

РЕЦЕНЗИЯ

от д-р Иван Генов Пищийски, професор в УХТ, гр. Пловдив

на дисертационен труд за присъждане на образователната и научна степен „доктор“ в област на висше образование 4. Природни науки, математика и информатика: професионално направление, 4.3 Биологически науки: докторска програма по Биохимия.

Автор: Александър Христов Александров

Тема: Ефект на пребиотични олигозахариди върху човешкото здраве

Научен ръководител: проф. д-р Илия Николов Илиев, ПУ „П. Хилендарски“

1. Общо описание на представените материали

Със заповед № Р33-1176 от 06.03.2020 г. на Ректора на Пловдивския университет „Паисий Хилендарски“ (ПУ) съм определен за член на научното жури за осигуряване на процедура за защита на дисертационен труд на тема „Ефект на пребиотични олигозахариди върху човешкото здраве“, за придобиване на образователната и научна степен „доктор“ в област на висше образование 4. Природни науки, математика и информатика: професионално направление, 4.3 Биологически науки: докторска програма по Биохимия.

Автор на дисертационния труд е Александър Христов Александров, докторант в редовна форма на обучение към катедра „Биохимия и Микробиология“ с научен ръководител проф. д-р Илия Николов Илиев от ПУ „П. Хилендарски“.

Представеният от докторанта Александър Христов Александров комплект материали на хартиен носител е в съответствие с Чл. 36 (1) от Правилника за развитие на академичния състав на ПУ и включва 9 документа, надлежно описани в молбата на кандидата до Ректора на ПУ, за разкриване на Процедурата за защита на дисертационен труд.

Докторантът е приложил 2 броя публикации. Този комплект документи съдържа всичко необходимо за разкриване на процедура по защита на дисертационен труд.

2. Кратки биографични данни за докторанта

Докторантът Александър Христов Александров е завършил бакалавърска степен по Биологични науки в Университет Утрехт, Миделбург, Нидерландия през 2009 г., след което продължава и завършва магистър по Медицинска биология в ПУ „П. Хилендарски“. От 2016 г. е редовен докторант. Знанията и уменията, които е придобил от двете степени са отлична основа за разработката на дисертационния труд, което се потвърждава и от нейния завършен вид.

3. Актуалност на тематиката и целесъобразност на поставените цели и задачи

Тематиката, свързана с пребиотичните олигозахариди е едно от основните направления в научната дейност на биохимичната част от колектива на катедра „Биохимия и микробиология“ на ПУ. Разработката на настоящия дисертационен труд се явява съвсем естествено и оправдано продължение на тази тематика. Тези продукти могат да бъдат получавани по микробнален път, да бъдат изолирани от различни природни източници или директно да се ползват от тях. Все по-голяма част от хората се убеждават в ползата от тяхната употреба в хранителния им микс и режим. За това считам, че разширяването на познанията за влиянието на тези съединения върху

здравето на човек има перманентна актуалност и трябва да бъде подкрепяно и адмирирано.

4. Познаване на проблема

Запознаването със съществуващата научна информация по избраната тема е необходимо и задължително условие за успешно справяне с целта, която се поставя. Докторантът е осъзнал тази необходимост и представя един добре подреден в тематично отношение литературен обзор, засягащ всички аспекти на бъдещите научни изследвания. Той обхваща 140 научни статии, от които над 80% са след 2000-та година, като началната точка е 1914 година. Трябва да се отбележи обаче, че част от изложението има образователен характер, което до известна степен може да бъде прието. Проблемът е, че някои теми се разглеждат доста подробно, без това да кореспондира с проведените изследвания, каквито са например методите и условията за екстракция при водораслите. Като цяло считам, че докторантът има необходимата предварителна подготовка и умее на добър език и стил да излага и анализира съществуващите научни факти.

5. Методика на изследването

Наборът от методи за анализ се определя от вида на поставените за решаване задачи. Те са сравнително добре формулирани и изискват няколко групи аналитични техники – методи за изолиране на полизахариди и определяне на техния състав, ензимни методи и такива за характеристика на спермалната течност. Като количество те не впечатляват, но се оказват достатъчни за получаване на приемливи резултати, защото са микс от стандартни и съвременни аналитични техники. Доброто и внимателно тяхно описание дава възможност да бъдат възпроизведени без проблеми.

6. Характеристика и оценка на дисертационния труд

Стартът на научните изследвания е свързан с изолирането на фукоза съдържащи сулфитирани полизахариди (фукоидани) от *Ascophyllum nodosum* и определяне на техния монозахариден състав. Тази стъпка е продиктувана от водещата количествена позиция на тези водорасли в състава на многокомпонентния препарат *Seanergix*, който е основен обект на проучванията в дисертацията.

Без да се излагат детайли от условията на екстракция и пречистване се съобщава, че са получени 4 различни проби. След тяхната киселинна хидролиза те са подложени на HPLC анализ и закономерно е установено, че основен монозахарид е фукозата в количества от 16.5% до 23.7%. Тези стойности се различават доста от познатите в литературата. Причините могат да бъдат от различно естество – непълна екстракция на полизахарида или недостатъчна негова хидролиза, но докторантът не представя данни за добива на фукоидан, нито за неговата степен на хидролиза. Без коментар остава и видът на пика с най-голяма площ в хроматограмите.

Друг интересен компонент в състава на препарата *Seanergix* са полифенолите, които са екстрахирани с вода и ацетон в количества, съответно от 149 mg/g и 136 mg/g, като тези стойности предполагат добри антиоксидантни свойства. Те действително са потвърдени, като за водния екстракт са получени 69.3%, а за ацетоновия – 66.6% от максимално възможните. В подкрепа на тази антиоксидантна защита се включва и фукоидановата полигозахаридна фракция на кафявите водорасли, която още при концентрация 2mg/ml постига 30.1% от максималната стойност и то в присъствие на еякулат. Тези резултати потвърждават важната роля на сулфитираните полизахариди и техните производни в предпазването на спермата от окислителното действие на различни свободни радикали.

Следващата стъпка в изследванията е свързана с ензима фукозидаза (човешка) и неговите отнасяния спрямо присъствието на различни компоненти в средата (фукоза, полизахариди, полифеноли и на различни екстракти). Причина за това е схващането, че фукозата е основен енергиен източник за сперматозоидите и спомага за тяхната адхезия към яйцеклетката. Получените резултати показват, че повишаването на концентрациите на отделните добавки над определени стойности предизвиква инхибиране на ензимната активност. Най-чувствителна е фукозидазата на полифенолите от *Ascophyllum nodosum*, които в концентрация от 125 µg/ml понижават над 50% от нейната активност. Една част от екстрактите обаче се оказват мощни стимулатори на ензимното действие, като това най-добре е изразено при активната субстанция от *Tribulus terrestris*, която в концентрация от 1.875 mg/ml повишава над 2 пъти ензимната активност.

За да проявят своето действие върху човешкия организъм различните таблетирани добавки преминават през неговия храносмилателен тракт и се подлагат на действието на киселия стомашен сок. Симулирайки подобно действие върху част от екстрактите, докторантът проверява как се отразява тази обработка върху ензимната активност. Оказва се, че в повечето случаи се понижава инхибиращото действие на тези компоненти, което вероятно е свързано с по-слабото им въздействие върху структурата на ензима, като се запазва по-пълно неговата нативна природа. Въпреки подробните изследвания не става ясно доколко човешката фукозидаза е в състояние да разгражда сулфитирани полизахариди и да осигурява мономерна фукоза, като енергиен източник.

Заявеното в темата на дисертацията проучване на ефекта на пребиотичните олигозахариди върху човешкото здраве е една доста амбициозна цел, тъй като човешкият организъм е сложен комплекс от различни органи и системи. Нормалното им функциониране осигурява здравословното състояние на всеки индивид. Проучването на влиянието на хранителните компоненти върху това състояние е мащабна задача. Поради тази причина докторантът ограничава своето поле на действие само върху влиянието на многокомпонентния продукт *Seanergix* върху пациенти с понижени спермални показатели. Техният брой е само 32, което за нуждите на статистиката вероятно не е достатъчно, но и намирането на по-голям брой също е трудно, тъй като е известно, че българинът се слави със своята мъжественост. Изследвани са показатели, като обем на еякулата, общ брой на сперматозоидите и степента на тяхната подвижност в началото и след 60 и 90 дена прием на препарата *Seanergix*. В първата група от 12 доброволци изследваните показатели на всички се подобряват в различна степен, докато във втората от 20 пациенти многокомпонентният препарат подобрява спермалните показатели, но не на всички. Около 20% от тях не реагират положително. От обобщената таблица с резултатите от проучването се вижда, че положителният ефект е най-силно изразен при пациентите с най-малък брой нормокинетични сперматозоиди (до 10 млн./ml) и по-слабо при останалите две групи – до и над 20 млн./ml. Изводът е, че препаратът *Seanergix* оказва благотворно влияние върху репродуктивните способности при мъжете, като намалява и ДНК фрагментацията на сперматозоидите. Това влияние обаче не може да се абсолютизира, тъй като индивидуалните реакции не винаги се подчиняват на общото правило. Освен това добре би било да има и контролна група пациенти.

В края на дисертационния труд се предлага част озаглавена „Дискусия“. Трудно ми е да преценя нуждата и ползата от нея, тъй като тя в известна степен се явява продължение на литературния обзор. Разбирането ми за дискусия е в нея да се оценят и съпоставят в дискусийна форма получените резултати и съществуващите в литературата данни, което практически липсва.

В заключителното обобщение докторантът разглежда голямата роля на реактивните кислородни видове (ROS) в процеса на фертилизация, мястото на различни антиоксиданти в нея и нуждата от разширени бъдещи проучвания на ефектите на ROS

върху биологичните системи, с цел тяхното преодоляване. Разбира се и без тези пожелания научната общност ще продължи да работи върху оксидативния стрес, неговите проявления и начини за отстраняване. Така че ползата от обобщението е доста спорна.

Представените изводи достоверно отразяват получените резултати, с малки изключения.

7. Приноси и значимост на разработката за науката и практиката

Афишираната тема на дисертацията – ефект на пребиотичните олигозахариди върху човешкото здраве, безспорно привлича внимание и буди интерес, тъй като неговото поддържане и подобряване е в основата на нормалното функциониране на всеки индивид. В дисертационния труд този ефект е ограничен само върху сперматогенезата при мъже с изразени репродуктивни проблеми.

В основата на проведените изследвания стои многокомпонентният препарат Seanergix и част от неговите компоненти. Представените данни позволяват да бъдат формулирани следните научни и научно-приложни приноси:

1. Потвърдено е, че основният монозахарид на изолирания фукоидан от *Ascophyllum nodosum* е L-фукоза.
2. Установено е, че препаратът Seanergix проявява висока антиоксидантна активност, която достига до 69.3%. Такава притежава и полизахаридът, изолиран от кафяви водорасли, която при концентрация 5 mg/ml и присъствие на еякулат достига до 42.8%.
3. Доказано е за първи път активиране до 20% на човешка L-фукозидаза от воден екстракт на годжи бери и до 151% след негова симулирана обработка в стомашен сок.
4. Установено е за първи път, че активната субстанция на *Tribulus terrestris* стимулира силно ензимното действие на човешката фукозидаза, независимо от формата на нейното влагане.
5. Доказано е подобряване на спермалните показатели на доброволци с репродуктивни проблеми след 90 дневен прием на препарата Seanergix.

8. Преценка на публикациите по дисертационния труд

Докторантът е представил две публикации, едната от които е под печат. Това е удостоверено със съответния документ. Двете статии са в *Journal of Bioscience and Biotechnology* – научното списание на Биологическия факултет на Пловдивския университет. В едната от статиите Александров е първи автор, а в другата втори. Участвал е в един научен форум, състоял се в Пловдив през 2017 година. По този начин изискванията на Биологическия факултет спрямо публикуването на научната продукция са изпълнени.

9. Лично участие на докторанта

Считам, че в представения дисертационен труд личното участие на Александър Христов Александров е безспорно и не буди съмнение, защото останалите участници в авторските колективи на научните статии са научният му ръководител, носител на идейната част в тях и негови колежки. Взаимодействието с тях е от полза и за двете страни.

10. Автореферат

Авторефератът е оформен съгласно изискванията и включва по-голямата част от резултатите, изводите и приносите във връзка с дисертацията. От него може да се придобие достоверна и пълна представа за извършените научни изследвания.

11. Критични забележки и препоръки

Една част от забележките бяха изложени в хода на обсъждането на отделните части и не считам да ги повтарям. Тук ще поставя само няколко въпроса за доизясняване на част от постановките и резултатите.

1. Считате ли, че само полизахаридите и полифенолите в различните екстракти са активните субстанции, които влияят в една или друга посока върху протичащите ензимни реакции и процеси в клетките. Имате ли идея за други такива?
2. След проведените изследвания бихте ли препоръчали при производството на многокомпонентния препарат Seanrgix да се променят количеството и вида на отделните съставки?
3. Освен за подобряване на спермалните показатели при мъжете с нарушени репродуктивни способности, за какво още бихте препоръчали препаратата Seanrgix и то с вътрешна убеденост?

Препоръките, които ще направя са свързани с коректността при представянето и коментарите на отделните резултати. Например в първия извод се твърди, че е доказано съдържание на L-фукоза над 25% в изолирания фукоидан. В действителност обаче най-високата стойност, отчетена от представените хроматограми е 23.7%. Вторият пример е свързан с първия принос и донякъде с втория. От представените числени стойности в тях само една е на мястото си и е вярна- тази за активиращото действие на субстанцията от Tribulus terrestris с 200%, докато други две са с разменени места, а трета е невярна. Има и на други места такива неточности, но целта ми е да подсказва на младия колега, че е необходима по-висока прецизност и коректност.

12. Препоръки за бъдещо използване на дисертационните приноси и резултати

Още при представянето на получените резултати докторантът стига на няколко места до извода, че за по-пълното изясняване на различни механизми и факти са необходими допълнителни изследвания. Така, че и без препоръки посоката е ясна.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

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

Дисертационният труд показва, че докторантът Александър Христов Александров притежава необходимите теоретични знания и професионални умения по научна специалност Биохимия, като демонстрира качества и умения за самостоятелно провеждане на научно изследване.

Поради гореизложеното, давам своята **положителна оценка** за проведеното изследване, представено от рецензираните по-горе дисертационен труд, автореферат, постигнати резултати и приноси, и **предлагам на почитаемото научно жури да присъди образователната и научна степен „доктор“** на Александър Христов Александров в област на висше образование: 4. Природни науки, математика и информатика: професионално направление, 4.3 Биологически науки: докторска програма по Биохимия.

10.04.2020 г.

Рецензент:
/проф. д-р. Иван Пищийски/