

РЕЦЕНЗИЯ

от проф. дбн Искра Витанова Иванова

На дисертационен труд на тема:

“Изследване влиянието на структурно-функционалните свойства на олигозахариди върху ензимната кинетика на микробIALни гликозидхидролази продуцирани от лактобацили изолирани от микробиота на кърмачета”

с научни ръководители: проф. д-р Илия Николов Илиев и доц. д-р Тонка Василева

Представен за присъждане "доктор" на **Даниела Георгиева Моллова-Дошкова** за придобиване на образователната и научната степен „доктор“ по професионално направление 4.3. Биологически науки (Биохимия)

Със Заповед № Р-33 /23.07.2019 г. на Ректора на Пловдивски университет „Паисий Хилендарски“ съм определена за член на научно жури за защита на дисертационен труд за придобиване на образователна и научна степен „Доктор“ от докторант Даниела Георгиева Моллова-Дошкова.

1. Актуалност и значимост на дисертационната тема

Формирането на чревната микрофлора на кърмачетата се определя като резултат на тристранна връзка между майчиното мляко, новороденото и бактерии, като е общоприето, че бифидобактериите доминират в детската чревна екосистема. Род *Lactobacillus* е важна част от микробиота на стомашно-чревния тракт при здрави бебета. Консумацията на майчино мляко насърчава пролиферацията на лактобацили в стомашно-чревния тракт, тъй като осигурява хранителни вещества като пребиотични НМОs. Основните ензими, участващи в разграждането на НМО са β -галактозидаза, фукозидаза, сиалидаза, лакто-N-фосфорилаза и β -хексозаминидаза. Част от лактобацилите, населяващи стомашно-чревния тракт на новородените, притежават набор от специфични ензими като

фукозидази, които подпомагат усвояването на сложни захари и опосредстват метаболизма на НМОs. Видовете на род *Lactobacillus* са част от микробиома в стомашно-чревния тракт и други мукозни повърхности при хората. Полезните за човека микроорганизми трябва да оцелеят в специфична екологична ниша и да бъдат метаболитно активни на целевите си места, а именно повърхности на лигавицата на гостоприемника, метаболизирането на произведения от лигавицата гликани е ключов фактор за тяхното оцеляване и активност. От друга страна изучаването на β -галактозидазната активност като основен параметър при подбора на пробиотични щамове е целесъобразно. В този смисъл представената дисертация е по особено актуален проблем с важно фундаментално значение и възможности за практическо приложение.

2. Оценка на структурата на дисертационния труд

Дисертационният труд съдържа 156 страници на формат А4, 30 таблици и 74 фигури. Налице е ясно конструиране в традиционна форма със съответните раздели. Написан е на 156 стандартни компютърни страници, които включват 138 страници текст и 17 страници литература. Литературният обзор е изготвен целенасочено и конкретно и включва всички аспекти на изследването. В него са отразени 288 публикации (на латиница). Експерименталната работа е извършена в лабораториите на катедра „Биохимия и микробиология“ на ПУ „Паисий Хилендарски“ и в лабораториите на Технологичен център на ПУ. Налице е предпоставка за успешна разработка, целяща да се доразвият изследвания, с ръководител проф. Илиев и неговия колектив, които са едни от пионерите в изследването на пребиотиците в България, а и не само тук. Наличният опит е основа за едно ново научно предизвикателство, което определя целта на дисертацията.

2.1. Литературен обзор

Литературният обзор е конкретен, структуриран е правилно и следва логическа обвързаност на информацията. Авторката проучва в последователност и характеризира гастроинтестинален микробиом и колонизиране на гастроинтестиналния тракт на новороденото. Представя структурата и класификацията на олигозахариди изолирани от майчина коластра и кърма, както и ролята на човешките млечни олигозахариди във взаимоотношенията с микрофлората, и тяхното потенциално влияние върху здравния статус. Разглежда олигозахаридите от кърма като модулатори на чревния и системен

имунитет. Представена е важна информация, в съответния раздел литературния обзор, за потенциалните източници на бактерии в коластрата и кърмата при човека.

В последният раздел са разгледани гликозидхидролази продуцирани от гастроинтестиналният тракт на новороденото и възрастният човек, както и информация за бактериално разграждане на гликани при новородените.

Докторантката се е постарала синтезирано да представи научните данни. Литературата (както в обзора, така и в целия труд) е тясно свързана с дисертационната тема. Трябва да се подчертае, че авторът е акцентирал върху публикациите след 2000 година (представляващи повече от 90% от цитираната литература), систематизирайки огромна по обем информация и наличните данни от изследванията на изучаваната тема. Обзорът представя състоянието на проблема и доказва необходимостта от разработването на дисертационната теза.

2.2. Цел и задачи

Целта на настоящата дисертация е да се проучат ензимите, опосредстващи метаболизирането на олигозахаридите от майчина кърма, различни биологично активни захари и пребиотични олигозахариди, секретирани от щамове млечнокисели бактерии, изолирани от майчина кърма и от слюнка на новородени.

За реализирането на целта на настоящия дисертационен труд авторката изолира и идентифицира различни видове бактерии от майчина кърма и слюнка на новородени. Скринира изолираните щамове бактерии по специфични пробиотични показатели и изследва пробиотичния им потенциал. Наред с това оптимизира протокола за изолиране и пречистване на олигозахариди от майчина кърма. Изследва и индукцията и динамиката на секреция на основните ензими, отговорни за хидролиза на олигозахариди от майчината кърма при селектираните бактериални щамове от кърма и слюнка на новородени, както и способността на изолираните щамове млечнокисели бактерии да усвояват пребиотични олигозахариди с различни структури. След подбор на подходящи методи се изследва корелацията между секрецията на ензимите, отговорни за хидролиза на олигозахариди от майчината кърма и тяхното метаболизиране. Провежда се сравнителен анализ на възможностите на селектираните щамове млечнокисели бактерии от кърма и слюнка на новородени да метаболизират олигозахариди от медицински растения. За тази цел са формулирани седем конкретни, взаимно обвързани и логически следващи задачи.

2.3. Материали и методи

Разделът "Материали и методи" демонстрира внушителен набор от методи, съобразени с конкретните изисквания на експеримента. Те са както рутинни, така и съвременни, микробиологични, биохимични, генетични, химични и други, което е основание да се счита, че е придобила необходимия методичен опит. Всички методи са описани достатъчно подробно, за да могат да бъдат възпроизведени. Освен това те са разбираеми и дават възможност за коректно провеждане на експериментите и получаване на достоверни резултати. Следва да се подчертае, че настоящата разработка е достоверна и прецизна.

2.4. Резултати и обсъждане

В раздел „Резултати и дискусия” е включен експериментален материал, който е представен на 78 стр. и демонстрира широко-машабна изследователска дейност. Важно е да се отбележи, че разработката се характеризира с логическа последователност, отделните етапи са разработени обстойно и всеки от тях е база за следващия. Трябва да се подчертае още, че дисертацията е написана в много добър научен стил и коректно отразява получените резултати. Доказателственият материал е оформен професионално в 24 таблици и 71 фигури. Всички тези фигури и таблици още веднъж доказват машабния характер на разработката. Смятам, че получените резултати са убедителни и тяхната достоверност не подлежи на съмнение.

Авторът установява видовата принадлежност към *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus gastricus*, *Bifidobacterium longum*, *Enterococcus lactis*, *Enterococcus faecalis* и *Enterococcus faecium* на 56 щамове бактерии, изолирани от майчина кърма и от слюнка на новородени. Тя доказва щамовата специфичност при изследваните 8 щамове *Lactobacillus fermentum* по отношение на индукцията на ензимите β -галактозидаза, α -галактозидаза и β -глюкозидаза при култивиране на хранителни среди в присъствие на различни концентрации на лактоза, лактулоза, галактоолигозахариди и олигозахариди от майчина кърма. Установена е най-висока активност на ензима β -галактозидаза при използване на лактоза и олигозахариди от кърма. От особен интерес е доказаната щамова специфичност при индуцирането на α -фукозидаза при изследвани 8 щамове. Доказана е щамова специфичност при индуцирането на α -фукозидаза при изследваните 8 щамове

Lactobacillus fermentum от L-фукоза, муцин, фукозиллактоза (2-FL) и олигозахариди от майчина кърма, като е установена най-висока активност на α -фукозидаза при използване на L-фукоза. За разлика от описаното дотук, при пробиотичните щамове *Str. thermophilus* St 229, *Str. thermophilus* St 226, *L. acidophilus* N, *L. brevis* 27, *L. plantarum* 30 и *L. plantarum* 26, *L. bulgaricus* L14 не се установява α -фукозидазна активност.

При изследваните щамове *L. Fermentum*, култивирани в присъствие на муцин и на 0,3% жлъчни соли, се индуцира секрецията на α -L-фукозидази. При щамове *Lactobacillus fermentum st5* и *Lactobacillus fermentum st 22* е установено наличие на *afcA* гена, кодиращ 1,2- α -L-фукозидаза (Е.С. 3.2.1.63) и е определена молекулната маса на секретирания от тях β -галактозидаза от 116 kDa. Щамовете *Lactobacillus fermentum st5* и *Lactobacillus fermentum st 22* показват способност да адхезират върху клетъчна линия HT 29, като при щам *Lactobacillus fermentum st5* се установи адхезия и спрямо муцин-продуциращата клетъчна линия LS 180. В резултат на проведените изследвания бе установен *afcA* гена, кодиращ 1,2- α -L-фукозидаза (Е.С. 3.2.1.63) и е отчетена ензимна активност при щамове *Lactobacillus fermentum*, изолирани от майчина кърма. Доказана е пластичността на въглехидратния метаболизъм при щам *L. plantarum* 30, култивиран в присъствие на олигозахариди с различна структура и произход, като се индуцира секрецията на ензимите β -галактозидаза, α -глюкозидаза, β -глюкозидаза и β -ксилозидаза в присъствие на фукозиллактоза, муцин и олигозахариди от листа на *P. major*, *P. media* и *P. Lanceolata*.

От получените резултати смятат, че доказаната щамова специфичност при индуцирането на α -фукозидаза при изследваните 8 щамове *Lactobacillus fermentum* от L-фукоза, муцин, фукозиллактоза (2-FL) и олигозахариди от майчина кърма, както и активността на α -фукозидаза при използване на L-фукоза представяват изключителен интерес. Известно е, че *Lactobacillus ghamnosus* GG използва L-фукоза като източник на въглерод и енергия, като гените за това са аотирани в генома му, но тяхната функционалност не е доказана. Няма и данни за използване на L- фукоза от чревни лактобацили. Установеното участие фукозидази от *Lactobacillus fermentum* при използване на L-фукоза, разкрива нови перспективи, което е от особена важност за устойчивостта и колонизацията на чревния хабитат от *Lactobacillus fermentum*.

Към достоинства на дисертацията трябва да се добави и умението на Даниела Моллова-Дошкова да отразява извършеното много ясно и коректно, да обсъжда

получените резултати на фона на постигнатото от други автори. Дискусията е направена убедително въз основа на голям брой съвременни данни. Трябва да се подчертае стремежът на автора да търси обяснение на данните, да предлага хипотези, да отразява и дискутира и отрицателните резултати, да дава насока за нови изследвания. Това, разбира се, е възможно благодарение на много доброто познаване на проблема и задълбочената научна разработка.

2.5. Изводи и приноси

Изводите са логично следствие от проведените експерименти. Според мен са формулирани в съответствие с постигнатото. Приемам изцяло направените приноси. Извършените изследвания дават възможност да се открият сериозни теоретични приноси, както оригинални, така и приложни.

2.6. Препоръки, забележки и въпроси

Към докторантката имам следните въпроси:

1. Повечето от видовете *Lactobacillus*, намиращи се в червата на човека не формират стабилни популации и са категоризирани като алохтоненни. Въпреки, че не са автохтонни в класическия смисъл, някои видове *Lactobacillus*, като *L. plantarum*, *L. casei*, *L. paracasei* и *L. rhamnosus*, са адаптирани към чревните екосистеми и устната кухина, които им позволяват да се намират там поне ограничено време. Във тази връзка изолираните от вас щамове могат ли да бъдат определени като номадски такива?
2. Възможно ли е фукозата да бъде сигнална молекула в храносмилателния тракт?
3. Какви са бъдещите ви приоритети в изучаването на бактерии изолирани от майчина кърма?
4. Планувате ли да секвенирате генома на изолираните от Вас щамове *Lactobacillus fermentum*?

2.7. Публикации във връзка с дисертационния труд

Част от резултатите са включени в две (2) научни публикации, представени са резултати и на три (3) научни форума. Даниела Моллова-Дошкова е посочена на първо място в една от статиите. Тези данни ми дават основание да направя извода, че в

основната си част, резултатите са дело на докторантката, а научната общност е запозната с тях.

2.8. Автореферат

Авторефератът се състои от 42 страници, които подробно отразяват основните акценти на докторантския труд. Накрая е приложено и резюме на автореферата на английски език.

3. Придобита компетентност и съответствие с изискванията на образователната и научна степен „доктор”

В хода на изпълнението на експерименталната работа и оформянето на дисертационния труд докторантката Даниела Моллова-Дошкова е придобила компетенции и умения, които могат да бъдат групирани по следния начин:

- ✓ разширила е теоретичната си компетентност в областта на биохимията и микробиологията;
- ✓ придобила е умения за работа с научна литература, анализирайки и обобщавайки научна информация;
- ✓ обогатила е методичните си умения, особено в частта на прилагането на редица съвременни методи;
- ✓ придобила е умения самостоятелно да оформя и дискутира резултатите, получени в хода на разработването на дисертацията, както и да прави изводи на базата на тях.

4. Заключение

В заключение искам да подчертая, че материалът е дисертабилен. Темата е актуална, докторантката е усвоила съвременни методи, експериментите са поставени методично правилно, получените резултати са достоверни и са солидна база за следващи научни и приложни разработки. Открояват се изключително оригинални научни и приложни приноси. Въз основа на гореизложеното уверено мога да заявя, че рецензираният дисертационен труд представлява оригинална научна разработка, с теоретично и приложно значение. Той отговаря на всички условия на Закона за развитие на академичния състав в Република България, Правилника за неговото приложение и на Правилника на ПУ “Паисий Хилендарски“. Всичко това ми дава основание за цялостна висока оценка на дисертационния труд, въз основа на която предлагам на уважаваното

научно жури да присъди образователната и научна степен „Доктор” на Даниела Георгиева Моллова-Дошкова по научната специалност „ Биохимия “.

15.09.2019 г.

Реценцент:

(проф. дбн Искра Иванова)