридски“