

## **Рецензия**

**От доц. д-р Маргарита Топашка-Анчева, върху** дисертационният труд на Петър Остоич, редовен докторант по специалност „Екология и опазване на природната среда“ (шифър 022201) в Институт по биоразнообразие и екосистемни изследвания, БАН

На тема: **„Екотоксикологичен биомониторинг - принципи, концепции и приложение при гръбначните животни“** с Научен ръководител: проф. д-р Румяна Мечева и Научен консултант: доц. д-р Михаела Недялкова.

**Общи данни за докторанта:** Докторантът Петър Остоич е бакалавър по биохимия и клетъчна биология в Международния университет „Якобс“, Бремен (Германия) (2003 -2006). Той получава магистърска степен (MSc) по история на науката, технологиите и медицината в University of Manchester, Център по история на науката, технологиите и медицината. Като студент той е носител на специално отличие за магистърската разработка относно въвеждането на рентгеновите лъчи в медицината във Великобритания. По този начин още като студент той получава значителни знания върху влиянието на рентгеновите лъчи върху живите организми. Тези знания позволяват да работи като научен сътрудник във Френски комисариат по атомна енергетика (СЕА), Париж (Франция) и да изпълнява научна дейност, по европейския проект RISC-RAD, свързан с рисковете от онкологични заболявания от йонизиращите лъчения. По късно вече в България, той е научен сътрудник в Национален център по радиобиология и радиационна защита (НЦРПЗ) София, където участва в провеждане на мониторинг с кометно изследване на работници от АЕЦ, Козлодуй. От началото на 2015 до края на 2017 година е редовен докторант, а от началото на 2018 г асистент в ИБЕИ, БАН.

**Актуалност на изследвания проблем.** Представеният за рецензиране труд се отнася до един основен, изключително важен и интересен проблем свързан е екотоксикологичните изследвания. Макар и конкретните научни изследвания в тази област да се увеличават непрекъснато, обобщителните трудове в тази насока не са много. В контекста на казаното, **проблемът**, който разработва в дисертационния си труд докторантът П. Остоич е **актуален** и представените подробни литературни данни и техният анализ представляват определен принос в развитието на това направление на екологичната наука.

**Поставената цел** да се направи обобщаващ, критичен анализ на съвременните постижения и общото състояние на познанията в областта на екотоксикологичния биомониторинг чрез използване на дребни видове гръбначни животни, е **важна** и нейното сполучливо разрешаване има важно значение и за бъдещото **развитие** на изследванията в това направление. За постигането на поставената цел при разработката на дисертационния труд са формулирани **три основни задачи**, които включват синтез и критичен анализ на най-често използваните научни методи в екотоксикологичния биомониторинг на сухоземните гръбначни животни; да се дискутират два вида основни замърсители, токсични елементи и радионуклиди,

като се акцентира на техните ефекти върху околната среда, механизмите на биологично действие, както и върху мониторингови проучвания на дребните бозайници; да се проучи в детайли екотоксичността на радионуклидите, както и на два характерни токсични метала: олово (Pb) и кадмий (Cd) и да се обсъдят основни мониторинжни видове дребни бозайници и се анализира техният потенциал като обекти и модели в екотоксикологичния биомониторинг, да се разгледат видовете особености на животните и да се посочат тези от тях, които са особено перспективни за провеждане на мониторингови изследвания.

Дисертационният труд включва и обзор на радионуклидите като токсикант в екосистемите. Разгледани са трите основни изотопа от гледна точка на биологичните и екологични ефекти от техногенни радиационни замърсявания ( $^{137}\text{Cs}$ ,  $^{90}\text{Sr}$  и  $^{131}\text{I}$ ), чиято роля се дължи на тяхното химично поведение и биоаккумуляция в организмите, както и от сравнително дългия, в случая на  $^{137}\text{Cs}$  и  $^{90}\text{Sr}$  период на полуразпад, означаващ дълго присъствие на изотопите в околната среда. Темата продължава да е актуална и в контекста на една авария в световен мащаб, каквато е тази от Фукушима, 2011 г.

За осъществяване на поставената цел и за решаване на конкретните задачи докторантът е проучил впечатляващо количество научна литература. Списъкът на използваните литературни източници съдържа 368 заглавия. Той е прегледал и анализирал научни доклади, статии, монографии и други източници. Използваните литературни източници са подбрани съобразно тяхната информативност, близостта им към проблема, дали подлагат на задълбочено обсъждане поставените проблеми и до колко допринасят за отговорите на конкретните въпроси в рамките на поставената в дисертацията цел.

**Анализ на дисертационния труд.** Дисертационният труд на докторант Остоич е написан общо на 214 страници и е структуриран предвид особеностите на темата както следва: Увод 16 сс., Цели и задачи 1с., Основният текст включва: Методи в екологичния биомониторинг – 35 сс., Основни замърсители в околната среда и техните биологични ефекти - 92 сс., Мониторни видове дребни бозайници – 29 сс., Изводи – 6 с. Приноси – 1 с., Библиография - 31 сс. – 268 заглавия. Ръкописът съдържа още 2 Таблици и 87 фигури, от които 68 прецизно изработени графики и 19 цветни микрофотографии.

Дисертантът разглежда подробно методите в екотоксикологичния биомониторинг, като подчертава направеното в 80-те години стандартизиране на тези методи във всички държави от бившия СИВ. Като принос на България в разработването на тези въпроси е посочено създаването на фонова станция на връх Мусала, както и импактна станция в района на КЦМ Пловдив..

В текста се описват подробно класическите **морфофизиологични методи**, като се посочва оценката, която може да се даде относно влиянието върху животнските организми на замърсяването с тежки метали. Отбелязва се, че да се достигнат статистически значими резултати при този метод са необходими големи експериментални извадки и комбинирано прилагане на подхода съвместно с други методи като спектрометрична оценка на нивата на даден токсикант в организма на животните, хистопатологичен анализ и др.

Сериозно внимание е отделено на **хематологичния метод** като един от класическите методи за оценяване на общото физиологично състояние на организма. Дисертантът

подчертава, че едно от главните приложенията на метода на хематологичните индикатори е при отчитането на ефектите на конкретни токсиканти, които влияят върху хематопоезата и/или се натрупват в костния мозък. При ниски дози от даден токсикант и в случай, че той е кластоген, за по-сигурни резултати се препоръчва комбинация с други методи, с по-нисък праг на дозата за биологичен отговор, каквито са цитогенетичните методи.

В изложението личи особения интерес на докторантът към цитогенетичните методи и той описва подробно техните особености. Според него, анализът на хромозомни аберации в метафазни клетки на бозайници е сигурен, надежден и утвърден метод за оценка на въздействието на определени видове токсиканти в организмите, а недостатъците му се изразяват преди всичко в това, че цитогенетичните техники са сравнително трудоемки и изискват време за наблюдение и анализ на данните както и че за неговото прилагане са необходими много високи специфични умения.

За методът за отчитане на сестринските хроматидни обмени (SCE) се посочва, че се използват в токсикологията като прогностичен маркер за генотоксичност. И въпреки неговата бързина и добра прогностична стойност при скрининг за генотоксичност на различни химикали, дисертантът не пропуска да отбележи и неговите недостатъци - по-висока и често варираща спонтанна честота на SCE в сравнение с „класическите“ хромозомни аберации; необходимост от поддържане на популация от дялящи се клетки, при използване на бромдезоксигуанидин като не трябва да се забравя, че самият реактив индуцира SCE и по-ниска специфичност на метода по отношение на някои характерни кластогени в сравнение с отчитането на хромозомни аберации.

В дисертационния труд е описан стандартен протокол за блокиране на клетки на бозайници в състояние на псевдомитоза с две ядра, като този метод е стандартизиран и за отчитане на **микроядра в лимфоцити**. Посочено е, че е доказано чувствителен и информативен при провеждането на проучвания за генотоксичност в клетъчни култури от бозайници, като се прилага успешно и в лимфоцити от кръвни проби. Сред недостатъците на *in vivo* теста при диви гризачи е неговата неспецифичност. Различни фактори, които не са свързани със замърсяването на околната среда, могат да допринесат за появата на микроядра в червените кръвни телца. Сред тях са: пол, възраст, инфекциозни заболявания и др.

Дисертантът не е пропуснал да разгледа подробно и един нов, модерен метод т.н. кометен анализ за изследване на ДНК уврежданията. Придържайки се към подчертана обективност при характеризирането на методите, П. Остоич изрично подчертава, че методът е бърз, лесен и удобен, като в добавка изисква по-малък брой клетки от необходимите за цитогенетични изследвания и микроядрен тест, но се влияе от редица фактори: пол, възраст, индивидуални генетични/епигенетични особености, хранителен режим, нива на физическа активност, инфекции, и др.

Посочено е създаването на спектрометрични техники за измерване на съдържанието на елементи и съединения в тъканите на живите организми. В биологичните науки най-често срещаните методи са атомноабсорбционна спектроскопия (AAS), неутронно-активационен анализ (NAA), индуктивно свързана плазмена мас спектрометрия (ICP-MS), топлинна йонизационна мас спектрометрия (TIMS), като съществуват различни варианти и комбинации

от уреди, детектори и спектрометрични протоколи и техники. Важен извод в тази част на ръкописа е че, спектрометричните и други техники са абсолютно необходими за екоотоксикологичните проучвания.

Не са пропуснати и съвременните тенденции в екоотоксикологичния биомониторинг, а именно използването на неинвазивни методи за събиране на биологичен материал за изследване. По този начин ще се избегне унищожаването на животни, особено когато става дума за защитени видове.

Прави впечатление, че при крайните заключения относно информативността и значимостта на получените резултати дисертантът е успял да покаже предимствата на всеки от използваните тестове и да помогне на бъдещите изследователи в областта на екоотоксикологията да се спрат на тези от тях, които ще им дадат най-надеждната информация за решаване на съответния проблем. Положителна оценка заслужава и това, че при крайните си заключения относно информативността и значимостта на получените чрез отделните методи данни се препоръчва съвместното прилагане на няколко метода при провеждане на екоотоксикологичен биомониторинг.

Във **втория раздел 2** са представени данни за основни замърсители в околната среда и техните биологични ефекти.

**В 2.1.** е направен обстоен преглед на изследванията за селективното натрупване на олово в организма на бозайниците, създаването на биокинетичните модели, които позволяват проследяване на обмена на метала между различни органи и системи. Дисертантът е открил в литературата и посочва, че поради ниски нива на мутагенност в използвания тест на Еймс първоначално не се е считало, че оловото директно уврежда ДНК. По-късно, обаче, е установено, че се наблюдават статистически значими повишения в нивата на хромозомните аберации. Също така е подчертал, че лабораторните животни са по-чувствителен модел за изследване за генотоксичност на оловото в сравнение с клетъчните култури и реагират при доста по-ниско дозово натоварване. Нови изследвания потвърждават теорията, че механизмите на увреждане на ДНК при интоксикация с олово се дължат на два основни фактора: генериране на оксидативен стрес чрез потискане на нивата на активен глутатион в клетките, и потискане на механизмите на ДНК репарацията.

Приведени са множество данни за влиянието на оловото върху хематопоезичната система, нервната система, черния дроб. Особено силно впечатление ми направи Таблица 2.1. за проследяване на генотоксичността на оловото чрез използването на различни тест системи, изработена от Garsia-leston et al., (2010), която показва, че при *in vivo* условия резултатите за генотоксичния ефект на оловото са най-често положителни и само в няколко от случаите са отрицателни.

В дисертационния труд се обръща внимание и на възможността за въвеждане на двойноверижните скъсвания и други молекулярни индикатори като биомаркери за оловноиндуцирани генетични дефекти. В подкрепа на тези твърдения, Остоич представя данните на Pottier et al., (2013). Въпреки привлекателността на тези факти, ще изразя известни резерви към тяхната еднозначност, тъй като в използваните от тези автори клетъчни линии *in vitro*, произхождащи от злокачествено изродени ракови клетки на пикочния мехур, може да се

очаква по-голяма чупливост на ДНК нишките и едва ли повишаването на двойноверижните разкъсвания и загубата на теломерите (нали те се губят и при злокачественото израждане и при имортилизацията на клетките *in vitro*) е свързано само със специфичното действие на оловото.

В своето изложение Остоич се спира и на различни варианти на екотоксикологични изследвания, при които дребни бозайници продължително се третират с оловосъдържащите токсиканти. Подробно са описани екотоксикологичните експерименти с лабораторни мишки и гюнтеровите полевки, провеждани от български специалисти. Посочени са данните за натрупването на олово, кадмий, цинк и мед, отчетено е нивото на хромозомните аберации, кислородната консумация, терморегулация, растеж и основни хематологични показатели.

Въз основа на проучената литература дисертантът прави заключението, че класическата органна и тъканна токсичност на оловото е добре проучена и макар че данните за генотоксичност и канцерогенност на оловото са много и убедителни, то конкретните механизми за тази генотоксичност все още са предмет на изследвания, като повечето автори са склонни да приемат про-оксидативните състояния на организмите. Цялостното заключение от подробното изложение за цито- и гено-токсичността на оловото направено от дисертанта е, че различните тест-системи използвани в биологичния мониторинг реагират по различен начин, което недвусмислено потвърждава логичното предположение за задължителното използване на различни тестсистеми в екотоксикологичните проучвания.

**В раздела 2.2** дисертантът разглежда токсичното и генотоксично действие на кадмия. Подчертано е че кадмият си остава един най-важните замърсители, който е обект на системно проучване в екотоксикологията и биомониторинга. Излагайки подробно различните изследвания той привежда сериозни данни, обясняващи действието на Cd за увреждане на ДНК репариращите ензимни системи, на транскрипционните фактори и РНК модифициращите ензими като основна причина за цитотоксичност и канцерогенност на метала. Подчертава се също така понижаването на нивата на глутатиона и другите антиоксидантни метаболити в клетки и серум на бозайници подложени на кадмиево въздействие. Добро впечатление прави подробното и с разбиране изложена описание на молекулните механизми на действието на кадмиевите йони. Твърде интересни са приведени данни за това, че ниските концентрации на кадмиеви йони увеличават активността на системите за репарация на двойноверижните скъсвания, а при по-високите от 30  $\mu\text{M}$  Cd се наблюдава потискане на системите за нехомоложно снаждане, при което пораженията, изразени чрез появата на микроядра в клетките продължават да нарастват.

**В Раздел 2.3 „Радионуклиди“** дисертантът посочва, че те са едни от най старите присъстващи в природата токсиканти от значение за екосистемите. Част от космическите лъчи са високоенергийни и плътно йонизиращи, което ги прави малка част от общата доза, но същевременно биологично значим компонент от радиационния фон. В обособен подраздел са представени най-важните техногенни нуклеотиди, техните периоди на полуразпад и типове излъчване. Базирайки се на научните данни Остоич сочи, че най-характерният и най-важен за човека и околната среда радионуклид е  $^{131}\text{I}$ , който се натрупва в щитовидната жлеза особено на децата. Радиоактивният цезий с изотопи  $^{134}\text{Cs}$  и  $^{137}\text{Cs}$  също е един от основните техногенни замърсители. Стронций-90 е третият по важност техногенен радионуклид тъй като е химически

аналог на калция и като такъв се натрупва в организма предимно в костите, нервната тъкан и кръвотворните органи. Обсъждайки наличните данни дисертантът аргументирано приема, че посочените три нуклеотида са значими в контекста на екологичния мониторинг. Приведени са интересни конкретни примери за натрупване на  $^{137}\text{Cs}$  в някои видове гъби и от там по хранителната верига в животни, които се хранят с тях.

Дисертантът разглежда подробно получените резултати от влиянието на различните дози облъчване. Много интересни са приведените данни (Rodgers et al, 2001) според които системите за ДНК репарация засилват активността си при повишени нива на природния радиационен фон. Подобни резултати са получени и за *Myodes glareolus*. Някои изследователи твърдят, че бозайниците се адаптират към хронични повишения на общия радиационен фон, а други показват, че дори много ниски нива водят до повишения в ендогенните нива на мутагенеза и геномна нестабилност. Интересни са приведените от дисертанта данни за изследване проведено в райони с различна степен на радиоактивно замърсяване в Беларус. Авторите установяват увеличаване на честотата на хромозомни аберации и полиплоидия, което вероятно е резултат от настъпване на трайна геномна нестабилност. Тези данни лежат в основата на концепцията за „придобитата геномна нестабилност“. Всичко това навежда на мисълта, че тези насоки на биологичния мониторинг се нуждаят от много допълнителни изследвания.

**Раздел 3** озаглавен „Мониторни видове дребни бозайници“ обхваща 31 страници от представения ръкопис. В него по-специално внимание заслужава **3.2 – Основни критерии за подбор на мониторинни и индикаторни видове дребни бозайници**. В него се посочват основните причини тези видове да бъдат избрани за целите на подобен тип изследване. Обръща се внимание върху базовата им позиция в трофичните вериги на екосистемите, краткия жизнен цикъл, относително високата популационна численост и добре познатата им биология, поведение, хабитати и екологични ниши. Дисертантът подчертава недвусмислено, че това са животни, чиято физиологична реакция позволява екстраполация на получените резултати към други видове бозайници и използването им като моделни организми за оценка на риска при човека. В детайли са разгледани всички характеристики на пет вида от сем. *Cricetidae* (*Microtus arvalis*, *Myodes glareolus*, *Microtus oeconomus*, *Chionomys nivalis*, *Microtus guentheri*) и два от сем. *Muridae* (*Apodemus flavicollis* и *M. spretus*). Видът *M. glareolus* е особено интересен с това, че поради това че е предимно растителнояд притежава възможност за силна биоаккумуляция на радиоизотопи, което е показано в изследванията след Чернобилската авария. Докторантът обръща внимание на нарастващото значение снежната полевка (*Chionomys nivalis*). Тъй като е характерна само за високите части на планините в Европа и югозападна Азия и е биотопично привързана към каменисти местности с ниска растителна покривка, *Ch. nivalis* много добре може да се използва за проследяване на общото състояние и промените в алпийските екосистеми. Видът е отлично характеризирани, като са правени сравнителни проучвания между полевки от Рила и други планини. В дисертацията са посочени публикации на български и словашки автори. Подробно са представени и изследванията върху видовете от р. *Mus* и р. *Apodemus*.

**Значимост и убедителност на получените резултати.** Представеният от докторантът П. Остоич дисертационен труд притежава несъмнени достойнства, като сполучлив опит за

представяне, критична оценка и възможност за извеждане на съответните заключения от огромно количество литературни данни, събрани и обработени от него, отнасящи се до проучвания в областта на екотоксикологичния мониторинг. Дисертантът обективно е отразил приносът на българските специалисти в това направление.

Към представения ръкопис могат да се направят и някои критични бележки, които не намаляват неговите достойнства.

### **5. Бележки и въпроси към дисертационния труд и към самия докторант .**

Може да имаме претенции към докторанта за пропуски в цитираната литература, но не бива да забравяме, че лавината от научни статии и доклади е огромна и изчерпателно цитиране може да се постигне само при разглеждане на много тясна научна област. Въпреки това смятам, че е трябвало да обърне по-голяма внимание на българските автори. Имам предвид **"Геномна Биомаркерна Тест Система за оценка състоянието на екологичния риск предложен като Ръководство за целите на зоомониторинга"** (Михайлова и съавт. 2013). Липсват някои по-стари обзори като например Swierenga S., Gilman, J., McLean, J. (1987). Cancer risk from inorganics. *Cancer Metastasis Rev.*, 6, (2):113-154. В целия текст в разделите за детоксикация е използван терминът „метод“, вместо „начин“. Излишни са данните за лабораторните видове и тяхното използване в медицинските изследвания. На места има противоречиви твърдения (с.150), повторения на вече изказани съждения (с.87), на много места текстът се нуждае от редакционни поправки, за да стане по-точен и по-ясен. Представеният текст на автореферата няма „Съдържание“. Пропуск на разработката е липсата на обобщителни таблици относно действието на разглежданите токсиканти, което при бъдещо публикуване е задължително.

Имам следните въпроси: 1. Как докторантът ще обясни твърдението си, че детоксикацията на оловото в живия организъм за момента е труден процес? 2. Защо според него нивото на глутатионът не може да се използва като надежден маркер на действието на даден токсикант? 3. Има ли връзка между мутагенното и канцерогенно действие на кадмия? 4. Какво е неговото собствено мнение за биологичното действие на ниските дози радиоактивно облъчване и имат ли те значение за микроеволюционните процеси в популациите?

**6. Характер на научните приноси.** Резултатите от своето изследване докторантът е обобщил в 5 основни приноса. Два от тях имат оригинален характер. Те се отнасят до: За първи път в България е проведен цялостен анализ на екотоксикологичния мониторинг на сухоземните екосистеми. Анализирани са същността и значението на най-често използваните методи, три от най-значимите токсиканти и основните европейски мониторинжни видове дребни гризачи. За първи път е изготвен цялостен анализ на наличната информация за радиоекологичните проучвания в сухоземните екосистеми. Обсъдени са подробно дискуссионни въпроси за нискодозовите ефекти и в частност на придобитата геномна нестабилност. Представени са нови резултати, засягащи изменения в сперматогенезата при гризачите в ниския и много ниския дозов диапазон.

Като потвърдителни приемам приносите за направения анализ на познанията за важните замърсители – тежките метали олово и кадмий. Обобщени са съвременните проучвания, установяващи някои основни механизми и направен сравнителен анализ тяхната на общата токсичност, генотоксичност и ко-генотоксичност в мониторинжни видове дребни гризачи.

Сериозен принос е и детайлно описание и сравнение на седем основни мониторни вида дребни гризачи. Изготвен е анализ на минали проучвания с използването им, както за екотоксикологичен, така и за радиоекологичен биомониторинг. Направен е сравнителен анализ на тяхната приложимост за различни типове проучвания, както и прогнози за тяхната перспективност. Приемам предложените от дисертанта приноси.

**7. Оценка на качеството на научните трудове, отразяващи изследванията по дисертацията;** В процесът на обучение докторантът е получил 442 кредита. Представил е списък на публикации свързани с дисертационния труд. Списъкът включва 4 отпечатани доклада от участие в конференции и 3 приети за публикации, една от които в списание с импакт фактор. Докторантът е представил и списък за участие в 5 научни конференции със 7 доклада.

**8.** Приемам, че дисертационният труд е лично дело на дисертанта, макар че приносът в неговото разработване и окончателно оформяне на научният ръководител проф. Р. Мечева и научния консултант доц. М. Недялкова е безспорни. Текстът е представен на точен и разбираем научен език и съдържащите се в него данни, разсъждения и интерпретации са на много високо ниво. Личните ми впечатления от П. Остоич са, че той притежава много добра биологична подготовка, отнася се отговорно към поставените задачи и умее да работи в колектив,

**Заключение.** С представеният дисертационен труд докторантът Петър Остоич се представя като много добре подготвен теоретично специалист в областта биологичния мониторинг. Той е събрал, анализирал и интерпретирал задълбочено голямо количество научни данни. Направил е съпоставка на различни становища относно механизма на действие на различните избрани от него токсиканти и е посочил нерешените все още проблеми. Неговият дисертационен научен труд ще бъде много полезен за всеки специалист у нас, който се занимава или реши да се занимава с проблемите на биологичния мониторинг. Това ми дава основание да препоръчам на почитаемото жури да присъди на дисертанта Петър Остоич научната и образователна степен „доктор“.

02.04.2019

Рецензент: доц. д-р М. Топашка-Анчева