

СТАНОВИЩЕ

ОТ

проф. д-р инж. Румяна Петрова Статева, Институт по инженерна химия - БАН

Относно: дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен „доктор“ по научна специалност 4.3 Биологически науки, Молекулярна биология

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“ изготвен и представен от редовен докторант Александър Николаев Душков, с научен ръководител проф. д-р Ива Угринова

Съгласно Заповед No 218-ОБ на Директора на Института по молекулярна биология „Акад. Румен Цанев“ (ИМБ-БАН) от 20.12.2024 г. бях определена за член на научно жури, а в последствие избрана за изготвяне и представяне на становище относно дисертационния труд на маг. Душков.

След направения от мен преглед на представените от докторанта документи, дисертационен труд и автореферат, установих, че съответстват напълно на изискванията, изложени в Правилник за условията и реда за придобиване на научни степени и за заемане на академични длъжности в БАН (изм. от 20.05.2024). Дисертационният труд е представен и обсъден на разширен семинар на секция „Структура и функция на хроматина“ към ИМБ-БАН на 16.12.2024 г.

За времето на своята докторантура, маг. Душков е изпълнил изцяло своята докторантска програма, като е събрал 518 кредитни точки, което е отразено в атестационната му карта.

Кратки биографични данни за дисертанта:

Александър Душков е роден през 1981 г. в гр. София. Завършил е НПМГ „Акад. Любомир Чакалов“, профил Биология през 2013, и от същата година е редовен студент в Биологическия факултет към Софийски университет „Св. Климент Охридски“, където през 2019 г. получава степен бакалавър, а през 2021 г. - степен магистър. От 2022 г. е редовен докторант в ИМБ-БАН. По време на редовната си докторантура е стажувал един месец в Химическия факултет на Карловия университет в Прага, Чехия по програмата CEEPUS. От 2018 г. до момента е на работа в ИМБ-БАН, отначало като техник-биолог, а в последствие като асистент.

Общ преглед и характеристика на дисертационния труд:

Дисертационният труд е написан на 111 страници, съдържа 47 фигури, 4 таблици, и включва следните раздели: Въведение, Литературен обзор, Цел и задачи, Материали и методи, Резултати и обсъждане, Изводи и Приноси. Списъкът на използваната литература е впечатляващ - 248 литературни източници на латиница, което несъмнено е атестат за изключително доброто познаване от докторанта на съвременното състояние на проблематиката.

Изложеният в Раздел 2 подробен литературен анализ е позволил на Александър да формулира ясно **основната цел** на дисертационния труд: „Изследване на противотуморния ефект на екстракти, получени от различни видове гъби, разпространени на територията на България“.

Специално искам да отбележа актуалността на тематиката на дисертационния труд, насочена към:

- Изследване възможностите за трансформиране (валоризиране) на устойчива, сравнително леснодостъпна и налична в достатъчни количества на територията на България растителна биомаса в биоактивни вещества и вторични метаболити с висока добавена стойност;
- Изясняване на механизма на тяхното действие и анализ на възможностите и перспективите за приложението им в различни сфери, най-вече свързани със здравето

и подобряване на качеството на живот на човека, и по-конкретно насочени към лечението на социално значими болести.

Тематиката е съзвучна с идеите на биокръговата икономика и следва новите тенденции, характеризиращи се с промяна на акцента на парадигмата на научните изследвания – от биомаса-за-енергия/биогорива към биомаса за биохимикали и биоактивни компоненти (from biomass-to-energy/biofuels to biomass-to-biochemicals). За този толкова удачен избор на тема на научните изследвания трябва да бъдат поздравени докторанта и неговия научен ръководител проф. Угринова.

Формулираната **цел на дисертационния** труд предопределя интердисциплинарния характер на изследванията, насочени към използване основно на инструментариума на молекулярната биология и биотехнологията, но също така на аналитичната и до известна степен на инженерната химия, особено в частта получаване на ниско токсични биологично активни екстракти от изследваните обекти и анализ на техния състав.

Считам, че Раздел 2 демонстрира убедително не само много доброто познаване на специализираната литература от докторанта, но и възможностите му за провеждане на аналитичен, задълбочен и критичен анализ. Това, без съмнение е било от значение при формулиране на пет задачи (Раздел 3), ясно и конкретно дефинирани, за изпълнение на поставената амбициозна цел като всяка една от тях изисква извършване на значителна като обем експериментална работа. Единствената забележка към тази част на дисертационния труд е, че надписите в полето на Фигурите, и Таблиците, са на английски език. Аналогично, с малки изключения, е представянето на фигурите и таблиците в останалите раздели на дисертационния труд.

Раздел 4 е посветен на Материали и методи. В голяма част от подразделите (вж. 4.1.1 – 4.1.5; 4.2.2 – 4.2.11) е използвана специализирана терминология и се дискутират методи, които са твърде далеч от моите компетенции, за да мога да се произнеса с необходимата увереност.

Що касае получаването на екстракти от гъбни плодни тела (подраздел 4.2.1.), бих искала да отбележа, че ако се следва общоприетия в инженерната химия (и не само) подход, е необходимо да бъде анализирано влиянието на режима на работа (напр. температура, екстрагенти, и пр.) както върху ефективността на използваните техники, така и върху компонентния състав на получените екстракти.

Докторантът е използвал екстракция с разтворители, които се характеризират като GRAS (generally regarded as safe) – напр. биомасата е заливана с вряща вода и оставяна да престои 24 ч на 80°C; или на кисвана в 45 mL 96% етанол и отново оставяна за 24 ч; или мацерация за 21 дни със смес дестилирана вода+етанол (50/50, v/v), или на кисвана в ръжена водка с концентрация на алкохол 40% отново за 21 дни.

Всеки от получените екстракти, както е отбелязано съвсем коректно, представлява твърде сложна смес, чийто състав може да варира в зависимост от вида на прилагания екстрагент и неговата полярност – напр. силно или по-слабо полярен (вода vs етанол). Считам, обаче, че един кратък анализ на влиянието не само на природата на разтворителите, но и на температурния режим, както и време на екстракция, би бил много полезен за получаване на важна нова информация, която в последствие ще позволи да бъде идентифициран онзи екстракционен метод и/или онази комбинация от условия, които позволяват получаване на ниско токсични биологично активни екстракти с желан състав.

Относно подраздел 4.2.9 следва да бъде направено следното терминологично уточнение: В специализираната литература процесът, който използва докторантът и нарича „фракциониране“, е по-коректно да бъде обозначен като "последователно извличане" или многоетапна/многостъпална екстракция течност-течност (sequential/multistep liquid-liquid extraction). При екстракция течност-течност се реализира процес на обмен на определени съединения между два разтворителя, които са или частично или напълно несмесващи се един с друг, като при многостъпалната екстракция на всяка последваща стъпка се добавя нов екстрагент.

С други думи, терминът "последователно извличане" следва да се използва, когато химичните разлики между получените екстракти се дължат на различна разтворимост

на техните компоненти в различните разтворители. Докато терминът „фракционирание“ следва да се използва, когато химичните разлики между получените фракции се дължат на различно разпределение на отделните компоненти между две фази. Тези уточнения прецизират терминологията, но в никакъв случай не оказват влияние върху надеждността на получените от докторанта резултати и тяхната интерпретация.

Раздел 5 е посветен на анализ на *in vitro* изследвания на цитотоксичността на получените екстракти срещу различни клетъчни линии, като докторантът правилно е отбелязал, че е необходимо да бъдат контролирани много внимателно „локация на събиране, наличие или отсъствие на пънчета в дрогата, ясно определени съотношения дрога/разтворител при екстракцията и т.н“, бих добавила и подготовка на биомасата и пр. (стр. 70). Контролирането на тези „важни подробности“ са задължително условие за получаване на надеждни и възпроизводими резултати, и тяхното коректно последващо сравнение и тълкуване.

Заслужава специално да бъде отбелязан факта, че Александър, в рамките на своето обучение, не само се е запознал, но е усвоил високо ефективни аналитични методи за анализ на получените екстракти - HPLC, CZE/CCD и UHPLC-MS/MS, и е предложил оптимизирани процедури за анализ на съдържанието на невроактивните алкалоиди иботенова киселина (IBO), мусцимол (MUS), както и на ергостерол, вещество с доказана антикарциногенно действие.

Както бе посочено вече, изследванията реализирани от маг. Душков са комбинация от прецизна експериментална работа и използване на съвременни методи за анализ и методи за обработка на получените резултати. Данните са достоверни, интерпретирани творчески и компетентно. Тяхната значимост е систематизирана и обобщена като Изводи (Раздел 6), без излишно разводняване.

Това, от своя страна, е позволило да бъдат формулирани шест Приноси (Раздел 7), които се отличават с конкретност и точност на изказа, което е рядко срещано (поне в моята рецензентска практика, където съм виждала описание на приноси в рамките на страници). Единствено си позволявам да отбележа, че според мен, ако се следва подреждане по значимост, би трябвало приноси 4,5,6 да бъдат съответно поставени на места 1, 2 и 3, първо, защото касаят директно темата на дисертационния труд и са в полето на научната специалност молекулярна биология, и второ, защото така ще бъдат в синхрон с направените в раздел 6 Изводи.

Има пълно съответствие между дисертационния труд и автореферата на докторанта.

Публикации и принос на докторанта:

Научните постижения на асистент Душков по темата на дисертацията са обобщени в две публикации в специализирани издания с ИФ, квартили респективно Q1 и Q4. И в двете публикации Александър е водещ автор, което е несъмнено потвърждение за личното му участие в изработването, интерпретацията на резултатите и формулирането на заключенията.

Особено впечатляващи са наукометричните показатели на статията, публикувана в *Molecules* (Q1). Съгласно статистика на списанието, тя е била прегледана ("accessed") към момента над 6400 пъти и има забелязани 9 цитирания - за съжаление факт, който не е отбелязан от дисертанта. Високата цитируемост на този научен труд, публикуван през 2023 г., е потвърждение на сериозен интерес на международната академична общност, и е пряко доказателство за актуалността на тематиката и значимостта на получените резултати. Втората публикация в *Bulg Chem Commun* (Q4) също има 2 цитирания, съгласно SCOPUS.

Във връзка с публикационната активност на докторанта трябва да се отбележи и, че съгласно горе споменатия Правилник, минималните изискуеми точки по групи показатели, в конкретния случай за научна степен доктор, са 30 точки от показатели от 5 до 10. Александър не само напълно ги покрива - а ги надвишава (25 точки за публ. в Q1 и 12 точки за публ. в Q4).

Александър Душков има 4 участия в международни научни мероприятия и други три – в национални, като вида на представянето - съответно постер или доклад - не е уточнен.

Тъй като резултатите от изследването "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", са били представени на два научни форума, считам, че е по-коректно следното изписване: **Заглавие, Тип** (доклад/постер), **Представен на:** 1. Име на научното мероприятие, място, дата; 2. (аналогична последователност), освен в случая, когато на едното мероприятие е доклад, а на другото – постер.

Лични впечатления:

Познавам Александър от две години и съм с отлични впечатления от неговите знания, задълбоченост, компетентност и отношение към научните предизвикателства. Специално отбелязвам и много доброто владение на английски език.

Бих искала и да споделя, че четенето на дисертационния му труд ми достави удоволствие, не само защото е структуриран отлично, написан елегантно и на много добър български език, но и защото ми посочи нови и изключително актуални теми за възможно бъдещо сътрудничество. Ако трябва да екстраполирам (с едно намигане), след червената мухоморка вдъхновила творческия процес на дисертанта, съм уверена, че ще можем да идентифицираме много други растения (дори такива считани и третирани като бурени), позабравени билки, и пр., на които е толкова богата флората на България, като обекти на един интегрален (холистичен) подход, фокусиран върху перспективите за трансформиране на тяхната биомаса в ценни биоактивни компоненти с широка гама на приложение.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представеният дисертационен труд е актуално, комплексно и завършено изследване със сериозни научни приноси, което отговаря напълно на всички изисквания на ЗРАСРБ, Правилника за прилагането на ЗРАСБ и Правилник на БАН за прилагането му, както и на Правилника на ИМБ-БАН.

Всичко това ми дава основание убедено да гласувам положително и да препоръчам на почитаемото Научното жури да присъди на магистър Александър Николаев Душков образователната и научна степен „доктор“ в професионално направление 4.3. „Биологически науки“, Научна специалност „Молекулярна биология“.

11.03.2025 г.

Чл

гр. София

(проф. д-р инж. Румяна П. Статева)