

СТАНОВИЩЕ

от доц. д-р **Женя Петкова Йорданова**

Биологически факултет, катедра „Физиология на растенията“, СУ
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 Женя Петкова Йорданова**

Общи основания

Настоящото становище е подготвено във връзка със заповед на Ректора на СУ „Св. Климент Охридски“ № РД 20-376/ 11.07.2022 г. по процедура за защита на дисертационен труд за придобиване на образователна и научна степен „Доктор“ в професионално направление 4.3 Биологически науки, научна специалност Физиология на растенията - ин витро култивиране на лечебни растения. Становището е изготвено в качеството ми на научен ръководител на докторанта, допустимо като заварено положение по стария закон за ЗРАСРБ. Докторант Десислава Мантовска е предоставила всички изискуеми документи съгласно тази версия на ЗРАСРБ и Правилника на СУ „Св. Климент Охридски“ за неговото прилагане. Оригиналността на представения дисертационен труд е установена по законовия ред за отсъствие на плагиатство.

Общо представяне на дисертационния труд.

Дисертационният труд е представен във вид и обем, съответстващи на изискванията и критериите на Правилника за прилагане на ЗРАСРБ в СУ „Св. Кл. Охридски“ по професионално направление „Биологически науки“.

Актуалност, значимост и оригиналност на темата на дисертацията.

Разработването на подходящ метод за съхранение на популациите от видовете от род *Stachys* в България се налага поради тяхното ограничено разпространение и

природозащитен статус, както и продължаващото намаляване на отделните индивиди под влияние на човешката дейност. Темата на дисертационния труд е актуална в няколко аспекта: от една страна работата е насочена към създаването на колекция от органни култури, които са подход за съхранението на видове от р. *Stachys* с консервационно значение и от друга служи, като база за бъдещо разработването на нови източници на биологично активни молекули с фармакологичен потенциал и потенциално приложение в медицината, козметичната и хранително-вкусовата индустрии. Тук 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. Направено е сравнително ЯМР- метаболитно профилиране и оценка на биологичния потенциал на метанолови екстракти, изолирани от от *in situ*, *in vitro* култивирани и *ex vitro* адаптирани *S. thracica*, *S. bulgarica* и *S. scardica*. Дисертационният труд повишава и знанието за биосинтез на фармацевтично значими метаболити, което е ефективен инструмент за управление и по-добра “експлоатация“ на вторичния метаболизъм на растенията от род *Stachys* и по този начин създаване на т.нар. “растителни клетъчни/тъканни фабрики“.

Характеристика на дисертационния труд.

Дисертационният труд е конструиран по приетата стандартната схема в общ обем от 102 стр., като включва: Увод - 2 стр., Литературен обзор - 26 стр.; Цел и задачи - 2 стр.; Материали и методи - 12 стр., Резултати и обсъждане - 32 стр., Изводи и заключение - 4 стр., Приноси - 1 стр. Използвана литература - 16 стр. При изготвянето на труда са спазени всички изискванията за форма, съдържание и съотношение на отделните раздели. Дисертацията е написана на много добър научен стил и на правилен граматически издържан български език. Надлежно са посочени съкращения, което улеснява четенето и оценката на дисертационния труд. Между отделните раздели на дисертацията съществува логическа свързаност, което показва, че докторантката познава задълбочено тематиката. Прави впечатление доброто илюстриране на материала с 14 таблици и 16 фигури, вкл. графики, снимки и 1 схема.

Степен на познаване състоянието на проблема от докторанта.

Докторант Десислава Мантовска показва много добра литературна осведоменост по темата на дисертацията. За подготовката на литературния обзор е използвала

значителен обем научни публикации (174 в целия труд), които са позволили оформянето на добре структуриран и изчерпателен обзор по проблема в светлината на последните научни данни. В този раздел е направена обща характеристика на представителите от род *Stachys* и детайлен преглед на разпространението и таксономичната характеристика на изследваните представители – *S. thracica*, *S. bulgarica* и *S. scardica*. Отделено е внимание на употребата на представителите от рода в етномедицината и е направена подробна справка на идентифицираните вторични метаболити и биологична активност на екстракти, изолирани от представители на род *Stachys*. От целенасочения литературен обзор ясно следва целта на разработката: „*Да се осъществи ex situ 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.*“ За реализирането на целта докторантката формулирали ясно 8 тематично свързани и подредени в логична последователност експериментални задачи.

Оценка за съответствие на избраните методи

За решаването на поставените задачи докторантката прилага интердисциплинарен подход.

Ex situ съхранението на изследваните представители е осъществено чрез прилагане на метод на микроразмножаване, включващ стерилизация, индуциране на *in vitro* органна култура и мултипликация. Получените микрорастения впоследствие са адаптирани *ex vitro* посредством тристепенна аклиматизация във фитотронна камера, оранжерия и опитно поле. Извършен е морфометричен, биохимичен и молекулярен анализ на проби от *in situ* растенията в естествените им местообитания и от култивираните в *in vitro* и *ex vitro* условия. В етапа на мултипликация са изпитани различни концентрации на цитокинина 6-бензиладенин /БА/.

Приложен е Ядрено Магнитен Спектрален Анализ /ЯМР/ за метаболитно профилиране на *in situ*, *in vitro* култивираните и *ex vitro* адаптираните растения *S. thracica*, *S. bulgarica* и *S. scardica*. Биологичната активност на изолираните метанолови екстракти е установена чрез прилагане на методи за изследване на обща антиоксидантна активност и такива, демонстриращи радикал улавящия потенциал на изследваните екстракти. Антимикробната активност е изследвана при 7 щам от грам положителни бактерии, причинители на инфекциозни болести при човека и при 1 щам от дрожди. Противовъзпалителната активност е проследена в еритроцитна култура, чрез т. нар.

метод на комплимента, включващ определяне на хемолитична активност на екстрактите. Чрез анализ на геномна ДНК, изолирана от листа и с използване на SRAP маркери са получени данни за генетичната стабилност на *in vitro* култивираните и *ex vitro* адаптираните растения.

Оценка на получените резултати.

В резултат на проведените изследвания са създадени колекции от *in vitro* и *ex vitro* култури на видовете *S. thracica*, *S. bulgarica* и *S. scardica*, което осигурява *ex situ* съхранението на тези застрашени от изчезване балкански ендемитни видове. Благодарение на създадените моделни системи е постигнато сравнително ЯМР – метаболитно профилиране и изследване на биологичния потенциал на метанолови екстракти, изолирани от *in situ* диворастващи, *in vitro* култивирани и *ex vitro* адаптирани растения от трите ендемитни вида. Най-вероятно първични метаболити, като органични киселини и непротеинови аминокиселини, участват във фин синхрон с вторични метаболити при регулацията на отговора за адаптиране на растенията към променящите се условия на заобикалящата ги среда. И при трите ендемитни вида се забелязва тенденция за намаляване на количеството на фенолните съединения и флавоноидите, а оттам и на антиоксидантния, радикал улавящ, антибактериален и противовъзпалителен потенциал при култивирането им в асептична среда. Въпреки това, биосинтетичният потенциал и свързаната с него биологична активност се възстановяват след адаптиране на растенията в *ex vitro* условия. Установено е запазване на генетичната идентичност на изследваните видове, независимо от условията на култивиране.

Получените резултати дават нова информация за представителите от род *Stachys* и биосинтеза на биологично активни метаболити при променящи се условия на заобикалящата ги среда. Последващи проучвания, свързани с разкриване на механизма на действие на изолирани екстракти и/или фракции в животински *in vitro* и *in vivo* моделни системи, биха допринесли за цялостното охарактеризиране на биологичния потенциал на тези видове и изграждане на иновативна и устойчива платформа за биосинтез на фармацевтично значими метаболити.

Резултатите от дисертацията са обобщени в 10 извода, 4 приноса с оригинален и 2 приноса с потвърдителен характер. Проведените изследвания са отразени в две научни публикации, от които едната е с висок ИФ /4.9/, а другата е с ИР. И в двете публикации докторантката е първи автор. Резултатите от дисертационния труд са представени на 8 научни форума, проведени в България и чужбина.

Заклучение

Представеният дисертационен труд е по актуална и значима тема в областта на растителните биотехнологии и изпълнява напълно изискванията на ЗРАСРБ и специфичните изисквания на Правилника на Софийски Университет „Св. Климент Охридски“. Десислава Мантовска е усвоила редица методи и подходи за планиране, анализ и обработка на експериментални задачи, което я утвърждава като сериозен млад учен с изявен интерес в областта на биологичните науки. Получените резултатите по дисертацията имат оригинален характер и представляват солидна основа за бъдещи фундаментални и приложни изследвания. Индуцираните *in vitro* и *ex vitro* моделни системи от трите изследвани представителя на род *Stachys* ще послужат за последващи проучвания, свързани с разкриване на механизма на действие на изолирани екстракти и/или фракции в животински *in vitro* и *in vivo* моделни системи и биха допринесли за цялостното охарактеризиране на биологичния потенциал на тези ценни растителни видове и изграждане на иновативна и устойчива платформа за биосинтез на фармацевтично значими метаболити.

В заключение оценявам положително и високо дисертационния труд и препоръчвам убедено на уважаемото научно жури да оценят по достойнство представената работа като гласуват положително за присъждане на образователна и научна степен “Доктор” в област 4. „Природни науки, математика и информатика; професионално направление 4.3 Биологически науки, научна специалност Физиология на растенията - *in vitro* култивиране на лечебни растения на Десислава Иванова Мантовска.

14.09.2022 г.

Изготвила становището:.....

(доц. д-р Жения Йорданова)