

РЕЦЕНЗИЯ

на дисертационен труд на тема:

„КАТАЛАЗА ОТ АНТАРКТИЧЕСКИ ГЪБИ: РОЛЯ В АНТИОКСИДАНТНАТА ЗАЩИТА, РЕГУЛАЦИЯ И СВОЙСТВА“

Представен от Владислава Георгиева Дишлийска,
докторант на самостоятелна подготовка за присъждане на образователната и научна
степен „Доктор“ в професионално направление в област на висше образование 4.
Природни науки, математика и информатика, професионално направление, 4.3.

Биологични науки, Докторска програма Микробиология

Научен ръководител: доц. д-р Екатерина Крумова

Рецензент: проф. Светла Данова, дбн,
Институт по микробиология „Стефан Ангелов“ (ИМикБ), БАН

ОТНОСНО ПРОЦЕДУРАТА:

Настоящата процедура по придобиване на ОНС „Доктор“ се провежда на основание чл. 29 ал. 3 от Правилника за условията и реда за придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности в институт по микробиология БАН, решение на Научния съвет на ИМикБ-БАН (*протокол No 7 от 30.07.2024 г.*). Съгласно Заповед (№ I-107/31.07.2024) на Директора на Института съм избрана за член на Научно жури по горепосочения конкурс и съм определена за рецензент на първото му заседание. В качеството ми на рецензент, декларирам, че не съществува конфликт на интереси по смисъла на § 1, т. 2а от допълнителните разпоредби на ЗРАСРБ между мен и кандидата по процедурата за ОНС „Доктор“ и за мен не са налице ограниченията по чл. 33 от ЗРАСРБ.

Доказано е по законоустановения ред отсъствие на плагиатство в научните трудове на кандидатката.

АКТУАЛНОСТ И ЗНАЧИМОСТ НА РАЗРАБОТВАНИЯ ПРОБЛЕМ

Представеният ми за рецензия дисертационен труд е посветен на психрофилни представители на царство гъби, изолирани от слабо проучени антарктическите екосистеми. Оригинален е не само обектът на изследване – разнообразни в таксономично отношение fungi, но и проучването на механизми на екологичната селекция, както и еволюционната адаптация, които осигуряват тяхното оцеляване в екстремни условия. Въздействието на ниските температури и проявите на оксидативен стрес привлича интереса не само на учените. Дисертацията търси данни за клетъчния отговор срещу студовия стрес и за адаптацията на гъбите за оцеляване при такива екстремни

температури. В тази връзка се характеризира способността на непроучени досега психрофили да произвеждат температурно чувствителни (cold-active, СА) ензими, включително и каталазата като първа линия на антиоксидантна защита. Трудът изучава СА ензими, които имат важно приложение в хранителната, текстилната и фармакологичната индустрии, в технологията за биоремедиация, като индикатор за разграждането на въглеводороди на замърсена със суров нефт почва и др. Много важно е разбирането на техния потенциал като терапевтични средства при заболявания, предизвикани от повишеното ниво на свободни радикали (напр. диабет, болест на Алцхаймер, болест на Паркинсон, витилиго и акаталаземия), както и при криоконсервацията в репродуктивната медицина. Всичко това ми дава основание да подчертая иновативността и актуалността на разработения дисертационен труд.

ОБЕМ И СТРУКТУРА НА ДИСЕРТАЦИЯТА

Дисертационният труд е конструиран в общоприетата форма, съгласно Правилника на ИмикБ-БАН за приложение на ЗРАСРБ. Написан е на 125 стандартни компютърни страници (на 1.5 pt), които включват 90 стр. текст и 27 стр. използвана литература. Спазени са изискванията за форма, съдържание и съотношение на отделните раздели както следва: *Увод* - 2 стр., *Литературен обзор* - 28 стр.; *Цел и задачи* - 1 стр.; *Материали и методи* - 11 стр., *Резултати и обсъждане* - 43 стр., *Изводи* - 2 стр., *Приноси* - 1 стр. *Използвана литература* - 22 стр.; *Публикации* - 1 стр. Надлежно са посочени използваните съкращения. Отлично впечатление правят подредбата, логическата последователност в литературния обзор и изложението на получените резултати и тяхната илюстрация с 30 фигури и 12 таблици. Материалът е представен със стегнат научен стил. Бих искала да отбележа целенасочения увод, който в концентриран вид представя както нерешените проблеми, така и оригиналността на разработката.

ЛИТЕРАТУРНА ОСВЕДОМЕНОСТ И ПОСТАНОВКА НА ЦЕЛТА И ЗАДАЧИТЕ

Литературният обзор е много добре структуриран и разисква в логическа обвързаност научната информация, необходима за представяне проведените изследвания, както следва:

(1) „*Антарктика - местообитание за филаментозни гъби, адаптирани към екстремно студени условия на средата* „– аналитично разгледан като слабороучен хабитат, с микрофлора изследванията на която е свързано с редица научни предизвикателства и от което са изолирани изследваните фунги. (2) „*Оксидативен*

стрес, индуциран от ниски температури и стратегии за адаптиране“ - авторката преминава от биотопа към биоценозата и метаболитните особености в екстремни условия. Обобщена е актуалната информация за измененията на климата и *оксидативен стрес*; *Биомаркери на оксидативния стрес, индуциран от ниски температури и антиоксидантна защитна система на клетките*. (3) Потърсена е „Връзка между студов стрес и оксидативен стрес“ и (4) Адаптиране на микроорганизмите към оксидативен стрес, причинен от ниски температури на околната среда; (5) Роля на КАТ в антиоксидантната защита срещу ниско-температурен оксидативен стрес, добавяйки доказателства за (6) Филаментозните гъби като експериментален модел. Представени са данни от последните 20 г. което ясно показва отлична теоретична осведоменост на докторантката. Това личи и от структурирането на обзора, целенасочено и конкретно, като включва всички аспекти на изследването. Ясно се откроява аргументираната и подкрепена с литературни данни обосновка, относно необходимостта и иновативността от научната разработка.

Отлично впечатление прави финалното критично обобщение на нерешените проблеми по темата, което води логически към целта: „*Да се изследва участието на антиоксидантния ензим каталаза в механизмите на адаптация към нискотемпературен стрес при филаментозни гъби, изолирани от екстремно студени местообитания (Антарктика)*“.

За нейното изпълнение са ясно формулирани 7 задачи с 3 под-задачи, което изисква не само теоретични знания, но и експериментални умения.

ОЦЕНКА НА ИЗПОЛЗВАНИТЕ МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

Разделът "*Материали и методи*" демонстрира широк набор от рутинни и съвременни молекулярни и аналитични методи, съобразени с конкретните изисквания на поставените задачи. Оценявам високо големия брой – 61 щам плесенни гъби, изолирани от почвени проби от различни региони на Антарктика, като експериментална група, за решаване на задачите и за избор на моделни щамове в последващите етапи. Умело са подбрани класически микробиологични тестове, за охарактеризирането на растежа и морфологията на фунгалните клетки и клетъчната диференциация в условията на температурен стрес. Те се допълват в логическа последователност с класическите аналитични методи и с молекулярно генетични методи за изолиране и секвениране на гени и гена експресия на каталазните гени. Стратегията за оценка на антиоксидантни ензими –СОД и КАТ, свързани със студов и оксидативен стрес в нормоокси условия и

при дълготраен и при кратък нискотемпературен стрес, позволява обективна оценка на търсените механизми на клетъчен отговор, при този тип психрофилни микоорганизми. Правилно подбран и умело приложен е панел от биохимични методи, включващ промените различни биомаркери, като *съдържание на оксидативно увредени белтъци; количество на резервни въглехидрати, Липидна пероксидация, определяне нивото на генерираните свободни окси-радикали* за да достигне до избор на моделен щам и до изолиране, пречистване и характеризирание на КАТ. Докторантката избира високо-дискриминативни молекулярно-генетични методи за охарактеризиране генетичните основи на отговора към оксидативен стрес при нискотемпературни условия, при моделния щам. Освен намиране на каталазни гени е доказана и тяхната генна експресия при култивиране в нормоокси условия и в условията на нискотемпературен стрес.

ОЦЕНКА НА ПОЛУЧЕНИТЕ РЕЗУЛТАТИ

Дисертационният труд на Владислава Дишлийска, е задълбочено и мащабно научно изследване върху механизмите на адаптация, към нискотемпературен стрес при филаментозни гъби, избирайки обект от едно от най-студените местообитания, непроучени до момента – Антарктида. Техният избор, допълва научните данни за адаптацията на непроучени еукариотни микроорганизми, за оцеляване при температури, близки до отрицателните. Докторантката търси връзката между ниско-температурното въздействие и проявите на оксидативния стрес, а така също и участието на антиоксидантните ензими в преживяемостта на организмите в подобни екстремни условия. Основополагаща е групата от 61 щамове плесенни, изолирани от антарктически почвени проби, които са проучени за растеж и развитие при различни температури и са класифицирани към съответните термални класове по 3 различни температурни показателя и натрупване на биомаса. Заслужава внимание логическата последователност на разработката. Всеки етап включва убедително доказан материал, който е отправна точка за следваща насоченост на изследването. Класифицирането, по добре избраните физиолого-биохимични показатели е отправна точка за последващата характеристика на изолираните гъби по отношение синтезата на вътреклетъчна и извънклетъчна каталаза. В. Дишлийска оценява разпространението на извънклетъчната КАТ в щамове от различни таксономични групи, което има важно практическо приложение. Изборът на моделни щамове също е научно обоснован със *сравнителен анализ на данните за синтеза на КАТ при различните щамове*. Всичко това придава на дисертацията характеристика за цялостност, основана на научно познание и теоретична подготвеност.

Потвърждават го изборът на методичните подходи и включването на модерни молркулярно -генетични методи, надграждащи утвърдените класически такива. Оригинален подход прилага докторантката, оценявайки ролята на каталазите в клетъчния отговор на моделните щамове към стрес, причинен от ниски температури, в търсенето на каталазни гени и транскрипционния анализ на тяхната експресия. Умело е дискутирана ролята на експресирияния *cat1* ген при ниска температура. Решаването на задачите като цяло е постигнато чрез сравнителен мултифакторен анализ, основан на оценка на различни биомаркери на оксидативен стрес. Високо оценявам разнообразието на използваните методи и тяхното съчетаване за решаване на експерименталните задачи. Безспорно качество на разработения труд е доказването на генетичните основи за получените емпирични данни по оценка ключовия ензим каталаза и отговора на правилно подобрите моделни щамове в нормоокси условия и в условията на нискотемпературен стрес.

Към достоинства на дисертационния труд се прибавят новополучените данни по оптимизиране условията на култивиране на щам *P. griseofulvum* P29 за повишаване синтеза на ензима каталаза (КАТ), неговото биохимично пречистване и ензимно охарактеризиране. В тази глава от дисертацията докторантката е разработила последователно параметрите за култивиране на щама-продуцент и е оптимизирала тези за получаване на търсения ензим. С протокола по ензимната очистка на КАТ е постигната 12 пъти по-висока активност при това по неусложнена и ефективна процедура. Този раздел от работата безспорно има авторски решения и нови подходи, но в дискусиата това не е отразено. Бих препоръчала при тази част и в останалите раздели с експериментални резултати оригиналният принос да намери изява в дискусиата на получените резултати. Това е важно и поради факта, че информацията за ефективно производство на температурно чувствителна КАТ е оскъдна. Сред голям брой микроорганизми, способни да произвеждат вътреклетъчни ензими, включително КАТ, филаментозните гъби са особено интересни поради лесното им култивиране и натрупване на биомаса. Тези резултати са добре илюстрирани с 22 фигури и 8 таблици.

Научните експерименти са правилно поставени, в повтореност и доказана статистическа достоверност, което потвърждава отлична подготвеност на докторантката и способност да избира и съчетава методични подходи и да провежда експерименти. Това води до успешно решаване на конкретни експериментални задачи, видно от представените публикации по темата на дисертацията. Представените 2 публикации

са в авторитетни международни списания и са с общ ИФ-5.532. На една от тях докторантката е първи автор.

Изводите са логично следствие от експерименталните данни. Те точно представят изпълнението на поставените задачи. Написани са в стегнат стил и кратък изказ, което представлява трудност при обобщаване на резултатите от такъв обемен експериментален труд. Затова техният брой съответства на броя на формулираните подзадачи. От тях ясно личи, че целта е постигната.

Формулирани са 4 приноса, които приемам като такива, с оригинален и с потвърдителен характер. Прави впечатление и тяхната точна формулировка с ясно очертан научен и методичен принос в изследванията на малко проучени психрофилни плесени в условията на нискотемпературни въздействия и оксидативен стрес.

АВТОРЕФЕРАТ, КРИТИЧНИ БЕЛЕЖКИ И ВЪПРОСИ

Авторефератът както и цялостният дисертационен труд са оформени много добре и нямам критични бележки. Бих искала да направя една препоръка, натрупаният предходен опит в изследователския колектив, по разработваните проблеми да бъде отразен или в литературния обзор или в дискусията при сравнителния анализ на резултатите. Това още по-ясно ще очертае личния и научния принос в развитието на тази актуална тематика:

В тази връзка бих искала да поставя и един въпрос към докторантката: С оглед оригиналните резултати за получения и охарактеризиран температурно-чувствителен ензим, как виждате развитието на разработката и може ли да очакваме практическо приложение.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В заключение искам да подчертая, че материалът е дисертабилен, темата е актуална, докторантката е усвоила широк набор от съвременни методи, експериментите са поставени методично правилно, получените резултати са достоверни и са солидна база за следващи научни и приложни разработки, открояват се оригинални научни и приложни приноси.

Въз основа на направения обективен анализ на дисертационния труд и като имам предвид актуалността и нивото на работата, убедено предлагам на уважаемите членове на Научното жури, да присъдят на докторант на свободна подготовка **Владислава Георгиева Дишлийска** образователната и научна степен „Доктор” в област на висше

образование 4. Природни науки, математика и информатика, професионално направление, 4.3. Биологични науки, Докторантска програма: Микробиология.

26.09.2024

Рецензент:.....

(проф. С. Данова, дбн)