

Рецензия

От: **проф. Искра Витанова Иванова, дбн,**

Относно: оценка на дисертационен труд за придобиване на образователна и научна степен “доктор” в област на висше образование, „Доктор“ по докторска програма „Биохимия“. Професионално направление 4.3 „Биологически науки“ Област на висшето образование 4. „Природни науки, математика и информатика“

Със заповед № Р33-3326 от 15.07.2021 г. на Ректора на Пловдивския университет „Паисий Хилендарски“ (ПУ) съм определена за член на научното жури.

Автор на дисертационния труд: **Ивица Димов**

Заглавие на дисертационния труд: **„ИЗСЛЕДВАНЕ СИНЕРГИСТИЧНИЯ ЕФЕКТ НА ПРЕБИОТИЧНИ ОЛИГОЗАХАРИДИ ВЪРХУ ЕНЗИМИ ОТ ВЪГЛЕХИДРАТНАТА ОБМЯНА И АНТИОКСИДАНТНАТА ЗАЩИТА НА ОРГАНИЗМА“**

Научни ръководители: : **проф. д-р Илия Илиев**
доц. д-р Анелия Биволарска

1. АКТУАЛНОСТ И ЗНАЧИМОСТ НА РАЗРАБОТВАННИЯ ПРОБЛЕМ

Микробиотата е един от решаващите фактори, които благоприятстват човешкия метаболизъм и здравословното му състояние и са обект на многобройни изследвания през последните години. Разработването на молекулярни техники сега позволява пълното идентифициране на отделните микроорганизми в сложните съобщества на човешката микробиота в контекста на здравния статус на човека. развитието на пребиотиците като хранителни добавки в търсене на максимален ефект върху поддържане баланса на чревната микробиота на човека, предизвиква засилен научен интерес. Пребиотиците са несмилаеми хранителни съставки, които селективно стимулират растежа, състава и активността на чревната микрофлора и по този начин подобряват здравето и благосъстоянието на гостоприемника. От друга страна нарушенията, предизвикани от оксидативния стрес на клетъчно и тъканно ниво, са предпоставка за развитие на метаболитен синдром, с риск за прогресиране в по-сериозни усложнения - захарен диабет тип 2, сърдечно-съдови заболявания, стеатоза на черния дроб, астма, както и някои ракови заболявания. Редица научни изследвания докладват за положителните ефекти на пребиотиците при борбата с физиологичните нарушения, предизвикани от окислителния стрес. Основният механизъм на действие на пребиотиците е свързан с растежа и развитието на полезната микрофлора в ГИТ

на гостоприемника и получаване на късоверижни мастни киселини. Те подпомагат нормалното функциониране на чревната лигавица, стимулират имунната система, като потискат производството на провъзпалителните цитокини, подобряват глюкозната хомеостаза . Актуалността на настоящата темата е лесно доказуема само като се вземе предвид очакваното пандемично покачване на заболялите от диабет, което е свързано с борбата със затъстяването на населението. Причината да се обръща внимание на тези заболявания е установената корелация между тези хронични заболявания и срива на имунологичния статус, което е в основата на онкологичните и сърдечно-съдовите заболявания.

Всичко това ми дава основание да оценя като актуална представената научна разработка, с потенциал за научни постижения, които да имат бърза практическа реализация.

2. ОБЕМ И СТРУКТУРА НА ДИСЕРТАЦИЯТА

Дисертацията е изложена на 146 стандартни страници текст. Спазена е общоприетата схема и препоръчителните съотношения между отделните части на труда, както следва: *Въведение* – 1 стр.; *Литературен обзор* – 28 стр.; *Цел и задачи* – 1 стр.; *Материали и методи* – 16стр.; *Резултати и обсъждане* – 76 стр.; *Дискусия*- 1 стр.; *Изводи* 1 стр. и *Литература* – 20 стр. Получените резултати са илюстрирани с 50 фигури и 32 таблици и са представени 217 литературни източника.

3. ЛИТЕРАТУРНА ОСВЕДОМЕНОСТ И ПОСТАНОВКА НА ЦЕЛТА И ЗАДАЧИТЕ

Настоящата дисертация е комплексна и предполага добро познаване на литературните източници и методите за решаването ѝ. Докторантът е направил обстоен преглед на постиженията на други изследователи, които е успяла да предаде и анализира върху 28 страници в литературния обзор. Обзорът представя детайлно състоянието на проблема и доказва необходимостта от разработването на дисертационната теза. Литературният обзор се състои от седем раздела. Разгледани са факторите, водещи до възникване на оксидативен стрес и механизмите от които зависи. Представени са изследвания свързани с механизмите за възникване на метаболитен синдром и корелацията между оксидативен стрес, метаболитен синдром и захарен диабет , както и тяхното взаимодействие. Представени са данни за микробиота на ГИТ при човека, хидролитични ензими от храносмилателния тракт като амилазите, които са част от групата на гликозил хидролазите, катализиращи разграждането на сложни въглехидрати. Логично са представени пребиотици и олигозахариди, тяхната класификация и механизъм на действие и физиологични ефекти.

Допълнително е се приложени данни за въглехидратна обмяна при еритроцитите, транспорта на глюкоза в еритроцитите и структура на еритроцитната мембрана.

На вниманието на читателя се предлагат и някои нерешени проблеми. Литературният обзор е конкретен, структуриран е правилно, следвайки логическата обвързаност на информацията. Данните от справката са послужили за ясното и правилно определяне не само на целта, но и за формулировката на задачите. Поставени са за решаване добре обосновани 5 експериментални задачи.

Литературата (както в обзора, така и в целия труд) е тясно свързана с темата на дисертационния труд. Литературният списък включва внушителния брой от 217 заглавия на латиница. Те са основно от последните години. Това говори за отлична теоретична осведоменост на докторантката и с цел намиране на ново научно предизвикателство.

4. ОЦЕНКА НА ИЗПОЛЗВАНИТЕ МЕТОДИ И МАТЕРИАЛИ

Разделът "Материали и методи" демонстрира внушителен набор от методи, съобразени с конкретните изисквания на експериментите. Те са съвременни и адекватни за реализацията на дисертационния труд. Описани са точно и подробно, като изцяло покриват многостранните области на работата: от класическите до модерните изследвания, включващи модел на експеримента със специално конструирана система на *in vitro* ГИТ-стомах и черва охарактеризиране на щамове и тяхното култивиране. Представени са голям брой спектрофотометрични методи свързани с определяне на ензимни активности свързани с метаболизма на въглехидрати (пребиотици). За определяне на антиоксидантна активност на еритроцити са определени активностите на глутатион редуктаза, желязо редуциращата способност, каталаза и супероксид дисмутаза. Монозахаридният и олигозахаридният състав се определени с помощта на високоефективна течна хроматографска система. Shimadzu Резултатите са анализирани с LabSolution, Nexera-XR-RF софтуер. Изведени са уравнения, описващи площта на пика (y) и концентрацията на монозахаридите или олигозахаридите (x , mg/ml). Органичните и късоверижните мастни киселини са определени на високоефективна течна хроматографска система Konik-Tech. Статистическите анализи са направени със статистическа програма SPSS, версия 19.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) и GraphPad Prism version 7.00 for Windows (GraphPad Software, La Jolla California USA).

В отделните етапи на работата докторантът съчетава умело използваните подходи. Всички това ми позволява да дам висока оценка на научното ниво и на отличната подготовка на докторанта, който успява правилно да съчетае многообразие от класически със съвременни методи за целите на дисертацията, успешно решавайки поставените експериментални задачи.

5. ОЦЕНКА НА ПОЛУЧЕНИТЕ РЕЗУЛТАТИ

Целта на настоящия дисертационен труд е да се изследва синергистичния ефект на комбинация от пребиотични олигозахариди и пробиотични млечнокисели бактерии върху ензими от въглехидратната обмяна и антиоксидантната защита при еритроцити след метаболитни трансформции в условия на *in vitro* система на гастроинтестинален тракт.

Раздел „*Резултати и обсъждане*“ е добре структуриран, подкрепен с табличен и графичен материал, с подходяща интерпретация на получени резултати от чужди научни колективи. Авторът последователно представя доказателствен материал по своята научна теза, като по този начин логически финализира експериментална работа. Извършена е голяма по обем и разнообразна експериментална работа в рамките на комплексно микробиологично и биохимично изследване. В резултат на проучвания на структурните промени на пребиотични олигозахариди и полизахариди в симулиран модел на гастроинтестинален тракт се установява, че се наблюдава различна степен на хидролиза на изследваните пребиотични олигозахариди. Най-висока резистентност проявява лактулозата, а най-чувствителни са фруктоолигозахаридите. При изследването на метаболитни промени при пробиотичен щам *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* L14 култивиран в гастроинтестиналният тракт в присъствие на пребиотици са получени данни за стимулиране растежа на пробиотичния щам, в присъствие на лактулоза като единствен въглехидратен източник като се разкрива потенциал за специфичното ѝ утилизиране. От изследваните олигозахариди в условия, симулиращи *in vitro* тънки черва в система на гастроинтестинален тракт, пробиотичният щам *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* L14, показва най-висок клетъчен растеж при метаболизиране на лактулозата и нейните деривати. В условия, симулиращи *in vitro* стомах в система на гастроинтестинален тракт, се наблюдава различна степен на хидролиза на изследваните полизахариди. От изследваните полизахариди в условия, симулиращи *in vitro* тънки черва в система на гастроинтестинален тракт, пробиотичният щам *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* L14, показва най-висок клетъчен растеж при метаболизиране на инулина и неговите деривати.

Особен интерес представляват получените резултати за пробиотичният щам *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* L14, като се установява преминаване от хомоферментативен метаболитен тип при наличие на глюкоза в средата, към смесен тип, най-добре изразен при лактулозата и β -глюкана. Развитието на пробиотичните и пребиотичните продукти на пазара включва комбинация от пребиотични олигозахариди и пробиотични щамове, за да се покрият по-голяма част от изискванията към тях за въздействие върху здравния статус на човека. В тази връзка е проследен хода на метаболитните процеси в присъствие на три

олигозахарида (лактоулоза, ГалОЗ и ФОЗ) при култивиране на два изследвани пробиотична щам. От данните за динамиката на ензимните активности се вижда, че активността на β -галактозидазата е по-висока в по-продължителен период, което вероятно се дължи на двойно по-голямо количество олигозахариди, чиито гликозидни връзки се хидролизират от този ензим. Нивото на инулиназната активност е с около 50% по-ниско от β -галактозидазата.

Профилът на активираните ензими, отговорни за хидролизата на специфичните гликозидни връзки в структурите на изследваните олигозахариди и полизахариди, секретирани от пробиотичния щам *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* L14, доказва техния индуцируем характер. Доказано е, че β -галактозидазата се активира в присъствие на лактулоза и ГалОЗ, инулиназата се активира в присъствие на инулин и ФОЗ, а β -глюкозидазата се активира при наличие на фрагменти от β -глюкан. Основното познание за ензимната активност на лактобацили може да цели създаване на нов дизайн на нови по-ефективни пребиотици, а може също така да цели и идентифициране на потенциални ензимни индикатори на главната метаболитна активност, при оценка на тяхното влияние върху гастроинтестиналния тракт. Използвайки гликотехнология, пребиотиците могат да бъдат моделирани така, че да съдържат определени монозахариди и/или комбинация от връзки, които индуцират или усилват специфичната гликозидазна активност на пробиотични щамове *Lactobacillus* или други пробиотични микроорганизми.

Изследвано е влиянието на олигозахариди в резултат на метаболитните процеси осъществявани в условия, симулиращи ГИТ и съпътващите пробиотични щамове, върху антиоксидантните ензими, каталаза и супероксид дисмутаза в еритроцити, в условия на *in vitro* индуцирана хипергликемия. Установено е се статистически значимо повишение в активността на глутатион редуктазата на еритроцити, в условия на *in vitro* индуцирана хипергликемия при третиране с 1% лактулоза, 1% инулин, 1% ГалОЗ, 1% ФОЗ и 5% ФОЗ.

Фруктоолигозахаридите от инулинов тип понижават активността на слюнчената α – амилаза в *in vitro* условия. Метаболитите и фрагментите получени от ГалОЗ, ФОФ, лактулоза, полизахарид от *P. major* и таблетирани пребиотик, в условия на *in vitro* хипергликемия индуцирана от 50 mM глюкоза, при продължителност на третиране 48 часа, увеличават активността на супероксид дисмутазата в диапазон между 11-50% спрямо контролата.

С това изследване се установява, че метаболитите получени от пробиотични олигозахариди и полизахариди в *in vitro* система, симулираща ГИТ, подпомагат растежа и развитието на пробиотични щамове млечнокисели бактерии, но също така предпазват и подпомагат защитните механизми на еритроцити в условия на хипергликемия.

Получените резултати представени в „Резултати и обсъждане”, логично следват хода на решаването на поставените задачи. Те са обобщени и дискутирани в светлината на публикуваните данни от последните години. Висока оценка заслужават както идеята, така и обемът от изследвания проведен по изпълнението на тази задача и в целия труд. Направената дискусия по всеки експеримент, съпоставката на резултатите за отделните щамове и експерименти, и съпоставката с литературните данни, още веднъж подчертава качествата на докторанта във владенето на експерименталната теория. С това той доказва, че е овладял напълно третата степен на обучението си и е завършен експериментатор.

6. ПРИНОСИ И ЗНАЧИМОСТ НА РАЗРАБОТКАТА ЗА НАУКАТА И ПРАКТИКАТА, ЗАБЕЛЕЖКИ И ВЪПРОСИ

Приемам направените приноси.

За особено значими считам, че за първи път са представени данни, докладващи промените в състава и степента на полимеризация на вложените олигозахариди и полизахариди, третирани в условия, симулиращи *in vitro* стомах, което позволява да бъдат изчислени с по-голяма точност пребиотичните индекси.

За първи път е доказана в *in vitro* условия, възможността за въздействие върху антиоксидантни ензими (глутатион редуктаза, каталаза и супероксид дисмутаза) на еритроцити при наличие на хипергликемия, на метаболитите и остатъчните олигозахариди, получени в условия, симулиращи ГИТ.

Ивица Димов е автор в 4 научни публикации, като в три от тях е водещ изследовател и три участия в научни форуми, което показва творческата и изследователската му активност при изработването и оформянето им.

Към дисертанта имам няколко въпроса:

- Вашата разработка ще улесни ли разбирането на антиоксидантните механизми в изследваните от Вас млечно кисели бактерии и ще предостави ли информация за по-нататъшни инженерни щамове, устойчиви на окисление?
- Бактериите участват ли в „усещане за конкуренция“ при хранителен стрес и увреждане на клетките при наличието на екологична конкуренция?
- Какъв е най-общия ефект от добавянето на пробиотици върху метаболитните параметри, маркерите за възпаление и оксидативен стрес, нивото на мастни киселини с къса вериги (SCFAs) в състава на микробиотата в човешкия организъм?

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Темата е актуална, докторантът е усвоил 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. Предложената дисертация е доказателство, че Ивица Димов е развил компетентности необходими за присъждане на образователната степен доктор включващи теоретична подготовка, методологични познания, самостоятелност и опит за планиране на експерименти и способност за анализ на резултатите.

Дисертационният труд съдържа научни, научно-приложни и приложни резултати, които представляват оригинален 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“ и давам своята висока оценка за неговата защита и препоръчвам на членовете на научното жури да присъдят на дисертанта Ивица Димов образователната и научна степен „Доктор“ по професионално направление 4.3. Биологически науки, Специалност биохимия.

22.09.2021 г.

Подпис: