

РЕЦЕНЗИЯ

за присъждане на научната и образователна степен “Доктор”

Автор на дисертационния труд: *Елена Костова Шопова*

Тема на дисертационния труд: “Анализ на оксидативните процеси в грах (*Pisum sativum* L.), индуцирани от фотоактивно генериран синглетен кислород”

Рецензент: доцент д-р Петранка Ангелова Йонова

Физиологичните механизми, чрез които растенията се приспособяват към конкретни условия на околната среда, са обект на изследване във физиологичната екология на растенията. Растенията, както всички останали живи системи, могат да съществуват само при определени параметри на външната среда. В процеса на филогенезата всеки вид е обезпечил приспособеността си към дадени условия на средата чрез различни механизми. В растителните клетки, много метаболитни реакции, такива като фотосинтеза, фотодишане и дишане, включват образуването на активни кислородни форми (АКФ). Още, установено е, че различни по своята природа стресови фактори причиняват повишена продукция на АКФ, поради което повишените вътреклетъчни нива на АКФ се възприемат като компонент на почти всяко стресово въздействие. Общото свойство на различните видове АКФ е тяхната способност да причиняват оксидативни увреждания на протеини, ДНК и липиди. Тези цитотоксични свойства на АКФ обясняват еволюционното развитие на комплекс от не-ензимни и ензимни детоксикационни механизми в растенията. Нарастващите експериментални данни демонстрират още, че АКФ могат да функционират и като сигнали, които активират някои пътища на стрес-отговорите.

Биологичните ефекти и функции на синглетния кислород, не-радикалова форма на активиран кислород, в растенията, както и на индуцираните защитни механизми, са по-слабо изучени в сравнение с тези на другите АКФ. Обикновено е изследван тоталния ефект на всички продуцирани АКФ, отбелязван като «оксидативен стрес». Затова, индивидуално индуциран оксидативен стрес от един вид АКФ, в частност синглетния кислород и изучаването на селективните стрес-отговори, е твърде актуален и научнозначим проблем.

Дисертационният труд на асистент Елена Шопова е посветен на изследване на влиянието на синглетния кислород върху ендогенните окислително-редукционни процеси и антиоксидантната защита в млади грахови растения.

(1) Обща характеристика на дисертационния труд – обем и структура.

Дисертационният труд обхваща 109 страници и е структуриран съобразно изискванията, съответно увод и литературен обзор – 37 стр., цел и задачи – 1 стр., материали и методи – 12 стр., резултати – 19 стр., дискусия – 10 стр., заключение – 3 стр., изводи – 2 стр. Отделните раздели са развити премерено и точно. Цялата работа е написана на правилен български език.

(2) Литературна осведоменост и теоретична подготовка на кандидата.

В литературния обзор и при обсъждането на резултатите, дисертантката използва значителен брой предходни литературни данни от други автори, което е указание за нейната информационна компетентност. Цитирани са 405 литературни източници, от които 9 – на кирилица и 396 – на латиница. От цялата литература, около 1/2 от цитираните статии (197 броя) са публикувани през последните 10 години (2001-2011). Големият брой литературни източници, използвани от дисертантката, недвусмислено показват многобройните изследвания в областта на стресовата растителна физиология, в частност роля на АКФ и индукция на стрес-отговорите. От литературния обзор на дисертационния труд (35 стр.) е очевидно, че Елена Шопова познава отлично литературата по разработваните от нея проблеми. Въпреки съществуването на огромен обем информация, тя е успяла да се ориентира целенасочено и точно. Темата на дисертационния труд е формулирана много добре. Целта и задачите са поставени правилно.

(3) Методичен подход.

В методично отношение, работата е поставена много добре – използвани са широк спектър от класически и съвременни физиолого-биохимични методи, характеризиращи функционалния статус на растенията и фото-окислителния стрес.

Използвана е модифицирана от дисертантката моделна система, включваща 10-дневни грахови растения с отстранена коренова система. За фотоактивното генериране на $^1\text{O}_2$ («флуоресцентен кислород») е избран еозин У, след експерименталното доказване, че еозин У в сравнение с други 4 фоточувствителни съединения, предизвиква най-силен ефект в най-ниски концентрации. Изследваните показатели са подбрани логично,

съобразно собствени и литературни данни, и те са достатъчно информативни за поставените цели.

(4) Значимост и убедителност на получените резултати, интерпретациите и изводите.

Експерименталните данни и обсъждането на резултатите обхващат 31 стр, в които са включени 2 таблици, 19 фигури и 5 снимки.

Ще отбележа по-основните резултати и интерпретации, и тяхната значимост:

Използваната моделна система – цели растения без корен, се различава от известните досега, които използват листни дискове от грах, дава информация за абсорбцията, акропеталния транспорт и локализацията (до 2-ри лист) на еозина, както на светло, така и на тъмно. Инхибиция на растежа (FW) на растенията, който е един интегрален физиологичен показател, е отчетена само при непрекъснато осветяване, пропорционално на концентрацията на еозина.

Определени са динамичните изменения (до 48-я час) в нивото на специфични маркери, характеризиращи определени оксидативни процеси, индуцирани от фотохимично генерираня $^1\text{O}_2$. Обърнато е особено внимание на времевата последователност на оксидативните събития, определящи първичното действие на $^1\text{O}_2$ – инициране на липидното пероксиране (LOOH), наблюдавано на 6-я час, а това на МДА (един от крайните продукти на този процес) се повишава на 12-я час. Според моето скромно мнение, това е вярно, но е изместено с 6 часа по-късно (на базата на данните от фигурите). Намерено е още, че оксидативното модифициране на белтъците, причинено от $^1\text{O}_2$ настъпва на по-късен етап (24-я час) в сравнение с това на липидите.

Принос в работата е, че в $^1\text{O}_2$ -специфичната антиоксидантна ензимна система на растенията се включва силно активиране само на два ензима - гваякол-пероксидазата и глутатион редуктазата. Изоензимният профил на втория ензим се обогатява с две нови нискомолекулни изоформи. Не-ензимната антиоксидантна защитна система на растенията - глутатион, тотални феноли и пролин, не са решаващ фактор в защитата спрямо синглетния кислород.

Прави се предположение за специфичното действие на $^1\text{O}_2$ в използваната моделна система, което може да бъде комбинация между цитотоксичния ефект на $^1\text{O}_2$ и свързаното с това активиране на различни сигнални пътища на стрес-отговорите в клетката. В тези

раздели на работата, собствените резултати са съпоставяни компетентно с данните на други автори. Правят се предположения за възможните механизми на наблюдаваните защитни отговори спрямо $^1\text{O}_2$ –индуцирания фото-оксидативен стрес, което трябва да се оцени добре. Заключение на дисертационната работа е твърде кратко и не отразява напълно същността на разработката. Изводите отразяват добре приносите на труда.

(5) Критични бележки към дисертационния труд.

Към *Литературния обзор*:

1) Той представлява 1/3 от обема на труда; смятам че би спечелил, ако съдържанието до 12-та стр. е елиминирано.

Към *Материали и методи*:

1) единиците за крайното представяне на някои показатели са или неточни, или не добре описани (например, хлорофилна флуоресценция);

2) липсва характеристика на използвания фотосенсибилизатор – еозин У, като химическо наименование, физично състояние, цвят, водоразтворимост, фирма доставчик, чистота.

Въпрос: Има ли дисертантката предварителни данни относно условията на приложение на еозин У с цел получаване на висока флуоресцентна ефективност? Кое гарантира еднаквата степен на еозин-флуоресценцията при отделните опити, имайки в предвид, че тя зависи от концентрацията му, от температурата на водните разтвори?

3) липсва кратка характеристика на използвания инхибитор на глутатион биосинтезата – BSO, като химическо наименование, фирма доставчик, чистота.

Към *Резултати, дискусия и заключение*:

1) На Фиг. 1А, отразяваща влиянието на еозин У върху растежа на растенията (FW) при осветяване, е отчетена 45% инхибиция след третиране с 50 μM еозин и 48 часа, и в същото време дисертантката пише, че тези растения са загинали още на 24-я час?

2) Повишеното електролитно отделяне при растения, третирани с 10 и 50 μM еозин, още на 6-я час (фиг. 5А) се нуждае от коментар.

3) Значителните увреждания на ДНК (оценени с помощта на Comet assay, фиг. 7) са отчетени само на 24-я час след третиране с 1, 10 и 50 μM еозин, поради това, твърдението, че те са първичен отговор на $^1\text{O}_2$ – индуцирания фото-оксидативен стрес, е неточно.

4) Фотоактивното багрило еозин У във воден разтвор и осветяване има определена флуоресцентна способност, но каква е тя в смес с BSO (тук евентуално ще имат роля

някои взаимодействия, агрегации); Дали флуоресцентната способност на еозина е еднаква или различна (например, намалява) в сравнение със самостоятелното му приложение? (Табл. 5)

(6) Характер на научните приноси, като за всеки един от тях се посочва дали е оригинален или потвърдителен и каква е неговата стойност за науката и/или обществото (практиката).

Оригинални приноси

Доказано е, че глутатиона, тоталните феноли и пролина не участват директно в *in vivo* детоксификацията на синглетния кислород; Фотохимично генерирания $^1\text{O}_2$ активира силно само част от ензимната антиоксидантна система в грах – гваякол-пероксидаза и глутатион редуктаза. Значителното повишение на активността на глутатион редуктазата е съпроводено с появата на две нови нискомолекулни изоформи на ензима.

Приноси с потвърдителен характер

Биологичните ефекти на еозин-продуцирания синглетен кислород в млади грахови растения зависят пряко от концентрацията на фотоактивното багрило; Първичната реакция от въздействието на фотохимично генерирания $^1\text{O}_2$ са перокисленето на мембранни липиди, уврежданията на ДНК и на по-късен етап окислителното модифициране на белтъчните молекули.

Като *методичен принос* трябва да отбележа използваната моделна система, включваща цели растения без корен, за разлика от досегашни експерименти само с отделни растителни части.

Това са приноси в областта на физиологичната екология на растенията - изучаване на конституционните защитни стратегии на растенията и на възможностите за подобряване на устойчивостта им към неблагоприятните фактори на околната среда.

(7) Оценка на качеството на научните трудове във връзка с дисертацията.

Представени са 3 публикации – 2 излезли от печат: едната (обзорна статия) в *Растениевъдни науки*, София и една (експериментална статия) – в *Oxidation Communications*. Под печат е една статия (експериментална статия) – в *Oxidation Communications*. Елена Шопова има и 1 участие в международен научен форум - XV

Конгрес на FESPB, 2006, Лион, Франция. Всичките публикации са върху темата на дисертационния труд и включват отделни части от него.

(8) Мотивиран отговор на въпроса доколко изследванията са предимно лично дело на докторанта.

Дисертационният труд може да се прецени като лично дело на докторантката, видно от 3-те представени научни публикации и участието ѝ в научния форум, в 3 от които тя е първи автор и в 1 – втори автор.

(9) Мотивирано заключение, препоръчващо еднозначно едно от следните предложения: а) присъждане на научната и образователна степен “Доктор”, б) връщане на дисертацията за преработка или в) отказ за присъждане на научната и образователна степен “Доктор”.

Докторантката Елена Костова Шопова е запозната много добре с литературата по разработвания проблем – фото-оксидативен стрес, индуциран от синглетен кислород и фото-протекционни процеси спрямо този стрес. Има добри познания по физиология и биохимия на растенията, овладяла е редица съвременни аналитични методи. Провела е с добро качество и в голям обем експериментална работа, като е получила резултати с ценни приноси. Позволявам си да считам, че дисертационната работа отговаря на Закона за развитието на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ) и Правилника за неговото приложение в БАН. Изразявам моето заключение, препоръчващо еднозначно, присъждане на научната и образователна степен “Доктор” на асистент Елена Костова Шопова.

07 юни 2011 г.
София

Рецензент:

/ доц. д-р Петранка Йонова/