

## РЕЦЕНЗИЯ

от проф. д-р Василий Щерев Ишев – пенсионер, Медицински университет – Пловдив

Със Заповед №Р33-5007/20.10.2017 г. на Ректора на Пловдивски университет „Паисий Хилендарски” съм определен за член на Научно жури по процедура за защита на дисертационния труд:

**„Имуномодулаторни свойства на пробиотици и пребиотици”**

за придобиване на образователна и научна степен „доктор”.

Област на висше образование: **4. Природни науки, математика и информатика.**

Професионално направление: **4.3. Биологични науки.**

Докторска програма **Клетъчна биология.**

Автор: **Павлина Яворова Средкова** – редовен докторант към Катедрата по биология на развитието при Биологичен факултет на Пловдивски университет „Паисий Хилендарски”.

Научен ръководител: **проф. д-р Балик Маломиров Джамбазов** от Пловдивски университет „Паисий Хилендарски”.

### **1. Общо описание на представените материали.**

Представеният от Павлина Яворова Средкова комплект материали на хартиен и електронен носител **е в съответствие** с чл. 36 (1) от Правилника за развитие на академичния състав на ПУ и включва следните документи:

-молба до Ректора на ПУ за разкриване на процедура за защита на дисертационен труд;

-автобиография по европейски формат;

-копие на Диплома за висше образование от ПУ „Паисий Хилендарски” – ОКС „магистър”, специалност „Биофармацевтична биохимия”;

-копие на Заповед Р33-786/27.02.2013 г. за зачисляване на редовна докторантура;

-копие на Заповед Р33-1076/14.03.2016 г. за удължаване срока на докторантурата;

-копие на Заповед Р33-4878/12.10.2016 г. за отчисляване от докторантура с право на защита;

-копие на Заповед №193/22.04.2013 г. за назначаване на Комисия за провеждане на докторантски изпит по „Клетъчни култури и тяхното приложение” и копие от Протокол от 25.04.2013 г. от проведения изпит с оценка Отличен (6);

-копие на Заповед №188/22.04.2013 г. за назначаване на Комисия за провеждане на докторантски изпит по „Клетъчни и молекулни механизми на автоимунните заболявания” и копие от Протокол от 16.05.2013 г. от проведения изпит с оценка Отличен (6);

-копие на Заповед №236/27.11.2013 г. за назначаване на Комисия за провеждане на докторантски изпит по „Рецептори и механизми на сигналната трансдукция” и копие от Протокол от 18.12.2013 г. от проведения изпит с оценка Отличен (6);

-копие на Протокол №330/29.09.2016 г. на Катедрения съвет на Катедрата по биология на развитието с предложение до ФС на Биологическия факултет за отчисляване с право на защита на редовния докторант Павлина Яворова Средкова;

-копие на Заповед №P33-4426/13.09.2017 г. за еднократно разширение на състава на Катедрата по биология на развитието във връзка с предварителното обсъждане на дисертационния труд;

-копие на Протокол №338/20.09.2017 г. на Разширения катедрения съвет на Катедрата по биология на развитието от предварителното обсъждане на дисертационния труд на Павлина Яворова Средкова;

-дисертационен труд;

-автореферат;

-декларация за оригиналност и достоверност;

-справка за спазване на специфичните изисквания на Биологическия факултет при ПУ за придобиване на образователна и научна степен „доктор”.

-списък на научните публикации по темата на дисертацията и участие в научни форуми във връзка с дисертацията;

-копия на научните публикации;

Докторантът е приложил две публикации в пълен текст на английски език, в които е водещ автор – едната публикувана в *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, а другата е официално приета за публикуване в *Central European Journal of Immunology*, с импакт фактор 0,776 (за 2016 г.)

**2. Кратки биографични данни за докторанта.** Павлина Яворова Средкова е завършила висшето си образование в Пловдивски университет „Паисий Хилендарски”, с отличен успех, както следва: от 2006 г. до 2010 г. - бакалавърска програма по специалност Биология (редовно обучение), а от 2010 г. до 2012 г. – магистърска програма по специалност Биофармацевтична биохимия (редовно обучение). През 2012-

2013 г. е работила като биолог СМДЛ „Д-р Писанец ООД” – Пловдив с основна дейност - медицинска диагностика. От 2013 до 2016 г. е редовен докторант към Катедрата по биология на развитието при Биологически факултет на Пловдивски университет „Паисий Хилендарски” по докторска програма Клетъчна биология. Докторантът е изпълнил успешно предвидената образователна и научна програма.

**3. Актуалност на тематиката и целесъобразност на поставените цел и задачи.** Известно е, че нормалната микрофлора в човешкия организъм осъществява редица полезни ефекти - защита срещу патогени от различно естество, разграждане и усвояване на трудноусвоими въглехидрати, синтезиране на витамини. Известно е също, че колонизирането с нормална чревна микрофлора в ранната детска възраст подпомага матурацията и компетенциите на имунната система.

Редица изследвания доказват значението на дисбаланса между нормалната микрофлора и патогенните микроорганизми за протичането на редица заболявания при човека. В този смисъл ролята на микроорганизмите, формиращи нормалната човешка микрофлора придобива все по-голямо значение за лечебната практика и предизвиква нарастващ интерес.

Благоприятните промени в чревната микрофлора се дължат най-вече на пробиотиците бактерии от родовете *Bifidobacterium* и *Lactobacillus*, които при метаболизма си разграждат определени въглехидрати - пребиотици. Идеята да бъде проучен ефектът на различни пребиотици върху физиологията и имуномодулаторните свойства на пробиотични щамове от род *Lactobacillus* прави тематиката на дисертационния труд изключително актуална.

**Целта** на дисертационния труд е ясно и точно дефинирана. За нейното постигане прецизно и изчерпателно са формулирани седем **задачи**. Поставените цел и задачи са целесъобразни.

**4. Структура на дисертационния труд.** Структурата е съобразена с общоприетия модел за този вид труд. Дисертацията е написана на 104 страници и съдържа: заглавна страница, съдържание – 1 стр., въведение – 3 стр., литературен обзор – 31 стр., цел и задачи – 1 стр., материал и методи – 7 стр., резултати – 35 стр., обсъждане – 5 стр., изводи – 2 стр., научни приноси на дисертационния труд – 1 стр., списък на научните публикации, свързани с дисертацията - 1 стр. и литература – 14 стр. Литературният указател включва 212 литературни източника на латиница, от които 115 (54%) са от последните 10 години. Дисертационният труд е много добре онагледен с 30 фигури и 2 таблици.

**Литературният обзор** е обстоен преглед на публикациите от последните две десетилетия по тематиката на дисертацията. Той показва отличната литературна осведоменост на докторанта. Обзорът е представен в девет раздела. Компетентно са представени: микрофлора в гастроинтестиналния тракт и нейния метаболизъм, морфофизиологични особености на интестиналния епител, значение на чревния мукозен имунитет, описание и характеристика на пробиотици, пребиотици и

синбиотици, механизми на действие на пробиотиците, имуномодулаторни свойства на пробиотици и пребиотици и потенциални рискове при използване на пробиотиците. Литературният обзор сполучливо обосновава целта и задачите на дисертационния труд.

**5. Материали и методи.** От методологична гледна точка подходът за решаване на поставените цел и задачи е правилен. Адхезията към чревния епител е една от основните характеристики на бактериите с пробиотичен потенциал. За изследване на адхезивните способности на пробиотиците от род *Lactobacillus* са използвани три сертифицирани щама: *Lactobacillus acidophilus* 11, *Lactobacillus rhamnosus* 1010 и *Lactobacillus paracasei* 8458, закупени от НБПМКК – София. За нуждите на тестовете за адхезия, пробиотиците са култивирани в хранителни среди като към културите поотделно са добавяни различни пребиотици. Използвани са шест пребиотика с различна химична природа – несмилаеми олигозахариди – галактоолигозахарид и ксилоолигозахарид и водноразтворими полизахариди (фибри) – бета-глюкан, инулин, хитозан и пектин, закупени от сертифицирани биотехнологични лаборатории в Италия, САЩ и Китай. В края на инкубационния период бактериалните концентрации в културите са определени чрез измерване на оптичната плътност и изчислената концентрация е проверена чрез броене на клетките в камера на Бюркер. След това пробиотиците са инокулирани и ко-култивирани върху клетки от три стандартизирани клетъчни линии от човешки колоректален аденокарцином – Caco-2, HT-29 и LS 180, закупени от Европейската колекция за автентични клетъчни култури - Великобритания. Анализът за адхезия е проведен по модифициран метод на Duayu и сътр., 2011.

За изследване на прекия пробиотичен ефект върху имуномодулаторните свойства са използвани два щама от вида *Lactobacillus brevis* (3448 и 8429, също закупени от НБПМКК - София), при култивирането на които са добавяни различни пребиотици. Избраните пробиотично-пребиотични комбинации са приложени при нормални физиологични условия и при условия на възпаление. За целта са използвани DBA/1мишки, отглеждани в стерилна среда и разделени в две групи: при мишките от едната група по подходящ начин е предизвикан колаген индуциран артрит (CIA), а мишките от другата група са запазени интактни. Клетъчни суспензии от лимфни възли и слезка на мишките от двете групи са поставени за 48 часа в хранителна среда, в която като стимулатори са добавени метаболитни продукти от културите на всеки от пробиотичните щамове. В края на *ex vivo* стимулирането, нивата на цитокините в супернатантите са измерени с помощта на ELISA, а за изследване на повърхностните клетъчни миши маркери е използван цветен панел от флуорохром-белязани антители и е приложен флуоцитометричен анализ. Всички проби са повторени трикратно. Резултатите са подложени на статистически анализ. Следва да се отбележи, че използваните материали и методи са прецизно описани в дисертацията.

Можем да обобщим, че при разработката на дисертационния труд са приложени съвременни методи с висока информативна стойност. Направен е уместен подбор на пребиотици, които имат разностранни механизми на действие и различен биологичен

ефект върху пробиотичните бактерии. Приложените методи на изследване са достатъчни за постигане на целта и задачите в дисертационния труд.

**6. Анализ и оценка на получените резултати.** Получените резултати следват последователно и логично поставените задачи. Обемът на изследвания материал е достатъчен. Представените резултати са достоверни и са обсъдени задълбочено и коректно в светлината на литературните данни. Богатият илюстративен материал много добре онагледява получените резултати и има доказателствена стойност.

Установено е, че пробиотичните щамове *Lactobacillus*, инкубирани с олигозахаридни пребиотици статистически значимо повишават адхезивните свойства, докато инкубираните с пребиотични полизахариди намаляват адхезивните свойства. Доказано е също, че съществуват различия в адхезионните нива на изследваните бактерии спрямо отделните човешки клетъчни линии.

Олигозахаридните метаболитни продукти водят до намаляване на концентрациите на IFN-гама, IL-6, IL-17, и TNF-алфа, а метаболитните продукти от водноразтворимите полизахариди - до повишаване на концентрациите им. Метаболитните продукти, получени при инкубирането на пробиотичните щамове с различни пребиотици, повлияват по различен начин секрецията на определени цитокини и клетки на имунния отговор. От изложеното следва, че имуномодулаторните свойства на пробиотиците зависят не само от щама, но и от използваните пребиотици.

Обсъждането на резултатите и направените изводи потвърждават отличната теоретична подготовка и аналитичните способности на докторанта, особено в случаите на различия с някои литературни данни.

**7. Приноси и значимост на дисертационния труд за науката и практиката.** Дисертационният труд е задълбочено и мащабно научно изследване, довело до правилно изведени и точно формулирани изводи. Приносите на дисертационния труд обогатяват науката с нови оригинални данни и имат потенциално значение за лечебната практика.

#### **Оригинални научни приноси:**

1. За първи път е изследван прекият ефект на пребиотиците галактоолигозахарид, ксилоолигозахарид, бета-глюкан, инулин, хитозан и пектин върху адхезивната способност на *Lactobacillus acidophilus 11*, *Lactobacillus rhamnosus 1010* и *Lactobacillus paracasei 8458* като е демонстрирано, че използваните пребиотици имат различаващи се ефекти върху пробиотичните щамове.

2. За първи път е изследван прекият ефект на метаболитните продукти от инкубирането на щамове *Lactobacillus brevis 3448* и *Lactobacillus brevis 8429* с ксилоолигозахариди, инулин, хитозан и пектин върху имунния отговор *ex vivo*, при нормално физиологично състояние и състояние на възпаление. Установено е, че метаболитните продукти на ксилоолигозахаридите от една страна и на водноразтворимите фибри – от друга, влияят разнопосочно върху секрецията на

провъзпалителните цитокини, макрофагите и регулаторните Т-клетки. Посочените метаболитни продукти не повлияват секрецията на противовъзпалителния IL-10.

#### **Научни приноси с потвърдителен характер:**

1. Потвърдена е щамовата специфичност на имуномодулаторните и адхезивните способности на пробиотиците.

2. Потвърдена е хипотезата, че пребиотиците влияят върху пробиотичния потенциал и могат да променят пробиотичните ефекти на бактериите в една или друга посока.

#### **Научно-приложен принос:**

Познаването на имуномодулаторните свойства на пробиотични щамове, инкубирани с определени пребиотици дава възможност за прилагането във всеки конкретен случай на подходяща пробиотично-пребиотична комбинация в хода на лечението на автоимунни, алергични и туморни заболявания.

#### **8. Преценка на публикациите по дисертационния труд.**

Докторантът е приложил две статии в пълен текст на английски език, в които е първи автор. Те съдържат фрагменти от дисертационния труд и са на високо научно ниво. Участвал е с презентация по темата на дисертацията в международна научна конференция по биология.

**9. Личното участие на докторанта** в разработването на дисертационния труд е безспорно. Експериментът е добре обмислен и прецизно проведен и показва задълбочената теоретична и практическа подготовка на докторанта. Докторантът умело анализира получените резултати в светлината на литературните данни като отчита възможностите за практическото приложение на установените от нея зависимости.

**10. Авторефератът**, като неразделна част от дисертацията, отразява в съкратен вид основните ѝ положения и дава реална представа за проведените изследвания, получените резултати и направените изводи. Оформен е в съответствие с дисертационния труд и е много добре онагледен.

Към докторанта нямам забележки, препоръки и въпроси.

**11. Заключение.** Дисертационният труд съдържа научни и научно-приложни резултати, които представляват оригинален принос в науката и отговарят на всички изисквания на Закона за развитие на академичния състав в Република България, Правилника за прилагането му и съответния Правилник на ПУ „Паисий Хилендарски”. Представените материали напълно съответстват на специфичните изисквания на Биологичния факултет, приети във връзка с Правилника на ПУ за приложение на ЗРАСРБ.

Докторантът Павлина Яворова Средкова притежава задълбочени теоретични знания и професионални умения по научната специалност Клетъчна биология, обосновава научни задачи и прилага съвременни методи за решаването им, успешно анализира получените резултати и формулира достоверни изводи. Така тя доказва, че има необходимите качества за самостоятелно провеждане на научно изследване.

Предвид гореизложеното, давам своята положителна оценка на представения ми за рецензиране дисертационен труд, автореферат, постигнати резултати и научни приноси и **убедено предлагам на почитаемото научно жури да присъди образователната и научна степен „доктор” на Павлина Яворова Средкова** в област на висше образование: 4. Природни науки, математика и информатика, професионално направление: 4.3. Биологични науки и докторска програма: Клетъчна биология.

Пловдив, 13.11.2017 г.

РЕЦЕНЗЕНТ:

(проф. д-р В. Ишев)