

БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ
ИНСТИТУТ ПО МОЛЕКУЛЯРНА БИОЛОГИЯ „АКАД. РУМЕН ЦАНЕВ“

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд

на тема:

Природни ниско токсични биологично активни екстракти от български гъби с фокус върху *Amanita muscaria* – анализ на състава, антитуморна активност и механизъм на действие

на докторант

: **Александър Николаев Душков**

за присъждане на образователно-научна степен „Доктор“ по научна специалност **4.3 Биологически науки, Молекулярна биология**

Научен ръководител: **проф. д-р Ива Угринова**

гр. София

2025 г.

Дисертацията обхваща 117 страници, съдържа 47 фигури и 4 таблици. Библиографската справка включва 248 заглавия.

Дисертационният труд е представен и обсъден на разширен семинар на секция „Структура и функция на хроматина“ към Института по молекулярна биология „Акад. Румен Цанев“, БАН, на 16.12.2024г.

Съдържание

1. Въведение.....	1
2. Цел и задачи	3
3. Материали и методи	4
4. Резултати и обсъждане	6
4.1. Определяне и сравнение на <i>in vitro</i> цитотоксичния ефект на екстрактите от изследваните гъбни видове	6
4.2. Цитотоксичност <i>in vitro</i> на „домашен“ етанолен извлек от <i>A. muscaria</i> срещу белодробни клетъчни линии.....	10
4.3. Цитотоксичност <i>in vitro</i> на етанолен извлек от <i>A. muscaria</i> , получен в лабораторни условия, срещу белодробни клетъчни линии	13
4.4. Цитотоксичност <i>in vitro</i> на етанолен извлек от <i>A. muscaria</i> , получен в лабораторни условия, срещу клетъчна култура от рак на простатата	15
4.5. Хроматографски HPLC анализ на съдържанието на IBO, MUS и ERG в тотален етанолен екстракт от <i>A. muscaria</i> и фракции, получени от него чрез течна-течна екстракция с неполярни разтворители	16
4.6. CZE/CCD анализ на съдържанието на IBO и MUS в тотален етанолен екстракт от <i>A. muscaria</i>	22
4.7. UHPLC-MS/MS анализ на съдържанието на IBO и MUS в тотален етанолен екстракт от <i>A. muscaria</i>	24
4.8. Изследване на влиянието на екстракта от <i>A. muscaria</i> върху синтеза на РНК при третиране с него на клетъчни култури <i>in vitro</i>	26
4.9. Идентифициране на наблюдаваните РНК агрегати като нуклеопротеинови стрес-гранули	28
4.10. Изследване на влиянието на екстракта от <i>A. muscaria</i> върху деленето на клетки от линиите H1299, A549 и PC3 <i>in vitro</i> чрез третиране с 5-етинил-2'-дезоксигуанидин.....	30
4.11. Изследване на влиянието на екстракта от <i>A. muscaria</i> върху фосфорилирането на хистонов вариант H2AX при линия PC3.....	38
4.12. Анализ на клетъчния цикъл при белодробна ракова линия A549 след третиране с екстракт от <i>A. muscaria</i>	41
5. Изводи.....	43
6. Приноси	44
7. Публикации, свързани с темата на дисертацията	45
8. Публикации, които не са свързани с темата на дисертацията	45
9. Участия в научни форуми по темата на дисертацията.....	46
10. Литература.....	47

1. Въведение

В съвременното общество, раковите заболявания се нареждат сред челните места по смъртност и влошаване на качеството на живот на милиони хора [1]. Измежду различните типове рак, този на белия дроб се отличава със значително завишена възможност за летален изход, като по данни на Световната здравна организация (World Health Organization, WHO), към 2024 г., той е най-смъртоносният вид раково заболяване в глобален мащаб [2]. Меланомният тип рак на кожата е сравнително по-рядко срещан, но е отговорен за най-голямо количество смъртни случаи, свързани с възникване на кожни малигнени образувания [3]. Наред с рака на кожата, ракът на простатата е сред най-често срещаните видове диагностицирано онкозаболяване при мъжете в САЩ [4], като при жените аналогично място в статистиката по установени диагнози и смъртни случаи заема ракът на гърдата [5].

Тези тенденции показват належащата нужда от ефективни средства и подходи за борба с раковите заболявания, както и подобрението на съществуващите такива. За съжаление, хирургическата намеса за премахване на ракови образувания не винаги е възможна, а когато е, не винаги води до трайна ремисия на заболяването; в допълнение, много от достъпните лекарствени препарати за химиотерапевтично лечение на рак носят със себе си множество странични ефекти, оказващи пагубен ефект върху здравето и качеството на живот на пациентите. Лъчетерапията – друг подход за лечение на ракови заболявания – също не е без рискове, както и не винаги демонстрира задоволителна ефективност. Поради това, търсенето на допълнителни, лесно достъпни и нискотоксични съединения с противотуморна активност *in vivo* продължава да се засилва в последните десетилетия.

Сред научната общност се наблюдава тенденция на покачващ се интерес към вторичните метаболити на представители на царствата на растенията и гъбите, много от които проявяват различна биологична активност. Макар и т.нар. „билколечение“ да фигурира в най-различни общества от много векове, съвременната западна наука – понастоящем вече описала огомно богатство от съединения, които могат да се открият в тези организми и които притежават свойството да предизвикват силен биологичен отговор в човешкото тяло – продължава да открива и охарактеризира растителни и гъбни метаболити с медицински потенциал. Много от вече описаните

характерни за растенията и гъбите биологично активни вещества или фигурират в днешните фармакопеи, или са послужили като основа за прецизен синтез на молекули, подобни на тях, но с по-добро действие или с намалена в сравнение с тяхната токсичност. В светлината на тези възможности, растителните и гъбни видове продължават да са ценен ресурс в търсенето на нови противоракови подходи.

Изучаването на химията и биологичната активност на метаболити, изолирани от представителите на царство Гъби, засвидетелства техния забележителен потенциал; много от тях имат имуностимулиращо, антинеоангиогенетично, противотуморно, противодиабетно и антиоксидантно действие сравнимо с, или надвишаващо това на, множество растителни метаболити [6]. Разнообразните начини, по които те влияят върху организма могат да са от полза както при усилия за елиминиране на вече съществуващо раково заболяване, така и – поради антиоксидантните, противовъзпалителни и антимикробни свойства на много от тях – като ефективна превенция срещу възникването на тумори. Фактът, че много видове все още не са охарактеризирани с фокус върху описване на противотуморния им потенциал и механизмите зад него прави биохимията на метаболитите на членовете на царство Гъби актуална тема в съвременната молекулярна биология.

2. Цел и задачи

Сведенията, получени от литературния обзор сочат към големия противотуморен потенциал на вторични метаболити, изолирани от плодни тела на гъбни видове. Същевременно в литературата към момента отсъстват данни за някои техни аспекти и активности. Взимайки тези обстоятелства предвид, за целите на дисертационния труд бяха формулирани следните цел и задачи.

Цел: да се изследва противотуморния ефект на екстракти, получени от различни видове гъби, разпространени на територията на България.

За изпълнение на целта бяха формулирани следните задачи:

- Да се проведе сравнителен скрининг за цитотоксичност на различни видове гъбни екстракти и да се определи най-обещаващият от тях за по-задълбочен анализ на ефекта върху клетъчните култури.
- Да се анализира съдържанието на специфични съединения в етанолния екстракт от *Amanita muscaria*, като се фокусира върху нежелани невроактивни вещества и противораковото съединение ергостерол.
- Да се проучи ефектът *in vitro* на екстракта от *A. muscaria* върху синтеза на РНК в клетъчни модели.
- Да се изследва *in vitro* влиянието на екстракта от *A. muscaria* върху ДНК, с акцент върху потенциални ДНК повреди.
- Да се анализира ефектът *in vitro* на екстракта от *A. muscaria* върху степента на клетъчно делене и динамиката на клетъчния цикъл.

3. Материали и методи

Материали

Всички клетъчни линии и среди за култивиране, използвани при изработването на дисертационния труд са закупени от ATCC®. Антителата за провеждане на имунофлуоресцентен анализ са закупени от Sigma-Aldrich, BioLegend и Abcam. Етанол, н-хексан, хлороформ, етилацетат, бутанол и метанол (в качество „Чист за Анализ“ респективно) бяха закупени от Chim-spectar Ltd. (Sofia, Bulgaria). Амониев ацетат кристалохидрат бе закупен от Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Ацетонитрил (LC-MS grade), метанол (LC-MS grade), дейонизирана вода (LC-MS grade) и мравчена киселина бяха закупени от VWR International (Radnor, PA, USA). Чисти вещества IBO, MUS и ERG бяха закупени от Sigma-Aldrich в кристална форма. MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) бе закупено от Thermo-Fischer Scientific (Waltham, MA, USA). DAPI, 5-бромоуридин и 5-етинил-2'-дезоксисуридин бяха закупени от Sigma-Aldrich. Lipofectamine ® 2000 и среда за трансфекция Opti-MEM™ бяха закупени от Thermo Fisher Scientific. Плазмидният вектор pFRT_TO_FlagHA_dest с клонирана секвенция за белтъка G3BP1 бе закупен от Addgene (Addgene plasmid #127106; RRID: Addgene_127106).

Екстрактите от видовете дървесни гъби са получени в Института по молекулярна биология „Акад. Румен Цанев“, БАН, с изключение на единия извлек от *A. muscaria*, който бе предоставен от микотерапевта Владимир Въжаров. Всички видове гъби бяха събрани на територията на Природен парк Витоша, като бяха спазени всички правила за използване на находища от полезни растителни и гъбни видове, описани в закона на Република България (НАРЕДБА № 2 ОТ 20 ЯНУАРИ 2004 Г. ЗА ПРАВИЛАТА И ИЗИСКВАНИЯТА ЗА СЪБИРАНЕ НА БИЛКИ И ГЕНЕТИЧЕН МАТЕРИАЛ ОТ ЛЕЧЕБНИ РАСТЕНИЯ) [241]

Молекулярнобиологичните експерименти са извършени в Института по молекулярна биология „Акад. Румен Цанев“ към БАН; HPLC, CZE/CCD и UHPLC-MS/MS експериментите са проведени в Карловия университет в Прага, Чехия.

Методи

- МТТ тест за цитотоксичност
- Трансформация на бактерии с плазмидна ДНК и трансфекция на еукариотни клетъчни линии с плазмидна ДНК
- Имунофлуоресцентен анализ
- Оценка на промяна в броя на активно делящи се клетки посредством включването в тях на нуклеозидния аналог 5-етинил-2'-дезоксиуридин (EdU)
- CLICK-chemistry визуализация на новосинтезирана РНК чрез включване в нея на веществото етилиуридин (EU)
- Анализ на клетъчния цикъл
- HPLC анализ на екстракт от *A. muscaria* и фракции от него
- CZE/CCD анализ на екстракт от *A. muscaria*
- UHPLC-MS/MS анализ на екстракт от *A. muscaria*

4. Резултати и обсъждане

4.1. Определяне и сравнение на *in vitro* цитотоксичния ефект на екстрактите от изследваните гъбни видове

Стандартна първа стъпка в търсенето на нови, обещаващи противоракови препарати е определянето на тяхната цитотоксична активност срещу панели от ракови клетъчни линии *in vitro*. Необходимо е цитотоксичната активност на комплексни смеси от вещества, каквито са тоталните, неразделени екстракти от гъби (и които често се предлагат на пазара като хранителни добавки с предполагаем благоприятен ефект за здравето) да бъде установена лабораторно, за да може да се прецени меродавността на провеждане на по-нататъчни, задълбочени *in vitro* и *in vivo* биологични експерименти, както и от трудоемки и прецизни процедури по химически анализ и разделяне с цел стигане до единични биоактивни вещества с изяснен механизъм на действие.

Първоначалният скрининг за цитотоксичност, който проведохме, беше извършен с екстракти, получени в нашата лаборатория от дървесните гъби *Trametes versicolor*, *Lenzites betulina*, *Fomes fomentarius* и *Fomitopsis betulina*. Екземпляри от видовете бяха събрани от членове на екипа на територията на Природен парк Витоша, като при събирането им бяха спазени правилата за използване на находища от полезни растителни и гъбни видове, описани в закона на Република България (НАРЕДБА № 2 ОТ 20 ЯНУАРИ 2004 Г. ЗА ПРАВИЛАТА И ИЗИСКВАНИЯТА ЗА СЪБИРАНЕ НА БИЛКИ И ГЕНЕТИЧЕН МАТЕРИАЛ ОТ ЛЕЧЕБНИ РАСТЕНИЯ) [7]. Плодните тела на събраните видове бяха изсушени в сушилня при температури от 65°C за дървесните гъби и 70°C за *A. muscaria*, след което бяха механично смелени до прахова консистенция с помощта на електрическа мелница.

Поради генерално голямото химично разнообразие от вещества, които се откриват в билки и лечебни гъби и които несъмнено притежават различна степен на разтворимост в различни условия, ние сметнахме за необходимо да изследваме цитотоксичната активност както на екстракти, получени чрез прилагане на полярен разтворител (вода) при висока температура, така и на екстракти, получени чрез накисване на дрогата в по-слабо полярен разтворител (етанол), често прилаган при получаването на „домашни“ тинктури поради широката си достъпност. За да проверим дали няма да наблюдаваме повишен ефект при комбинация от вещества, които потенциално биха присъствали в единия от типовете екстракти, но не и в другия, ние проведохме и МТТ тестове за цитотоксичност за комбинации от двата екстракта, след получаване и охарактеризиране на всеки един от тях поотделно.

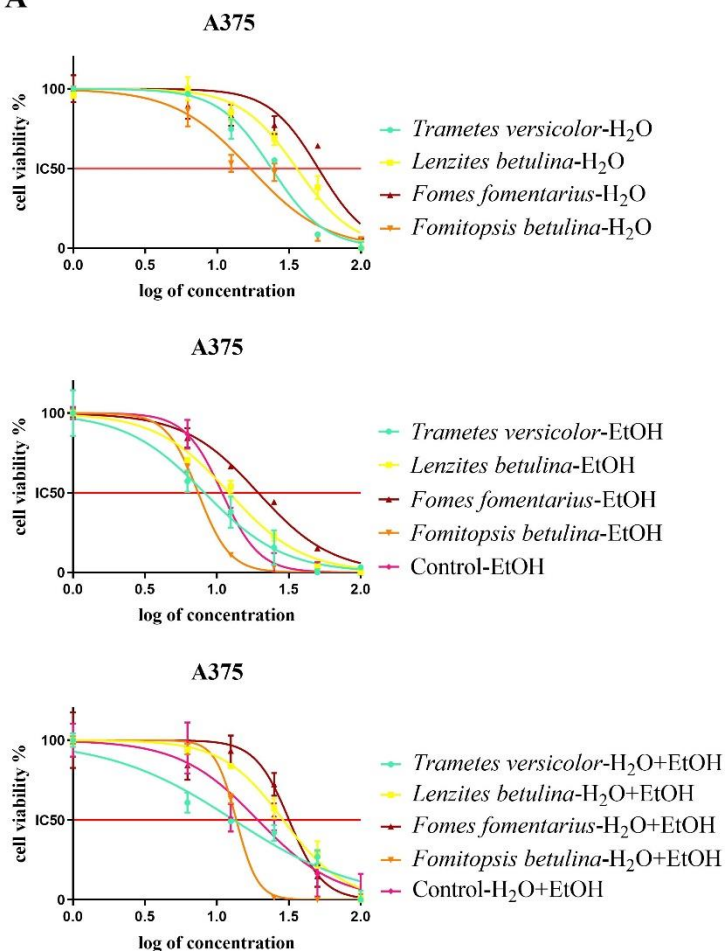
Клетки от линиите A375, A375-KRAS, HS 895.T и MDA-MB231 бяха инкубирани със среда, в която бяха добавени количества от водни, етанолни, и смес от водни и етанолни

извлеци в концентрации от 10, 5, 2.5, 1.25 и 0.625 μL за 100 μL среда на клетъчно култивиране; тъй като всяка ямка в 96-ямковите плаки, които бяха използвани побира по 100 μL течност, тези стойности могат да се разглеждат и като процентни съотношения екстракт/среда. Резултатите от този първоначален скрининг за цитотоксичност са представени в Таб. 3 под формата на установените IC_{50} стойности (изразени в μL екстракт на 100 μL среда за култивиране, или в обемен процент екстракт на ямка) за всяка линия и екстракт; за по-обещаващите от тях, ефектът е представен графично на Фиг. 27. При всеки експеримент с извлек, получен с помощта на EtOH, контролни клетки от всяка от дадените линии бяха третирани с количество EtOH аналогично на това, което би присъствало в ямка, третирана със съответната доза гъбен екстракт, за да се изключи всяка възможност резултатите за цитотоксичност да се дължат на присъствието на етанол в средата. Данните са публикувани в [8]. На Фиг. 27. е представена графично преживяемостта на култури от кожните ракови клетъчни линии A375 и Hs.895.T след инкубиране със съответните екстракти за 72 часа, установена посредством МТТ тест и представена като процентна преживяемост на третираните клетки в сравнение с преживяемостта на нетретиран контролни клетки, инкубирани за същия период от време с чиста среда за клетъчно култивиране.

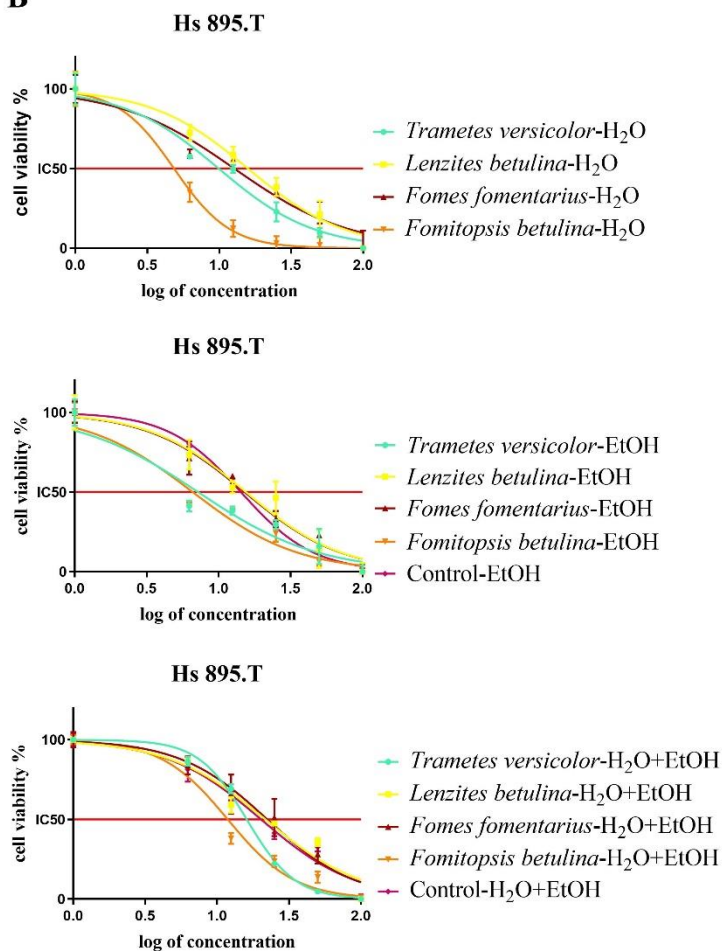
Кл. линия/Гъба	<i>Trametes versicolor</i>			<i>Lenzites betulina</i>			<i>Fomes fomentarius</i>			<i>Fomitopsis betulina</i>			Позитивна контрола	
	H ₂ O	EtOH	H ₂ O + EtOH	H ₂ O	EtOH	H ₂ O + EtOH	H ₂ O	EtOH	H ₂ O + EtOH	H ₂ O	EtOH	H ₂ O + EtOH	EtOH	H ₂ O + EtOH
A375	2,4	1,22	1,7	3,8	1,7	2,6	4,9	1,9	3,2	1,8	0,84	1,4	1,5	2
A375 KRAS	1,9	1,25	3,3	3,2	1,6	5	4,4	1,7	5	1,6	0,87	1	1,2	3
Hs 895.T	9,9	7,2	8,4	16	8	9,2	13	8,5	9,4	4,8	6,6	7,8	7,9	8,8
MDA-MB231	5,2	2,7	4,8	6,2	3,8	5,6	9,6	3,2	5,4	NT	NT	NT	3	5,2

Табл. 3. IC_{50} стойности за цитотоксичност (под формата на обемно съотношение; μL екстракт на 100 μL среда за култивиране) на различните типове екстракти, получени от изследваните видове дървесни гъби, върху ракови клетъчни линии с кожен произход, както и върху линията MDA-MB231 (рак на гърдата). Стойностите са установени при анализ на данни от проведени МТТ тестове за цитотоксичност посредством софтуер GraphPad Prism. NT – Not Tested

A



B



Фиг. 27. Цитотоксичност на водни и алкохолни извлекци от дървесни гъби, както и на комбинация от двата типа екстракт, върху клетки от линията A375 (колона A, ляво) и Hs 895.T (колона B, дясно); сравнение на кривите доза-отговор, установени чрез МТТ тест. Данните са нормализирани спрямо преживяемостта на контролни, нетретиранни клетки. Представена е интерполация на резултати от три независими експеримента, като за всяко условие са измерени четири повторения. Данните са използвани за изчисляване на средна инхибиторна концентрация (IC_{50}) на екстрактите чрез софтуера GraphPad Prism. Процентните обемни концентрации (v/v) на екстрактите, получени с екстрагент вода и с чист EtOH, както и на EtOH/H₂O комбинацията, са изобразени върху X-оста в логаритмичен вид.

Всички изследвани екстракти показаха наличие на цитотоксичност, макар и последната да бе изразена в различни степени между различните типове екстракти, видове гъби и клетъчни линии. Цялостно сравнение на получените IC_{50} стойности за дървесните видове показва, че екстрактите от *F. betulina* – брезовата гъба – са с най-явно изразен цитотоксичен ефект върху изследваните линии. Едно съединение с доказано директно антитуморно действие – бетулиновата киселина, за което се знае, че влиза в състава на плодните ѝ тела – притежава

добра разтворимост в етанол. Силно вероятно е ефектът да се дължи на присъствието му в етанолния извлек от *F. betulina*, особено взимайки предвид факта, че етанолният извлек от същата е с изразено по-ниска IC₅₀ стойност, отколкото водния или водно-етанолния извлек от този вид. Тъй като бетулиновата киселина се разтваря и в DMSO, вероятно е добавянето на това съединение към състава на екстрагента да увеличи добива ѝ в крайния екстракт. Въпреки това, необходимо е да се вземе предвид присъщата за DMSO цитотоксичност при всякакви потенциални експерименти, в които се изследва ефективността на подобен хипотетичен екстракт.

Етанолният извлек от *F. betulina* бе с най-ясно изразено цитотоксично действие срещу малигнената меланомна линия A375, последвано от MDA-MB-231 и с най-слабо изразено такова срещу линията Hs.895.T.

Измежду третираните клетъчни линии, етаноловият екстракт от *F. fomentarius* показва минимална цитотоксична активност спрямо клетки от линията Hs.895.T (най-ниска измежду изследваните клетъчни линии), като същевременно демонстрира значително по-голяма активност срещу линията от рак на млечна жлеза MDA-MB-231. Това е в съответствие с предишни проучвания, описващи апоптотичните ефекти на екстракта върху MDA-MB-231 клетки [9]. Най-силният цитотоксичен ефект на етаноловия извлек от *F. fomentarius* (указан чрез по-ниската стойност на IC₅₀) измежду всички линии, разглеждани в панела, бе установен срещу злокачествената меланомна линия A375. Ниските IC₅₀ стойности за A375 и MDA-MB-231 клетъчните линии могат да служат като основание за хипотезата, че цитотоксичният ефект на екстракта срещу A375 е опосредстван от АКТ сигнализиране, както вече е описано при третиране на MDA-MB-231 клетки с извлек от *F. fomentarius* [9]. Същевременно водният екстракт от *F. fomentarius* показва значително по-високи стойности на IC₅₀ срещу всички изследвани клетъчни линии, отколкото същите при етанолния, което може да предполага или, че е необходима по-продължителна водна екстракция за получаване на достатъчни количества от водоразтворимия цитотоксичен полизахарид MFKF-AP1β за наблюдаване на цитотоксичен ефект, сравним с този, наблюдаван в A549 клетки при прилагане на водния извлек [10], или, че полизахаридът не предизвиква апоптоза в клетъчните линии от рак на кожата, както се случва в клетките A549. Трябва да се отбележи, че водният екстракт от *F. fomentarius* показва значително по-голям цитотоксичен ефект върху A375 клетки, отколкото върху MDA-MB-231 и Hs 895.T клетки.

Както водните, така и етаноловите екстракти от *T. versicolor* показаха най-висока цитотоксичност срещу A375 клетки в сравнение с другите клетъчни линии, третирани с тях; единствено екстрактите от *F. betulina* показаха по-висока цитотоксична активност. Вземайки

предвид, че PSK е водоразтворим в гореща вода, а PSP - в етанол, експерименталните данни тук предполагат, че PSP може да има по-голяма активност срещу A375, отколкото PSK.

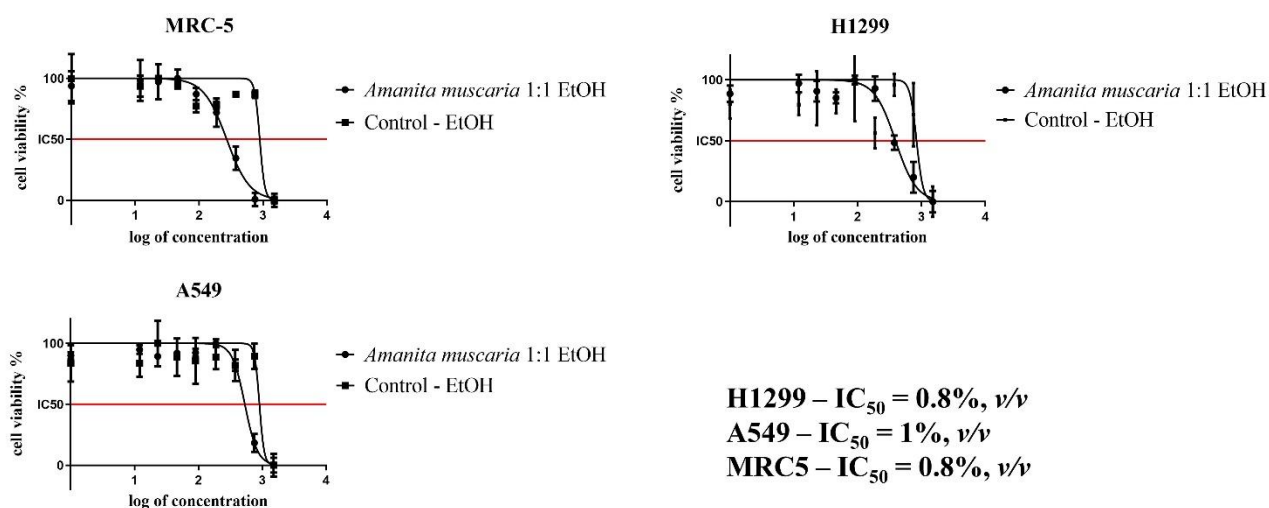
Измежду всички тествани гъбни видове екстрактите от *L. betulina* показаха най-ниска обща цитотоксичност, което сочи към потенциално отсъствие на разтворими в етанол цитотоксични съединения в тази гъба, въпреки съобщенията за цитотоксична активност с екстракти от петролев етер и етилацетат [11].

Нито една от комбинациите от водни и етанолови екстракти не доведе до намалени стойности на IC₅₀ в сравнение с отделните чисти етанолни и водни екстракти, което предполага, че методите за екстракция, използвани тук, не извличат съединения, проявяващи завишена цитотоксичност в комбинация, в сравнение с прилагането им поотделно.

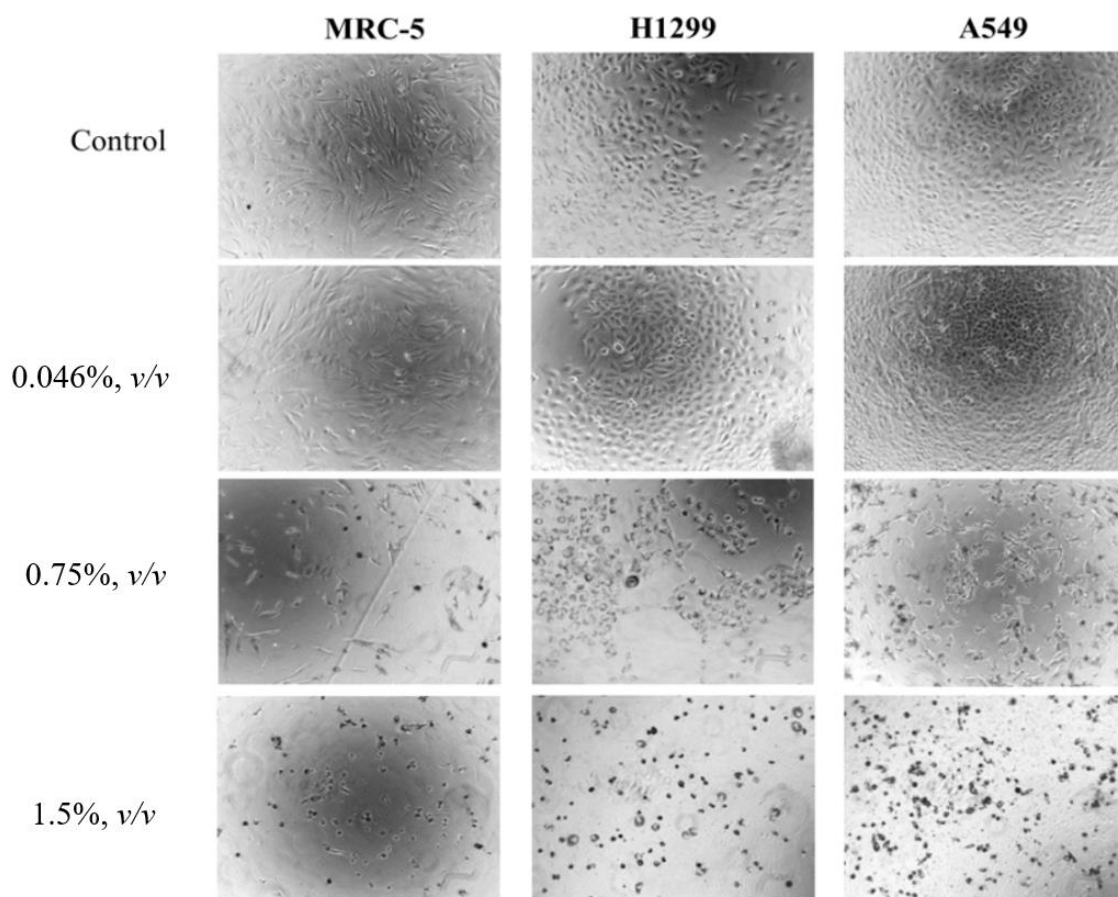
4.2. Цитотоксичност in vitro на „домашен“ етанолен извлек от *A. muscaria* срещу белодробни клетъчни линии

По време на провеждане на първоначалния скрининг за цитотоксичността на извлеките от дървесни гъби, екипът на лабораторията получи извлек от *A. muscaria* от микотерапевта Владимир Въжаров, получен чрез мацерация на изсушени на слънце шапки от гъбата в търговски достъпна водка със съдържание на алкохол 40%. Някои от условията на екстракция не бяха описани – екстрактите включваха гъбни шапки, събирани от разнообразни локации, които не бяха сушени под контролирани условия с известна температура и влага, както и точно определено съотношение дрога/екстрагент. Въпреки това, предоставените извлеци бяха подложени на първоначален МТТ тест, за да се установи цялостно присъствие или отсъствие на цитотоксичност в етанолния екстракт от тази гъба. За експериментален модел беше избран малък панел от белодробни клетъчни линии (две ракови и една здрава), тъй като в сравнително оскъдните описани случаи на прилагане на екстракта като адювантна терапия при онкоболни, предполагаемо се бе наблюдавал най-добър ефект срещу белодробни заболявания. За условно определяне на подходящ диапазон на дозата на третиране, използвана в МТТ теста, бе взето финалното процентно съдържание на EtOH, което би присъствало в ямките; за целта „домашният“ извлек от *A. muscaria* бе разглеждан като разтвор на етанол със съдържание 40%, а експерименталните концентрации от него – като разредки на същия. В експерименталната постановка отново бяха посяти клетки, служещи като позитивна контрола, като те бяха третирани с разредки от същата търговска марка водка, използвана при получаването на „домашния“ извлек. EtOH съдържанието в ямките с позитивните контролни култури бе аналогично на това в ямките, третирани с извлек от червена мухоморка, за да се елиминира възможността цитотоксичният ефект да се припише погрешно на присъствието на етанол, вместо на някакви биологично активни вещества, разтворени в екстракта. Резултатите от този

първоначален експеримент са представени на Фиг. 28. (графики от МТТ теста на малкия белодробен клетъчен панел) и Фиг. 29 (светлинномикроскопски снимки на промените в клетъчната морфология за трите белодробни линии с увеличаване на дозата *A. muscaria* екстракт).



Фиг. 28. Цитотоксичност на „домашен“ алкохолен извлек от *A. muscaria*, получен с екстрагент 40%-на ръжена водка, върху клетки от линиите MRC-5 (A), A549 (B) и H1299 (C); криви, изобразяващи взаимоотношението доза-отговор, установени чрез МТТ тест. Данните са нормализирани спрямо преживяемостта на контролни, нетретирани клетки. Представена е интерполация на резултати от три независими експеримента, като за всяко условие са измерени четири повторения. Данните са използвани за изчисляване на средна инхибиторна концентрация (IC₅₀) на екстрактите чрез софтуера GraphPad Prism. Процентните обемни концентрации (v/v) на екстракта и на чистия ЕтОН, с който са третирани позитивните контроли, са изобразени върху X-оста в логаритмичен вид.



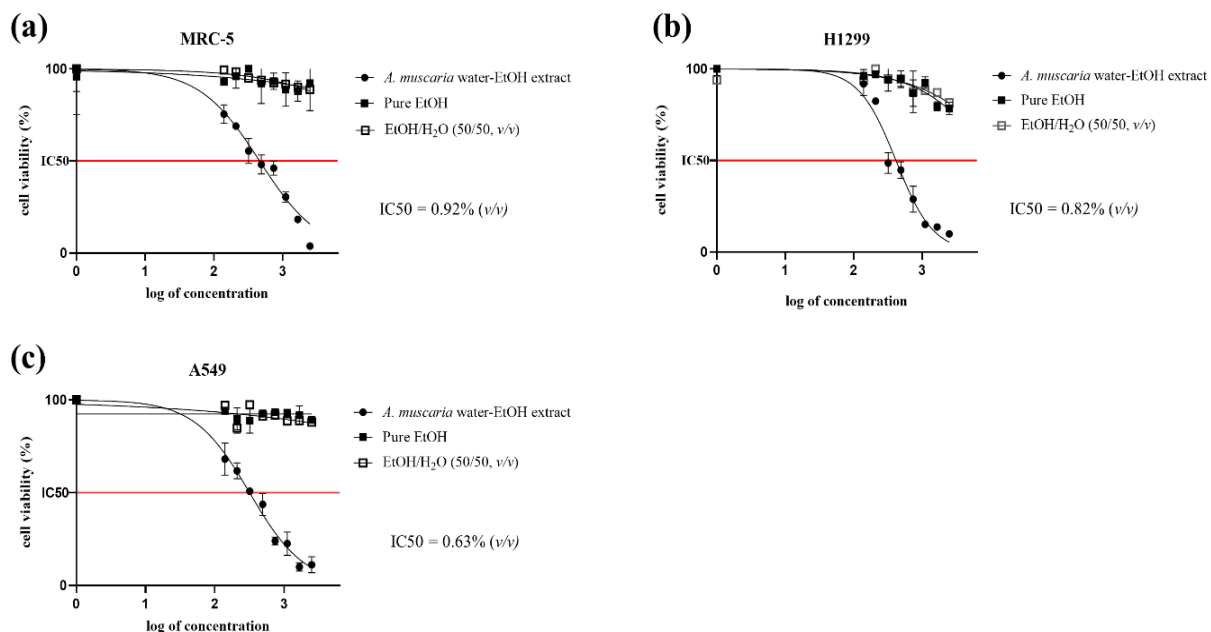
Фиг. 29. Морфологични промени в клетки от линиите MRC-5, H1299 и A549, наблюдавани на светлинен микроскоп с увеличение 10х, при третиране с нарастващи концентрации извлек от *A. muscaria*

Наблюдаваните IC₅₀ стойности показаха, че етанолният извлек от *A. muscaria* е с много висока цитотоксична активност срещу всяка една от изследваните линии, макар и да не се характеризираше със селективност. При сравнение на активността на етанолния извлек от *A. muscaria*, изразена като IC₅₀ стойности, с тази, установена за дървесните видове гъби (макар и вземайки предвид разликата в типовете клетъчни култури, които бяха обект на анализ) беше очевидно, че екстрактът от мухоморка демонстрира значително по-ниски IC₅₀ стойности и, съответно, много по-висок цитотоксичен ефект в сравнение с всеки един от многобройните типове екстракти от дървесни гъби. Това наблюдение, в комбинация с много по-оскъдни сведения за подобен тип изследвания за цитотоксичност и механизми зад нея с екстракти от *A. muscaria* в сравнение с тези за дървесните видове гъби, налични в литературата, послужи като обосновка за провеждане на по-продължителни и задълбочени изследвания, в които биологичният ефект на екстракта от мухоморка бе основен фокус на работата.

4.3. Цитотоксичност *in vitro* на етанолен извлек от *A. muscaria*, получен в лабораторни условия, срещу белодробни клетъчни линии

Тъй като за екстрактите, приложени при първоначалния експеримент, не бяха изяснени важни подробности – локация на събиране, наличие или отсъствие на пънчета в дрогата, ясно определени съотношения дрога/разтворител при екстракцията и т.н., във всички последователни изследвания с извлекци от *A. muscaria*, описани в настоящата работа, бе използван екстракт, получен от екипа на нашата лаборатория, при които всички условия на екстракция бяха контролирани – събиране на обекти от гъбата на територията на природен парк Витоша, сушене в сушилня на точно определена температура (70°C) за 12 часа, определяне на точно съотношение дрога/разтворител (изразено като маса на дрогата към обем на разтворителя) и прилагане на екстрагент, състоящ се от дестилирана вода и етанол в определени обемни съотношения. Условията на екстракция за получаване на етанолния извлек от *A. muscaria*, използван за целите на настоящата работа, са описани в секция *Материали и методи*.

За потвърждаване на резултатите, получени от първоначалния експеримент за определяне на цитотоксичност (Фиг. 28) отново бе използван панел от линиите H1299, A375 и MRC-5, който беше третиран с получения в ИМБ-БАН екстракт от *A. muscaria* в същите процентни обемни концентрации (μL екстракт/100 μL среда за клетъчно култивиране). В този експеримент с контролна цел беше проследена както жизнеспособността на клетки, третирани с EtOH в концентрации, аналогични на тези в ямките с екстракт от червена мухоморка, така и жизнеспособността на клетки, третирани със смес от EtOH и dH₂O в равни обеми, с цел да се внесе леко разреждане в хранителната среда, което би следвало да присъства в ямките, третирани с екстракт от гъбата, но без ефекта от метаболитите ѝ. Резултатите от този експеримент са показани на Фиг. 30. в графичен вид. На фигурата са упоменати и установените IC₅₀ стойности срещу всяка от клетъчните линии.

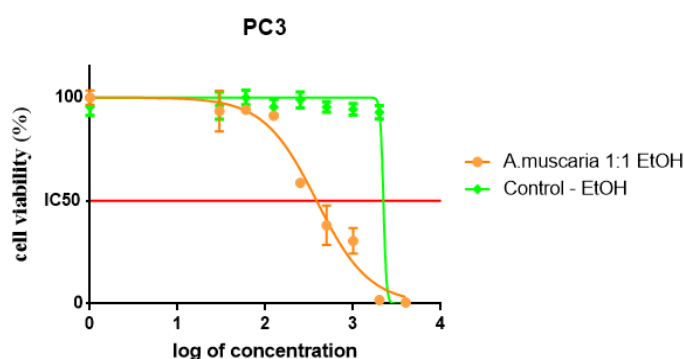


Фиг. 30. Цитотоксичност на алкохолен извлек от *A. muscaria*, получен в ИМБ-БАН с екстрагент 50/50 v/v смес от dH₂O/EtOH, върху клетки от линиите MRC-5 (a), H1299 (b) и A549 (c); криви, изобразяващи взаимоотношението доза-отговор, установени чрез МТТ тест. Данните са нормализирани спрямо преживяемостта на контролни, нетретирани клетки. Представена е интерполация на резултати от три независими експеримента, като за всяко условие са измерени четири повторения. Данните са използвани за изчисляване на средна инхибиторна концентрация (IC₅₀) на екстрактите чрез софтуера GraphPad Prism. Процентните обемни концентрации (v/v) на екстракта, чистия EtOH, с който са третирани позитивните контроли, или EtOH/H₂O комбинацията, добавени към клетъчната среда, са изобразени върху X-оста в логаритмичен вид.

Екстрактът от *A. muscaria*, получен в лабораторни условия, също показва значително цитотоксично действие срещу белоробните клетъчни линии, сравнимо с това, вече установено за „домашния“ извлек. Този резултат не просто послужи за потвърждаване на първоначалните наблюдения, но и спомогна да бъдат изключени потенциалните влияния на примеси, съдържащи се в комерсиално закупения екстрагент водка, които биха затруднили значително по-нататъчните изследвания, касаещи съединенията, стоящи зад наблюдаваните ефекти.

4.4. Цитотоксичност *in vitro* на етанолен извлек от *A. muscaria*, получен в лабораторни условия, срещу клетъчна култура от рак на простатата

При обсъждане на предполагаемата ефективност на екстракта от *A. muscaria*, наблюдавана в непосредствената микотерапевтична практика на В. Въжаров, авторът посочи, че в практиката си е наблюдавал най-ниска ефективност на извлека при опит за благоприятно повлияване на състоянието на пациенти, страдащи от рак на простатата. В светлината на тези сведения бе проведено допълнително изследване за цитотоксичността на екстракта върху клетки от линията PC3 – клетки от аденокарцином на простатата, характеризиращи се със сравнително висока пролиферативна способност и съответно представляващи подходящ модел за агресивен и инвазивен тип рак на простатата. Резултатите са представени на Фиг. 31.



Фиг. 31. Цитотоксичност на алкохолен извлек от *A. muscaria*, получен в ИМБ-БАН с екстрагент 50/50 v/v смес от dH₂O/EtOH, върху клетки от линията PC3; криви, изобразяващи взаимоотношението доза-отговор, установени чрез МТТ тест. Данните са нормализирани спрямо преживяемостта на контролни, нетретиранни клетки. Представена е интерполация на резултати от три независими експеримента, като за всяко условие са измерени четири повторения. Данните са използвани за изчисляване на средна инхибиторна концентрация (IC₅₀) на екстрактите чрез софтуера GraphPad Prism. Процентните обемни концентрации (v/v) на екстракта и на чистия EtOH с който са третирани позитивните контроли, са изобразени върху X-оста в логаритмичен вид.

Въпреки получените сведения, касаещи занижената ефективност на екстракта от *A. muscaria* върху пациенти, страдащи от рак на простатата, при проведения тест за цитотоксичност бе установен значителен *in vitro* цитотоксичен ефект върху линията PC3, напълно сравним с този, установен при гореописаните експерименти върху панел от белодробни клетъчни линии.

4.5. Хроматографски HPLC анализ на съдържанието на IBO, MUS и ERG в тотален етанол екстракт от *A. muscaria* и фракции, получени от него чрез течна-течна екстракция с неполярни разтворители

Въпреки обещаващите резултати от пилотния експеримент за цитотоксичност, *A. muscaria* е известна с факта, че произвежда и натрупва невроактивните алкалоиди иботенова киселина (IBO) и мусцимол (MUS) [129-133]. Същевременно, литературната справка показва, че за много гъбни видове е характерно съдържанието на противораковото съединение ергостерол (ERG) [155]. За да се изключи възможността от възникването на предизвиквания от IBO и MUS синдром „пантерина-мускария“ [119] при приемането на тоталния етанол екстракт, за който бе установена *in vitro* цитотоксичност, както и за да се провери дали присъствието на ERG не би могло да обясни наблюдавания цитотоксичен противотуморен ефект, бяха проведени експерименти, целящи да установят и околичествят IBO, MUS и ERG във водно-етанолния извлек от *A. muscaria*, за да може от една страна да се прецени дали той крие опасност от невротропно гъбно отравяне, а от друга – да се открие потенциална „активна съставка“, която да обясни наблюдаваните при МТТ тестовите резултати.

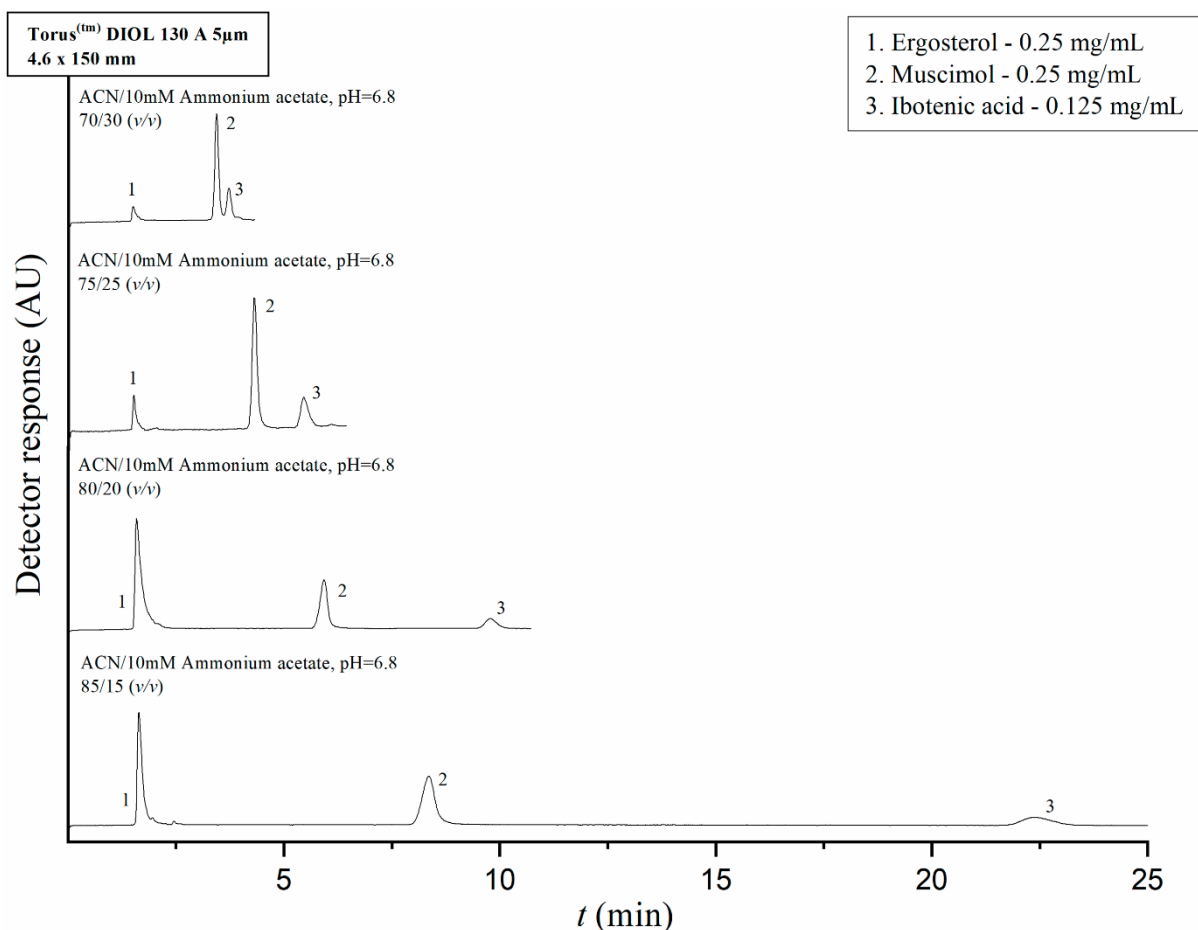
Оптимизация на хроматографския метод за анализ

Параметрите на състава на подвижната фаза и нивото на рН на амониевия ацетат бяха оптимизирани преди анализа на съдържанието на IBO, MUS и ERG в екстрактите и фракциите, за да се осигури най-качествено разделяне на пиковите им. Времето на задържане на чистите съединения в разтвора беше тествано поотделно за всяко едно от тях, като за целта бяха инжектирани стокови разтвори, описани в секция **Материали и методи**. След това, смес от стоковите разтвори на IBO, MUS и ERG в различни съотношения беше инжектирана при различни условия за хроматографски анализ, за да се наблюдава разделянето на пиковите им и да се определят параметрите, най-подходящи за целите на анализа –тип колона, състав на подвижната фаза (обемно съотношение полярен/неполярен разтворител) и нивото на нейното рН.

Първоначално анализирахме задържането и разделянето на IBO и MUS, използвайки обратнофазна и mixed-mode хроматография; тези условия не дадоха задоволителни резултати, тъй като пиковите на съединенията не можеха да бъдат прецизно разделени от пика на мъртвото време. След това задържането и разделянето на IBO и MUS бяха тествани на колона Torus™ Diol 130Å 5 µm 4.6 × 150 mm (Waters Corporation, Milford, MA, USA) – колона, предоставяща условия за хидрофилна интеракция (hydrophilic interaction liquid chromatography, HILIC), подходяща за разделяне на полярни съединения – с подвижна фаза, състояща се от ацетонитрил

и 10 mM разтвор на амониев ацетат с pH 6.8 при различни обемни съотношения. Скоростта на потока беше 1 mL/min. Количествата на инжекция на разтвора на анализите и на маркера на мъртвото време бяха съответно 5 μ L и 20 μ L. При HILIC колоната, пиковите на IBO, MUS и на маркера на мъртвото време бяха достатъчно разделени един от друг. Времето на задържане на ERG също беше тествано на тази колона; анализът се елуираше почти едновременно с маркера на мъртвото време и намаляването на полярността на подвижната фаза не доведе до качествено разделяне на пиковите на ERG и този на мъртвото време.

Накрая беше приготвена смес от трите анализа чрез смесване на 100 μ L от запасния разтвор на ERG с по 50 μ L от запасните разтвори на IBO и MUS, за да се постигне крайна концентрация от 0.25 mg/mL за ERG и IBO и 0.125 mg/mL за MUS. Хроматограмите на разделянето на стандартите при различни състави на подвижната фаза са показани на Фиг.32.



Фиг. 32. Хроматограми на разделянето на стандартите ергостерол, мусцимол и иботенова киселина на колона TorusTM Diol 130Å 5 μ m 4.6 $\times$ 150 mm с подвижна фаза, състояща се от различни изократни v/v съотношения на ацетонитрил и 10 mM амониев ацетат с pH = 6.8 и скорост на потока 1 mL/min. Обемът на инжекцията от смеската стандарти беше 20 μ L; температурата на колоната бе

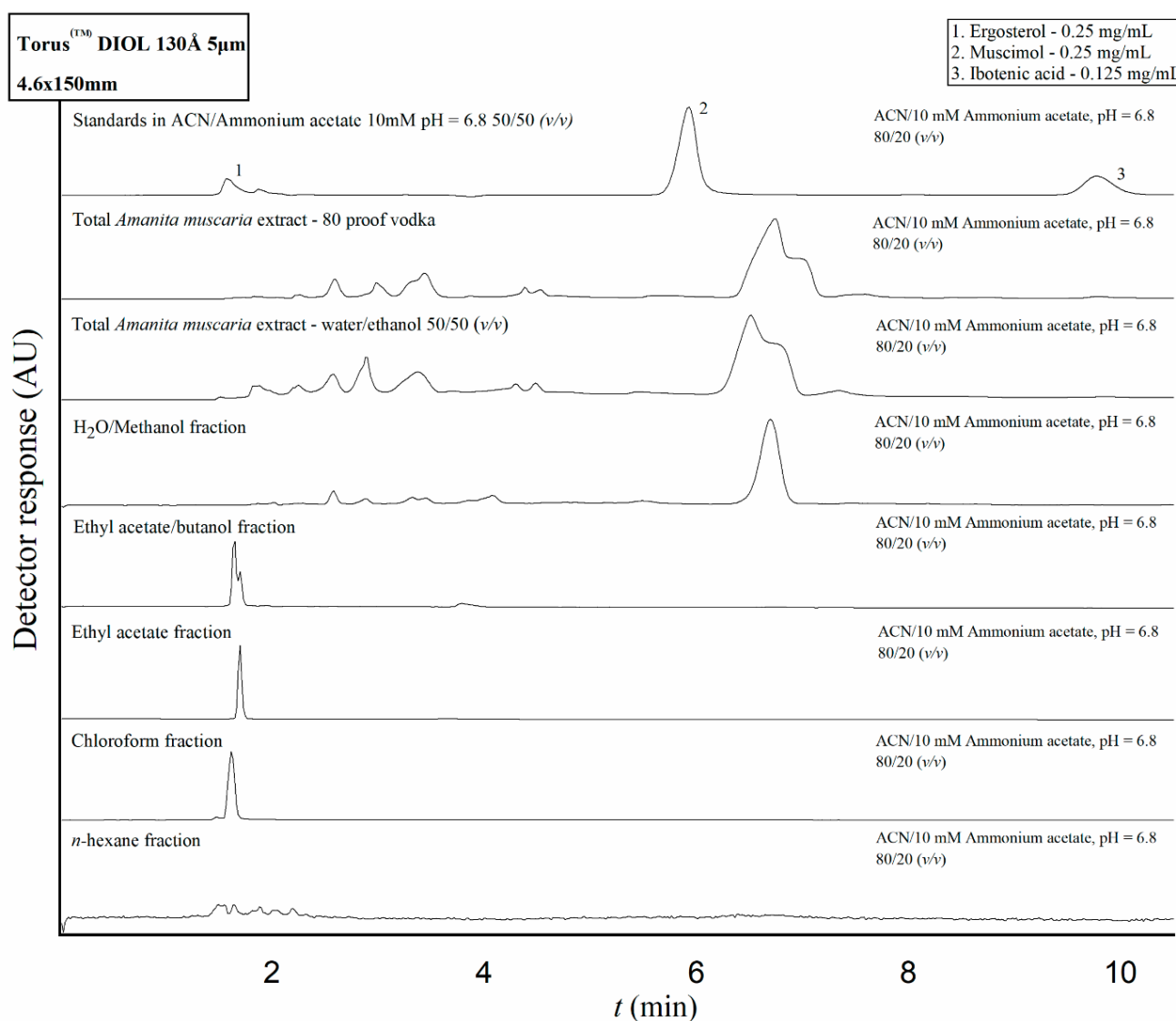
поддържана на 25°C. UV детекцията бе проведена при дължина на вълната 255 nm. Концентрациите на всеки от анализите в сместа са упоменати в панела горе вдясно.

След сравняване на разликите във времената на задържане при различни съотношения на състав на подвижната фаза, съотношение 80/20 (v/v) на ацетонитрил към амониев ацетат беше избрано като подвижна фаза за анализ на съдържанието на IBO и MUS в екстрактите и фракциите от *A. muscaria*. При тези условия ергостеролът се елуира на 1.59 мин, мусцимолът на 5.92 мин, а иботеновата киселина на 9.77 мин. от инжекцията на пробата. UV детекцията беше извършена при дължина на вълната 255 nm.

Разделянето на пиковите на ергостерола и на мъртвото време при тази колона не беше успешно постигнато; поради това, за да се проведе анализ за присъствието му в екстракта беше избрана колона AtlantisTM dC18 (5 µm 4.6 × 150 mm, Waters Corporation, Milford, MA, USA), която е от обратнофазов тип; при колони от този тип, принципът на разделяне се основава на хидрофобни взаимодействия между анализа и стационарната фаза, което позволява постигането на по-добро разделяне на пик на хидрофобно съединение като ERG – молекула, за която се очаква да се задържи силно в такива условия. При инжекция на стандартен разтвор на ергостерол в метанол, описан в секция Материали и методи, в тази колона при условия на подвижна фаза със състав от чист метанол със скорост на потока 1 mL/min, анализът се елуира на минута 7.2 и бе задоволително разделен от пика на мъртвото време. По тази причина, всички анализи за съдържанието на ERG в тестваните екстракти и фракции бяха проведени при гореописаните условия.

Резултати от хроматографския анализ на съдържанието на IBO и MUS в екстракти от *A. muscaria* и фракции от тях

След оптимизирането на хроматографските условия за разделянето на стандартите, тоталните „домашен“ и лабораторно получен екстракти от *A. muscaria*, както и фракциите от втория, бяха инжектирани при вече описаните условия. Хроматограмите, показващи резултатите от детекцията са представени на Фиг. 33.



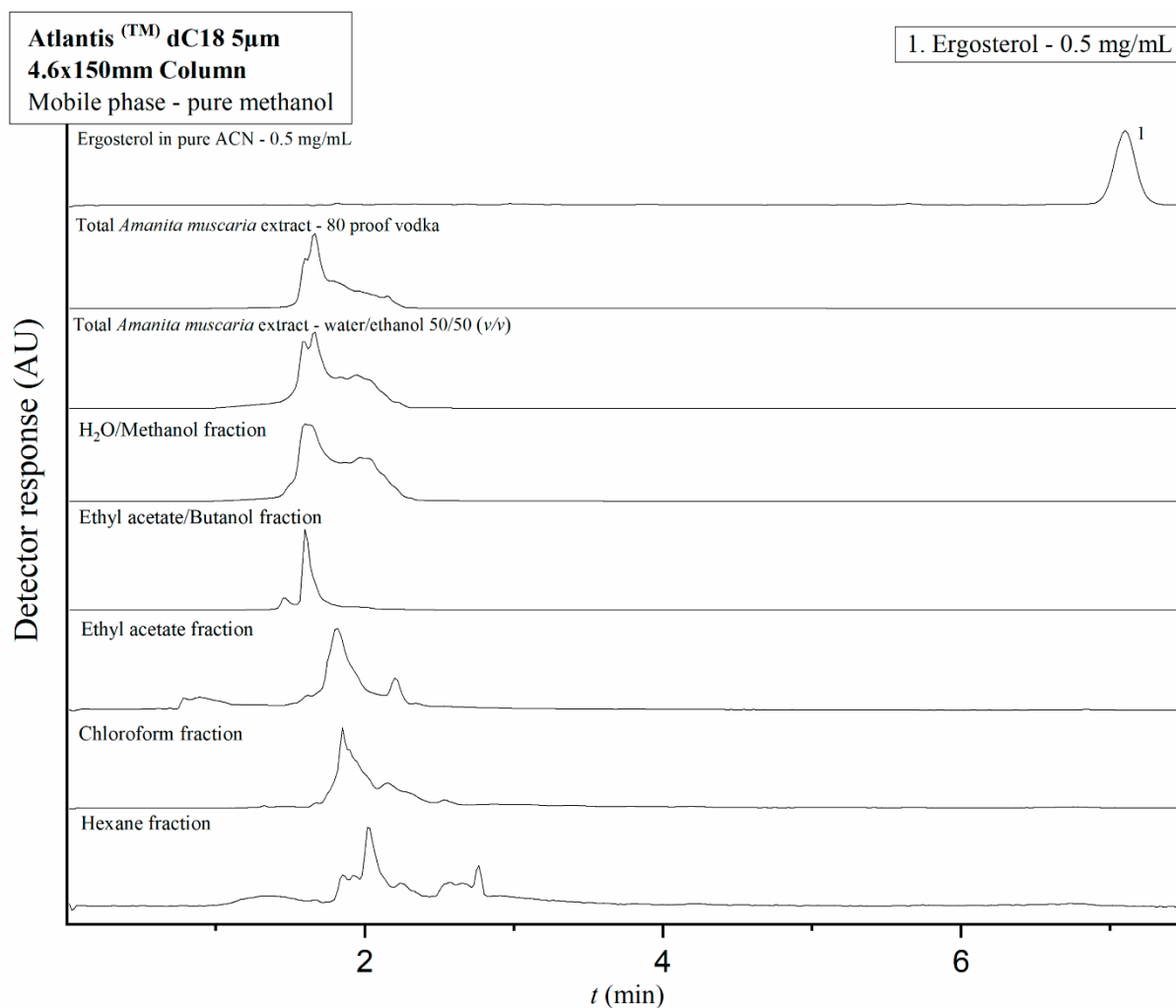
Фиг. 33. Хроматограми на разделянето на стандартите ергостерол (пик 1), мусцимол (пик 2) и иботенова киселина (пик 3) (най-отгоре) и на анализирани тотален извлек от *A. muscaria* с екстрагент водка, тотален извлек от *A. muscaria* с екстрагент 50/50 вода/етанол, и фракции от последния, получени с неполярни разтворители. Разделянето е извършено на колона TorusTM Diol 130Å 5 µm 4.6 × 150 mm – HILIC условия за разделяне на полярни анализи – с подвижна фаза, състояща се от изократно 80/20 v/v съотношение на ацетонитрил и 10 mM амониев ацетат с pH = 6.8 и скорост на потока 1

mL/min. Обемът на инжекцията от сместа стандарти и този на инжекциите на тоталните екстракти беше 20 μ L, а този на респективните фракции – 5 μ L; температурата на колоната бе поддържана на 25°C. UV детекцията бе проведена при дължина на вълната 255 nm. Концентрациите на всеки от анализите в сместа са упоменати в панела горе вдясно.

Видимо е, че при нито един от изследваните тотални екстракти и фракции не се наблюдава наличие на пикове, съвпадащи по време на елуиране с тези, установени за разтворите на чистите анализи. Отсъстват и пикове, които да са близки по време на елуиране с тези, установени за разтворите на стандартите, на които би могло да се припише потенциално маскиране на сигнала на чистите вещества в комплексната смес на тоталния екстракт. Пикът на ERG (означен на фиг. 33 като 1. при изложените на най-горната хроматограма времена на елуиране на стандартните вещества) съвпадна по време на елуиране с пиковете, установени за неполярните разтворители, използвани при получаването на фракциите; тъй като неполярните вещества по правило не се задържат в HILIC колони, съвпадането на пика на стандарта ERG с тези, установени при фракциите при тези условия не бе взето за достоверно сведение за наличието му в изследваните разтвори.

Резултати от хроматографския анализ на съдържанието на ERG в екстракти от *A. muscaria* и фракции от тях

Анализ за наличието на ERG в екстрактите и фракциите бе проведен на обратнофазова колона Atlantis dC18. Хроматограмите, получени в резултат на експеримента са изложени на Фиг. 34.



Фиг. 34. Хроматограми на елуиране и приблизително време на задържане на стандартно вещество ERG (пик 1, най-горе) и на анализирани тотален извлек от *A. muscaria* с екстрагент водка, тотален извлек от *A. muscaria* с екстрагент 50/50 вода/етанол, и фракции от последния, получени с неполярни разтворители. Разделянето е извършено на колона AtlantisTM dC18 5 μ m 4.6 $\times$ 150 mm с подвижна фаза, състояща се от чист метанол и скорост на потока 1 mL/min. Обемът на инжекцията от стандарт ERG и този на инжекциите на тоталните екстракти беше 20 μ L, а този на респективните фракции – 5 μ L; температурата на колоната бе поддържана на 25°C. UV детекцията бе проведена при дължина на вълната 255 nm. Концентрацията на чистото вещество ERG в стандартния разтвор е упомената в панела горе вдясно.

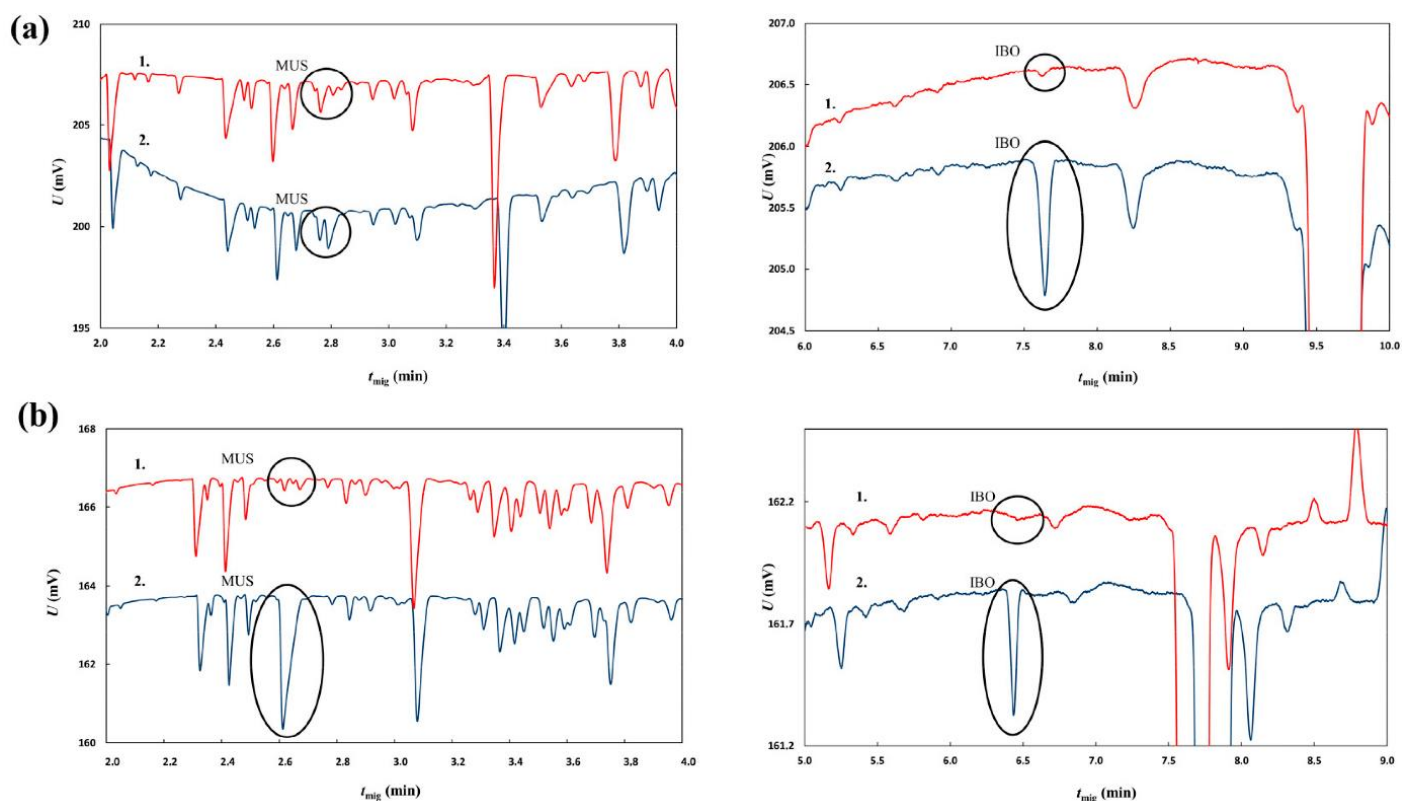
Анализът не показва наличието на пикове, съвпадащи по време за елуиране с този, установен за чистото вещество ERG при описаните условия (Фиг. 34). Пълното отсъствие на сигнал при очакваното време за елуиране при всички тествани екстракти и фракции навярно е индикатор, че приложеният метод за екстракция не е подходящ за извличането на ERG от гъбни дроги, особено предвид ниската разтворимост на съединението във вода и етанол.

Получените резултати дават основание да се смята, че ERG не присъства в този тип екстракт в количества, достатъчни да обусловят значителния цитотоксичен ефект, наблюдаван при МТТ тестовете. Поради пълното отсъствие на сигнал, който да предположи наличието му в екстракта, ERG не беше обект на анализ при по-нататъчните аналитични методи, описани в дисертационния труд.

4.6. CZE/CCD анализ на съдържанието на IBO и MUS в тотален етанолен екстракт от *A. muscaria*

В качеството си на полярни молекули, които подлежат на йонизация, IBO и MUS могат да бъдат разделени чрез капилярна електрофореза. За потвърждение на HPLC резултатите, тоталните извлеци от *A. muscaria* бяха подложени на разделяне чрез капилярна електрофореза с безконтактен капацитивно свързан детектор на проводимостта. За фонов електролит бе използван 1М разтвор на мравчена киселина с $\text{pH} = 1.88$; при тези условия, аминокрупите на двата анализата бяха протонирани, докато карбоксилната група на IBO остава недисоциирана; съответно, и двата анализата са положително заредени и се придвижват в условия на електрично поле.

Съдържанието на MUS и IBO бе анализирано за „домашния“ и лабораторно получения тотален извлек от червена мухоморка. От всеки екстракт бяха взети по две аликвоти; първата бе разрежена с дейонизирана вода (1:1. v/v), а втората бе смесена в същото обемно съотношение с разтвор на IBO и MUS (с концентрации 0.5 mg/mL и 0.35 mg/mL респективно), служейки като контроли. Получените електроферограми са представени на Фиг. 35.



Фиг. 35. Электрофорограми на екстракт от *A. muscaria* с екстрагент водка (горен ред (a)) и на екстракт от *A. muscaria*, получен с екстрагент смес от dH₂O и EtOH (долен ред (b)). От лявата страна на всеки ред са представени пиковите на MUS, а от дясната – на IBO – за съответния извлек. За всеки панел, пробата, разредена с дейонизирана вода (1:1, v/v) е представена на горния сигнал (червено), а тази, обединена със смес от стандарти IBO и MUS (1:1, v/v) и служеща като контрола – на долния сигнал (синьо). На абцисата е представено времето на миграция на анализа през системата, а на ординатата – интензитета на сигнала, представена като спад в електрическия потенциал на течната фаза.

Тъй като присъствието на изследваните анализи предизвиква рязък спад в проводимостта, засечена от електродите, в сравнение с тази на фоновия електролит – 1M разтвор на мравчена киселина – пиковите, установени за анализите, са отрицателни (Фиг. 35). Контролните проби, обогатени с разтвор на анализите показват добре видими пикове (на минута 2.8 за MUS и минута 7.6 за IBO при екстракта, получен с водка, и минута 2.6 за MUS и минута 6.4 за IBO за екстракта, получен в лабораторни условия). Анализите мигрираха по-бавно при инжекция на „домашния“ извлек, отколкото при инжекция на лабораторно получения, което може да се дължи на влияние на разтворителя; въпреки това, при повтаряне на експерименталната процедура, времената на миграция оставаха консистентни за всеки респективен тип извлек.

За пробите, разредени с дейонизирана вода бяха установени значително по-малки пикове, отколкото тези, наблюдавани при контролните проби. При сравнение на площта на пиковите на анализите в пробите, разредени с вода и в тези, разредени с разтвор на IBO и MUS с определена концентрация бяха определени концентрации от 0.07 mg/mL MUS и 0.02 mg/mL IBO за „домашния“ екстракт и 0.02 mg/mL MUS и <0.01 mg/mL IBO за извлека, получен в лабораторни условия.

4.7. UHPLC-MS/MS анализ на съдържанието на IBO и MUS в тотален етанол екстракт от *A. muscaria*

Тъй като резултатите от капилярноелектрофоретичния анализ предполагаха някакво наличие на изследваните алкалоиди в извлека, макар и твърде ниско, за да бъде установено чрез HPLC (фиг.35), за окончателно определяне на количествата IBO и MUS в тоталните етанолни извлеци от *A. muscaria* бе приложен троен квадрупол тандемен масспектрометър с Ultra High Performance течна хроматография (UHPLC-MS/MS). Хроматографските условия, приложени при експеримента бяха същите като тези, описани в **5.5. Хроматографски HPLC анализ на съдържанието на IBO, MUS и ERG в тотален етанол екстракт от *A. muscaria* и фракции, получени от него чрез течна-течна екстракция с неполярни разтворители.** За установяване на оптималните параметри на масспектрометъра, за откриването на анализите бяха тествани както положително-йонния режим, така и отрицателно-йонния.

Разтворите на анализите, подложени на UHPLC-MS/MS анализ бяха същите като тези, приложени при капилярноелектрофоретичния експеримент – от „домашния“ и лабораторно получения извлек бяха взети по две аликвоти, като първата бе разредена с дейонизирана вода, а втората – с вече описана смес от разтвор на чисти IBO и MUS. За детекцията на MUS бе приложен режим на проследяване на позитивни единични йони на m/z 115.30, а на IBO – режим на проследяване на отрицателна избрана реакция, използвайки m/z преход $157.0 > 113.2$ (Q1 предварително отклонение 18.0 V, Q3 предварително отклонение 22.0 V и колизионна енергия 11.0 V. Околичествяването на анализите в пробите бе осъществено чрез метод на стандартно добавяне. Тъй като не бе приложен вътрешен стандарт, околичествяването на пробите бе извършено чрез сравнение на площта на пиковите на анализите, установени в пробата, разредена с вода и в тази, разредена с разтвор на IBO/MUS; поради това, те са приблизителни. Установените стойности на концентрациите на алкалоидите са представени на Табл. X, където са и сравнени с тези, установени при CZE/CCD анализа.

Method Used	Concentration in Extract with Rye Vodka—mg/mL		Concentration in Extract with dH ₂ O/EtOH (50/50 v/v)—mg/mL	
	IBO	MUS	IBO	MUS
CZE/CCD	0.02	0.07	ND *	0.02
LC-MS	0.04	0.02	ND *	0.005

Табл. 4. Сравнение на стойностите на концентрациите на алкалоидите IBO и MUS (mg/mL) в „домашния“ екстракт (вляво) и в лабораторно получения екстракт (вдясно), получени чрез метода CZE/CCD или UHPLC-MS/MS.

Резултатите от провеждането на експерименти с прилагане на всички описани аналитични методи – HPLC, CZE/CCD и UHPLC-MS/MS – сочат, че нито екстракцията на дрога от шапки на *A. muscaria* с дестилирана вода и етанол, нито „домашният“ метод на тинктуриране с водка водят до продукт, който е особено богат на IBO, MUS или ERG.

Известно е, че IBO и MUS са алкалоиди с невротропно действие върху човешкия организъм; поради това, те трябва да бъдат строго контролирани като потенциални нежелани елементи в екстракт с предполагаемо терапевтично действие. С оглед установените минимални психоактивни дози за IBO и MUS [12, 13], резултатите от анализа, представен в дисертационния труд навяват на мисълта, че приемането на етанолен извлек от *A. muscaria* в количествата, сочени като благоприятни за преодоляването на ракови заболявания [14] не могат да предизвикат симптоми на невротропно гъбно отравяне. Въпреки това, изследвания, касаещи наличието на потенциална хронична токсичност, до която може да доведе приемането на ниски количества от изследваните алкалоиди за по-дълги периоди от време, все още не са провеждани.

Въпреки, че ERG е съединение с добре известни противоракови свойства, наличието му в екстракт, получен чрез прилагане на етанолов разтвор е слабо вероятно. Резултатите от аналитичните методи, описани в настоящата работа не позволяват да се състави хипотеза, че съединението е отговорно за наблюдаваната при MTT теста цитотоксичност.

Резултатите от проведените аналитични експерименти позволяват да се направят два извода; от една страна, ERG не присъства в количества, достатъчни, за да се предполага, че противораковият цитотоксичен ефект на екстрактите от *A. muscaria* се дължи на присъствието му; от друга страна, отсъствието на алкалоидите IBO и MUS във водно-етанолния извлек от гъбата дава основание да се счита, че приемането на екстракта не би могло да доведе до нежелани психоактивни ефекти, както и, че алкалоидите също не участват в механизма зад наблюдаваната цитотоксичност. Установените нищожни количества алкалоиди в екстракта дадоха основание да се продължи работа по изясняване на механизмите зад цитотоксичния

ефект, тъй като опасенията, че той може да е свързан с потенциално опасни невроактивни съединения отпадат; става ясно, че риск от нежелана психоактивна реакция при приемането на екстракта фактически не фигурира като вероятност.

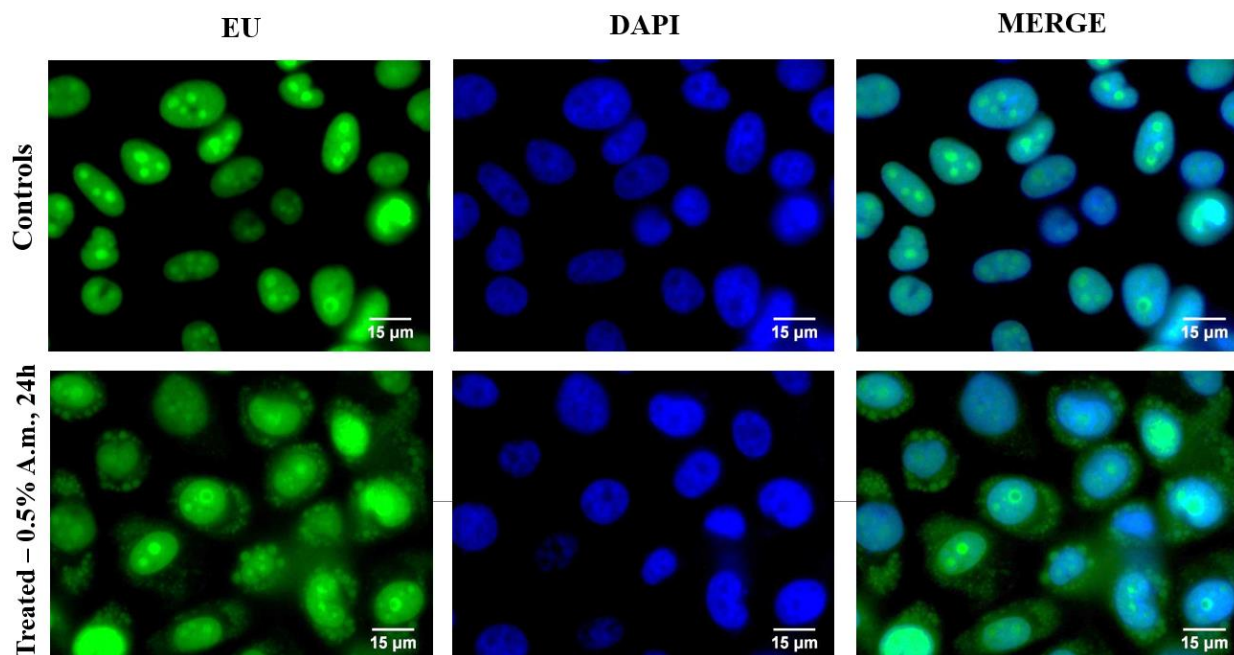
4.8. Изследване на влиянието на екстракта от *A. muscaria* върху синтезата на РНК при третиране с него на клетъчни култури *in vitro*

Както вече беше отбелязано, съдържанието на аматоксини в *A. muscaria* в сравнение с това в еволюционно и родствено близката до нея *A. phalloides* (позната като най-отровната гъба в Европа), както и с това, установено при множество ядливи видове гъби (изразено в нанограми аматоксини за грам прясна гъбна маса), е значително ниско. Аматоксините са съединения с изключително висока цитотоксичност, дължаща се на свойството им да инхибират действието на РНК полимеразата II и III; поради това е уместно да се предполага, че дори присъствието на ниски количества от тях би могло да окаже видим ефект върху жизнеспособността на изследваните клетки.

За разлика от РНК полимеразата I, при която се наблюдава пълно отсъствие на чувствителност към аманитин, както и от РНК полимеразата III, която проявява частична чувствителност към инхибиране от същия, РНК полимеразата II подлежи на пълно инхибиране и е най-чувствителна. За РНК полимеразата II и III се знае, че се намират в нуклеоплазмата на клетъчното ядро (РНК полимеразата I се открива в ядрцето). Въпреки това е установено, че хепатоцити, третирани с α -аманитин претърпяват промени в морфологията на ядрцата си [15]; поради това, пораждането на такива при третиране на клетъчна култура с екстракт от *A. muscaria* би могло да бъде признак за наличието на аманитини.

За да се провери дали екстрактът въздейства върху морфологията на ядрцата или предизвиква други видими промени в РНК синтезата при третиране с него на клетъчни култури *in vitro* – например натрупване на РНК агрегати – клетки от линията РС3 бяха отгледани в среда, суплементирана със съединението 5-етинилуридин (EU) – нуклеозиден аналог на азотната база уридин, който притежава флуоресцентна активност, видима след фиксиране на клетките и подлагането им на т.нар. click-chemistry реакция – и инкубирани с количество от екстракта от *A. muscaria*, близко до установените IC₅₀ стойности, за 24 часа, за да се избегне смъртта на твърде много от клетките преди да настъпят потенциални промени в синтезата на РНК, които да се проследят. При присъствието на достатъчно високи количества EU в средата, използвана при отглеждането на клетките, той се включва в новосинтезираната

РНК, при което тя може да бъде визуализирана под флуоресцентен микроскоп. Флуоресцентните микроскопски снимки са представени на Фиг. 36.



Фиг. 36. Горен ред – контролна популация клетки от линията PC3, третиран с EU; отляво надясно – сигнал EU, сигнал DAPI и комбинация от сигналите на EU и DAPI. Долен ред – Клетки от линията PC3, третиран с екстракт от *A. muscaria* в концентрация от 0.5% за 24ч., след което третиран с EU. отляво надясно – сигнал EU, сигнал DAPI и комбинация от сигналите на EU и DAPI. Увеличение – 63x, заснето с микроскоп Zeiss Axiovert 200M с камера AxioCam MRm CCD

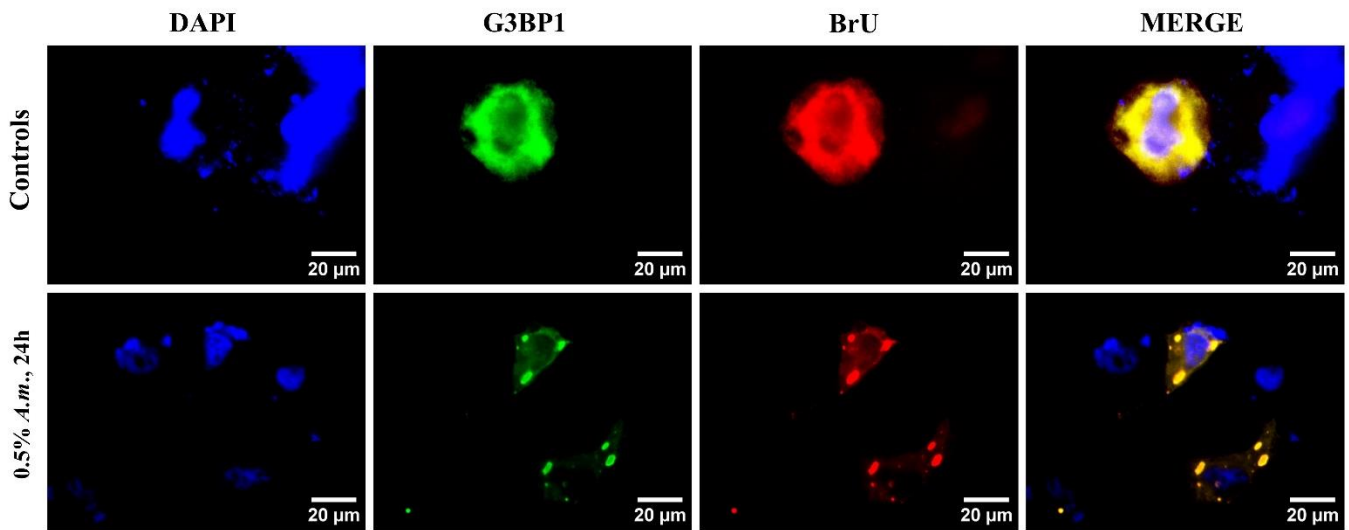
На получените микроскопски снимки не се забелязва видима промяна в ядрцевата морфология; отсъстват и видими натрупвания на РНК в рамките на клетъчните ядра. За сметка на това, в цитоплазмата на третираните клетки са ясно видими големи натрупвания от новосинтезирана РНК. Такава РНК се открива и в ядрата им, но там присъствието ѝ не е неочаквано; клетъчното ядро е мястото, на което протича процесът транскрипция. Наличието на агрегати от новосинтезирана РНК в цитоплазмата на клетките е явление, нетипично за нетретираните ракови клетки, както е видимо и при визуално сравнение на контролните клетъчни популации с тези, третиран с 0.25% екстракт от *A. muscaria*.

4.9. Идентифициране на наблюдаваните РНК агрегати като нуклеопротеинови стрес-гранули

Наблюдаваните на фиг.36 новосинтезирани РНК агрегати, получени в следствие на третирането на РС3 клетки с извлек от *A. muscaria* представляваха интерес, тъй като появата им в цитоплазмата, а не в ядрото се различава от очакваните наблюдения, че подобен тип белег за възпрепятствана транскрипция ще се наблюдава в ядрото. Високата цитотоксичност на екстракта даде основание да се смята, че в неговото присъствие клетките навярно се намират под някакъв вид клетъчен стрес; в допълнение, преглед на литературните данни показва, че нуклеопротеиновите стрес-гранули (SGs) са белег за такъв. Фактът, че последните по правило се откриват в цитоплазмата, съвпада с първоначалното наблюдение относно разположението на установените РНК агрегати при линията РС3. Тези данни позволиха да се състави хипотезата, че агрегатите са именно SGs.

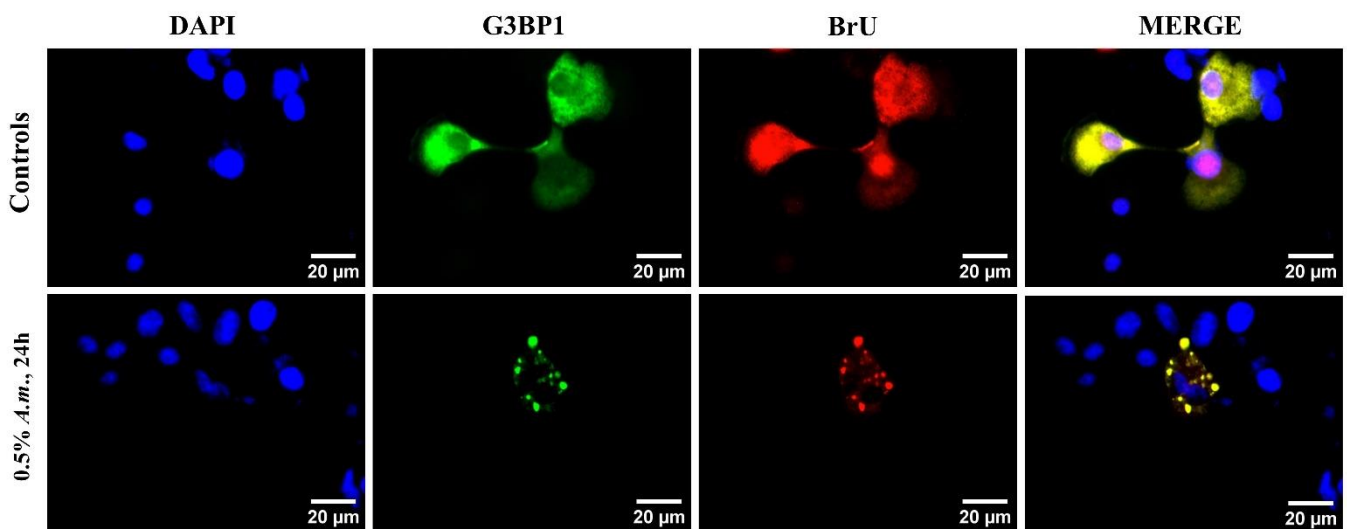
За да потвърдим дали наблюдаваните РНК агрегати са SGs или не, ние приложихме имунофлуоресцентен подход, който разчиташе на присъствието на белтъка G3BP1 в състава на нуклеопротеиновите стрес-гранули. Посредством техники за плазмидна трансфекция в клетки от линиите A549 и H1299 бяха привнесени плазмидни ДНК молекули, кодиращи белтъчен продукт G3BP1, ковалентно слят с флуоресцентен FLAG-таг. По този начин натрупването на белтъка G3BP1 (или отсъствието на такова) може да бъде проследено чрез флуоресцентна микроскопия. Евентуална ко-локализация на натрупването на РНК в цитоплазмата на третираните клетки с натрупване на големи количества G3BP1 би могла да послужи като основание наблюдаваните на фиг. 36 РНК агрегати да се определят като нуклеопротеинови стрес-гранули. При този експеримент, за белязване на новосинтезирана РНК беше използвано съединението бромоуридин (BrU) – уридинов аналог, който подлежи на имунофлуоресцентна визуализация с подходящи антитела.

H1299



Фиг. 37. Клетки от линията H1299, белязани с бромоеуридин за новосинтезирана РНК и експресиращи FLAG таг-слята форма на белтъка G3BP1 (визуализирани чрез свързване на анти-BrU и anti-FLAG антитела респективно). Горен ред – контролни, нетретирани клетки; долен ред – клетки, третирани с 0.5% (v/v) концентрация на лабораторно получен екстракт от *A. muscaria* за 24ч. И при двата реда, на първата снимка е изобразен сигналът от боята DAPI, на втората – зелен сигнал от белтъка G3BP1, на третата – новосинтезирана РНК, включила BrU, а на четвъртата – съвкупност от всички сигнали. На долния ред при последното изображение е видима ко-локализацията на сигнала на G3BP1 с тази на местата на натрупване на BrU, които са в цитоплазмата. Увеличение – 63x, заснето на Zeiss Axiovert 200M с камера AxioCam MRm CCD.

A549



Фиг. 38. Клетки от линията A549, белязани с бромоеуридин за новосинтезирана РНК и експресиращи FLAG таг-слята форма на белтъка G3BP1 (визуализирани чрез свързване на анти-BrU и

anti-FLAG антитета респективно). Горен ред – контролни, нетретираны клетки; долен ред – клетки, третирани с 0.5% (v/v) концентрация на лабораторно получен екстракт от *A. muscaria* за 24ч. И при двата реда, на първата снимка е изобразен сигналыт от боята DAPI, на втората – зелен сигнал от белтъка G3BP1, на третата – новосинтезирана РНК, включила BrU, а на четвъртата – съвкупност от всички сигнали. На долния ред при последното изображение е видима ко-локализацията на сигнала на G3BP1 с тази на местата на натрупване на BrU, които са в цитоплазмата. Увеличение – 63х, заснето на Zeiss Axiovert 200M с камера AxioCam MRm CCD.

И при двете изследвани линии от белодробни ракови клетъчни култури се наблюдава възникването на ясно изразени цитоплазмени РНК агрегати, чиято локация съвпада напълно със сигнала, получен от FLAG-белязания белтък G3BP1. Тези наблюдения дават основание да се смята, че клетките от линиите A549 и H1299 образуват цитоплазмени SGs при третиране с количества етанол извлек от червена мухоморка, близки до неговата IC₂₅ стойност. Наблюдава се и неравномерно разпределение на сигнала на BrU, като при контролните клетки той е много по-равномерно разпределен в цитоплазмата, докато при третираните се наблюдава склонността му към натрупване на местата на цитоплазмените РНК агрегати. Това неравномерно разпределение на РНК, както и самото наличие на стрес-гранули говори за намалена транскрипционна активност при изследваните линии [16].

Провеждането на изследване, целящо да установи сигнализацията, водеща до възникването на SGs в цитоплазмата на третираните белодробни клетъчни линии може да хвърли светлина върху характера на гранулите, които могат да бъдат канонични или неканонични [17]; механизмът на образуването на едните и другите SGs се различава и изясняването му може да хвърли светлина върху по-широката клетъчна сигнализация, активирана при третиране с етанол извлек от червена мухоморка.

4.10. Изследване на влиянието на екстракта от *A. muscaria* върху деленето на клетки от линиите H1299, A549 и PC3 in vitro чрез третиране с 5-етинил-2'-дезоксиуридин

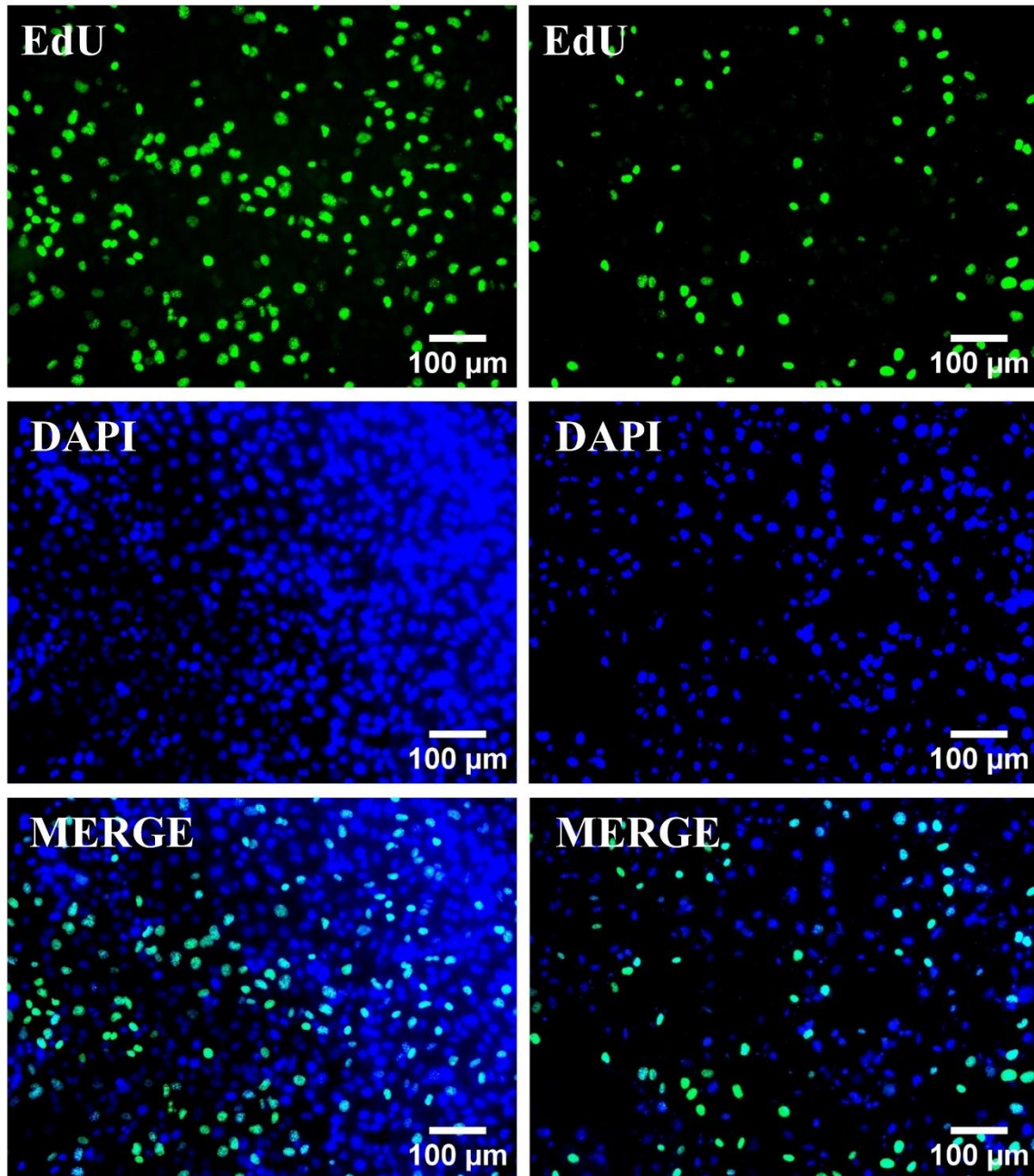
5-етинил-2'-дезоксиуридинът (EdU) е нуклеотиден аналог, който, подобно на EU, подлежи на флуоресцентна визуализация посредством click-chemistry реакции; за разлика от EU, EdU се включва не в РНК, а в новосинтезираната ДНК на клетките, третирани с него, с други думи – в ДНК, синтезирана от клетките след добавянето му към средата им за култивиране. Поради тези си свойства, EdU може да послужи като инструмент за визуализация на броя S-фазни (активно делящи се) клетки, които дават зелен флуоресцентен сигнал.

С цел установяване на наличието на потенциален цитостатичен ефект, оказван от екстракта от *A. muscaria*, бяха проведени експерименти, при които клетъчни култури от белодробните ракови линии H1299 и A549 и култура от линията рак на простатата PC3 бяха третирани с него (в количества отговарящи на установените IC₅₀ стойности) и отгледани съвместно с контролни клетки от същите линии. След това всички линии бяха третирани с EdU, визуализирани и заснети на флуоресцентен микроскоп Zeiss Axiovert 200M с камера AxioCam MRm CCD. Снимките бяха анализирани чрез програмата CellProfiler, с чиято помощ бяха изброени ядра, излъчващи зелен сигнал; бройката беше съпоставена с общия брой ядра в зрителното поле (оцветени с DAPI) и представена в графичен вид за всяка изследвана линия. Микроскопските снимки и графичният анализ на количествата ядра с наличен зелен сигнал, съпоставени с цялата бройка, за всяка линия са изложени респективно на фиг. 39 и фиг. 40 (H1299), фиг. 41 и фиг. 42 (A549) и фиг. 43 и фиг. 44 (PC3).

H1299

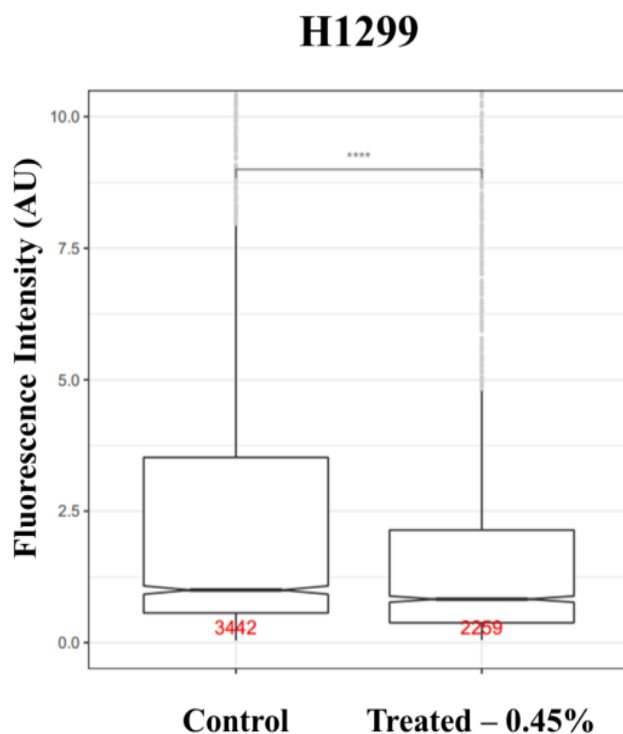
A - Control

B - 0.9% *A.m.*, 48h



Фиг. 39. Колона А: контролни клетки от линията H1299, култивирани в чиста клетъчна среда за 48ч. и инкубирани с EdU; колона В – клетки от линията H1299, третирани с екстракт от *A. muscaria* (концентрация 0.9% v/v екстракт/среда за култивиране) за 48ч. и впоследствие инкубирани с EdU. Всички снимки в респективните колони са правени от една и съща позиция на микроскопа; на първият ред е отчетен сигналът на клетъчните ядра, включили EdU (делящи се клетки), на втория ред е

изобразено тоталното количество живи клетки чрез сигнала на боята DAPI в ядрата (както делящи се, така и неделящи се), а на третия – съвкупността от двата сигнала. Увеличение 10х, заснето на Zeiss Axiovert 200M с камера AxioCam MRm CCD.



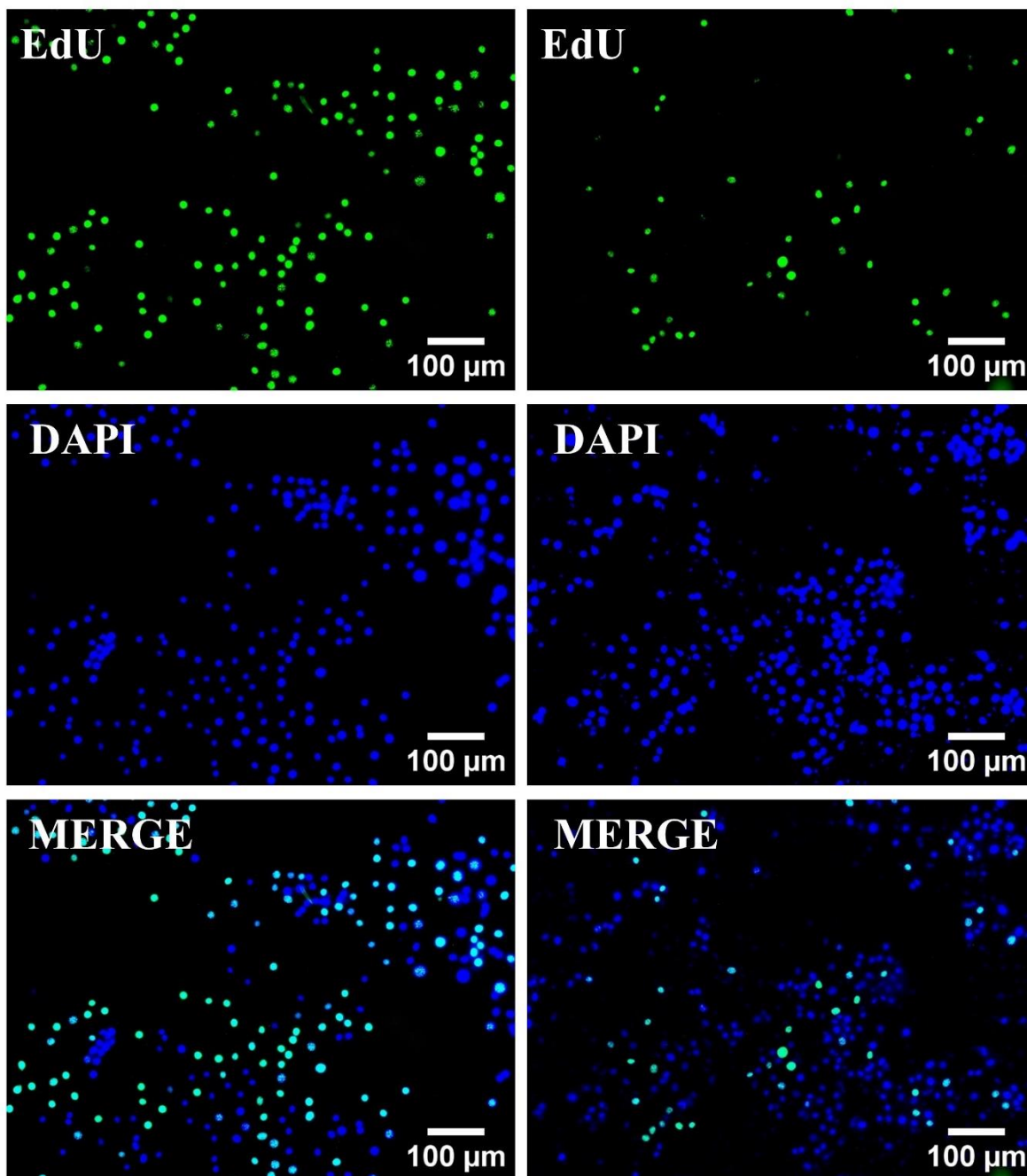
Фиг. 40. Анализ на снимките от фиг. 39 на линията H1299, извършен на софтуер CellProfiler и RStudio. Цифрите в червено съответстват на броя анализирани клетки за съответното условие, включително и тези, които не са включили EdU и не излъчват зелен сигнал; размерът на кутиите показва количеството клетки, при които се наблюдава зелен флуоресцентен сигнал (S-фазни, делящи се клетки).

На Фиг. 39. е видима изразена разлика в броя на клетките, включили EdU в ядрата си след третиране с 0.9% *A. muscaria* за 48ч. в сравнение с контролните клетки, отглеждани в култура за същото време и при същите останали условия. Статистическият анализ (Фиг. 40.) потвърждава, че намаляването на количеството установени чрез EdU-включване S-фазни клетки е статистически значимо.

A549

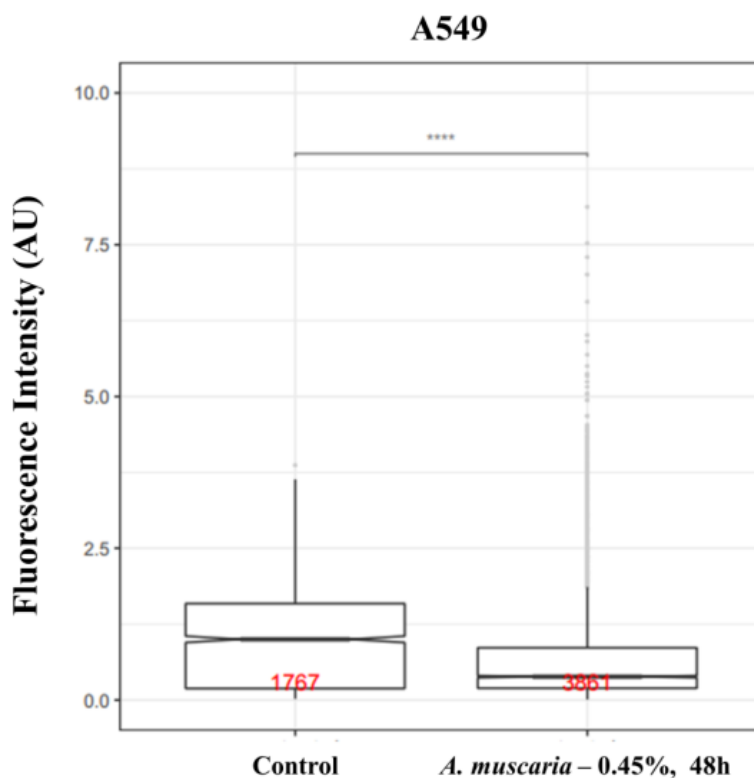
A - Control

B - 0.9% *A.m.*, 48h



Фиг. 41. Колона А: контролни клетки от линията А549, култивирани в чиста клетъчна среда за 48ч. и инкубирани с EdU; колона В – клетки от линията А549, третирани с екстракт от *A. muscaria* (концентрация 0.9% v/v екстракт/среда за култивиране) за 48ч. и впоследствие инкубирани с EdU. Всички снимки в респективните колони са правени от една и съща позиция на микроскопа; на първият

ред е отчетен сигналът на клетъчните ядра, включили EdU (делящи се клетки), на втория ред е изобразено totalното количество живи клетки чрез сигнала на боята DAPI в ядрата (както делящи се, така и неделящи се), а на третия – съвкупността от двата сигнала. Увеличение 10х, заснето на Zeiss Axiovert 200M с камера AxioCam MRm CCD.



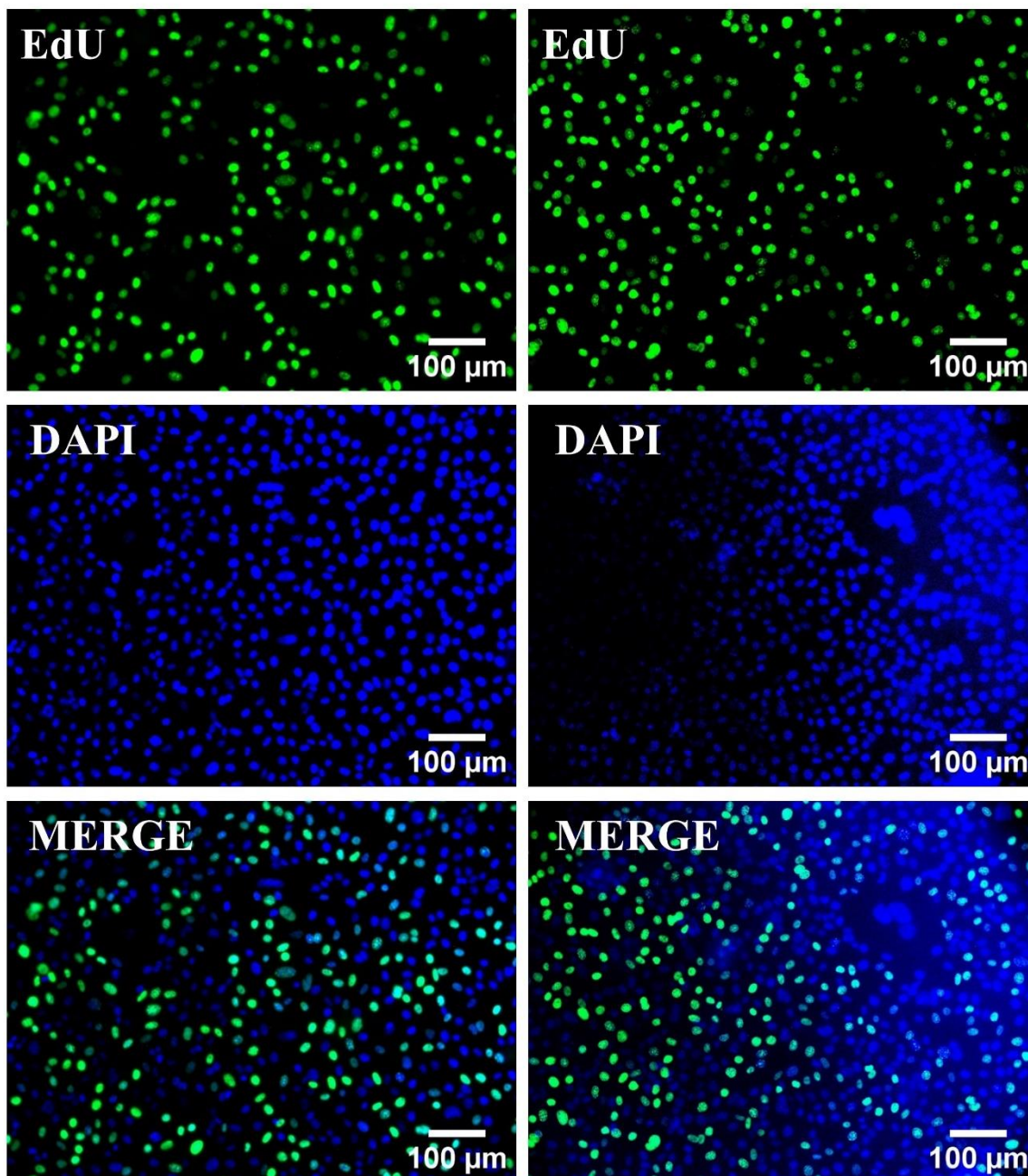
Фиг. 42. Анализ на снимките от фиг. 41 на линията A549, извършен на софтуер CellProfiler и RStudio. Цифрите в червено съответстват на броя анализирани клетки за съответното условие, включително и тези, които не са включили EdU и не излъчват зелен сигнал; размерът на кутиите показва количеството клетки, при които се наблюдава зелен флуоресцентен сигнал (S-фазни, делящи се клетки).

Резултатите, установени за линията A549 също показват видим (фиг. 41.) и статистически значим (фиг. 42.) спад в количеството S-фазни клетки в третираната култура в сравнение с контролната. Данните сочат, че при A549 този спад е по-застъпен, отколкото при H1299. Докато A549 са клетки, запазили черти, присъщи за епителен клетъчен тип, при H1299 се наблюдават повече мезенхимни характеристики, например намалени количества е-кадхерин [18, 19]; тези разлики, в комбинация с характерните за H1299 отсъствие на активен p53 и завишена резистентност към други химиотерапевтици [20] биха могли да обяснят по-високата пролиферативна активност на втората линия [21] и по-слабия ефект на извлека върху нея.

PC3

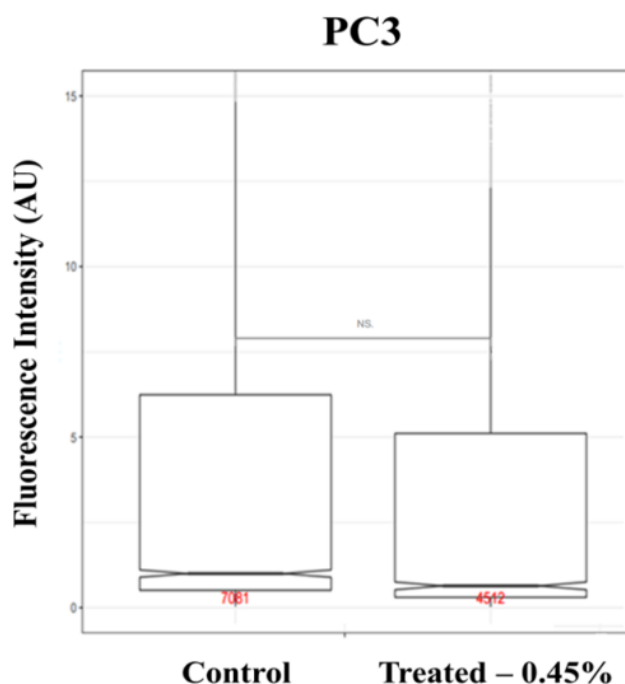
A - Control

B - 0.9% *A.m.*, 48h



Фиг. 43. Колона А: контролни клетки от линията PC3, култивирани в чиста клетъчна среда за 48ч. и инкубирани с EdU; колона В – клетки от линията PC3, третирани с екстракт от *A. muscaria* (концентрация 0.9% v/v екстракт/среда за култивиране) за 48ч. и впоследствие инкубирани с EdU. Всички снимки в респективните колони са правени от една и съща позиция на микроскопа; на първият

ред е отчетен сигналът на клетъчните ядра, включили EdU (делящи се клетки), на втория ред е изобразено тоталното количество живи клетки чрез сигнала на боята DAPI в ядрата (както делящи се, така и неделящи се), а на третия – съвкупността от двата сигнала. Увеличение 10х, заснето на Zeiss Axiovert 200M с камера AxioCam MRm CCD.



Фиг. 44. Анализ на снимките от фиг. 43 на линията PC3, извършен на софтуер CellProfiler и RStudio. Цифрите в червено съответстват на броя анализирани клетки за съответното условие, включително и тези, които не са включили EdU и не излъчват зелен сигнал; размерът на кутиите показва количеството клетки, при които се наблюдава зелен флуоресцентен сигнал (S-фазни, делящи се клетки).

Анализът на броя S-фазни клетки при наличие и отсъствие на екстракт от *A. muscaria* в средата на клетки от линията PC3 показва, че третирането не довежда до видим или статистически значим спад в броя на ядрата, излъчващи зелен сигнал (фиг 43, 44). Линията PC3 притежава завишен метастатичен потенциал в сравнение с други клетъчни линии, произхождащи от рак на простатата [22]; наблюдението, че пролиферацията не намалява видимо при третиране с екстракт в дози, близки до установените IC₅₀ стойности за линията съвпада със сведения, че извлекът не благоприятства прогнозата на пациенти, страдащи от рак на простатата [23].

4.11. Изследване на влиянието на екстракта от *A. muscaria* върху фосфорилирането на хистонов вариант H2AX при линия PC3

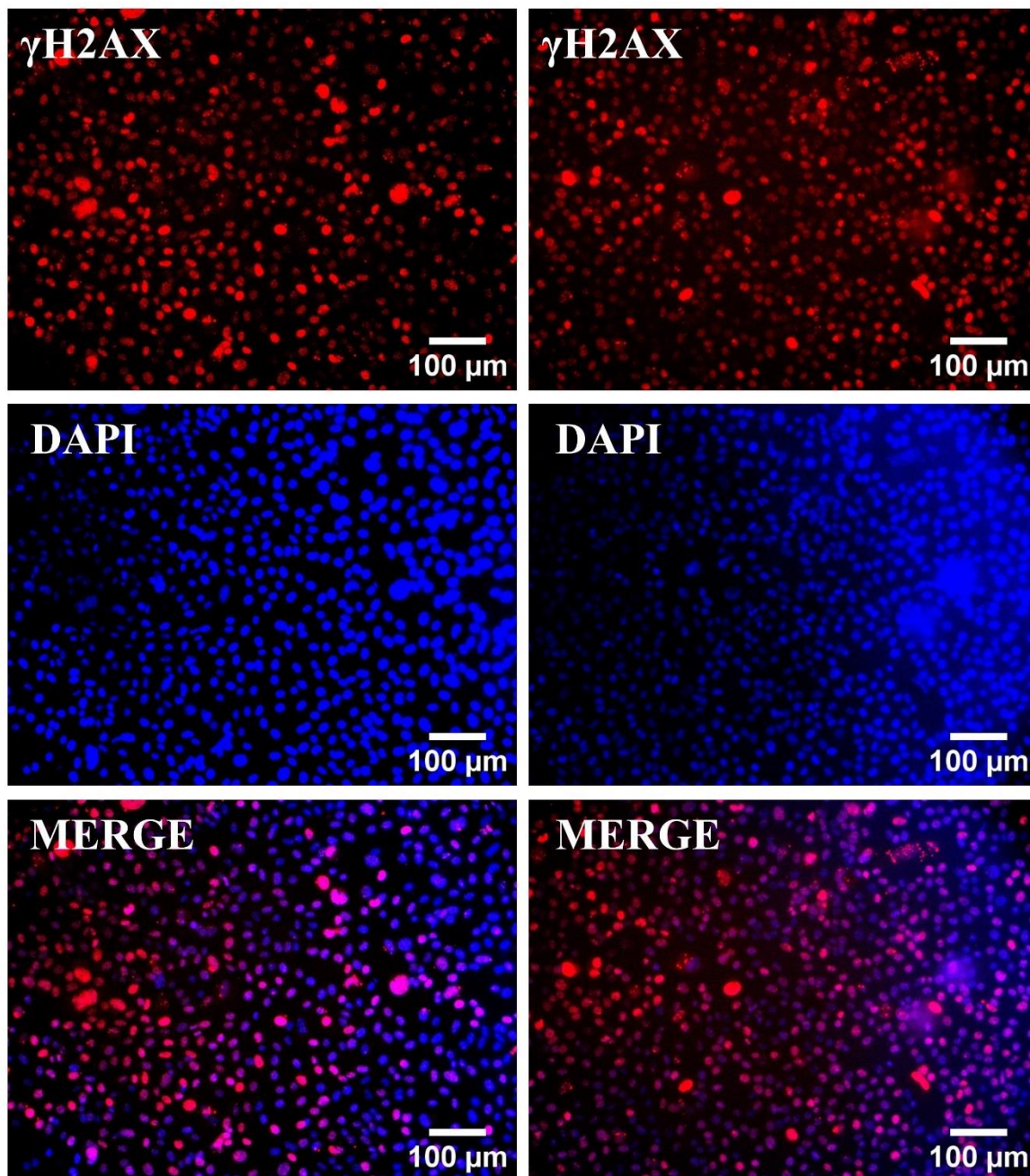
Установихме високата цитотоксичност на екстракта от *A. muscaria* върху клетки от линията PC3 (Фиг. 31), както и привидно заниженото влияние при третиране на същата с извлек върху количеството S-фазни клетки (Фиг. 43, 44). Това даде основание да се проведе експеримент, имащ за цел установяване на промяна в количеството фосфорилиран хистонов вариант H2AX (известен като γ H2AX) в ядрата на третирани клетки.

Увеличение на количествата γ H2AX в ядрата може да е белег за наличие на двойноверижни скъсвания в ДНК; в контекста на проучванията, обект на дисертационния труд, то може да послужи и като насока за изясняване на механизма на цитотоксичност на извлек върху клетъчните култури. Клетки от линията PC3 бяха третирани с количества екстракт от *A. muscaria*, близки до установените IC₅₀ стойности за 48ч., след което обработени съгласно описания протокол за подготовка на препарати за имунофлуоресцентен анализ и третирани с антитяло срещу γ H2AX. Резултатите от експеримента бяха заснети на микроскоп Zeiss Axiovert 200M с камера AxioCam MRm CCD (фиг. 45) и анализирани посредством CellProfiler (фиг. 46).

PC3

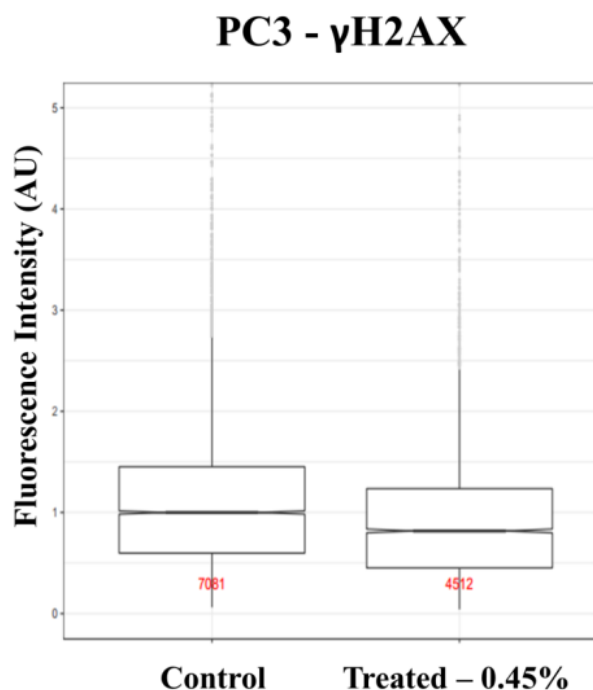
A - Control

B - 0.9% *A.m.*, 48h



Фиг. 45. Колона А – контролни клетки от линията PC3, култивирани в чиста клетъчна среда за 48ч.; колона В – клетки от линията PC3, третиран с лабораторно получен екстракт от *A. muscaria* (в концентрация от 0.9% v/v екстракт/среда за култивиране) за 48ч. След изтичане на времето за третиране, от културите бяха приготвени препарати за имунофлуоресцентна визуализация на γ H2AX чрез свързване с него на специфично антитяло. На най-горната

микроскопска снимка и при двете колони е изобразен червеният сигнал на фосфорилираната форма на H2AX; на средната отгоре надолу – синият сигнал на боята DAPI, най-отдолу – съвкупност от двата сигнала. Увеличение 10х, заснето на Zeiss Axiovert 200M с камера AxioCam MRm CCD.

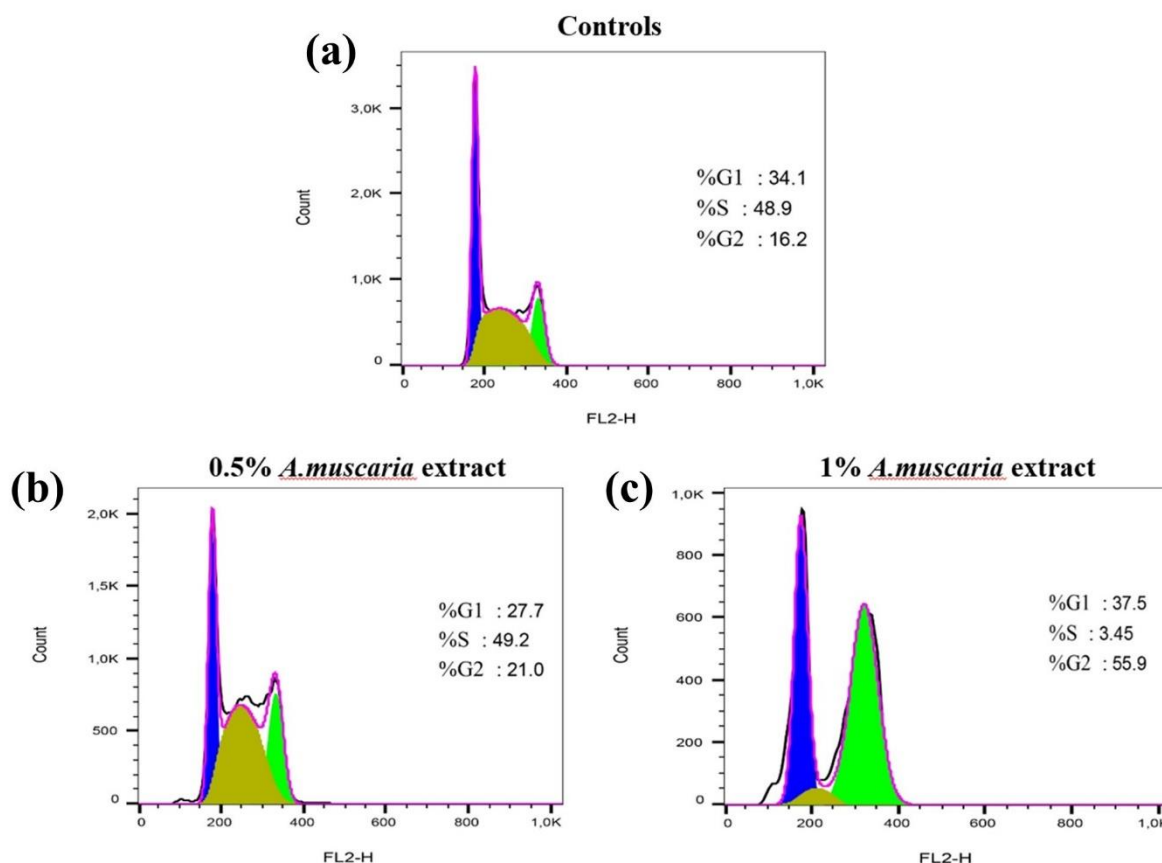


Фиг. 46. Анализ на снимките от фиг. 45 на линията PC3, извършен на софтуер CellProfiler и RStudio. Цифрите в червено съответстват на броя анализирани клетки за съответното условие, включително и тези, които не са включили EdU и не излъчват зелен сигнал; размерът на кутиите показва количеството клетки, при които се наблюдава червен флуоресцентен сигнал – белег за наличието на γ H2AX.

Резултатите от експеримента показват, че не се наблюдава статистически значима разлика между количествата фосфорилиран хистонов вариант H2AX при третираните и контролните клетки (Фиг. 45, фиг. 46). Този резултат предполага възможността наблюдаваната цитотоксичност (Фиг. 31) да не е в резултат на двойноверижни ДНК скъсвания, а отсъствието им да е свързано със способността им да запазват своята пролиферативна активност.

4.12. Анализ на клетъчния цикъл при белодробна ракова линия A549 след третиране с екстракт от *A. muscaria*

Резултатите от анализа на клетъчния цикъл за клетки от линията A549, третирани с 0.5% и 1% обемни концентрации на лабораторно получен *A. muscaria* екстракт в сравнение с контролни клетки от същата линия е представен под формата на панел хистограми (Фиг. 47.).



Фиг. 47. Хистограми, изобразяващи броя клетки, намиращи се в различен етап от клетъчния цикъл при (a) контролни клетки от линията A549, при (b) клетки от същата линия, третирани с лабораторно получен екстракт от *A. muscaria* в концентрация от 0.5% (v/v екстракт/среда за култивиране) за 24ч. и при (c) клетки от същата линия, третирани с концентрация от 1% (v/v екстракт/среда за култивиране) лабораторно получен екстракт от *A. muscaria* за 24ч. Данните са резултат от анализ на три независими експеримента. На хистограмите са показани процентите клетки от дадената популация, които се намират във фази G1, S или G2 от клетъчния си цикъл.

Анализираната контролна клетъчна популация (Фиг. 47, (a)) демонстрира типична за нетретираните A549 клетки картина на клетъчния цикъл – 34.1% от клетките са във фаза G1, 48.9% - в S-фаза (активно делищи се), 16.2% - във фаза G2. При третиране с 0.5% обемна концентрация на алкохолен извлек от *A. muscaria* за 24ч., 27.7% от клетките са във фаза G1, 49.2% - в S-фаза и 21.0% - във фаза G2 (Фиг. 47, (b)). При третиране на клетките с 1% обемна концентрация извлек от червена мухоморка, 37.5% от клетките са във фаза G1, 3.45% - в S-фаза и 55.9% - във фаза G2 (Фиг. 47, (c)).

Резултатите от експеримента са в съгласие с наблюдавания спад в S-фазните клетки от линията A549, описан в контекста на експериментите с включване на EdU при третиране с извлек от червена мухоморка. На Фиг. 47, (c) се вижда драстично заниженото количество S-фазни клетки в популацията при третиране с концентрация, близка до установената IC₅₀ стойност за клетъчната линия. Този цитостатичен ефект на екстракта, в комбинация с установеното му вече свойство да индуцира образуването на нуклеопротеинови стрес-гранули в тази клетъчна линия позволява да се предполага, че присъствието му в средата на клетките ги поставя в състояние на силен стрес, намалявайки репликацията и транскрипцията. Би било меродавно да се установи дали това се дължи на едно или няколко от компонентните му съединения. Към момента, основавайки се на данните, описани в настоящия дисертационен труд може да се предположи, че тези ефекти не се дължат на ERG, IBO или MUS с оглед ниските установени концентрации на същите в етанолния извлек от червена мухоморка.

5. Изводи

- * Изследваните дървесни гъби показват различна степен на цитотоксичност, като най-силно изразен ефект притежават водният и етаноловият екстракт от *Fomitopsis betulina*. Смесването на воден и етанолов екстракт не води до повишаване на цитотоксичния ефект при нито един от изследваните видове.
- * Етаноловите екстракти от *A. muscaria* не съдържат значителни количества от невроактивните алкалоиди иботенова киселина и мусцимол.
- * В екстрактите не е установено наличие на противораковия компонент ергостерол, съдържащ се в клетъчните стени на гъбите.
- * Етаноловият екстракт от *A. muscaria* проявява значителна цитотоксичност срещу клетъчни култури от рак на бял дроб и рак на простата, дори при много ниски концентрации.
- * Етаноловият екстракт намалява клетъчната пролиферация на белодробните ракови клетъчни линии H1299 и A549 *in vitro*.
- * Третирането с етанолов екстракт от *A. muscaria* индуцира образуването на цитоплазмени структури, идентифицирани като стрес-гранули в третираните клетки.

6. Приноси

- * **Оптимизиране на нов хроматографски метод** за анализ на съдържанието на алкалоидите **иботенова киселина и мусцимол**, както и на веществото **ергостерол** в комплексна смес от вещества.
- * **Оптимизиране на капилярно-електрофоретичен метод с безконтактна детекция на проводимост** за анализ на съдържанието на алкалоидите **иботенова киселина и мусцимол** в комплексна смес от вещества.
- * **Оптимизиране на нов UHPLC/MS-MS метод** за анализ на съдържанието на алкалоидите **иботенова киселина и мусцимол** в комплексна смес от вещества.
- * **Извършена е сравнителна оценка на цитотоксичния ефект** на панел от различни видове екстракти от няколко гъбни вида, разпространени на територията на България, върху **ракови клетъчни линии**.
- * **Направена е първата оценка на цитотоксичния и цитостатичния ефект** на тинктура от *Amanita muscaria* върху клетъчни култури *in vitro*.
- * **Представени са първите сведения** за натрупването на **стрес гранули** в клетъчни култури *in vitro*, третирани с екстракт от *A. muscaria*.

7. Публикации, свързани с темата на дисертацията

- **Dushkov, A.**, Vosáhlová, Z., Tzintzarov, A., Kalíková, K., Křížek, T., Ugrinova, I.. Analysis of the Ibotenic Acid, Muscimol, and Ergosterol Content of an *Amanita Muscaria* Hydroalcoholic Extract with an Evaluation of Its Cytotoxic Effect against a Panel of Lung Cell Lines In Vitro. *Molecules*, 28, 19, MDPI, 2023
SJR (Scopus):0.7, JCR-IF (Web of Science):4.6, Q1
- **Dushkov, A.**, Petrova, M., Todorova, J., Gospodinov, A., Ugrinova, I.. Natural medicine: an evaluation of the in vitro cytotoxic effect of several Bulgarian fungal species on two panels of cancer cell lines. *Bulgarian Chemical Communications*, 53, A, 2021, 35-41.
SJR (Scopus):0.18, JCR-IF (Web of Science):0.31, Q4

8. Публикации, които не са свързани с темата на дисертацията

- Vlahova, Z., Tzintzarov, A., Petrova, M., **Dushkov, A.**, Velkova, L., Dolashki, A., Dolashka, P. and Ugrinova, I., 2023, October. Additive Effects of *Helix aspersa* Mucus Fractions with Chemotherapy Drugs in Breast Cancer: Exploring Anti-proliferative Potential. In *Proceedings of the Bulgarian Academy of Sciences* (Vol. 76, No. 10, pp. 1505-1516).
SJR (Scopus):0.16, JCR-IF (Web of Science):0.3, Q3

9. Участия в научни форуми по темата на дисертацията

- 07-13.07.2024. “Analysis of the Ibotenic Acid, Muscimol, and Ergosterol Content of an *Amanita muscaria* Hydroalcoholic Extract with an Evaluation of Its Cytotoxic Effect against a Panel of Lung Cell Lines In Vitro”, CEEPUS Summer School, Charles University, Prague, Czech Republic
- 14-15.09.2023. “Analysis of the Ibotenic Acid, Muscimol, and Ergosterol Content of an *Amanita muscaria* Hydroalcoholic Extract with an Evaluation of Its Cytotoxic Effect against a Panel of Lung Cell Lines In Vitro”, 19th International Student Conference “Modern Analytical Chemistry”, Charles University, Prague, Czech Republic
- 10-13.09.2023. ”Investigating the in vitro antitumor and antiproliferative potential of an *Amanita muscaria* (L.:Fr.) Hook. extract against lung and prostate cancer cell lines”, International conference „CLEAN NATURE FOR HEALTH“, Велинград, България
- 02-07.07.2023. “Investigating the *in vitro* antitumor and antiproliferative potential of an *Amanita muscaria* (L.:Fr.) Hook. Extract Against Lung and Prostate Cancer Cell Lines”, V International Summer School of Natural Products, Maratea, Italy
- 06.10.2022. “Investigating the *in vitro* antitumor and antiproliferative potential of an *Amanita muscaria* (L.:Fr.) Hook. Extract Against Lung and Prostate Cancer Cell Lines”, 100th Anniversary of the Birth of Acad. R. Tsanev Conference, София, България
- 06-07.06.2022. “ИЗСЛЕДВАНЕ НА ПРОТИВОТУМОРНИЯ ПОТЕНЦИАЛ НА ЕКСТРАКТИ ОТ НЯКОИ ВИДОВЕ БЪЛГАРСКИ ГЪБИ”, Трети интердисциплинарен докторантски форум, Парк-хотел „Кюстендил“, гр. Кюстендил, България
- 27-02.06.2022. ““ИЗСЛЕДВАНЕ НА ПРОТИВОТУМОРНИЯ ПОТЕНЦИАЛ НА ЕКСТРАКТИ ОТ НЯКОИ ВИДОВЕ БЪЛГАРСКИ ГЪБИ” Второ национално лятно училище по природни продукти с приложение в медицината, Творчески дом на БАН, Варна, България

10. Литература

1. <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>.
2. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/lung-cancer>.
3. <https://www.cancer.org/cancer/types/melanoma-skin-cancer/about/key-statistics.html>.
4. <https://www.cancer.org/cancer/types/prostate-cancer/about/key-statistics.html>.
5. <https://www.cancer.org/cancer/types/breast-cancer/about/how-common-is-breast-cancer.html>.
6. Corbu, V.M., et al., *Current Insights in Fungal Importance-A Comprehensive Review*. Microorganisms, 2023. **11**(6).
7. <https://lex.bg/laws/ldoc/2135479531>.
8. Alexander Dushkov, M.P., Jordana Todorova, Anastas Gospodinov, Iva Ugrinova, *Natural medicine: an evaluation of the in vitro cytotoxic effect of several Bulgarian fungal species on two panels of cancer cell lines*. Bulgarian Chemical Communications, 2021. **53**(Special Issue A): p. 035 - 041.
9. Lee, S.O., et al., *Fomes fomentarius Ethanol Extract Exerts Inhibition of Cell Growth and Motility Induction of Apoptosis via Targeting AKT in Human Breast Cancer MDA-MB-231 Cells*. Int J Mol Sci, 2019. **20**(5).
10. Kim, S.H., R. Jakhar, and S.C. Kang, *Apoptotic properties of polysaccharide isolated from fruiting bodies of medicinal mushroom Fomes fomentarius in human lung carcinoma cell line*. Saudi J Biol Sci, 2015. **22**(4): p. 484-90.
11. Ren, G., et al., *Evaluation of cytotoxic activities of some medicinal polypore fungi from China*. Fitoterapia, 2006. **77**(5): p. 408-410.
12. Waser, P.G., *The pharmacology of Amanita muscaria*. Psychopharmacology Bulletin, 1967. **4**(3): p. 19-20.
13. Michelot, D. and L.M. Melendez-Howell, *Amanita muscaria: chemistry, biology, toxicology, and ethnomycology*. Mycological research, 2003. **107**(2): p. 131-146.
14. Въжаров, В., *Лечебните гъби в България*. 2016: Биана, София.
15. Marinozzi, V. and L. Fiume, *Effects of -amanitin on mouse and rat liver cell nuclei*. Exp Cell Res, 1971. **67**(2): p. 311-22.
16. Thakor, N. and M. Holcik, *IRES-mediated translation of cellular messenger RNA operates in eIF2 α - independent manner during stress*. Nucleic Acids Res, 2012. **40**(2): p. 541-52.
17. van Leeuwen, W. and C. Rabouille, *Cellular stress leads to the formation of membraneless stress assemblies in eukaryotic cells*. Traffic, 2019. **20**(9): p. 623-638.
18. Cruz-Bermúdez, A., et al., *Cancer-associated fibroblasts modify lung cancer metabolism involving ROS and TGF- β signaling*. Free Radic Biol Med, 2019. **130**: p. 163-173.
19. Asnaghi, L., et al., *E-cadherin negatively regulates neoplastic growth in non-small cell lung cancer: role of Rho GTPases*. Oncogene, 2010. **29**(19): p. 2760-71.
20. Leung, E.L., et al., *Non-small cell lung cancer cells expressing CD44 are enriched for stem cell-like properties*. PLoS One, 2010. **5**(11): p. e14062.
21. Li, C.H., et al., *Cytoplasmic aryl hydrocarbon receptor regulates glycogen synthase kinase 3 beta, accelerates vimentin degradation, and suppresses epithelial-mesenchymal transition in non-small cell lung cancer cells*. Arch Toxicol, 2017. **91**(5): p. 2165-2178.
22. Tai, S., et al., *PC3 is a cell line characteristic of prostatic small cell carcinoma*. Prostate, 2011. **71**(15): p. 1668-79.
23. Vazharov, V., *Medicinal Fungi of Bulgaria*. 2021, Biana: Sofia, Bulgaria.