

## РЕЦЕНЗИЯ

от проф. д-р Илия Николов Илиев,

катедра „Биохимия и микробиология” при ПУ „Паисий Хилендарски” – Пловдив

Относно: дисертационен труд на тема **„ИЗУЧАВАНЕ НА СТРУКТУРАТА И ИМУНОМОДУЛИРАЦИЯ ПОТЕНЦИАЛ НА КИСЕЛИТЕ ХЕТЕРОПОЛИЗАХАРИДИ ОТ ПЕКТИНОВ ТИП В БЪЛГАРСКИ ЛЕЧЕБНИ РАСТЕНИЯ”** представен от докторант ас. инж.-техн. **ЙОРДАН НИКОЛАЕВ ГЕОРГИЕВ** от ЛАБОРАТОРИЯ „БИОЛОГИЧНО АКТИВНИ ВЕЩЕСТВА - ПЛОВДИВ“ към ИНСТИТУТ ПО ОРГАНИЧНА ХИМИЯ С ЦЕНТЪР ПО ФИТОХИМИЯ на БАН за придобиване на образователна и научна степен „ДОКТОР” по професионално направление 4. Природни науки, математика и информатика, 4.2. Химически науки, Научна специалност: 01.05.10 „Биоорганична химия, химия на природните и физиологично активни вещества“

**Получени материали:** Дисертация, автореферат, списък с публикации по дисертацията, папка с материали по дисертацията.

Със заповед № НО-05-05/13.12.2017г. на директора на Института по органична химия с център по фитохимия на БАН съм определен за член на научно жури за защита на дисертационен труд за придобиване на образователна и научна степен „Доктор” от докторант ас. инж.-техн. **ЙОРДАН НИКОЛАЕВ ГЕОРГИЕВ** на тема **„ИЗУЧАВАНЕ НА СТРУКТУРАТА И ИМУНОМОДУЛИРАЦИЯ ПОТЕНЦИАЛ НА КИСЕЛИТЕ ХЕТЕРОПОЛИЗАХАРИДИ ОТ ПЕКТИНОВ ТИП В БЪЛГАРСКИ ЛЕЧЕБНИ РАСТЕНИЯ”**. Дисертационният труд е разработен в ЛБАВ-Пловдив при ИОХЦФ-БАН, в Лабораторията по експериментална хроматография и масспектрометрия при ИОХЦФ-БАН. Част от изследванията са направени в други научни организации по време на специализация на докторанта и в сътрудничество с колеги - Университета на Осло (Кралство Норвегия), Института по микробиология „Стефан Ангелов“ при БАН, Пловдивския университет „Паисий Хилендарски“, Университета „Китасато“ в гр. Токио (Япония) и Института по биофизика към Чешката академия на науките в гр. Бърно.

Йордан Георгиев е завършил УХТ-Пловдив през 2011г. специалност „Биотехнологии“. В периода 2011 – 2013 завършва с отличен успех магистратура „Биофармацевтична биохимия“ в ПУ „Паисий Хилендарски“. В периода 2013-2016г. е редовен докторант в ЛАБОРАТОРИЯ „БИОЛОГИЧНО АКТИВНИ ВЕЩЕСТВА - ПЛОВДИВ“ към ИНСТИТУТ ПО ОРГАНИЧНА ХИМИЯ С ЦЕНТЪР ПО ФИТОХИМИЯ на БАН, а от 2016г. е назначен за асистент към същата лаборатория. По време на обучението си успешно е изкарал курсове на обучение по „Масспектрометрия и протеомика – методи и приложение“ в ИОХЦФ-БАН ; по ЯМР спектроскопия в ИОХЦФ-БАН; по компютърна програма MATLAB в Центъра за обучение при БАН. Докторант Георгиев е специализирал в три чуждестранни лаборатории - катедра Експериментална биология, Факултет по природни науки, Масариков университет, гр. Бърно, Чешка република., катедра „Патофизиология на свободните радикали“, Институт по биофизика към Чешката академия на науките, гр. Бърно, Чешка република, катедра „Фармацевтична химия“, Институт по фармация, Университета на Осло, гр. Осло, Кралство Норвегия, при проф. Naoki Yamada и проф. Hiroaki Kiyohara в лаборатория „Биофармакология на фитотерапевтиците“, Институт по природни науки „Китасато“ към Университета „Китасато“, гр. Токио, Япония, където е провел част от своите експерименти по дисертацията.

Дисертационния труд е обсъден и одобрен за разкриване на процедура за защита пред научно жури на 07.12.2017г. с протокол № 20/07.12.2017г. Дисертацията е оформена по приет за България модел и е написана на 270 стандартни машинописни страници и съдържа следните основни глави: Съдържание – 4 стр., Съкращения – 1 стр., Литературен обзор – 49 стр., Цел и задачи – 2 стр., Материали и методи – 18 стр., Резултати и обсъждане – 182 стр., Обобщение – 10 стр., Изводи и заключение – 3 стр., Приноси – 2 стр., Литература – 32 стр., Обучение и представяне на дисертацията – 7 стр. В литературния обзор има 2 таблици, 1 схема и 7 фигури, а експерименталната част е онагледена с 18 таблици, 4 схеми, 58 фигури и 7 снимки. Библиографската справка обхваща 404 литературни източника, от които 225 са публикувани в периода 2010-2017 г. При оформянето на дисертационния труд авторът подхожда новаторски, като при всеки основен раздел включва резюме и въведение, което считам че по-скоро затруднява и обърква ползвателя на материала отколкото да го ориентира в материята. Номерирането на таблиците и фигурите в дисертацията е отделно за всеки раздел, което по принцип е неправилно, но и в случая затруднява цитирането на

резултатите. Липсва увод или въведение на дисертацията, което по принцип се използва за да предизвика интерес у четящия съответния научен труд.

### **1. Актуалност на разработвания в дисертацията проблем в научно и научно-приложно отношение**

Темата за природните полизахариди е вълнувала, вълнува в момента и ще вълнува и занапред научната общност, защото тя предполага търсене на отговор както на строго фундаментални научни въпроси за генезиса на полизахаридите в клетките, така и за техните структурно-функционални зависимости с потенциал за приложение в медицината и индустрията. Растителните полизахариди отдавна са предмет на научни изследвания, но интересът към тях днес нараства поради разкриване на възможност за получаване на нови модификации със свойства, които им осигуряват нарастване на сферите на приложение. Особено място в научната проблематика заемат полизахаридите на медицинските растения. При проследяване на научните публикации по темата полизахариди в медицински растения през последните три години може да се види интензитетът на публикуване, който обхваща изследвания върху имуностимулиращото им действие, регенериращо действие на епитела, протективно действие на стомашно-чревния тракт, протективно действие върху оксидативния стрес, чернодробни и сърдечно-съдови проблеми, диабет, хиперлипидемия и др. Всичко това подкрепя тезата на докторанта за актуалността на тематиката и необходимостта от допълнителни изследвания. Авторът е изчислил, че делът на изследванията върху биологичната активност на полизахариди от билки обхваща 24.5% от всички проучвания и обосновава, че изучаването на биологичноактивни полизахариди е важен и актуален научен проблем. Докторантът е избрал да се занимава с изучаване на структурата на полизахариди от различни билки и техните имуностимулиращи и имуномодулиращи свойства.

### **2. Степен на познаване на състоянието на проблема и на литературата**

Актуалността на темата е осъзната от докторанта, което личи както от добре структурирания обзор, така и от акцентите на проведената от него експериментална работа. Литературния обзор е тематичен по проблемите на дисертацията, обхваща информация относно значението на биологично активни растителни кисели хетерополизахариди, разнообразието на химичните структури на полизахаридите от медицински растения и техните имуномодулиращи свойства, механизмите на имуномодулиращото действие на пектиновите полизахариди и комбинирания ефекти при имуномодулация на полизахариди от медицински растения. Докторантът е

отделил достатъчно внимание и върху информацията в литературата за специфичното приложение на биоактивните полизахариди във фармацевтични пропарати - прицелно-специфични лекарствени форми, както пребиотици и полизахаридни конюгати. Литературният обзор завършва със заключение, което обобщава перспективите на едно бъдещо изследване на биоактивните полизахариди от различни медицински растения.

Целта на дисертацията е дефинирана в две направления - да се изучат киселите хетерополизахариди от пектинов тип в традиционни и перспективни за България лечебни растения, и да се определи техният имуномодулиращ потенциал. Би могло да се направи още по-точно формулиране на целта, като се изведе на преден план корелацията между имуностимулиращия потенциал на полизахаридите от лечебни растения и тяхната структура, което е същността на работата. Формулирани са общо девет задачи, част които считам за несъстоятелни – задача 9, а други (задачи 6 и 7) се нуждаят от стилова редакция. Например какво означава „задълбочено изучаване“, „комбинаторно влияние“. Освен това не приемам ползването на съкращения именно при формулирането на целта и задачите в дисертационния труд. Авторът дублира представените цел и задачи със схема на идеята за дисертация, което считам за уместно да се представи в раздела „Резултати и дискусия“.

### **3. Съответствие на избраната методика на изследване с поставената цел и задачи на дисертационния труд**

В раздел „Материали и методи“ са описани прецизно основните методи, които са прилагани при изпълнението на поставените задачи в дисертацията. По време на разработването на дисертационния труд инж. Георгиев е усвоил широка гама биохимични, химични; хроматографски и имунологични методи, което е основание да се счита че е придобил необходимия методичен опит при извеждане на научен експеримент.

Цялата изследователска програма в дисертацията е построена на базата на предварително селектирани лечебни растения и плодове, от които се изолират полизахаридни фракции. По своята същност методичната работа по дисертацията следва едно стандартно изследване на структурата на полизахариди, след тяхното изолиране и хроматографско пречистване и провеждане на имунологични изследвания за доказване на имуностимулиращия и имуномодулиращия им ефект. Методологията на изследването логично завършва с предложение за схема за получаване на биоактивни полизахаридни препарати с имуномодулиращо действие.

Към този раздел имам следните забележки: описанието на пробите от билки би могло да се даде по-ясно в таблица и без излишни подробности, в т.2.1. са изброени основните аналитични методи без да се описват и да се цитират надлежно авторите на методите, при описание на хроматографските методи излишно се представят хроматограми, при описание на антиоксидантните методи заглавието е на английски език, което е недопустимо при публикуване на дисертацията на български език. Възможно е да се добави английската терминология в скоби.

#### **4. Характеристика на естеството и оценка на достоверността на материала**

Своята изследователска работа докторантът стартира с подбор на имунологично-активни полизахаридни комплекси от български лечебни растения. Схемата на изследването включва последователно изолиране и пречистване на пектинови фракции от полизахариди. Посредством двукратна екстракция с кипяща вода и утаяване с етанол са получени 42 полизахаридни фракции от различни части на растението (надземни части, цветове, плодове, листа, корени) на 34 лечебни растения. Определя *in vitro* комплемент-фиксиращата активност по класическия път и алтернативния път, и *ex vivo* интестиналната имуномодулираща активност на полизахаридните комплекси и детектира 20 активни проби. Допълнително определя и *in vitro* антиоксидантната активност на комплексите по ORAC и HORAC методите. Доказва, че ПЗ от коприва (корен) е с най-висока *in vitro* комплемент-фиксираща активност по алтернативния път с  $IC_{50} = 21.1 \mu\text{g/mL}$  и най-високата *ex vivo* интестинална имуномодулираща активност при  $100 \mu\text{g/mL}$ , изразена като стимулиране пролиферацията на костно-мозъчни клетки и продукцията на IL-6 от клетки на чревните пайерови плаки.

В следващата глава от дисертацията инж. Георгиев описва резултатите от експериментите по оценка на комплемент-фиксиращата активност на полизахаридни фракции от липа, лавандула и тученица, получени чрез водна и етанолна екстракция. В резултат на експеримента авторът е определил съпътстващите в полизахаридите вещества полифеноли, фитостероли, мастни киселини и захари. На базата на фитохимичните анализи и комбинирания ефект от смесването на изходните ПЗСК-и и отделните екстракти докторантът изказва предложението, че полифенолите допринасят положително, а мастните киселини отрицателно за проявлението на комплемент-фиксираща активност от ПЗСК-и по консервативния път. Високата активност на ПЗСК-и по алтернативния път докторантът отдава на полизахаридите.

В четвъртата глава от своето изследване докторантът изследва модулирането на активността на фагоцитарните левкоцити и клетките на чревните Пайерови плаки от страна на полизахаридите от цветовете на лавандула. Получени са две пектинови (chPS-L1, chPS-L2) и една полифенолна (chPP-L) фракции, посредством екстракция с кипяща вода, продължително третиране с етанол за отстраняване на нискомолекулни съединения и гел-хроматография. Докторантът показва, че лавандуловите продукти, богати на пектинови полизахариди, притежават реален имуномодулиращ потенциал за подпомагане на нормалното функциониране на имунната система. Поради своята антиоксидантна и комплемент-фиксираща активност фракцията chPP-L може да бъде ефективна срещу активиране на неутрофилите при възпалителни процеси.

В пета глава инж. Георгиев доказва, че цветовете на сребролистната липа съдържат различни пектини (PSI-PSIII) с имуномодулиращи свойства. PSI е ниско-естерифициран пектинов ПЗ с преимуществен хомогалактуронов регион, последван от рамногалактан-I със странични вериги от арабиногалактан-II и следи от рамногалактан-II областта. Според резултатите липовите пектини предизвикват продукцията на реактивни форми на кислорода и азотен окис в нестимулирана кръв и макрофаги, съответно. В същото време те потискат опсонизираните зимосанови частици активирания продукция на РФК и индуцираните от ЛПЗ-те iNOS експресия, и продукцията на NO. Този двойствен начин на действие предполага тяхната потенциална противовъзпалителна активност.

В последната глава докторантът сравнява структурата и имуномодулиращата активност на хроматографски пречистени, водно-екстрахируеми ПЗ от листата (NL-PSI) и корените (NR-PSI-IV) на коприва *Urtica dioica* L. Получените резултати показваха, че не само  $\alpha$ -глюканите, но и пектините в корените, както и неизследваните пектини в листата допринасят за противовъзпалителната активност на копривата.

Всички резултати са представени и дискутирани в отделни глави от раздела „Резултати и обсъждане“, които логично следват хода на решаването на поставените задачи. Докторантът е обобщил своите резултати и коментари в специална глава „Обобщение“, където в първата част е акцентувал върху получените от него резултати за имунологичните свойства на изследваните полизахариди, представил е предполагаеми схеми на структурите на изследваните от него полизахаридни фрагменти и е представил предполагаема схема на механизма на действие на полизахаридите върху имуномодулирането на различни човешки клетки.

В резултат на проведеното изследване докторант Георгиев е формулирал 6 извода, които приемам по принцип. Според мен изводите са много описателни и повтарят части от изложението в дисертацията. Те биха могли да се редактират както по съдържание така и по стил за да отразят още по-добре постигнатите съществени резултати от докторанта. След представянето на изводите те излишно се тълкуват, което по принцип повтаря написаното в обобщението.

### **5. Приноси на дисертационния труд**

Приемам така формулираните научни и научно-приложни приноси на дисертацията. В стилистично отношение те също се нуждаят от редакция, като например по-подходящо е да се напише че е установен даден факт, отколкото „открито е...“

Фундаменталният за мен принос на дисертацията е описанието на полизахаридите на 34 лечебни растения и е изследван техния имуностимулиращ ефект.

Вторият по значение принос е описанието на структурата на някои от изследваните полизахаридни фрагменти.

Третият принос е доказването на имуностимулиращия ефект на някои от изследваните полизахаридни фракции върху различни човешки клетки.

### **6. Преценка на публикациите по дисертационния труд**

Резултатите от дисертацията са публикувани в четири научни публикации, и една глава от книга. Впечатляващ е успехът на докторанта да публикува резултатите в три статии, отпечатани в много престижни научни списания (Carbohydrate Polymers и International Journal of Biological Macromolecules). Общият импакт фактор на тези три статии е 13,2, което е много сериозно постижение за Йордан Георгиев и недвусмислено показва нивото на проведените изследвания. Във всички статии докторантът е на първо място, което още веднъж потвърждава неговото водещо участие в изработването на експерименталната работа и обработването на резултатите по дисертацията.

Авторефератът отговаря на целите, задачите и постигнатите резултати в дисертационния труд.

Инж. Георгиев докладва резултатите от дисертацията на 13 научни форума, като на 9 от тях изнася доклади.

## 7. Мнения, препоръки и бележки

Към докторантът имам следните въпроси:

1. Възможно ли е да се декларира антиоксидантна активност на растителни полизахариди тъй като от методична гледна точка винаги ще има известно остатъчно количество на полифеноли, фенолни киселини и други вещества с ниска молекулна маса и с доказани антиоксидантни свойства?
2. Получените от вас данни от различните анализи на структурата на полизахаридите дали са достатъчни за да се предположи по-цялостен модел на структурата на полизахаридите от различните растения, а не само за изследвания фрагмент?
3. На стр. 191 коментирате, че полизахаридът ПЗК от липа проявява неспецифична ин витро подтискаща активност върху различни ракови клетъчни линии и върху нормални амниотични клетки и фибробласти. Каква е вашата работна хипотеза при провеждането на този експеримент?
4. На стр. 190 в какъв смисъл сте употребили думата експресия в израза „Този резултат беше в съответствие с индуцируема азотен оксид синтаза експресията след 48 час на култивирането“?

Към докторантът имам следните препоръки:

1. В раздела „Резултати и дискусия“ всички глави са оформени по схемата : резюме, въведение, резултати, дискусия, заключение. Считам за ненужно отново да се повтаря материал, който вече е изложен в литературния обзор, а резюмето не е нужно поради дублиране със заключението. Същността на този раздел е да покажете своите резултати и съпоставката с получените от други автори, както и каква част от хипотезата ви те доказват.
2. На много места в дисертацията употребявате неточни изрази, а текстът се нуждае от стилистична редакция. Например: на стр. 150 има изречение, което започва с „Както се очакваше...“; на стр. 151 изречението започва с малка буква на съкращение; на стр. 151 изречение започва с „Интересно...“ ; на стр 152 т.3.1.2. е неправилно озаглавена и има неточен израз „Преимуществото на 3,6-свързаната галактоза в страничните вериги е в добро съответствие с резултатте от теста на Ярив“; Глава 5 описанието не е заглавие; неточно

формулиране на заглавията на т. 3.1.2. и 3.1.4, а т. 3.1.3. липсва; неточни изрази на стр 184 „чиста д. Вода“, „мишите ПП“, на стр 189 „Стимулиращата активност на PSII изглеждаше по-слаба от тази на PSI и PSIII“ „комбинаторния ефект“.

3. Какъв точно смисъл влагате в употребата на много места в дисертацията на термина „определяне състава на гликозидните връзки“?

#### 8. Заключение:

Оценката ми за дисертационния труд, автореферата, научните публикации и научните приноси на ас. инж.-техн. **ЙОРДАН НИКОЛАЕВ ГЕОРГИЕВ** е напълно положителна. Въпреки направените препоръки, бих искал да отбележа още веднаж достойнствата – на първо място една научно обоснована и прецизно изпълнена научна разработка, с оригинални изследователски подходи, съдържаща правилно интерпретирани и обобщени резултати. Експерименталната работа надхвърля многократно изискуемия стандарт за този тип дисертации. Дисертационния труд има подчертани научни и научно-приложни приноси, които биха могли да намерят приложение при производството на имуностимулиращи препарати.

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 ас. инж.-техн. **ЙОРДАН НИКОЛАЕВ ГЕОРГИЕВ** по професионално направление 4. Природни науки, математика и информатика, 4.2. Химически науки, Научна специалност: 01.05.10 „Биоорганична химия, химия на природните и физиологично активни вещества“.

14.02.2018г.

Изготвил:

Пловдив

(проф. д-р Илия Илиев)