

Р Е Ц Е Н З И Я

върху дисертационен труд за придобиване на образователната и научна степен “Доктор”

Автор на дисертационния труд: ГЕРГАНА ВАЛЕРИЕВА ГЪЧЕВА – асистент в ИФРГ на БАН, Секция “Експериментална алгология”

Тема на дисертационния труд: “Влияние на култивационни условия върху физиолого-биохимични характеристики и биологични активности на перспективни щамове микроводорасли”

Рецензент: ИРИНА ДИМИТРОВА ПУНЕВА, доц. д-р в ИФРГ на БАН, Секция “Експериментална алгология”

В последните години е обоснован засиленият интерес към нетрадиционни източници на биологично активни вещества, с потенциално приложение във фармацията и медицината. Такъв източник безспорно са водораслите. Това е така, тъй като се докладват резултати, които доказват, че водораслите са продуценти на вътре- и извънклетъчни активни субстанции с различни биологични ефекти, включително антивирусно, антибактериално, атгигъбно, антитуморно и имуностимулиращо действие.

В най-нови публикации от 2013 година се съобщава за продукцията от морски водорасли на α -фактор на туморна некроза, който има не само антитуморна активност, но също индуцира растеж на фибробластни клетки в увредени области чрез предизвикване на ангиогенезна активност. Той също е важен медиатор на някои отговори на тялото, свързани с контрола на храненето, съня и успокояване на болката. От голям интерес е и фактът, че астроцити също продуцират α -фактор на туморна некроза, което предоставя връзка на имунната система с нервната система. Установено е, че продуцирани от водорасли полизахариди, като алгинат, карагенан, фукоидан и порфиран, активират фундаментални функции на имунната система за минимизиране или пълно изключване на вредното действие на различни патогени. Следователно е възможно подобни полизахариди, продуцирани от водорасли, директно или индиректно да функционират в човешкия организъм и да стимулират имунната система макар, че взаимодействията структура - функция все

още не са добре проучени. Доказано е също, че морски водорасли могат да бъдат полезен източник на суровини в създаването на нови лекарства и функционални храни. Установено е, че метанолни екстракти от някои кафяви водорасли показват силна активност при предизвикване на продукцията на човешки β -интерферон *in vitro*, че полизахаридни фракции от морски водорасли притежават макрофагостимулираща активност *in vitro* и *in vivo*.

Тези обстоятелства правят представената за рецензиране работа на ас. Гергана Гъчева особено актуална. Дисертацията касае изучаване влиянието на различни култивационни условия върху растежа и биохимичния състав на представители от два рода цианобактерии, а именно *Gleocapsa* и *Synechocystis*, както и тяхната биологична активност, изразена в антибактериална, антитуморна и фунгицидна активност.

Обектите на изследване са избрани удачно в резултат от продължителен и трудоемък скрининг на 20 водораслови щама, с различна таксономична принадлежност и изолирани от твърде разнообразни в географско и климатично отношение биотопи. Пет от тях са нови български изолати. Единият, от основно изследваните от докторантката обекти, е представител на род *Gleocapsa*. Той е сравнително слабо проучен като продуцент на биологично активни вещества и същевременно се знае малко относно неговите физиологични характеристики. В контраст, в литературата съществуват множество проучвания за другия обект – цианобактерия от род *Synechocystis*. Този подход, на слабо проучен и по-добре изследван обект, дава възможност на докторантката да получи нови, оригинални резултати, които логично да обсъди, ползвайки достъпната ѝ литература, което тя прави успешно.

Дисертационният труд обхваща 143 страници, онагледен е с 32 фигури и 9 таблици. Работата е структурирана добре с правилни пропорции между отделните глави. Библиографската справка е направена въз основа на 459 автора, от които 8 на кирилица, а останалите - на латиница.

Литературният обзор обхваща 32 страници, в които коректно е отразено съвременното състояние на изучавания проблем. Дисертантката показва добра литературна осведоменост, която илюстрира чрез задълбочено систематизиране на

съществуващите понастоящем знания относно продукцията от водорасли на ценни вътре- и извънклетачни метаболити, а именно на каротеноиди, фикобилипротеини, ненаситени мастни киселини, въглехидрати, пептиди, производни на аминокиселините, ароматни съединения и др. В пълнота е отразена и съществуващата достъпна литература, касаеща биологичната активност на тези метаболити. Направен е аналитичен преглед на влиянието на култивационните условия върху растежа, биохимичния състав и продукцията на биологично активни вещества от водорасли с акцент върху ролята на светлината, температурата, съчетаното действие на светлина и температура, както и влиянието на фазата на водорасловия растеж.

Литературният обзор не е механичен сбор от факти по изследвания проблем. Прави приятно впечатление способността на докторанта задълбочено да обсъжда съществуващите до момента данни. Като логично следствие от доброто познаване на литературата следва ясно и конкретно поставената цел с произтичащите за нейното решаване задачи.

Методичният подход е адекватен на поставената цел и задачи. В процеса на научните си изследвания, докторантката е овладяла и използва успешно широк набор от класически и модерни методи, както и методи за статистическа обработка на получените експериментални данни, което гарантира достоверност на представените резултати. Безспорно достойнство на предоставения ми за рецензиране труд е стремежът на докторантката да прилага комплексен подход в процеса на изучаване на *Gleocapsa sp.* и *Synechocystis sp.*, поставени както при оптимални култивационни условия, така и подложени на различни форми на абиотичен стрес. Този подход се изразява в поэтапно провеждане на физиологични и биохимични изследвания, последвани от изучаване на биологичната активност на вътре- и извънклетъчни водораслови екстракти, както и на конкретни метаболити като функция от променящите се култивационни параметри. Проследена е антибактериална активност на *Gleocapsa sp.* и *Synechocystis sp.* чрез тестиране на 7 опасни болестотворни патогенни и условнопатогенни бактерии: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Bacillus cereus*, *Echerichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Yersinia enterocolitica* и патогенната гъба *Candida albicans*.

Резултатите и тяхното обсъждане са изложени на 54 страници. Те са добре структурирани, онагледени и логично тълкувани. Получените резултати убедително доказват, че новоизолираните и проучвани щамове *Gleocapsa* и *Synechocystis* са надеждни източници на вещества с потенциално медицинско и фармацевтично приложение.

Като следствие от прецизно и в голям обем извършените експерименти, в дисертационния труд се открояват методични, научни и научноприложни приноси.

Към методичните приноси се отнася:

- Доказаната за водорасли приложимост на метода за «регистриране на естеразна активност чрез оцветяване в гел» и използването на този ензим като маркер за настъпили промени в метаболитната активност на алгални култури.

По-значимите научно-приложни приноси касаят:

- Установяване на биологична активност на екстракти и вещества с цианобактериален произход, подтискаща развитието на грамположителни и грамотрицателни болестотворни бактерии, както и с фунгициден ефект по отношение на *Candida albicans*.

- Несъмнен биотехнологичен принос е регистрирането на цитотоксична активност на изследваните биологичноактивни вещества с водораслов произход по отношение на HeLa клетки – туморна клетъчна линия от карцином на цервикса.

- Установяване на култивационни условия и фаза на растеж, при която биологичната активност на екстракти и метаболити от *Gleocapsa sp.* и *Synechocystis sp.* имат най-висока активност и най-широк спектър на действие срещу болестотворните бактерии, гъби и HeLa клетки.

- Доказване възможността *Synechocystis sp.* R 10 да бъде ползван като продуцент и източник на фикобилипротеини.

- Изоллирани са и се поддържат в музейна сбирка 5 нови български щамове зелени и синьо-зелени микроводорасли.

Към приносите с фундаментален характер се отнася:

- Характеризиране на изоензимния профил на ключови антиоксидантни ензими, както и на протеази и естерази, изолирани от *Gleocapsa sp.* и *Synechocystis sp.* и настъпващи промени в него, като следствие на екстремни култивационни

ситуации. Установен е специфичен отговор на отделни изоформи на всеки от изследваните ензими. Тези резултати имат оригинален характер и са представени за първи път.

Към дисертационния труд имам следните бележки и препоръки:

- Литературният обзор започва с обща характеристика на водораслите и тяхното значение за екологията и науката в обем от 10 страници. Тези данни имат общ и популярен характер макар, че показват широката алгологична осведоменост на Гъчева. Те нямат пряко отношение към изучавания проблем и би могло да бъдат избегнати.

- Цианобактериите *Gleocapsa sp.* и *Synechocystis sp.*, които са основни обекти на проучването, са определени само до род. Необходимо е в бъдещи публикации те да бъдат определени до вид, независимо от тудоемкостта и отговорността на този процес.

- В повечето случаи, отделните параграфи от глава «Резултати и обсъждане» започват с методично въведение. По-коректно би било то да бъде позиционирано в раздел «Материал и методи».

- Често в текста се използва терминът «културална среда», което означава хранителната среда на отглеждане, вместо «отделяния в културалната среда». В същност се изследват и се имат предвид отделенията на водораслите след достигане на определена растежна фаза.

- В заглавието на таблица 4 терминът «Антимикробна активност» да бъде заменен с «антибактериална и антигъбна активност», тъй като в таблицата се визират както бактерии, така и гъбата *Candida albicans*.

- При обсъждане динамиката в активността на протеазите е добре да се потърси корелация с количеството на разтворимите клетъчни белтъци и общото състояние на клетките. Това е така, тъй като е известна ролята на протеазните активности в стремежа на растителните клетки да отстранят увредените протеини при прекомерно стресово увреждане на белтъците.

- Като препоръка за бъдещи изследвания е да се обърне внимание на пигментите С-фикоцианин и Ало-фикоцианин и тяхното приложение в

медицината, тъй като за тях е известно, че влияят върху хемопоезата и по-точно върху диференциацията на стволовите клетки.

По темата на дисертационния труд докторантката е публикувала 3 статии, в 2 от които които Гьргана Гъчева е водещ автор. Една от статиите е публикувана в чуждо списание с IF – J. Appl. Physiol.; една в българско списание – Gen. Pl. Physiol. и една в пълен текст в сборник от национална конференция. Докторантката има участия в 5 национални и международни научни форуми.

Авторефератът е изготвен съгласно изискванията и правилно отразява получените резултати и научните приноси на дисертационния труд.

З А К Л Ю Ч Е Н И Е

Докторантката Гьргана Гъчева познава добре литературата, свързана с изучаване на проблеми, касаещи проучване влиянието на различни култивационни условия върху растежа, биохимичния състав и биологична активност на представители от отдел *Cyanoprokaryota*. Тя владее съвременни и класически методи, които прилага творчески и успешно за разрешаване на поставените в дисертацията цели и задачи. Извършената експериментална работа е с голям обем и е проведена прецизно и качествено. По-голямата част от изследванията имат оригинален характер. Получените резултати безспорно ще послужат като фундамент за бъдещи разработки с теоретичен и приложен характер. Считаю, че настоящият дисертационен труд отговаря на изискванията на Правилника за придобиване на научни степени и за заемане на академични длъжности в ИФРГ, във връзка с което си позволявам да предложа на почитаемите членове на Научното жури-ИФРГ да присъдят на асистент Гьргана Валериева Гъчева образователната и научна и степен “Доктор” по специалност «Физиология на растенията – 01.06.16» .

21.01.2013г.

София

доц. д-р И. Пунева