



РЕЦЕНЗИЯ

**за дисертационен труд за придобиване на научната и образователна степен
„доктор“**

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 Александър Николаев Душков, редовен докторант към Лаборатория по Структура
и функция на хроматина, Институт по молекулярна биология „Акад. Румен Цанев“,
Българска академия на науките, в научно направление 4.3. Биологични науки
(Молекулярна биология) с научен ръководител проф. д-р Ива Угринова

**От проф. д-р Тания Иванова Топузова-Христова, Катедра Клетъчна биология и
биология на развитието, Биологически факултет на Софийски Университет „Св.
Климент Охридски“**

Данни за докторанта и докторантурата.

Александър Николаев Душков е завършил бакалавърска степен на образование със специалност Молекулярна биология в Биологически факултет към Софийски университет „Св. Климент Охридски“ през 2019 година и магистърска степен по Клетъчна биология и патология в същия факултет на Софийски университет „Св. Климент Охридски“ през 2021 година с отличен успех. От 2018 година работи като техник, лаборант, биолог и по-късно като асистент в секция „Структура и функция на хроматина“ към Института по молекулярна биология, БАН. Александър Душков е зачислен като редовен докторант през 2021 г. в Лабораторията по Структура и функция на хроматина на Института по молекулярна биология към Българската академия на науките, в научно направление 4.3. Биологични науки (Молекулярна биология) с научен ръководител проф. д-р Ива Угринова. Докторантът е отчислен с право на защита в срок, като са спазени всички изисквания според *Правилника за прилагане на Закона за развитие на академичния състав на Република България и Правилника за развитието на академичния състав на Института по молекулярна биология „Акад. Румен Цанев“ при Българска академия на науките, раздел 4* и няма допуснати нарушения. Спазени са

минималните национални изисквания според Закона за развитието на академичния състав в Република България, 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.

Данни за дисертацията.

Темата на дисертацията „Природни ниско токсични биологично активни екстракти от български гъби с фокус върху *Amanita muscaria* – анализ на състава, антитуморна активност и механизъм на действие“ отразява вярно нейното съдържание. Дисертацията обхваща 114 страници, съдържа 47 фигури и 4 таблици. Темата на дисертацията е актуална и е с научно-приложен характер. Откриването на нови биологично активни вещества с потенциално противотуморно действие, както и изясняването на механизмите им на действие са от голям интерес за биомедицинските и фармакологични изследвания в търсене на нови лекарствени препарати.

Основните части на дисертацията спазват общоприетият за такъв труд план и включват: Литературен обзор – 31 страници, Цели и задачи – 1 страница, Материали и методи – 20 страници, Резултати и Дискусия – 28 страници и Изводи - 1 и приноси – 1 страница.

В литературния обзор е направен преглед на данни за основните туморни заболявания при човек, фармакологичните приложения на биологично-активни метаболити от 5 вида гъби, включени в изследването, ДНК уврежданията и клетъчния стрес и тяхната роля в туморогенезата. Тази част от дисертационния труд е написана на разбираем език, стегнато и ясно, като достатъчно добре мотивира избора на научен проблем за следващите изследвания.

Формулираните цел и задачи логически следват от направения обзор, а използваните материали и методи са описани коректно и ясно, достатъчно подробно, за да бъдат повторени. Целта на дисертационния труд е да се изследва противотуморния ефект на екстракти, получени от различни видове гъби, разпространени на територията на България. Използвани са 8 човешки клетъчни линии – една от нормални диплоидни клетки и 7 с туморен произход, които са тествани с водни и алкохолни екстракти от общо 5 вида гъби (дървесни и червена мухоморка).

Наборът от методи включва определяне на цитотоксичност чрез МТТ, трансформация на бактерии и трансфекция на човешки клетки с флуоресцентно тагнати белтъци за определяне на сформирането на стрес-гранули, имунофлуоресцентен анализ, анализ на клетъчен цикъл и на синтетична фаза, анализ на новосинтезирана РНК чрез клик-реакция, фракциониране и анализ на състава на екстрактите чрез Високоэффективна течна хроматография и Капилярна електрофореза с безконтактен капацитивно свързан детектор на проводимостта. За приложените методи са обяснени и базови теоретични принципи, които обосновават тяхното използване, придружени и с необходимите схеми. Експериментите са проведени прецизно, а получените резултати са интерпретирани логично. Към представените резултати е направена дискусия, която би могла да се разшири с оглед на повече данни за химичния състав и възможни кандидати за наблюдаваното цитотоксично действие и селективен ефект. Този въпрос е особено важен, като се има предвид, че изследваните алкохолен и воден екстракт от *Amanita muscaria* не съдържа ергостерол, който е с доказано противотуморно действие. Има ли данни за друг потенциален кандидат с такова действие?

Повечето от фигурите, включени в този раздел са микрофотографии от имунофлуоресцентните микроскопските изследвания и графично околичествяване на клетъчната жизненост и анализите на химичния състав и дават представа за големия обем работа, която е извършена. Резултатите са добре илюстрирани и обяснени, като позволяват извеждането на 6 извода по отношение на действието на екстрактите върху изследваните клетъчни линии, както и състава на екстрактите от червена мухоморка. Част от изводите са формулирани като обобщение на получените резултати и имат нужда от по-добро прецизиране. Освен изводите са формулирани и 6 приноса на дисертационния труд, три от които са свързани с оптимизиране на методите за анализ на химичния състав.

Научен апарат

Цитирани са 248 източника, които дават възможност да се направи изчерпателен преглед на научните достижения по темата. Част от източниците, свързани с честотата на раковите заболявания (над 20), са от сайтове с медицински данни като Medical News Today, American Cancer Society, HWO, които въпреки че се базират на научни данни не са по същество научни публикации, с обяснена методика и експериментален или аналитичен подход и не е редно да бъдат цитирани като източници към строго научен труд като докторската дисертация. Същото се отнася до ботаническото описание на

гъбите, където като източник е цитирана Уикипедия (общо 5 броя) и цитираните като отделни източници страници с информация за клетъчните линии от сайтовете на ATCC, Cyton и Cellosaurus (общо 15 на брой). Препоръчвам на докторанта да се въздържа от подобни цитирания в бъдещите си научни разработки, а да се ориентира към строго научните източници, които са преминали поне през двойно научно рецензиране. При използване на снимки или графики от интернет в комплексни или илюстративни фигури и схеми, източника би могъл да се цитира под самата фигура, а търговските сайтове се цитират само в частта Материали и методи, а не като използвана литература в края на труда. Друга забележка е, че два от цитираните източници са публикувани на японски, два на немски и един на френски език, а един от тях е цитиран два пъти – на български и в превод. Вероятно тези източници са прецитирани от някой следващ, а не са използвани в оригинал. В следващи трудове е добре да се избягва такава практика. Останалите цитирания са направени при спазване на утвърдените стандарти за цитиране на научна литература.

Автореферат

Авторефератът съдържа 50 страници и напълно отразява съдържанието на дисертационния труд. Коректно са представени основните резултати, илюстрирани с общо 19 фигури, в които са включени графики, цветни микрофотографии и схеми. Изводите и приносите са представени коректно и отговарят на тези в дисертационния труд. Включени са и публикациите по темата на дисертацията, както и съкратен списък на цитирана литература, използвана основно в дискусията към резултатите.

Публикации

Основните резултати от дисертационния труд са публикувани в две статии в научни списания с импакт фактор и с квартил Q1 и Q4. И в двете публикации докторантът е първи автор, което отразява съществения принос в изработването им. Според изискванията на Закона за развитие на академичния състав, двете публикувани статии носят общо 32 точки, което надвишава необходимия минимум от 30 точки. Освен тези публикации, Александър Душков е приложил списък от 7 участия на национални и международни конференции, на които е популяриизирал получените в дисертационните си изследвания резултати. Тази научно-изследователска активност характеризира Александър Душков като един изграден и активен млад учен с отлични перспективи за бъдещо развитие.

Научни и научно-приложни приноси

Като приноси от дисертационния труд са посочени 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 и оптимизиране на нов UHPLC/MS-MS метод за анализ на съдържанието на алкалоидите иботенова киселина и мусцимол в комплексна смес от вещества. Тъй като това не са по същество нови протоколи, а оптимизиране на съществуващи, те са по-скоро част от изпълнените задачи във връзка с дисертационния труд, а не самостоятелни научно-приложни приноси. Останалите приноси са свързани с оценка на цитотоксичния ефект на панел от различни видове екстракти от дървесни гъби, разпространени на територията на България, върху ракови клетъчни линии; оценка на цитотоксичния и цитостатичния ефект на тинктура от *Amanita muscaria* върху клетъчни култури *in vitro* и първите сведения за натрупването на стрес гранули в клетъчни култури *in vitro*, третирани с екстракт от *A. muscaria*. Последния принос за мен лично е най-интригуващ и с потенциал да се развие в интересна самостоятелна тема за изследвания.

Заклучение

В заключение, представено е едно комплексно изследване на фармакологичния потенциал на екстракти от биологично активни вещества от гъби от България. Направена е *in vitro* оценка на цитотоксичния ефект на панел от различни видове екстракти от дървесни гъби и на тинктура от *Amanita muscaria* върху седем човешки клетъчни линии с туморен и нетуморен произход и са получени първите сведения за натрупването на стрес гранули в клетки, третирани *in vitro* с екстракт. Направен е анализ на алкалоидите и определени биологично активни вещества като ергостерол и психотропни вещества в използваните екстракти от *A. muscaria*. Получените резултати дават основа за развитие на обещаваща тема за механизмите на въздействие на растителните и гъбни компоненти върху туморните клетки *in vitro*.

Въз основа на представените материали, считам, че докторантът напълно отговаря на изискванията на ЗРАСРБ за присъждане на научната и образователна степен „доктор“ и препоръчвам на Александър Душков да бъде присъдена научната и образователна

степен „доктор“ в научно направление 4.3. Биологични науки, научна специалност
Молекулярна биология.

Гр. София

Резензент:

/проф. д-р Таня Топузова-Христова/