

## РЕЦЕНЗИЯ

За защита на дисертационен труд, представен по процедура за присъждане на научна и образователна степен “ДОКТОР”

Тема: **“Антимикробен потенциал на синтетични аналози на биологично активни вещества и комбинираното им действие с рамнолипид – биосърфактант”**

Автор: **Ирина Лазаркевич** - Отдел ”Обща микробиология” - Секция “Микробна биохимия” към Институт по микробиология “Стефан Ангелов”, БАН

Научен ръководител: доц. д-р Данка Гълъбова

Вътрешен рецензент: доц. д-р Златка Алексиева

Представената за рецензиране дисертационна разработка е посветена на тема, която обединява многовековните знания за лечение с природни продукти, съвременния стремеж за търсене на алтернативи на лечението с антибиотици и развитието на идеята, че изолираните природни вещества биха могли да послужат като първичен образец за синтез на ефективни и максимално безвредни и лечебни чисти химични субстанции.

Представеният проект за дисертационен труд е с общ обем от 137 страници, разпределени в 5 глави, обозначени според възприетата практика. Разработката е онагледена с 3 таблици и 36 фигури и завършва с формулирането на изводи и приноси. Списъкът на литературата обхваща 243 източника, от които само 50 са от предишния век, а 94 са издадени от 2010 г. до днес, което показва колко съвременни и актуални са изследванията по тематиката на дисертацията.

Основната част на литературният обзор е посветена на биологичната активност на тиосулфинати и производни органични сяросъдържащи съединения и 1,4 – нафтохинони. Направен е подробен преглед на тяхната антибактериална, антифунгална, антипаразитна и антивирусна активности, както и цитотоксичност. Описани са основните известни механизми на действие, чрез инхибиране на тиол-съдържащи ензими, въздействие върху редокс-потенциала на клетката, инхибиране на липидния и мастнокиселинния синтез, инхибиране на клетъчното делене. Конкретно внимание е отделено на синтетичните аналози, както и на потенциала за приложение на комплексни препарати с тиосулфинати и 1,4 – нафтохинони.

При разглеждане на първата група съединения, основно внимание е отделено на негативното въздействието на алицина върху микробни клетки. В раздела 3.1.5. Цитотоксичност е отделено внимание и на въздействието му върху животинските

клетки. Втората по обем и значимост тема в литературния обзор е посветена на ролята и класификацията на биосърфактантите и най-вече върху механизма на действие на рамнолипидите и прилагането им в комбинирани терапии.

Голяма част от данните изнесени в обзора са изключително интересни, третират актуални и съвременни разработки и са в голяма степен готови за обзорни публикации.

Целта е формулирана ясно - Оценка на антимикробната активност на тиосулфонати и 1,4- нафтохинон - производни, приложени самостоятелно и в комбинация с рамнолипид - биосърфактант, както и изследване на техните механизми на действие. Формулирани са 4 основни задачи, които съответстват и водят до изпълнение на поставената цел.

В глава „Материали и методи“ са описани изследваните в разработката моделни щамове микроорганизми, хранителните среди и стандартизирани условия на култивиране. Представени са названията и структурните формули на използваните химични съединения: тиосулфонил- производни (MTS, ETS); 1,4-нафтохинон-производни (Lub 4, Lub 5, Lub 6) и рамнолипид – биосърфактант (RL). Описани са процедурите за определяне на минимална инхибираща концентрация (MIC), максимална бактерицидна концентрация (MBC), фракционна инхибираща концентрация (FIC), оценка на антибиотичната чувствителност на изпитваните щамове и цитотоксичност на изследваните вещества. Описани са методи за изолиране и анализ на екстрацелуларен и мембранни протеини и липиди.

Логично са съчетани класически и най-съвременни методи за анализ, като сканираща електронна микроскопия (SEM), флуоресцентна конфокална микроскопия (CLSM), газова хроматография и мас-спектрометрия (GS/MS) за анализът на интрацелуларните метаболити.

От представената методическа част може да се направи основния извод, че докторант Ирина Лазаркевич е усвоила редица методични умения, които са я изградили като квалифициран специалист за провеждане на самостоятелна експериментална дейност в областта на съвременните микробиологични изследвания.

Резултатите и тяхното обсъждане са обединени в една глава от дисертацията. Експерименталното развитие на разработката започва с изпитване на антимикробният потенциал на двете групи инхибитори в широк концентрационен диапазон от 1  $\mu\text{g/ml}$  до 120  $\mu\text{g/ml}$ . Проведени са паралелни анализи на самостоятелното въздействие на препаратите и в комбинация с рамнолипид, прилаган в концентрация под СМС - 10

µg/ml. Като критерии са използвани съотношението между MIC и MBC и промяната на количеството екстрацелуларен белтък.

Установено е, че при експериментите с *Pseudomonas aeruginosa* 1390, *Bacillus subtilis* 168 и *Alcaligenes faecalis* 6132 присъствието на биосърфактанта рамнолипид усилва инхибиращия ефект на Метилтиосулфонат (MTS) и повишава неговия антимикробен потенциал. Количеството екстрацелуларен белтък се повишава с повишаването на концентрацията на инхибитора. Най-силно е изразена чувствителността на щам *Alcaligenes faecalis* 6132 към MTS. Силен ефект се наблюдава и при експериментите с *Bacillus subtilis* 168.

Различни са резултатите при щамове *Escherichia coli* W 1655 и *Escherichia coli* 25922. Установен е значителен антимикробен ефект на MTS и при двата щамове, но не се отчита влияние на присъствието на рамнолипида в този процес.

Отчетено е значително по-слабо антимикробно въздействие на друг синтетичен естер на тиосулфаниловата киселина - етилтиосулфонат (ETS) върху щамове *P. aeruginosa* 1390, *B. subtilis* 168, *E. coli* W 1655 и *E. coli* 25922. Бактерицидното действие на ETS се проявява при значително по-висока концентрация в сравнение с MTS. Присъствието на RL повишава инхибиращото действие при значително по-ниски концентрации на ETS и биосърфактантът провокира промени в повърхностните клетъчни структури при първите три щамове, но не и при щамове на *E. coli*. Отново най-силно бактерицидно въздействие на ETS се наблюдава при щам *A. faecalis* 6132.

Изследването на влиянието на 3 синтетични 1,4 – нафтохинон- производни (Lub 4, Lub 5 и Lub 6) показва, че оказвания антибактериален ефект, като цяло е по-слаб от описаният при тиосулфоновите съединения. Отново е отбелязано, че установеното антибактериално действие на инхибиторите в комбинация с рамнолипид е по-силно изразено.

Lub 4 проявява най-ниска антимикробна активност, като инхибиране на растежа се наблюдава само при *P. aeruginosa* 1390 и *B. subtilis* 168, докато *A. faecalis* 6132 и *E. coli* W 1655 не се повлияват от това вещество. Практически подобни резултати са отчетени и при изследване на въздействието на Lub 6, но се забелязва известно забавяне на растежа при прилагането на инхибитора в съчетание с рамнолипид при щам *A. faecalis* 6132.

Lub 5 оказва силен бактериостатичен ефект върху всички изследвани щамове, но при никой от тях не е установена бактерицидна концентрация на този инхибитор. Най-

ниска MIC и в този случай се наблюдава при щам *A. faecalis* 6132. Най-слабо е въздействието върху *E. coli* W 1655.

В разработката е приложена и достатъчно сложна схема за анализ на комбинираното действие на съединенията от двете групи инхибитори (MTS и Lub 5), показали най-добър ефект върху показаните по-добра устойчивост щамове – *P. aeruginosa* 1390, *B. subtilis* 168 и *E. coli* W 1655. При двата Грам (-) щамове се отчита значително инхибиране на растежа при съчетаването на по-високите концентрации на двата инхибитора и не е установена разлика между самостоятелното и едновременното прилагане на MTS и Lub 5 в по-ниските концентрации. При експериментите с *B. subtilis* 168 не се наблюдава синергичен ефект при никоя от приложените комбинации.

Едно от интересните проучвания в дисертацията е посветено на сравнението между MICs на изследваните тиосулфанил- и 1,4-нафтохинон производни (в отсъствие и присъствие на рамнолипид-биосърфактант) и MICs на някои конвенционални антибиотици при моделните щамове. Подбрани са 5 антибиотика с различен механизъм на действие – ципрофлоксацин, цефтазидим, тобрамицин, меропенем и колистин.

Най-ниска MIC или най-силен ефект е отчетен при прилагането на ципрофлоксацин при *B. subtilis* 168, *P. aeruginosa* 1390 и *E. coli* W 1655, а при щамове *A. faecalis* 6132 и *E. coli* 25922 неговият негативен ефект върху растежа е съизмерим с този на меропенем. Изследванията с цефтазидим показват резистентност на *P. aeruginosa* към този антибиотик. Най-слаб инхибиращ ефект е отчетен при колистина. Резултатите от проведените MIC Stripe – тест с щамове на *E. coli* демонстрират по-висока устойчивост на референтния щам в сравнение с клиничния изолат при 4 от приложените антибиотици и равен ефект на колистина.

Получените резултати потвърждават хипотезата, че установените MICs и MBCs на изследваните синтетични аналози при отделните щамове са значително по-високи в сравнение с MICs на приложените антибиотици. Интересно е да се отбележи, че регистрираната MIC<sub>ТОВ</sub> (8 µg/ml) по отношение на *B. subtilis* 168 е близка до установената при него MIC на Lub 5 (10 µg/ml) и по-висока от MIC на комбинацията Lub 5/RL (2 µg/ml).

Проучването на цитотоксичния ефект на използваните инхибитори без или в комбинация с рамнолипид, е проведено върху две клетъчни линии – нормална (Vero) и ракова (HEp-2). Доказано е, че използваният рамнолипид PS-17 в използваната концентрация (10 µg/ml) няма цитотоксично действие при двете клетъчни линии.

Установено е, че в концентрациите, в които MTS проявява бактерициден ефект (80 µg/ml), той не е цитотоксичен за нормални или ракови еукариотни клетки. Присъствието на рамнолипид увеличава процентът на преживелите клетки. Цитотоксичният ефект на ETS също не е значителен, но при концентрация от 80 µg/ml преживяемостта на Vero клетките рязко спада до 50%, докато туморната клетъчна линия запазва жизнеността си. Присъствието на рамнолипид не влияе върху преживяемостта на двете линии.

Според цитирани литературни данни, по-голямата уязвимост на микробните клетки към действието на алицин и негови производни се дължи на по-малкото количество глутатион в тях. В този контекст, получените резултати дават основание да се счита, че относително ниската цитотоксичност на изследваните синтетични тиосулфонилови естери, съчетана с добър антимикуробен потенциал разкриват перспектива за приложимост на двата тиосулфоната в областта на биомедицината, въпреки неустановената селективност спрямо туморната клетъчната линия.

Оригинални резултати са получени и при изследване на цитотоксичния ефект на синтетичните 1,4-нафтохинонови деривати. Например, самостоятелно приложен, Lub 4 в концентрации оказващи ефикасно антимикуробно действие е с значително ниво на токсичност. Приложението му обаче в комбинация с рамнолипид рязко снижава цитотоксичността му особено при Vero клетки. Lub 4 проявява добре изразена селективност спрямо туморната клетъчна линия, като в концентрация 40 µg/ml предизвиква ясен цитотоксичен ефект при туморните клетки (18%), докато процентът оцелели Vero клетки надвишава прага на безвредност (54%).

Lub 5 проявява силен цитотоксичен ефект в достатъчно ниски концентрации (30 µg/ml) върху Vero клетките. Неочакван е обаче резултатът, че комплексът 30 µg/ml Lub 5 с RL се оказва силно цитотоксичен при HEp2 линията.

Цитотоксичният ефект на 30 µg/ml Lub 6 е силно изразен върху Vero клетките, докато антимикуробната му активност се проявява при 70 µg/ml. При двойно увеличаване на концентрацията му се проявява силен ефект и върху туморните клетки. Комбинирането с RL не оказва смекчаващо действие върху цитотоксичността на Lub 6.

Съпоставянето на установените MICs с прага на цитотоксичност при изпитваните 1,4-нафтохинонови деривати налагат извода, че те са неприменими като антимикуробни агенти, но някои от тях могат да намерят потенциално приложение в противотуморни терапии, поради селективността си към туморната клетъчна линия.

Известно е, че биосърфактантите предизвикват промени в мембранната организация на бактериалната клетка, така че проучването на влиянието на рамнолипида върху повърхностните клетъчни структури е логично обосновано и съществено за настоящата разработка. Контролните проучвания за влияние на рамнолипида са проведени с щам *B. subtilis* 168. В отсъствие на рамнолипид в хранителната среда са установени четири фосфатсъдържащи фракции, идентифицирани на базата на техните хроматографски свойства. Анализът на липидните екстракти от клетки, култивирани в присъствие на биосърфактанта показва количествени, но не и качествени промени във фосфолипидите. Количественото определяне на получените фосфолипидни профили показва, че в присъствие на рамнолипид се увеличават отрицателно заредените фосфолипиди в липидния бислой на бактериалната мембрана, което е вид защитен механизъм, който увеличава устойчивостта на клетките към антимикробни пептиди и други антимикробни субстанции. Присъствието на RL (10 µg/ml) не оказва съществено влияние върху белтъчния компонент на клетъчната мембрана при *B. subtilis* 168.

На основата на установените ефекти на изучаваните вещества върху промените в състава на бактериалната мембрана са подбрани два щама *B. subtilis* 168 и *P. aeruginosa* 1390 и тиосулфовото съединение MTS за провеждане на анализи с флуоресцентна конфокална микроскопия (CLSM) и сканираща електронна микроскопия (SEM).

Най-големи нарушения в пропускливостта на мембраната (минимално количество неувредени клетки) на *P. aeruginosa* 1390 е установена при прилагане на комплекса MTS(50 µg/ml) /RL(10 µg/ml). При същите условия, флуоресцентните микроскопски изследвания разкриват, че клетките на *B. subtilis* 168 показват по-добра устойчивост, но при третиране с 50 µg/ml MTS/RL също се наблюдават значителни промени в мембранната им пропускливост.

Аналогични са резултатите от визуализирането чрез SEM на промените в морфологията и клетъчната повърхност и при двата щама. Влиянието на рамнолипида е видимо, но слабо, самостоятелното въздействие на MTS води до деформации и промени в адхезивните им свойства, а комбинираното въздействие на двата препарата причинява възникването на критични морфологични промени и разрушаване на бактериите.

Проведените експерименти със синтетични тиосулфонатни аналози подкрепят и допълват наличните в литературата данни относно въздействието на природните алицинови производни върху микробната клетъчна морфология.

Сравнението на резултатите, получени при микробиологичните и биохимичните изследвания и интегритета на повърхностните клетъчни структури доказват високата ефективност на RL за намаляване на дозата на антимикробните препарати.

В настоящата разработка са проведени и метаболомни изследвания, отразяващи отговора на клетката към стресовите промени, предизвикани от MTS, RL и MTS/RL. И в двата щама е установена промяна в ключови метаболити като аминокиселини, органични и мастни киселини, нуклеотиди. Графичната визуализация на метаболитните профили е отлично представена чрез Heat maps. Най-голямо отклонение от нормалните нива на метаболитите се регистрира при въздействие с комплекса MTS/RL.

Базови и от най-съществено значение са установените промени в нивата на органичните киселини и нарушенията в цикъла на Кребс.

При *Pseudomonas aeruginosa* 1390 силно са понижени концентрациите на редица органични киселини, като  $\beta$ -хидроксимаслена, глицеринова, 2-кето-глюконова, глицил-глутаминова,  $\alpha$ -хидрокси-глутарова, ябълчна, янтарна, фумарова, изолимонена, както и на уреата. С повишени нива са фосфорната киселина, уридина, 2-аминобутирата. При *Bacillus subtilis* 168 са понижени нивата на глицериновата и глицил-глутаминовата киселина, но относителните нива на някои от горе изброените органични киселини са повишени: янтарна,  $\alpha$ -хидрокси-глутарова, 2-кето-глюконова,  $\alpha$ -хидрокси-глутарова. Към тях се добавят млечна,  $\beta$ -хидрокси-изовалерова и D-рибонова киселина – $\gamma$ -лактон.

Метаболитните профили и на двата щама дават ясна индикация за сериозни промени в цикъла на Кребс при третираните клетки, като при въздействие с MTS/RL те са най-драстични. При *P. aeruginosa* 1390 се наблюдават многократно намалени нива на всички междинни продукти от цикъла, което пък води до нарушение в глутаматния метаболизъм и съответно до понижени нива на глутамат. При *B. subtilis* 168 нивата на сукцинат, изоцитрат и  $\alpha$ -кетоглутарат са чувствително повишени, което води до разко спадане на концентрациите на малат и фумарат и нарушения в глиоксалатния цикъл. И при двата щама, междинните метаболити от ЦТК с най-голямо отклонение в относителните концентрации са изоцитрат и сукцинат.

На базата на тези резултати се предполага, че ефектът на MTS като синтетичен алицинов дериват е аналогичен с механизма на инхибиращото действие на алицина върху редица тиол-съдържащи ензими, пряко свързани с цикъла на Кребс.

Поради взаимовръзката на синтезираните аминокиселини с междинни продукти на гликолизата или цикъла на Кребс, анализите върху аминокиселинния метаболизъм, при въздействие с MTS/RL, също показва съществени отклонения. Едни от най-

важните промени касаят намаляване на нивото на глутамат и аспарагиновата киселина, които играят изключителна роля при синтеза на много други ключови за клетките метаблити.

Изследванията и влиянието на MTS, RL и MTS/RL върху биосинтеза на нуклеотиди и мастни киселини при *P. aeruginosa* 1390 и *B. subtilis* 168 показват затормозен нуклеотиден биосинтез и понижаване на количествата на ненаситените и наситените мастни киселини с нисък фазов преход, което води до установените по-рано промени в повърхностните клетъчни структури и необратими промени в клетъчния метаболизъм и клетъчна смърт при комбинираното прилагане на MTS и RL. Разбалансирането е по-слабо при третиране с MTS и рамнолипид, но в присъствие на MTS/RL е значително. В допълнение е изследвано влиянието на MTS, RL и MTS/RL върху други ключови метаболити при *P. aeruginosa* 1390 и *B. subtilis* 168 - глицеринова киселина, с важно участие в процеса гликолиза и уреата, която има основна роля в поддържането на азотния баланс в клетката. Най-силно редуцираните нива на тези съединения се наблюдават при комбинираното прилагане на MTS и RL.

Формулираните са 14 изводи и 4 приноси, които отразяват обективно получените резултати.

На основата на получените резултати докторант Лазаркевич участва в публикуването на 5 статии, две от които в реферирани списания с ИФ, и в 2 от които е първи автор. Участвала е в 4 национални и 1 международни научни конференции.

Авторката се е съобразила напълно с отправените в рецензията за вътрешна защита забележки и препоръки.

### **Заключение**

Въз основа на направения преглед може да се направи заключението, че представеният проект на дисертацията има висока научната стойност и съответства на Закона за академичното развитие, както и на правилниците на БАН и Института по микробиология за неговото приложение. Ето защо убедено ще гласувам за присъждането на образователната и научна степен ДОКТОР на докторант Ирина Вадим Лазаркевич.

14.01.2020

Подпис:

(доц. д-р Златка Алексиева)