

РЕЦЕНЗИЯ

на дисертационен труд на тема: „**Биотехнологичен подход за *ex situ* съхранение на застрашени видове от род *Stachys* и изследване на техния фармакологичен потенциал**“

Представен от докторант: **Десислава Иванова Мантовска** за присъждане на образователна и научна степен „Доктор“ в професионално направление 4.3 Биологически науки, научна специалност Физиология на растенията - ин витро култивиране на лечебни растения
научен ръководител: **доц. д-р Жения Петкова Йорданова**

Рецензент: проф. д-р Венета Михова Капчина-Тотева, определена за член на НЖ със заповед №РД-20-376/11.07.2022г. на Ректора на СУ

Кратки биографични данни за докторанта

Десислава Иванова Мантовска е възпитаник на СУ „Св. Климент Охридски“, Биологически факултет, където през 2014 придобива образователна степен бакалавър с квалификация „Биотехнологии“. Продължава обучението си в катедра „Физиология на растенията“, и получава образователна степен магистър „Растителни биотехнологии“ през 2016г., с дипломна работа „*Ex situ* съхранение и изследване на антиоксидантния потенциал на Балканския ендемитен вид *Stachys thracica* Davidov“. През 2018г. е зачислена като докторант (Заповед РД-20-575/15.03.2018г.) в катедра „Физиология на растенията“ на Биологически факултет към СУ „Св. Климент Охридски“ и отчислена с право на защита със Заповед РД-20-2020/08.10.2021г. Била е стажант в АБИ (2012-2013 г. и Биопласт 2014 г.); File reviewer - IMS (2016 г.); Графичен дизайнер - SADIGIRB (2017-2019 г.); Асистент в катедра ФР, БФ на СУ (2017 – до сега). Придобила е допълнителна квалификация (2021 г.) чрез участие в програма Предприемачи в науката към фондация Карол Знание и курс по Иновации и предприемачество във фармацевтиката, биотехнологии в козметиката към Център за приложни науки и иновации. Провела е две едномесечни специализации в Университета в Малта (2018 г.) и Университета в Калгари (2018 г.), което е от значение за усвояването на нови методи и придобиване на международен опит. Член е на Съюза на учените в България, секция Биология.

Докторантката е представила всички необходими документи, в съответствие с ЗРАСРБ и Правилника на СУ “Св. Климент Охридски“, за да бъде допусната до защита на дисертационния си труд.

Актуалност на проблема

Природните продукти с растителен произход са предпочитано терапевтично средство от древността до днес, поради ниската си токсичност и липса на странични ефекти, което е предпоставка за намаляване на растителното разнообразие и недостиг на суровини за производството им. Урбанизацията, антропогенния фактор и променящите се климатични условия оказват значително влияние за по-лимитираното разпространение на видовете, което налага прилагане на алтернативни методи, целящи не само съхранението на видовете, но и тяхното същевременно изучаване и приложение в практиката. Растенията от род *Stachys* са едни от най-старите лечебни видове, които са използвани от човечеството. *Stachys thracica* (тракийски ранилист), *Stachys bulgarica* (български ранилист) и *Stachys scardica* (шарпланински ранилист) са балкански ендемитни видове. В литературата няма информация за *ex situ* съхранението на трите ендемитни вида, а биологично-активните вещества, продуцирани от тях са слабо проучени. Индуцираните *in vitro* и *ex vitro* култури и потенциала за биотехнологична продукция на биологично активни вещества, ще позволи съхранението им в природата и ще даде възможност в бъдеще за мащабен биосинтез на ценни вторични метаболити с възможно приложение във фармацевтичната, козметичната и хранително-вкусова индустрии. Темата на дисертационния труд е актуална и напълно отговаря на научната специалност.

Обща характеристика на дисертационния труд – обем и структура

Дисертационният труд е написан на 102 страници, структуриран по класически начин според изискванията за придобиване на образователната и научна степен „доктор“ и включва разделите: увод (2 стр.), литературен обзор (27 стр.), цел и задачи (2 стр.), материали и методи (12 стр.), резултати и обсъждане (32 стр.), изводи (2 стр.), заключение (2 стр.), приноси (1 стр.), научни публикации, участие в конференции и проекти (2 стр.) и цитирана литература (16 стр.). Библиографската справка включва 174 източника на латиница, основно от последните 10 години. Литературният обзор е задълбочен и обхваща

разпространение; ботанически характеристики; употреба в етномедицината; съхранение на застрашените от изчезване балкански ендемитни видове *S. thracica*, *S. bulgarica* и *S. scardica*; генетична стабилност на *in vitro* култивираните растения. Важна част от литературния обзор е посветена на видовете вторични метаболити, характерни за род *Stachys* и тяхната биологична активност. Боравенето с такъв значителен обем литература е доказателство за добрата подготовка на докторантката и познаване на проблема. Резултатите от изследванията са обобщени в 16 фигури и 14 таблици.

Материал и методи

Микро размножаването с основните му фази: въвеждане в култура, мултипликация, вкореняване и адаптация при *ex vitro* условия на трите вида е описано ясно и точно. Докторантката е овладяла всички необходими методи за изпълнението на поставените в дисертацията цели и задачи. Използвани са редица модерни аналитични, биохимични, микробиологични и молекулярни методи, което е позволило да се направи детайлна характеристика на изследваните лечебни растения. Всички методи са описани подробно и по начин, който позволява тяхното възпроизводство от други учени. Много добро впечатление прави добрата статистическа обработка на данните, което е допринесло за правилното описание и дискутиране на получените резултати. От прегледа на изложените в раздел Материал и методи експериментални техники може да се заключи, че в процеса на обучението си докторантката е усвоила много и разнообразни методи и се е изградила като високо квалифициран специалист. Тя притежава отлична методична подготовка, придобила е значителен научно-изследователски опит, основа за бъдещите и научни изследвания.

Цел, задачи и методи на изследване

Формулирани са ясно и точно. Ограниченото разпространение, природозащитен статус и антропогенния фактор налагат разработването на подходящи методи за съхранение на популации от видове от род *Stachys*. Основната цел на настоящата дисертация е *ex situ* съхранение на три застрашени и ендемитни видове от род *Stachys*: *S. thracica*, *S. bulgarica* и *S. scardica* чрез прилагане на биотехнологичен подход, сравнително метаболитно профилиране и оценка на биологичната активност на екстракти, изолирани от *in situ*, *in vitro* култивирани и *ex vitro* адаптирани растения. За постигането на тази цел са формулирани 8

основни задачи. *In vitro* култивирането на тези застрашени растения и биотехнологичната продукция на биологично активни вещества е иновативен подход за съхранение на тези видове в природата и възможност за мащабен биосинтез на ценни вторични метаболити с възможно приложение във фармацевтичната, козметичната и хранително-вкусова индустрии при създаването на промишлени насаждения.

Оценка на получените резултати и тяхната интерпретация

Раздел „Резултати и обсъждане“ (32 стр.) е много добре структуриран в пет основни раздела, съответстващи на поставените задачи. Извършена е значителна по обем експериментална работа и са получени съществени резултати, задълбочено коментирани в светлината на международната литература и онагледени с 16 фигури и 14 таблици. Много добро впечатление прави обобщаването на получените резултати като заключение след представянето им. Установени са основните параметри за въвеждане в *in vitro* условия и микроразмножаване с висок размножителен коефициент (11.14 ± 0.73) на Балканският ендемитен вид *S. thracica*: стерилизация на семената, което е от значение при връщане на адаптирани растения в природните им местообитания, оптимална хранителна среда за мултипликация и вкореняване. При *S. bulgarica* и *S. scardica* оптималното микроразмножаване е върху среда, съдържаща 1.0 mg/L BA и 1.5 mg/L BA съответно и последващо прехвърляне на микрорастенията върху основна MS хранителна среда без добавени растежни регулатори за индуциране на коренообразуване при висок размножителен коефициент (8 ± 0.71 и 22.6 ± 2.47 съответно). Постигната е тристепенна *ex vitro* адаптация на *S. thracica*, *S. bulgarica* и *S. scardica* (растежна камера, оранжерия и опитно поле) с висока степен на преживяемост - 83%, 96%, и 92% съответно. Изключително важен резултат е, че и трите растителни вида се характеризират със запазена генетична идентичност с донорните растения в процеса на *ex situ* съхранение. В метаболитните профили на *in situ*, *in vitro* култивирани и *ex vitro* адаптирани *S. thracica*, *S. bulgarica* и *S. scardica* са идентифицирани общо 18 първични и вторични метаболити, имащи отношение към адаптацията на растенията към променящите се условия на заобикалящата ги среда, които са различни в зависимост от изследвания вид: фенилетаноидни гликозиди (вербаскозид, левкосептозид А), фенолни киселини (хлорогенова киселина) и алкалоиди (тригонелин) за *S. thracica*, докато при *S. bulgarica* доминират вторичните метаболити от

групата на иридоидите (алобетоникозид, харпагид и ацетилхарпагид). В профила на *S. scardica* са еднакво застъпени всички по-горе описани метаболити, с изключение на харпагида, спадащ към групата на иридоидите. Асептичните условия на култивиране и миксотрофното хранене значително намаляват количеството на тоталните феноли и флавоноиди, а оттам и асоциираната с тях биологична активност и при трите изследвани представителя от род *Stachys*. При адаптиране на растенията в *ex vitro* условия биосинтетичният потенциал и свързаната с него биологична активност се възстановяват, което е от значение и за наличие на висока биологична активност.

Най-висока антиоксидантна и радикалулавяща активност е установена при *in situ* и *ex vitro* адаптираните растения, която варира в зависимост от изследваният вид: *S. scardica* > *S. thracica* > *S. bulgarica*, което е в пълна корелация с отчетената при тези варианти висока концентрация на общи феноли и флавоноиди.

Екстрактите от *in situ* и *ex vitro* адаптирани растения при *S. thracica* и *S. scardica* притежават висока инхибираща активност спрямо системата на комплемента с максимум на потискане от 95% при концентрация 2 mg/ml, докато при *S. bulgarica*, *in vitro* култивираните растения притежават най-висок противовъзпалителен потенциал и 80% инхибиране на комплемента при концентрация 2mg/ml. Резултатите корелират с биологичната активност на идентифицираните групи вторични метаболити при трите изследвани представителя от род *Stachys*. Метаноловите екстракти от *S. bulgarica* > *S. thracica* > *S. scardica* притежават умерена активност спрямо Грам “-”, бактерии, като най-чувствителни на третиране са *A. calcoaceticus* и *K. pneumoniae*. Успешното индуциране на *in vitro* и *ex vitro* култури е алтернативен биотехнологичен подход за съхранение на ендемитните видове *S. thracica*, *S. bulgarica* и *S. scardica* и ефективен инструмент за по-добро управление и „експлоатация“ на вторичния метаболизъм на растенията от род *Stachys* в бъдеще с цел създаване на т. нар. “растителни клетъчни/тъканни фабрики“ за биосинтез на фармацевтично значими метаболити и хранителни добавки.

Изводи и заключение

Изводите от дисертационния са в пълно съответствие с получените резултати. Приемам посочените научни приноси, които имат оригинален и потвърдителен характер.

За първи път е постигнато *ex situ* съхранение и запазена генетична идентичност на балканските ендемитни видове *S. thracica*, *S. bulgarica* и *S. scardica*, чрез индуциране на *in vitro* стъблени култури и *ex vitro* адаптиране в условия на растежна камера, оранжерия и опитно поле. Условието на култивиране значително повлияват качествения и количествен състав на вторичните метаболити, а оттам и на асоциираната с тях биологична активност. Получена е нова информация за антиоксидантната, радикал улавящата, противовъзпалителната и антимикробната активности на метанолови екстракти, изолирани от *in situ*, *in vitro* култивирани и *ex vitro* адаптирани растения от трите вида и е установена корелация с биологичната активност на идентифицираните групи вторични метаболити при трите изследвани представители от род *Stachys*. За първи път е проследена инхибиращата активност спрямо системата на комплемента на метанолови екстракти, изолирани от *in situ*, *in vitro* култивирани и *ex vitro* адаптирани *S. thracica*, *S. bulgarica* и *S. scardica*. Потвърдено е наличието на фенолетаноидни гликозиди, фенолни киселини, иридоиди и алкалоиди при представители от род *Stachys*. Получена е потвърдителна информация за стимулиращия ефект на растежния регулатор бензиладенин (БА) при *in vitro* мултипликация на растения.

Публикувани статии по дисертационния труд, участие в научни проекти.

Авторефератът отговаря напълно на изискванията, вярно отразява съдържанието на дисертацията и в съкратен вид представя най-важните резултати и приноси. Получените резултати са отразени в 2 публикации: *Metabolites*, IF: 4.9 и *BioRisk*, SJR=0.17. Резултати от дисертационния труд са представяни на 15 научни форума. Докторантката е на първо място във всички статии и в 13 от участията, което е основание да считам, че има съществен принос не само в проведените изследвания, но и при тяхното оформление и представяне. Участвала е в разработването на 6 научни проекта, 5 финансирани от ФНИ при СУ и един финансиран от ФНИ-МОН.

Критични бележки и препоръки.

Познавам асистент Десислава Мантовска от Бакалавърската специалност по Биотехнологии и магистратурата по Растителни биотехнологии. Изключително работлива, скромна и възпитана, последователно надграждаща знания и опит при лечебните растения от изработването на бакалавърска и магистърска дипломни работи до докторската дисертация. Препоръчвам и да се насочи към разработки, свързани с *ex situ* съхранение,

оценка на биологичната активност и приложение на вторични метаболити от биосинтезата и на други перспективни за практиката лечебни растения.

Заключение

Дисертацията на Десислава Мантовска е задълбочено изследване в областта на Растителните биотехнологии, което заслужава висока оценка и напълно отговаря на всички изисквания на ЗРАСРБ и правилниците на БФ и СУ “Св.Кл.Охридски“за неговото приложение. Усвоила е редица методи, извършена е внушителна по обем експериментална работа и са получени научни резултати с оригинален принос. Всичко това ми дава основание убедено да гласувам положително и да препоръчам на почитаемото Научно жури да подкрепи присъждането на образователната и научна степен „доктор” по професионално направление 4.3 “Биологически науки”, научна специалност Физиология на растенията (ин витро култивиране на лечебни растения) на асистент Десислава Иванова Мантовска.

15.09.2022 г.

гр. София

Рецензент:

(проф. д-р Венета Капчина-Тотева)