

До Председателя на Научното жури

Назначена със заповед на Директора

на ИМ към БАН

### РЕЦЕНЗИЯ

върху дисертационен труд, представен за защита за получаване на научната и образователна степен “ДОКТОР”

Автор на дисертационния труд: асистент Стефан Енгибаров, докторант на самостоятелна подготовка

Тема на дисертационния труд: „Получаване и характеристика на нова неураминидаза от *Aeromonas caviae* 40/02”

Рецензент: проф. дмн Тодор Кантарджиев

Нямам общи публикации и нямам конфликт на интереси от друг характер по смисъла на ал.1, т.3 и 5 от ДР на ЗРАСРБ с докторанта

Асистент Стефан Енгибаров е зачислен в свободна докторантura през 2014-та година с тема на дисертацията „Биохимични изследвания върху неураминидаза от щам *Aeromonas* sp. 40/02“ и научен ръководител проф. дбн Игнат Абрашев. В процеса на разработката е обсъдено продължение от една година, одобрен е нов научен ръководител – доц. Радослав Абрашев и с решение на Научния съвет на ИМикБ е променено заглавието в необходимите за това срокове.

Представената ми за рецензия дисертация (92 печатни страници) е оформена в отделни глави, като основният ѝ обем се съдържа в Литературен обзор, Материали и методи и Резултати и обсъждане. Илюстрациите включват 12 таблици и 23 фигури. В списъкът на цитираната литература са отбелязани 219 публикации, които обхващат както по-класически литературни данни, така и съвременни изследвания по темата на дисертацията.

Темата на дисертацията е посветена на характеризирането на ензим неураминидаза от щам-продуцент на вида *Aeromonas caviae*.

Неураминидазите, наричани още сиалидази са група ензими, които са важни участници в механизма на вирулентността. Това се осъществява чрез действието на ензима върху гликозидни връзки в крайни остатъци на сиаловата киселина в гликоконюгати, които се срещат на повърхностите на клетките при хора, животни, растения и микроорганизми. Въз основа на гликозидното разцепване на сиаловата киселина са идентифицирани екзо и ендо- $\alpha$ -неураминидази. Днес е известно, че тези ензими се срещат като антигени върху повърхностите на определени вируси от семействата Orthomyxoviridae и Paramyxoviridae, както и върху повърхностите на някои инфекциозни бактерии и други микроорганизми. Гените, кодиращи неураминидазите на грипните вируси, са силно податливи на генетични мутации, които модифицират епитопите на антигена. Появата на нов неураминидазен епитоп позволява на грипния вирус да избегне имунното разпознаване, поне докато не се генерират нови антитела срещу него, което може да доведе до причиняване на епидемии. Заедно с различни форми на хемаглутинин, неураминидазите се използват за разграничаване на подтипове от грипни вируси А (например, H1N1, H5N1).

Неураминидазите, които се срещат на повърхностите на бактерии и други микроорганизми, не са толкова добре характеризирани в сравнение с тези, открити при грипни вируси. Известно е обаче, че тези ензими допринасят за вирулентността на някои бактерии. Например, бактерията *Pseudomonas aeruginosa* продуцира невраминидаза, която улеснява образуването на биофилми в дихателните пътища.

Съществуването на неураминидазите в няколко функционални форми и приносът им към образуването на биофилми влияят и са част от механизмите и степента на оцеляване на патогенните бактерии. Установеното участие на неураминидазите в много болести насочва и повишава вниманието на учените и разширява научните изследвания на тези ензими като вирулентен фактор в бактериите.

В световен план в настоящо време се извършват значителен обем изследвания на неурамидази с различен произход и характеристики, както и се търсят инхибитори на неураминидазите.

В този смисъл, може да се каже, че разработваната в дисертацията тема е актуална и значима, както в научен аспект, така и като част от данните, допринасящи за развитието на биотехнологии с фармацевтична и медицинска насоченост.

Целта на разработката е получаване на нови за науката данни относно биохимичните особености на ензима неураминидаза при представители на род *Aeromonas*. Поставените за изпълнение задачи са конкретни и задават структурата на изследванията.

В Литературният обзор се дава изчерпателна информация за разпространението, характеристиките и патогенността на описани в литературата представители на род *Aeromonas*. Основен раздел на тази глава от дисертацията е фокусиран конкретно върху исторически преглед до наши дни на научните постижения при проучване на механизма на ензимния синтез, структура и действие на бактериалните неураминидази, основни субстрати, индуциращи тяхното действие, пълна характеристика на сиаловите киселини и важната роля на неураминидазите, сиалилтрансферазите и транссиалидазите в метаболизма им в бактериите. Последните раздели на литературния обзор демонстрират познаване в детайли на биологичната роля и приложение на микробните неураминидази в медицинската практика като диагностични и терапевтични препарати, но са посочени и трудностите и нерешените въпроси. Като цяло, Литературният обзор обосновава важното значение и актуалност на проучванията на бактериалните неураминидази.

Глава „Материали и методи“ съчетава по-стандартни химични, микробиологични и биохимични анализи с някои модерни научно изследователски методи. Усвояването на описаните методи за разработката на настоящата дисертация демонстрира широкият набор от умения за самостоятелна и квалифицирана изследователска дейност на докторанта.

В глава „Резултати и обсъждане“ са ясно описани и илюстрирани получените данни. Те са подробно сравнени с наличните в литературата съобщения в изследваното направление.

Изследвани за неураминидазна активност са 40 бактериални изолата, предоставени за разработката от НЦЗПБ. Селектиран за последващи изследвания е

избран изолатът *Aeromonas* sp. A40/02 с най-висока ензимна активност. Направени са изчерпателни морфологични, физиологични, биохимични и ензимологични изследвания, в резултат на които са установени оптimalните условия за култивиране – хранителна среда, киселинност, режим на аерация, растежни фази. В резултатите са представени данни за антибиотичната резидентност, неураминидазна, пиразинамидаизна протеолитична и алдолазна активности, локализация на ензимите неураминидаза и алдолаза. Установено е едновременното присъствие на извънклетъчна и вътреклетъчна неураминидазна активност, като активността на извънклетъчната е значително по-ниска. Политаксономичият анализ, включващ гореизброените характеристики и молекулярен метод на базата на сравнителен секвенционен анализ на 16S rДНК е определена таксономичната принадлежност на изследвания щам, който е обозначен като *Aeromonas caviae* 40/02.

Изолираният ензим неураминидаза е пречистен в четири етапа с краен добив 24% по оптимизирана в настоящото изследване схема, като е постигната 385 пъти по висока специфична ензимна активност.

В следващите етапи на разработката са установени специфичните характеристики на ензима, продуциран от изследвания щам. Предполагаемата димерна структура и молекулно тегло на ензима от щам *A. caviae* A40/02, установени чрез нативна и денатурираща (SDS) полиакриламидна електрофореза го нарежда в редицата на по-рядко срещаните „големи” олигомерни бактериални неураминидази.

Температурният оптимум на ензима ( $50^{\circ}\text{C}$ ) е по-висок от установените за широк кръг бактериални неураминидази. Интерсно е да се отбележи и широкият pH диапазон в който ензимът е активен, както и наличието на два изразени пика, което се среща рядко при вече проучени бактериални неураминидази. Авторът предполага, че това е свързано с възможността за хидролизирането както на  $\alpha$ 2-3, така и на  $\alpha$ 2-6 гликозидни връзки на сиаловите киселини.

Описано е различното инхибиращо ниво на различни тежки метали и химични съединения върху ензимната активност. Интересни са наблюденията за стимулиращия ефект на живака, инхибиращ практически повечето описани от други автори неураминидази и липсата на влияние на  $\text{Ca}^{2+}$  йони и ЕДТА. Подробни проучвания са проведени и за характеризиране на субстратната специфичност на ензима и е доказана способността му да хидролизира трите типа гликозидни връзки ( $\alpha$ 2-3,  $\alpha$ 2-6 и  $\alpha$ 2-8) в сиало-съдържащите съединения.

Тези и другите получени данни отразяват уникалността и спецификата на изследвания ензим и още веднъж потвърждават наличието на неуранидазни ензими с разнообразни свойства, което обосновава важността на подобни изследвания.

В резултат на проведените изследвания и получени резултати са формулираните 9 изводи и 6 приноси. И изводите и приносите отразяват обективно получените резултати.

На основата на получените резултати от настоящата дисертационна разработка са публикувани 4 статии и 1 глава от книга, от които 1 в *Annals of Microbiology* с IF - 1.232 и 1 в Доклади на БАН с IF -0.27, в които Енгибаров е първи автор. В научната литература са открити 3 цитата.

В четири от публикациите, докторантът е първи автор. Асистент Стефан Енгибаров е участвал в 5 национални научни форума, на които е изнесъл 4 доклада, един от които е публикуван в пълен текст. Наукометричните показатели за цялостната му научна дейност включва 15 публикации с общ IF - 7.515, 38 цитата и h-индекс – 3, 8 доклада и 5 постерни съобщения на научни форуми.

Докторантът е положил задължителните по правилника на БАН изпити и при необходим 250 т. той е съbral 430 точки по кредитната система за докторанти на БАН.

Въпрос: Как виждате бъдещото развитие на темата на това научно изследване в теоретичен и приложен аспекти?

## **Заключение**

Научният труд на Стефан Енгибаров е едно сериозно изследване в областта на интересна за науката и практиката област. Поставената цел е постигната. Трябва да се подчертва, че в дисертацията за първи път е доказан синтеза на неуранидаза от щам, принадлежащ към вид *Aeromonas caviae*. За първи път в представител на род *Aeromonas* е установено и наличието на ензима N-ацетилнеуранинат лиаза (алдолаза). Щамът е

напълно характеризиран като продуцент на неураминидаза и е разработена схема за максимален ензимен синтез. В процеса на изследването е разработена схема за ефективно пречистване на ензима до електрофоретично чист ензимен препарат. Изводите включват обобщение на данни с оригинален характер относно локализацията, регулацията на синтеза, молекулното тегло и димерната структура, както и физикохимична характеристика на ензима неураминидаза, продуциран от щам *A. caviae* A40/02.

Докторантът е изпълнил изискванията по ЗРАСРБ и конкретните условия в частта за придобиване на научната степен «Доктор» от Правилника за придобиване на академични степени и заемане на академични длъжности в Институт по микробиология на БАН. Считам, че качеството на представената за оценка дисертация ми дава пълно основание да препоръчам докторант Стефан Енгибаров да получи образователната и научна степен „Доктор“.

15.05.2019

Подпись:

(проф. Т. Кантарджиев)