

СТАНОВИЩЕ

Върху дисертационен труд на Мартин Димитров Димитров за придобиване на образователната и научна степен „Доктор”

Тема на дисертационния труд: „Антиоксидантна активност на пчелни продукти и влиянието им върху подвижността на Tu1 ретротранспозон в дрожди *Saccharomyces cerevisiae*”,

Автор: Маргарита Георгиева Пешева доц. д-р в СУ”Св. Климент Охридски”, Биологически факултет, катедра Генетика

1. Биографични данни на кандидатката

Мартин Димитров Димитров е роден съм на 04.05.1983 година в град София. Висшето си образование (бакалавърска степен на обучение) завършва през 2005 г. в Биологическия факултет на СУ „Св. Климент Охридски” по специалността “Молекулярна Биология”. През 2005 година е приет в магистърска програма по „Генетика” към катедра Генетика, където в лабораторията по „Генетика и селекция на микроорганизмите” изработва дипломната си работа на тема: „Ниски температури активират мобилността на Tu1 ретротранспозона в дрожди *Saccharomyces cerevisiae*” с научен ръководител гл.ас. д-р. Маргарита Пешева и защитава през 2007 година.

Научната си кариера започва от 2006 г. като „младши експерт” към „Институт по Криобиология и Хранителни Технологии” в лаборатория по „Молекулярна Екология”, където работи до 2009 г. успоредно с обучението си в магистърската програма

През 2009. година е зачислен като редовен докторант към катедрата по „Генетика” с научен ръководител доц. д-р. Маргарита Пешева с тема на дисертационния труд: „Антиоксидантна активност на пчелни продукти и влиянието им върху подвижността на Tu1 ретротранспозон в дрожди *Saccharomyces cerevisiae*”.

През последните няколко десетилетия както в световен мащаб, така и България се засилва тенденцията към повишаване броя на хората с невродегенеративни заболявания, с тумори и др., причинени от окислителен стрес.

Дисертационният труд на Мартин Димитров Димитров е посветен на изучаване ефекта на различни субстанции да индуцират РКВ, увреждащи ДНК. Повишените нива на РКВ от своя страна повишават подвижността на Tu1 ретротранспозон в дрожди. Преместването му на ново място в генома води да реорганизации в него, сходни с тези при канцерогенезата.

В отговор на разрушителното действие на РКВ, аеробните организми са си изградили различни защитни механизми, чиято цел е да предпазват клетъчните компоненти от увреждания. В научната литература е описан голям брой природни и синтетични вещества, които могат да неутрализират действието на РКВ. Доказано е, че пчелните продукти (мед, прополис и пчелно млечице) притежават силно антиоксидантно, противовъзпалително и противотуморно действие.

За изследване на антиоксидантни свойства е необходимо да се създадат нови тестове, удовлетворяващи възможно голям брой от изискванията към метод за определяне на биологичната активност на антиоксиданти.

В дисертацията е описан такъв тест, наречен Tu1антиРКВ и са представени получените с него резултати от определяне на антиоксидантна активност на пчелни продукти, произведени в България. Изследването на тези продукти показва, че

маханизмът, по който антиоксиданта неутрализира оксидативните радикали в живата клетка, се отличава от механизма на химичните реакции, използвани в другите тестове за определяне на антиоксидантна активност.

В тази връзка темата на дисертационния труд е актуална и в него са изследвани антиоксидантните свойства на български пчелни продукти и способността им да намаляват нивата на РКВ, и честотата на Ту1 ретротранспозицията.

2.Обща характеристика на дисертационния труд – обем и структура

Дисертационният труд е с общ обем 151 стр. и съдържа 8 основни раздела, както следва: Въведение (3стр.), Литературен обзор (51 стр.), Цел и задачи (1 стр.), Материали и методи (10 стр.), Резултати (51 стр.), Дискусия (12 стр.), Изводи (1 стр.), Приноси (1 стр.) и Литература (14 стр.). Резултатите от работата са представени в 19 таблици и 34 фигури.

3. Литературна осведоменост и теоретична подготовка на кандидата.

Списъкът на цитираната литература съдържа 282 заглавия. Литературният обзор е подробен и добре подреден. В него е направена обща характеристика на дрождите *S. cerevisiae*. Подробно са описани транспозоните, реактивните кислородни видове и антиоксидантите (мед, прополис и пчелно млечице). Коментирана е необходимостта от създаване на метод за измерване *in vivo* на антиоксидантни свойства на различни продукти.

4. Методичен подход.

В дисертационният труд са използвани няколко класически генетични методи за получаване на *rho*-мутанти и тестове (спектрофотометрично измерване на клетъчна плътност, количествен Ту1 транспозиционен тест, измерване супероксидни аниони и Ту1антиРКВтест. Данните от изследванията са обработени статистически чрез прилагане на подходящи тестове и анализи в програмни продукти.

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

При проведеното от докторанта изследване на действието на CrVI, MMS H₂O₂ (като канцерогени) и на пчелни продукти (като антиоксиданти) върху дрождени клетки са получените резултати и изводи в следните основни направления:

а) Пропорционална зависимост между честотата на Ту1 транспозицията и нивото на РКВ в клетки *S.cerevisiae*

Докторантът установява, че честотата на Ту1 транспозицията се увеличава след третиране на дрождени клетки с канцерогени (шествалентен хром (CrVI), метилметансулфонат (MMS) или бензо(а)пирен (B(a)P)), но не се променя при третиране с неканцерогенни мутагени. Доказва, че канцерогените са силни генератори на РКВ в дрожди, а повишеното ниво на РКВ е инициатор на Ту1 транспозиция.

Установената превопропорционална зависимост между честотата на Ту1 транспозицията и нивото на РКВ, произведени в клетки *S.cerevisiae* подсказва идеята за създаване на тест за определяне на антиоксидантна активност на природни продукти (и не само) по инхибиране на честотата на Ту1 транспозицията.

б) Ту1антиРКВ тест за количествено определяне на антиоксидантна активност.

Тестът Ту1антиРКВ е базиран на клетки *S.cerevisiae*, в който за определяне на антиоксидантна активност се използва промяната в един клетъчен процес, какъвто е Ту1 транспозицията. Във всички други *in vitro* или клетъчни тестове антиоксидантната

активност се определя посредством химични реакции. Докторантът посочва предимствата и недостатъците на теста пред други съществуващи до сега тестове.

в) Антиоксидантна активност на пчелни продукти определена с Ту1антиРКВ теста

С Ту1антиРКВ докторанта получава различни стойности за IC_{50} (инхибиращо 50% от Ту1 транспозицията- контролата с канцерогена), като за прополис IC_{50} е 0,7 мкг/мл, за пчелно млечице -10 мкг/мл и за пчелен мед -250 мкг/мл. Докторантът получава еднакви стойности за IC_{50} при използване на CrVI (5mM) или MMS (12mM) като индуктор на РКВ и прави извода, че резултатът от Ту1антиРКВ теста не се повлиява от източника на РКВ. Той установява експоненциална зависимост между антиоксидантната активност и концентрация на антиоксиданта, което характеризира Ту1антиРКВ теста и най-вероятно се дължи на биологичния механизъм, по който се определя антиоксидантната активност в него, т.е. използването на клетъчен процес, какъвто е Ту1 транспозицията, а не на химична реакция.

г) В Ту1антиРКВ теста зависимостта активност към концентрация на антиоксиданта е експоненциална

Докторантът установява, че при изследване на прополис, пчелно млечице и мед посредством Ту1антиРКВ теста липсва пропорционална зависимост между антиоксидантна активност и концентрация. Когато резултатите са нанесени на координатна система, в която ординатата е логаритмична (а не метрична), то зависимостта между антиоксидантната активност и концентрация се представя с права линия, която е низходяща при увеличаване на концентрацията на антиоксиданта.

Докторантът подчертава, че съществената разлика между Ту1антиРКВ теста и други клетъчни тестове се проявява и в стойностите на IC_{50} , получени с тях.

д) Молекулен механизъм на Ту1антиРКВ теста

За изучаване на молекуления механизъм на Ту1антиРКВ теста докторантът използва rho^- мутанти, които не образуват РКВ, защото имат мутации в митохондриалния геном. Те си набавят РКВ чрез прибавяне на H_2O_2 в суспензията, който влиза свободно в клетките и активира Ту1 транспозицията.

От получените резултати Мартин Димитров прави два извода, които подкрепят становището, че активността на един антиоксидант е по - висока към РКВ, синтезирани в тестерните клетки и по – ниска към РКВ, прибавени като реактив в теста, какъвто е случая с опитите при използване на rho^-

е) Разрушаването на *Yap1* гена увеличава канцероген-индуцираната Ту1 транспозиция

В дисертацията докторантът използва щам дрожди с разрушен ген *YAP1*. В него се блокира синтезата на *Yap1* белтъка, при което таргетите на *Yap1* гена не се активират и системата за неутрализиране на пероксиди се изключва от функция. В резултат на това се повишават вътреклетъчните концентрации на H_2O_2 , което е позволило на докторанта да изследва ролята на H_2O_2 в канцероген-индуцираната Ту1 транспозиция. Дисертационният труд завършва с дискусия, където докторанта задълбочено обсъжда получените резултати в сравнение с наличните данни в литературата.

Формулирани са 6 извода и 4 приноса.

Основните резултати от работата са оформени в 3 публикации, едната от които е в реферирано научно списание с импакт фактор, една в българско списание и една в книга. Мартин Димитров е член на колектив, получил патент за разработване на метод за количествено определяне на антиоксидантна активност в живи клетки. Това е

доказателство за личния принос на докторанта в изработването и написването на публикациите. Докторантът има 5 участия в национални и международни форуми. ". 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”.

Наред с качествата на дисертационния труд, трябва да се отбележат и някои забележки, свързани основно с използването на чуждици и допускането на някои правописни грешки. Тези забележки обаче не намаляват стойността на работата.

Заклучение:

Дисертационният труд е посветен на една важна област в биологията и медицината, по специално в канцерогенезата. Докторантът има водеща роля и творческо, лично участие в научните разработки.

Като имам предвид качеството и обема на извършената работа, отличното оформяне на дисертационния труд, стила на написване и качествата на научните трудове имам основание да гласувам за присъждане на образователната и научна степен „доктор” в професионално направление 4.3 „Биологични науки” по научната специалност „Генетика” на Мартин Димитров Димитров.

02. 04. 2013г.
Гр. София

Изготвил становището:

(доц. д-р М. Пешева)