

РЕЦЕНЗИЯ

от

Проф. Ана Иванова Манева, дбн

Със заповед Р33-3326/15.07.2021 г. от Ректора на ПУ „Паисий Хилендарски“ и решение на ФС на Биологическия факултет, протокол № 266/06.07.2021 г съм утвърдена за член на научно жури за защита на дисертационен труд на тема „*Изследване синергистичния ефект на пребиотични олигозахариди върху ензими от въглехидратната обмяна и антиоксидантната защита на организма*“ за придобиване на научно-образователната степен „доктор“ от Ивица Димов 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 носител от Ивица Димитров- 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 № 266/06.07.2021 , заповед № 266/06.07.2021. от Ректора на ПУ „Паисий Хилендарски“ за утвърждаване членовете на научното жури, декларация за оригиналност и достоверност на приложените документи, справка за покриване критериите на биологическия факултет, ПУ- „Паисий Хилендарски“, автобиография европейски формат, списък на научните публикации по темата на дисертацията, списък на участията в научни форуми,копия на публикациите по темата на дисертационния труд, автореферат, дисертационен труд.

Ивица Димов е придобил степен бакалавър (2011-2015 година). със специалност медицинска химия в ПУ- П.Хилендарски. Степен магистър по биофармацевтична биохимия е получил след обучение в периода 2015-2016 година в ПУ- П.Хилендарски . От 2017 година до сега е работил по дисертационен проект за придобиване научната степен „доктор“ в Биологическия факултет, Катедрата по биохимия и микробиология. В автобиографичната справка е посочил отлично владение на компютърни умения и статистически програми, допълнително е обучен за работа с лабораторни животни.

Описание на дисертационния труд

Представеният труд е написан на 146 стр. Структурата му включва: Въведение – 1 стр.; Литературен обзор – 25 стр.; Цел и задачи- 1 стр.; Експериментална част с описание на

използваните методи – 25 стр.; Резултати и обсъждане- 64 стр.; Изводи – 1 стр.; приноси -1 стр. Литература – 217 източника.

Резултатите са онагледени с 20 таблици и 49 фигури. Представен е списък собствени научни публикации (4) и участия в международни (1) и национални научни форуми (2). От публикациите докторантът е първи автор на 3 от тях. Публикационната активност отговаря на изискванията на ПУ “Паисий Хилендарски“.

Обща преценка на актуалността на дисертационния труд

Дисертационния труд е озаглавен: ИЗСЛЕДВАНЕ СИНЕРГИСТИЧНИЯ ЕФЕКТ НА ПРЕБИОТИЧНИ ОЛИГОЗАХАРИДИ ВЪРХУ ЕНЗИМИ ОТ ВЪГЛЕХИДРАТНАТА ОБМЯНА И АНТИОКСИДАНТНАТА ЗАЩИТА НА ОРГАНИЗМА. За целта докторантът използва модел на симулиран стомашно-чревен тракт, в който са изкуствено създадени условия близки до тези в червата и стомаха, за да се изследва пребиотичния потенциал на олигозахариди и полизахариди в стомах, да се прецени степента на синбиотични ефекти на пребиотици и пробиотици в тънките черва, както в присъствие единствено на пробиотичен щам *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus L14.*, така и при използване на комбинация от бактериални щамове с пробиотична активност - *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus L14*, *Streptococcus thermophilus St81* и *Lactobacillus acidophilus A1*. Друго изследователско намерение е да се провери как използваните пребиотични олигозахариди влияят върху активността на ензими, отговорни за първоначалния хидролиз на въглехидрати *in vitro*. Използвана е също така моделна система от еритроцити на здрави индивиди за да се прецени синбиотичния ефект на пре- и пробиотици върху антиоксидантната активност на еритроцити при симулирано състояние на хипергликемия. Налагащо се становище в литературата е, че пре-, про-, и синбиотиците биха могли да се окажат полезни, но са необходими допълнителни изследвания, за да се изясни тяхното клинично значение в превенция и лечение на различни болести.

Има много доклади за полезните ефекти на пре- и пробиотиците върху човешкото здраве. Резултатите от клиничните проучвания потвърждават положителния ефект на пре- и пробиотици върху стомашно-чревни заболявания (напр., Синдром на раздразнените черва, стомашно-чревни нарушения, елиминиране на *Helicobacter*, възпалителни заболяване на червата, диария) и алергични заболявания (напр., атопичен дерматит). Много клинични изследвания са доказали ефективността на пребиотици и пробиотици за лечение на заболявания като затлъстяване, синдром на инсулинова резистентност, диабет тип 2, и чернодробни заболявания. Научни доклади също показват ползите от профилактична употреба на пробиотици в различни видове рак и странични ефекти, свързани с рак. Пребиотиците повишават достъпността на хемовото желязо, което ги свързва с възможни благоприятни ефекти в състояния на анемии.

Арена за упражняване на биологичните ефекти на пре- и пробиотиците са тънките черва, които са един мултифункционален орган, участващ в мрежа от взаимодействия с мозъка, единната система на имунитета, част от която самите те представят, черния дроб и инсулин-зависимите тъкани. Освен храносмилателни ензими, от червата се

секретират гастроинтестинални хормони, които могат да оказват въздействие върху апетита по оста черва-мозък и да профилактират състояния на инсулинова резистентност като контролират продукцията на инсулин от панкреаса и тъканната чувствителност на инсулиново въздействие. Пребиотиците могат да упражняват антилипидитични ефекти в адипоцитите и да подобряват инсулиновата резистентност чрез транспортера за глюкоза GLUT4, опосредствано от активиране на клетъчната сигнализация позависим от 5'-AMP-активирана протеин киназа път в мускулите и черния дроб. Червата са включени в ентерохепаталния кръговрат на жлъчни киселини и преработваните в тях пребиотици могат да упражняват контрол върху липидния обмен като регулатори на действието на липогенни чернодробни ензими чрез повишаване продукцията на късоверижни мастни киселини, такива като пропионат. Механизмът на действие на пропионата е модулиране на хистоновото ецетилиране, което води до повишаване достъпа на определени гени за транскрипционни фактори, контролиращи експресията на ензими от липогенезата.

Направеният преглед показва, че дисертационния труд е посветен на актуален проблем, свързан с оптимизиране възможностите за подобряване на човешкото здраве.

Експериментални модели

Създадени са симулационни модели, в опит да се възпроизведат събитията, протичащи в ГИТ (гастроинтестиналният тракт). Подобен модел, симулатор на човешката стомашно-чревна микробна екосистема, се състои от пет модула с контролирани рН и температура, които симулират стомаха, тънките черва, преден, среден и заден дял на дебело черво (*Marcel Roberfroid и съавт 2010*). В подобни проучвания с модели (рН или не-рН контролирани), различни субстрати се инкубират или с чиста култура от избрани бактерии, или с фекални шламове, анализирани впоследствие за микробен състав. Такова проучване върху пребиотичния потенциал на олигозахариди при рН-контролирани условия на ферментация с комбинация от *Bifidobacterium, Lactobacillus, and Bacteroides* е публикувано в статията на *Sabina Leanti La Rosa и съавт.(2019)*. В дисертационния труд е представена схема на подобен симулационен модел на стомах и черва, който обобщава изследователските намерения за проучване на пре-, пробиотични и симбиотични ефекти .

Втората моделна система симулира състояния на хипергликемия в еритроцити при здрави индивиди, в условията на която се изследват ензими от гликолизата и ензими с антиоксидантна активност. В този модел е проверена възможността на пребиотици и синбиотици за въздействие върху изследваните показатели. Подобен модел е използван от *Viskupicova и съавт. (2015)*. Използваната експерименталната постановка в дисертационния труд би дала информация за промени при първично натоваарване с глюкоза при здрави. В норма глюкозата се използва като енергиен субстрат за образуване на АТФ и за натрупване на НАДФ.Н в еритроцити .В еритроцитите на здравите, за разлика от диабет тип 2, няма промени поради оксидативен, нитрозативен и карбонилен стрес. За да бъде отнесен към диабет тип 2, в този модел е необходимо паралелно да изследва въздействие върху еритроцити от болни с диабет тип 2. В този

смисъл проучването с еритроцити при здрави в условия на хипергликемия е информативно в профилактичен аспект.

Към този модел имам някои забележки и препоръки:

1. За да се прецени пре- и симбиотичен антиоксидантен ефект в еритроцити е необходимо първо в избрания модел да се докаже, че това е необходимо като се обективизира наличие на окислителен стрес по показатели за съществуването му, напр. липидни прекиси по нивото на малондиалдехид. В възприетия в дисертационния труд модел отсъства показател за оценка на настъпващия окислителен стрес.

2. Определянето на глутатион редуктазата е подходящ, но не достатъчен показател за определяне капацитета на тиоловия антиоксидантен статус в еритроцита. В повечето изследвания едновременно се определя съдържанието на глутатион и активността на ензима глутатион пероксидаза. Ензимът глиоксалаза също е глутатион-зависим и е уместно да бъде определян при изследване системата на глутатиона.

3. При биохимични изследвания с еритроцити хематокритът е относителна величина. Най-прецизен метод за изолиране на еритроцитите е чрез тристъпално центрофугиране на хепаринизирана кръв при различни обороти за да се утаят при ниски обороти като най-тежки клетки еритроцитите, а след това при нарастващи обороти те да бъдат промити и освободени от други клетки.

4. Като препоръка при разширяване на бъдещи проучвания е добре да се преценява степента на хемолиза при нормо- и хипергликемия за да се прецени стабилизиращ еритроцитната мембрана ефект на пребиотиците.

Методи

Като пребиотици са използвани олигозахариди и полизахариди - Лактулоза; Галактоолигозахарид; Фрукто-олигозахарид; Инулин; β -глюкан; Полизахарид, изолиран от *Plantago major*; Пребиотик, съдържащ лактулоза и β -глюкан (Център по технологии на ПУ „Паисий Хилендарски“), а за изследване на техния пребиотичен потенциал бактериите - *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* L14, *Streptococcus thermophilus* St81 и *Lactobacillus acidophilus* A1, предоставени от колекцията на катедра „Биохимия и микробиология“ на Биологическия факултет, ПУ „Паисий Хилендарски“.

В дисертацията са използвани съвременни колориметрични и хроматографски методи, изпълнението на които е подробно описано в дисертацията. Използван е и метод за определяне на колонии, формиращи единици за милилитър. Някои от ензимните методи са изпълнени с готови китове. Използвани са също така съвременни методи за статистическа обработка на получените резултати.

Резултати и дискусия

Първа задача: Да се изследват структурните промени на пребиотични олигозахариди и полизахариди и техния пребиотичен потенциал в условия, симулиращи стомах в in

in vitro система на гастроинтестинален тракт – За да бъде класифицирана дадена хранителна съставка като пребиотик, е необходимо да изпълнява следните критерии: да бъде устойчива на стомашните киселини; да не се хидролизира от ензимите в ГИТ (гастро-интестиналният тракт); да не се абсорбира в горната част на ГИТ; да претърпява ферментация от чревната микробиота на дебелото черво; селективно да стимулира растежа и/или активността на чревните бактерии, потенциално свързани със здравето и благосъстоянието на гостоприемника (*Gibson & Roberfroid, 1995*). В контекста на тези изисквания прави впечатление, че е наблюдавана частична хидролиза в стомаха на някои от изследваните пребиотици: 1. увеличаване с 30% на количеството на галактозата след 2 h третиране в описаните условия за ГалОЗ; 2. частична хидролиза на използваният полизахарид, получен от листа на *Plantago major* до монозахариди - главно галактоза и олигозахарид; 3. частична хидролиза на молекулата на β -глюкана, чрез отцепване основно на терминалните глюкозни остатъци. 4. при киселото рН, каквото е в стомаха, от инулина се отделя фруктоза и тризахаридът кестоза, като техните нива се увеличават пропорционално спрямо продължителността на хидролитичния процес. Получените резултати са отклонение от критериите за устойчивост на пребиотици в стомаха. Въпреки че бактериалното натоварване в стомаха е ниско при здрави възрастни (приблизително 10^2 колония образувача единица (CFU) (на ml съдържание), между стените на стомаха се колонизират бактерии, сред които са и лактобацили и ентерококи. Това прави възможно *in vivo* да се случват събития, подобни на описаните в дисертацията и касаещи модела *in vitro*. Резултатите са обяснени с възможност настъпилите промени да не касаят основните характеристики на третираните пребиотици.

2. Втора задача - Да се изследва метаболизирането на модифицираните пребиотични олигозахариди и полизахариди и пребиотичния им потенциал, поставени в условия, симулиращи тънки черва в *in vitro* система на гастроинтестинален тракт в присъствие на пробиотичен щам *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus L14* - Динамиката на промените в тези експерименти е проследена в продължение на 4 часа като за ефекта на всеки пребиотик е преценена степента на клетъчен растеж, активност на бактериалните ензими и образувани метаболити. Резултатите показват, че всички изследвани пребиотици стимулират бактериалния растеж, но с различна динамика в продължение на 4 часовата инкубация. Различните пребиотици показват различна способност да стимулират ензимните бактериални активности: напр. лактулоза и ГалОЗ стимулират секрецията на α -глюкозидаза и β -галактозидаза от *Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus L14*, докато въпросните ензими не се секретират от този бактериален щам в присъствие на инулин. *Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus L14* проявява слаба инулиназна активност, която е интерпретирана като допълваща за доставка на енергиен субстрат след изчерпването на минималните налични количества от лесно усвоимите фруктоза и ФОЗ на 4-я час от инкубацията. Основните метаболити, образувани от секреторната активност на *Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus L14* са D- и L-лактат, ацетат и бутират, като количеството и динамиката на образуване във времето са специфични за всеки пребиотик. В дисертацията се коментира възможност за преминаване към смесен тип ферментация. Като възможно обяснение докторантът подкрепя предположението,

направено от друг автор, че става дума за промени в генната експресия на ензими от метаболитни пътища, което предстои да бъде изяснено. Изследването на комбинацията от 0.5% лактулоза и 0.5% β -глюкан върху метаболизма на пробиотичния щам L14 в условия, симулиращи тънки черва, показва синергични ефекти и постепенно увеличаване на бактериалния растеж до 4 час.

Получените резултати са интерпретирани като възможност на пребиотиците да доставят полезни метаболити и да поддържат съдържанието на полезни бактерии.

Трета задача: Да се изследва метаболизирането на модифицираните пребиотични олигозахариди и полизахариди и пребиотичният им потенциал, поставени в условия, симулиращи тънки черва в in vitro система на гастроинтестинален тракт в присъствие на комбинация от пробиотични млечнокисели бактерии. - За изпълнение на поставената задача е проучена динамиката на клетъчния растеж на щамове *Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus L14* и *St. thermophilus St81*, в присъствие на 1% ФОЗ и 1% ГалОЗ в условия, симулиращи тънките черва. Отбелязва се отчетливо нарастване на количеството живи бактерии с детектиран максимум на 12 h на инкубирането и последващо намаляване на техния брой. Най-съществено нарастване се отчита между 4 и 12 h, което вероятно се дължи на интензивно усвояване на нискомолекулните деривати на двата типа олигозахариди. Подобна динамика показват и секретираните ензими α -галактозидаза, β -галактозидаза, α -глюкозидаза, инулиназа. Данните за продуцираните органични киселини показват натрупване основно на L-лактат и ацетат, като максимумът на количеството им е отчетен на 12-тия час и остава непроменен до 20-тия час на процеса. Количеството на ацетата е пет пъти по-малко от това на лактата. В опитите да се постигнат оптимални резултати са изследвани три пробиотични щама в присъствие на три пребиотика – съотв. щамове *Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus L14*, *St. thermophilus St81* и *Lb. acidophilus A1* в присъствието на 0.5% ГалОЗ, 0.5% ФОЗ и 0.5% лактулоза, а също така е изпитан в присъствието на трите щама пребиотик в таблетна форма, създаден в колектив на Центъра по технологии на ПУ „Паисий Хилендарски“. При изследване на метаболитните процеси в присъствие на три пробиотични щама от три различни вида, се наблюдава значително увеличаване количеството на ацетата след 4-тия час на инкубиране, което е коментирано като възможност за стимулация на синтеза на бутират в *in vivo* условия в присъствие на останалите микроорганизми от микробиома на дебелото черво.

В дискусията на обобщения раздел получените резултати са сравнени с опита на други автори, а също така е отделено внимание на важното значение на получените метаболити при преработката на пребиотиците за здравето на червата, нормалното функциониране на други органи и системи в човешкия организъм

Четвърта задача: Да се изследва ефекта на пребиотични олигозахариди върху активността на ензими, отговорни за първоначалния хидролиз на въглехидрати in vitro. - В литературата е отбелязана положителна корелация на нивото на кръвната глюкоза и слюнчената амилаза при диабет тип 2, неконтролиран диабет тип 2 и диабет тип 1, което прави определянето на слюнчената амилаза перспективен неинвазивен диагностичен

подход. Установен е инхибиращ ефект на пребиотичните олигозахариди върху активността на ензима, като статистическа достоверност в сравнение с контролите е намерена в присъствие на олигозахаридите инулин 2% ($p=0.001$) и ФОЗ 1% ($p=0.001$) на десетата минута, което би могло да бъде предпоставка за потенциален хипогликемичен ефект на посочените олигозахариди. Като предполагаем механизъм на инхибиращият ефект е обсъждано понижението на рН от киселите продукти при разграждането на пребиотиците, които изваждат от оптималното рН ензима алфа-амилаза. Слюнчената амилаза доставя хранителни субстрати за патогенни бактерии в устната кухина и стратегиите за инхибирането ѝ от пребиотици биха били полезни в лечението на възникващи усложнения, настъпващи в случаи на отслабване на противобактериалната защита, както е при диабет.

Пета задача: Ефект на пребиотични олигозахариди върху ензими от въглехидратната обмяна и антиоксидантната защита при in vitro третиране еритроцити в условия на хипергликемия - Еритроцитът е уникална клетка. Еритроцитите притежават рецептор за инсулин, но глюкозата постъпва не с Glut4, а с Glut1. Събитието, свързано с инсулин-рецепторното сигнализиране в случая, е стимулация на Na⁺/H⁺ антипорта в еритроцитите по PI3K (фосфатидилинозитол-3-киназа)-зависим сигнален път (*Sauvage и съавт. 2000*), водещо до активиране на гликолизата (*Madshus, 1988*). По-голямата част от процесите в еритроцита ангажират еритроцитната мембрана, която е място на сложна сигнализация. Еритроцитните гликолитични ензими алдолаза, фосфофруктокиназа и глицералдехид-3-фосфат дехидрогеназа (GAPDH) са свързани в мембранни комплекси с band 3 на вътрешната повърхност на човешката еритроцитна мембрана, а пируват киназа (ФК) и лактат дехидрогеназа не са мембранно-свързани. Фосфорилирането на band 3 активира гликолитичните ензими (*Harrison и съавт. 1991*). Активността на гликолитичния ензимен комплекс се регулира от процеси на фосфорилиране с нерелепторните тирозин кинази Syk и Lyn и дефосфорилиране с протеин тирозин фосфатази PTP1B и SHPTP-2. При нормални условия съотношението РТК: РТР е изместено по посока на дефосфорилиране. Доказана е връзка между процесите на окисление и фосфорилиране в еритроцита: Фосфорилирането на band 3 води до дисоциация и активиране на гликолитичните ензими, които са свързани с него в комплекс. Този процес на фосфорилиране зависи от окислително-редукционните мембранни процеси (*Mallozzi и съавт. 2001*). Тиоловият статус на еритроцитите регулира фосфотирозиновото ниво на band 3 чрез процеси на окисление/редукция на свързаните с band 3 фосфотирозин фосфатази (*Zipser и съавт. 1997*).

Доказана е електроно-транспортна верига, с участието на GAPDH (глицералдехид-3ф-дехидрогеназа) и аскорбинова киселина, експортираща електрони извън еритроцита, която води до активиране на гликолизата при физиологични условия (*Orringer и Roer, 1979*). Също така е съобщено за транс-мембранна феррицианид оксидоредуктаза, която поддържа редуциран еритроцитния аскорбинат (*May и Qu, 1999*). При окислителен стрес и блокиране на тиолови групи в мембранните белтъци, Band 3 се превръща в променен антиген, разпознаван от моноцитите и фагоцитиран (*Verri и съпр. 1992*),

което нарушава функциите му като регулатор на анионния транспорт и гликолизата в еритроцита.

Еритроцитната мембрана е чувствителна към окислителен стрес и се стабилизира от АО (*Clemens u Waller, 1987*). Известно е, че при диабет има окислителни нарушения на еритроцитната мембрана, които се корегират с АО внос като благоприятният ефект касае подобрене на функционалната активност на еритроцитите. Обнадеждаващи резултати са получени с природни и синтетични антиоксиданти, но няма системен опит и окончателни резултати.

Резултатите в дисертационния труд показват, че използваните пребиотици повишават активностите на изследваните гликолитични ензими. Контролът върху гликолизата в еритроцита може да бъде упражнен на ниво мембранни комплекси чрез ковалентна модификация от Band 3 и от съотношението НАД⁺/НАД.Н. За да протича гликолизата трябва да бъде непрекъснато възстановявана окислената форма на никотинамидната редокс система. За еритроцита е доказано, че това може да стане със съдействието на електроно-транспортна система, изнасяща електроните, получени в глицералдеhid-3ф-дехидрогеназната реакция, спрегнато с работата на помпа изнасяща протони. Предстои в бъдещи проучвания да се установи включването на тези механизми пребиотиците могат да стимулират ензими от гликолизата. Друг механизъм на благоприятен ефект на пребиотиците е корекция на нежелани постранслационни промени в структурата на ензимите, настъпващи при оксидативен и карбонилнен стрес.

Получените резултати показват повишение в активността на глутатион редуктаза в условия на силна хипергликемия и третиране с олигозахариди, което е обяснено в дисертацията с вероятен корегиращ ефект първично върху гликолизата, което прави по-ефективен този енергоснабдяващ път и създава условия за пренасочване на субстрата глюкоза към ПФП с натрупване НАДФ.Н, субстрат на глутатион редуктазата. Тези резултати правят надеждно ползването на олигозахаридите лактулоза, инулин, ГалОЗ и ФОЗ при състояние на хипергликемия за поддържане на тиоловия антиоксидантен фонд.

Намерено е повишение в общата антиоксидантна активност, преценено с FRAP-метода, при използване на различни пребиотици. Пребиотиците имат максимален ефект при различна степен на натоварване с глюкоза. Установеният ефект е сумарен и може да касае корекция на едно или няколко звена от системата на антиоксидантна защита.

В условия на *нормогликемия* се предполага, че еритроцитите имат достатъчно енергодобив и при липса на окислителен стрес е трудно да се обясни повишаването във времето от 24 до 48 на активността на *каталазата*, освен това при нормално съдържание на глюкоза няма промени в активността на партниращия ензим супероксиддисмутаза. Също така е трудно да се интерпретират данните за повишена активност на каталазата при всички варианти на експеримента – в условия на хипергликемия и след добавяне на пребиотици. Тук като липсващо звено в приетия модел за антиоксидантна защита може да се посочи определянето на ензима глутатион

пероксидаза, работещ в същата посока. Отсъствието на статистическа обработка в този тип изследване също затруднява интерпретацията.

Супероксиддисмутазната активност намалява в условия на хипергликемия, което се обяснява с участието на съпровождащия окислителен и карбонилен стрес, водещи до деструктивни промени и понижаване във функционалната активност на белтъците при повишено гликиране. При *синбиотичното третиране с Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus L14 и St. thermophiles St81*, се запазва тенденцията за повишени стойности на каталазата и понижаване в активността на супероксиддисмутазата, но при хипергликемия, предизвикана от 50 mM глюкоза и присъствие на метаболити, получени от изследваните олигозахариди от двата пробиотични щама, се наблюдава увеличение на супероксид дисмутазната активност на 48 h спрямо 24 h. Тези повишени стойности в този пункт на експеримента показват пълна корекция и изравняване на стойностите на ензима със стойностите, намерени при нормогликемия. *Комбинация от повече пребиотици* - ФОЗ, лактулоза, полизахарид от живовлек и таблетирани пребиотици, метаболити и фрагменти, получени от ГалОЗ, в условия на *in vitro* хипергликемия, индуцирана от 50 mM глюкоза при продължителност на третиране 48 часа, също увеличава активността на супероксид дисмутазата в диапазон между 11-50% спрямо контролата. Би могло да се предположи, че при умерена хипергликемия подобно симбиотично въздействие може да подобри антиоксидантния статус на еритроцита. Подобен извод е направен и в дисертацията.

Прави впечатление, че при избраният вариант на общо представяне на резултатите и дискусията в дисертационния труд, не винаги вървят едновременно описанието на резултатите и коментарът върху тях. Също така фрагменти от дискусията биха могли да бъдат отнесени към литературния обзор.

В резултат на направеното проучване са изведени 9 извода и 3 приноси, с които съм съгласна. Изследователските намерения са изпълнени в многопластов проект, който очертава перспектива за пренасяне натрупания опит в експерименти *in vivo* с експериментални животни или в клинични изследвания.

Заключение: Направените забележки и препоръки не намаляват основанието ми да дам положителна оценка на дисертационния труд. Оценката ми за дисертационния труд, автореферата, научните публикации и научните приноси на докторанта Ивица Димов е напълно положителна. Представената дисертация напълно отговаря на изискванията на ЗРАСРБ и Правилника за неговото прилагане. Постигнатите резултати ми дават основание да предложа да бъде присъдена образователна и научна степен „доктор” на Ивица Димов по професионално направление по област на висше образование 4. Природни науки, математика и информатика; професионално направление 4.3 Биологически науки; научна специалност по Биохимия

Рецензент:

Проф Ана Манева, дбн