

РЕЦЕНЗИЯ

От: акад. Атанас Иванов Атанасов, СГЦ към СУ „Св. Кл. Охридски“ София, член на НЖ, определено със заповед N67/26.07.2022 от Директора на ИБЕИ, БАН

Относно: дисертационен труд, представен за присъждане на ОНС “Доктор”, по професионално направление 4.3. „Биологически науки”, научна дисциплина „генетика“, шифър 01.06.06

Автор: Даниела Миткова Митева, докторант на самостоятелна подготовка към секция „Мутагенеза от околната среда, отдел “Екистемни изследвания, екологичен риск и консервационна биология“ на ИБЕИ – БАН, научен ръководител проф. д-р Стефка Чанкова

Тема на дисертационния труд: „Едноклетъчни зелени водорасли като модел за генотипна устойчивост към окислителен стрес“

Актуалност на дисертационния труд

Търсенето и усъвършенствването на моделни тест - системи за изпитване и отбор на живи организми към стресови фактори на околната среда при естествени или новосъздадени в процеса на изследователската работа форми продължава да привлича вниманието на изследователите в целия свят и да формира нови рационални подходи в подобрителната генетико-селекционна работа при тях.

В този аспект считам, че дисертационният труд е твърде актуален, поради това че предлага нови видове едноклетъчни водорасли *Chlorella*, които се оказват по-ефективни като моделна система за изследване на генотипната устойчивост към окислителен стрес, поради обстоятелството, че са изолирани от екстремните условия на Антарктида и термалните води на Рупите, в сравнение с досега използваните.

Обща характеристика на дисертационния труд

Дисертационният труд е в обем от 90 страници текст, 4 таблици и 19 фигури. Списъкът на цитираната литература включва 199 заглавия, от които всички са на латиница. Изследванията, които са включени в дисертационния труд, са проведени в Института по

биоразнообразие и екосистемни изследвания при БАН. Той е оформен по все още нестандартен за България модел под формата на публикувани статии и доклад от конференция. Публикуваните три статии на английски език са в следните списания : Gene 516, 184-189, IF 2,196; Q1 (Scopus), където кандидатката е трети автор; Ecologia Balkanica, Special edition 3, 19 -30, 2020, SJR (Scopus):0.13, Q4 (Scopus) и Seminar of Ecology -2015 with international participation, ФАРАГО, 2016, ISBN:979-853-476-132-4, 158-160, където тя е пръв автор. Участвувала е като пръв автор с два доклада в международни конференции, проведени през 2015 и 2020 година в София.

Литературна осведоменост и теоретична подготовка на кандидата

От дадената справка за ползвана литература в края на дисертационния труд, става ясно, че кандидатката е проучила 199 източника, публикувани на английски език без изключение. Повече от 47 % от ползваната литература е от последните десет години (от 2012 година насам), което е твърде показателно за теоретичната осведоменост и подготовка на докторантката и за актуалността на избраната тема. Това до голяма степен предполага правилното формулиране както на темата, така и на целите и задачите на настоящия дисертационен труд и да осигури тяхното качествено изпълнение с очакваната висока научна стойност.

В тази връзка твърде подробно са разгледани различните типове от групата на топлинно-стресовите белтъци (HSPs), които заемат специално място сред защитните системи и могат да допринесат за клетъчната хомеостаза и термо-толерантността на прокариотните и еукариотните, а така също и на активните кислородни форми (АКФ), които се образуват в резултат от протичането на абнормалните метаболитни процеси, които са в следствие на различни въздействия от околната среда и най-вече ролята и ефекта на различните видове UV – светлини като съществен стресов фактор.

Методични подходи

Успехът на настоящата дисертационна работа до голяма степен е свързан с правилния избор на обектите на изследване и на съответните методични подходи. За изпълнение на поставените задачи в дисертационния труд са използвани едноклетъчни зелени водорасли от род *Chlorella*, изолирани от различни местообитания с екстремни условия на живот към топлинен и UV-B индуциран стрес, а именно :

- *Chlorella vulgaris* Antarctic, вид изолиран от почва на остров Ливингстън, Антарктида;
- *Chlorella vulgaris* 8/1, термофилен вид, изолиран от минералните извори в района на Рушките, през 1968 г.;
- *Chlorella kessleri*, мезофилен вид от Trebon колекцията, Чехия, използван като контрола.

Съобразно конкретните изисквания на експерименталните задачи, считам, че докторантът се е справил успешно с усвояването и успешното прилагане на специфични и твърде различни по своя характер разнообразни микробиологични, молекулярни и други биологични методи като: spot-test (Harris E., 1989); Метод на микроколониите (Vlcek et al., 1987); Скорост на растеж (Брой удвоени клетки (Harris E., 1989 и Коефициент на скоростта на растеж (Шевченко, 1979); Летални дози по метода на Рид и Менч (Лидански Т., 1988); Сектори на фотореактивация (Harm, 1968; Serafin et al., 2003; Kiefer, 2012); Ниво на индуцирани и репарирани двойно-верижни разриви в ДНК - чрез гел-електрофореза в постоянно електрично поле; ефективност на три системи на репарация - фотореактивация, тъмнинна репарация и репарация на двойно-верижните разриви. Методиката за отчитане на количеството индуцирани и репарирани ДВР в ДНК, се явява модификация на по - рано разработената методика за *Chlamydomonas reinhardtii* (CFGE) (Chankova and Bryant, 2002; Chankova et al., 2005); Генотипната устойчивост на двата екстремофилни щама *Chlorella vulgaris* (Antarctic и 8/1) и мезофилен вид *Chlorella kessleri* към индуциран температурен стрес е определяна на базата на:

- метод на макроколониите (Шевченко, 1979)
- гел-електрофореза и Western blotting за определяне на конститутивните и индуцирани нива на HSP70 (Chankova et al., 2009; Chankova et al., 2013).

Значимост и убедителност на получените резултати, интерпретациите и изводите

Резултатите от изследванията по дисертационния труд са обобщени в седем глави. Те са отразени в : Gene 516, 184-189, IF 2,196; Q1 (Scopus); Ecologia Balkanica, Special edition 3, 19 -30, 2020, SJR (Scopus):0.13, Q4 (Scopus) и Seminar of Ecology -2015 with international participation, ФАРАГО, 2016, ISBN:979-853-476-132-4, 158-160 и в два доклада в международни конференции, проведени през 2015 и 2020 година в София. Това

потвърждава, че резултатите отразени в тях логично и последователно демонстрират тяхната достоверност и значимост.

Това, което обаче е задължително да се отбележи е, че в настоящия дисертационен труд са използвани видове едноклетъчни зелени водорасли, изолирани от хабитати с контрастни условия.

Кандадатката има възможността да използва за пръв път *Chlorella vulgaris* Antarctic за реализиране на настоящите цели. Поради това обстоятелство, тя лансира хипотеза, с която цели да докаже, дали едноклетъчни зелени водорасли от род *Chlorella*, изолирани от местообитания с различни екстремни условия на живот не биха могли да бъдат по-подходяща моделна система при изследване на механизмите, участващи във формирането на генотипната устойчивост към окислителен стрес, в сравнение с досега използваните.

Използвайки широк инструментариум от подходящи биологични методи, авторката успешно демонстрира, че измерените конститутивни нива на HSP70B в *Chlorella vulgaris* Antarctic са с приблизително 30% по-високи в сравнение с тези, измерени за другите два вида *Chlorella vulgaris* 8/1 и *Chlorella kessleri*. Тези резултати подкрепят хипотезата, че функционалните свойства на HSP70B играят ключова роля като еволюционно фиксиран фактор, участващ във формирането на устойчивостта на растенията към термален стрес. С това авторката достига до заключението, че по-високото конститутивно съдържание и добре изразеното свръхпроизводство на HSP70B е вероятно един от механизмите, позволяващи на *Chlorella vulgaris* Antarctic, да оцелява в екстремните условия на Антарктида.

За да подкрепи това предположение, авторката прави успешен опит да сравни капацитета на *Chlorella vulgaris* Antarctic, *Chlorella vulgaris* 8/1 и *Chlorella kessleri* да репарират повредите в ДНК, индуцирани от UV-B облъчване, чиято роля като екологичен фактор нараства, в резултат на настъпилите климатични промени

Анализирайки натрупаната информация за чувствителността на трите вида *Chlorella*, кандидатката убедително показва, че *Chlorella vulgaris* Antarctic е значително по-устойчива към UV-B облъчване в сравнение с *Chlorella kessleri*. Още повече, авторката развива предположението, че сходните нива на спонтанно възникнали ДВР, индуцирани от различни до-зи UV- В и при трите вида *Chlorella*, означава и сходна ДНК чувствителност, от което тя достоверно допуска, че генотипната устойчивост е по-скоро

свързана с репаративния капацитет, отколкото с нивото на първично индуцираните повреди.

Характер на приносите

Според приносния си характер най-важните резултати от дисертационния труд са коректно разделени на приноси с потвърдителен (1 бр), с оригинален (2 бр) и методичен (2 бр.) характер

Или ако трябва да се сумира, може да се каже, че настоящето изследване достига до откриването на нови експериментални доказателства, показващо, че UV-B облъчването може да предизвика ДВР в ДНК. Заключение, което прави кандидатката е, че *Chlorella vulgaris* Antarctic и *Chlorella vulgaris* 8/1 притежават добре изразен репаративен капацитет за отстраняване на UV-B индуцирани ДВР в молекулата на ДНК и активна фотореактивация, както и високи конститутивни нива на топлинно-стресви белтъци (HSP70B), които биха могли да допринесат за по-доброто разбиране на механизмите на формиране на генотипната устойчивост към абиотичен стрес при този едноклетъчен моделен обект

Оценка на качеството на научните трудове

Както бе вече споменато по-горе, резултатите от изследванията са отразени в : Gene 516, 184-189, IF 2,196; Q1 (Scopus); *Ecologia Balkanica*, Special edition 3, 19 -30, 2020, SJR (Scopus):0.13, Q4 (Scopus) и Seminar of Ecology -2015 with international participation, ФАРАГО, 2016, ISBN:979-853-476-132-4, 158-160, в две от които тя е пръв автор и в два доклада в международни конференции, проведени през 2015 и 2020 година в София. Според установените критерии изредените научни трудове на докторантката напълно отговарят на наукометричните изисквания за публикационна активност

Лично участие на докторанта в изследванията

Съдейки по продължителния период на осъществяване на настоящия дисертационен труд, може да се предполага, че докторантката е положила значителни и адекватни усилия за овладяване на гореспоменатите методи и за тяхното успешно прилагане. Ръководителят на докторантката е утвърден учен в тази област, който е успял да предаде своя богат опит с което да се покаже, че след първата публикация, където

докторантката е трети автор, то в последващите такива, тя да заеме логично водещото място в публикуваните разработки.

Критични бележки към дисертационния труд

Без да го считам за пропуск, би могло в изследванията да се включи и моделният растителен вид *Arabidopsis thaliana*, чрез който би могло да се даде възможност да се установи, дали някои от съществените механизми като HSP70B и ДВР като генетични маркери, свързани с окислителния стрес, наблюдавани при *Chlorella vulgaris* Antarctic показват същите тенденции и при висшите растителни видове.

Заклучение

От рецензирания по-горе дисертационен труд става ясно, че съгласно закона за развитие на академичния състав в Република България, той отговаря по качество и обем на изискванията за придобиване на образователната и научна степен „Доктор“.

Основните резултати от дисертационния труд са публикувани в международни списания с импакт фактор и са представени на международни научни форуми, което напълно отговаря на наукометричните изисквания.

От изнесеното дотук може да се каже, че Даниела Миткова Митева се очертава като добре информиран, задълбочен и в същото време критичен учен, който би бил в състояние да продължи самостоятелно изследователската работа в тази област.

Направеният по-горе анализ ми дава пълно основание да дам нужната положителна оценка на дисертационния труд и да препоръчам на почитаемото научно жури да присъди образователната и научна степен „Доктор“ на Даниела Миткова Митева.

23.08.2022

Рецензент: акад. Атанас Атанасов

София