

РЕЦЕНЗИЯ

на дисертационен труд за присъждане на научната и образователна степен “Доктор”

представен от Десислава Иванова Мантовска

докторант на свободна подготовка в катедра Физиология на растенията към

Биологически факултет на Софийски университет „Св. Климент Охридски”

Тема на дисертационния труд: *Биотехнологичен подход за ex situ съхранение на застрашени видове от род Stachys и изследване на техния фармакологичен потенциал*

Професионална област: 4.3. Биологически науки

Докторска програма: Физиология на растенията (*in vitro* култивиране на лечебни растения)

Рецензент: проф. д-р Елена Томова Якимова, Институт по декоративни и лечебни растения, Селскостопанска академия

Представяне на докторанта въз основа на подадената документация

Десислава Иванова Мантовска е родена през м. април 1991 г. в гр. София. Завършва средно образование в 134-то СОУ „Димчо Дебелянов” – Hebrew School, през 2010 г. През 2014 г. получава висше образование като бакалавър по биотехнологии в Биологическия факултет на Софийски университет „Св. Климент Охридски”. Продължава обучението си в магистърска програма по растителни биотехнологии към катедра Физиология на растенията, БФ, СУ и успешно защитава дипломна работа на тема „*Ex situ съхранение и изследване на антиоксидантния потенциал на балканския ендемитен вид Stachys thracica Davidov*”. В същата катедра е зачислена за докторант на самостоятелна подготовка за периода 15.03.2018 г. до 15.03.2021 г. /Зап. № РД 20-575/15.03.2018 г. на Ректора на СУ/, като срокът на докторантурата е удължен с 6 месеца, считано до 15.09.2021 г. /Зап. № РД 20-1028/ от 21.05.2021 г. Отчислена е с право на защита на 15.09.2021 г. /Зап. № РД 20-2020 от 08.10.2021 г./.. От м. декември 2017 г. и понастоящем работи на длъжност Асистент в катедра Физиология на растенията, БФ, СУ „Св. Климент Охридски”. Междувременно Десислава Мантовска е работила в няколко институции, вкл. като графичен дизайнер. В предходни години е стажувала във фирма Bioplast и в Агробιοинститут. По време на докторантурата е придобила допълнителна квалификация чрез участие в програма Предприемачи в науката към фондация Карол Знание и курс по Иновации и предприемачество във фармацевтиката, био- и технологии в козметиката към Център за приложни науки и иновации. Член е на Съюза на учените в България, секция Биология. Докторантката се отличава и с международен опит, получен чрез две специализации по програма Еразъм плюс: в Университета на Калгари и Университета в Малта и чрез представяне в редица научни форуми в чужбина и у нас с международно участие. Участвала е в 6 научно-изследователски проекта към катедра

Физиология на растенията финансирани от Фонд научни изследвания и тематично свързани с проучванията в дисертацията. Участието в проекти е свидетелство за успешното ѝ интегриране в научния колектив на катедрата и опит за работа в екип.

Процедура по защитата

След предварително обсъждане на дисертационния труд е даден ход за публична защита и е определен състава на Научното жури /Зап. № РД 20-376/ 11.07.2022 г. на Ректора на СУ/. На първото заседание на журито съм избрана за Рецензент. На същото заседание е определена и датата за провеждане на публичната защита.

Декларирам, че в качеството ми на рецензент, не съм в конфликт на интереси с кандидатката по процедурата за ОНС „Доктор” съгласно ЗРАСРБ.

Документацията по процедурата е изрядна.

Оценка на качествата на дисертационния труд

Структура и обем на дисертационния труд. Съобразеност с композиционните изисквания към дисертационния текст

Дисертационният труд е написан на 102 страници и е структуриран според изискванията. Съдържа всички необходими раздели като са спазени обема, логиката в подреждането им и съотношението им, както следва: увод 1 страница, литературен обзор 25 страници, цел и задачи 2 страници, материал и методи 11 страници, резултати и обсъждане 32 страници, изводи 1 стр., заключение 2 стр., приноси 1 стр. списък на научните публикации, участия в конференции и проекти 2 стр. Броят на използваните литературни източници е 174, всички на латиница.

Актуалност и значимост на разработвания в дисертационния труд проблем

Дисертационният труд разглежда важни и актуални проблеми свързани с опазването на биоразнообразието от 3 застрашени от изчезване балкански ендемитни видове: *Stachys thracica* /тракийски ранилист/, *S. bulgarica* /български ранилист/ и *S. scardica* /шарпланински ранилист/ на лечебните растения от род *Stachys*, сем. *Lamiaceae*. Лечебните свойства на различни ендемитни видове са добре доказани, но информацията за конкретните три вида е оскъдна. Не са известни характеристиките на метаболитния им профил, антиоксидатен потенциал и ефектите в терапевтичен, профилактичен и козметичен аспект. Притеснително е че все още няма разработени подходи за съхранението на изчезващите растения, което определя проучването като оригинално. Разширяващата се урбанизация и неблагоприятното антропогенно въздействие върху естествените находища, вкл. строежни дейности и неконтролирано събиране на растителен материал се отразяват отрицателно върху наличието и разпространението на видовете. Нестабилността в променящите се климатичните условия е друг фактор с негативно влияние върху растежните прояви на растенията. Във връзка със съхранение и изучаване на застрашените от изчезване 3 ендемитни за България видове *Stachys*, предлаганият в дисертационния труд биотехнологичен подход за микроразмножаване по метода на тъканните култури *in vitro*, е

иновативен, актуален и алтернативен на общоприетите подходи за консервиране *ex situ* в условия *in vivo*. Значимостта на изследването включва и установяването на неизвестни до този момент характеристики на проучваните видове, като състав на вторични метаболити, биологична активност на екстракти и генетичната стабилност при култивирането в системи за отглеждане *in vitro* и *ex vitro*.

Оценка на дисертационния труд по раздели

Увод: Уводната част е стегнато написана и дава ясна представа за разработваните в дисертацията въпроси, за необходимостта от изследването, приложените изследователски методи и подходи и значението на получените резултати за съхранението *ex situ in vitro* на проучваните застрашени видове ранилист и потенциала за биотехнологичен синтез на ценни биологично активни вещества с потенциал за използване във фармацевтичната и козметична индустрии.

Задълбоченост и изчерпателност на проучването на теоретичните източници

Литературният обзор е изчерпателен и правилно композиран с фокус съобразно тематиката на дисертацията. Откроява се добрата библиографска осведоменост на докторантката, задълбоченост и критичност при представяне и дискутиране на теоретичните знания и приложни постижения в областта на проучването.

Литературната справка е удачно структурирана в 4 основни части съдържащи: ботаническо описание /илюстрирано със снимков материал/ на видовете от род *Stachys*; разпространение на изследваните 3 вида у нас и таксономична характеристика; примери за приложение на представителите от рода в народната медицина, в исторически аспект и с акцент върху употребата им в страните от Балканския полуостров.

Подраздел “*Ex situ* съхранение на представители от род *Stachys*” представя предимствата на методите на биотехнологиите за *in vitro* съхранение на ранилист. Отделено е нужното внимание на трудовете на български и чужди учени в тази насока. В подраздел “Генетична стабилност на *in vitro* култивирани растения от род *Stachys*” се обръща внимание на, рисковете от изменения в генетичната идентичност на растенията в зависимост от условията в естествените местообитания и при култивиране *in vitro* и *ex vitro*. Обобщени са някои от изследванията с молекулярни маркери за идентифициране на полиморфизъм и генетично вариране. В следващите части на обзора подробно са описани метаболити като фенолни съединения, гликодиза вербаскозид, хлорогенова киселина, иридоиди, субстанции в етеричните масла и други метаболити с антиоксидантни и пребиотични свайства, които да били изолирани от видовете от род *Stachys*. Информацията е нагледно систематизирана в таблици. Отделено е специално внимание на биологичната активност на екстрактите и компонентите им вкл. антиоксидантен потенциал и възможности за прилагане при зарастване на рани, цитотоксичен ефект, като противовъзпалително средство и като антимикробни агенти. Добавена е и полезна информация за инхибиторната активност на

екстракти от *Stachys* върху ензими с функции на невротрансмитери /ацетилхолинестераза/, в метаболизма на въглехидратите / α -амилаза и глюкозидаза/ и такива от обмяната на меланина /тирозиназа/

Цитираната в обзора литература е от последните години като не са пропуснати и други по-ранни съществени изследвания. Прегледът на литературните източници показва широката осведоменост на докторантката и задълбочено мислене при разбирането на теоретичните въпроси и представянето на откритията с научна и приложна стойност.

Цел и задачи

Литературният обзор е логично въведение към целта и задачите за постигането ѝ. Целта на разработката е формулирана като „*Съхранение на застрашени и ендемитни видове от род Stachys посредством прилагане на биотехнологичен подход и сравнително метаболитно профилиране и биологична активност на екстракти изолирани от in situ, in vitro култивирани и ex vitro адаптирани растения*”.

Разработени са 8 основни тематично свързани и подредени в логична последователност експериментални задачи. Задачите обхващат проучвания и при трите изследвани вида ранилист, вкл. въвеждане в култура, микроразмножаване *in vitro* и *ex vitro* адаптация на *in vitro* регенерираните растения, проследяване на физиолого-биохимичния статус и проверка за генетична стабилност на *in vitro* и *ex vitro* адаптирани растения, сравнително метаболитно профилиране чрез ЯМР на растения *in situ*, *in vitro* и *ex vitro*, антиоксидантна и радикал улавяща активност на екстракти изолирани от растения *in situ*, *in vitro* и *ex vitro*, антимикробна и противовъзпалителен потенциал на екстрактите и корелационен анализ на получените в съответните задачи експериментални данни.

Операционалност на избраните методи и подходи за изследване

Методичната постановка се базира на интегриран интердисциплинарен подход. Докторантката е усвоила и използвала в проучването широк диапазон от изследователски методи, адекватни за постигането на резултатите по заложената в дисертационния труд цел. Методите са с установена ефективност, коректно и прецизно приложени. Описани са синтезирано, но достатъчно подробно, така че да позволят повторение на съответните лабораторни протоколи.

Използваният биотехнологичен подход за съхранение на видовете ранилист *ex situ* се базира на *in vitro* култивиране и обхваща проучване във всички етапи на процеса на микроразмножаване, вкл. въвеждане на експлантите в *in vitro* култура, мултипликация, вкореняване, отглеждане *ex vitro* и адаптиране на получените микрорастения във фитостатна камера, в оранжерия и на открито в полски условия. Извършен е морфологичен, биометричен, физиологичен, биохимичен и молекулярен анализ на проби от изходния материал от растенията в естествените им местообитания и от култивираните *ex vitro* и *ex vitro*. В етапа на мултипликация са изпитани различни концентрации на цитокинина 6-бензиладенин /БА/. При инициране на *in vitro* култура от семена и за вкореняване са тествани хранителни среди без добавка на растежни регулатори.

Отличава се с използването на съвременен метод за прецизен анализ - Ядрено Магнитен Спектрален Анализ /ЯМР/ за метаболитно профилиране на диворастящите, култивирани *in vitro* и реализираните растения *ex vitro*. Биологичната активност на метанолови екстракти е установена с три различни метода за определяне на антиоксидантен потенциал; антимикробната активност е тестирана при 7 щамове от грам положителни бактерии, причинители на инфекциозни болести при човека и при 1 щам от дрожди. Противовъзпалителната активност е изследвана в еритроцитни култури, чрез т. нар. метод на комплимента включващ определяне на хемолитична активност на екстрактите. Чрез анализ на геномна ДНК, изолирана от листа и с маркери за *sequence-related amplified polymorphism /SRAP/*, са получени данни за генетичната стабилност на *in vitro* и *ex vitro* растенията.

Коректност при събирането и обработката на експерименталните данни

Събирането на данните от експерименталната работа е правилно осъществено. Опитите са проведени с необходимия брой повторения позволяващи недвусмислено тълкуване на вариациите във вариантите и преценка на достоверността за значимост на разликите. Статистическата обработка на данните е извършена с подходящи методи.

Резултати и обсъждане

Резултатите са представени на 14 таблици и 16 фигури, вкл. графики, снимки и 1 схема. Прилагането на описания биотехнологичен подход за разработване на *in vitro* култури от *S. thracica*, *S. bulgarica* и *S. scardica* е позволил оптимизирането на протоколи за *ex situ in vitro* съхранение на тези застрашени от изчезване балкански ендемитни видове. Резултатите показват метаболитния профил и дават информация за биологичния потенциал на метанолови екстракти, изолирани от растящи в естествените местообитания, култивирани *in vitro* и *ex vitro* адаптирани растения във връзка с влиянието на условията в заобикалящата ги среда. От важно значение е, че и при трите растителни вида се наблюдава тенденция за намаляване на количеството на активните метаболити, антиоксидантната, антимикробната и противовъзпалителната активност в процеса на култивиране *in vitro*, но тези показатели се възстановяват след адаптиране на растенията в *ex vitro* условия. Съществено е установеното запазване на генетичната идентичност на видовете, независимо от условията на култивиране. Оригинална и информативна е приложената на фиг. 16 схема илюстрираща хода на проучването, получените сведения и придобитите теоретични знания, както и прогнозни тенденции за допълнителни изследвания и за практическо приложение на резултатите.

Обсъждането на резултатите е извършено въз основа на задълбочен анализ на докладваните в дисертацията данни и реалистичното им интерпретиране от страна на докторанката, като отлично впечатление прави критичността на дискусията и обвързаността ѝ със сведения в светлината на литературните източници.

Оценка на възможностите за използване на получените резултати

Получените резултати дават перспектива за прилагане на експерименталните данни за целите на изследвания и при други видове от род *Stachys*. Освен като открития с фундаментален характер, резултатите биха допринесли при установяването и на други *in vitro* моделни системи за характеризирани на биологичния потенциал на застрашени от изчезване ендемитни лечебни растения и да послужат като иновативна платформа за биосинтез на фармацевтично значими метаболити.

Изводи и приносен характер на дисертационната разработка

В следствие на разработката в дисертационния труд са обобщени 10 извода, които съответстват на получените резултати. Предвид значимостта на установеното, считам че частта от Извод 3 “Установено е, че и трите растителни вида се характеризират със запазена генетична стабилност в процеса на *ex situ* съхранение” е можело да бъде оформена като самостоятелен извод.

Проучването се откроява с 4 оригинални и 2 приноса с потвърдителен характер, които реалистично отразяват новостта на получената информация от експерименталната дейност. Съществени са приносите показващи установената за първи път при проучваните видове биологична активност на извлеките и влиянието на условията на култивиране върху метаболитния профил и генетичната стабилност. Принос е разработената оригинална схема за микроразмножаване. Като цяло изследването обогатява фундаменталните знания за физиолого-биохимичните, метаболитни и молекулярни прояви при *ex situ* съхранение на *Stachys*. Откритията могат да послужат за платформа за бъдещо прилагане на биотехнологичен подход за запазване в условия *ex situ* на тези застрашени лечебни растения. С приложна стойност е приносът очертаващ перспектива за въвеждане на разработения методичен подход при изолиране и/или синтез на активни здравословни субстанции базиращи се на идентифицираните в изследването вторични метаболити. В този смисъл се предвижда постиженията да бъдат усвоени при разработването на компоненти на медикаменти и хранителни добавки в сферата на фармацевтичната индустрия, както и при продукти с козметичен ефект.

Одобрявам и приемам формулираните приноси.

Оценка на езиково-стиловите качества на изложението

Стилът на написване на дисертационния труд е строго научен, граматически издържан и в съответствие с общоприетата и специална терминология. Спазени са правописните и пунктуационни норми в българския език.

Оценка на съответствието на текста на автореферата с текста на дисертационния труд

Авторефератът следва реда на разделите в дисертацията и описва най-съществените резултати и постижения от разработката. Текстът на автореферата е в пълно съответствие с текста на дисертационния труд. Обемът е от 47 страници, което е в рамките на допустимото.

Публикации и участия в научни форуми

Публикационната активност във връзка с дисертацията е напълно достатъчна по изискванията на предходната версия на ЗРАСРБ. Посочени са две публикации от които едната е с висок ИФ /4.9/ и другата е с ИР. Дисертантката е първи автор. Забележителен е броят на представените от докторантката материали от дисертацията на 15 научни форума у нас и в чужбина.

Оценка на авторското участие в получаването на приносите в дисертационния труд и на публикациите по него

Дисертационният труд като експериментална работа, изложение, оформление на изводите и приносите, и написването на дисертационния текст очевидно са лично дело на докторантката, с компетентните напътствия от научния ръководител.

Десислава Мантовска е първи автор в научните публикации към дисертацията.

Въз основа на надлежно проведен анализ за сходство на текста на дисертационния труд с други източници, е установено че намерените незначителни сходства са регламентирани в рамките на допустимите граници и не носят признаци на плагиатство.

Препоръки за насоките на по-нататъшна работа на докторантката

Дисертационният труд е изчерпателен и надвишава очаквания обем на работа. Приносите са ясно очертани, но все още са в сферата на фундаменталните изследвания. Препоръчвам проучванията да бъдат продължени и надградени при настоящите и разширени и при други потенциално застрашени ендемитни видове *Stachys* и, при възможност, продуктите с ценна биологична активност да бъдат лицензирани, което ще позволи директното им прилагане в практиката за нуждите на фармацевтичната и козметична промишлености. Препоръчвам също продължаване на проучванията върху поведението на растежа, физиологичния и биохимичен статус, генетичната стабилност и метаболитно профилиране за идентифицирането на метаболитния спектър при потенциално реинтродуциране *in situ*, с цел получаване на научна информация за възможностите за възстановяване на естествените находища с *in vitro* получени растения. Това ще бъде допълнителен научен и с практическа значимост принос.

Заклучение

В заключение на направената оценка на дисертационния труд, имам удоволствието да изкажа удовлетворение от представения ми материал. Дисертацията напълно покрива и дори надвишава изискванията на ЗРАСРБ и Правилника за приложението му в СУ отнасящи се до получаване на образователната и научна степен „Доктор“; докладва изследване на важен актуален проблем; проучването е с пионерен характер при обектите на разработката; извършено е надлежно чрез съвременен биотехнологичен методичен подход и методи за експериментални анализ, получените резултати са интерпретирани компетентно и умело систематизирани в изводите; приносите основно са оригинални и със съществена фундаментална и приложна стойност. Текстът е написан

интелигентно; дискусиата и боравенето с литературните източници показват задълбоченост и критично мислене на докторантката. Научната продукция към дисертацията се отличава със статии в списания с висок международен ранг. Като цяло дисертационният труд представлява солидна основа за продължаване на работата в теоретичен и приложен аспект. Създава реална перспектива за интегриране на откритията при използване на метода за *in vitro* размножаване при *ex situ* съхранение на проучваните видове ранилист, както и за използване на продуктите от тях във фармацевтичната и козметичната индустрии.

Базирайки се на изложеното по-горе,

С дълбока убеденост предлагам на Уважаемото научно жури и на членовете на Факултетния съвет на Биологически факултет към СУ „Климент Охридски” да оценят по достойнство дисертационния труд и да гласуват положително за присъждане на образователната и научна степен “Доктор” в професионално направление 4.3. Биологически науки, докторска програма Физиология на растенията (*in vitro* култивиране на лечебни растения) на Десислава Иванова Мантовска.

Дата: 09.09.2022 г.

Подпис:.....

Проф. д-р Елена Томова Якимова