

СТАНОВИЩЕ

върху дисертация на тема:

„CHLAMYDOMONAS REINHARDTII КАТО МОДЕЛНА ИНДИКАТОРНА СИСТЕМА ЗА ГЕНОТОКСИЧНОСТ НА НИСКИ ДОЗИ КСЕНОБИОТИЦИ”

За придобиване на образователна и научна степен „Доктор”, научна специалност „Генетика” шифър 01.06.06.

Автор на дисертационния труд: МАРИЯ ДИМИТРОВА ТОДОРОВА

Член на научното жури: доц. д-р Елена Тодоровска, АгроБиоИнститут, ССА

В резултат на засилващата се негативна антропогенна дейност, в околната среда се отделят и натрупват множество несвойствени за живите организми вещества, известни като ксенобиотици. Голяма част от тях притежават генотоксични свойства, чието действие директно или индиректно води до различни видове повреди в наследствения материал (ДНК молекулата) и до поява на мутации, някои от които с летален изход. Ето защо, оценката на увреждащото действие на ксенобиотиците върху живите организми и прогнозирането на възможните негативни последици върху околната среда е, и продължава да бъде във фокуса на вниманието на науката генотоксикология, чиито основни задачи са **скрининг** - разкриване на генотоксичния/мутагенния потенциал на сублетални/субтоксични/ концентрации замърсители върху живите организми и **генетичен мониторинг** - оценка и прогноза на отдалечените генетични последици върху популациите. Поради все по-належащата необходимост от опазване на биоразнообразието, интегритета на наследствения материал и стабилността на растителните и животински популации в замърсените райони, проблемът разработване на растителни биоиндикаторни и биомаркерни тест-системи за ранна и бърза диагностика на степента на замърсяване на околната среда в резултат на антропогенната дейност и оценка на екологичния риск е изключително актуален както в национален, така и в световен мащаб. Той е в съзвучие и с едно от направленията на 7-ма рамкова програма на ЕС „Оценка на риска от химични вещества и алтернативни стратегии за тестване” (анекс 6.3.3.1), Директива 2010/63/ЕС за регулиране използването на животни за експериментални научни цели в ЕС и СЗО.

За оценка на генотоксичния и мутагенен ефект на генотоксините, понастоящем се използват около 25 растителни тест-системи, разработени при 10 вида растения, чиято ефективност не винаги отговаря на специфичните изисквания, поради огромния брой генотоксини със специфичен механизъм на действие, комплексния характер на

молекулярните механизми за превръщане на първично индуцираните повреди в ДНК в трайни наследствени изменения – мутации, биотрансформация на ксенобиотиците и др.

Това налага разработване на бърза, високо чувствителна, информативна и ефективна за растителните организми еукариотна клетъчна и субклетъчна система за установяване на генотоксичния и мутагенен потенциал на ниски дози ксенобиотици - индуктори на окислителен стрес.

В този контекст, проблемът засегнат в дисертационния труд на Мария Димитрова, касаещ разработване на надеждни и бързи био-тестове за целите на генотоксикологията на основата на зеленото водорасло *Chlamydomonas reinhardtii* е изключително актуален и важен за еко-генотоксикологията. Дисертационният труд е написан на 130 страници по модел, утвърден в ЕС за придобиване на научната степен PhD (Doctor of Philosophy) и включва 11 глави, от които глави I, II и III са Въведение, Цел и задачи и Схематично изложение на експерименталната работа, глави IV-IX – пълен текст на статиите, отразяващи публикуваните резултати, а глава X представлява раздел „Заклучение“, който по същество е кратко обобщение с дискуссионен елемент, написан интелигентно и професионално. Списъкът на цитираната литература включва 225 заглавия, от които 8 на кирилица.

В методично отношение, постановката на експерименталната работа е построена правилно. Използвани са 4 щама *Chlamydomonas reinhardtii* (137C - див тип, UVS-10 - дефектен по *rec*-репарация, CW15 - без клетъчна стена и UVS-14 - дефектен по *mismatch*-репарация) за разработване на бърза, информативна и ефективна еукариотна биоиндикаторна и биомаркерна система за установяване на генотоксичния и мутагенен потенциал на ниски дози ксенобиотици - индуктори на окислителен стрес (зеоцин и кадмий – CdCl₂). Изборът на *C. reinhardtii* за разработване на тест-системи за оценка на действието на ксенобиотици не е случайна. Той отговаря на изискванията на генотоксикологията за „добрите“ тест-системи (Weber et al., 2000), както и на съвременните изисквания на еко-токсикологията за бързи и евтини методи, с добра разрешителна способност и възможност за експониране на резултатите върху висши еукариоти. Използван е богат методичен арсенал, базиращ се на **микробиологични** (спот-тест, метод на микроколониите, тест на видимите мутации, метод на селективните среди); **молекулярни** (агарозна гел електрофореза в постоянно електрично поле (CFGE) за отчитане нивото на ДВР в ДНК); **биохимични** (вътреклетъчно съдържание на МДА, H₂O₂ и пигменти - хлорофил *a*, *b* и каротеноиди) и **статистически** методи (Т-тестът на Стюдънт; еднофакторен дисперсионен ANOVA

анализ с множествово сравнение по метода на Тюки и двуфакторен дисперсионен ANOVA анализ с последващи тестове по метода на Бонферони /GraphPad Prism 5 software/, подбрани правилно за интерпретиране на достоверността в разликите между генотиповете по изследваните критерии).

В резултат на проведените изследвания върху действието на радиомиметикът зеоцин и тежкия метал $CdCl_2$ върху преживяемостта на 4-те щама са получени оригинални, теоретични и приноси с приложен характер:

1. Установено, е че *rec-* и *mismatch-* репарацията са едни от основните механизми, отговорни за възстановяване на ДНК повредите, индуцирани от двата ксенобиотика чрез използване на комплекс от критерии (микробиологични, молекулярни и биохимични) при анализиранияте четири щама. В резултат, като най-подходящи за целите на генотоксикологията в лабораторни условия са предложени следните генотипове *C. reinhardtii*: 137C (див тип) в качеството на биоиндикатор за разкриване наличието на биоактивни субстанции в проби с неизвестно съдържание и UVS-10 (дефектен по *rec-*репарация) и UVS-14 (дефектен по *mismatch-*репарация) - за получаване на първоначална информация относно механизма на действие на биологично активните субстанции в изследваните проби;

2. На базата на *C. reinhardtii* (WT 137C) са разработени и предложени два сравнително евтини, надеждни и бързи био-тестове за целите на генотоксикологията:

- Био-тест за разкриване на генотоксичния и мутагенен потенциал на природни проби (почва, вода и въздух), замърсени с различни видове ксенобиотици - тежки метали (в нива по-ниски и/или малко над пределно допустимите концентрации), следи от пестициди, отпадни газове, микроскопични прахови частици и др. на основата на критериите: клетъчно преживяване, тест на "видимите" мутации и биохимични биомаркери за окислителен стрес - МДА, H_2O_2 и пигменти.

- Тест за анализ на биоактивността на мултифункционални биоминерални продукти (препарати от биотрансформиран патешки тор) за земеделието и екологията, включващ критериите: спот-тест, клетъчно преживяване и индукция на ДВР.

Разработените два теста са съответно, методичен принос към Директива 2010/63/ЕС и анекс 6.3.3.1 на 7РП на ЕС за научни изследвания, технологично развитие и демонстрационни дейности 2007-2013, и принос към екологичното земеделие. Резултатите по дисертационния труд са своевременна база за по-детайлни изследвания не само на механизмите на репарация, чрез идентифициране на асоциираните с репаративния потенциал мутации, но и на механизмите на толерантност към

окислителен стрес, чрез проследяване експресията на гени от сигналната мрежа, включваща се в отговор на този вид стрес.

Получените от авторката резултати са публикувани в 5 научни статии в списания с и без импакт фактор, в 3 от които тя е първи автор. Подготвена е и статия за печат в *Environmental Toxicology and Safety* (IF = 2,203). Докторантката има 7 участия в научни форуми, отразяващи изследванията по дисертационния труд и е изпълнила успешно кредитната си програма. Представила е и 1 цитат.

Заклучение

Дисертационният труд на Мария Димитрова е задълбочено и изключително актуално изследване в областта на съвременната еко-генотоксикология, разкриващо възможностите за приложение на едноклетъчното зелено водорасло *C. reinhardtii* за разработване на евтини, бързи и надеждни биотестове за оценка на генотоксичния и мутагенен потенциал на ксенобиотици - резултат на негативната антропогенна дейност. Богатият методичен арсенал и правилно подбраната биологична система са довели до получаване резултати с подчертан оригинален и научно-приложен характер. Последните са база за по-нататъшно дешифриране на механизмите, отговорни за окислителен стрес и идентифициране на алелни варианти на гени, асоциирани с различия в репаративния потенциал на щамове от колекцията *Chlamydomonas reinhardtii*.

Въз основа на научната и приложна значимост на получените резултати и перспективите, които те откриват в областта на еко-генотоксикологията, убедено давам своята положителна оценка и препоръчвам на Уважаемото Научно жури да присъди на Мария Димитрова Тодорова образователната и научна степен „Доктор” по научна специалност „Генетика”, шифър 01.06.06.

07.08.2014г.

Член на Научното жури:

/доц. д-р Елена Тодоровска/