

С Т А Н О В И Щ Е

О Т

Проф. Ана Иванова Манева, дбн

Катедра по „Биохимия“ при МУ-Пловдив

Със заповед №Р33-1176/ 06.03.2020 г. от Ректора на ПУ „Паисий Хилендарски“ и решение на ФС на Биологическия факултет, протокол № 251/11.02.2020 г. съм утвърдена за член на научно жури за защита на дисертационен труд на тема **„Ефект на пребиотични полизахариди върху човешкото здраве“** за придобиване на научно-образователната степен „доктор“ от Александър Христов Александров към катедра по „Биохимия и микробиология“, Биологически факултет – ПУ „Паисий Хилендарски“ по професионално направление на област на висше образование 4. Природни науки, математика и информатика; професионално направление 4.3 Биологични науки; научна специалност: Биохимия.

Общо представяне на процедурата и докторанта

Представеният комплект материали на хартиен /електронен носител от Александър Христов Александров е в съответствие с Процедурата за придобиване на ОНС „доктор“ в ПУ – Пловдив и включва: молба до ректора по образец за откриване на процедура, протокол от катедрен съвет за предварително обсъждане на дисертационния труд и взетите решения за разкриване на процедура и за състав на научно жури, Със заповед №Р33-1176/ 06.03.2020 г. от Ректора на ПУ „Паисий Хилендарски“ за утвърждаване на научното жури, автобиография европейски формат, дисертационен труд, автореферат, списък на научните публикации по темата на дисертацията, справка за покриване критериите за необходим брой публикации на Биологически факултет на ПУ „Паисий Хилендарски“, копия на две публикации, едната публикувана, другата приета за печат, декларация за оригиналност и достоверност на приложените документи, свързани с хода на процедурата. Във връзка с дисертационния труд кандидатът има едно участие в международна конференция и в три проекта.

Александър Христов Александров е придобил степен Бакалавър по Биологични науки (BSc. Hons.) в Университет Утрехт, Миделбург, Холандия, Миделбург (Холандия) и Магистър по Медицинска биология (MSc.) (2011–2013) Пловдивски университет Паисий Хилендарски, Пловдив (България). От 2016 година е докторант в Катедрата по биохимия и микробиология към Биологически факултет, Пловдивски университет Паисий Хилендарски.

Описание на дисертационния труд

Представеният труд е написан на 129 стр. Структурата му включва: съдържание – 3 стр., списък на използваните съкращения – 2 стр., въведение – 1.5 литературен обзор

– 37 стр.; материали и методи -14 стр, резултати и обсъждане -43 стр., обобщение -2 стр, изводи и приноси – 3 стр., литературен списък от 140 автори. Резултатите са представени с 30 фигури и 10 таблици. В публикациите докторантът е първи автор.

Обща преценка за актуалността на дисертационния труд

Дисертационният труд има приложно-научен характер като идеята е да се потърси здравен ефект на пребиотични олигозахариди. Заглавието би могло да се конкретизира дотолкова доколкото то касае не изобщо човешкото здраве, а засяга мъжкия инфертилитет като работен обект са сперматозоиди. Използвани са кафяви водорасли (*Ascophyllum nodosum*), Годжи Бери (*Lycium barbarum*) и бабини зъби (*Tribulus terrestris*), билки с известни благоприятни биологични ефекти като източник на полизахариди, богати на фукоза. Фукозата е дезоксихексоза, която присъства в голямо разнообразие от организми. При бозайниците гликаните, съдържащи фукоза играят важна роля в кръвноруповата антигенност, реакциите на левкоцитно-ендотелна адхезия и трафик, взаимодействия между гостоприемник и микроби и много онкогенни събития. Промени в експресията на фукозилирани олигозахариди са наблюдавани при някои патологични процеса, включително рак и атеросклероза. Дефицитът на фукоза е придружен от сложен набор от фенотипове както при хора с левкоцитен дефицит на тип Пв). Фукозата е основен енергиен източник за сперматозоидите и се освобождава от фукозилираните полизахариди с ензима α -L-фукозидаза. Кафявите водорасли (*Ascophyllum nodosum*) съдържат в най-висока концентрация фукоза в структурата на фукоидан, който е сулфатиран полизахарид, намиращ се основно в клетъчната стена. По тази причина една от основните задачи в дисертацията е да се изолират и пречистат такива богати на фукоза полизахариди от *Ascophyllum nodosum* с цел да се провери тяхния биологичен ефект като се изследва антиоксидантната им активност в присъствие на еякулат и върху активността на алфа-L-фукозидаза в симулиран стомашен сок на човек. Друга задача е изолиране и характеризирание на полифенолни съединения от *Ascophyllum nodosum*, тъй като е известен тяхният благоприятен ефект при различни заболявания, напр. екстракти от *Ascophyllum nodosum*, съдържащи фенолни съединения, подобряват състояния с инсулиновата резистентност и гликемичния статус при пациенти с нарушена толерантност към глюкозата. Лиофилизирани екстракти от другите два растителни вида са също тествани за определяне ефекта им върху L-фукозидазната активност в симулиран стомашен сок на човек. Сравнен е ефектът на многокомпонентен продукт SEANERGIX с биологичната активност на отделните полизахариди и лиофолизирани екстракти за да се проучат възможни благоприятни ефекти върху човешки сперматозоиди чрез спермален анализ и определяне на ДНК фрагментацията при клинично проучване при пациенти с понижени спермални показатели.

В литературата има проучвания върху растителни обекти, показващи инхибиращ ефект на фукоидан върху алфа-амилаза и алфа-глюкозидаза (Kim et al.2014) което се интерпретира като потенциална възможност за възстановяване на глюкозния толеранс при застрашени индивиди. В литературата не намерихме данни за ефект на екстракти от кафяви водорасли, бери-бери и бабини зъби върху алфа-фукозидаза. Има изследвания от български автори върху антиоксидантна активност на *Tribulus terrestris* (Dimitrina

Zheleva-Dimitrova, Danka Obreshkova, Paraskev Todorov, 2012). Чужди автори публикуват данни за подобряване на човешките спермени параметри при човек и в миши модел при третиране с *Tribulus terrestris* (Khaleghi S, Bakhtiari M, Asadmobini A, Esmaeili F, 2016; . Natasha Frasson Pavin, Aryele Pinto Izaguirry et al. 2018).

Дисертационният труд е актуален и социално значим като се има предвид, че в световен мащаб се поставя въпросът за понижение на мъжкия фертилитет поради различни фактори, засягащи начина на живот, нарастващия стрес и замърсявания на околната среда и др.

Литературен обзор – В литературния обзор е направен преглед на механизми на окислителния стрес и антиоксидантна защита, безплодието като резултат от нарушен редокс баланс и последиците от окислителния стрес за сперматозоида, ролята на окислителния стрес за ДНК фрагментация, разгледани са аспекти важни за мъжкия инфертилитет, които включват анализ на фактори за оценка биологичната активност на сперматозоидите. Друг важен раздел е характеристика на природни биоактивни вещества, повишаващи репродуктивното здраве, което мотивира избора на растителни видове, източници на полизахариди и полифеноли. Обърнато е внимание на биологичната активност на кафявите водорасли с представител *Ascophyllum nodosum* и фукоидините като важни съединения в състава им, и е направен критичен анализ на процедури за екстракция и изолиране на богати на фукоза въглехидрати. Разгледани са биологично активни съединения от другия растителен обект – *Lycium barbarum*. В обзора отсъства коментар върху биологичната активност на третия използван растителен обект – *Tribulus terrestris*, такъв е направен при дискусията. Липсва заключение, което да аргументира на базата на натрупаните данни досега какво ново се очаква от настоящото изследване. В този порядък не е упомената и работна хипотеза.

Цел и задачи – Целта е конкретна и отразява намеренията на дисертацията, а задачите конкретизират отделните стъпки за постигане на целта. Четвъртата задача е изследване ефекта на изолираните полизахариди и отделните екстракти от *Ascophyllum nodosum*, *Tribulus terrestris* и *Lycium barbarum* върху α -L-фукозидаза в моделна система на стомашен сок, а не в еякулат.

Методи – Използвани са съвременни методи, които включват 1) оптимизиране на съществуващите методи за изолиране на полизахариди, включващи пречистване на изходната суровина с ацетон и метанол, екстракция на полизахариди и пречистване на богатия на фукоза оплизахарид; 2) характеристика на изолирания полизахарид чрез киселинна хидролиза и хроматографски методи; 3) изследване на полифенолни вещества в екстрактите и търговския продукт чрез екстракция и спектрофотометрични анализи; 4) използване на модел, симулиращ процесите на храносмилане в стомаха; 5). метод за определяне активността на алфа- L- фукозидаза б). методи за обработка на прясна и замразена проба от семенна течност; 7). Спермален анализ и интерпретация на анализа. 8).Тест за дисперсия на хроматина на сперматозоидите и за ДНК фрагментация; 9) Определяне на антиоксидантна активност посредством два спектрофотометрични

методи. Не са посочени какви статистически методи са използвани за обработка на получените резултати. Няма библиографска справка за авторите на използваните методи.

Резултати– Оптимизирани са методи за екстракция и пречистване на полизахари от *Ascophyllum nodosum* като в зависимост от методите съдържанието на фукоза е от 16.3-23.7%. Оптимизиран е метод за екстракция и определяне съдържанието на полифеноли, представени като mg еквивалент галова киселина като резултатите показват, че във воден екстракт се съдържат 8.5% повече полифеноли в сравнение с екстракция с ацетон и също така антиоксидантната активност, представена като Trolox еквивалент е по-висока във водния екстракт. Резултатите от изследване на ефекта на полизахариди, изолирани от *Ascophyllum nodosum* върху антиоксидантна активност, определена в еякулат показва, че с нарастване концентрацията на фукоидановия полизахарид антиоксидантна активност нараства около 6 пъти. Изследванията с екстракти от *Ascophyllum nodosum* показват зависими от концентрацията на екстракта ефекти, които са инхибиране на активността на ензима алфа-L-фукозидаза в симулирания модел със стомашен сок. Лиофилизираните екстракти от *Lycium barbarum* и *Tribulus terrestris* стимулират активността на ензима алфа- L-фукозидаза. Не е намерен синергичен ефект при въздействие с двата вида екстракти. Ензимната активност на α -L-фукозидазата в присъствие на лиофилизиран екстракт от многокомпонентен продукт SEANERGIX след обработка в симулирани условия на стомашен сок е по-висока с 24 до 30 % независимо от концентрацията му в реакционната смес. След 90 дневен прием прием на многокомпонентния препарат от доброволци с репродуктивни проблеми се установява подобряване параметрите на спермалния им анализ – увеличение на общия брой сперматозоиди средно с 21.75%, увеличение процента на нормокинетичните сперматозоиди с 27.55% и увеличение общия брой на нормокинетичните сперматозоиди с 43% като процента на ДНК фрагментаци намалява средно с 6%. При представянето на резултатите не е посочено какъв/и/ метод/и/ на статистически анализ е/са/ използван /и/ за да се оцени значимостта на постигнатия ефект от 6%.

Дискусия – В дискусията е направен анализ на съвременните представи за окислителни промени в сперматозоидите като е изтъкнато, че те притежават слаба собствена система на антиоксидантна защита. Окислителният стрес е обвързан с коментари върху митохондриални събития, касаещи като страничен продукт на дихателната верига образуването на супероксидни аниони. Известно е, че флавопротеините и убихинонът като редокс-системи в процеса на електронен транспорт временно съществуват като нестабилни свободни радикали и в патобиохимията на биоенергетиката това може да доведе до окислителен стрес. В дихателната верига има 4 дихателни комплекса, като I-ви и III-ти могат да бъдат въввлечени в окислителен стрес поради образуване на супероксид. Съществуват митохондриални и цитозолни изоензими супероксиддисмутаза, които елиминират супероксидния анион до водороден прекис. Антиоксидантната защита изисква за пълно неутрализиране на окислителния стрес елиминиране и на водородния прекис от каталаза или други пероксидази. Не става ясно защо е включена в коментара инхибитора на електронния транспорт ротенон. Като електронен акцептор той има значение само за изясняване подредбата и

последователността на подреждане на редокс системите и не е известно да може да бъдат ползвани при физиологични условия. В обсъждането е споменато „лечение с ротенон“, но не е посочен литературен източник. Ротенонът блокира електронния транспорт и по този начин би нарушил образуването на енергия така че едва ли е удачно лечение с ротенон, напротив той се счита за силна дихателна отрова и са определени леталните дози. В целия този подраздел няма цитирана литература. Също е използван терминът „митохондриална матрица“, вместо митохондриален матрикс. Има неясни изречения, напр. „Тъй като производството на митохондриална АТФ не е необходимо за поддържане на подвижността при наличие на глюкоза, тази връзка следва да бъде непряка и потенциално причинена от оксидативен стрес“. Това не би могло да бъде вярно твърдение, тъй като глюкозата е основен източник за набавяне на АТФ, образуван при окислително фосфорилиране в митохондриите, кооперирано с гликолизата. Също така буди недоумение изречението „В настоящото изследване се определи ефекта на оксидативния стрес върху α -L-фукозидазата на сперматозоидите за да се покаже, че оксидативния стрес“..... В целта и задачите не е посочено подобно намерение и подобни изследвания липсват в дисертацията. Би могло да се предположи само, че антиоксидантните ефекти на изследваните екстракти минимизират и окислителни промени в ензима.(стр.101). Не са въведени значенията на някои съкращения, напр. PRDX2. Не е ясно какво се разбира под „антиоксидантен модификатор“. „Лечението с H_2O_2 е довело до дозозависимо увеличение на GSS-R във високомолекулните протеини и тиол-окислените протеинови комплекси в семенната плазма при нередуциращи условия“ (стр.102). Вероятно става дума за груб превод и става дума за третиране с H_2O_2 , тъй като последният не би могъл да се ползва за лечение и както показва изречението причинява окислителни нарушения в белтъците. (стр. 102). Направен е интересен преглед на механизмите на антиоксидантна защита, както и за възможни механизми за окислителни нарушения на сперматозоида. Като слабост може да се посочи, че разсъжденията са общи, не са свързани с конкретните резултати. и имат характер на литературен обзор.

Изводи и приноси- От направеното проучване са изведени 9 извода въз основа на получените данни от структурните изследвания и биологичните тестове. Изброени са 2 оригинални и 2 извода с потвърдителен характер. Изводите и приносите отговарят на получените резултати.

Научни публикации във връзка с дисертацията – Докторантът е представил 2 публикации в реферирани списания, като в двете е първи автор. Има участие в 1 международен форум и участва в 3 научни проукта. Публикационната активност отговаря на изискванията

Заключение: Дисертационният труд е посветен на важен медицински и социален проблем, засягащ безплодието при мъжете. Трудът има заслуга да оптимизира методи, свързани с получаване на биологично активни субстанции от растения, които са известни с целебните си качества, включително и при мъжкия фертилитет. Проучен е и ефектът на готов продукт, което предоставя възможност той да бъде препоръчан и използван. Оригинален е приносът върху възможностите на ензима алфа-фукозидаза да разгражда

полизахариди и предоставя като субстрат за сперматозоидите фукоза, която е специфичен енергиен субстрат. Сумарната оценка на представения труд е, че той отговаря на изискванията за придобиване на научно-образователната степен „доктор“ по професионално направление на област на висше образование 4. Природни науки, математика и информатика; професионално направление 4.3 Биологични науки; научна специалност: Биохимия.

Проф. Ана Манева, дбн

21 април 2020