

## РЕЦЕНЗИЯ

на

Дисертационен труд за получаване на образователната и научна степен  
” ДОКТОР ”

Автор на дисертационния труд: Елена Костова Шопова, докторант- асистент в

Института по Физиология на Растенията и Генетика при БАН

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

Рецензент: проф., дбн Иван Т. Йорданов – пенсионер.

В процеса на еволюцията растенията са развили множество механизми, за да защитят фотосинтетичния си апарат (ФСА) срещу различни стресове. На клетъчно ниво, растенията се “опитват” да облекчат увреждащите ефекти на стреса, чрез промяна на своя метаболизъм, ултраструктура и морфология.

Както правилно отбелязва Дисертантката, почти всички стресови въздействия водят до развитието на оксидативен стрес, засягащ всички организми, включително и човека, поради което той е впрегнал познанията си в тази насока. В дисертационния труд е направен подробен анализ на оксидативните процеси в граховите растения, индуцирани от синглетен кислород, генериран от фотоативното багрило еозин.

Установено е, че за голяма част от уврежданията при всички аеробни организми е отговорен т.н. синглетен кислород ( $^1\text{O}_2$ ). Предмет на представената ми за рецензиране дисертация е изследване влиянието на продуцирания от еозина синглетен кислород върху ендогенните оксидативни увреждания и антиоксидантната защита при граха; оптимизиране на моделната система за изследване на ефекта от фотоактивно генерирания синглетен кислород; определение на неговите нива предизвикващи увреждания в мембранните липиди, белтъците и ДНК, както и уврежданията на структурната клетъчна организация; изследване промените в активността и изоензимния профил на основните атиоксидантни ензими и др.

Проблемът, на който е посветен дисертационният труд на колежката Шопова, е актуален с теоретическо и приложно значение. Той обхваща 109 машинописни страници. Добре е структуриран. Добре са формулирани целите и задачите, които дисертантката е реализирала на много добро научно ниво, благодарение на високата си компетентност и

широкият обхват на методическите си умения. Литературният преглед е твърде обемист. Счита обаче, че той не отежнява текста и дава добра представа за състоянието на проблема и предстоящите задачи за неговото решение. Подробно са характеризирани активните кислородни, азотни и хлорни форми, формирането на синглетен кислород, неговото антиоксидантно действие, неговите рецептори и сигнални пътища, методите за определението му в живите клетки, антиоксидантните ензимни и неензимни защитни системи; отговорът на защитните системи в стресови условия. Написан е с вещина, което показва, че дисертантката не само добре познава състоянието на проблема, но и умело борави с литературните източници, които са вплетени в обсъждането на получените от нея резултати. Личи високата ѝ ерудиция, както и способността ѝ да оценява творчески резултатите на своите предшественици. В него е обобщена информацията от 405 източника, от които само 8 са на кирилица.

На базата на задълбочен анализ на литературните данни и собствения си опит дисертантката е формулирала целите и произтичащите задачи на дисертационния си труд.

В раздела **“Материали и методи”** подробно и възпроизводимо са описани отглеждането на растителния материал и условията на третирането му, експериментите с третиране на цели растения от *Pisum sativum*. Използвани са компетентно над 20 процедури за регистриране на наблюдаваните промени, включително нативна полиакриламидна гел електрофореза и хлорофилна флуоресценция.

**РЕЗУЛТАТИ** – В дисертационния труд е направен анализ на оксидативните процеси в грах, индуцирани от генерирания от фотоактивното багрило еозин, синглетен кислород. От дисертантката е въведена нова оригинална моделна система за изследване на ефектите от фотоактивно генериран синглетен кислород в интактните грахови растения, благодарение на която е установено, че при всички експериментални варианти на светло се наблюдава повишение на ендогенното съдържание на пролин при използване на 50μM еозин. С приложената нова моделна система е установено, че третирането с еозин не води до значителни изменения в количеството на фенолите. Показано е, че той, еозина, приложен на светло самостоятелно не предизвиква съществени изменения в количеството на общите феноли и повишава свободните тиоли. Подтвърдено е, че количеството на свободните тиолови групи в растенията директно корелира с устойчивостта им към

въздействия на екстремални фактори. Показано е, че продукцията на синглетен кислород активира само част от ензимната антиоксидантна система. Установено е също, че от всички изследвани ензими най-значителна е активността на глутатион редуктазата, което е дало основание на дисертантката да предположи, че това е резултат от експресията на нови изоформи на ензима, индуцирани от синглетния кислород. Това е потвърдено от електрофоретичния профил показващ наличието на още две изоформи в растенията, третирани с еозин на светло.

С разработката на настоящия дисертационен труд са направени следните съществени приноси:

1. Създадена е нова оригинална моделна система за изследване на ефектите от фотоактивно генериран синглетен кислород в интактни млади грахови растения. Съвместно с колектив е адаптирана методиката за изследване на ДНК уврежданията.
2. Инкубирането на граховите растения с фотоактивното багрило еозин, при непрекъснато осветяване, инхибира растежа им с ясно изразена концентрационна зависимост и последващо развитие на хлорози и некрози. Това е доказателство, че негативното въздействие е следствие на провокираната при осветяването продукция на синглетен кислород от еозина.
3. Първоначална мишена на генерирания от еозина синглетен кислород са ненаситените мастни киселини, което много бързо изпреварва другите стресови маркери, включително малондиалдехид, електролити, скъсвания в ДНК, карбонилно съдържание на белтъците.
4. Приложен в ниски и средни концентрации, еозинът понижава количеството на окислен глутатион, а високата му доза увеличава неговото количество, корелиращо със силните увреждания на целите растения. Хлорофилната флуоресценция показва, че третирането на растенията с еозин, при непрекъснато осветяване, води до понижаване на максималния квантов добив на първичната фотохимична реакция на ФС2.
5. Блокирането на глутатионовия биосинтез с бутионин сулфоксимин води до силното му намаляване, което не променя устойчивостта на растенията, третирани с еозин и показва, че той не е решаващ фактор в защитата на клетките от синглетния кислород.

6. Доказано е също, че свръх продукцията на синглетен кислород в граховите растения индуцира появата на 2 нови изоформи на глутатион редуктазата и не повлиява изоензимния профил на SOD.
7. Отхвърлена е хипотезата за защитно действие на фенолните съединения срещу синглетен кислород в *in vivo* условия.

Съвсем малко са забележките ми по отношение качеството на дисертационния труд. Той е написан на чист български език умело и достъпно. Не на всички схеми и фигури са посочени техните автори. Доста икономични са използваните съкращения, което до някъде затрудняват четенето. По погрешка на 12 страница в текста, линоленовата киселина е обозначена като 18:2, а нейната формула е 18:3.

### **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

На защитата **Елена Костова Шопова, докторант-асистент** в Института по Физиология на Растенията и Генетика при БАН, се явява с достатъчно по обем и високо качество, напълно отговарящо на изискванията за присъждането на образователната и научна степен **“ДОКТОР”**.

Дисертационният труд на колежката Шопова е един от добрите примери на дисертационно изследване, с ясно поставена цел и задачи с оглед на успешната им реализация в рамките на докторантурата. На базата на задълбочен анализ на литературните данни и на собствения си опит дисертантката е формулирала целите и произтичащите от тях задачи на дисертационния си труд. Експерименталната работа е проведена при използването на широк арсенал от съвременни техники на различните нива на изследване. Направен е подробен анализ на оксидативните процеси в граховите растения, индуцирани от синглетния кислород, генериран от фотоактивното багрило еозин. Представеният труд е съществен принос към изясняването на проблеми, свързани с механизмите на увреждане растенията от синглетния кислород. Фактът, че дисертантката е овладяла и умело използвала огромен арсенал от методи в изследванията си е убедително доказателство, че дисертационният ѝ труд е предимно нейно лично дело. От резултатите в дисертацията са написани 3 статии, от които 2 са отпечатани – един обзор и една експериментална статия, като и в трите първи автор е дисертантката, а третата е под печат. Авторефератът отразява обективно същността на дисертационния труд.

Въз основа на направения подробен анализ и оценките на дисертационния труд, относно актуалността на проблема, научната значимост на получените резултати и личните ми впечатления считам, че **дисертантката Елена Костова Шопова е вече добре подготвен специалист, способен да решава самостоятелно научни проблеми в своята област. Това ми дава основание да предложа на Научното Жури при Института по Физиология на Растенията и Генетика да подкрепи с вота си докторантката Елена Костова Шопова и да и присъди образователната и научна степен “Доктор”.**

28.05.2011 г.

Рецензент:

(Проф. дбн Иван Т. Йорданов)