

<b>ТРАКИЙСКИ УНИВЕРСИТЕТ</b>	
Стара Загора	
Ветеринарно медицински	
факултет	
Вх. №	563
Дата:	27.11.2017

## РЕЦЕНЗИЯ

на дисертационен труд за придобиване на научната степен „Доктор на науките“ в област на висше образование 6. „Аграрни науки и ветеринарна медицина“, професионално направление 6.4. „Ветеринарна медицина“, научна специалност „Патология на животните“

**Автор на дисертационния труд:** Доц. Мария Йорданова Андонова, дб.

**Тема на дисертационния труд:** „Възможности за коригиране на нарушенията в естествените защитни механизми при животни с различна чувствителност към антигени на Грам-негативни бактерии.“

**Рецензент:** Доц. Андон Атанасов Филчев, дб., член на Научно жури (протокол № 17/25.09.2017 г. на ФС на ВМФ и заповед № 2189/27.09.2017 г. на Ректора на Тракийския университет, гр. Стара Загора), избран за рецензент на заседание на журито на 20.10.2017 г.

**1. Оценка на представените по процедурата материали:** Материалите за допускане до публична защита на дисертационния труд на доц. Мария Андонова са комплектовани съгласно изискванията на ПРАСРБ и Правилника за развитие на академичния състав в Тракийския университет (чл.58, ал.2) и съдържат всички документи, описани в заявлението до Декана на ВМФ, представени в отделна папка.

**2. Кратко представяне на кандидата:** Доц. Мария Андонова е родена 1958 г. в гр. Стара Загора. Средно образование е завършила в гимназия „Иван Вазов“ в родния град със златен медал, а висше във ВИЗВМ, гр. Стара Загора, специалност Ветеринарна медицина с отличен успех от семестриалните и много добър от държавните изпити. След година и половина стаж като ветеринарен лекар в Обединено предприятие за хибридни свине, гр. Стара Загора на 16.02.1983 г. постъпва в катедра „Патологична физиология на животните“ при ВМФ като редовен аспирант. През 1987 г. след успешно защитена дисертация и е присъдена образователната и научна степен „Кандидат на биологическите науки“ (доктор). Преминала е през всички степени на академичното израстване – научен сътрудник, асистент, старши асистент, главен асистент, а от 2002 г. е доцент по шифър „Патология на животните“. Изнася лекции и провежда практически занятия по задължителните за специалността ветеринарна медицина дисциплини – „Имунология“ и „Функционална патология“.

**3. Актуалност на проблема:** В организма на животните и човека обитават огромно количество бактерии, много от които са безвредни или дори полезни. Същевременно в организма присъстват и патогенни бактерии, които в зависимост от това колко са адекватни защитните механизми може да се развие или да не се прояви инфекция.

Откриването на антибиотиците бе първата надежда, че ще бъде решен проблемът с бактериалните инфекции както при хората, така и при животните. Оказа се обаче, че прекомерната употреба на антибиотиците, навинаги с известен ефект, доведе до появата на нови щамове бактерии, резистентни не само към вече използвани антибиотици, но и към такива от нови поколения. От друга страна, появиха се и множеството странични действия на антибиотиците, важно място между които заема имуносупресивния ефект, който нарушавайки защитните механизми на организма, може да отвори врати за развитие на опортюнистични инфекции. Това определя необходимостта от търсене на нови подходи в терапията с бактериалните инфекции, като наред с конвенционалната терапия се подпомагат и стимулират и естествените защитни механизми. През последните десетилетия бяха изолирани редица натурални продукти от различен произход с имуномодулиращо действие. Много от тях са с добро стимулиращо действие върху имунната система и намират приложение при лечение на различни заболявания.

Научният подход при изясняване особеностите на инфекциозния процес, както и разработването на съвременни схеми за лечение, изискава подходящи експериментални модели с различна чувствителност към определени микроорганизми и техните продукти. В тази връзка актуалността на проблема е добре очертана и обоснована както в увода, така и в литературния преглед на дисертационния труд.

**4. Литературна осведоменост:** Понастоящем в резултат на многобройни и разнообразни по характер изследвания е натрупана огромна информация за патогенното действие на микроорганизмите и техните продукти и механизмите на защита срещу тях. Цялото това море от информация предоставя различни възможности за нейното изложение, анализиране и описание. В това отношение дисертантът успешно се е справил с това предизвикателство като творчески е осмислил и интерпретирал съществуващите научни данни, които е представил в пет глави. Прави впечатление големият списък на цитираните източници, но той е в отговор на обема и експерименталните модели, обект на изследване. Базира се на 925 източници, от които 20 на кирилица, 876 на латиница и 29 [http](#) страници. Авторите са подредени по азбучен ред с пълна библиографска справка на статиите. Заслужава да отбележим, че над 77 % от цитираните заглавия са след 2000-та година, а над 30 % от тях от последните 5-6 години. Това показва, че дисертантът има богата информация по проблема, включително и с най-новите достъпни данни, защото само от последните две години са цитирани над 25 заглавия.

В литературния преглед са отразени основните характеристики на *E. coli* и *P. aeruginosa* и отделяните от тях патогенни фактори. Отделено е достатъчно внимание и на чувствителността на използваните в опитите видове животни към антигените на Грам-негативните бактерии, както и на нарушенията на естествените защитни

механизми под действието на тези антигени. Коментирани са и съвременните подходи и средства за лечение и контрол на тези опортунистични инфекции.

**5. Структура на дисертационния труд:** Структурата на дисертационния труд е съобразена с общоприетите правила и обхваща в логическа и смислова цялост научно-изследователската дейност на дисертанта. Отпечатан е на 303 сандартни машинописни страници и съдържа следните раздели: увод – 2 стр., литературен преглед – 72 стр., цел, изследователска хипотеза и задачи – 4 стр., материал и методи – 31 стр., резултати – 84 стр., обсъждане – 43 стр., изводи – 4 стр., приноси – 3 стр., препоръки за практиката – 1 стр., литература – 51 стр., списък на научните публикации във връзка с дисертацията – 2 стр., списък на участия в научни форуми във връзка с дисертацията – 2 стр., списък на цитирания на публикации във връзка с дисертацията – 4 стр.. От съотношението между отделните раздели е видно, че като цяло те са балансираны с акцент върху резултатите и тяхното обсъждане.

**6. Цел и задачи:** На базата на изчерпателния литературен преглед и добре формулираната изследователска хипотеза дисертантът мотивирано определя целта на изследването, а именно: „Чрез използване на животни с различна чувствителност към антигените на Грам-негативните бактерии *E. coli* и *P. aeruginosa* да се отдиференцират настъпилите нарушения в защитния им потенциал, свързан с барьерни системи и неспецифични защитни реакции /възпаление, острофазов отговор и фагоцитоза/ и на тази база да разработи нови схеми за коригиране на настъпилите нарушения в защитните механизми, което да съдейства за повишаване ефективността на антибактериалната терапия“.

Параметрите на изследването са очертани коректно в поставените към целта четири основни задачи съобразно експерименталните модели. За изпълнението им към всяка от тях са планирани по няколко подзадачи – общо 13, с които е детайлизиран плана на изследванията.

**7. Материал и методи:** В изследването са използвани достатъчен брой животни от отделните видове, което е база за статистическа обработка на получените резултати и извеждане на съответни изводи. Експерименталните постановки при отделните модели са илюстрирани на 4 фигури, които нагледно демонстрират схемите на опитите. Методите, подбрани за изпълнението на поставените цел и задачи са научно обосновани и без съмнение позволяват получаването на коректни резултати. Нещо повече, за по-детайлно изпълнение на задачите и получаване на убедителни резултати са апробирани и въведени и 10 нови за секцията методи.

**8. Оценка и анализ на резултатите:** Съобразно експерименталните модели резултатите от изследването са представени в четири раздела. В такъв порядък ще направя и оценката на резултатите.

В първия раздел на 25 страници са отразени резултатите от експерименталния модел на мишки (резистентни на LPS- въздействие), третирани интраперитонеално с LPS и ефектите на нестереоидния противовъзпалителен препарат нимезулид. Промените в изследваните показатели са илюстрирани на 7 фигури, а хистологичните изменения в различните органи са отразени на 27 микроснимки. Тук не е възможно да правя оценка на всеки изследван показател, но графичното представяне ясно показва стойностните им изражения, а статистическата обработка илюстрира достоверността на получените данни. Все пак, макар и обобщено, ще отбележа някои от най-съществените приноси от извършеното изследване с този експериментален модел.

**1.** Установено е, че LPS понижава активността на интрацелуларната антиоксидантна система в лицето на каталазата и редуцира концентрацията на неензимния вътреклетъчен антиоксидант глутатиона. В същото време стойностите на малондиалдехида и на индекса на оксидативния стрес в началото са повишени, но в следващите етапи са понижават. **2.** При запазен антиоксидантен капацитет на плазмата и албумина, трайно е нарушена глюкозната хомеостаза. **3.** Доказано е, че нестереоидният противовъзпалителен препарат нимезулид притежава антиоксидантни свойства като нормализира концентрацията на редуцирания глутатион и регулира индуцираната хипогликемия. **4.** Хистологичните изследвания на различните органи показват, че нимезулида проявява и токсични ефекти, поради което се прави препоръка при използването му да се оценява съотношението полза/вреда.

**Резултатите от втория експериментален модел – плъхове**, също резистентни към LPS, са отразени на 17 страници. Онагледени са с 9 фигури и 3 таблици. И тук графичното и табличното представяне на данните илюстрира тяхната достоверност. Доказано е, че приложеният интраперитонеално липополизахарид индуцира силен възпалителен отговор, проявяващ се с:

**1.** Рязко увеличени концентрации на PGE2 и IL-1, активиране на лизозима, разнопосочни ефекти върху клетъчните елементи на естествената резистентност;

**2.** Метаболитни нарушения, изразени с хипогликемия, понижени общ белък, албумин, алфа2 и гама глобулини и промени в киселинно-алкалното състояние;

**3.** Хематологични промени, свързани с трайно понижени стойности на хемоглобина, на хематокрита и на еритроцитните индекси;

**4.** Приложеният нестериоиден противовъзпалителен препарат индометацин проявява лечебен ефект като нормализира телесната температура, коригира концентрациите на PGE2 и IL-1, действа позитивно върху глюкозната хомеостаза, но не повлиява промените в червената и бялата кръвна картина, нарушенията в общия белък, белъчните фракции и киселинно-алкалното състояние.

При третият експериментален модел – прасета, чувствителен вид към липополизахаридно въздействие, са приложени два начина на въвеждане на антигена – интравенозно и интраперитонеално. Резултатите от венозното аплициране на LPS са илюстриране на 5 фигури и 3 таблици. Установено е, че при този начин на прилагане на антигена липсва локална реакция. Развива се обаче системен възпалителен отговор,

протичащ с: 1. Покачване на телесната температура, адинация и повръщане; 2. Промени в количеството на левкоцитите, изразяващи се в бързо преходна левкопения, последвана от левкицитоза с ядрено изместване наляво в левкограмата; 3. Потисната фагоцитна активност на неутрофилите.

По отношение на хуморалните фактори на естествения имунитет е наблюдавано: 1. Покачване концентрацията на лизозима в началния етап на LPS действие; 2. Липса на отклонения в хемолитичната активност на комплемента, но настъпват промени в серумните протеини, индикатори на задействания от антигена острофозов отговор; 3. Метаболитни нарушения, изразени с бързо преходна хипергликемия, последвана от хипогликемия, промени в чернодробните трансаминази и в есенциалните олигоелементи цинк и желязо.

Ефектите от **интраперитонеалното приложение** на LPS и терапевтичните действия на индометацина и циметидина са отразени на 8 страници и са илюстрирани с една фигура и две таблици. Установено е, че промените в клиничното състояние на животните настъпват по-късно в сравнение с венозното приложение на липополизахарида и продължават по-дълго. Доказано е, че приложението по този начин LPS индуцира системен възпалителен отговор, който протича с: 1. Промени в общото състояние и повишена ректална температура през целия период на изследването; 2. Промени в клетъчните елементи на естествения имунитет, изразяващи се в намаление броя на левкоцитите само в първия ден на изследването, а в левкограмата се наблюдава ядрено изместване наляво; 3. От хуморалните фактори на естествения имунитет е засегнат само комплемента, хемолитичната активност на който е понижена; 4. Характерни са промените в киселино-алкалното състояние и кръвно-газовия статус, изразяващи се с понижение стойностите на pH и намаление парциалното налягане на кислорода и кислородното насищане.

Ефектите на индометацина по отношение на индуцираните от LPS промени в клиничното състояние и хематологичните отклонения показват, че той действа положително като премахва анорексията и адинацията, нормализира телесната температура и коригира левкоцитните отклонения, но не повлиява нарушенията в КАС.

H<sub>2</sub> рецепторния антагонист - циметидина също проявява леачебни свойства като нормализира телесната температура, но за разлика от индометацина, той коригира и нарушенията в КАС.

Заслужава да се отбележи, че от проведените опити с резистентни и чувствителни към LPS въздействие животни е установено, че периодът на отзучаване на настъпилите поведенчески реакции зависи не от чувствителността на биологичния вид, а от начина на прилагане на антигена.

**Резултатите от експерименталния модел на инфекция с *P. aeruginosa* на кожата и меките тъкани при кучета са представени на 24 страници. Онагледени са с 8 фигури и 7**

таблици. Графичното и табличното представяне на данните от изследваните показатели ясно илюстрират тяхната достоверност. Макар и обобщено ще отбележа някои от най-съществените достойнства на получените резултати при това изследване.

**1.** За първи път в България се прави такова обширно изследване на кожна инфекция при кучета с местен теренен щам на *P. aeruginosa*, актуален проблем за здравословното състояние на кучетата; **2.** Установено е, че животните, реагират със силен възпалителен отговор, протичащ с повишена температура, увеличен нуклеарен фактор капа-бета, нарастващи серумни концентрации на NO и сиаловата киселина и съотношението неутрофили : лимфоцити. **3.** Доказано е, че прокалцитонина може да бъде биомаркер както за откриване на инфекцията, така и за приложеното лечение; **4.** Анализът на получените експериментални данни определя периода от началото на инфекцията до 72-ия час, като решаващ прозорец за предприемане на ефективни терапевтични действия; **5.** Установено е, че приложените терапевтични средства енрофлоксацин и растителния продукт feverfew (активна субстация партенолид), както и комбинацията от двата продукта коригират настъпилите нарушения в организма, като най-добър ефект се получава при комбинираната терапия; **6.** Приложението за първи път при кучета фитопродукт feverfew показва добре изразено антиоксидантно действие без да променя активността на трансаминазите.

В синтезиран вид получените резултати при отделните експериментални модели са обобщени в 18 извода, които коректно отразяват мащаба на извършените изследвания. Обсъждането е направено в отделна глава по раздели съобразно експерименталните модели. Заслужава да отбележа, че то е направено много професионално с научно интерпретиране на собствените резултати с литературните данни

**9. Оценка на приносите:** Приносите в дисертационния труд на доц. Андонова са безспорни. Те обогатяват с нови данни знанията за действията на антигени от Грам-негативните бактерии *E. coli* и *P. aeruginosa* върху животни с различна чувствителност и възможностите за коригиране на нарушенията в естествените защитни механизми и повишаване ефективността на антибактериалната терапия. Получените резултати са свързани в логическа последователност и ще могат да служат като ориентир при контрола на инфекциите с изследваните патогени. Базират се на собствените резултати и литературните данни 12 от приносите са определени за оригинални и 3 с потвърдителен характер, което приемам за коректно. На базата на изводите и приносите се правят и 6 препоръки за практиката, което ще е от полза при диагностиката и лечението на изследваните инфекции.

**10. Оценка на публикациите във връзка с дисертацията:** Обективен критерий за качеството на представения ми за оценка дисертационен труд са приложените научни публикации. По вид и брой те съответстват на обявения списък – общо 15 в пълен текст, като 13 от тях са на английски език и две на български. Пет от статиите са публикувани в

реномирани списания с имакт фактор (общ IF 4.391) и три в списания с имакт ранг (общ SIR 0.558). На 9 от публикациите дисертантът е водещ автор, в две е втори, в две трети, в една е на по-задно място и на една е самостоятелен автор. Това е ясно доказателство, че представените в дисертационния труд резултати са дело основно на дисертанта. Резултати от дисертационния труд са докладвани и на 9 научни форуми – 5 национални и 4 международни. За значимостта на публикациите, а оттам и на дисертационния труд е показателен и факта, че 9 от тях са цитирани общо 37 пъти като 18 са в списания с импакт фактор (общ импакт фактор 36,451).

**11. Оценка на автореферата:** Авторефератът е оформлен съобразно изискванията в общ обем 76 компютърно набрани машинописни страници. Като уменен вид на дисертацията, той достоверно възпроизвежда съдържанието и е база за даване на широка гласност на проведените изследвания, получените резултати, направените изводи и препоръки, и изведените приноси. Оформен е добре не само текстово, а и илюстарционно. Представено е обширно резюме и на английски език.

**12. Оценка на учебно-преподавателската дейност:** Доц Андонова е преподавател с дългогодишна практика. Минала е всички етапи на академичното израстване. Чете лекции и провежда практически занятия със студентите от ВМФ по две основни дисциплини – „Имунология“ и „Функционална патология“. За добра преподователска дейност е наградена с грамота-отличие „Доцент на 2011 г.“ Съавтор е на 4 учебни помагала – три ръководства за упражнения и един учебник по Имунология, където е автор на 10 глави. Разработила и внедрила е в учебната и научната работа 15 методики. Участвала е в изпълнението на 14 научни проекта като на 2 е и ръководител. Била е един мандат член на Специализиран научен съвет. Трети мандат е член на Факултетния научен съвет на ВМФ, а еин мандат (2008–2012 г.) е и Научен секретар на съвета. Изготвила е една рецензия и едно становище на кандидати за заемане на академичната длъжност „доцент“. Под нейно ръководство е защитена една дисертация на кандидат за получаване на образователната и научна степен „доктор“. Рецензирана е и 3 научни помагала. Активен участник е и при рецензиране на научни проекти и научни публикации. Отзовите, които съм получавал от студенти и от колеги завършили ВМФ са, че тя е възискателен, но обективен преподавател.

**13. Критични бележки:** Критични бележки по същество нямам. Бележките и препоръките, които бях направил в предварителния отзив и в текста на работния вариат на дисертационния труд са взети в предвид и в голама част са коригирани. Смятам, че прекалено много са фигурите от хистологичните изследвания, но това е коригирано в автореферата, където са показани само 4 фигури с най-типични изменения.

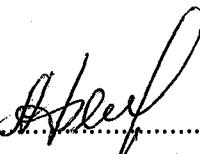
**14. Заключение:** Дисертационният труд на тема „Възможности за коригиране на нарушенията в естествените защитни механизми при животни с различна чувствителност към антигени на Грам-негативни бактерии“ с автор доц. Мария

Йорданова Андонова е изпълнен на високо научно ниво. Представената обширна информация показва, че дисертантът има задълбочени познания по изследвания проблем. С оглед обема на изследванията и използваните модели експериментите са провеждани в сравнително дълъг период от време, което е база получените резултати да бъдат проверявани и интерпретирани внимателно.

Като оценявам упоритостта и последователността в работата на доц. Андонова, а и личните ми впечатления приемам, че дисертационния труд е лично нейно дело. Това е видно и от броя на публикациите по темата, където в по-голямата част от тях е водещ автор. Получени са оригинални резултати, част от които са и с практическа насоченост. Дисертационният труд отговаря напълно на ЗРАСРБ и Правилника за неговото приложение, както и на Правилника за развитие на академичния състав в Тракийския университет. Представените материали са напълно в унисон и с препоръчителните критерии за оценяване кандидатурите за получаване на научни степени по ветеринарна медицина.

В съответствие с гореизложеното давам положителна оценка на дисертационния труд, автореферата към него, постигнатите резултати и приноси. Това ми дава основание убедено да предложа на почитаемото Научно жури да гласува положително и присъди научната степен „Доктор на науките“ на доц. Мария Йорданова Андонова в област на висшето образование 6. „Аграрни науки и ветеринарна медицина“, професионално направление 6.4. „Ветеринарна медицина“, научна специалност „Патология на животните“.

София, 20.11.2017 г.

Подпись: 

/доц. А. Филчев/