

БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ

ИНСТИТУТ ПО БИОРАЗНООБРАЗИЕ И ЕКОСИСТЕМНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ

АВТОРЕФЕРАТ

на

ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД

на Петър Владиславов Остоич

редовен докторант

по научна специалност „Екология и опазване на екосистемите”

(шифър 022201)

**Тема на дисертационния труд: „Екотоксикологичен биомониторинг - принципи,
концепции и приложение при гръбначните животни”**

Научен ръководител: проф. д-р Румяна Мечева

Научен консултант: доц. д-р Михаела Недялкова

СОФИЯ

2019 г.

Дисертационният труд е с обем 214 страници и съдържа информация от 368 анализирани източника.

Защитата ще се състои на от часа, в.....

Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита от разширен колегиум на отдел „Екосистемни изследвания, екологичен риск и консервационна биология“ към Института по биоразнообразие и екосистемни изследвания – БАН, проведен на 28.01.2019 г.

Изследванията са проведени в Института по биоразнообразие и екосистемни изследвания – БАН, като дисертационният труд се представлява съвременен обзор на екотоксикологичния биомониторинг с използване на дребни гръбначни животни.

Дисертантът работи като асистент в ИГ „Биомониторинг и биоиндикация“ към секция „Биомониторинг и екологичен риск“, отдел „Екосистемни изследвания, екологичен риск и консервационна биология“, ИБЕИ-БАН.

Благодарности:

Бих искал да благодаря най-вече на научния си ръководител, проф. д-р Румяна Мечева и на научния си консултант, доц. д-р Михаела Недялкова, без които изработката на настоящия труд не би била възможна. Благодаря на ръководството и администрацията на ИБЕИ-БАН за оказаното доверие и предложената възможност да защита образователната и научна степен „Доктор“ в областта на екологията и опазването на екосистемите. Благодаря на професорите Бойко Георгиев и Васил Попов за интересните тематични курсове. Благодаря на всички, които изразиха интерес и съпричастност към изготвянето на настоящия труд. Благодаря на преподавателите Джон Пикстоун (1944-2014), Майкъл Уорбойс, Себастиан Шпрингер, Клаудия Брикс, Джеймс Съмнър и Бено-Майер Рохов, които промениха не само за мен, но и за много други, начина, по който разбираме, прилагаме и описваме научното познание. Не на последно място, благодаря на моето семейство и приятели за оказаното съдействие и морална подкрепа през дългите години академичен труд и развитие.

Декларация за оригиналност и достоверност:

Във връзка с провеждането на процедура за защита на дисертация за придобиване на образователна и научна степен „доктор“ в ИБЕИ-БАН, еднозначно декларирам:

- 1) Обсъжданията и изводите в научната продукция, които представям в процедурата, са оригинални и създадени на базата на публикации от други автори, които не са заимствани без цитиране и позоваване на оригиналния авторски труд.
- 2) Представената от мен информация във вид на копия от документи и публикации съответства на обективната истина.

Декларатор: _____
/Петър В. Остоич/

Дата: 28.02.2019 г.

Увод

Екотоксикология – същност, връзки с други дисциплини, развитие.

Екотоксикологичните проучвания се коренят в редица публикации, появили се в научната периодика в началото на 20-ти век (Bowles, 1908; McAtee, 1908). Индустриализацията на земеделието в периода преди Втората световна война довежда до масовата употреба на различни пестициди, включващи, в този период растителни производни (пиретрум, никотин), неорганични съединения (калциев арсенат, оловни съединения, меден сулфат и др.) и органични съединения (динитро-орто-крезол) (Sheail, 1985). След 1945 г. широко навлизат в употреба органофосфорни, органохлорни, органобромни и други органични препарати, сред които най-известен е дихлородифенилтрихлороетан (ДДТ). Информативни проучвания за общата екотоксичност на различни химични елементи и съединени започват да се провеждат през 50-те и 60-те години на 20-ти век. Самият термин „екотоксикология“ е предложен от Трюо през 1969 г. като съчетание от науките токсикология и тези за околната среда (Truhaut, 1977). След средата на 90-те години се появяват учебници по екотоксикология, някои от които се обновяват и преиздават досега (Newman, 2001, Hoffmann et al., 2002, Newman, 2014, Walker et al., 2012, Walker, 2014). За съжаление, трудовете далеч не са изчерпателни за специалност, която е сравнително неголяма като научен сектор и в същото време много широкообхватна и богата на специфични познания и умения. Базовата литература е твърде специфична и ориентирана до голяма степен към мониторинг на хищни птици и биомониторингови проучвания на замърсявания с пестициди и органични ксенобиотици; акцентира се върху водните екосистеми и влажните зони.

Липсата на обобщена и систематизирана информация на съвременно ниво в горепосочените направления обуславя и разработката на настоящия труд.

Актуалност на проблема

До момента съществуват няколко обобщаващи труда по екотоксикология (Newman, 2001, Hoffmann et al., 2002, Newman, 2014, Walker et al., 2012, Walker, 2014). Важни теми като екосистемните ефекти на замърсявания с токсични елементи и радионуклиди, обаче, са слабо застъпени. Съществуват обзорни статии и монографии за ролята, постиженията и приложимостта на някои видове проучвания с мониторинни видове дребни гризачи (Talmage and Walton, 1991, Ieradi et al., 1998, Shore and Rattner, 2001, Andras et al., 2006, Metcheva et al., 2008, Topashka-Ancheva and Gerasimova, 2012). Въпреки това, обобщаващ, критичен преглед на постиженията в областта на съвременно научно ниво до момента не е направен.

Настоящият труд включва обзор върху въздействието на два тежки метала в екосистемите (Cd и Pb), както и тяхната специфична токсичност и генотоксичност при бозайниците. През последните десетилетия се наблюдава известен спад в интереса на

учените към този тип замърсители, като причините са няколко: 1) в развития свят намалява добивът и приложимостта на тежки метали в индустрията и бита, производството се насочва към високотехнологични отрасли; 2) през последните две десетилетия в рамките на Европейския съюз са налице редица промени в динамиката на антропогенния натиск върху околната среда, налагат се все по-строги норми върху вредните емисии в околната среда; 3) счита се, че последиците от замърсяванията с тежки метали са добре проучени. Съществува ли нужда от аналитичен обзор на биологичните ефекти на токсичните метали в дребните бозайници? Точно в момента необходимостта от подобен обзор е особено изразена поради следните основни причини: 1) в Европа емисиите на токсични елементи намаляват устойчиво, докато в глобален мащаб те се увеличават; 2) ограничаването на добива на цветни метали в рамките на ЕС не означава, че рискът от замърсяване намалява съществено; 3) токсичните елементи са най-устойчивите замърсители; 4) установяването на нови механизми на генотоксичност и обща токсичност на тежките метали през последните няколко години обуславя появата на нови обзорни материали за тях, както и общо преосмисляне на техните биологични ефекти (Viau et al., 2008, Pereira et al., 2013, Pottier et al., 2013, Tete et al., 2014).

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}Cs , ^{90}Sr и ^{131}I), чиято роля се дължи на тяхното химично поведение и биоаккумуляция в организмите, както и от сравнително дългия, в случая на ^{137}Cs и ^{90}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. Откриват се както нови биологични ефекти, така и нови биомаркери за ефекти на йонизиращите лъчения при мониторинжни видове дребни гризачи (Okano et al., 2016). Това създава необходимост от преценка на настоящите познания и основни концепции в радиобиологията и радиоекологията, давайки основа за един от приносите на настоящия труд и съпътстващите публикации.

Цел и задачи

Целта на настоящия труд е да представи обобщен и критичен анализ на съвременните постижения и общото състояние на теоретичното и практическо познание в областта на екотоксикологичния биомониторинг чрез използване на дребни видове гръбначни животни. Този обзор включва проследяване на проучванията в конкретното поле на науката, както и прогнозиране на тяхното развитие в близко бъдеще.

За постигане на целта, са поставени следните **задачи**:

1. Да се направи синтез и критичен анализ на най-често използваните научни методи в екотоксикологичния биомониторинг на сухоземните гръбначни животни.
2. 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).
3. Да се обсъдят основни мониторинжни видове дребни бозайници и се анализира техният потенциал като обекти и модели в екотоксикологичния биомониторинг, да се разгледат видовите особености на животните и да се обособят няколко особено перспективни от тях.

За целите и изпълнението на поставените задачи са използвани редица подходи при прегледа и оценката на литературата по въпроса. Библиографската справка засяга както статии, книги и монографии на хартиен носител, така и такива, които се откриват в световните бази данни. Критериите, по които се оценяват използваните източници са тяхната информативност, релевантност към проблема, дискуссионност, цитируемост и до каква степен допринасят за отговора на конкретен въпрос в рамките на поставената цел.

1. Методи в екотоксикологичния биомониторинг

Методологията на екотоксикологичния биомониторинг има дълга история, като се усъвършенства с особено бързи темпове през последните няколко десетилетия.

1.1. Морфофизиологични методи

Класически морфофизиологични методи

Морфофизиологичните индикатори (Schwartz et al., 1968) са част от класическите методи, които се прилагат в екотоксикологичния биомониторинг (Talmage and Walton, 1991, Ieradi et al., 1998, Tice et al., 1987). Те се използват главно в популационните проучвания за отчитане на ефектите от голям брой фактори от околната среда, включително замърсявания, върху развитието на основни морфологични и физиологични показатели на индивидите. Като пример може да се даде оценката на ефекти от замърсявания с тежки метали. При наличие на олово в токсични концентрации в организма, относителното тегло на черния дроб нараства (Tice et al., 1987, Gdula-Argasinska et al., 2001). За 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. (Wlostowski et al., 2004, Wlostowski et al., 2010).

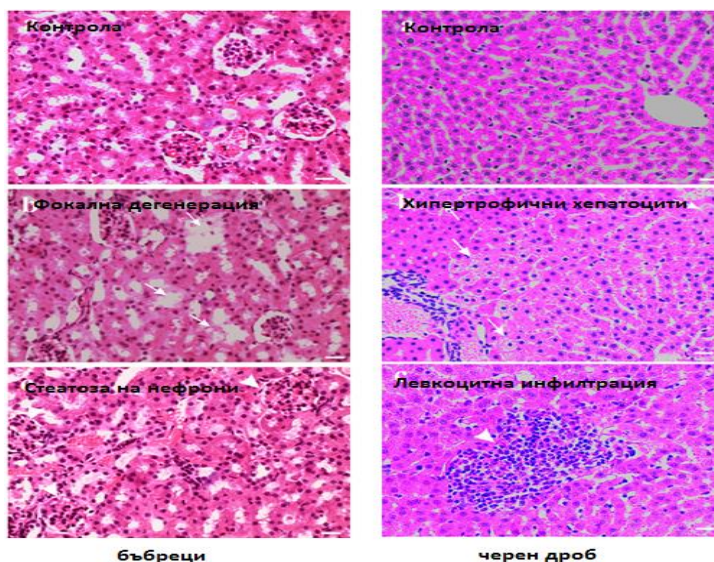
Хематологични методи

Определянето на хематологичните индекси е един от класическите методи за оценяване на общото физиологично състояние на организма. Тази група изследвания се възприема като нискоинвазивна. Основните хематологични показатели, които се следят при дребни гризачи, са брой на еритроцити (Er); хемоглобин (HGB) хематокрит (HCT); среден обем на еритроцити (MCV) и общ брой на бели кръвни телца (WBC) (Marques et al., 2006). В добавка към тези индикатори, могат да бъдат включени и специфичните типове бели кръвни клетки (лимфоцити, гранулоцити, тромбоцити) в периферната кръв (Fliedner et al., 2002). Промяната в техния брой е показател за общ стрес на организма, но този параметър не е строго специфичен за замърсявания и е възможно да се увеличава и в резултат на патогенни и имуногенни изменения в организма (Maceda-Veiga et al., 2015). Едно от главните приложения 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, каквото е оловото, за по-сигурни резултати се препоръчва комбинация с други методи, с по-нисък праг на дозата за биологичен отговор, каквито са цитогенетичните методи (Topashka-Ancheva et al., 2003, Mitkovska et al., 2012). При работа

с бозайници, винаги е желателно хематологичните изследвания да бъдат комбинирани с точни методи за определяне на дадения токсикант в организма: мас-спектрометрия (МС), атомно-абсорбционна спектрометрия (ААС), индуктивно-свързана плазмена МС (ICP-MS) и др.

1.2. Хистопатологични методи

Тези методи дават възможност да се установят редица изменения на клетъчно и тъканно ниво и са сравнително чувствителни и специфични. В някои случаи хистопатологичните изменения могат да бъдат добри индикатори за нововъзникващи промени в околната среда, а в комбинация с други методи (молекулярни, спектрометрични) да се използват като прогностични биомаркери (Wlostowski et al., 2007, Winzer et al., 2012). Пример за информативно хистопатологично изменение в черния дроб и бъбреците при ръждиви горски полевки (*Myodes glareolus*), изложени на дозово натоварване с кадмиев хлорид е представен на Фиг. 1.



Фигура 1. Хистопатологични изменения на черния дроб и бъбреците при ръждиви горски полевки (*Myodes glareolus*) по Salinska et al. (2012)

На фигурата са представени характерни ранни признаци за дегенерация на бъбреците и интоксикация на черния дроб чрез нарастване на обема на хепатоцитите и фокална инфилтрация от бели кръвни телца. Един от важните аспекти на посочения пример е, че тъканните образци, използвани от авторите, могат да служат за прогностични цели, т.е. да показват ранни етапи на поражения от тежки метали при животните, които не биха могли да бъдат констатирани с класически морфофизиологични методи. От съвременна гледна точка един от основните недостатъци на тази група от методи е тяхната инвазивност. Както при повечето техники в екотоксикологията е добре те да се комбинират със

спектрометрично измерване на съдържанието на токсиканти в обекта, с молекулярни техники и т.н.

1.3. Установяване на нивата на токсиканти в организма. Тъкани и органи-мишени.





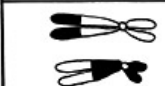


Токсичните ефекти на някои метали и съединения е известна отдавна. Въпреки това, до средата на 20-ти век на практика няма методи за измерване на съдържанието на повечето вещества в биологични тъкани и органи. С развитието на ядрената промишленост се получават възможности за синтез на радиоизотопи на голям брой химични елементи. Пример за това са радиоактивните изотопи на оловото (^{203}Pb и ^{210}Pb), които дават основата на първите биокинетични модели за този токсичен метал при бозайниците (Rabinowitz, 1998). Създаването на спектрометрични техники за измерване на съдържанието на елементи и съединения дава нови възможности за определяне на токсиканти в организмите. В биологичните науки най-често срещаните методи са атомно-абсорбционна 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. Определянето на концентрации от различни елементи става относително лесно и достъпно и с прилагането на рентгенофлуоресцентен анализ (RFA), който използва подобен принцип на атомно-абсорбционната спектроскопия (AAS). Частен случай при спектрометричните методи представлява неутронно-активационният анализ (NAA), който е чувствителен при засичане на съдържанието на определени елементи и се характеризира като недеструктивен. Определянето на радионуклиди в проби от биологични тъкани е друг частен случай, при който съществуват различни достатъчно информативни методи за анализ. По-разпространените методи като правило първоначално включват измерване на обща β -радиоактивност. В случай на повишени нива на β -активности над пределно допустимите норми се пристъпва към измерване на конкретните радионуклиди. Прието е, че β -активности под 4.8 Bq/g се считат за нормални стойности (Thorn and Vennard, 1976). Спектрометричните и други техники се считат за абсолютно необходими при провеждането на екоотоксикологични проучвания.

1.4. Цитогенетични методи

Кариотипи и анализ на хромозомните аберации в метафазни клетки

През 70-те години на 20-ти век се развиват и намират широко приложение така наречените „banding techniques“, които дават възможност за нееднородно, диференциално оцветяване на хромозомите. До момента най-често използваните техники от този тип са Q-banding, G-banding и AgNOR banding. Аберациите, които се наблюдават в метафазите,

могат да бъдат от няколко типа. Някои от най-често наблюдаваните увреждания от хромозомен тип са показани на Фиг. 2:

	INTERCHANGE	INTER-ARM INTRACHANGE	INTRA-ARM INTRACHANGE	"BREAK" DISCONTINUITY
A	 dicentric	 centric-ring	 interstitial deletion	
S	 reciprocal translocation	 pericentric inversion	 paracentric inversion	

Фигура 2. Механизми за получаване на някои от най-често срещаните хромозомни аберации в клетки на бозайници (Savage et al., 1999).

При работа с диви животни трябва да се има предвид, че голяма част от аберантните клетки са нежизнеспособни и нивото им спада с течение на времето. Това означава, че хромозомните аберации имат определена кинетика на индукция и елиминация в организма (Hall and Giaccia, 2006). При клетъчни култури може да се наблюдава обратния процес: развитие на хромозомни аберации в една майчина клетка (няколко транслокации) и тяхното прогресивно усложняване в процеса на растеж на клетъчната култура, което нерядко служи като модел на развитието на раковите заболявания (Hanahan and Weinberg, 2011). При йонизиращите лъчения, чиито биологични ефекти са много добре проучени, съществуват протоколи за цитогенетична биодозиметрия, които позволяват да се установи нивото на полученото облъчване в организмите ако не са налични физични данни. За други токсични агенти, като оловото, съществуват емпирични данни, че определени концентрации предизвикват хромозомни аберации, но конкретните механизми не са изцяло проучени. Счита се, че металите Pb и Cd взаимодействат с ДНК индиректно, като въздействат върху активностите на ензимите за ДНК репарация (Hartwig, 2001). 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. Някои от основните му недостатъци се изразяват в това, че цитогенетичните техники са сравнително трудоемки и изискват време за наблюдение и анализ на данните; при анализа на метафази са необходими много високи специфични умения.

Сестрински хроматидни обмени (SCE)

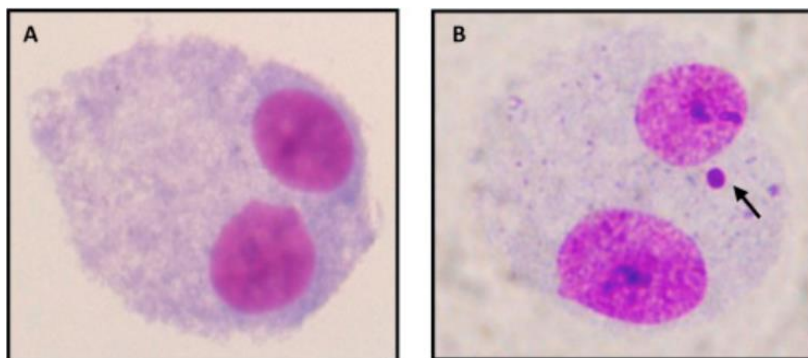
Един от методите, който намира широко приложение в токсикологията, е отчитане на обмени на сестрински хроматиди (SCE) в делящи се клетки. При SCE има различни нива на фонова честота в отделните типове клетки, тъкани и цяло тяло на животните. За клетки на бозайници вариациите са обикновено в диапазона 2-10 SCE на метафаза (Sonoda

et al., 1999). Методът за анализ на обмени на сестрински хроматиди обикновено се използва в токсикологията като прогностичен биомаркер за генотоксичност на даден реагент (Asakawa and Gotoh, 1997). Сред основните предимства на SCE като биомаркер са: сравнителна бързина и удобство на метода; по-ниски прагове на дозата, отколкото са необходими при стандартни цитогенетични анализи; утвърденост в различни видове модели (животни, клетъчни култури и др.) и добра прогностична стойност при скрининг за генотоксичност на различни химикали. Недостатъци на метода са: 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 BrdU е необходимо да се вземе предвид, че самият реактив индуцира SCE (Asakawa and Gotoh, 1997) и по-ниска специфичност на метода по отношение на някои характерни кластогени в сравнение с отчитането на хромозомни аберации.

1.5. Установяване на увреждания в ДНК

Микроядрен тест

Schmid (1975) първи стандартизира протокол за отчитане на микроядра в гризачи под въздействието на мутагени и други токсични агенти. През 1985 г. е разработен 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 (Fenech and Morley, 1986). Така се появява втората вариация на този метод, засичането на микроядра с цитокинетичен блок (CBMN). Тази вариация рутинно се използва за скрининг на генотоксичност (Фиг. 3):



Фигура 3. Общ изглед на бинуклеарни клетки с микроядра при токсикологичен скрининг на цинк и цинкови съединения в бял дроб на китайски хамстер (*Cricetulus griseus*) (Reis et al., 2015).

На базата на данните от CBMN след третиране с цинков оксид, авторите са установили, че наночастици цинкови съединения увеличават честотата на микроядра в клетки дори при много ниски дози (Reis et al., 2015). Тестът е полезен, стандартизиран и удобен за приложение, но изисква големи популации от дялящи се клетки, а това намалява неговата приложимост при проучвания с диви животни.

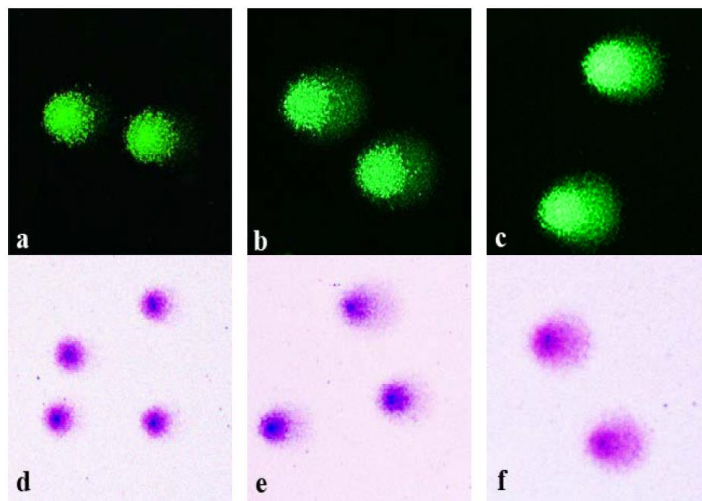
In vivo микроядреният тест в еритроцити е хронологично първи вариант на този вид методи. В общия му случай се използва кръвна натривка от бозайници, като количеството оцветени микроядра се отчита спрямо общия брой преброени еритроцити (Ieradi et al., 1998). С течение на времето тестът се усъвършенства, като се въвежда употребата на флуоресцентни ДНК-интеркалиращи багрила, което увеличава специфичността му и го прави подходящ за автоматизация с апаратура за флуоресцентно клетъчно сортиране (FACS).

Микроядреният тест в неговата CBMN версия 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. *In vivo* версията на този метод е често употребявана в екотоксикологичния мониторинг на дребните гризачи (Degrassi et al., 1999, Mitkovska et al., 2012 и др.). Сред предимствата му са сравнителната бързина на анализа и неговата ниска инвазивност. *In vivo* тестът може много добре да се комбинира с хематологични изследвания, като най-често е по-чувствителен от тях по отношение на замърсяване с определени видове токсиканти (Ieradi et al., 1998, Flidner et al., 2002, Hedde et al., 2011). 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 MN в червените кръвни телца. Сред тях са: пол, възраст, инфекциозни заболявания, наличие на микро- и макропаразити, индивидуални вариации в количеството циркулиращи еритроцити с MN и т. н. Както повечето други методи в екотоксикологията, е добре анализът на MN да се комбинира със спектрометрични методи.

Кометен анализ

Кометното изследване известно в България и като „гел електрофореза“ на единични клетки (ГЕЕК) е сравнително нов метод за изследване на ДНК увреждания. Методът е бърз, лесен и удобен, като в добавка изисква по-малък брой клетки от необходимите за цитогенетични изследвания и микроядрен тест (Ostling and Johanson, 1984), но се влияе от редица фактори: пол, възраст, индивидуални генетични/епигенетични особености, хранителен режим, нива на физическа активност, инфекции, сезонни вариации и др. (Möller et al., 2000). Съществуват три основни варианта на кометното изследване: неутрално, алкално и ензимно. В неутралното кометно изследване се използват лизиращи буфери с неутрално или слабо алкално рН, като протоколът е най-близък до оригиналния на Ostling and Johanson (1984). По-късно се появява метод с денатурираща стъпка (рН>13), който доказано може да регистрира по-ниски нива на ДНК увреждания (Singh et al., 1988). Ензимното кометно изследване е най-съвременната версия на този тест и се счита най-подходяща за установяване на много ниски нива на увреждания в ДНК (Hartwig et al., 1996). Този тип изследване включва

стъпка на ензимно разграждане с репарационни ендонуклеази преди алкалното денатуриране на ДНК. Първоначално се прилагат ензимите формамидопиримидин-ДНК-гликозилаза (FPG) и ендонуклеаза III (EndoIII), като по-съвременни проучвания използват и редица други ДНК-репарационни белтъци (Smith et al., 2006, Azqueta et al., 2015). Оцветяването и визуализацията на микрогеловете за кометния анализ може да се осъществи чрез редица методи. Тестът е развит с флуоресцентни багрила като Acridine Orange, SYBR Green, етидиев бромид (EtBr) и др. (Collins, 2004). фиг. 4:



Фигура 4. Сравнение между оцветяване със SYBR Green (a, b, c) и стандартен 5% разтвор на Гимза (d, e, f) (Osipov et al., 2014).

Илюстрацията показва увеличаване на опашката на кометите след облъчване с 3 и 6 Gy, независимо дали се използва светлинна или флуоресцентна микроскопия. При кометното изследване най-често се отчитат три основни показателя:

- 1) %DNA in tail – общо съдържание на ДНК в кометата (100%) минус съдържанието на ДНК в „главата“ на кометата.
- 2) Tail moment – дължина на опашката, умножена по параметъра „%DNA in Tail“.
- 3) Olive moment – изчислява се по формулата: Olive Moment = (|разстояние м/у „центъра на главата“ и „общия център на кометата“|), умножено по показателя „%DNA in tail“ (Olive and Banath, 2006, Azqueta et al., 2015).

Кометното изследване има следните предимства:

- 1) Приложимост в множество видове обезсмъртени клетъчни култури, както и в първични такива;
- 2) Не се изисква митотично делене на клетките, които се използват за изследването.
- 3) Не е необходим голям брой клетки.
- 4) Тестът е бърз, евтин и не изисква специфична подготовка на персонала.

- 5) С помощта на кометния тест е възможно до известна степен да се измерва ДНК репарацията, но неговата специфичност е сравнително ниска.

Заедно с изброените предимства, този метод има и редица недостатъци, които трябва да се вземат предвид при прилагането му в екоотоксикологичния биомониторинг:

- 1) Използването му при хора и животни може да се окаже не особено информативно, поради наличието на множество странични фактори, които влияят на размера на кометите (тютюнопушене, алкохол, атмосферно замърсяване, възраст – при хората, а при животните: възраст, пол, индивидуални генетични и епигенетични вариации, замърсители, стрес и др.).
- 2) Информацията от кометното изследване може да се използва само за очертаване на най-общи тенденции в състоянието на ДНК на индивидите от дадена популация и резултатите често могат да бъдат оспорвани.
- 3) Кометното изследване работи най-добре в лабораторни условия, с контролирани популации от клетки. При работа с клетки на животни и първични клетъчни култури, трябва да се има предвид, че нивата на увреждания, метилиране и разгъване на ДНК често варират индивидуално и в широки граници.

Както и при другите методи, и дори в по-голяма степен, е необходимо комбиниране с други техники като мас спектрометрия, хематологични методи и др.

1.6. Молекулни биомаркери

Измерване на нивата на детоксикационни белтъци и съединения

Установяването на нивата на детоксикационни белтъци и техните активности в клетките се прилага отдавна. Cherian and Nordberg (1983) използват техники за пречистване на белтъци (металотионеини) чрез използването на течна хроматография. Възможно да се изолират протеини в полиакриламидни гелове чрез електрофореза (SDS-PAGE) и след това техниката Western Blot. Сами по себе си нито SDS-PAGE, нито Western Blot дават ясен количествен анализ на нивата на белтъците в тъканите, клетките и клетъчните фракции. Известни са и други методи за оценка на съдържанието на основни детоксикационни белтъци в клетките. Такова е ензимно-свързаното имуносорбентно изследване (Enzyme-linked immunosorbent assay - ELISA). За белтъци като металотионеините, които имат висока степен на подобие във всички видове бозайници, е удобно да се използват ELISA китове. Протоколите за ензимно-свързани имуносорбентни изследвания са бързи, стандартни, не изискват специална подготовка, но предполагат наличие на апарати за четене на плаки във видимия и ултравиолетовия спектри.

Измервания, свързани с оксидативния стрес

Известно е, че организмите поддържат хомеостаза на кислородните радикали в клетките чрез използването на редица ензими и съединения. Сред белтъците са известни каталазата, различни пероксидази и супероксид дисмутази, като MnSOD, с наличие на

манганови йони в активния център. Простите съединения с ниско молекулно тегло, гасители на радикали, включват глутатион, витамин С и др. Редица токсиканти довеждат до про-оксидативни състояния, като биологичният отговор на тези агенти може да бъде измерен чрез оценка на физиологичните системи за гасене на радикали и общите нива на оксидативен стрес в клетките. Измерването на съотношението окислен/неокислен глутатион често се използва за оценка на състоянието на общ оксидативен стрес (Wlostowski et al., 2010). Въпреки че молекулните методи носят ценна информация, те не биха могли да бъдат информативни сами по себе си. Препоръчва се съвместното им прилагане с други методи, като хистопатологични и цитогенетични. Препоръчва се комбиниране с мас спектрометрия за определяне на съдържанието на токсиканти.

1.7. Съвременни тенденции: неинвазивни методи за пробовземане

Една сравнително нова тенденция в екотоксикологичния биомониторинг е използването на неинвазивни методи за пробовземане и анализ. При биомониторинговите проучвания е възможно, особено ако механизмите на действие и ефектът на даден замърсител е добре изучен и известен в литературата, да се оцени ефектът в популацията само като се използват данни от мас-спектрометрия за характеризация на нивата на токсикантите. При птиците е разработен неинвазивен метод с използване на оперението (Dmowski, 2000, Wlostowski et al., 2010). При бозайниците, използването на космена покривка и екскременти за определяне на съдържанието на токсиканти в организма на бозайници се налага все по-често. (Taberlet et al., 1999). В тестовете за генотоксичност все по-рядко се използват бозайници и все повече навлизат прости еукариотни организми (*Saccharomyces cerevisiae*, *Daphnia magna* и др.) и клетъчни култури (Walker et al., 2012). Съвременна е и тенденцията за въвеждане, валидиране и прилагане на математически прогностични модели за оценка на ефектите на различни токсиканти от околната среда върху организмите (Beresford et al., 2008, Vetikko and Saxen, 2010).

От направения обстоен преглед и анализ на основните методи, прилагани при екотоксикологичните изследвания може да се направи извода, че те имат ограничена информативност сами по себе си и е добре да се комбинират с други техники, особено когато при биомониторингови проучвания с използването на диви животни. При повечето от тях е необходимо да се приложат спектрометрични методи за анализ и корелация на получените данни от експерименти с нивата на токсиканти в организмите. Същото се отнася и за неинвазивните методи за пробовземане. Въпреки, че те са добри при оценка на нивата на замърсяването в определени региони, е важно да се установи корелация с биологичните параметри (Dmowski, 2000). Изборът на методи зависи от поставените конкретни задачи, типа замърсители, обектите на изследване и т.н.

2. Основни замърсители в околната среда и техните биологични ефекти

Токсичността на химичните елементи при бозайниците до голяма степен е проучена в детайли (Luckey and Venugopal, 1977, Luckey and Venugopal, 1978, Rattner, 2009). Даден елемент може да бъде токсичен или нетоксичен за живите организми в зависимост от дозата но, освен нея, има и редица други фактори, които определят биологичните му ефекти:

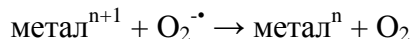
1. *Кинетиката на дозовото натоварване*
2. *Свойствата на химичните елементи и техните съединения.*
3. *Взаимодействията между различни съединения и биологичната материя.*
4. *Метаболитната активация на някои токсиканти.*
5. *Биологичните ефекти, произтичащи от възрастта и пола на животните*

С най-голямо значение и най-често проследявани при екотоксикологичните изследвания на сухоземните екосистеми са четири „цветни“ метала: Cd, Pb, Cu и Zn. Това се обуславя от техния висок потенциал за биоаккумуляция, както и от дейностите по техния добив и преработка, които нерядко са свързани с тежки локални замърсявания.

Въпреки различните механизми на токсичност на тежките метали, може да се каже, че голяма част от тях имат про-оксидативни свойства, като спомагат за генерирането на активни форми на кислорода (АФК) в клетките (Stohs and Bagchi, 1995). Основна реакция, която довежда до появата на свободни радикали е т.нар. реакция на Фентън:



В тази реакция метален йон повишава своята валентност, и взаимодействайки с молекула на водороден прекис води до появата на хидроксилен радикал. След това радикалът се свързва с биомолекули, включително ДНК (Stohs and Bagchi, 1995). Друга значима реакция е процесът на Хабер-Вайс, в чиято първа стъпка, обратно на Фентъновата реакция, металният йон се редуцира:



Двете реакции донякъде се допълват, като тези процеси могат да продължат безкрайно, водейки до повишаване на нивата на хидроксилни радикали в клетките вследствие на взаимодействие между оксидативния метаболизъм и металния йон.

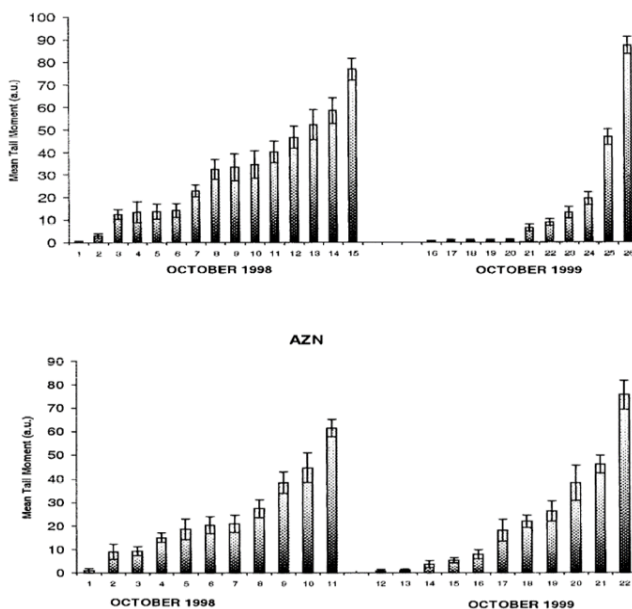
2.1 Олово (Pb)

Металът е един от най-тежките стабилни елементи, като количеството му се увеличава, тъй като стабилни Pb изотопи са крайни стадии във веригите на радиоактивен разпад на тория, урана и радона (Patnaik, 2003). Pb се явява най-често от втора валентност, като понякога, в силно киселинна среда, се среща и в +4 (Patnaik, 2003). От интерес за екотоксикологичните изследвания е преди всичко антропогенното обогатяване на метала, което е отдавнашен феномен и предизвиква остра и хронична токсичност. От Древността

идват първите сведения за токсичността на оловото. През 1983 г. Jerome Nriagu публикува статия в *New England Journal of Medicine*, озаглавена „Сатурновата подагра сред римските аристократи: свързано ли е оловното отравяне с края на Римската империя?“ (Nriagu, 1983). Авторът излага хроничното отравяне с олово при коренното население на древния Рим е една от причините, довели до краха на империята. Металът отново се появява като токсикант в периода на Индустриалната революция в края на 18-ти и началото на 19-ти век. В България Pb се добива и пречиства при обработката на оловно-цинкови и други полиметални руди в района на Мадан, като едно от основните предприятия, които прилагат процеси за рафиниране е КЦМ-Пловдив. Въпреки строгите законови стандарти в ЕС (Наредба №3 от 2008 г.) за допустимо съдържание на олово в почвите и Наредбите от 2000 г. и 2004 г. съответно за съдържание на олово в атмосферния въздух и за рециклирането на битови продукти, Pb остава един от замърсителите с висок приоритет в рамките на ЕС и на световно ниво.

Екотоксичност

Може да се приеме, че за общата екотоксичност на оловото в наземните екосистеми основен проблем са локалните замърсявания, като следствие от индустриални процеси. Едни от основните импактни региони в Европа са около Буковно, Полша и Нитра, Словакия (Salinska et al., 2012, Martiniakova et al, 2015). Пример за екологична катастрофа, включваща олово, е замърсяването на природния парк „Доняна“ в Испания като следствие от скъсана дига на хвостохранилище през 1998-а година. Пример за проучване, проведено там с *Mus spretus*, е даден на фиг. 5:

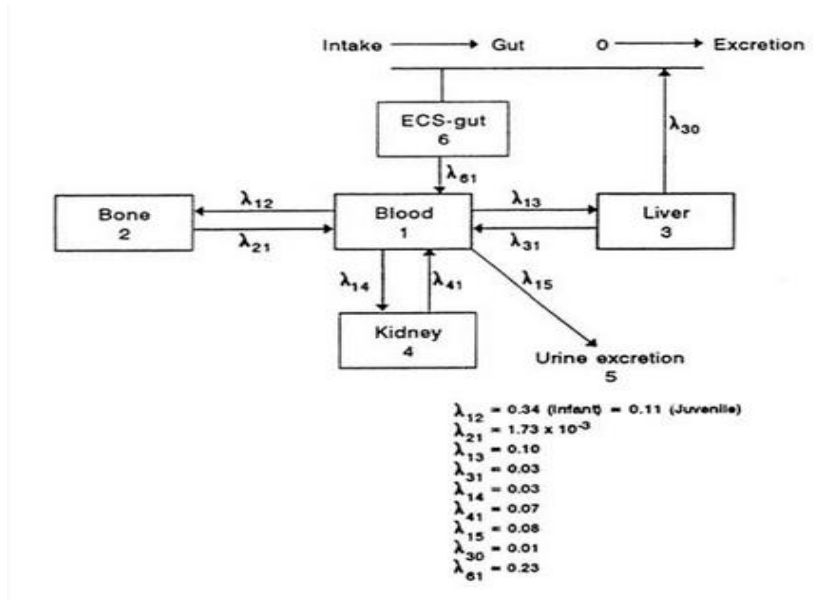


Фигура 5. Алкално кометно изследване на лимфоцити от *M. spretus* непосредствено след разлива на шлага и отпадни води. (Festa et al., 2003).

Фигурата показва превръщането на природния парк от фонев в импактен район; проследена е промяната в локализацията на замърсяването по течението на река Гуадиамар (Festa et al., 2003). Изводите от екологичната катастрофа в Испания са два: 1) дори и в съвременна Европа не са изключени сериозни замърсявания с олово и други цветни метали, и 2) мониторинговите проучвания в тази насока продължават да бъдат актуални и ценни източници на информация за състоянието на околната среда.

Селективно натрупване на олово в организма на бозайниците. Биокинетични модели. Тъкани и органи-мишени.

С развитието на ядрената промишленост в средата на 20 век, се появяват радиоизотопите ^{203}Pb и ^{210}Pb , които дават прост и надежден метод за проследяване на кинетиката на олово при бозайниците (Rabinowitz, 1998). Установява се, че след поемане на метала с храна или вода, голямата част от него се екскретира в неразтворима форма. Остри симптоми на отравяне се появяват едва когато концентрациите му в кръвта достигнат устойчиви нива от $80 \mu\text{g/dL}$. Установено е, че костите са основен резервоар на Pb в организма. При хронично отравяне се достигат устойчиви нива на метала в кръвта, което води до тежки и продължителни симптоми на интоксикация (Zelikoff et al., 1988, Tete et al., 2014). Keller and Doherty (1980). Rabinowitz (1998) и Kneip et al. (1983) разработват детайлни биокинетични модели на Pb в организма на бозайниците, като отчитат разликата в абсорбцията на олово при млади и възрастни индивиди (Фиг. 6):



Фигура 6. Биокинетичен модел за метаболизма на олово в организма на бозайниците (Kneip et al., 1983).

Моделът дава коефициенти за обмена на метала между различни органи и системи при бозайниците. Екотоксикологичните изследвания, свързани с натрупването на метала в организма на различните видове бозайници и птици, кинетиката и специфичните

поражения, които оловото нанася, остават активно направление в екотоксикологичните изследвания (Wang et al, 2010, Salinska et al., 2012, Tete et al., 2014, Martiniakova et al., 2015).

В организма на бозайниците няма система, която да не се уврежда при кръвни концентрации на олово над 80 µg/dL (Luckey and Venugopal, 1977). Съществуват, обаче, системи, които са по-податливи на интоксикация с Pb. Такива са:

- 1) Хематопоеичната система. Блокира се биогенезата на еритроцити, както и ензимите ALAD и ферохелатаза, водейки до анемия при концентрации над 70 µg/dL.
- 2) Нервната система. При 40 µg/dL устойчиво съдържание на метала в кръвта се наблюдават когнитивна дисфункция, ранна деменция и забавяне на умственото развитие.
- 3) Черен дроб. При видовете *Ap. sylvaticus*, *R. norvegicus*, *M. glareolus* и др. се наблюдават оловно-индуцирани хистопатологични лезии при концентрации над 40 µg/dL (Ma, 1989, Wang et al., 2010, Salinska et al., 2012, Tete et al., 2014).

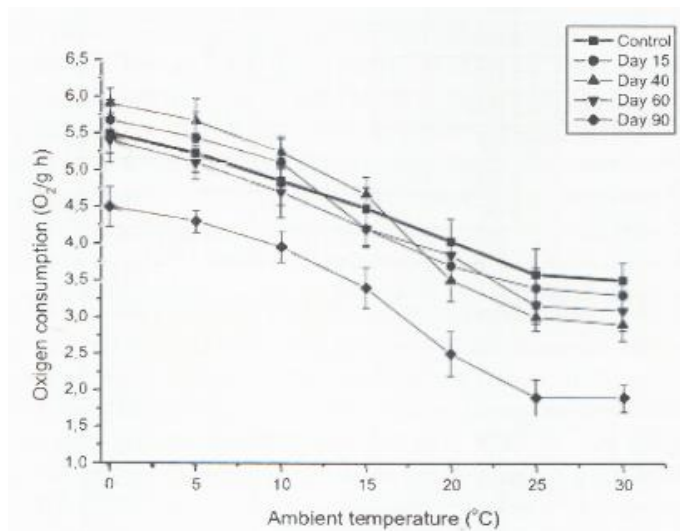
Генотоксичност и ко-генотоксичност на оловото

Поради ниски нива на мутагенност в теста на Еймс първоначално оловото не се счита за директно увреждащо ДНК (Winder and Bonin, 1993). По-късно, обаче, е установено, че се наблюдават статистически значими повишения в нивата на хромозомните аберации (Rabinowitz, 1998, Zelikoff and Thomas, 2005). При кометните изследвания, микроядрения тест и хромозомните аберации, наблюдаваните поражения са ясно дозово зависими. 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 (Valverde et al., 2001). Съвременни изследвания правят стъпки към въвеждането на двойноверижните скъсвания и други молекулярни индикатори като биомаркери за оловно-индуцирани генетични ефекти (Pottier et al., 2013 и др.).

Вариантни екотоксикологични експерименти

Съвременен вариант на екотоксикологично проучване с използване на лабораторни бели мишки BALB/c е проведено в България от Metcheva et al. (2007). Авторите използват полиметален прах от електрофилтрите на КЦМ-Пловдив и правят корелация между нивата на четири метала (Pb, Cd, Zn и Cu) в тъкани и органи-мишени на животните. Един от

параметрите, при които е установена промяна в следствие на интоксикацията с тежки метали е кислородната консумация (Фиг. 7)



Фигура 7. Кислородна консумация при бели мишки BALB/c, захранвани с полиметален индустриален прах при различни температурни условия (Metcheva et al., 2007).

Данните са сходни с тези, представни от други автори при провеждане на подобни експерименти с бозайници (Goyer and Rhine, 1973, Zelikoff and Thomas, 2005). Установено е също, че средната телесна температура на животните спада устойчиво в хода на експеримента (Metcheva et al., 2007), което е в съответствие с по-ранни наблюдения на Cooke and Johnson (1996).

Мониторингови проучвания в България и по света

Мониторингови проучвания с дребни гризачи, свързани с оловно замърсяване са провеждани от средата на 60-те години на 20-ти век (Eisler, 1988, Ma et al., 1989). Особеност на подобни изследвания е, че обикновено спектрометрични анализи се правят не само за съдържанието на олово, но и за други токсични елементи (Ma et al., 1991, Damek-Poprawa and Sawicka-Kapusta, 2003, Milton et al., 2003, Ieradi et al., 2003, Liu, 2003, Sanchez-Chardi et al., 2009, Martiniakova et al., 2010, Martiniakova et al., 2012). Известно е, че металът се натрупва предимно в костите дори и при животни с кратък жизнен цикъл, превишавайки понякога до няколко десетки пъти концентрациите на елемента в цялото тяло. Поради това се приема, че съдържанието на елемента в скелета е най-подходящият биомаркер за оловно натоваарване (Eisler, 1988, Martiniakova et al., 2015). Мониторинговите проучвания убедително доказват наличието на биомагнификация на Pb в сухоземните екосистеми.

Анализ и обобщение

В заключение може да се каже, че класическата органна и тъканна токсичност на оловото е добре проучена, като са изяснени основните тъкани и органи-мишени и са открити

прагови концентрации за детерминистични ефекти като хематологични и невробиологични ефекти в организмите. Конкретните механизми на генотоксичността на оловото при висшите организми са все още предмет на изследвания. Взаимодействията на оловото с геномната ДНК са проучени в много по-малка степен в сравнение с такива класически генотоксини като йонизиращите лъчения, UV-лъченията, алкилиращи органични агенти (DEN, MMS, MNNG), ДНК-интеркалиращи органични мутагени и дори други токсични елементи като кадмия за когото експериментално са демонстрирани механизмите на блокиране на системите за ДНК репарация (Hartwig, 1994, Viau et al., 2008). Въпреки неголемия брой механистични проучвания с олово и геномна ДНК, вече са известни молекулярни биомаркери за оловно-индуцирана генотоксичност (Pottier et al., 2013). Темата, свързана с мониторингови проучвания на оловни интоксикации е все още актуална. Друго важно предизвикателство пред науката в това направление е детоксикацията на олово в животинските организми, което за момента е труден процес. Въпреки тенденциите към намаляване на дела на нерещиклирано олово в развитите страни, всички данни сочат, че металът ще продължава да бъде значим замърсител и в бъдеще. В този контекст биомониторингът на оловните замърсявания продължава да бъде важно направление в екотоксикологичните изследвания.

2.2 Кадмий

Кадмият (Cd) е сребристобял мек метал с атомно число 48, елемент от II група на Периодичната система, към която принадлежат също така цинкът и живакът. Токсичността на кадмия става известна след началото на широкото му приложение в галванопластиката. Първоначално се установява ролята му като инхалационен канцероген. През последните години нови публикации представят резултати, които доказват, че металът предизвиква генотоксичен и ко-генотоксичен ефект (Yamada et al., 1993, Hartwig et al., 2002, Viau et al., 2008, Pereira et al., 2013). В Европа съществени замърсявания с кадмий се срещат сравнително рядко. Изключение прави районът на Буковно (Полша), където се наблюдават силни локални замърсявания с Cd (Sawicka-Kapusta et al., 1997, Wlostowski et al., 2004, Wlostowski et al., 2010). Сериозни замърсявания с метала се наблюдават в района на Тояма, Япония, откъдето произхожда болестта “итай-итай”, както и в Китай и Индия (IARC, 1993). В България източници на локални замърсявания са основно предприятията за добив и преработка на оловно-цинкови руди, като кадмият е сравнително малък компонент от общото натоварване на районите с тежки метали.

Токсичност и екотоксичност. Селективно натрупване в организма на бозайници. Тъкани и органи-мишени.

Установяването на токсичността на кадмия е факт след проучвания върху животни в периода 1955-1970 г. (Foulkes, 1986, Friberg et al., 1974, Friberg et al., 1986, Goyer, 1989).

При бозайниците уврежданията засягат предимно бъбреците, черния дроб и панкреаса, а при по-високи дози, нервната система. Като инхалационен токсин във високи дози той предизвиква пневмонити и силни отоци на белия дроб, а при по-ниски се увеличава риска от рак на белия дроб (Waalkes, 2000). Основният леталитет при остро отравяне произлиза от натрупването на метала в бъбреците и последващото унищожение на гломерулите. Това води до протеинурия, хипофосфатемия и повишени нива на урея в кръвта, последвани от цялостна загуба на бъбречната функция (Squibb et al., 1984, Friberg et al., 1986, Goyer, 1989, Leffler and Nyholm, 1996, Liu et al., 1996, Nordberg, 2009). Кадмият е също така репродуктивно токсичен. Доказано е, че уврежда сперматогенезата при дребни бозайници (Mukherjee et al., 2002). Основен механизъм за изхвърлянето му от организма взаимодействието с нискомолекулната група белтъци на металтионеина, която се свързва стабилно с кадмиеви йони (основно в черния дроб), след което се екскретира през бъбреците (Bremner, 1979, Brady, 1982, Misra et al., 1996, Klaasen et al., 1999, Wlostowski and Krasowska, 1999, Klaasen et al., 2009, Sabolic et al., 2010, Wlostowski et al., 2010). Счита се, че кадмият е опасен за бозайниците дори и в много ниски дози, при които не се наблюдават остри симптоми. Поради неефективността на физиологичната кадмиева детоксикация и тенденцията към устойчиво натрупване на метала при растенията и животните, локалните замърсявания с Cd представляват сериозен екологичен риск и като такива са обект на мониторингови проучвания, (Shore et al, 1990, Sawicka-Kapusta et al., 1990, Teodorova et al., 2003, Topashka-Ancheva et al., 2003, Pillet et al., 2006, Sanchez-Chardi et al., 2007, Wlostowski et al., 2010, Martiniakova et al., 2012).

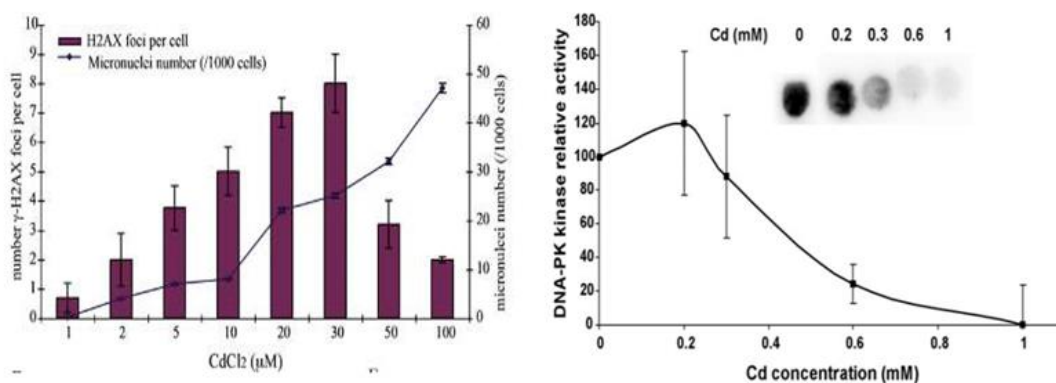
Токсичност на кадмия на молекулярно и клетъчно ниво

Подобно на оловото в биологичните системи кадмия води до увеличаване на физиологичните нива на АФК и механизмите за този ефект са слабо индуцируема реакция на Фентън в комбинация с блокиране на клетъчните системи за защита срещу АФК (Stohs and Bagchi, 1995, Dally and Hartwig, 1997). Свързването на тежки кадмиеви йони води до дерегулация на транскрипционния отговор на различни стресори, като топлина, кислородни радикали и др. (Rossmann et al., 1992, Hartwig et al., 2002), както и до супресия на ключови елементи от системите за нехомоложно ДНК-снаждане (Viau, 2008) и хипер-активация на други репаративни системи (Waalkes, 2000, Viau et al., 2008). Счита се, че дерегулацията на ДНК репаративни системи, транскрипционни фактори и РНК-модифициращи ензими е основният механизъм на цитотоксичност и канцерогенност на метала.

Генотоксичност и ко-генотоксичност

Спорът относно хипотезата, че кадмият е генотоксичен, продължава от десетилетия и едва напоследък има тенденции да се осветлят неговите генотоксични ефекти както при бозайниците така и на базата на различни еукариотни клетъчни системи (Rossmann et al.,

1992, Hartwig et al., 2002). Въпреки съществуващите доказателства, че кадмият е канцерогенен в ниски концентрации, които не предизвикват остра токсичност (IARC, 1993) и е ясно изразен кластоген и инхалационен канцероген при бозайниците (Yamada et al., 1993, Yang et al., 1996, Luckey and Venugopal, 1977, Oberdorster et al., 1994) тестът на Еймс показва ниска или несъществуваща мутагенност (Waalkes, 2000). Съществуват сравнително ранни доказателства, че Cd инхибира репаративния ДНК-синтез (Nocentini, 1987), но едва през последното десетилетие се появяват конкретни доказателства за механизмите на генотоксичност на метала на клетъчно ниво. При концентрации, надвишаващи 30µM, се наблюдава както насищане на системите за ДНК-репарация, така и активно инхибиране, при фосфорилирането на хистона H2AX и в други компоненти на DNA-PK и XRCC1-зависимите системи за ДНК репарация (Viau et al., 2008, Pereira et al., 2013), Фиг. 8:



Фигура 8: Корелация между дозовото натоварване с кадмий и инхибирането на ДНК-репарацията. Вляво: инхибиране на фосфорилирането на хистон H2AX; Вдясно: инхибиране на каталитичната активност на DNA-PK (Viau et al., 2008, Pereira et al., 2013).

Методи и подходи за детоксикация

Основна детоксикационна система на организмите са белтъците от групата на металтионеините, които се свързват с Cd²⁺ и с други метални йони. Тяхната синтеза се предизвиква от повишени нива на кадмий в организма, но механизмите все още не са напълно известни. Наблюдавани са повишения на белтъците в диапазона от няколко пъти до няколко десетки пъти (Wlostowski and Krasowska, 1999). Индукцията на металтионеин от замърсяване с кадмий се наблюдава много ясно при няколко вида мониторинни дребни гризачи и птици: *M. glareolus*, *Ap. flavicollis* и *Pica pica* (Wlostowski et al., 2004, Wlostowski et al., 2007, Salinska et al., 2013). Нито биологичните, нито фармакологичните пътеки за детоксикация на организма, обаче, не са достатъчно ефективни.

Биомониторинг на кадмий при дребните гръбначни животни.

Биомониторинговите проучвания за кадмий, най-често са свързани с полиметални замърсявания (Topashka-Ancheva et al., 2003, Metcheva et al., 2007). В световната

литература най-често използван мониторинг вид от дребните гризачи е ръждивата горска полевка (*M. glareolus*) (Wlostowski et al., 2007, Martiniakova et al., 2012, Salinska et al., 2013). Wlostowski et al. (2010) провеждат проучвания за характерни биомаркери (металотионеин, глутатион, нива на липидна пероксидация) в бъбреците и черния дроб на свраки след кадмиева интоксикация. Изследванията показват наличие на адаптивен отговор при птиците на ниво експресия на металотионеин. Въпреки това, персистиращи увреждания се отчитат в антиоксидативната хомеостаза чрез промяна в нивата на глутатион, биомолекулни увреждания в нивата на липидна пероксидация и общата цитотоксичност (Wlostowski et al., 2010).

Анализ и обобщение

Мониторинговите проучвания, свързани с кадмиевото замърсяване са перспективно направление в екоотоксикологичните изследвания. По отношение на своята кинетика на абсорбция и биоаккумуляция, както и специфична органична токсичност и генотоксичност, кадмият е добре проучен елемент. Особено информативни са проучванията, използващи съвременни техники за анализ на ефектите му на молекулярно ниво (протеини, ДНК и ДНК репарационни системи), доказващи дерегулация на репарационните системи за нехомоложно снаждане (Viau et al., 2008, Pereira et al., 2013). Въпреки това, далеч не всички ефекти на метала върху различните нива на организация на биологичната материя са изяснени. В контекста на намаляващите емисии на кадмий се счита, че в перспектива опасността от него ще намалява. Въпреки това е необходимо да има разработена методология за биомониторинг на Cd, която все още е важна, както в Европейски, така и в световен мащаб.

2. 3. Радионуклиди

Въпреки, че радионуклидите се приемат основно като антропогенни замърсители те са едни от най-старите присъстващи в природата токсиканти, от значение за екосистемите. Радиационният фон съществува винаги и навсякъде по земното кълбо и се състои от няколко основни компонента: 1) природен бета- и гама-фон, произлизащ от земната кора; 2) космически лъчения, които варират в широки граници; 3) природни изотопи като уран и торий и произлизащите от тях изотопи от дъщерната верига на разпад; 4) Техногенно замърсяване, следствие от изпитването на ядрено оръжие, военната ядрена промишленост и аварията в ядрената енергетика. За целите на екоотоксикологичния биомониторинг се вземат под внимание както повишеният природен фон, така и техногенните изменения в радиационната обстановка. Увеличаването на естествения радиационен фон вследствие особености в състава земната кора се наблюдава, например, в Керала, Индия и Гуарапари, Бразилия, където присъства голямо количество съдържащ торий пясък. Основни техногенни радиоизотопи с особена значимост за природата са ^{137}Cs , ^{131}I и ^{90}Sr . Те се отделят вследствие ядрен взрив или като отпадък на ядрената

енергетика. Над 90% от световното радиационно замърсяване с тези изотопи е следствие от аварията в Чернобил. Темата за далечния пренос на радионуклиди често се среща в екологичната литература. Например, Европейската система от високопланински обсерватории първа установява далечен пренос на радиоизотопи след аварията във Фукушима (Masson et al., 2016).

Природна радиоактивност и райони с повишен естествен радиационен фон

Съгласно Наредбата за основните норми за радиационна защита (ОНРЗ-2004) естествен радиационен фон е радиационно поле, дължащо се на естествени източници. Той се състои от три основни компонента – гама-фон, произлизащ от земната повърхност, космически лъчения и лъчения на радона и торона, които са резултат от веригите на разпад на двата основни изотопа на радона – ^{222}Rn и ^{220}Rn . Що се отнася до дозовото натоварване при сухоземните гръбначни животни, се добавя четвърти компонент – облъчване вследствие на вътрешни излъчватели – основно ^{40}K и ^{14}C . В Европа места с естествено повишение на фона се намират в райони в Алпите (Бад Гещайн), във Франция (Централен Масив), в Португалия (Доуро) и на границата между Германия и Чехия. Тези райони са значими и поради антропогенното обогатяване на радионуклиди, свързано с уранодобива. Слаби геогенни повишения на радиационния фон в България са регистрирани около обекти на бившия уранодобив (Бухово и Елешница) и в минерални води от извори около с. Ошава, Нареченските бани, Момин проход, Клисурса, Стрелча, Хисар, Чепино (Димова, 2012). Тези стойности са важни при консумацията на минерални води, но значението им за екотоксикологичния биомониторинг е сравнително слабо. По-голям интерес от гледна точка на екотоксикологичния биомониторинг представляват локалните замърсявания от минно-геоложка дейност. В Европа постоянно се провеждат мониторингови изследвания в околностите на закрити уранови мини (Le Guernic et al., 2016). В България подобни обекти са рудниците в Бухово и Елешница, минни галерии в околностите на Наречен и полиметални рудници на юг от Бургас (и залива Вромос) (Kolev et al., 2014, Ivanova et al., 2014).

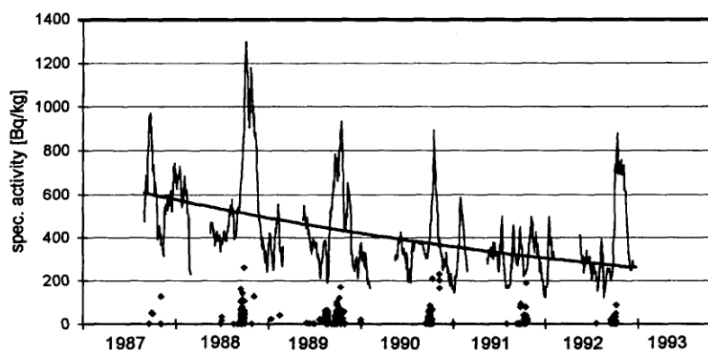
Техногенно замърсяване

Поведението на природните и техногенни радионуклиди като замърсители е сравнително добре проучено. След аварията в Чернобил е добре проучено радиоекотоксикологичното поведение на трите основни биологично значими замърсители ^{90}Sr , ^{131}I и ^{137}Cs , изхвърлени вследствие на аварията и тяхното разпространение, биоаккумуляция и биомагнификация (Nifontova, 1995). ^{90}Sr има основно бета-излъчване, другите два радионуклида излъчват както бета- така и гама-лъчения. Периодите на полуразпад на изотопите дефинират и тяхното значение за биотата. ^{131}I има сравнително кратък период на полуразпад от порядъка на 8 дни, и неговото значение за бозайниците е мощно, краткосрочно и главно резултат от биомагнификация по хранителните вериги, както и от

биоаккумуляция в щитовидната жлеза. ^{90}Sr и ^{137}Cs имат период на полуразпад от порядъка на три десетилетия, което обуславя тяхното продължително участие в кръговрата на веществата в екосистемите. Други техногенни радионуклиди, които намират широко приложение в индустрията (дефектоскопия, гама-нивомери, пожарообезопасяващи датчици) и медицината (лъчелечение, диагностика и др.) са: ^{192}Ir , ^{241}Am , ^{242}Cf (индустриални приложения) и ^{60}Co , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{13}C , ^{15}O (медицински приложения). За щастие, значителни изтичания на тези радионуклиди не са отчитани до момента.

Радиоecологичен биомониторинг

Радиоecологичният биомониторинг със сухоземни гръбначни животни до момента е развит предимно в контекста на локални замърсявания. Районът на Чернобилската АЕЦ е основният обект на мониторинг на радионуклидите в сухоземните екосистеми (Chesser et al., 2000, Chesser et al, 2001, Beresford et al., 2008, Rodgers and Baker, 2000, Rodgers et al., 2001 (1), Rodgers et al., 2001 (2)). Освен района на Чернобил, подобни проучвания са провеждани и в други райони на Европа: Норвегия и северна Швеция (Amundsen et al., 1996, Christaldi et al, 1991), както и южна Германия и Австрия в района на Залцбург (Zibold et al., 1992). Връзката между биоаккумуляцията на ^{137}Cs в гъби и биомагнификацията му в бозайници е изследвана от Zibold et al., 1992 (Фиг. 9).



Фигура 9. Корелация между специфичните активности на ^{137}Cs в мускулна тъкан на сърни използвали гъби в диетата си (Zibold et al., 1992).

При мониторингите видове дребни гризачи, повечето изследвания са провеждани на териториите на Украйна и Беларус (Chesser et al., 2000, Chesser et al, 2001, Goncharova and Riabokon, 1998, Beresford et al., 2008, Rodgers and Baker, 2000, Rodgers et al., 2001 (1), Rodgers et al., 2001 (2) и др.).

Анализ и обобщение:

Радионуклидите остават един от значимите замърсители, както на локално ниво, така и в глобален мащаб. Това, което ги отличава от токсичните метали, е способността на някои от тях да увреждат организма в много ниски дози и с много ниски прагове на стохастичните ефекти (мутагенеза, канцерогенеза) (Trott and Rosemann, 2000).

Съществуват дългогодишни спорове по отношение на радиобиологичните ефекти в ниския дозов диапазон, които продължават до момента (Morgan and Bair, 2013). По отношение на дългосрочните ефекти в екосистемите най-важни са изотопите ^{137}Cs и ^{90}Sr , които имат период на полуразпад около 30 години. Добре е радиоеколозите да не забравят думите на Ю. Одум, който казва: „Възможно е да дадем на природата на пръв поглед безвредно количество радиация и тя да ни го върне в смъртоносен пакет” (Odum, 1959).

2.4. Детоксикация на елементни замърсители и радионуклиди

Пътищата и методите за детоксикация на организма от тежки метали и радионуклиди са значително по-слабо проучени в сравнение с интоксикацията с химичните елементи и техните изотопи. Въпреки това са ясни някои базови концепции, свързани с техния химичен и биологичен клирънс. Детоксикацията на химични елементи и радиоизотопи се осъществява на три основни нива:

1) ниво асорбция; Пример за използване на зеолитни сорбенти с цел намаляване на биоаккумуляцията на олово в организма при бели лабораторни мишки щам ICR е съобщен от Beltcheva et al. (2014)

2) физиологично ниво; При остра фаза на отравяне с цветни метали (олово, кадмий, мед, хром и др.) често се използва така наречената „хелационна терапия“, при която в организма се въвеждат съединения с висок специфичен афинитет към съответния елемент. (Kosnett, 2010), и

3) ниво на елиминация. Организмът на бозайниците притежава неспецифични механизми за защита от интоксикация с токсични метали (напр. металотионеини); за съжаление тази система не може да се справи с високи дози от токсикантите (Brady, 1982, Pritchard and Fowler, 1984, Liu et al., 1996).

Трите основни установени детоксикационни подхода имат добре известни предимства, но в същото време и недостатъци, които ограничават тяхната приложимост. Може да се твърди, че за момента това е една относително свободна и перспективна ниша в областта на екоотоксикологичните проучвания.

3. Мониторни видове дребни бозайници

Гризачите (Rodentia) са най-многобройният и един от най-богатите на видове разреди от клас Бозайници. Морфологичните и поведенчески особености на отделните видове гризачи обуславят техният адаптивен потенциал и разпространението им в различните типове екосистеми. Най-богати на видове са семействата Muridae, Cricetidae и Sciuridae (Wilson and Reeder, 2005). Използването на гризачите като моделни организми за целите на различни биологични, медицински и екологични проучвания е утвърдена практика от векове. В екотоксикологичния биомониторинг на сухоземните животни най-често се използват различни видове дребни гризачи, типични за дадена екосистема. Гризачите, като видове с масово разпространение и относително широк ареал, висок размножителен потенциал и сравнително малки индивидуални участъци и ограничена склонност към миграция на големи разстояния, представляват едни от възможно най-подходящите видове за мониторинг на локални замърсявания (Talmage and Walton, 1991, Talmage and Walton, 1992).

3. 1. Основни критерии за подбор на мониторни и индикаторни видове дребни гризачи

Ролята на дребните бозайници за целите на екотоксикологичния биомониторинг на сухоземните екосистеми е разгледана от редица автори (Talmage and Walton, 1991, Talmage and Walton, 1992, Ieradi et al., 1998, Shore and Rattner, 2001, Andras et al., 2006, Topashka-Ancheva and Gerasimova, 2012). Основните причини представители от разред Rodentia да бъдат избрани за целите на подобен тип изследвания са следните:

- 1) Базова позиция в трофичните вериги в екосистемите;
- 2) Кратък жизнен цикъл, ранно достигане на полова зрялост, висок размножителен потенциал, бързо развитие и обновяване на популациите, бърз метаболизъм.
- 3) Относително висока популационна численост, сравнително малки индивидуални участъци и липса на миграция на далечни разстояния
- 4) Повечето гризачи, обитаващи Евразия и Северна Америка са известни отдавна и изчерпателно описани
- 5) Относително малки размери, сравнителна неагресивност, както и фактът, че основната част от гризачите не подлежат на специални природоохранителни мерки

В Европа сред най-често използваните дребни гризачи за целите на екотоксикологичния биомониторинг са видове от род *Apodemus* (*Ap. flavicollis*, *Ap. sylvaticus*, *Ap. agrarius*), както и видове от семейство Cricetidae (*M. glareolus*, *Microtus arvalis*, *Microtus oeconomus*, *M. subterraneus* и др.). Изследване на мониторните видове дребни бозайници би било невъзможно без споменаване на насекомоядните представители на сем. Soricidae. В България се срещат седем вида, като най-разпространена е обикновената кафявозъбка

(*Sorex araneus*). Срещат се и белокожемната белозъбка (*Crocidura leucodon*) и голямата водна земеровка (*Neomys fodiens*) (Пешев et al., 2004). Въпреки сравнително високата си степен на биоаккумуляция на токсиканти, представителите на Soricidae рядко се използват, основно заради силно затрудненото им отглеждане в лабораторни условия.

3. 2. Сравнителен анализ на пригодността на отделни видове дребни бозайници за целите на екотоксикологичния биомониторинг

За целите на екотоксикологичния биомониторинг най-често използваните дребни бозайници на територията на Палеарктика са видовете от сем. Cricetidae и Muridae. Сред видовете гризачи в Неарктика преобладават представителите на сем. Cricetidae, като някои представители на това семейство заемат подобни екологични ниши на тези на Muridae от Европа и Западна Азия. За целите на настоящото проучване фокусът е върху Палеарктичните мониторинжни видове дребни бозайници, като в детайли се разглеждат пет представителя на сем. Cricetidae (*M. arvalis*, *M. glareolus*, *M. oeconomus*, *Ch. nivalis* и *M. guentheri*) и два на сем. Muridae (*Ap. flavicollis* и *M. spretus*).

сем. Cricetidae

Семейство Cricetidae е богато на различни видове и се характеризира с големи междувидови вариации (Wilson and Reeder, 2005). От гледна точка на екотоксикологичния биомониторинг най-интересни са хамстерите и полевките. Въпреки, че в рамките на семейството е трудно да се правят обобщения, може да се отбележи, че при подсем. Arvicolinae и Cricetinae преобладават представители с предпочитания към растителната храна в сравнение със семейство Muridae, които са предимно семеяди. За целта на настоящия анализ са разгледани видовете поотделно, като се правят сравнения за тяхната приложимост и пригодност в биомониторинговите изследвания на различни екосистеми.

1. *Microtus arvalis* Pallas, 1778

Обикновената полевка (*M. arvalis*) обитава почти цяла Континентална Европа.). В България видът е разпространен предимно в равнините, но се среща в цялата страна от морското равнище до около 2000 м. надморска височина (Пешев et al., 2004). Обикновената полевка е проучвана за биоаккумуляция на токсични метали и характерен биологичен отговор, изразен чрез хромозомни аберации и кръвна патология (Metcheva et al., 2003, Topashka-Ancheva et al., 2003, Martiniakova et al., 2011). За *M. arvalis* има и данни от радиоекологични проучвания, които показват сравними данни за биоаккумуляция на ^{90}Sr при обикновени полевки и други представители на сем. Cricetidae (*M. glareolus*, *M. oeconomus*), но значително по-слаба биоаккумуляция на цезиеви радионуклиди в сравнение с *M. glareolus* и статистически различимо по-слабо натрупване на ^{137}Cs и ^{134}Cs в сравнение с *M. oeconomus* (Chesser et al., 2000, 2006, Beresford et al., 2008).

2. *Myodes glareolus* Schreber, 1870

Ръждивата горска полевка (*Myodes glareolus*) е дребен гризач с тегло, което не надвишава 40 g. Ареалът на вида обхваща северна Европа, източната част на Сибир, планински райони на Балканите и Средиземноморието и северната част на Турция (Togge and Arrizabalaga, 2004). В южната част, където попада и България, видът обитава най-често горския планински пояс (Пешев et al., 2004). Широкият ареал на *M. glareolus* обуславя неговата приложимост за различни видове екотоксикологичен биомониторинг. Начинът му на хранене обяснява и тенденцията към акумулация на специфични замърсители като ^{137}Cs (Chesser et al., 2000, Chesser et al., 2001, Chesser et al., 2006, Beresford et al., 2008). В България ръждивата горска полевка е използвана както за оценка на биоаккумуляцията на тежки метали, така и за определяне на обща бета активност (Iovtchev et al., 1995, Metcheva et al., 2003).

3. *Microtus oeconomus* Pallas, 1776

Полевката икономка (*Microtus oeconomus*) е друг представител на подсем. Arvicolinae, който обитава северна Европа, Азия и най-северозападната част на Северна Америка. Видът е проучван основно във връзка със съдържанието на радионуклиди в района на Чернобилската АЕЦ (Chesser et al., 2000, Chesser et al., 2001, Chesser et al., 2006, Beresford et al., 2008). Въпреки по-рядкото си използване в качеството на мониторен вид в сравнение с *M. glareolus*, полевката икономка вероятно ще придобива все по-голяма важност в екотоксикологичния биомониторинг, поради нарастващия антропогенен натиск върху биотопите, които обитава.

4. *Chionomys nivalis* Martins, 1842

Снежната полевка (*Chionomys nivalis*) е глациален реликт, характерен за високите части на планините в Европа и западна Азия. Видът поддържа стабилни популации и е утвърден като подходящ биомонитор за високопланински екосистеми (Metcheva et al., 1995, Beltcheva et al., 1998, Metcheva et al., 2008, Janiga et al., 2016). Подробно са характеризирани и морфологични и цитогенетични особености на вида като кислородна консумация, хематологични параметри, съдържание на тежки метали, обща β -активност и т.н. (Metcheva et al., 1995, Beltcheva et al., 1998, Metcheva et al., 2008). Снежната полевка е особено ценен за Европа биомонитор, с висок индикаторен потенциал за ефектите на събития от локално и глобално значение в алпийските екосистеми.

5. *Microtus guentheri* Danford & Alston, 1880

Гюнтеровата полевка (*M. guentheri*) е дребен гризач от сем. Cricetidae, разпространен в Югоизточната част на Балканския полуостров, западната част на Мала Азия и части от Северна Африка. Видът е проучван основно с оглед на биоаккумуляцията на токсични метали (Topashka-Ancheva et al., 1998, Chassovnikarova et al., 2005, Demir and Yavuz, 2017). Провеждано е и пилотно радиоекологично проучване с използване на *M.*

guentheri (Yavuz et al., 2016). Присъствието на стабилни популации на *M. guentheri* в района на Странджа прави проучванията на територията на България интересни от гледна точка на фоновия екологичен мониторинг.

сем. *Muridae*:

Семейство *Muridae* е най-голямото сред гризачите и към което принадлежат над 700 вида, които произлизат от Евразия, Африка и Австралия (Wilson and Reeder, 2005). *Muridae* са широко адаптивни видове, някои от които са синантропни и космополитни (Wilson and Reeder, 2005). В Новия Свят екологичната ниша на *Muridae* заемат представители на сем. *Crictidae*, като както беше споменато по-горе някои от тези представители притежават външни прилики с *Muridae*, които обаче, не означават филогенетична близост. Видовете от сем. *Muridae* са добре проучена група както от филогенетична, така и от биологична и екологична гледна точка. Типичен пример в това отношение е род *Apodemus* с около 20 вида, с многочислени популации в различни региони на Евразия, обособени в подродовете *Apodemus sensu stricto*, *Sylvaemus*, *Carstomys* и *Alsomys* (Wilson and Reeder, 2005; Serizawa et al., 2000).

1. *Apodemus flavicollis* Melchior, 1834

Жълтогърлата горска мишка (*Ap. flavicollis*) е дребен гризач от семейство *Muridae*, разпространен от Западна Европа до западната част на Сибир и Мала Азия. У нас и на Балканите *Ap. flavicollis* се среща в райони, които най-често споделя с близкородствения *Ap. sylvaticus* (Wlostowski, 1987, Пешев et al., 2004). *Ap. flavicollis* също така се среща във високите части на планините и в близост до човешки местообитания (Vu Josevic, 1992, Mitkovska et al., 2012).). В България са сравнени натоварванията с тежки метали при *Ap. flavicollis* с тези при други гризачи (*M. arvalis*, *M. glareolus*, *Ch. nivalis*, *M. macedonicus*, *M. subterraneus*, както и с обикновената кафявозъбка (*S. araneus*)) (Topashka-Ancheva and Metcheva, 1999, Metcheva et al., 2003, Mitkovska et al., 2012). Видът е много добре характеризирани не само по отношение на неговата биология и екология, но и относно стойностите на дозово натоварване с токсични елементи и радионуклиди както от различни точки в България, така и от редица локалитети в цяла Европа (Wlostowski, 1987, Ieradi et al., 1998, Metcheva et al., 2003, Beresford et al., 2008).

2. *Mus spretus* Lataste, 1883

Алжирската домашна мишка (*Mus spretus* Lataste, 1883) е вид, от западното Средиземноморие. Обитава територии от Испания, Португалия, Мароко, Алжир, Тунис и Южна Франция. Въпреки че не е характерен за България, негови особеностиса изследвани и у нас в рамките на съвместен българо-френски проект (Metcheva et al., 1994a, Metcheva et al., 1994b). *M. spretus* един от най-добре проучените мониторинжни видове дребни гризачи по отношение на биологичните ефекти на полиметалните замърсявания (Tanzarella et al., 2001, Festa et al., 2003, Bonilla-Valverde et al., 2004, Udriou et al., 2008).

Други видове гръбначни животни със значение за екотоксикологичния биомониторинг

В определени случаи в зависимост от целите, екотоксикологичния биомониторинг се провежда и с по-едри бозайници. В България подобни изследвания са провеждани със златист чакал (*Canis aureus*), лисица (*V. vulpes*), и сърна (*C. capreolus*) като са установени нивата на редица токсични метали (Zn, Cu, Pb, Cd, Co, Ni) (Markov et al., 2006, Markov et al., 2016, Ahmed and Markov, 2017). Същите автори представят и резултати за степента на биоаккумуляцията на токсични елементи при обикновения (*Glis glis*) и горски сънливец (*Dryomys nitedula*) (Markov et al., 2016(2), Naderi et al., 2017). Проучвания с едър дивеч са провеждани и в Германия, Великобритания и Швеция след аварията в Чернобил (Lowe and Horrill, 1991, Johansson and Bergstrom, 1994, Zibold et al., 1992). Една от съвременните тенденции в екологичните проучвания е неинвазивното пробовземане, описано по-подробно в главата, посветена на методите в екотоксикологичния биомониторинг, поради което нараства значението на птиците като мониторинжни видове. Въпреки това, гризачите остават „златният стандарт“ в този тип изследвания, особено когато се изследват локални замърсявания (Talmage and Walton, 1991, Udrouiu et l., 2008).

3.3 Анализ и обобщение

Настоящата глава анализира и аргументира използването на различни видове дребни гризачи като експериментални видове в екотоксикологията. С позоваване на различни специалисти в областта (Talmage and Walton, 1991, 1992, Shore and Rattner, 2001, Metcheva et al., 2003, Gdula-Argasinska et al., 2004, Mitkovska et al., 2012, Topashka-Ancheva and Gerasimova, 2012) са обособени следните причини за избиране на дивите гризачи за целите на екотоксикологичните проучвания: 1) бързият жизнен цикъл, 2) характеристиките на техните екологични ниши и местообитания, позволяващи Rodentia да се използват за мониторинг на локални замърсявания, 3) малките размери и относително високата численост и размножителен потенциал, улесняващи полевата и лабораторна работа с животните, 4) принадлежността на гризачите към добре изучения и близък до човека клас Mammalia, 5) изобилието от познания за Rodentia, позволяващо висока степен на приемственост и сравнимост между различните научни проучвания в областта. В заключение може да се каже, че обсъдените в детайли гризачи, без да са изчерпателен набор от потенциалните мониторинжни видове, предлагат добри алтернативи за екотоксикологични проучвания в Европа. На базата на техните описания, както и на общия анализ на минали и настоящи проучвания с тях, може да се прогнозира, че описаните ще останат релевантни, актуални видове в екотоксикологичния биомониторинг и през следващото десетилетие, като поради гореизброените причини е много вероятно значението на *C. nivalis* и *M. oeconomus* да нараства.

4. Обобщение и изводи

Настоящото проучване дава възможност да се направят редица изводи и паралелно с това сравнителен анализ в рамките на всяка от трите основни глави.

Методи в екотоксикологичния биомониторинг

Наборът от методи, в областта е широк и селекцията им зависи от естеството на проучването. С изключение на установяването на токсиканти в организма чрез спектрометрични, рентгенофлуоресцентни и други аналитични техники, като правило никой от използваните методи не е достатъчно информативен и не се прилага самостоятелно.

1. Класическите морфофизиологични методи са широко приложими, но имат единствено прогностичен характер. Като правило интоксикацията предизвиква видими морфологични и физиологични изменения в организма животните. Въпреки че тези промени се очакват при повечето мониторинжни видове, необходимостта от големи статистически извадки, както и препоръчителната оптимизация по пол и възраст на изследваните групи животни правят този метод основно с ориентировъчна стойност.

2. Хематологичният анализ отчита само промени в кръвната картина резултат от високодозови натоварвания. В определени случаи (олово и остър радиационен синдром) токсикантите индуцират ясно различим комплекс от патологични изменения, но като правило методът е неспецифичен. Ясни и представителни резултати могат да бъдат дефинирани само при комбинацията на този метод с цитогенетични и други техники като микроядрен тест, кометно изследване и т. н.

3. Хистопатологичните методи по принцип са високо информативни. Основен недостатък на метода, прилаган при мониторинжни видове бозайници е силно инвазивния му характер. Съвременна тенденция при тази група методи е използването на криосекции и комбинацията с молекулярен и/или имунофлуоресцентен анализ, позволяващи откриването на клетки в състояние на апоптоза.

4. Методите за установяването на нивата на токсиканти в организма са основна и задължителна част от екотоксикологичните изследвания. Най-приложими и често използвани в момента са AAS и ICP-MS, като последният се прилага при най-прецизни анализи за откриване на много ниски концентрации. Неутронно-активационният анализ (NAA), прилаган доскоро, се използва все по-рядко, тъй като изисква мощен източник на неутрони, както и множество ограничения по отношение на подготовката на биологичната матрица, което ограничава неговата приложимост.

5. Цитогенетичните техники се приемат за един от най-меродавните методи при анализа на ефектите на генотоксични агенти. Резултатите показват, че при установяването на генотоксични ефекти, особено при клетъчни култури анализът за обмен на сестрински хроматиди е по-чувствителен от този на хромозомни аберации. Въпреки по-високата

чувствителност на SCE методите, анализът на хромозомни аберации в метафазни ядра остава основен както в цитогенетиката, така и в изследванията на генотоксичност при бозайниците като цяло.

6. Микроядреният тест е информативен и с висока прогностична стойност, но в същото време поради неспецифичния си характер би могъл да бъде подвеждащ. Анализът е особено подходящ при скрининг за генотоксичност в клетки на бозайници. Подобно на микроядрения тест, кометното изследване не е специфично за генотоксичност, индивидуалните вариации в спонтанната фрагментация на ДНК са широки и могат да бъдат резултат, както от фактори на околната среда, така и от генетични, епигенетични, възрастни, поведенчески и др. причини. При този тип анализи също се препоръчва комбинация с отчитане на хромозомни аберации.

7. Изследването на молекулните биомаркери може да бъде много подходяща добавка към други методи, то не може да бъде достатъчно информативно само по себе си. Препоръчва се комбинацията му с методи за установяване на увреждания в ДНК, както и със спектрометричен анализ за нивата на токсиканти. Перспективите пред молекулните биомаркери са големи. Счита се, че с навлизането на микрочипове за изследвания на ниво РНК тази технология ще даде възможност за по-дълбоко навлизане в динамиката на биологичния отговор на генетично и епигенетично ниво.

8. Навлизането на неинвазивните методи на пробовземане е обусловено от два основни фактора: доброто ниво на проученост на биологичния отговор към замърсители и, биоетични съображения, свързани с намаляването на вредата и страданието, причинени на животните. Тези техники са особено важни в случаите, когато видът е от консервационно значение. Очаква се, с течение на времето неинвазивното пробовземане да стане норма в екотоксикологичния биомониторинг.

Основни замърсители в околната среда и техните биологични ефекти

1. Класическата органична токсичност на оловото се асоциира с хематопоетичната система, черния дроб и нервната система, и наскоро установената увеличена невронна апоптоза при много ниски кръвни концентрации ($<10 \mu\text{g/dL}$). Металът е сравнително слаб индуктор на двойноверижни скъсвания, но причинява загуба на теломери, което води до клетъчно стареене, апоптоза и/или злокачествени заболявания при високи дози. Това не обяснява среднодозовата *in vivo* генотоксичност на Pb, но заедно с индукцията на про-оксидативни състояния, ко-генотоксичността на метала би могла да доведе до персистиращи увреждания в ДНК.

2. Кадмият рядко присъства като замърсител самостоятелно и най-често се изпуска в околната среда като атмосферни емисии, съдържащи олово, цинк и серен диоксид. Основните тъкани и органи-мишени на кадмия са на първо място бъбреците, следвани от черния дроб и сперматогониите. Основната детоксикационна система на организмите за

този метал е индуцируемият синтез на металотионеини, които, обаче, не могат да се справят с високи дози. Кадмият е опасен за бозайниците дори и в много ниски дози, при които не се отчитат остри симптоми. Металът е доказано генотоксичен като някои съвременни изследвания показват конкретни механизми за потискане и дерегулация на ДНК-репаративните системи при много ниски дози (2-5 μM).

3. При сравняване на ефектите на Pb и Cd е важно да се отбележи, че кадмият показва ясни, дозово зависими генотоксични ефекти в много по-малки количества от оловото, както в *in vivo*, така и в *in vitro* системи. Това обуславя и съществуващия консенсус относно екоотоксичността на кадмия и тенденциите за забрана на употребата му в рамките на ЕС.

4. Йонизиращите лъчения са най-добре проученият генотоксин до момента. Основно се засягат хематопоетичната система, а при по-високи дози храносмилателната и нервната системи. По отношение на ниските дози все още не е постигнат консенсус. Някои проучвания сочат, че ниските дози биха могли да бъдат много опасни, понеже не активират системите за ДНК репарация и системите за отговор на поражения в ДНК, други показват, че дози под 50 mGy са безвредни или дори стимулиращи организма. Проблемът се усложнява и от факта, че до момента не са открити значими изменения при бозайници от райони с природно повишен радиационен фон.

Мониторни видове дребни бозайници

1. Анализът на наличната до момента информация дава основание да се заключи, че що се отнася до използването на лабораторни животни за целите на биологичния мониторинг и екстраполирането на данните към човешката популация, трябва да се вземат пред вид видово специфичните особености както в темповете на метаболизма, така и по отношение на специфичния биологичен отговор на организма спрямо различни увреждащи агенти.

2. Представителите на сем. Cricetidae са предимно зеленоядни, което обуславя разлики в степента на биоаккумуляцията в сравнение със сем. Muridae, - типични семейди. Зеленоядните видове дребни гризачи са особено подходящи за целите на радиоекологичния биомониторинг, което следва от факта, че зелените части на растенията акумулират по-големи дози от радионуклиди в сравнение със семената и са с по-ниска калорична стойност от тях.. Най- добре проучен и най-често използван в Европа за целта вид е *M. glareolus*, следван от *M. oeconomus*. Докато първия вид е широко използван и като монитор при отчитане на степента на интоксикация и с тежки метали, то за *M. oeconomus* липсват подобни данни. Поради специфичната си биотопична привързаност снежната полевка (*Ch. Nivalis*) е определен като отличен биоиндикатор за високопланински екосистеми в Европа. Поради особеностите на високопланинските биотопи, свързани с глобални замърсявания, климатични промени и изменения в

атмосферата се счита, че видът ще остане важен и актуален и в бъдеще. Наличните данни за биоаккумуляция на радионуклиди и токсични елементи в *M. guentheri*, който у нас оформя стабилни популации единствено в Странджа, дават основание да се счита, че видът е перспективен с оглед на нарастващата индустриализация и цялостен антропогенен натиск в Близкия Изток, както и поради перспективите за строеж на АЕЦ в Източното средиземноморие.

3. От представителите на сем. Muridae са разгледани в детайли близкородствените *Ap. flavicollis* и *Ap. sylvaticus*, както и един представител на р. Mus - *M. spretus*. Видовете от род *Apodemus* са с висока численост и адаптивен потенциал, широка екологичната пластичност и сравнително устойчиви спрямо различни токсиканти. Съществува голямо количество информация за биоаккумуляцията и биологичния отговор при интоксикация с тежки метали и радионуклиди при двата вида. Те са широко разпространени видове, които често се използват в сравнителен аспект с *M. glareolus*, с оглед проследяване на потока на даден токсикант по хранителните вериги. Счита се, че *Ap. flavicollis* и *Ap. sylvaticus* ще останат важни зоомонитори и в близко бъдеще, като, заедно с *M. glareolus*, остават незаменими при провеждане на мониторингови проучвания в Европа. *M. spretus* е типичен представител на дребната бозайна фауна на Западното Средиземноморие. Неговият биологичен отговор към полиметални замърсявания е изключително добре проучен, и в тази връзка е интересен от гледна точка на екотоксикологичния биомониторинг в региона.

4. Използването на представители на сем. Soricidae като мониторингите видове е важен момент при биомониторинговите проучвания, поради ролята им на вторични консументи в екосистемите.

5. Въпреки високата информативност и мащабност на биомониторинговите проучванията с използването на едър дивеч те остават по-скоро изключение, като една от причините е сравнително големият индивидуален район на някои от тези видове и тенденцията им към сезонна миграция.

5. Приноси

1. За първи път в България е проведен цялостен анализ на екотоксикологичния биомониторинг на сухоземните екосистеми. Включени са най-често използваните методи, три от най-значимите токсиканти (олово, кадмий и радионуклиди) и основните европейски мониторинжни видове дребни гризачи. Разкрита е взаимовръзката между методологията, основните химични и физико-химични замърсители в околната среда, изследваните обекти и получените резултати.
2. Направен е критичен анализ на най-често използваните методи в екотоксикологичния биомониторинг на сухоземните гръбначни животни. Дискутирана е тяхната приложимост за различни цели. Обсъдени са както класически, така и нови методи.
3. Направен е анализ на познанията за основните химични и физико-химични замърсители. Обобщени са съвременните проучвания, установяващи някои основни механизми и направен сравнителен анализ на общата токсичност генотоксичност и когенотоксичност при кадмия и оловото в мониторинжни видове дребни гризачи, други моделни животински видове и клетъчни линии.
4. За първи път е изготвен цялостен анализ на наличната информация за радиоекологичните проучвания в сухоземните екосистеми. Такъв тип синтез на наличната информация до момента не е провеждан в глобален мащаб. Акцентира се върху дискуссионни въпроси като 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.
5. Детайлно са разгледани и сравнени седем основни мониторинжни 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.

Списък на участията в научни форуми с доклади, отразяващи изследванията по дисертацията:

1. „Наука за по-добро бъдеще“, ПУ «Паисий Хилендарски», Пловдив (2015 г.)
2. Семинар по екология с международно участие, ИБЕИ-БАН, София (2016 г.)
3. Семинар по екология с международно участие, ИБЕИ-БАН, София (2017 г.)

Публикации по темата на дисертационния труд

Излезли от печат:

1. Beltcheva, M., Metcheva, R., Topashka-Ancheva, M., **Ostoich, P.** Bioindicator potential of small mammals regarding to environmental contamination. Proceedings 21st International Eco-Conference, 12th Eco-Conference on Environmental protection of urban and suburban settlements, Novi Sad, Serbia., Ecological movement of Novi Sad, 2017, 195-202.
2. **Ostoich, P.**, Beltcheva, M., Metcheva, R.. Methods, Applicable to the Ecotoxicological Biomonitoring of Terrestrial Vertebrates: A Review, Seminar of Ecology - 2016 with international participation Proceedings” 23-24 April 2016. Sofia, 2017, 117-125.
3. **Ostoich, P.**, Metcheva, R., Beltcheva, M., Yankov, Y.. Concepts in the radioecological biomonitoring of Rila mountain, Bulgaria with a focus on terrestrial small mammals. Proceedings 21st International Eco-Conference, 12th Eco-Conference on Environmental protection of urban and suburban settlements, Novi Sad, Serbia., Ecological movement of Novi Sad, 2017, 165-174.
4. **Ostoich, P.**, Beltcheva, M., Metcheva, R. Contemporary concepts in the ecotoxicology of cadmium (Cd) in terrestrial ecosystems and its biomonitoring in terrestrial vertebrates. Seminar of Ecology - 2017 with international participation Proceedings, 2018, 96-102.

Приети за печат:

1. **Ostoich P.**, Beltcheva, M., Metcheva, R.. State, Application and Prospects of Radioecological Biomonitoring in Small Mammals. Acta zoologica bulgarica, приета за печат: 2018, ISI IF:0.369 C ISI IF - Q4.
2. Beltcheva, M., Metcheva, R., Geleva, E., Aleksieva, I., **Ostoich, P.**, Ravnachka, I., Angelov, H.. TotalL β - activity in monitor species small rodents from two different altitudes in Rila Mountain (Bulgaria). AIP Conference Proceedings, AIP Publishing, приета за печат: 2018, SJR:0.16, Без ISI IF – с SJR.

3. Metcheva, R, Beltcheva, M, Topashka - Antcheva, M, Tyutyundzhiev, N., Aleksieva, I., Ravnachka, I., **Ostoich, P.**, Angelov, H. Potential Effect of Natural UV Irradiation on Albino Mice at Two Altitudes (Rila Mountain, BG). AIP Conference Proceedings, AIP Publishing, приета за печат: 2018, SJR:0.16, Без ISI IF – с SJR.

Ecotoxicological biomonitoring – principles, concepts and applications to vertebrate animals

Peter Vladislavov Ostoich

**Institute of Biodiversity and Ecosystem Research, Bulgarian Academy of Sciences,
1 Tsar Osvoboditel Blvd, Sofia 1606, Bulgaria**

PhD Thesis

Sofia, 2019

The current work is a critical overview of the contemporary state of ecotoxicological research as applied to terrestrial vertebrates. The main objectives are to conduct a summary and analysis of the contemporary methods in this field of study, as well as to discuss three main types of pollutants (lead (Pb), cadmium (Cd), and radionuclides) and the model organisms used in the discipline (mainly European representative species of the families Cricetidae and Muridae). The first part introduces some basic concepts in the ecotoxicology of terrestrial ecosystems as well as discussing the background literature on the subject with its strengths and limitations. Examples are provided regarding the necessity of the current project and the gaps that exist in the literature.

With the focus shifting to methods, several classes of research techniques are discussed, including: 1) classical morpho-physiological and hematological indicators, 2) histopathological methods, 3) determination of the levels of toxicants in the body by spectrometric and other methods, 4) cytogenetic techniques, including metaphase analysis and sister chromatid exchanges (SCE), 5) studies of DNA damage, including the micronucleus test in its CBMN and *in vivo* variations, as well as most variations of the Comet test, 6) molecular biomarkers, including biomarkers of oxidative stress and determination of the concentration of detoxifying biomolecules, and 7) non-invasive sampling techniques. Several conclusions are drawn, including that every method, with the exception of the determination of toxic body burden, is insufficient by itself, and must be combined with other methods in order to produce informative results. The selection of methods always depends on the scope, objectives and underlying principles of the study conducted.

The chapter dealing with the major classes of pollutants discusses first several general principles responsible for the specific toxicity of chemical elements, including 1) dose and kinetics of retention and elimination, 2) chemical reactivity and known toxic compounds, 3) interactions with biological systems, 4) metabolic activation, and 5) age and sex-related effects. Continuing with lead (Pb), the chapter analyses the particular biokinetics and specific toxicity of this heavy metal, citing threshold doses for induction of deterministic effects (anemia, mental retardation and neurodegeneration, liver and systemic damage). The ecotoxicity of Pb is discussed, including its role in the “Coto Doñana” environmental disaster in Spain. Lead is confirmed as a genotoxic agent, and several eco-toxicological studies are discussed in detail.

such as those, conducted by Ma et al. (1991), Metcheva et al. (2007) and Topashka-Ancheva et al. (2003). Shifting the discussion to cadmium (Cd), the analysis continues with the ecotoxicity and specific toxicity of that metal. Its genotoxicity is discussed in detail, including low-dose effects on DNA repair systems such as NHEJ and BER at very low ($\leq 30\mu\text{M}$) concentrations. The analysis continues with an overview of the environmental biomonitoring studies on cadmium, concluding that the metal poses a very high risk, even in very small doses, to individual organisms and ecosystems. The review of radionuclides starts with a discussion of natural radioactivity, then proceeds to anthropogenic enrichment and technogenic dispersal of radioactive isotopes. The ecological effects of three key anthropogenic radionuclides – ^{137}Cs , ^{90}Sr and ^{131}I are reviewed in detail. The chapter provides an overview of the monitoring studies conducted in the 30-km Exclusion zone of the Chernobyl NPP and discusses contemporary concepts in radiobiology and radioecology. Conclusions are drawn regarding the suitability of small rodents, particularly *M. glareolus* and *M. oeconomus* as zoomonitors of radioactive contamination. The chapter ends with a discussion of the current challenges facing radioecology.

Following is a brief overview of the current concepts in the detoxication of heavy metals and radionuclides. Three stages of detoxication are discussed: 1) at the absorption level (sorbents, diet supplementation, etc.), 2) at the physiological level (metal chelation, specific antidotes), 3) at the elimination/excretion level (biological elimination systems, adaptive responses). The last chapter of the dissertation deals with suitable monitoring species, discussing in detail five European species of the family Cricetidae (*Microtus arvalis*, *Myodes glareolus*, *Microtus oeconomus*, *Chionomys nivalis*, and *Microtus guentheri*) as well as two representatives of Muridae (*Apodemus flavicollis* and *Mus spretus*). The comparative utility of the seven species for different types of ecotoxicological and radioecological monitoring is discussed and conclusions are drawn regarding the future role of these animals as zoomonitors of environmental contamination. The dissertation ends with a list of the main conclusions and achievements drawn from the conducted summary, systematization and critical analysis and an enumeration of the specific contributions of the work within the context of the scientific field.