

Вх. № 228/НО-05-06/11.03.2020г.

Рецензия

от проф. д-р Мариела Оджакова, Биологически факултет, СУ „Св. Кл. Охридски”

относно дисертационен труд за придобиване на образователната и научна степен “доктор” в област на висше образование 4. Природни науки, математика и информатика, професионално направление 4.3. Биологични науки; Научна специалност: 02.22.01. Екология и опазване на екосистемите

Автор на дисертационния труд: Лъчезар Петров Якимов, докторант в Институт по Биоразнообразие и Екосистемни Изследвания, БАН

Тема на дисертационния труд: «Оценка на оксидативния стрес и индикаторния потенциал на биологичния отговор на черноморската мида *Mytilus galloprovincialis* Lam. като общ показател за функционалното състояние на крайбрежни екосистеми“

Научен ръководител: проф. д-р Нешо Хайнрих Чипев, ИБЕИ – БАН и **научен консултант:** доц. д-р Венцислав Карамфилов, ИБЕИ – БАН.

Общо представяне на процедурата и дисертанта. Представеният комплект материали на хартиен и електронен носител е в съответствие с Правилника за развитие на академичния състав на ИБЕИ, БАН и отговаря на критериите за придобиване на научната степен „доктор на науките“. Лъчезар Якимов завършва бакалавърска степен “Молекулярна биология“ през 2002 г., а през 2005 г. - магистратура „Физиология на растенията“ в БФ на СУ “Кл. Охридски. От 2012 до 2016 г работи като биолог в ИБЕИ,а, а през 2019 е избран за асистент. От 2016 г е зачислен като редовен докторант в същия институт.

Актуалност на тематиката. В Черно море мидите заемат ключова позиция в хранителните вериги и могат да служат като индикатор за прехвърлянето на замърсители към по-високите трофични нива, включително и човека. Това е от особено значение при оценката на риска от натрупването на потенциално опасни вещества в морската храна, предвид голямото стопанско значение на вида за страните от Черноморския регион. Прикрепеният начин на живот на мидите *M. galloprovincialis* ги прави представителни за местообитанието и способни да локализируют пространствено локален натиск. Популациите на мидите обикновено са стабилни и това позволява повторно изследване, както и включването им в програми за дългосрочен мониторинг. Голям брой абиотични фактори – рН, соленост, температура и др., могат да модулират

подвижността на замърсителите, биологичната им достъпност и токсичното им действие. По този начин, отчитайки модулиращите фактори, количествата акумулиран ксенобиотик, отчетени в средата и тъканите на морските миди, могат да бъдат използвани като химически индикатори за експозицията на екосистемата, което е в основата на екотоксикологичните подходи на оценяване. Същевременно, технологичното развитие води и до допълнително натоварване на морските екосистеми с микроелементи и нови потенциално опасни вещества, които доскоро не са били от значение при оценката на риска. Количественото измерване на някои слабо проучени потенциални замърсители в биологични проби става все подостъпно и необходимо. Това задава нови насоки за целите на Глобалния мониторинг на химическото замърсяване на морската среда: изследвани отделни групи съединения, за които е известно, че упражняват натиск над морските екосистеми с фокус върху бентосните организми и такава опитна постановка, която би позволила засичането на дългосрочни тенденции в здравния статус на системно ниво.

През последните години се появи нова област на екологични изследвания, в която нивата на антиоксиданти (АО) и оксидативния стрес (ОС) се определят количествено в организмите и се използват за обяснение на редица екологични модели. Биологичните отговори на организмите към оксидативен стрес са сред найзначимите и широко използвани реакции за регистриране на промените на клетъчно и субклетъчно ниво, индуцирани под въздействието на фактори на околната среда. Обикновено, ефектът от всеки натиск върху живите организми е свързан с образуване на свободни радикали, които медирират ефектите на клетъчно ниво. По този начин, оксидативният стрес може да бъде приет като маркер на общия биологичен отговор на организма, подложен на стрес. Друг подход за оценка на биологичните ефекти предоставят изследванията на промените в структурата на генома предизвикани от ксенобиотици. Количественото измерване на подобни уврежданията се приема за надежден метод за оценка на общите увреждания в структурата на генома, които могат да бъдат свързани с определени категории генотоксични агенти. По този начин, понастоящем тези подходи често се използват в биологичния мониторинг като индикаторни елементи за биологичен ефект.

Напоследък, биомаркерите започват да се превръщат в неразделна част от програмите за мониторинг на морската среда, като допълнение към по-често използвания мониторинг на замърсителите. Все повече нови диагностични техники, се адаптират и прилагат към екологични проблеми. Молекулярни техники като геномика, протеомика и метаболомика се използват за разработване на потенциални биомаркери при оценка на риска от околната среда с обширни бъдещи перспективи. Биологичните отговори на организмите, изложени на въздействие на ксенобиотици, могат да бъдат много различни поради разнообразието на стресовите фактори в околната среда. По този начин се изисква определен набор от биомаркери, който да бъде ефективно приложен за оценка и биомониторинг. Тази необходимостта е в основата на опитите да се разработят различни биомаркерни индекси, които биха могли да опростят и обхванат в един общ

индикатор, с предварително определен клас на качество, сложните биологични промени, измервани от голямо множество биомаркери поотделно.

В контекста на гореизложеното, предложената разработка е актуална и представя първи опит за изследване на стресовата екология на черноморската мида у нас. Целта на изследването е да бъдат оценени промените в оксидативния статус в тъкани на *Mytilus galloprovincialis* Lam. и неговата пространствена и времева динамика, както и потенциалът на този биологичен отговор на вида като биомаркер за състоянието на екосистемите. Работната хипотеза, която настоящата научна разработка тества е, че балансът на прооксидантните и антиоксидантните процеси в черноморските миди се променя под действие на екологични и антропогенни фактори, предизвикващи оксидативен стрес. Така, установяването и оценката на оксидативния статус и нивото на оксидативен стрес в мидите от вида *M. galloprovincialis* представляват чувствителен биомаркер за екологичното състояние на морската среда и на екосистемите.

Структура на дисертационния труд. Дисертационният труд следва общо приетия за този вид научни трудове модел. Структуриран е според изискванията и съдържа увод (2 стр.), литературен обзор (23 стр.), цел, задачи и научна хипотеза (1 стр.), материали и методи (17 стр.), резултати (51 стр.), обсъждане (13 стр.), изводи, приноси, списък на използваните литературни източници и списък на авторските публикации по темата на дисертационния труд. Включени са 11 таблици и 17 фигури. Списъкът на цитираната литература обхваща 183 източника, от които 17 са на кирилица и 169 на латиница. Подредбата на материала е балансирана и дава превес на собствените резултати и интерпретации. Докторантът е запознат отлично с пробема. Повечето от цитираните източници са от последните 10 години. Литературният обзор е изчерпателен, последователен и целенасочен, написан стегнато и с професионализъм. Заключителната част на обзора е логична и от нея пряко следват целта и задачите на изследването. Целта на дисертацията е формулирана ясно и за постигането ѝ са поставени 5 конкретни задачи.

Методика на изследването. Подходите и методите са избрани целенасочено според поставените задачи. Усвоен е и е приложен огромен набор от съвременни физикохимични, молекулярно-биологични и статистически методи. Конструирани са 3 индекса, описващи баланса на про-/антиоксидантните процеси: Про-оксидантен индекс (PrO) и Индекс на антиоксидантната ензимна защита (АОЕ). За първи път е разработен и приложен „Специфичен индекс на оксидативен стрес“ (SOS) за диагностика на интегрираното въздействие върху морската среда в изследваните местообитания (Yakimov et al., 2018).

Считам, че докторантът притежава отлична теоретична и методична подготовка.

Характеристика и оценка на дисертационния труд и приносите. Разделите „Резултати“ и „Дискусия“ правят много добро впечатление с добре обмисленото и

организирано научно изследване. Проведени са разнообразни и комплексни изследвания и са получени много и съществени резултати. Изложението е стегнато и ясно. Представените обсъждания са задълбочени и адекватни на получените резултати.

В настоящата работа се представят резултати от първото комплексно изследване на стресовата екология на черноморската мида *M. galloprovincialis* в крайбрежните екосистеми в България. Получените резултати са изцяло в подкрепа на надеждността на използването на мидите *M. galloprovincialis* като индикатор за наблюдение на металното замърсяване на крайбрежните води. По отношение на изследваните метали, черните миди се проявяват като макроконцентратори с висок капацитет за натрупване, като съдържанието на тежки метали в ядливите тъкани на *M. galloprovincialis* надвишава стандартите за безопасност на храните в повечето изследвани райони от черноморското крайбрежие.

Анализирани са биомаркерите на оксидативния статус в извадки от миди от представителни райони. Тези биомаркери представляват подклас на биомаркери за въздействие, които напоследък се използват широко в екологични изследвания. Промените в оксидативния статус на морските организми в отговор на различни видове натиск, особено антропогенния, върху морската среда се очаква да допринасят за по-детайлна и обективна оценка на екологичното състояние на екосистемите, както и биха могли да служат за ранно предупреждение за предстоящи екологични проблеми. Резултатите показват, че нивото на изследваните биомаркери варира значително както в различни тъкани на изследвания индикаторен вид, така и по местообитания на черноморската крайбрежна зона. Различните органи проявяват различна реакция към въздействията на околната среда, проявена чрез различен отговор на маркерите за оксидативен стрес. Като най-чувствителен орган се проявяват хрилете, вероятно поради прекия си контакт с външната среда и интензивния обмен на кислород. Индивидуалните реакции (с изключение на каталазната активност) на биомаркерите за оксидативен стрес корелират със съдържанието на мед, олово и кадмий в тъканите на мидите, което определя високият им индикаторен потенциал за целите на екотоксикологичния мониторинг. Оксидативният статус е чувствителен към сезонни промени, като в миди, събрани през есенния период се отчитат завишени нива на оксидативен стрес в сравнение с тези, събрани през пролетния период

Като общ резултат от наблюдаваните при настоящето изследване промени в про- и антиоксидантните процеси в биомаркерния вид от различни станции и крайбрежните биотопи, се налага изводът, че промените в условията на околната среда в различните типове крайбрежни морски местообитания са свързани с риск от предизвикване на оксидативен стрес (ОС) в организма. В опит да се обединят множеството различни измерени биоиндикатори на оксидативния баланс и да се получи интегрална оценка на състоянието на стрес са изведени три индекса, отразяващи про- и антиоксидантните процеси в организма на изследваните миди от различните крайбрежни морски местообитания. Прооксидантният индекс (PrO) отразява нивото на прооксидантен

натиск от различни фактори върху организма. Антиоксидантният (ензимен) индекс (АОЕ) оценява нивото на активиране на антиоксидантната защита в организма на мидите. Ензимната антиоксидантна система на организма се активира като адаптивна реакция, която е предназначена да неутрализира напълно или частично оксидативния стрес. Реакцията на ензимните биомаркери към увеличаване на силата на фактора или времето на експозиция не е право пропорционална и може да се апроксимира с "камбановидна" крива. Това е причината при остро или хронично излагане на неблагоприятни условия на околната среда вместо активиране на ответна антиоксидантна реакция, да се наблюдава инхибиране на антиоксидантните ензими и следва да се отчита когато се използват маркери за оксидативен стрес за оценка на биотичния отговор на въздействия от средата и мониторинг. Предложеният АОЕ индекс отразява тази двойственост в ензимната антиоксидантна реакция.

Много морски организми коригират своите АО системи в отговор на промени в морската околна среда за да поддържат стабилно редокс състояние. Поради хормезисният ефект остро или хронично излагане на неблагоприятни условия на околната среда не винаги активира ответна антиоксидантна реакция. Следователно, е трудно да се направи оценка на условията на околната среда, използвайки само вариациите в активността на антиоксидантните ензими.

За да се отчетат зависимостите в динамиката на про- и антиоксидантните процеси под въздействието на променливото стояние на средата на обитаване е предложен „специфичен оксидативен стрес“ (SOS) индекс, който интегрира PrO и АОЕ индексите. Част от основанията индексът да бъде наречен „специфичен“ е, че в него могат да се включват различни биомаркери, като компоненти на PrO и АОЕ индексите и че може да се оценяват, както отклонения от предефинирани „референтни“ състояния, така и рискът от наличните изменения на общото моментно състояние на средата.

В проведеното изследване SOS добре отчита отклоненията на всяка станция от средното състояние на редокс баланса в мидите от всички изследвани станции на крайбрежието, а не отклонения от предефинирани референтни условия (т.е. „чисти“ места или „благоприятни“ условия). SOS индексът не оценява нивото на оксидативен стрес „per se“, а по-скоро е показател за нивото на стресовия синдром в организма и съответно представлява инструмент за оценяване на „стресогенност“ на дадените условия на морската среда, което всъщност отразява и „здравословното“ състояние на екосистемата.

Получените резултати от приложението на SOS индекса показва наличието на пространствени и времеви различия в състоянието на морската околна среда между северното и южното крайбрежие. Завишено стресогенно състояние, оценено чрез SOS е установено за станциите от южното крайбрежие. SOS индексът позволява оценка с по-голяма резолюция от направената с официално използваната методика, което се изразява във факта, че в отделни изследвани станции и райони е установена повишена стресогенност на морската среда, което се отличава от оценката на състоянието на

морската околна среда за съответния район, отразена в официални доклади на БДЧР. По този начин, измененията в редокс балансът на индикаторния вид *M. galloprovincialis* отразяват биотичния отговор на организма на стреса от околната среда, като предложените индекси допълват и детайлизират, но и увеличават разделителната способност на т.нар. оценки за „добро“ екологично състояние на морската околна среда по Рамковата директива за морска стратегия на ЕС (РДМС 2008/56/ЕО). Без съмнение, биомаркерите на оксидативен стрес могат да предоставят далеч по-пълна и обективна оценка на екосистемното „здраве“

В настоящата труд са представени и резултати от предварително изследване на наличието на генотоксичните ефекти в *M. galloprovincialis* от няколко представителни станции от северното и южното крайбрежие. Показано е, че интензивността на установените генотоксични ефекти е различна в зависимост от мястото на обитаване на мидите и следователно от състоянието на морската околна среда. Най-малки генотоксични ефекти са отчетени при мидите от двете ферми (гр. Каварна и о-в Св-Иван). Значително по-големи генотоксични ефекти са отчетени за южните станции, особено при мидите от замърсените райони на пристанището на гр. Созопол и крайбрежни скали на Стария град. Тези резултати се съгласуват много добре с резултатите, получени при използване на оксидативните биомаркери и индекси. Интересен факт е, че геномът на мидите от условно по-замърсените места показва тенденция да е относително по-устойчив на натиска от околната среда, отколкото геномът на мидите от условно чисти места. Това най-вероятно е резултат от активиране на механизмите за възстановяване на ДНК, като опит за адаптация, подобно на включването на антиоксидантната защита при значими въздействия на средата върху организма на мидите. Подтвърдено е наличието на зависимост между съдържанието на тежки метали в органите на мидите и степента на ДНК уврежданията в тях.

В тази част на дисертацията Лъчезар Якимов се представя като прецизен и аналитичен изследовател, който на базата на умелото боравене с литературните данни, собствените резултати, статистическите данни и логическите разсъждения, стига до съществени и значими заключения.

Приемам формулировките на приносите и смятам, че те правилно интерпретират получените резултати.

По темата на дисертацията са публикувани 3 научни публикации. От тях 1 е в списание с IF, възлизащо общо на 0.955 (Q2 и Q3); 1 публикация е с SJR и 1 е доклад в пълен текст в сборник от научен форум. Резултати са докладвани и на 12 международни и национални научни форуми. Основните експериментални и полеви изследвания в дисертационния труд са финансирани по два договори от ФНИ, МОН.

Заключение: Дисертацията е актуална, написана ясно и стегнато. Обемът на извършената работа е внушителен, направени са много сравнителни и експериментални анализи, а резултатите са оформени отлично. Получени са интересни резултати, които са

предпоставка за бъдещи разработки. Изработването и оформянето на дисертационния труд, включващо представянето на резултатите, тяхното дискутиране и илюстративният материал ми дават основание да смятам, че в процеса на докторантурата Лъчезар Якимов е придобил теоретични знания и практически умения напълно съответстващи на третата степен на обучение.

Въз основа на гореизложеното считам, че настоящият труд отговаря на всички изисквания на Закона за присъждане на научни звания и степени и Правилника за приложението му и напълно покрива изискванията на ИБЕИ към БАН. Оценявам го положително и убедено препоръчвам на почитаемото научно жури да присъди образователната и научна степен “Доктор” на Лъчезар Якимов в област на висше образование 4. Природни науки, математика и информатика, професионално направление 4.3. Биологични науки; Научна специалност: 02.22.01. Екология и опазване на екосистемите

7 март 2020 г
София

Рецензент:
/проф. д-р Мариела Оджакова/