



РЕЦЕНЗИЯ

от проф. д-р Петя Койчева Христова

Софийски Университет, Биологически факултет,
катедра „Обща и промишлена микробиология“

1. **Тема на дисертационния труд:** „Състояние на покой при дрожди *Saccharomyces cerevisiae* – модел за изследване на токсикологичен и стресов отговор“ за присъждане на образователна и научна степен „Доктор“ в Професионално направление 4.3. Биологични науки (Микробиология)

Автор на дисертационния труд: Поля Галинова Мариновска

Научен ръководител: доц. д-р Венцислава Янкова Петрова

Със заповед на Ректора на СУ № РД 38-354/10.07.2023 г. съм определена за Член на научното жури за провеждане на процедура за защита на дисертационен труд на Поля Галинова Мариновска. Представените документи и материали отговарят на минималните изисквания на Закона за развитие на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ) и Правилника за неговото прилагане.

1. Кратки данни за докторанта

Докторант Поля Мариновска е магистър по Микробиология и микробиологичен контрол при Биологически факултет, при СУ „Св. Климент Охридски“. От 2020 е редовен докторант в катедрата по Обща и промишлена микробиология, а през 2021 год. започва работа и като микробиолог на постоянен трудов договор.

2. Актуалност и значимост на дисертационната тема

Предложената за рецензия дисертация е насочена към дрождите от вида *Saccharomyces cerevisiae* като едни от най-използваните моделни организми в молекулярната биология, биотехнологиите за изследване на редица процеси, свързани с човешкото здраве и заболявания.

С уникалните си генетични характеристики и висока степен на консервативност с висшите еукариотни организми, тези микроорганизми представляват подходяща моделна система за изследване на механизмите на химична токсичност. Нещо повече, тяхното състояние на покой G_0 , където метаболитните флуктуации са силно намалени и наподобяват клетки на бозайници е предимство за изучаване на токсичното действие на различни химични вещества, за характеризиране на основните елементи на токсикологичния отговор, разработване на стратегии за тяхното неутрализиране и за оценка на риска за околната среда. Познаването на генома на дрождите също предоставя ценна база за моделиране на генната експресия на метаболити, които играят ключова роля в токсикологичния отговор.

В този контекст дисертационният труд е насочен към разработване на алтернативен модел, базиран на клетки *S. cerevisiae* в покой, който да служи за по-точен и чувствителен токсикологичен анализ при висшите еукариоти.

Изложените факти ясно мотивират избора на темата, нейната актуалност и практическо значение. Съдържанието на дисертационния труд напълно покрива обявената номенклатурна специалност по професионално направление 4.3 Биологични науки, научна специалност “Микробиология” за присъждане на ОНС “доктор”.

3. Оценка на структурата на дисертационния труд

Дисертационният труд е написан на 230 стандартни страници – формат А4, резултатите са обобщени и представени в 5 таблици и 60 фигури. Структуриран е по класическата схема и е балансиран по отношение на обема на всеки раздел: Увод (1 стр.), Литературен обзор (45 стр.), Цел и задачи (2 стр.), Материали и методи (15 стр.), Резултати и обсъждане (91 стр.), Изводи (2 стр.), Приноси (1 стр.) и Литература (54 стр.). Много добро впечатление прави приложените списъци на фигурите, таблиците и използваните съкращения.

Дисертацията е написана с добър научен стил, с точно използване на терминологията което показва, че докторантката познава задълбочено тематиката. Необходимо е да се отбележи, че представената литературна справка (574 публикации по темата) предлага един

сериозен анализ на състоянието на проблема. Дисертантката се е запознала много добре с литературните данни и умело ги използва при интерпретиране на резултатите.

3.1. Литературен обзор

Литературният обзор е структуриран правилно с пряко отношение към целта на дисертацията и поставените задачи. Обзорът на дисертационния труд засяга основните аспекти на дрождите като моделен организъм. Условно се разграничават няколко основни теми, които обаче са тясно свързани помежду си. В първата част докторантката представя клетъчния цикъл на дрождите и отделя особено внимание на характеристиките на състоянието G0. Втората част е насочена към изучаване на механизмите на токсично действие на различни лекарствени препарати. Третата тема разкрива влиянието на физичните параметри върху преживяемостта на дрождевите клетки – температура, рН, осмотично налягане, ултравioletови лъчи, ултразвук, гравитационна сила и механична сила. В четвъртата тема докторантката представя стресовия отговор при дрождите. В петата тема подробно са обсъдени биоинформатичните подходи за изучаване на състоянието на покой. Заключение на литературния обзор ясно обобщава постигнатите знания до момента, очертава необходимостта от нов интегративен подход за изучаване на начина, по който клетките взаимодействат с обкръжаващата ги среда.

3.2. Цел и задачи

Целта на дисертацията е формулирана ясно и включва изучаване приложимостта на клетки *Saccharomyces cerevisiae* в различни фази от жизнения им цикъл като еукариотен модел за клетъчен отговор към различни токсични и стресови агенти.

За постигането на формулираната цел докторантката си поставя осем основни задачи – разработване на моделна схема за получаване и изолиране на дрождеви клетки от различна фаза на клетъчния цикъл – логаритмични (Log), клетки в покой (Q) и стационарни непрелиферативни клетки (NQ), изследване на окислително-редукционния статус на изолираните дрождеви популации, проучване на ефекта на различни лекарствени (зеоцин, ибупрофен) и токсични (H₂O₂, менадион) препарати върху преживяемостта на изследваните дрождеви популации, оценка на цитотоксичния ефект на изпитваните химични агенти върху Log, Q и NQ дрождеви клетки, анализ на генотоксичния ефект на избраните химични препарати зеоцин и менадион върху трите дрождеви клетъчни популации, изучаване на ролята на различни физични стресови фактори за преживяване на дрождевите клетки, изолирани на различен етап от клетъчния цикъл, прилагане на *in silico* анализ на еволюционните стратегии за навлизане на дрождевите клетки в покой и създаване на моделен „Функционален профил“ за отговор към стрес на клетки *S. cerevisiae*, намиращи се в различни фази на клетъчния цикъл.

3.3. Материали и методи

Това е една важна част от дисертационния труд, която показва нивото на проведените научни изследвания. Представени са съвременни микробиологични, биохимични, молекулни, физични и микроскопски методи, така че самото им разработване и успешно прилагане е вече един безспорен успех и показва сериозната методична подготовка на докторантката. Мултидисциплинарният характер на изследването е позволило на докторантката да придобие нови методически умения.

3.4. Резултати, обсъждане и изводи

Основните резултати са представени съгласно поставените задачи и избраните методични подходи. Експерименталната част е изработена много прецизно и представено достоверно. Всички резултати са представени в сравнителен план добре анализирани и съпоставени с литературните данни.

Изследването съвсем логично започва с изучаване на динамиката на растеж и клетъчна диференциация на избрания за изследването щам *S. cerevisiae*. След това в последователен план е направена оценка на токсикологичното и генотоксичното въздействие на подбрани химични агенти като водороден пероксид, ибупрофен и зеоцин. Направена е оценка на въздействието на различни физични фактори и *In silico* анализ на гени от сигнални пътища, регулиращи навлизането в състояние на покой и отговора при стрес.

В резултат на проведените анализи е установено, че навлизането на клетката в G0 клетъчен цикъл се провокира в условия на лимитация по един или няколко от основните биогенни елементи в средата и се достига висок процент на клетки в покой при култивиране за 168 часа на среда YPD. Също така нелатентната NQ дрождева популация се оказва хетерогенна и се състои от жизнеспособни и репродуктивно компетентни клетки и клетки, които показват характерни черти на апоптозни и/или некротични състояния. Определена е експериментално токсичните дози (LD50) за използваните химични агенти, като се оказва, че най-чувствителна е NQ дрождевата клетъчна популация. От изследваните четири химични агента, зеоцинът има най-силен токсичен ефект върху изследваните дрождеви популации, като инхибира 100 % растежа на NQ и Log клетките и 95 % - на дрождите в G0 състояние. Ибупрофенът слабо повлиява клетъчната жизнеспособност на изследваните дрождеви популации на *S. cerevisiae* BY4741. Наблюдавано е, че ефектът на някои от приложените токсични агенти зависи от специфичната фаза от жизнения цикъл – H₂O₂ по-силно повлиява клетки в логаритмична фаза, а менадионът клетки в покой (G0).

Особено интересни са изследванията, които показват, че стресовият отговор при G0 клетките на *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 към различни токсични агенти значително се различава от този на активно пролифериращите и нелатентните стационарни клетки. Той зависи не само от фазата на клетъчния цикъл (логаритмична, G0 и/или стационарна), а също така и от специфичния механизъм на цитотоксично действие на съединението. Най-висок процент вътреклетъчни повреди при въздействие с различни лекарствени (зеоцин, ибупрофен) и токсични (H₂O₂, менадион) препарати се наблюдава при активно делящи се клетки. G0 клетките в покой са най-устойчиви на химични въздействия и показват най-ниски нива на вътреклетъчни повреди (< 25 %). Установена е по-ниска ДНК чувствителност на G0 клетките в сравнение с тази на клетки в логаритмична фаза на растеж, но най-висок капацитет на репарация е установен при логаритмично растящите клетки. Клетките, намиращи се във фаза на покой са значително по-устойчиви на физични въздействия и показват многократно по-висока преживяемост в условия на ниски и високи температури, UV облъчване и хиперосмотичен стрес. Биоинформатичните подходи показват, че гените и белтъците, които играят ключова роля за навлизането и излизането от G0 клетъчния цикъл при дрожди, имат съответни хомолози при човека. А метаболитната пластичност на дрождите се дължи на насочването на основните регулаторни протеини TORp, PKA_p, PKC_p и Snf1_p към различни вътреклетъчни компартменти.

4. Приноси с научен и приложен характер

В извършените изследвания могат да се очертаят както теоретични, така и оригинални приложни приноси, които доказват значимостта на научната разработка.

Приемам формулираните от докторантката приноси на дисертационния труд. От съществено значение е създаването модел за прогнозиране на токсикологичния отговор при еукариоти и генериране на физиологични профили като тест система за изследване на токсичното действие на молекулярно ниво.

5. Участие на докторанта в изработването на дисертацията

Реализираните контакти с докторантката при обсъждане на въпроси от дисертационния труд ми дават основание да считам, че изпълнението на дисертационния труд е изцяло нейно дело.

6. Публикации във връзка с дисертационния труд

Докторантката е представила списък с две научни публикации (Q2, общ IF₂₀₂₂ = 2.334), свързани с дисертацията. Резултатите от дисертацията са докладвани с постерно участие в 5 международни и национални научни форума и 1 секционен доклад.

Представено е участие в един научен проект свързан с темата на дисертацията и в още три проекта с други тематики.

7. Автореферат

Авторефератът е изготвен, съобразно изискванията и вярно отразява резултатите от дисертацията като в съкратен вид са представени най-важните елементи от всички раздели (без литературния обзор).

8. Препоръки, забележки и въпроси

В дисертационния труд няма съществени грешки относно използваните подходи и представяне на резултатите, поради което нямам препоръки или забележки.

Към докторантката имам следния въпрос:

а) Как ще обясните разликата в преживяемостта на клетките от различните фази на жизнения цикъл при третиране с различните токсични съединения?

9. Придобита компетентност и съответствие с изискванията на образователната и научна степен „доктор”

В хода на изпълнението на експерименталната работа и оформянето на дисертационния труд докторантката Поля Галинова Мариновска е придобила компетенции и умения, които могат да бъдат групирани по следния начин:

- разширила е теоретичната си компетентност в специфична област на микробиологията,

- придобила е умения за работа с научна литература, анализирайки и обобщавайки научна информация.

- обогатила е методичните си умения, особено в частта на прилагането на съвременни методи

- придобила е умения самостоятелно да оформя и дискутира резултатите, получени в хода на разработването на дисертацията, както и да прави изводи на базата на тях.

10. Заключение

Представеният дисертационен труд е едно завършено изследване, което предоставя ценна научна информация и разкрива възможности за практическо приложение. Много добрата теоретична подготовка е дала възможност на докторантката да подбере и съчетае набор от методи, които осигуряват изпълнение на поставените задачи и постигане на целта.

Въз основа на посочените аргументи оценявам положително предложението за рецензия дисертационен труд, който удовлетворява изискванията на ЗРАСРБ, Правилника за неговото

приложение и Правилника на СУ и предлагам на членовете на Научното жури да присъди на Поля Галинова Мариновска образователната степен „Доктор“.

18.09.2023

Рецензент:

проф.д-р Петя Христова