



# ТРАКИЙСКИ УНИВЕРСИТЕТ

## Ветеринарномедицински факултет

6000 Стара Загора, Студентски град, e-mail: vmfd@vmf.uni-sz.bg  
тел.: 042/699 - 500, - 504, -505, -506, -690; факс: 042/670 624; Декан: 042/670 193



### Становище

по дисертационен труд за придобиване на научна степен „Доктор на науките“ по  
научна специалност „Патология на животните“

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

**Автор:** доц. д-р Мария Йорданова Андонова от Катедра „Обща и клинична патология“  
на Ветеринарномедицински Факултет при Тракийски Университет - Стара Загора

**Изготвил:** доц. д-р Владимир Светославов Петров, определен за член на научно жури  
със заповед № 2189/27.09.2017 г. на Ректора на Тракийски университет - гр. Стара  
Загора.

През последните години научната общност с нарастваща тревога следи повишаващата се устойчивост към антибактериални средства, свързана със селектирането на мултирезистентни микробни щамове. Разработването на нови химиотерапевтици не водят до решаването на проблема, напротив наблюдава се нарастване честотата на бактериалните инфекции, особено тези предизвикани от опортунисти като *Pseudomonas aeruginosa*. Смята се, че поне 700 000 души всяка година стават жертва на заболявания предизвикани от резистентни щамове. Ефективният им контрол изисква използването на конвенционални средства, насочени към патогена, алтернативни подходи, като използването на биологично активни растителни екстракти (етерични масла и др.), мастни киселини със средна дължина на веригата и задължително подпомагане на защитния потенциал на организма с оглед коригиране на възникналите нарушения в естествените защитни механизми.

В проекта за дисертационен труд доц. Андонова си е поставила за цел проучване на етапите от развитието на инфекционния процес чрез използване на експериментални модели с животни, притежаващи различна чувствителност към Грам-негативни бактерии, като се изяснят настъпилите нарушения в защитния потенциал на организма, в барьерните му системи и неспецифични защитни реакции – възпаление, острофазов отговор и фагоцитоза. Особено важно е да се разработят схеми за корекция на нарушенията в защитните механизми, с което да се съдейства за повишаване ефективността на антибактериалната терапия. В тази връзка намирам детайлните изследвания по представената тематиката в дисертационния труд за съвременни и актуални.

Дисертационният труд е написан на 303 страници и следва класическата, възприета в България структура.

В литературният обзор много подробно, компетентно и в същото време разбираемо е представена информация за проблемни Грам-отрицателни (*Pseudomonas aeruginosa* и *Escherichia coli*) бактерии. Изяснени са организацията на клетките, антигенената структура, факторите на вирулентност, формите на съществуване, клинични прояви на заболяванията предизвикани от тях при биологични видове с висока и ниска чувствителност към липополизахаридите им. Задълбочено е представено

световното познание за въздействието на липополизахарида върху организма и естествените му защитни механизми. Професионално са разгледани увредите върху клетъчните елементи и еритроцитите, ефектите, които LPS оказва при предизвикване на възпаление (активиране на сензорните системи, на инфламазомите, на азотния оксид, увеличаване продукция на простагландини), оксидативния стрес, който провокира и повлияването на киселинно-алкалното състояние. Представени са и реакциите на макроорганизма посредством острофазов отговор. Описани са възможностите на *P. aeruginosa* да наруши бариерните системи, да манипулира фагоцитозата, като защита от опитите на организма да елиминира преодолелите локалните защити.

С оглед аргументиране на задачите поставени за разрешаване в проекта за дисертационен труд са изяснени основните маркери за инфектен процес предизвикан от Грам-негативни бактерии – прокалцитонин, нуклеарен фактор капа бета, азотен оксид, съотношение неутрофили към лимфоцити, сиалова киселина. Отделено е внимание и на терапевтичните подходи за контрол на инфекциите, предизвикани от Грам-негативни опортюнистични патогени (антибиотици и пробиотици), възможностите за коригиране на нарушенията посредством стероидни (глюокортикоиди), нестероидни противовъзпалителни средства (индометацин и нимезулид) и рецепторни антагонисти (циметидин). В края на обзора е представена информация и за потенциала на някои натурални продукти. Като препратка към бъдещи изследвания, литературния преглед завършва с кратко представяне на някои нови стратегии за управяване на инфекционния процес при използването на бактериофаги, моноклонални антитела, включването на антимикробни средства в наночастици, антимикробни пептиди, кателицидини, биологичноактивни растителни препарати и др.

Целта на проекта за дисертационен труд е ясно и прецизно формулирана. За постигането ѝ в логична последователност са поставени за разрешаване 4 основни задачи, с 13 подзадачи. Акуратното изпълнение на заложените изследователски намерения би позволило да се изяснят някои ключови моменти от промените предизвикани от липополизахарид на *E. coli* в антиоксидантния статус, липидната пероксидация и естествените защитни механизми при биологични видове с висока и ниска чувствителност, както и да се оценят възможностите за коригирането на нарушенията посредством нестероидни противовъзпалителни препарати, блокери на простагландиновата синтеза или хистаминовите рецептори. Разработения експериментален модел на *P. aeruginosa* инфекция при кучета, позволява да се проучат някои маркери за Грам-негативна бактериална инфекция и възможностите за контрол на възпалението на кожата и меките тъкани чрез използване на конвенционална, алтернативна и комплементарна терапия.

За постигане на предвидените изследователски задачи са използвани или разработени експериментални модели на възпаление при четири биологични вида бозайници (мишки, плъхове, свине и кучета). В проучванията са използвани общо 310 животни, което позволява сигурна статистическа обработка на резултатите от всеки експеримент. За определяне на биомаркерите на възпалението са използвани класически и съвременни лабораторни методи като ELISA, спектрофотометрия, радиоимунологичен метод, атомно-абсорбционна спектрофотометрия, имунофлуоресценция. За оценяване общото състояние на опитните животни и настъпващите промени под действието на липополизахарид на *E. coli* или инфекция с *P. aeruginosa* са определяни и класически показатели като червена кръвна картина с еритроцитометрични индекси, клетъчни показатели на естествения имунитет, вкл. фагоцитоза и фагоцитно число, хуморални показатели на естествения имунитет, острофазов отговор, есенциални олигоелементи (цинк, желязо), биохимични показатели на кръвта за чернодробната и бъбречна функция, киселинно-алкално

състояние с кръвно-газов профил и т. н. За проследяване ефектите на ендотоксемичното дразнене върху основните вътрешни органи (бял дроб, сърце, слезка, черен дроб, панкреас, тънки черва, бъбреци) на мишки са извършени мащабни патохистологични изследвания.

Получените резултати показват, че липополизахаридът на *E. coli* предизвиква понижение в активността на каталазата и редуциран глутатион, увеличава стойностите на малондиалдехида и индекса на оксидативния стрес, трайно нарушение на глюкозната хомеостаза и дистрофични увреждания в хепатоцитите. Прилагането на нестероидно противовъзпалително средство нимезуид води до увеличаване общия антиоксидантен капацитет на плазмата, нормализиране в концентрациите на редуцирания глутатион и регулира хипогликемията. За съжаление тази комбинация не коригира понижената каталазна активност, както и индекса на оксидативен стрес, а серумни концентрации на малондиалдехида остават високи.

Резултатите от експерименталния модел при плъхове доказват, че липополизахаридът на *E. coli* индуцира силен възпалителен отговор със статистически достоверно повишение на биомаркерите за възпаление и активиране на хуморалните фактори на естествена резистентност. В същото време предизвиква сериозни промени в червената и бяла кръвна катина, на фона на понижени стойности на общия белтък, албумина, а2-глобулините и γ-глобулините. Метаболитните нарушения са повишаване концентрациите на лактата, хипогликемия, хипоксия и некомпенсирана метаболитна ацидоза. Опитите за контролиране силата на възпалителнието с помощта на нестероидният противовъзпалителен препарат индометацин показват понижаване в концентрациите на PGE2, на IL-1, нормализиране на вътрешната телесна температура, но и липса на ефект върху метаболитните нарушения, киселинно-алкалното състояние на плъховете и отклоненията в червената, и бяла кръвна картина.

И при прасета липополизахаридът на *E. coli* индуцира преходно понижаване в общия брой на левкоцити, с ядрено изместване наляво, редуциране на еозинофилите, моноцитите и лимфоцитите, хипоксия, и некомпенсиран тип метаболитна ацидоза. Освен това се установява нарастване на серумните концентрации на цинка и желязото, нарушиане на фагоцитоза. Въпреки, че индометацинът, коригира понижението в общия брой левкоцитите, не успява да тушира напълно нарушенията в киселинно-алкалния статус. За H2 receptorният антагонист – циметидин е установено, че коригира по-добре предизвиканите от липополизахарида нарушения при левкоцитите, лимфоцитите, моноцитите и напълно контролира киселинно-алкалния статус.

Получените резултати от експериментален модел на кожна инфекция с *P. aeruginosa* при кучета показват, че прокалцитонинът е достоверен индикативен показател за развиващото се възпаление. Подобно е при нуклеарния фактор капа-бета. Нарастване се установява при серумните концентрации на азотния оксид и на неутрофилната активност, но при намалена способност за фагоцитоза. Реакцията на острофазовите протеини е свързана с повишение на фибриногена, серумните концентрации на свободната сиалова киселина и на глобулините. Увеличена е активността и на чернодробните трансаминази.

Получените резултати потвърждават необходимостта от ранно (до 72<sup>ри</sup> час) приемане на действия за овладяване на инфекционния процес. При използването на фитопрепарата feverfew се установява добре изразено противовъзпалително действие, ако употребата му започне до 4<sup>ти</sup> час от заразяването. Доказана е антиоксидантната му активност, блокирането на нуклеарния фактор капа-бета, хепатопротективният му ефект и възможността да се комбинира с антибактериални средства (енрофлоксацин), при което се установява коригиране на предизвиканите от инфекцията промени в броя на левкоцитите, левкограмата, в абсолютния брой на неутрофилите и тяхната хидроген

пероксидна продукция, в съотношението неутрофили към лимфоцити, но не предотвратява наблюдаваното потискане на фагоцитозата.

Обширното и задълбочено обсъждане, съпоставянето с резултатите от много автори, работещи по аспектите на тази тема през последните години, хвърлят светлина върху комплексните фактори на взаимодействието микро-макроорганизъм и възможностите за контрол посредством използването на конвенционални средства и алтернативни подходи. Във всички части на обсъждането са представени собствените становища и хипотези на автора за получените резултати, настъпилите промени или причините за несъответствията между очаквания и резултати от опитите за контрол на негативните ефекти на взаимодействието патоген-макроорганизъм.

Въз основа на получените резултати са формулирани 18 извода, които са релевантни на представеното в дисертационния труд. От структурирането им личи способността на автора да анализира данните от експерименталните модели. Видно е, че поставените в целта на труда за проучване научни задачи са изпълнени успешно.

Претенциите за 12 оригинални и 3 потвърдителни приноса намирам за напълно основателни, понеже са в корелация с получените резултати и формулираните изводи.

В литературния указател са включени 925 заглавия, около 75% от които са публикувани през последните 15 години, а 20% след 2010. Това показва отличната литературна осведоменост на доц. Андонова по проучваните въпроси и постоянното проследяване на представяните нови проучвания, доказателство за което е включването на литературни източници и от 2017 година. Не са пропуснати и изследванията на български автори, които са представени с 30 заглавия на кирилица и латиница.

Резултатите от проучванията включени в проекта за дисертационен труд са направени достояние на научната общност в 15 публикации, представени са на 9 научни форума. Пет от разработките са публикувани в български списания (две с SJR), 8 в чужди (4 с IF, 1 с SJR) и две в сборници от конференции. Представените научни резултати са заинтересовали световната научна общност и 9 от тях са цитирани общо 37 пъти.

Авторефератът е написан на 76 страници, структуриран е стандартно и отговаря напълно на представеното в дисертационния труд.

### **ЗАКЛЮЧЕНИЕ:**

Представеният дисертационен труд представлява задълбочено, прецизно извършено, мащабно научно изследване, самостоятелно дело на доц. д-р Мария Андонова. Темата на разработката е особено актуална с оглед повишенната честота и трудния контрол на инфекциите предизвикани от опортюнистични микроорганизми като *E. coli* и *P. aeruginosa*. Получени са важни резултати, позволяващи доосветляване на интимните патофизиологични механизми на взаимодействието на Грам-негативните бактерии с организма гостоприемник. По актуалност, значимост, оригинални приноси и съответствие със съвременните постижения в научната област на разработката този труд отговаря на критериите на Закона за развитие на академичния състав в Република България, Правилника за прилагането му и Правилника за развитие на академичния състав в Тракийски университет – Стара Загора за придобиване на научната степен „Доктор на науките“. Ето защо предлагам на членовете на научното жури да оценят по достойство представеният от доц. д-р Мария Йорданова Андонова дисертационен труд, и да ѝ присъдят научната степен „Доктор на науките“ по научна специалност „Патология на животните“.

16.11.2017  
Стара Загора

Изготвил становището: .....  
(доц. д-р Вл. Петров)