

## РЕЦЕНЗИЯ

**върху дисертационен труд за придобиване на образователната и научна степен „доктор”**

**Автор:** Мартин Димитров Димитров, редовен докторант към Катедра Генетика на СУ „Св. Кл. Охридски”- София

**Тема:** АНТИОКСИДАНТНА АКТИВНОСТ НА ПЧЕЛНИ ПРОДУКТИ И ВЛИЯНИЕТО ИМ ВЪРХУ ПОДВИЖНОСТТА НА ТУ1 РЕТРОТРАНСПОЗОН В ДРОЖДИ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

**Рецензент:** проф. д-р Любомир М. Стоилов, завеждащ секция Молекулярна генетика, ИФРГ- БАН

Дисертантът Мартин Димитров е придобил бакалавърска степен по молекулярна биология и магистърска степен по генетика в Биологическия факултет на СУ „Св. Кл. Охридски”. Трудовата си дейност започва през 2006 г. като молекулярен биолог в Института по Кробиология и Хранителни Технологии. През периода 2009-2012 разработва дисертация като редовен докторант към катедра Генетика на Биологическия факултет на СУ „Св. Кл. Охридски” под ръководството на доцент д-р Маргарита Пешева. Носител е на награда за млад изобретател на Фондация Еврика за 2011 г.

Представеният от Мартин Димитров дисертационен труд съдържа 152 страници, включващи 34 фигури, 19 таблици и библиография. Дисертацията е изградена по класическата за такива разработки схема - увод, литературен обзор, цели и задачи, материали и методи, резултати, дискусия, приноси и литература, включваща 282 литературни източника, практически всички на латиница. Въз основа на получените резултати са формулирани 6 основни извода, както и 4 научни приноса. Списъкът на научните публикации във връзка с дисертационния труд включва 2 публикации в авторитетни международни списания с импакт фактор (общ импакт фактор 6,872), 1 публикация в пълен текст на национален научен форум, 1 участие в глава от книга и 1 патент, както и 5 участия в национални научни форуми с доклади и постери.

Дисертационният труд е разработен в една интензивно развиваща се напоследък област на генетичната токсикология при еукариотите, свързана с оценка на антиоксидантната активност на натурални природни продукти в клетъчни оценъчни

системи *in vivo* след въздействие с мутагени и канцерогени с генотоксичен ефект. Системата, разработена в дисертацията, се базира на присъствието и функционалните характеристики на ретротранспозона Ty1 в генома на дрождите *Saccharomyces cerevisiae*.

LTR-ретротранспозоните са широко представени подвижни генетични елементи в генома на еукариотите, наподобяващи по структура и механизъм на репликация ретровирусите. Разпространяват се чрез обратна транскрипция на мРНК и интегриране на новосинтезираната кДНК в хромозомите. Въпреки, че подвижността им често се свързва с формирането на наследствени болести и туморогенеза, съществуват и неоспорими експериментални доказателства за ролята им като основна движеща сила в геномната еволюция. LTR-ретротранспозоните се репресират чрез различни механизми на генно мълчание или геномни фактори, подтискащи жизнения им цикъл, но могат да бъдат и активирани посредством разнообразни стресови въздействия от ендогенно и екзогенно естество. Установено е също, че генерирането на реактивоспособни кислородни видове (РКВ) е свързано с транспозиция на Ty1 ретротранспозона. От друга страна меда и пчелните продукти са с доказана антиоксидантна активност. Всичко това обуславя несъмнената актуалност и иновативност на дисертацията в тематично отношение.

Литературният обзор, заемащ около една трета от обема на дисертацията, представлява обстоен и критичен преглед на състоянието на проблема. Представена е детайлна характеристика на генома и клетъчния състав на *Saccharomyces cerevisiae*, Ty ретротранспозоните, механизмите на транспозиция и тяхната регулация, характеристика и механизми на образуване на реактивните кислородни видове (РКВ), клетъчните източници на РКВ и повредите, генерирани от тях. Разгледани са защитните механизми срещу оксидативен стрес, както и различните видове антиоксиданти. Съществено внимание е отделено на характеризиране на антиоксидантните активности на пчелните продукти (мед, пчелно млечице и прополис), химическите и биологичните им свойства, антиоксидантните свойства на меда и антитуморния потенциал на прополиса.

Като цяло обзорът изпълнява основната си функция да дисектира съвременното състояние на темата и да осветли нерешените въпроси и проблеми, но страда и от някои недостатъци. Обширният и информативен илюстративен материал (9 фигури) представлява изключително заемки от чуждестранни литературни източници, които, макар и походящо подбрани, са представени в английския им вариант, което не

намирам за много удачно. Някои от разделите биха могли да бъдат изложени значително по-синтетично. Би могло да се желае повече и по отношение на прехода от предходните литературните данни и интерпретацията им към обосновка и дефиниране на основната цел и задачи на дисертацията. С формулировката на последните съм принципно съгласен, но някои от тях биха могли да бъдат обединени, без от това да страда същността им.

Методичният раздел, както е прието за дисертация от такъв ранг, представя подробни експериментални протоколи на използваната методология, като в някои случаи, например раздел «Спектрофотометрично измерване на плътността на клетъчната култура» описанието на процедурата дори надхвърля стандартната изчерпателност. Към този раздел имам и някои въпроси. При прилагането на количествения *Tu1* транспозиционен тест посредством определяне честотата на транспозиция чрез маркерен ген освен контроли, съдържащи равен обем разтворител на съответния канцероген, използвани ли са и чисто контролни варианти. Вместо термина „пъти нарастване честотата на транспозиция“ (ПНЧТ) не би ли било по-удачно да се използва процентното нарастване, или това е общоприет критерии за такива тестове. За по-добро онагледяване някои от средите биха могли да бъдат представени в табличен вид, а не описателно, по отношение на условията на центрофугиране освен оборотите трябва да е указан и типа на ротора или алтернативно ускорението. Не е посочен произхода на пчелния мед.

Търсенията в дисертацията са групирани в 3 основни изследователски направления: i. Индукция на *Tu1* ретро-транспозиция посредством канцерогенни агенти в генома на *S. cerevisiae*; ii. Анализ на корелативни зависимости между окислителния стрес и активиране на *Tu1* ретро-транспозицията; iii. Оценка на антиоксидантния потенциал на български пчелни продукти, базирана на *Tu1* транспозиция.

Потенциалът на канцерогените да провокират транспозиция е изследван при използване на дрожден щам DG1141sec53 с увеличена чувствителност и пропускливост на клетъчната стена. Интерес представляват данните за значимо повишаване на честота на транспозиция след прилагане на мощни химически мутагени с потенциален канцерогенен ефект и различен механизъм на действие – алкилиращите агенти етилметан сулфонат и метилметан сулфонат и инхибиторът на клетъчното деление и мощен кластоген 4-нитрохинолин оксид, докато след третиране с биоцида с мутагенно действие натриев азид такъв ефект практически липсва. В тази връзка, макар че проблемът е дискутиран в дисертацията, бих поставил въпроса кои са вероятните

механизми, обуславящи подчертано многофакторната зависимост на ТУ1 ретротранспозицията в генома на дрождите. В това отношение интерес представляват и получените в дисертацията потвърдителни резултати показващи, че използваните канцерогени с повишаващ ефект спрямо нивото на РКВ в дрожди *Saccharomyces cerevisiae* влияят и на подвижността на Ту1 транспозона. Връзката между нивото на РКВ и честотата на Ту1 транспозицията е опосредствана и от факта, че прилагането на гасители на РКВ елиминира активирането на Ту1 транспозицията. Установена е пропорционална зависимост на Ту1 транспозицията от нивото на РКВ (супероксидните аниони O<sub>2</sub><sup>-</sup>) след въздействие с широк спектър от агенти като бензо(а)пирен (В(а)Р), хромVI (CrVI), арсен, олово, цинк и метилметан сулфонат (ММС). Тези резултати са предпоставили разработването в хода на дисертацията на принципно нова и ефективна тест-система - т.н Ту1антиРКВ тест за количествено определяне на антиоксидантната активност на продукти от различен произход.

Съществен елемент от този тест представлява използването на щама *S. cerevisiae* 551 *rho*<sup>+</sup>, характеризиращ се с мутантно-отстранена пермеабилитетна бариера и маркиран Ту1транспозон (съдържа локус *his3Δ200:TymHIS3AI*). По този начин гена *HIS3* е функционален само ако Ту1маркираният транспозон осъществи транспозиция. Полученият транспозант е HIS<sup>+</sup>, като всяка HIS<sup>+</sup> колония означава една нова транспозиция на маркирания Ту1 транспозон и по броя на HIS<sup>+</sup> колонии може да се определи количествено честотата на Ту1 транспозицията. Принципната новост тук е обстоятелството, че за разлика от други известни тестове за антиоксидантна активност, базирани на оценка на РКВ чрез химични реакции, Ту1антиРКВ теста дава възможност за количествено определяне промяната в Ту1 транспозицията, т.е. базира се на един вътреклетъчен биологичен процес.

Определянето на антиоксидантната активност на пчелните продукти – мед, пчелно млечице и прополис посредством Ту1анти-РКВ теста обяснимо заема една значима част от получените резултати. Калибрирането на теста е извършено след третиране с прополис и прилагането на агента с антиоксидантно действие N-ацетилцистеин след обработка с четиривалентен хром, като данните показват еднозначно неговия потенциал като гасител на РКВ. Определена е антиоксидантната активност на пчелно млечице в 6 различни концентрации по отношение индукцията на Ту1 транспозиция от 5mM CrVI. Те показват експоненциална зависимост на отчетената антиоксидантната активност спрямо концентрацията на пчелното млечице - феномен, който при досега използваните тестове не е наблюдаван и показва високата

чувствителност на Ту1анти-РКВ теста. Анализирани са и антиоксидантната активност на пчелен мед в 4 различни концентрации по отношение на индуцираната Ту1 транспозиция от 5mM CrVI. Сравняването на антиоксидантните активности на трите пчелни продукта показва, че най-активен е прополиса, следван от пчелното млечице и пчелния мед, като се хипотезира корелация между по-високият антиоксидантен потенциал на прополиса и съдържанието на фенетил естер на кафеената киселина (CAPE). Като цяло получените резултати показват, че при използване на Ту1антиРКВ теста, прополисът, пчелното млечице и медът проявяват по-голяма активност за неутрализиране на РКВ, отколкото същите продукти, изследвани с други клетъчни тестове, което показва високата му чувствителност.

Логично изследванията в дисертацията са насочени по-нататък към анализ на молекулните механизми на функциониране на Ту1антиРКВ теста. За изследване ефекта на H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> са използвани *rho*-мутанти, получени чрез третиране на диви *rho*<sup>+</sup> клетки на *S.cerevisiae* с етидиев бромид. Данните показват, че *rho*-мутантите не съдържат РКВ, но ги генерират при навлизане на H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в клетките, водещо до активиране на Ту1 транспозицията. Прилагането на у1антиРКВ теста с H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и *S. cerevisiae rho*- показва пропорционална зависимост между антиоксидантната активност и концентрацията на тестируания агент, което е коренно различно от данните при Ту1антиРКВ теста, проведен с щам *S. cerevisiae 551 rho*<sup>+</sup>. Освен това е установено, че увеличените нива на всички РКВ, а не само на O<sub>2</sub><sup>-</sup>, участват в канцероген-индуцираната Ту1 транспозиция. Фактът, че мутация или разрушаване на гена *YAP1* блокира синтеза на съответния белтъчен продукт, при което системата за неутрализиране на пероксиди не функционира, е позволил да се изследва още по-задълбочено ролята на H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в канцероген-индуцираната Ту1 транспозиция. Използван е тестерен щам 551 с инактивиран ген *YAP1* и е изследвана честотата на Ту1 транспозицията в получените *yap1Δ* клетки. Резултатите са показали, че повишените вътреклетъчни концентрации на H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> при неактивна Yap1-зависима защитна система водят до повишаване подвижността на Ту1 транспозона след канцерогенно третиране, която е по-висока от тази при функциониращ ген поради високото ниво на РКВ, продуцирани в клетките.

Фактологията, представена в този раздел, е внушителна като обем и съдържание. Основната ми забележка тук касае изложението на получените резултати, което в някои случаи е доста фрагментирано и това понякога затруднява възприемането им. Някои от данните, представени в самостоятелни фигури, биха могли да бъдат обединени, без от това да пострада представителността и осмислянето им, например

една част от резултатите върху антиоксидантната активност на пчелните продукти. Хистограмите и кривите, отразяващи корелационните зависимости между изследваните параметри не са представени със статистическите отклонения, въпреки, че в текста и описанието на фигурите броят на експерименталните повторения, S.D. и P са пунктуално описани. Освен това в доста случаи информацията е според мен ненужно дублирана и като крива и като хистограма - напр. Таблица 11 и Фигура 14, Таблица 16 и Фигура 30. Прави добро впечатление обаче умело вмъкнатия оценъчен елемент при излагането на резултатите.

Получените в дисертацията експериментални данни дават възможност за формулиране на няколко съществени извода. Преди всичко е доказана пряка зависимост от пропорционален характер между канцероген-индуцираната Tu1-ретротранспозиция и нивото на генерираните РКВ в дрождените клетки. На тази основа е създадена една иновативна и много чувствителна тест-система за определяне на биологичната активност на антиоксиданти с канцерогенни и мутагенни свойства - т.н. Tu1антиРКВ тест. При тази система зависимостта между антиоксидантна активност и концентрацията на агента има експоненциален характер за разлика от аналогични тест-системи, където зависимостта между тези компоненти е пропорционална. Есенциалната новост на теста се изразява в базирането му на един достъпен и възпроизводим в качествено и количествено отношение вътреклетъчен феномен, какъвто е канцероген-провокираната транспозиция на ретротранспозона Tu1 в генома на дрождите *Saccharomyces cerevisiae*. Изяснени са и някои от молекулните механизми, лежащи в основата на тази индуцирана транспозиция, като е установено, че биологичната активност на агентите с антиоксидантен ефект е в пряка зависимост от това дали реактивните кислородни форми се генерират ендогенно или екзогенно от съответните ефектори. С помощта на Tu1антиРКВ-теста са проведени комплексни изследвания на антиоксидантна активност на пчелните продукти прополис, пчелно млечице и пчелен мед от Български произход, като в този ред е установена понижаваща градация на антиоксидантните им свойства.

Основните теоретични, методични и практически приноси на дисертацията са свързани с генезиса, разработването и приложението на високочувствителна тест-система с доказан потенциал за определяне на биологичната антиоксидантна активност на канцерогенни и мутагенни агенти от различно естество въз основа на активиране на ретротранспозона Tu1 в генома на дрожди *S.cerevisiae* вследствие на генериране на реактивоспособни кислородни форми. Ефективността и чувствителността на тази

система е валидирана успешно и чрез проведения комплексен анализ на антиоксидантните свойства на пчелни продукти от български произход, като е определен специфичния антиоксидантен потенциал на прополиса, пчелното млечице и пчелния мед. Създаването на Tu1антиРКВ–теста предпоставя провеждането на бъдещи комплексни проучвания върху антиоксидантната активност *in vivo* и на редица други важни от здравна и екологична гледна точка компоненти на околната среда и разширяване на възможностите за оценка на генотоксичните ефекти от тяхното въздействие.

### **Заключение:**

Представената за рецензиране дисертациона разработка във всички нейни съществени компоненти отговаря на изискванията на ЗРАС в РБ и на Правилника за приложението му. Изготвеният от дисертанта автореферат отразява адекватно и изчерпателно основните резултати, изводи и научни и научно-приложни приноси на дисертацията. Получените експериментални резултати са публикувани в редица реномирани международни и български издания и форуми. Едно от основните практически постижения на дисертацията, свързано със създаване на ефективен тест за количествено определяне на антиоксидантна активност в живи клетки, е получило патентно признание и защита.

Въз основа на изложеното във връзка с дисертационния труд, неговите качествени характеристики, както и иновативния му и приносен характер за теорията и практиката на еукариотната генетична токсикология, убедено препоръчвам на Уважаемото Научно жури да присъди на Мартин Димитров Димитров, докторант към катедра Генетика на БФ при СУ „Св. Кл. Охридски”, научната и образователна степен „Доктор”, професионално направление „Биологични науки” ш. 4.3., научна специалност „Генетика”.

10.04.2013 г.

/Л. Стоилов/