

## АВТОРСКА СПРАВКА

за научните приноси на трудовете на гл. ас. д-р Веселина Стоянова Мерхар катедра "Биология, медицинска генетика, микробиология" МФ при Университет „Проф. д-р Асен Златаров“ – Бургас представени за участие в конкурс за заемане на академична длъжност „доцент“ в област на висшето образование 4. Природни науки, математика и информатика, професионално направление 4.3. Биологически науки, научна специалност „Клетъчна биология“ в Университет „Проф. д-р Асен Златаров“ – Бургас, обнародван в „Държавен вестник“, бр. 45/17.06.2022 г.

Кандидата участва в конкурса със следния брой научни публикации и участия в научни форуми:

- Публикации в списания с квартали - 12
- Публикувана глава от книга или колективна монография – 2
- Монографии – 1
- Публикации в рецензирани сборници и списания от международни научни форуми – 6
- Доклади и постери на международни форуми – 16
- Доклади и постери на национални форуми – 4
- Участие като ръководител в студентски научни сесии - 3

Научната продукция на кандидата основно се отнася към визуализация и охарактеризиране на различни клетъчни компоненти, както и клетъчен отговор към стрес, най-вече предизвикан от инфекции. Ранните изследвания са проведени върху растителен материал и описват измененията в клетките на гостоприемника в резултат на взаимодействието растение-патоген. На по-късен етап натрупаният изследователски опит и разработени методи, като имунохистохимия и имуноцитохимия, в съчетание с най-съвременни микроскопски техники, са приложени върху плаценти от пациенти в състояние на прееклампсия, инфектирани с ХИВ (HIV – Human Immunodeficiency Virus).

Като цяло научните приноси строго могат да бъде отнесени към научна област 4. Природни науки, математика и информатика, професионално направление 4.3. Биологични науки, научна специалност „Клетъчна биология“ и могат да бъдат групирани в зависимост от проектите (всички международни) с чийто финансиране е възможно провеждането на експериментите.

**1. Биохимично-молекулярно изследване на устойчивостта на пшеница към листна ръжда.**

За първи път са проведени микроскопски и биохимични анализи върху селектиран сорт пшеница носещ ген (Lr35) за устойчивост към листна ръжда. Установени са механизмите и измененията на клетъчно и молекулно ниво, които водят до тази устойчивост. В тази връзка са проведени:

- a.** подробни хистопатологични изследвания на проникването на патогена в растителните тъкани, както и начина, по който той колонизира тъканите.
- b.** флуоресцентно-микроскопски изследвания на свръхчувствителния отговор (HR) в тъканите на устойчивите към заболяването растения (т.е. тези носещи Lr35 гена). Свръхчувствителният отговор е механизъм, използван от растенията за предотвратяване разпространението на микробната инфекция. Той е аналог на вродения имунитет при животните и човека и се характеризира с бърза смърт на клетките в областта около инфекцията, което ограничава растежа и разпространението на патогена към други части на растението.
- c.** биохимични изследвания на група протеини изолирани от междуклетъчното пространство на листни тъкани съдържащи гена Lr35. Три от тези протеини се отнасят серологично към  $\beta$ -1,3-глюканидаза – ензими от групата на т.нар. свързани с патогенезата (PR – pathogenesis related) протеини. Те се индуцират в резултат на инфекция и са част от индуцираната (системна) устойчивост на растенията към инфекция, която е еквивалент на придобития имунитет при животните и човека. Един от белтъците беше идентифициран като хитиназа – също PR протеин. В допълнение беше наблюдавано повишено ниво на пероксидаза (ензим свързан с производството на свободни радикали, които съпътстват свръхчувствителния отговор).

Изследванията са публикувани в 3 последователни статии (№7, 8 и 9 и 10 в справката за изпълнението на минималните изисквания посочени в ПУРПНСЗАД) и водят до 129 цитирания в международни списания. Резултатите също така са представени като доклади и постери на редица конференции в ЮАР (6, 7, 8 и 9 от списъка на доклади и постери на международни форуми).

**2. „Влияние на микофлората върху увреждането на рекалцитрантните семена по време на тяхното краткосрочно хидратирано съхранение“ и „Микроскопски**

## изследвания на последствията от гъбични инфекции в рекалцитрантни и ортодоксални семена“

Актуални проекти върху т.нар. рекалцитрантни семена – семена, които не издържат на изсушаване. Това води до невъзможност за съхранението им за дълъг период от време. От друга страна ако се съхраняват в свежо състояние, тези семена са подложени на инфекции поради високото съдържание на вода в тъканите им, което е благоприятна среда за патогените. Най-често срещани са гъбичните инфекции причинени от *Fusarium moniliforme*. Поради невъзможността за съхранение на тези семена много рекалцитрантни видове, предимно тропични и субтропични са застрашени от изчезване, което прави изследванията върху тези видове доста актуални. Научните приноси на трудовете 2, 3, 4 и 14 посочени в справката за изпълнение на минималните изисквания са свързани с проследяване на измененията настъпващи в клетките на различни видове рекалцитрантни семена след инфекция с *Fusarium moniliforme*.

- a. Началните изследвания показват, че въпреки високата активност на ензимите  $\beta$ -1,3-глюканаза и хитиназа в рекалцитрантни семена на *Avicenia marina* след инфектиране с *Fusarium moniliforme*, инфекцията прогресира, което означава, че други важни механизми са подтиснати или не присъстват в тези семена, което ги прави силно податливи на инфекция.
- b. Сврѣхчувствителният отговор, който е особено важен за предотвратяване на разпространението на инфекцията в тъканите отсъства при тези семена.
- c. Имунно-ТЕМ (трансмисионна електронна микроскопия) резултатите с използването на антитела срещу  $\beta$ -1,3-глюканаза, конюгирани с колоидно злато показват, че в свежи семена ензимът  $\beta$ -1,3-глюканаза е изцяло ограничен до вакуолите. В по-късен етап от инфекцията  $\beta$ -1,3-глюканазата се наблюдава в клетъчната стена и около проникващата гъбна хифа.

В обобщение на горните резултати е предложена следната хипотеза:

Свежи семена на *Avicenia marina* съдържат PR-протеини като  $\beta$ -1,3-глюканаза. Тези ензими, обаче, са концентрирани във вакуолите и не са в състояние да достигнат до навлизащия в гостоприемника патоген. В хода на инфекцията с *Fusarium moniliforme*, те напускат вакуолите и се локализируют в клетъчните стени и междуклетъчните пространства, но това е твърде късно, тъй като патогенът вече е колонизирал тъканите. Това забавяне на имунния отговор, заедно с липсата на сврѣхчувствителен отговор, по всяка вероятност са един от решаващите фактори за високата чувствителност на рекалцитрантните семена към гъбични инфекции.

Тази хипотеза е представена на 8<sup>-ми</sup> Международен семинар по семена в Брисбън, Австралия през 2005г., а резултатите са публикувани като глава в

книгата на Стив Адкинс, Сара Ашмор и Шелдън Нейви – „Seeds: Biology, Development and Ecology“.

### 3. Реакциите на нуклео- и цитоскелета към дехидратация в рекалцитрантни семена на *Trichilia dregeana*

Проект върху друг аспект на поведението на рекалцитрантните семена, а именно силната им чувствителност към изсушаване, оттам и невъзможността да бъдат съхранени за по-дълъг период от време. Изследванията са изцяло микроскопски и включват:

- a. ТЕМ изследвания на състоянието на клетъчните органели в семена подложени на дехидратация. Установени са значителни ултраструктурните промени в клетките като: аномалии във формата на ядрото, неестествено кондензиране на хетерохроматина, промени в клетъчната мембрана и междуклетъчното пространство и др. Много характерно е струпването на митохондрии в областта на клетъчната мембрана. Всичките тези изменения говорят за невъзвратими промени в ултраструктурата на семената по време на дехидратацията.
- b. С помощта на имунофлуоресцентни методи за първи път са показани нарушения в структурата на цито- и нуклеоскелета на зародишите на *Trichilia dregeana* – рекалцитрантен вид разпространен в ЮАР, който е сериозно застрашен от изчезване. Предложен е метод за директна визуализация на нуклеоскелета на клетките на тези семена, който има принос в клетъчната биология, поради трудностите във визуализацията на вътрешната ядрена ламина. По тази причина някои автори все още отричат съществуването на вътрешен ядрен скелет и като нуклеоскелет разглеждат само външната ламина лежаща непосредствено под ядрената мембрана.

Изследванията от 2 и 3 са публикувани в трудове № 4 и 14 в справката за изпълнението на минималните изисквания и водят до 28 цитирания в международни списания. Резултатите са докладвани на различни научни форуми в ЮАР, Австралия и Унгария (1, 2, 3 и 4 от списъка на публикации в рецензирани сборници от научни форуми и 11, 12 и 13 от списъка на доклади и постери на международни форуми). Непубликуваните от тези изследвания резултати санаскоро включени в авторска монография „Имунофлуоресцентни методи за визуализация и анализ на цито- и нуклеоскелета на клетката“, ISBN 978-954-471-874-9, също включена в справката за изпълнението на минималните изисквания.

#### 4. Плацентарна лимфангиогенеза при прееклампсия

Опитът натрупан по време на предходните проекти върху имунохистохимията и използването на съвременните микроскопски техники и софтуери е използван в този проект с цел оценка на имуноекспресията на LYVE-1 и PODOPLANIN (два лимфни маркера) в плацентата на инфектирани с ХИВ нормотензивни жени спрямо жени с прееклампсия. Разпределението на белязаните с антитела LYVE-1 и подопланин се наблюдава микроскопски, а тяхното количество се определя морфометрично по степента на оцветяване.

Това проучване дава нова представа за диференциалното разпределение на лимфните маркери, LYVE-1 и подопланин в кръвообращението на плода при HIV-инфектираните жени с прееклампсия. То показва и предимствата на компютърния морфометричен анализ на изображенията като надежден инструмент за количествено определяне на имунооцветяването в биологична тъкан.

Изследванията са публикувани в трудове № 1 и 13 в справката за изпълнението на минималните изисквания и водят до 7 цитирания в международни списания. Резултатите са докладвани на Международния Симпозиум по Биоинформатика и Биомедицина, 8-10 октомври 2020, Бургас.

15.09.2022г.

гр. Бургас

Преподавател:



/гл. ас. д-р Веселина Мерхар/