

РЕЦЕНЗИЯ

На дисертацията за научната и образователна степен „Доктор“

На Тая С.Тошкова-Йотова

От проф. Елена Б. Николова, дбн

Представената дисертация е написана на 315 страници, с 29 фигури и 8 таблици. Тя включва Въведение, Материали и Методи, Резултати и Дискусия и Цитирана литература с 135 заглавия, от които 7 на кирилица.

Въведението е един преглед на литературата, нова и класическа, на специфичността на различни водораслови продукти и тяхното приложение в практически всички аспекти на нашия живот. Въпреки растящите достижения в полето на експерименталната и проложна алгология, само част от огромното богатство на изучените видове микроводорасли и потенциала на този полезен източник остава неизвестен и неизползван.

Дисертацията показва дълбоко разбиране на висшите достижения в областта на изследването и познаване на най-важната и текуща литература.

Целта е поставена ясно и точно и задачите са подходящи за тази цел.

Частта „Материали и Методи“ е много богата , включва 14 метода, повечето от които са интердисциплинарни, те включват:

Водораслов материал

Култивиране на микроводорасли

Газова хроматография – мас спектрален анализ на липиден екстракт

Химичен анализ и състав на екстрацелуларни полизахарид

Приготвяне на проби за биологична активност

Изследване на биологичната активност на метаболити и екстракти

Изследване на антитуморна активност

МТТ тест

Цитоморфологични изследвания с използване на флуоресцентни методи

Оцветяване с акридин оранж и етидиев бромид, DAPI оцветяване

Изследване на антибактериална и антигъбна активности

Метод на агарова дифузия

Метод за дискова дифузия

Анти оксидантна активност на етанолни екстракти

Статистически анализ

Методологията е описана по начин позволяващ повторение на експериментите. Спазени са принципите на добрите научни практики.

Резултатите са представени ясно, с съответни контроли и статистически анализ. Зелените водорасли са култивирани, продуктивността на биомасата и специфичната скорост на растеж определени. Маслените екстракти, съставът на масните киселини и химическия състав на екзополизахаридно съдържание са характеризирани.

Биологичната активност на продукти изолирани от *C. sp. BGV* е проучвана. Установена е антипролиферативна активност срещу туморната линия HeLa и срещу нормални миши фибробласти 3T3.

Цитоморфологичните промени в туморните клетки HeLa култивирани в присъствие на водораслови продукти са изследвани използвайки акридин оранж, етидиев бромид и DAPI. Намерени са значителни промени в ядрата и са документирани с много добри фотографии.

Значителни антибактериална/срещу различни щамове *E. Coli St. aureus/* и антигъбна /срещу *C. albicans/* активности на изолирани от зеленото водорасло *Coelastrella sp. BGV* са демонстрирани.

Проучвана е антиоксидантна активност на етанолен екстракт от *C. sp. BGV* и установена значителна такава.

В същата глава резултатите са обсъждани във връзка с проучвания на други автори и дисертацията показва едно добро разбиране на приложението на работата в по-широк научен контекст.

Съгласна съм с направените изводи:

1. От изследваните 4 щамове зелени микроводорасли от род *Coelastrrella* - *Coelastrrella sp. BGV*, *Coelastrrella multistriata* var. *corcontica* (CCALA 308), *Coelastrrella multistriata* var. *multistriata* (CCALA 309) и *Coelastrrella vacuolata* (CCALA 356), с най-висок растежен потенциал в лабораторни условия е българският щам *Coelastrrella sp. BGV*.

2. Качественият състав на биомасата на *Coelastrrella sp. BGV* в експоненциална и стационарна фаза на растеж е количествено балансиран, което заедно с високата продуктивност прави този щам перспективен в биотехнологично отношение.

3. В липиден екстракт от *Coelastrrella sp. BGV* са идентифицирани 11 мастни киселини, от които в най-голямо количество са олеинова (C18:1), линолова (C18:2) и палмитинова (C16:0). Съотношението на ненаситените към наситените мастни киселини е 3:1, а на мононенаситените към полиненаситените мастни киселини е 1:1.

4. Екзополизахаридът от *Coelastrrella sp. BGV* е нискомолекулен, съставен преимуществено от неутрални захари. Участващите в химичния му състав монозахариди са седем, от които са идентифицирани два – галактоза и фукоза.

5. Извънклетъчни отделения и компоненти на биомасата на *Coelastrrella sp. BGV* показват висока биологична активност в опити *in vitro*.

6. Изследваните продукти, получени от *Coelastrrella sp. BGV*, показват различна по-степен антитуморна/антипролиферативна активност към HeLa човешки туморни клетки (цервикален аденокарцином), отчетена чрез МТТ тест. 101

6.1 Най-висок статистически значим антитуморен ефект се отчита за мастни киселини (МК), последвани от алкохолен екстракт (АЕ), неосапуняеми вещества (НВ) и екзополизахариди (ЕПЗХ) на двата времеви интервала на изследване, като ефектът на МК (на 24 ч. и 48 ч.) и НВ (на 48 ч.) е съизмерим с този на класическия цитостатик Doxorubicin.

6.2. Извънклетъчни отделяния в културалната среда (КС), нискотемпературен (НТ) и високотемпературен (ВТ) водни екстракти понижават статистически значимо жизнеността на HeLa туморни клетки и на двата времеви интервала, като ефектът на НТ, ВТ и маслен екстракт (МЕ) е по-силен на 24-ти час, а на КС е 2-3 пъти по-изразен на 48-ми час.

7. Третирането на HeLa човешки туморни клетки с екстракти и метаболити от *Coelastrella* sp. BGV предизвиква различни по степен морфологични изменения в клетката и ядрото, характерни за ранна- и/или късна апоптоза, установени чрез прилагане на флуоресцентни методи на изследване (двойно оцветяване с АО и EtBr и оцветяване с DAPI).

8. Резултатите от флуоресцентните методи на изследване са в съответствие с данните, получени от МТТ теста и показват, че продуктите, изолирани от българския щам *Coelastrella* sp. BGV осъществяват антитуморно действие спрямо HeLa туморни клетки чрез индукция на апоптоза.

9. Получени са обнадеждаващи резултати по отношение на терапевтичен потенциал на екстракти и метаболити от *Coelastrella* sp. BGV (алкохолен екстракт, мастни киселини, екзополизахарид и културална среда) срещу широк спектър от Грам-отрицателни и Грам-положителни бактерии, както и гъбни инфекции, причинени от *Candida albicans*. Най-висока активност е отчетена за МК и АЕ.

10. Алкохолният екстракт от биомасата на *Coelastrella* sp. BGV е с високо съдържание на общи феноли, флавоноиди и високо ниво на тотална антиоксидантна активност. 102

11. Получените резултати за антитуморна, антибактериална и антигъбна активности на екстракти и метаболити от *Coelastrella* sp. BGV показват перспективността на този български щам за бъдещо приложение в практиката.

Съгласна съм и с приносите на автора:

1. Разширена и обогатена е биохимичната характеристика на българския щам зелено микроводорасло *Coelastrella* sp. BGV. Характеризиран е химичният състав на биомасата в две фази на растеж - експоненциална и стационарна. За първи път е изолиран екзополизахарид.

2. Характеризирани са мастно-киселинният профил на липиден екстракт и химичният състав на ЕПЗХ от *Coelastrella* sp. BGV.

3. Получени са оригинални данни за биологична активност на екстракти и метаболити от *Coelastrella* sp. BGV.
4. За първи път е установена антитуморна активност на екстракти и метаболити от *Coelastrella* sp. BGV спрямо HeLa човешки туморни клетки в опити *in vitro*.
5. Установена е висока антитуморната активност на мастни киселини, неосапуняеми вещества, алкохолен екстракт и екзополизахариди от *Coelastrella* sp. BGV. Активността на мастни киселини и неосапуняеми вещества срещу HeLa туморни клетки е съизмерима с тази на широко използвания в клиничната практика антитуморен антибиотик Doxorubicin.
6. За първи път е установена антибактериална активност на мастни киселини и етанолен извлек от щам *Coelastrella* sp. BGV, спрямо Грам-отрицателни патогени (*E. coli* ATCC, *E. coli* UPEC, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*).
7. Установено е, че *Coelastrella* sp. BGV е богат източник на естествени антиоксиданти.
8. Българският щам зелено микроводорасло *Coelastrella* sp. BGV е потенциален източник на биомаса и продукти от нея, приложими при създаване на нови природни лекарствени препарати за лечение на тумори и бактериални инфекции в експериментални и клинични условия.

Приносите на кандидата към всеки от аспектите на дисертацията са ясно показани.

Изпълнени са изискванията за публикации, кредити и положени изпити и са повече от достатъчни за получаването на научната и образователна степен „Доктор“. Убедено препоръчвам на уважаемото научно жури да я присъди на Таня С. Гошкова-Йотова.

23. 11. 2020г.

Проф. Елена Б. Николова дбн