

РЕЦЕНЗИЯ

от **акад. проф. Иван Георгиев Иванов, дбн**

относно конкурса за „Доцент“ област на висше образование: 4. „Природни науки, математика и информатика“, професионално направление: 4.2. „Химически науки“, научна специалност „Биоорганична химия, химия на природните и физиологично активните вещества“ обявен за нуждите на ИОХЦФ при БАН

1. Обща част

Конкурсът за „Доцент“ в област на висше образование: 4. „Природни науки, математика и информатика“, професионално направление: 4.2. „Химически науки“, научна специалност „Биоорганична химия, химия на природните и физиологично активните вещества“ е обявен в ДВ, бр. 43/31. 05. 2019 г. за нуждите на ИОХЦФ при БАН. Единствен кандидат в конкурса е гл. ас. д-р инж. Александър Константинов Долашки, от лаб. ХБПЕ на същия институт. Прегледът на документите показва, че процедурата по разкриване и обявяване на конкурса е спазена, а документите са изготвени съгласно ЗРАСРБ, Правилника за неговото приложение и вътрешните правилници на ИОХЦФ и БАН.

2. Кратки биографични данни

Гл. ас. д-р инж. Александър К. Долашки е родена на 29.12.1977 г. Той е възпитаник на Химико-технологичния и металургичен университет - София, който завършва през 2000 г. като мигистър инженер-химик по специалността „Химикотехнологични процеси и системи“. След дипломирането си започва докторантура в Университета на Тюбинген, Германия, където през 2005 г. придобива докторска степен по „Биохимия“. Оттогава е Главен асистент в ИОХЦФ при БАН. По време на кариерното си развитие д-р Долашки е бил на специализация и на работа по съвместни проекти в редица университети - Тюбинген, Германия; Майнц (Германия), Падова (Италия), Гент (Белгия), Киев (Украйна), Циндао (Китай) и др. Той е носител на престижната награда за наука „Питагор“ за 2017 г.

3. Научни трудове

3.1. Общ преглед на научните трудове

Според представения списък, д-р Долашки е автор на 50 научни труда, от които 45 са публикувани в списания с ИФ (общ ИФ 80.458). Трудовете му са цитирани досега 262 пъти. Неговият h-индекс е 10. Той е автор и на 4 заявки за национални патенти за изобретения.

За участие в конкурса за „Доцент“ д-р Долашки е представил 11 научни труда публикувани в периода 2008-2019 г. - всичките в списания с ИФ (общ ИФ 19.176). Те са разпределени по квадрили както следва: в Q1 - 3, Q2 - 5, Q3 - 2 и Q4 - 1. В 9 от статиите той е водещ (първи) автор. Всичките му трудове са в областта на биоорганичната химия и са посветени на изучаване структурата и свойствата на мед-съдържащи протеини и гликопротеини. В рецензията си ще визирам трудовете с оригиналната им номерация съгласно приложения към авторската справка списък.

Резултатите на Долашки са представени и на 53 национални и международни научни форуми. Те ще бъдат взети предвид, но няма да бъдат изрично рецензирани.

3.2. Оценка на научните трудове свързани с конкурса

Подлежащите на рецензиране трудове на д-р Долашки са посветени на изолирането и характеризирането на мед-съдържащите протеини супероксид

дисмутази (СОДази), хемоцианини и тирозинази. В съответствие с приетата класификация на мед-съдържащите протеини, те могат да се отнесат към четири тематични групи: а) Мед-съдържащи протеини тип I (№ 1 и 2); б) Мед-съдържащи протеини тип II (№ 3, 4 и 5); в) Мед-съдържащи протеини тип III (№ 6, 7, 8 и 9); г) Други трудове (№ 10 и 11).

а) Мед-съдържащи протеини тип I (трудовете № 1 и 2).

Към тип I спадат Cu/Zn-супероксиддисмутазите (Cu/Zn-СОДази) съдържащи един меден йон в активния център, които играят ключова роля в неутрализирането на супероксидния анионен радикал ($\bullet\text{O}_2^-$), ограничавайки по този начин образуването на H_2O_2 в клетките. Те имат важно значение за антиоксидантната защита на организма.

Като обект за изследване на Cu/Zn-СОДази Долашки избира филаментозните гъби *Humicola lutea* 103 и *Aspergillus niger* щам 26. От първата е изолирана СОДаза от трите клетъчни фракции – цитозол, митохондриален матрикс и митохондриални мембрани. Трите белтъка показват еднаква молекулна маса, N-крайна секвенция и еднакви цианидна и H_2O_2 чувствителности, което е основание кандидатът да допусне, че те са идентични. Въз основа на това е лансирана хипотезата, че Cu/Zn-СОД при *H. lutea* 103 се намира в матрикса и междумембрания лумен на митохондриите (№1). Трябва да отбележа, че това е първият идентифициран природно гликозилиран ензим от гъби. От *A. niger* 26 пък са изолирани два вида СОДази, едната от които е Cu/Zn-съдържаща, а другата - Mn-съдържаща (№ 2). Техните молекулни маси, определени чрез MALDI-MS и ESI-MS са съответно 15821 Da и 15912 Da. Тъй като в първичната структура на Cu/Zn-съдържащия ензим не е открит център за гликозилиране, Долашки прави извод, че ензимът не е гликопротеин. Сравнявайки първичните структури на Cu/Zn-СОДази от *H. lutea* 103 и *A. niger* 26, е показано, че двата ензима се състоят от 153 аминокиселини и се характеризират с висока хомология както помежду си, така и с други Cu/Zn-СОДази от низши гъби. Те имат висока температурна и рН стабилности, което се обяснява със стабилизиращия ефект на съдържащия се в тях дисулфидния мост (№ 1 и 2).

б) Мед-съдържащи протеини тип II (трудовете № 3, 4 и 5).

Към този тип гликопротеини спадат хемоцианините на молюски (охлюви) и артроподи (членестоноги), които изпълняват функцията на кислородни преносители. Въпреки еднаквата им биологична функция, хемоцианините от двата вида организми имат различна структура и свойства.

Д-р Долашки изолира нов хемоцианин от черноморския рак *Eriphia verrucosa* и доказва, че той има хексамерен състав (6x75 kDa). С помощта на йонообменна хроматография успява да изолира и охарактеризира четири от неговите субединици (EvH1, EvH2, EvH3 и EvH4), както и кодиращата част (сДНК) на гена на субединица 5. След секвениране установява, че изолираната сДНК кодира протеин съставен от 435 аминокиселини остатъци (№3). Прилагайки съвременни физични методи (ESI, MALDI и MALS) той характеризира хемоцианини и от други мекотели - *Octopus vulgaris*, *Sepia officinalis* и *Rapana venosa* и доказва, че докато хемоцианините от *O. vulgaris* и *S. officinalis* са изградени от един тип субединици (с мол. маси съответно 359.3 kDa и 443.8 kDa), то хемоцианина на *R. venosa* е съставен от две субединици с Мм 422.8 kDa и 400.0 kDa, агрегиращи в дидекамери. Всяка от двете субединици пък е изградена от осем функционални мономери с Мм 50 kDa (№ 4). Реасоциацията на хемоцианина от *R. venosa*, наблюдавана чрез електронна микроскопия, показва, че

субединиците агрегират в спирални тубули и мултидекамери с различна дължина. Върху агрегацията оказват влияние както рН, така и концентрацията на Ca^{2+} и Mg^{2+} , но влиянието им е различно за различните хемоцианини (№ 5). Конформационната стабилност на хемоцианина от *R. venosa* е изследвана и чрез КД. Установено е, че много от неговите вторични структури остават стабилни в широк рН и температурен интервал. При неутрално рН те запазват структурата си дори при 80°C - 90°C, което се обяснява със стабилизиращото влияние на четвъртичната структура на холопротеина върху вторичните структури (№ 5 и 6). Стабилната четвъртична структура пък се свързва със стабилизиращото влияние на въглехидратните остатъци. В хемоцианина на *E. verrucosa* Долашки идентифицира три потенциални центъра за О-гликозилиране в позиции 444-446, 478-480 и 547-549 (№ 3).

в) Мед-съдържащи протеини тип III (№ 6, 7, 8 и 9).

Мед-съдържащи протеини с три медни атоми в активния център са тирозиназите и сродните им катехолоксидази. В трудовете на Долашки обект на проучване са неизследваните досега са тирозинази от *Streptomyces albus* и *Laceyella sacchari*. Чрез утаяване на избистрени клетъчни лизати от двата бактериални щама с амониев сулфат и ултрафилтрация, са изолирани две тирозинази с молекулни маси 30096 Da и 30910 Da, които показват хомоложност с други стрептомицетни тирозинази (№ 8). За разлика от еукариотните тирозинази, те не са гликозилирани. Тирозиназата от *S. albus* е изследвана както за монофенолазна, така и за дифенолазна активности спрямо субстрати L-тирозин и L-DOPA/допамин. Нейният рН оптимум е определен на рН 6.8 (№ 6 и 8).

Заслужават внимание изследванията свързани с разкриването на латентна о-дифенолоксидазна активност във функционалната единица RvH1 от хемоцианин на *R. venosa*, която се проявява след третиране с SDS, трипсин и урея и в присъствие на L-Дора и/или допамин. Тъй като нативната RvH1 няма такава активност, Долашки допуска, че химическите реагенти откриват/освобождават активния ензимен център, който в нативната функционална единица е екраниран (№ 9).

г) Други трудове (№ 10 и 11).

Последните две публикации от списъка на трудовете свързани с конкурса са посветени на изучаването на биологичните ефекти на хемоцианини от молюски. Хемоцианини от *Helix lucorum*, *Rapana venosa* и *Megatura crenulata* и техните функционални единици са изследвани за антитуморна активност спрямо човешки туморни клетъчни линии от рак на пикочния мехур (CAL-29 и T24). Установено е, че те причиняват както апоптоза, така и некроза, като ефектът им е по-силен от този на референтния доксорубицин. Изследваните гликопротеини повлияват генната експресия, причинявайки видима промяна в белтъчния профил на туморните клетки. Наблюдавано е понижено ниво на експресия на 8 от основните белтъчни фракции и повишено ниво на 2 други, което се свързва с индуцираната апоптоза (№ 10).

Хемоцианини от *R. venosa* и *H. aspersa* и техни субединици са изследвани и за антибактериална активност спрямо патогенни щамове на *Staphylococcus aureus*. От тях най-силен ефект е наблюдаван при субединица β -HаН от хемоцианина на *H. aspersa*. Освен срещу *S. aureus* и *S. epidermidis*, той проявява антибактериална активност и спрямо *Escherichia coli* (№ 11).

4. Научни проекти

Гл. ас. д-р А. Долашки има успешна проектна дейност както на национално, така и на международно ниво. Той е участник в разработването на 27 научни проекта с национално и чуждестранно финансиране. Бил е ръководител на два проекта финансиран от МОН и ръководител на българските колективи в три съвместни проекти с Германия, Китай и Белгия. Понастоящем участва в разработването на Националната научна програма „БиоАктивМед“, финансирана от МОН. В своята изследователска дейност той работи в тясно сътрудничество с изследователи от различни български университети и институти, както и с учени от университетите в Тюбинген, Германия; Маинц, Германия; Падова, Италия; Гент, Белгия; Киев, Украйна и Циндао, Китай.

5. Лични впечатления

Бил съм рецензент на проекти и статии на А. Долашки и съм впечатлен от педантичното им оформление. Впечатлен съм и от неговото умение да търси и намира приложение на фундаментални научни резултати в практиката. Той умее да работи в колектив, както и да създава и ръководи научни колективи, което е предпоставка за бъдещите му успехи.

Заключение: В заключение мога да кажа, че гл. ас. д-р инж. Александър Долашки е изграден изследовател в областта на биоорганичната химия и по-конкретно в изучаването на мед-съдържащите металопротеини, каквито са супероксид-дисмутазите, тирозиназите и хемоцианините. В тази област той е публикувал 50 научни статии във водещи международни списания по биохимия, биоорганична химия и молекулярна биология, които са цитирани повече от 500 пъти в световната литература. От началото на своята научна дейност досега той демонстрира висока и неотслабваща активност, благодарение на която е утвърдил името си на задълбочен и уважаван изследовател не само у нас, но и в чужбина. Справката за изпълнение на минималните национални изискванията показва, че той има 1840 точки. С това той многократно надвишава официалните критерии на НАЦИД, БАН и ИОХЦФ за заемане на академична длъжност „доцент“ в област на висше образование: 4. „Природни науки, математика и информатика“, професионално направление: 4.2. „Химически науки“, научна специалност „Биоорганична химия, химия на природните и физиологично активните вещества“. Това ми дава основание убедено да препоръчам на уважаемото Научно жури, назначено да проведе настоящия конкурс, както и на НС на ИОХЦФ да му я присъдят.

София, 12.09.2019 г.

Рецензент:

/Акад. Иван Иванов/