

## РЕЦЕНЗИЯ

за дисертационния труд на Мартин Димитров Димитров на тема: "Антиоксидантна активност на пчелни продукти и влиянието им върху подвижността на Tu1 ретротранспозон в дрожди *Saccharomyces cerevisiae*"  
за присъждане на образователна и научна степен "доктор" по професионално направление 4.3. Биологични науки (Генетика)

Рецензент: доц. д-р Благовеста Тодорова Гочева,  
Биологически факултет на СУ „Св. Климент Охридски”

### 1. Биографични данни на кандидата.

Мартин Димитров Димитров е роден през 1983 г. в София. Висшето си образование завършва през 2005 г. като бакалавър по молекулярна биология и през 2007 г. като магистър по генетика в Биологическия факултет на Софийския университет "Св. Кл. Охридски". В продължение на 3 години (2006 – 2009) е работил като младши експерт в Лаборатория по молекулярна екология към Института по криобиология и хранителни технологии в София. От 2009 г. е зачислен като редовен докторант в катедра "Генетика" в Биологическия факултет на СУ "Св. Кл. Охридски". Мартин Димитров е удостоен с грамота от Ръководството на Съюза на учените и организационният комитет на Международната научна конференция, проведена в Стара Загора през 2007 г., а през 2011 г. е получил награда за Млад Изобретател от Фондация Еврика.

Дисертационният труд на Мартин Димитров е посветен на един много интересен и актуален проблем: изследване на антиоксидантния и антиканцерогенен потенциал на три български пчелни продукта (мед, прополис и пчелно млечице) върху дрожди *Saccharomyces cerevisiae*. Известно е, че дрождите са подходяща моделна система за изучаване на сложни молекулярно-биологични процеси, протичащи в живите клетки. Сходството в структурата и функциите на някои дрождеви гени, хомоложни с човешките, прави възможно изучаването на механизмите за възникване на редица заболявания.

В дрожения геном има подвижни генетични елементи, обозначени като Tu ретротранспозони (Tu1 до Tu5). Те имат способност да се преместват от едно на друго място в генома, което може да доведе до геномни преустройства, подобни на тези при канцерогенезата. За сега най-добре изучен е Tu1 ретротранспозона.

Независимо, че спонтанната честота на Tu1 транспозицията е сравнително ниска, тя би могла да се провокира както от екзогенни стресови фактори - УВ-лъчи, химични вещества, замърсители от околната среда, продуциращи реактивни кислородни видове (РКВ), така и от ендогенни, възникващи в резултат на нормалния клетъчен метаболизъм. Нарушаването на баланса между произведените и обезвредени свободни радикали води до сериозни нарушения в биомолекулите, включително и в ДНК. Аеробните организми си изграждат различни защитни механизми, с цел предпазване на клетъчните компоненти от разрушителното действие на реактивните кислородни видове.

В последните 20 години интензивно се изследват антиоксиданти с различен произход, поради натрупването на безспорни доказателства за причинната връзка между оксидативния стрес и канцерогенезата. Увеличеният интерес към ролята на свободните радикали в патогенезата на болестни състояния при човека доведе до необходимостта от създаване на методи за адекватно измерване на антиоксидантната активност на различни природни продукти. Изискванията към подобни тестове са доста и независимо, че съобщенията в литературата и използването им в практиката са многобройни, нуждата от създаването на нови продължава да е актуална. Това е водещото в избора на целта в дисертацията на Мартин Димитров. За изследването на антиоксидантния и антиканцерогенен ефект на три пчелни продукта, докторантът прилага комплексен подход за разработване на тест при моделна система дрожди, с

който да се определи нивото на Tu1 транспозицията, индуцирана от 3 канцерогена: шествалентен хром (CrVI), метил-метан-сулфонат (MMS) и H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Резултатите от тези изследвания ще помогнат за изясняване на механизма, по който антиоксидантът (пчелните продукти) неутрализира оксидативните радикали в живата клетка. Евентуалното създаване на принципно нов тест за определяне на биологичната активност на антиоксиданти ще представлява принос със значителна теоретико-практическа стойност и пряк ефект за човешкото здраве.

## **2. Обща характеристика на дисертационния труд – обем и структура**

Дисертационният труд е с общ обем 153 стр. и съдържа 8 основни раздела, както следва: Въведение (3 стр.), Литературен обзор (48 стр.), Цел и задачи (1 стр.), Материали и методи (10 стр.), Резултати (51 стр.), Дискусия (11 стр.), Изводи (1 стр.), Приноси (1 стр.) и Литература (15 стр.). Резултатите от работата са представени в 19 таблици и 34 фигури. Разделите са добре структурирани и са спазени препоръчителните съотношения между тях.

## **3. Литературна осведоменост и теоретична подготовка на кандидата.**

Списъкът на цитираната литература съдържа 282 заглавия, от които само едно на кирилица. Литературният обзор е целенасочен, изчерпателно подробен, логично структуриран и се базира на достатъчно количество литература, която докторантът е използвал много умело. Обзорът разкрива неговата широка теоретична подготовка, познаването на проблема, както и уменията за обобщаване и анализ на литературните данни. От цитираните изключително голям брой автори, над 64% са на съвременни публикации, считано от 2000-та година насам.

Обзорът включва няколко раздела, в които последователно се акцентира върху дрождите от вида *S. cerevisiae* и техния геном. Обърнато е специално внимание на подвижните генетични елементи - транспозоните. Разгледана е структурата на Tu1 елементите, жизнения цикъл, транспозицията и регулацията им. Специално място е отделено на образуването и разнообразието на свободните радикали, предизвикващи оксидативен стрес в *S. cerevisiae*. В обзора е представена информация за високо-, нискомолекулни и ензимни антиоксиданти, както и за защитните антиоксидантни механизми. Интересна информативност носи петият раздел, посветен на характеристиките и антиоксидантните свойства на трите пчелни продукта, обект на изследване от докторанта – прополис, пчелно млечице и пчелен мед. Предпоследният раздел е посветен на известните и използвани в практиката методи за изследване на антиоксидантната активност главно *in vitro* и е подчертана липсата на универсалност и приложимост в *in vivo* системи. Накрая е разгледан антитуморният потенциал на прополиса и основанието той да бъде включен като обект на настоящото изследване.

На база направения анализ в литературния обзор е изведена основната насоченост в дисертационната теза. Целта е ясно формулирана, както и логично произтичащите от нея шест задачи, поставени за решаване от докторанта.

## **4. Методичен подход.**

В дисертационния труд са използвани микробиологични, молекулярни и молекулярно-генетични, биохимични и статистически методи.

Класическите микробиологични и молекулярно-генетични методи са приложени при определяне преживяемостта на дрождните клетки и получаването на мутанти с дихателна недостатъчност (rho-) чрез третиране с етидиев бромид. Наред с тях, докторантът е използвал няколко тест-системи за определяне плътността на клетъчната култура; количествен тест за определяне честотата на транспозиция на Tu1 чрез маркерен ген; биохимично определяне на антиоксидантната активност чрез Tu1 транспозиционен тест и измерване на количеството на супероксидните аниони в клетки на *S. cerevisiae*.

Избраният методичен подход и използваните методики са адекватни на поставените задачи и позволяват получаването на достоверна информация, която да послужи като основа за анализи и сравнения. Данните от изследванията са обработени вариационно-статистически чрез критерия на Стюдънт за определяне степента на достоверност на получените резултати.

## **5. Значимост и убедителност на получените резултати, интерпретации и изводи**

При проведеното от докторанта изследване върху антиоксидантна активност на пчелни продукти и влиянието им върху подвижността на Tu1 ретротранспозон в дрожди *S. cerevisiae*, са получени резултати и направени изводи в следните основни направления:

А) *Индуциращо влияние на канцерогенни вещества върху Tu1 елементи*: В това изследване, чрез количествен транспозиционен тест авторът установява, че честотата на Tu1 транспозициите в новоконструирания опитен щам *S. cerevisiae* нараства повече от 2 пъти в отговор на третирането с няколко канцерогена с различен механизъм на действие. В същото време, тя остава непроменена при третиране с неканцерогенни мутагени. Докторантът прави извода, че транспозиционният процес зависи от индуциране подвижността на Tu1 транспозона на опитния щам от канцерогените.

Б) *Доказване зависимостта между индуциран от канцерогени окислителен стрес и активиране на Tu1 транспозицията в тест-система дрожди*: За целта е изследван окислителният стрес и Tu1 ретротранспозицията, индуцирана от различни химични съединения: 6 канцерогена и 5 мутагена, които имат сходна химична структура с тях, но не са канцерогени. Чрез метод за количествено определяне на супероксиден анион ( $O_2^-$ ) в живи клетки е доказано, че активните канцерогени повишават специфично около 5 пъти нивото на аниона, както и честотата на Tu1 транспозицията, за разлика от проканцерогенните генотоксини, които нямат този ефект. По-нататък докторантът изследва индуцирането на окислителен стрес от силни канцерогени (As, CrVI), условно канцерогенното олово и неканцерогенните CrIII и Zn. Според автора, канцерогените не само генерират в дрождевите клетки повишено ниво на реактивните кислородни видове, но и инициират Tu1 транспозицията. Прибавянето на лабораторния антиоксидант (N-ацетилцистеин) елиминира свободните радикали и намалява активирането на Tu1 елемента.

В) *Тест-система за количествено определяне на антиоксидантната активност на продукти с различен произход*: Разработването на тест за определяне на зависимостта между нивото на индуцирани от канцерогени РКВ и честотата на Tu1 транспозицията, е втората поставена пред докторанта задача. Той изследва влиянието на различни концентрации от няколко канцерогена върху количеството на окислителните радикали (супероксидния анион) в *S. cerevisiae* и установява правопрпорционална зависимост за Tu1 транспозицията. Това именно наблюдение лежи в основата на идеята за създаването на принципно нов тест за количествено определяне на антиоксидантната активност (по инхибиране честотата на Tu1 транспозицията). Тестът, който авторът нарича "Tu1антиРКВ", е оригинална разработка и до сега е използван само в лабораторията по Генетика на микроорганизмите към катедра Генетика в Биологическия факултет. Той се различава принципно от известните до сега клетъчни и *in vitro* прилагани тестове по това, че измерването на активността става не на база химична реакция, а на клетъчен процес, какъвто е промяната в Tu1 транспозицията. Това би позволило както да се определя антиоксидантната активност на продукти с различен произход, така и да се изучава молекулния механизъм на антиоксидантите в живите клетки. Не е пропуснато да се отбележат предимствата и недостатъците на новия тест. В края на този раздел от резултатите си, докторантът описва подробно протокола за количествена оценка на антиоксидантната активност на един клетъчен процес (Tu1 ретротранспозиция) с Tu1антиРКВ теста, проведен с три крайни концентрации на три канцерогена. За

приложимостта на теста при използването на други концентрации и съответно – канцерогени, той предлага подходяща формула за изчисляването на резултатите.

Г) *Определяне антиоксидантната активност на пчелни продукти:* Изследванията в този раздел са проведени с три пчелни продукта. Клетъчната суспензия от дрожди е третирана с увеличаващи се концентрации до 3 мкг/мл от прополис, 6 различни концентрации на пчелно млечице и 4 на пчелен мед. Прибавеният канцероген за генериране на РКВ е CrVI, а антиоксидантната активност, даваща 50% инхибиране на Tu1 транспозицията е определяна с Tu1антиРКВ теста спрямо калибровъчен стандарт N-ацетилцистеин, който е лабораторен антиоксидант на супероксидния анион. И в трите случая докторантът установява експоненциална зависимост между увеличаването концентрацията на пчелните продукти и преживяемостта на клетките и съответно намаляване честотата на Tu1 транспозицията. Сравняването на антиоксидантните активности на трите продукта показват, че най-активен е прополисът, следван от пчелното млечице и пчелният мед, за което докторантът дава логичното обяснение, че това се дължи на съдържащия се в прополиса фенетилов естер на кафеената киселина (CAPE). В следващите експерименти е използван метил метан сулфонат (MMS) като канцероген, генериращ РКВ в клетките на Tu1антиРКВ теста. Наблюденията показват пълно сходство с резултатите, получени при използване на CrVI, което от своя страна подсказва идентичност и на клетъчния механизъм, по който най-вероятно пчелните продукти неутрализират РКВ в теста. Липсата на пропорционалност в регистрираните зависимости между концентрация и активност, авторът демонстрира чрез представянето на получените резултати в логаритмична скала на ординатата, при което доказва отново експоненциалната им характеристика.

Д) *Молекулен механизъм на Tu1антиРКВ теста:* установената експоненциална зависимост между антиоксидантната активност, измервана чрез понижаването на Tu1 транспозицията и концентрацията на трите изследвани антиоксиданта, според докторанта се дължи на антиоксидантния потенциал на пчелните продукти, а не на активиране метаболизма на тестерните клетки. Това поставя въпроса за наличието на молекулен механизъм, с който тестът се отличава от досега използваните тестове за антиоксидантна активност. За изясняването на този механизъм са проведени експерименти за изследване ефекта на окислителният агент водороден пероксид ( $H_2O_2$ ) върху мутанти (*rho-*) на *S. cerevisiae*. Принципната разлика между Tu1антиРКВ теста и останалите тестове е в начина за повишаване нивото на РКВ – чрез продуциране в опитните клетки или чрез прибавяне на  $H_2O_2$ . Според автора, вътреклетъчните нива на РКВ в мутантните дрождеви клетки се увеличават пропорционално на концентрацията на прибавения водороден пероксид, който индуцира Tu1 транспозиция *de novo*, а не чрез генна конверсия или други повреди в ДНК. В Tu1антиРКВ теста РКВ се повишават ендогенно, докато в другите тестове нивата им се повишават екзогенно чрез прибавяне на  $H_2O_2$  към клетъчните суспензии. Следователно, механизмите за неутрализиране на РКВ и активността на антиоксидантите са различни в зависимост от произхода на свободните радикали. Когато те са продуцирани вътреклетъчно, дори и в излишък, антиоксидантът ги неутрализира по-ефективно при експоненциална зависимост между активност и концентрация. При екзогенно генертиране (с прибавяне на реактив  $H_2O_2$ ), неутрализирането им е по-слабо и зависимостта е пропорционална.

Известно е, че еукариотните организми разполагат с механизми за защита от високите нива на РКВ. В дрождевите клетки съществуват няколко супероксид дисмутази с различна клетъчна локализация и сходни, но допълващи се функции. Увеличената синтеза на тези предпазни ензими се активира от няколко транскрипционни фактора, между които най-важен е продукта на *YAP1* гена. Той се свързва с промоторите най-малко на 18 гена, чиито генни продукти участват в обезвреждането на РКВ. В дрожди *S. cerevisiae* с разрушен *YAP1* ген се натрупват големи количества ендогенни РКВ поради неефективната им защитна система, но

антиоксидантът прополис ги неутрализира по-ефективно при експоненциална зависимост между неговата концентрация и активност.

Докторантът е представил основните си резултати взаимосвързано. Целият раздел създава впечатление за логически добре замислено изследване. Получени са достатъчно доказателства в полза на изходната хипотеза. Във всеки подраздел резултатите са придружени от коментар, от който личи умението на докторанта да анализира и интерпретира данните, да проявява критичен подход и да поставя нови въпроси, което е ценно за всяка една научна разработка. В това отношение трудът на Мартин Димитров е значим и има перспективи за продължение, за да даде отговор на нововъзникналите въпроси и проблеми.

В дискуссионната част е направено задълбочено обсъждане на получените резултати в сравнение с известните от литературата данни. Финалната част е посветена на възможностите за приложение и предимствата на Ту1антиРКВ теста в *in vitro* условия за установяване ефекта и избора на оптимален антиоксидантен продукт.

Изводите (6 на брой) съответстват на поставените задачи, направени са логично и следват от получените в настоящото изследване резултати.

Дисертацията е написана в добър научен стил. Спецификата на проблематиката изисква използването на голям брой термини, като някои от тях са със съответните абривиатури, за които е приложен списък.

## **6. Критични бележки към дисертационния труд**

### **6.1. Бележки по раздела "Литературен обзор"**

Считам, че текстовете на фигурите би трябвало да са на български език, особено там където това е възможно (фигури 6, 7 и 8). Следва да се прецизират и някои изрази, като например "гасене" на свободните радикали, по-правилно би било да се каже "обезвреждане".

### **6.2. Бележки по раздела "Материал и методи"**

Считам, че не е удачно избрано мястото в този раздел на генетичната номенклатура на хромозомните гени при дрожди. Не става ясно от таблица 4 какъв е източникът на използваните щамове дрожди. Липсва описание на метода за количествено определяне на супероксиден анион в живи клетки. Методът за определяне броя на преживелите клетки не може да се класифицира като генетичен.

### **6.3. Бележки по раздела "Резултати"**

Считам, че при формулирането на т.4.3 трябва да отпадне последната част "...на продукти от различен произход", тъй като в раздела е отразено създаването на принципно новия тест за определяне на антиоксидантна активност, а останалото се разглежда в следващата точка 4.4. На стр. 88 изразът "поникване" на колонии трябва да се замени с по-правилното "прорастване". На няколко пъти в работата е използван изразът "Крива, подсказваща експоненциална зависимост", за който би трябвало да се намери по-подходящо определение. Заглавието на т.4.6, 4.8 и 4.8.1. звучи като констатация и би било добре да се прецизира.

### **6.4. Бележки по раздела "Изводи"**

Като цяло изводите са добре изведени от получените резултати. По мое мнение, не би трябвало тук да се отбелязват приноси, какъвто е случая с част от извод 2, тъй като те са формулирани от докторанта в отделна глава. От незначителна редакция се нуждаят изводите 3, 4 и 6.

## **7. Основни научни приноси**

Подкрепям справката на докторанта за приносите в дисертационния труд.

### **7.1. с фундаментален характер:**

Принос **1.** относно установената правопрпорционална зависимост между активиране подвижността на Ту1 транспозон в дрожди *S. cerevisiae* и нивото на РКВ, синтезирани в клетките.

### **7.2 с научно- приложен характер:**

Принос **2.** касаещ създаването на принципно нов тест за определяне на биологичната активност на антиоксиданти, наречен Ту1антиРКВ тест, който е оригинален и приложим за продукти с различен произход.

**Авторефератът** е с обем 46 страници и е структуриран отлично, бих казала дори малко нетрадиционно. Той отразява адекватно съдържанието на дисертационния труд и отговаря на изискванията.

Част от резултатите убедително са представени в 2 научни публикации - една в международно списание с висок импакт фактор (= 4.049), в която докторантът е първи автор и една в българско списание, в която той е втори автор. За отбелязване е съавторството му в една книга и един патент, както и участието му с 2 доклада, в които е първи автор и 3 постера в научни форуми, проведени в България и чужбина.

### **Заключение:**

Представеният дисертационен труд на Мартин Димитров е добре проведено научно изследване, посветено на една важна област в биологичната наука - зависимостта на канцероген-индуцираната Ту1 ретротранспозиция от нивото на РКВ. Формулираната работна хипотеза е осигурена с адекватен комплекс от методи и е доказана с резултатите от изследването. Мобилността на Ту1 транспозона и нивата на супероксидните аниони са изучени след третиране с различни генотоксини. Големият интерес към ролята на свободните радикали в патогенезата на различни заболявания при човека и ползата от консумация на храни с антиоксидантни свойства води до необходимостта от създаване на методи за измерване на антиоксидантната активност *in vivo* и *in vitro*. Работата има сериозен принос в областта на генетиката, от гледна точка на създадения принципно нов метод за определяне на тази активност чрез изследване на клетъчен процес с т.н. Ту1антиРКВ тест, който приближава ефекта на антиоксидантите до условия *in vivo*, отчитайки физиологичния ефект на РКВ в живите клетки.

Докторантът има водеща роля и лично творческо участие в научните разработки. Той показва задълбочени познания по специалността, отлична методична и биологична подготовка. Тълкуването на резултатите свидетелства за аналитично и творческо мислене и цялостната му дисертационна работа показва, че той е изграден научен работник.

На база изложените в рецензията положителни качества на дисертационния труд, обемът на извършената работа, отличното оформление и стила на написване, както и съответствието с нормативните изисквания, препоръчвам на почитаемите членове на научното жури да присъдят на Мартин Димитров Димитров образовалната и научна степен "доктор" по научната специалност "Генетика", 4.3.Биологични науки.

25.03.2013 г.  
София

Рецензент:  
(доц. д-р Благовеста Гочева)