



ДО ЧЛЕНОВЕТЕ НА НАУЧНОТО ЖУРИ,

назначено със заповед № 218-ОБ/20.12.2024 г. на Директора на ИМБ-БАН, относно защита на докторска дисертация на

Александър Николаев Душков – редовен докторант в секция „Структура и функция на хроматина“ при ИМБ-БАН, с научен ръководител проф. д-р Ива Угринова

РЕЦЕНЗИЯ

от проф. Маргарита Апостолова, дб

Ръководител Лаборатория по медико-биологични изследвания, Институт по молекулярна биология „Акад. Румен Цанев“ – БАН

върху дисертационния труд за присъждане на образователна и научна степен „Доктор“, по докторска програма „Молекулярна биология“, в професионално направление 4.3. Биологически науки, от област на висше образование 4. Природни науки, математика и информатика, на тема **„Природни ниско токсични биологично активни екстракти от български гъби с фокус върху Amanita – анализ на състава, антитуморна активност и механизъм на действие“**

Декларирам, че нямам конфликт на интереси по смисъла на § 1, т. 2а или ограниченията за свързани лица по смисъла на § 1, т. 5 от допълнителните разпоредби на Закона за Развитие на Академичния Състав в Република България (ЗРАСРБ). Нямам съавторство с докторанта в представените публикации. При извършената проверка не установих наличие на плагиатство.

I. Общо представяне на процедурата и докторанта.

Докторантът е отчислен с право на защита в срок и представеният комплект материали на електронен носител (дисертация и автореферат) е в съответствие с Правилника за прилагане на ЗРАСРБ (Обн. ДВ. бр.75 от 24 Септември 2010г., изм. ДВ. бр.19 от 8 Март 2011г., изм. ДВ. бр.9 от 31 Януари 2012г., изм. ДВ. бр.62 от 12 Юли 2013г., доп. ДВ. бр.60 от 22 Юли 2014г., изм. ДВ. бр.57 от 28 Юли 2015г., изм. и доп. ДВ. бр.56 от 6 Юли 2018г., изм. и доп. ДВ. бр.15 от 19 Февруари 2019г., изм. ДВ. бр.76 от 5 Септември 2023г., изм. ДВ. бр.23 от 18 Март 2025г.) и Правилника за развитието на академичния състав на ИМБ-БАН. Спазени са минималните национални изисквания според ЗРАСРБ (Обн. ДВ. бр.38 от 21 Май 2010г., изм. ДВ. бр.81 от 15 Октомври 2010г., изм. ДВ. бр.101 от 28 Декември 2010г., изм. ДВ. бр.68 от 2 Август 2013г., изм. и доп. ДВ. бр.30 от 3 Април 2018г., изм. ДВ. бр.17 от 26

Февруари 2019г., изм. ДВ. бр.17 от 25 Февруари 2020г.)

Александър Душков е представил списък от 2 публикации, които са обект на дисертационния труд, с общ IF 4.2 (JCR-IF (Web of Science)). Статиите са публикувани в списания с квартали 1 и 4. Забелязани са 11 цитирания (Scopus). Той е участвал в 7 научни форуми по темата на дисертацията, в 6 от които е имал представяне.

II. Актуалност на тематиката, познаване на проблема и целесъобразност на поставените цели и задачи и постигнатите резултати.

В така представения за защита дисертационен труд е изследван проблем, свързан с проучвания върху противотуморното действие на различни фармакологично значими екстракти от гъби, срещащи се на територията на РБългария. Гъбите са голям и все още малко проучван и неизползван източник на нови фармацевтични продукти. Много от гъбите съдържат активни полизахариди с анти-туморно и имуно-стимулиращи свойства, поради това темата, на която е посветен дисертационния труд, се отличава със своята голяма значимост. Безспорно е актуална, защото заболяванията от рак са на второ място по смъртност след сърдечно-съдовите заболявания, с тенденция за увеличаване на заболяемостта през последните години. Тяхната социална значимост и липсата на изчерпателни изследвания върху български гъби прави темата на дисертацията изключително съвременна и значима.

Дисертацията на Александър Душков е написана на 117 страници, структурирана е според изискванията за придобиване на образователната и научна степен „доктор” и е илюстрирана с 4 таблици и 47 фигури. Включва следните раздели: въведение (2 стр.), литературен обзор (38 стр.), цел и задачи (1 стр.), материали и методи (20 стр.), резултати и дискусия (38 стр.), изводи (1 стр.), и приноси (1 стр.). Използвани са 248 литературни източници.

Въведението стегнато обосновава интереса към тематиката, а литературния обзор изчерпателно проследява същността на проблема. Целите и задачите са ясно формулирани и целесъобразни. Използваните клетъчни, химични и молекулярно-биологични методи са съвременни, високоспецифични и дават надеждни резултати.

Размерът на изследванията е достатъчен за получаване на качествени и статистически достоверни резултати. Липсва обаче глава с описание на използваните статистически

методи приложени за анализ на резултатите.

За изпълнение на поставените задачи са използвани 8 човешки клетъчни линии – една от нормални диплоидни клетки (MPC-5) и 7 с туморен произход- A549, NCL-H1299, PC-3, MDA-MB231, A375, A375-KRAS, HS 895T.

Използваните комплексни експерименти за реализиране на целите на дисертационния труд показват, че докторантът е овладял разнообразни високоинформативни съвременни методи за провеждане на научни изследвания - култивиране на клетъчни линии, оценка на клетъчната преживяемост (MTT), FACS анализ, трансформация на бактерии и трансфекция на човешки клетки, флуоресцентна микроскопия и анализ на изображения, анализ на новосинтезирана РНК чрез клик-реакция и анализ на състава на екстракти чрез HPLC и CZE.

Относно методологичната част трябва да се отбележи, че ергостеролът е склонен към окисление, когато е изложен на въздух, което води до разграждане с течение на времето особено при екстракция провеждана за 21 дни, описана в дисертацията. Кислородът, разтворен в етанола, може да допринесе за този процес. Докато етанолът помага за запазването на стеролите, смес от 50:50 % етанол-вода, въвежда вода, което може да насърчи и хидролизата. Високите температури на сушене (напр. над 60–70°C) причинят термично разграждане на ергостерола, водещо до загуби. В методичното описание не е описано дали екстракцията е извършена на тъмно, а сушенето е проведено в дехидратор при температура 73 °C за една нощ. Поради описаните по-горе причини и относно правилното използване на стандарта за сравнение би било добре преминаването му през същите подготвителни процедури. Преди провеждане на бъдещи изследвания е препоръчително да се получи детайлна информация за начина на сушене на получените накъсани гъбни тела, защото, ергостеролът е чувствителен към кислород и може да се разгради и в окислени производни, когато е изложен на въздух, особено при продължително сушене. Респективно излагането на светлина – UV и видима могат да разградят ергостерола или да го превърнат във витамин D₂ (ергокалциферол), намалявайки общото му съдържание.

Получените резултати в дисертационния труд са описани подробно и логично и са онагледени с подходящи фигури и таблици. Резултатите ясно и недвусмислено показват наличието на различна степен на цитотоксичен ефект на етаноловите екстракти върху различните клетъчни линии. Най-силно изразен е ефектът от *Fomitopsis betulina*, където и водният екстракт е ефективен. *A. muscaria* проявява значителна цитотоксичност срещу

клетъчни култури от рак на бял дроб и рак на простата. Извършен е анализ и на невро-активните алкалоиди, които потенциално биха били отговорни за цитотоксичния ефект – иботенова киселина, мусцимол и ергостерол. Интерес представлява находката, че ергостеролът липсва в количества, които биха довели до цитотоксичност. Липсата на ергостерол обаче показва, че в екстрактите присъстват други съединения с потенциални противотуморни действия. Правени ли са опити да се идентифицират?

Извършен е анализ и на молекулярно-клетъчните изменения, настъпващи след третиране с екстракт от *A. muscaria* върху пролиферативната активност на ракови белодробни клетъчни линии A549 и H1299 и на рак на простата PC-3. Направен е извод, че намалението на клетки в S-фаза, установено след инкорпориране на EdU при A549 е сравнително по-застъпен в сравнение в H1299. Твърдението относително е така, но видно от представените флуоресцентни снимки третирането е извършено с концентрация 0.9%, докато отразените статистически анализи са за третиране с концентрация 0.45% (Фигури 39, 40, 41 и 42). Същата неточност е допусната при надписването на фигури 43 и 44, 45 и 46.

Изследванията свързани с FACS анализа на клетъчния цикъл на A549 клетки третирани с *A. muscaria* за 24 ч, с концентрации близки и по-големи от IC50 потвърждават намаление на клетките в S-фаза. Тъй като различните експерименти са извършвани с концентрации близки до IC25, IC50 и IC90 за различна продължителност на третиране, би било добре в дисертационният труд да присъства обобщаваща таблица с всички тези стойности.

Интерес представлява установено наличие на стрес-гранули (SGs) в цитоплазмата на A549 и H1299 клетки, при използване на G3BP1 ковалентно свързан с флуоресцентен FLAG-таг след третиране с етанолов екстракт от *A. muscaria*. Тъй като SG насърчават резистентността към терапията, метастазите и оцеляването, насочването към тях е обещаваща противоракова стратегия.

От проведените експерименти са направени **6 извода**. Ясно, точно и конкретно са формулирани и **6 приноса**. Всичките те са подкрепени от експерименталните данни, с които съм съгласна.

Представеният автореферат отговаря на съдържанието на дисертационния труд и дава отлична информация за проведените експерименти, получените резултати, обсъждане и анализ на изследванията.

Имам следните въпроси към дисертантът:

1. Би ли могъл антитуморният ефект на *A. muscaria* да се дължи на съдържащи се полизахариди?
2. Желано ли е формирането на SGs след третиране с етанолов екстракт от *A. muscaria*?

III. Заключение: От извършената голяма по обем научно-изследователска работа мога да обобща, че **Александър Николаев Душков** притежава умения да планира и провежда адекватни за поставените цели експерименти, както и способности да обсъжда получените резултати. Дисертационният труд е актуален, използва съвременни методологии, с ясни цели и задачи, със значими резултати и изводи. Има безспорни научни и научно-приложни приноси. Дисертационният труд на **Александър Николаев Душков** отговаря напълно на изискванията на ЗРАСРБ и Правилника за условията и реда за придобиване на научни степени и за заемане на академични длъжности в ИМБ. Давам своята **положителна оценка** и препоръчвам на уважаемото Научно жури да присъди на **Александър Николаев Душков** образователната и научна степен "доктор", по докторска програма „Молекулярна биология“.

София, 19.03.2025 г.

проф. Маргарита Апостолова, дб