

РЕЦЕНЗИЯ

от проф. Мария Богомилова Ангелова, дбн, Институт по микробиология „Стефан Ангелов” при БАН

върху дисертационен труд, представен пред научно жури, сформирано със заповед № РД-38-354/10.07.2023 г на Ректора на Софийския университет „Св. Климент Охридски” за получаване на образователната и научна степен “доктор” в Професионално направление: 4.3. Биологични науки (Микробиология)

Автор: Поля Галинова Мариновска

Тема: **Състояние на покой при дрожди *Saccharomyces cerevisiae* – модел за изследване на токсикологичен и стресов отговор**

Научени ръководител: доц. д-р Венцислава Петрова

Актуалност и значимост на дисертационната теза

Преди всичко, искам да отбележа, че представеният дисертационен труд е мултидисциплинарен и е насочен към най-сериозните предизвикателства на днешния ден – опазване на околната среда, лекарствената резистентност и оксидативния стрес, към които трябва да се добави и процеса на стареене. Всяко едно от тях е обект на нарастващ интерес в научните среди поради сложните механизми на контрол, поради неизяснените проблеми и изключителното си въздействие върху здравето и социалния живот на хората. Събрани на едно място те характеризират актуалността на разработката, очертават една широка и неизследвана ниша, която обхваща както научен, така и приложен аспект и е предпоставка за оригинални приноси. Тук трябва да се добави още едно достойнство на дисертацията – използването на дрождите от вида *Saccharomyces cerevisiae* като обект на изследване. Както е известно, именно *S. cerevisiae* са едни от първите живи същества, използвани в бита на човека, те са ефективно действаща „клетъчна фабрика“ за получаване на биологично-активни вещества и подходящ модел за изясняване на молекулярните механизми, лежащи в основата на редица биологични процеси. Техните уникални генетични характеристики и еукариотна природа позволяват мултиплицирането на получените биологични зависимости при висшите еукариоти. Като доказателство за актуалността на темата искам да отбележа, че списанието *International Journal of Molecular Sciences* (IF 5.6; Q1) ще публикува в края на 2023 год. специално издание със заглавие "Stress Response Research: Yeast as Models".

Основната теоретична насоченост на изследването е свързана с получаване на нови знания относно връзката между фазите на жизнения цикъл при *S. cerevisiae* и характеристиката на клетъчния отговор срещу стресови стимули. В научно-приложен аспект, дисертацията предлага нов, алтернативен модел за анализ, на базата на който може да се получи прогнозна информация за токсикологичен отговор при висши еукартни организми, полезен при разработването на нови лекарства.

Познаване на проблема

Дисертационният труд е конструиран в традиционна академична форма със съответните раздели. Написан е на 229 стандартни компютърни страници и е онагледен с 61 фигури и 5 таблици. Литературният обзор е оформен на базата на 575 научни публикации, той е целенасочен, обхваща широк диапазон от аспекти, свързани с проучвания проблем и отразява неговото съвременно ниво. На 45 страници Мариновска много ясно и достъпно въвежда читателите в теорията на всички предстоящи изследвания и демонстрира своите сериозни познания в тази област. В края е представен подраздел „Заключение“, в което са изтъкнати нерешените въпроси и е аргументирана необходимостта от разработката. Според мен това е много добра идея, която заедно с включените в обзора 13 фигури улеснява читателя да оцени актуалността на дисертационната теза.

Въз основа на този задълбочен анализ е изведена целта на настоящата дисертация: да се проучи приложимостта на клетки *S. cerevisiae* в различни фази от жизнения цикъл като еукариотен модел за клетъчен отговор към токсични и стресови агенти. Според мен тя съответства на актуалността на проблема и подчертава иновативния характер на разработката. Целта е ясна, добре формулирана и обединява направленията на експерименталната работа. За реализирането ѝ са формулирани 8 конкретни, взаимно обвързани и логически следващи задачи, които включват всички задължителни етапи на подобно проучване. Още тук се вижда сериозният обем работата, поставена пред докторантката.

Методика на изследването

Разделът "Материали и методи" демонстрира много широк набор от методи, съобразени с конкретните изисквания на експеримента. Те са както рутинни, така и съвременни, микробиологични, биохимични, молекулярно-биологични, биоинформатични и др. Правят впечатление получаването на клетъчни фракции, включително с ултрацентрофугиране, микроскопските анализи, оценката на различни видове абиотичен стрес, работата с ултразвук и гравитационна сила, анализа на биомаркерите на стреса и концентрацията на свободни-окси радикали (СОР) и др. Искам да подчертая молекулярно-генетичните подходи за проучване ефекта на стресовите стимули върху промените на ДНК, както и биоинформатичните методи за подбора на секвенциите, използваните програми за сравняване на множество секвенции, анализите на вътреклетъчната локализация на ензими и разпознаването на митохондриални, ядрени и пероксизомални белтъци. Методите са описани много детайлно (на места дори с излишни подробности) и могат да бъдат възпроизведени. Всички те са достатъчно основание за достоверност и прецизност.

Характеристика и оценка на дисертационния труд и приносите

Разделът „Резултати и обсъждане” в научния труд на Поля Мариновска очертава едно сериозно научно изследване, което е онагледено с 48 фигури и 5 таблици. Разработката се отличава с мащабност и ясно изразена логическа последователност. Основната част от експерименталната работа е свързана с получаването на популация от G₀ клетки от хаплоиден щам *S. cerevisiae* BY4741 от колекцията на EUROSCARF Frankfurt. Този щам, обект на много изследвания, е избран с презумпцията, получените в дисертацията резултати да бъдат сравнявани с публикуваните досега. Установени са условията за диференциация на дрождевите клетки и е направена характеристика на популациите. За оценка на токсикологичното въздействие са избрани съединенията менадион, H₂O₂, ибупрофен и зеоцин. След задължителното проучване на преживяемостта на три субклетъчни фракции (Log, Q и NQ) от моделния щам при въздействие с тест-съединенията е определена концентрацията LD₅₀ за всяко едно от тях. Тази концентрация е база за следващите експерименти. Във втория етап е направен анализ на цитотоксичността на моделните съединения чрез определяне нивото на основните биомаркери (СОР, оксидативно увредените белтъци и липидната пероксидация) и нивото на антиоксидантната защита посредством количеството на общия глутатион. Според мен, избраните критерии дават възможност за коректна оценка на степента на стреса в изследваните клетки - Log, Q и NQ. В допълнение към доказателствата за въздействието на зеоцина са представени DAPI флуоресцентни снимки за измененията в митохондриалната ДНК от клетки в експоненциалната и стационарната фаза, както и ускореното генериране на СОР с оцветяване с Rhodamine 123. Тук трябва да се подчертае стремежът на автора да охарактеризира най-пълно цитотоксичното въздействие на всяко съединение върху отделните субклетъчни фракции на основата на голям брой литературни източници.

След оценката на цитотоксичността, като закономерно продължение е направено проучване на генотоксичността на менадиона и зеоцина чрез молекулярно-генетични изследвания относно ефекта им върху двойно-верижните разкъсвания (ДВР) на ДНК. Авторката прави сравнение между спонтанните и индуцираните ДВР в Log, Q и NQ клетъчни популации на щам *S. cerevisiae* BY4741. Изчислен е капацитетът на репарация при третиране с зеоцин, който е най-висок при Log растящите клетки (60 мин за възстановяване на уврежданията).

За охарактеризиране на модела, Мариновска проучва влиянието на различни физични фактори върху преживяемостта на клетъчните популации от моделния щам. Искан да подчертая значението на проведените експерименти за постигането на поставената цел. Всички тези фактори (температура, рН, осмотичен стрес, УВ-лъчи, ултразвук, гравитационна и механична сила) са приложени към Log, Q и NQ клетъчни популации с вариране на времето или концентрацията. Установено е кои са най-устойчивите клетки при съответното

въздействие. В дискусиата авторката търси логични обяснения на фона на защитен комплекс, регулиран на ниво морфология, на генно или биохимично ниво, на ниво програма за диференциация, или толерантност към съответния фактор. Отбелязани са и някои специфични елементи от клетъчния отговор срещу оксидативния стрес (напр. наличието на резервни въглехидрати). Аз бих препоръчала още малко внимание на връзката между тези физични фактори и генерирането на оксидативен стрес.

Като логически завършек на раздела звучи биоинформатичният анализ на стратегиите на *S. cerevisiae* за навлизане на клетките в състояние на покой. Получени са *in silico* данни за наличието на гените *TOR1* и *TOR2*, кодиращи синтезата на две РИК (фосфоинозитид)-свързани протеин кинази, които участват в регулацията на редица клетъчни процеси. Много подробно са интерпретирани възможностите за насочване на тези кинази към пероксизомите, към ядрото или вакуолата. Данните в дисертацията потвърждават публикувано в литературата становище, че това са периферни мембранни белтъци, чиито С- и N- краища се разполагат от вътрешната страна на мембраната и са свързани с отговора към стреса и състоянието на покой. Биоинформатичният анализ на генома на моделния щам показва наличието на гените *TPK1*, *TPK2* и *TPK3*, които кодират протеините Трк1р, Трк2р, Трк3р. Отбелязаните протеини изграждат каталитичните субединици на сАМФ-зависима протеин киназа (РКА), подпомагаща вегетативния растеж в съответствие с наличието на хранителни вещества в клетката. Получени са данни за вътреклетъчната локализация на белтъците, които участват в РКА метаболитния път и са доказани разликите и подобията с данните за човека. Със същите методи е установен ген *PKC1*, кодиращ синтезата на серин/треонин протеин киназа С (1151 aa) и ген *SNF1*, кодиращ дрождевия хомолог на човешката АМФ-активирана протеин киназа (АМРК). Получени са убедителни данни за аминокиселинната последователност, за процента на хомоложност с човешкия геном и вероятността за локализиране в клетката. Доказателственият материал от този подраздел и особено оформените таблици, позволява коретно му възприемане от читателя.

Представянето на резултатите е съчетано с умела дискусия по всички етапи от разработката. Направено е задълбочено и професионално обсъждане на данните като са използвани подходящи литературни източници. Това създава впечатление за увереност и съизмеримост с публикуваното от други автори. Дискусиата демонстрира още сериозната експериментална работа на докторантката и нейните задълбочени познания в тази област. Много добро впечатление прави, че освен сравняването на резултатите с постигнатото от други автори, докторантката търси нови обяснения и правиви предложения за механизъм на действие.

В края на дисертационния труд е оформен раздел „Заклучение”, който обобщава много информативно получените данни, тяхното значение и представя Физиологичен профил за отговор към стрес на клетки *S. cerevisiae*, намиращи се в различна фаза на клетъчния цикъл

– пролиферативна, G₀ и стационарна непролиферативна фаза. Нещо повече, оформената фигура (Фиг. 61) дава нагледна представа за характеристиката на отговора срещу стреса на субклетъчните популации Log, Q и NQ на морфологично, биохимично и молекулярно ниво. Този начин на заключение улеснява читателя да се ориентира много точно в разработката и да възприеме постиженията в нея. Тук искам да подчертая и ролята на научния ръководител, доц. Венцислава Петрова, която е един от малкото специалисти в областта на докторантската теза и по мое мнение е допринесла за отличното представяне на материала.

Искам със задоволство да подчертая много доброто оформление на дисертацията, стегнатия научен стил, на който е написана, коректното отразяване на резултатите в таблици и фигури, както и тяхното професионално представяне.

Според мен, изводите са логично следствие от експерименталните данни и дават необходимата информация за стойността на проведените изследвания. Приемам и формулировката на приносите и искам да подчертая тяхното значение в теоретичен и в научно-приложен аспект. По същество, те се отнасят до следното:

1. Постигната е целта на дисертационния труд – доказана е приложимостта на клетки *S. cerevisiae* в различни фази от жизнения цикъл като еукариотен модел за клетъчен отговор към токсични и стресови агенти. За първи път е разработен сравнителен Функционален профил, който дава възможност за следващи теоретични и научно-приложни разработки.

2. Получени са нови знания относно адаптивния отговор на клетки от *S. cerevisiae*, намиращи се в различна фаза на клетъчния цикъл към широк набор от абиотични стимули на стрес.

3. Получена е нова информация за генотоксичния ефект на лекарствените препарати менадион и зеоцин върху ДНК на дрождевите клетки.

4. Охарактеризиран е високият редокс статус на клетки от популация G₀ на *S. cerevisiae*, които подобно на раковите клетки ускорено генерират ROS.

5. Със съвременни биоинформатични подходи са охарактеризирани гените, отговорни за фаза G₀ от клетъчния цикъл на дрожди и тяхната хомоложност с тези при човека.

6. Получена е ценна информация относно по-ниското ниво на податливост на метаболитно неактивните еукариотни клетки към противотуморни средства.

7. Направената метаболитна характеристика на G₀ клетките създава възможност за тяхното приложение като модел за проучване на:

- токсикологичните механизми на вредни вещества при животни и човека;
- устойчивостта към химичен и физичен стрес за приложение в индустрията

Критични бележки, препоръки и въпроси

Освен отбелязаните по-горе в текста бележки, към дисертацията на Мариновска имам следните препоръки:

1. Статиите, включени в дисертацията не трябва да са част от списъка с литературата.

2. Препоръчвам на докторантката да започва съответния подраздел в раздел „Резултати и дискусия“ със собствените резултати и след това да представя обсъждането им. Дългите преамбюли характеризират някои от пасажите като по-подходящи за разделите „Литературен обзор“ и „Материали и методи“.

Посочените забележки има технически характер и ни най-малко не намаляват стойността на дисертацията. Отбелязвам ги с презумпцията да бъде полезна за бъдещата работа на докторантката.

Към докторантката Поля Мариновска имам следните въпроси:

1. Какви са характеристиките на G_0 клетките, които ги определят като ефективен модел за изследване на токсикологичен и стресов отговор?

2. Освен ДВР разкъсване на ДНК, какви други увреждания може да предизвиква въздействието със зеоцин на генетично ниво?

3. В каква насока може да бъде продължена работата по представения проблем на базата на получените теоретични и приложни резултати?

Преценка на публикациите и личния принос на докторанта

Данните от дисертацията са включени в 2 научни статии и 6 участия в научни форуми. Статиите са журнални и са отпечатана в списание BioRisk с IF 1.167 и квантил Q2. Докладите са представени на 4 международни и два национални форума. Това ми дава основание да считам, че резултатите на Поля Мариновска са станали достояние на нашата и международната научна общност. Във всички статии и в 5 участия докторантката е на първо място, което доказва нейният значим дял в разработването на дисертационния труд.

Заклучение

В заключение искам да подчертая, че докторантката е изпълнила изискванията на ЗРАСРБ, като и тези в Правилника към него на СУ „Климент Охридски“ за придобиване на образователната и научна степен ”доктор”. Материалът, който представя Поля Мариновска е дисертабилен, темата е актуална и предлага съвременно ниво на важен за теорията и практиката въпрос. Проведените експерименти са поставени методично правилно, получените резултати са достоверни и са солидна база за следващи научни и приложни разработки. Извършена е огромна експериментална работа, като поставеният проблем е многостранно и детайлно проучен на съвременно ниво, направени са съществени приноси, формулирани са предложения за приложение в практиката. Към тази характеристика на дисертационния труд искам да добавя, че според мен, Поля Мариновска излиза от докторантурата като добре подготвен специалист в областта на микробиологията и молекулярната биология, усвоила е голям брой съвременни методи, получила е опит при интерпретиране на научни данни. Всичко това ѝ дава квалификация на млад учен, достоен конкурент на колеги от чуждестранни лаборатории.

Въз основа на направения разбор и на доказаното израстване на докторантката, предлагам на уважаемите членове на научното жури, сформирани със заповед № РД-38-354/10.07.2023 г на Ректора на Софийския университет „Св. Климент Охридски“, да присъдят на **Поля Галинова Мариновска** образователната и научна степен “**доктор**” по научно направление 4.3 Биологични науки (Микробиология).

22. 09. 2023 г

София

Рецензент:.....

/проф. Мария Ангелова, дбн/