

РЕЦЕНЗИЯ

на дисертационен труд, представен за защита по процедура за присъждане на образователна и научна степен “Доктор” по професионално направление 4.3. „Биологични науки“, Научна специалност 01.06.12 „Микробиология“

Тема: „Антимикробен потенциал на синтетични аналози на биологично активни вещества и комбинираното им действие с рамнолипид-биосърфактант“

Автор: докторант на самостоятелна подготовка **Ирина Вадим Лазаркевич**

Научен ръководител: доц. д-р Данка Гълъбова

Рецензент: доц. д-р Траяна Недева, Биологически факултет на СУ „Св. Климент Охридски“

Настоящата рецензия е изготвена в съответствие с нормативните документи – ЗРАС и ППЗРАС и Правилника за условията и реда за придобиване на научни степени и за заемане на академични длъжности в Института по Микробиология „Ст. Ангелов“ при БАН .

1. Съвременно състояние на научния проблем и актуалност на дисертационната тема

От откриването на пеницилина от Александър Fleming през 1929 г. до наши дни в клиничната практика се използват хиляди антибиотици. През последните тридесет години обаче, идентифицирането и прилагането на нови класове съединения с антибиотична активност се ограничават прогресивно от появата на антибиотична резистентност на патогените. Съвременните данни сочат, че при запазване на сегашните темпове на нарастване на резистентни на антибиотици патогени, през 2050 г. е възможно броят на жертвите от инфекции с резистентни микроорганизми да достигне 10 млн. човека годишно – повече, отколкото са ежегодните жертви на рака. Поради тези причини, резистентността към антибиотици е една от най-сериозните заплахи за общественото здраве. Понастоящем, успешните подходи за борба с антибиотичната резистентност включват разработването на стратегии, основани на постиженията на фармакологията и комбинаторната химия по отношение на скрининг на нови лекарства и синтеза на разнообразни химически библиотеки; рационален дизайн на лекарства, благодарение на познанията и техническите възможности за определяне на белтъчна структура и революционното приложение на информационните технологии за тази цел. На базата на тези фундаментални и технологични постижения, днес усилията на учените за борба с лекарствената резистентност са насочени както към откриването на нови синтетични съединения, така и към химическа модификация на съществуващи фармацевтични продукти.

Медицинските растения представляват важен източник на химиотерапевтични молекули, както и на модулатори на бактериалната резистентност по отношение на химичното разнообразие. Растителните вторични метаболити вече демонстрират своя потенциал като антибактериални средства, когато се използват самостоятелно или като синергисти, или добавени към други антибактериални агенти. Фитохимикалите често

действат чрез различни механизми, в сравнение с конвенционалните антибиотици и следователно могат да бъдат полезни при лечението на инфекции, причинени от резистентни бактерии. В някои случаи, комбинирането на установени антимикробни средства, разширява действието на редица антибиотици. Тези ефекти могат да се дължат на подобрена разтворимост, повишена бионаличност, както и взаимодействието на продуктите, които могат да модифицират или инхибират механизмите на бактериалната резистентност.

Арсеналът на комбинаторната химия, който осигурява получаването на сложни структури чрез ориентирана към разнообразието синтеза дава възможност за подбор на молекули – природни или синтетични, които притежават важни физикохимични характеристики като хидробилност, амфотерни свойства, химична стабилност, ниска молекулна маса – свойства, които гарантират тяхната приложимост като терапевтични средства.

В контекста на гореизложеното, представеният ми за рецензиране научен труд е посветен на актуална научна и научно-приложна тематика, свързана с оценка на антимикробния потенциал на синтетични тиосулфонилови и 1,4-нафтохинонови производни и подходи за неговото подобряване чрез добавяне на биосърфактанта рамнолипид.

2. Оценка на структурата, специфичните задачи и тяхното съответствие с поставения научен проблем

Дисертационният труд е с обем 133 стр., от които основен текст 109 стр. и списък на използваните литературните източници – 20 стр. (242 заглавия), други приложения – 4 стр., (в т.ч. списък с използваните съкращения и справка за публикационна дейност). Работата е структурирана по общоприетия за такъв вид труд схема, като включва част „Увод“ (2 стр.), „Литературен обзор“ (48 стр.); „Цел и задачи“ (1 стр.), „Материали и методи“ (7 стр.); „Резултати и обсъждане“ (49 стр.), „Изводи и приноси“ (2 стр.). Научните доказателства са представени с фигури (27 бр., в т.ч. 7 снимки) и таблици (3 бр.). Съотношението на текст към илюстративен материал е приблизително 1.5 : 1, което е разумно за една експериментална работа. Представени са 13 извода, 3 приноса, за обсъждане на резултатите са цитирани 57 автора, основно в последния, седми под-раздел на този раздел.

Приложеният към основния труд Автореферат с обем 58 стр. основен текст е изготвен съгласно изискванията и отразява правилно и пропорционално същността на дисертацията.

В работата е формулирана 1 цел и 10 специфични задачи, две от които с подзадачи. Задачите определят последователност от изследователски решения, чиято логика обаче би била по-ясна и по-лесно проследима, ако задачи 1, 2 и 4 бяха обединени в обща такава; задачи 3 и 5 – също; а задача 6 – предхождаща 3 + 5. Поставените задачи са достатъчни за постигане на целта на труда, независимо от факта, че резултати постигнати при разрешаването им са представени и интерпретирани в различна комбинация и последователност.

3. Оценка на съответствието на методичните подходи с поставените цели

За реализиране на научния труд е използван набор от методи, съобразени както с изискванията на експерименталните задачи, така и с интердисциплинарния подход

възприет за решаването им. Разделът „Материали и методи“ включва методи и техники, типични за микробиологията, биохимията и физико-химията. Това са микробиологични техники за култивиране на микроорганизми-тест култури и определяне на МИК, МБК и ФИК на изследваните субстанции; аналитични биохимични методи, методи за оценка на антимикробен ефект и цитотоксичност към еукариотни клетки, техники за изолиране и анализ на вътреклетъчни компоненти, микроскопски техники. Липсват данни за биохимичните анализи и софтуерния продукт, приложени за изучаване на глобалния метаболитен отговор на бактериалната клетка към антибиотичен стрес и създаването на топлинна карта.

Така приложеният методичен подход е подходящо подбран за разрешаване на научните задачи и за достоверност на формулираните изводи. Той позволява да се проследи последователно и в детайли хода на изследователския процес. Получените експериментални данни - доказателствен материал, са натрупан при сериозен обем работа.

4. Оценка на съответствието на теоретичната обосновка с експерименталните решения, резултати и приноси

Увод и Литературен обзор

Уводът предоставя най-обща информация за значението на проблема антибиотична резистентност, стратегиите за справяне с този проблем и по-конкретно търсене на синтетични производни на биологично активни вещества с растителен произход, които притежават антимикробен потенциал и подходи за неговото модулиране. Този раздел от дисертацията в синтезиран вид показва как разработването на дисертационния труд допринася за решаване на маркираните научни проблеми.

Литературният обзор е написан въз основа на над 240 заглавия на публикации от тематичния обхват на дисертацията. Те отразяват световните постижения и съвременни тенденции по научната проблематика – значителна част от цитираните публикации са излезли от печат след 2010 година. Тези данни показват, че докторантката е приложила принципа на изчерпателност и библиографска точност, а така също се е съобразила с изискванията за актуалност на използваната информация.

По отношение на структурата на обзора: съгласно съдържанието си е структуриран в 4 части, които адекватно покриват формулираните задачи и представените резултати. Разделът е вътрешно балансиран, не само структурно, но и по съдържание. Представена е коректно доста фактология, в повечето случаи обобщена в тенденции и заключения, която въвежда читателя в същината на научната проблематика на дисертацията. Обзорът е написан разбираемо; излагането на научните факти е направено на професионално издържан и академичен език. Като цяло този раздел от дисертацията е добра теоретична обосновка на експериментите, резултатите и приносите. Единствената забележка към него е големия му обем – на практика половината от дисертационния труд.

Експериментални решения, резултати, анализи и изводи

Получените резултати са представени и интерпретирани в логическа последователност. Така и ще бъдат коментирани в рецензията.

Подраздели 1 и 2: Изследване влиянието на синтетични аналози на биологично активни вещества и техните комплекси с рамнолипид-биосърфактант (RL) върху растежа и повърхностните клетъчни свойства на моделни щамове Грам (+) и Грам (-) бактерии; проучване на комбиниран ефект (стр. 58 – 76)

В тези подраздели са отразени коректно резултатите по оценка на антимикробния потенциал на два синтетични естера на тиосулфаниловата киселина и три 1,4 – нафтохинон- производни, самостоятелно и в комплекс с биосърфактанта RL. Извършена е сериозна експериментална работа, отразена в обобщения доказателствен материал. Подраздел 1 има доста констативен характер, без съществен коментар на твърде разнообразния ефект на тестваните 5 субстанции както по отношение на Грам статуса и видовата принадлежност на тест-микроорганизмите, така и по отношение на потенциращото действие на биосърфактанта. Споделям мнението, че едно обобщение на представените в първия подраздел резултати би улеснило читателя и би аргументирало избора на две сублетални концентрации на MTS и Lub 5 и на 3 от началните 4 тест бактерии за проверка на синергичен ефект на двата класа синтетични аналози при демонстриране на антимикробната им активност, описана в подраздел 2.

Подраздели 3 и 4. Оценка на чувствителността на тестваните щамове към антибиотици и проучване на цитотоксичния ефект (стр. 76 – 87)

Подраздел 3 играе ролята на своеобразна контрола за оценка на ефективността на антимикробното действие на изследваните синтетични аналози чрез сравнителен анализ с действието на търговски препарати антибиотици с различни механизми на инхибиране на бактериалния растеж и развитие.

Представените в Подраздел 4 резултати са особено важни, защото дават възможност да се предвиди практическо приложение на изследваните субстанции като терапевтици във висши еукариоти. Доказаната задоволителна степен на безвредност (основно при тиосулфониловите аналози), съчетана с добър антимикробен потенциал както на индивидуалните инхибитори, така и на комплексите инхибитор/биосърфактант е съществен научен и научно-приложен принос на труда с потенциал за прилагане в областта на биомедицината.

Подраздели 5 и 6: Изследване на промените в бактериалната клетъчна мембрана под действие на рамнолипид – биосърфактант и оценка на влиянието на синтетичните аналози и техния комплекс с RL върху клетъчната ултраструктура на моделни Грам (+) и Грам (-) бактерии (стр.90 - 96)

В подраздел 5 са представени доказателства за ефекта на рамнолипид-биосърфактант върху фосфолипидния и белтъчен състав на биологичните мембрани в моделна Грам положителна тест-култура. Изборът на този моделен вид допълва и обогатява известните в литературата данни за ефекта върху Грам отрицателни микроорганизми. Установените количествени промени във фосфолипидите и неповлияния белтъчен компонент се разглеждат като адаптивен механизъм към средата на гостоприемника, който увеличава резистентността на патогените към продуцираните от имунната система антимикробни пептиди.

В подраздел 6 са представени данни по отношение на ефекта на синтетичните аналози върху клетъчните ултраструктури и техните функции: пермеабилитет на клетъчната мембрана и промени в морфологията и клетъчната повърхност. Установените данни изясняват връзката между кумулативното действие на синтетичните аналози + биосърфактанта и интегритета на повърхностните клетъчни структури - изменения в клетъчната структура, водещи до трайно увреждане и бактерициден ефект.

Подраздел 7: Изучаване на глобалния метаболитен отговор на бактериалната клетка към антибиотичен стрес (стр.90 -109)

В последният подраздел на „Резултати и обсъждане“ е направен преглед на метаболитните профили на моделни Грам положителни и Грам отрицателни бактерии, култивирани в норма и при третиране с проучваните синтетични аналози. Тези метаболомни анализи показват, че изследваните аналози предизвикват значителни отклонения от нормалните нива на голяма част от продуктите на основни метаболитни пътища - цикъл на Кребс, биосинтеза на мастни киселини, метаболизъм на аминокиселини и азотни бази. Установените разнообразни тенденции за промени в концентрациите на ключови метаболити предполагат комплексен отговор на клетката срещу действието на антимикробния агент. В този подраздел е и най-задълбоченото интерпретиране на резултатите с извеждане на заключения, които заслужават обобщение в повече от единствения представен извод, който е твърде генерален.

Дисертационният труд завършва с 13 извода и 4 приноса. Изводите следват хронологията на представените и обсъдени експериментални резултати, но не и на поставените задачи. Те достоверно отразяват постиженията на докторантски труд. Повечето от изводите съдържат количествени данни и качествени оценки; така докторантката умело е елиминирала чисто констативния им характер. Някои от тях обаче (Извод 3, 13) , са твърде категорични.

Посочените 5 приноси са с научно-приложен характер. Те посочват новаторските елементи в дисертацията и съответстват на Професионално направление 4.3. Биологични науки.

5. Коментари от общ характер, допълнения и въпроси

В дисертационния труд се срещат епизодични пунктуационни грешки и стилови неточности, които определено са с технически, а не същностен характер.

Въпроси:

1. Защо при проучване на комбиниран ефект на синтетични тиосулфонил- и 1,4-нафтохинон- производни не използвате моделния щам *Alcaligenes faecalis*, независимо от факта, че тази бактерия показва най-ниски стойности за MIC към MTS ?
2. Коя комбинация от синтетичен аналог/аналози и биосърфактант (т.е. съединение/я и концентрации) бихте препоръчали като най-ефективна при Грам отрицателни бактерии?

6. Публикации във връзка с дисертационния труд

Публикационната дейност изцяло съответства на нормативните документи – ЗРАС, ППЗРАС и на препоръчителните критерии на Института по микробиология „Ст.

Ангелов“ при БАН. Подробности от публикационната дейност са отразени коректно в дисертационния труд и в автореферата. Кратката статистика в цифри показва 4 публикации в реферирани научни списания с общ IF = 2.339; 1 публикация в нереферирано списание; h индекс = 4; 5 участия в научни форуми (3 международни и 2 национални); 37 цитирания. В две от публикациите и в три от участията на научни форуми докторантката е на първо място, което определя нейният съществен дял в разработването на дисертационния труд.

7. Съответствие на придобитата компетентност с изискванията на образователната и научна степен „доктор”

Знания:

Докторантката е усвоила нови знания в конкретна научна област: антимикробен потенциал и механизъм на действие на синтетични аналози на растителни биологично активни вещества; подходи за потенциране на това действие.

Умения:

Докторантката е придобила умения за прилагане на разнообразен методичен подход за разрешаване на конкретни изследователски задачи. Тя е усвоила микробиологични, физико-химични, биохимични, микроскопски методи. В допълнение на специализираните техники докторантката е придобила умения за анализ, интерпретация и оценка на експериментални данни. Тези умения са принос към съществуващите практики в професионалното направление.

Самостоятелност и отговорност:

Докторантката демонстрира самостоятелност при разработването на новаторски идеи и научни изследвания в работен контекст; независимост и поемане на отговорност при разрешаване на научни проблеми, успешно вписване в работна среда и екип.

Нумерично представяне на придобитата компетентност - 494 кредита.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Въз основа на посочените по-горе аргументи изразявам подкрепа на актуалността на проблемите, обект на дисертационната работа. По отношение на структура, специфични задачи за разрешаване на поставения научен проблем, методични подходи, експериментални решения, реализирани резултати и тяхната интерпретация, изразявам мнение, че дисертацията на докторант **ИРИНА ВАДИМ ЛАЗАРКЕВИЧ** е напълно завършен авторски труд, който изцяло отговаря на критериите обем, съдържание и творчество.

Във връзка с това, препоръчвам почитаемото Научно Жури, назначено със Заповед № I-115 / 03.12.2019 г. на Директора на ИМикБ при БАН, да присъди на **ИРИНА ВАДИМ ЛАЗАРКЕВИЧ** образователната и научна степен „доктор”.

05.02.2020 г.

София

рецензент:

(доц. д-р Траяна Недева)