

СТАНОВИЩЕ

**от доц. д-р Албена Йорданова - Софийски университет „Св. Климент Охридски“,
Медицински факултет, Катедра химия и биохимия, физиология и патофизиология**

на дисертационен труд за присъждане на образователната и научна степен „доктор“

Тема: 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

Автор: Лъчезар Петров Якимов

Научна специалност: 02.22.01. "Екология и опазване на екосистемите"

Форма на докторантурата: редовна

Научен ръководител: проф. д-р Нешо Хайнрих Чипев, ИБЕИ – БАН

Научен консултант: доц. д-р Венцислав Карамфилов, ИБЕИ – БАН

1. Общо представяне на процедурата и докторанта

Представеният комплект материали на хартиен /електронен носител е в съответствие със Закона за развитие на академичния състав в Република България, Правилника за прилагане на Закона за развитие на академичния състав в Република България, Правилника за условията и реда за придобиване на научни степени и за заемане на академични длъжности в Института по биоразнообразие и екосистемни изследвания при БАН (приет от НС на ИБЕИ-БАН на 22.07.2014 год. и изменен и допълнен от НС на ИБЕИ-БАН с решения от 28.04.2015 г., 12.05.2015 г. и 20.11.2018 г.) и включва следните документи:

- ✓ дисертационен труд
- ✓ резюме на дисертацията на английски език
- ✓ автореферат
- ✓ справка за приносите на дисертационния труд
- ✓ списък на публикациите по темата на дисертационния труд с приложени копия
- ✓ списък на участията в научни форуми с доклади и постери, отразяващи изследванията по дисертационния труд с приложени копия от резюметата
- ✓ научна автобиография, включваща и пълен списък на публикациите
- ✓ диплома за придобита магистърска степен (копие, заверено от Научния секретар след сверяване с оригинала)

- ✓ диплома за придобита бакалавърска степен (копие, заверено от Научния секретар след сверяване с оригинала)
- ✓ протокол №8/12.12.2020 от заседанието на разширения съства на колегиума на отдел „Екосистемни изследвания, екологичен риск и косервационна биология“ на ИБЕИ-БАН, насочило дисертацията за защита
- ✓ справка за проведения учебен процес и получените кредити, заверена от Научния секретар
- ✓ заповед №1/08.01.2020 на директора на ИБЕИ- БАН за назначаване на научно жури за защита на дисертацията за придобиване на образователната и научна степен „доктор“.
- ✓ Приложени са и 3 научни публикации на докторанта.

2. Актуалност на тематиката

Представеният ми за становище дисертационен труд на Лъчезар Петров Якимов е насочен към разработване на ефективни методи за биомониторинг, които да дават информация за екологичното състояние и антропогенното въздействие на екосистемите в Черно море. Известно е, че засилената еутрофикация, натрупването на ксенобиотици, нарастващия брой инвазивни видове, прекомерното и нерационално използване на морските екосистеми, нарастващото антропогенно замърсяване са водещи причини за нарушаване на екологичното равновесие, а следователно - и до негативни токсични ефекти за човешкото здраве. Това налага актуализация на съществуващите методи за оценка на риска от замърсителите в морските екосистеми, чрез използване на нови, подходящи биомаркери, осигуряващи актуална информация за потенциални екологични рискове.

В представения ми за становище дисертационен труд е разгледана и анализирана възможността индикаторния вид *Mytilus galloprovincialis* да бъде използван за проследяване на състоянието на морската среда в Черно море. Черната мида е широко разпространена по нашето черноморско крайбрежие и причини за това са толерантността на вида към условията на характерната ниска соленост, температурни вариации, както и на широк спектър от замърсители. Представителите на вида, чрез филтриране на морската вода и чрез активно извличане на йони от водата за изграждане на черупката си, натрупват ксенобиотици, в резултат на което успешно биха могли да се използват за индикация на замърсяването в морските ни екосистеми.

3. Познаване на проблема

Дисертантът е запознат много добре с научните публикации и изследванията на цитираните автори и прецизното им интерпретиране. Литературният обзор към дисертационния труд въвежда логично към изследователската цел, която Лъчезар Якимов си е поставил: оценка на промените в оксидативния статус в тъкани на *Mytilus galloprovincialis* с оглед използване на вида като биомаркер за състоянието на морската среда и екосистемите.

Поставените за изпълнение задачи са адекватни, ясно формулирани, включват разнообразни биохимични методи и се явяват основа за представянето и анализирането на резултатите в проведените експерименти в дисертационния труд. Задачите точно и логично са обобщени в няколко направ-

ления: разработване и прилагане на аналитична процедура за определяне и оценка на подходящи маркери на оксидативен стрес и други биомаркери на *M. galloprovincialis*; оценка на оксидативния статус на екземпляри на черна мида, събрани от различни райони на българското черноморско крайбрежие и различни сезони, включително и от марикултури; определяне на наличието на тежки метали в тъкани на *M. galloprovincialis* и водната среда, както и акумулационния им капацитет; анализ и интерпретиране на получените данни за оценка на нивото на оксидативния стрес в *M. galloprovincialis* със специфични индекси; оценка на екологичното състояние на морската околна среда и крайбрежните екосистеми в характерни райони на българското черноморско крайбрежие.

4. Методика на изследването

За изпълняване на поставените цели са подбрани разнообразни молекулярно-биологични и биохимични методи, които дават информация за настъпилите отклонения в оксидативния статус в тъканите на *Mytilus galloprovincialis* с цел използването му като биомаркерен вид за оценка и анализ на състоянието на морската среда и екосистемите в Черно море. Подробно са описани районите на изследване и пробонабиране, като за осъществяване на целите на дисертационния труд са избрани райони по черноморското ни крайбрежие, които са подложени на различни по вид и интензитет антропогенни атаки, както и с различни характеристики на абиотичните условия на средата (климатични особености, геоложки строеж, тип седимент, изложеност на вълново въздействие и др.). Пробонабирането е осъществено в рамките на месеците юни-юли и септември-октомври в две последователни години - 2017 и 2018 от определените райони на Северното и Южното черноморско крайбрежие (съответно на север и на юг от нос Емине). Събирани и анализирани са и култивирани миди от садките на мидени ферми. За определяне наличието на метални замърсители в органите на черната мида (и съответно в морската вода) са анализирани концентрациите на кадмий, олово, никел, мед и цинк в хрилете, храносмилателната жлеза, крака и черупките на мидите, както и във водната среда на местобитанията им.

Основната част от направените мащабни биохимични анализи в дисертационния труд е насочена към определяне степента на липидна пероксидация, съдържание на общ глутатион, определяне на активностите на антиоксидантните ензими каталаза, супероксид дисмутаза, глутатион пероксидаза, глутатион редуктаза, глюкозо-6-фосфат дехидрогеназа и глутатион-S-трансфераза. Изчислени и анализирани са индексът на про-оксидантните процеси, на базата на промените в концентрациите на малондиалдеhid и глутатион, който кореспондира с повишени нива на оксидативен стрес в мидите и съответно измененията в околната им среда; индекс на антиоксидантната ензимна защита, който показва активиране или инхибиране на ензимната активност на изследваните ензими; а определеният специфичен индекс на оксидативен стрес обобщава стойностите на индексът на про-оксидантните процеси и абсолютната стойност на антиоксидантната ензимна защита. В допълнение е проведен и генетичен анализ, който включва кометен тест и оценка на средната интензивност на кометната опашка при електрофореза на клетъчна суспензия от мидени хриле. Всички резултати са подложени на статистически анализ.

5. Характеристика и оценка на дисертационния труд и приносите

Дисертационният труд на Лъчезар Петров Якимов, който съдържа 122 страници, 17 фигури и 12 таблици, е оформен прецизно и дава отлична представа за извършените от дисертанта изследвания. Цитирани са 186 литературни източника, предимно от чуждестранни автори. Целта на дисертационния труд е формулирана ясно, а поставените за изпълнение задачи обобщават насоките за извършване и анализ на предвидените експерименти.

Получените резултати и обсъждането им показват задълбочено разбиране на изследвания проблем, като в детайли е определено съдържанието на метални елементи в проби от тъкани на *M. galloprovincialis*, както и от черупки и води от изследваните морски екосистеми. Анализът на съдържанието на металите показва, че 69.1% от натрупаните метали са разпределени в изследваните органи, които се подреждат в реда хриле > храносмилателна жлеза > крак > черупка. Определено е и количественото съотношение на акумулираните метали в крака и хриле, което намалява в реда: Zn > Cu > Pb > Cd > Ni. Показани и анализирани са и резултатите от измерените количества метални елементи в тъканите на миди от различните пробосборни пункове. За проучване на сходствата и различията в определените метални концентрации в тъкани на миди, събрани от различни региони, е приложен мултипараметричен анализ на главните компоненти на данните за акумулираните метали. От получените данни за метално съдържание е определен и коефициентът на биоконцентрация, като съотношение между концентрациите на съответния елемент в тъканните проби и черупките на миди и съответните стойности в морката вода.

За оценка на оксидативния статус в тъканите от хриле, крак и хепатопанкреас на изследваните миди са изследвани степента на липидна пероксидация, определяне на общ глутатион, както и активността на важните антиоксидантни ензими каталаза, супероксид дисмутаза, глутатион пероксидаза, глутатион редуктаза, глюкозо-6-фосфат дехидрогеназа и глутатион-S-трансфераза. В допълнение чрез проведените кометни тестове е установено, че интензитетът на генотоксични ефекти е различен и зависи от местообитанието и състоянието на морската околна среда.

Забележителен принос в дисертационния труд е въвеждането на нови индекси, отразяващи активността на про- и антиоксидантните процеси, както и баланса им в организма на мидите от различни местообитания. Изчислени са прооксидативен и антиоксидативен ензимни индекси, които отразяват съответно нивото на прооксидантен натиск от различни фактори върху организма (нивото на липидната пероксидация и концентрация на мономерен глутатион), и нивото на активиране на антиоксидантната защита в организма на мидите (изменения в активността на ензимите на антиоксидантната защита). Въз основа на двата индекса за първи път в настоящия дисертационния труд е използван и специфичен индекс на оксидативния стрес и е разработена оценъчна скала за диагностика и оценка на състоянието в крайбрежните ни екосистеми. Получените резултати са представени на фигури, които отлично онагледяват извършената мащабна експериментална работа.

Получените резултати са обобщени в 10 основни извода, 5 приноса с оригинален характер и 3 приноса с потвърдителен характер, които обединяват извършената мащабна научно-изследователска

работа за оцененка на промените в оксидативния статус в тъканите на черната мида и използването на вида като биомаркер за оценка на състоянието на морски екосистеми.

6. Преценка на публикациите и личния принос на докторанта

Резултати от разработката на дисертационния труд, са публикувани в 3 научни статии в периода от 2018 година до края на 2019, като едната е приета за печат. Една от публикациите е в международно периодично издание с $IF=0.634$ (Q3), една е приета за печат в края на 2019 в международно периодично списание с Q4, а третата е публикувана в сборник от научен форум, проведен през 2017 година. И в трите публикации дисертантът е първи автор, което демонстрира определения му личен принос при проведените изследвания и тяхната интерпретация. Резултатите са представени като научни съобщения на 12 международни и национални научни конференции, като в болшинството от тях дисертантът е първи автор. Липсват данни за цитиранията на публикациите, както и за участието на дисертанта в научни проекти.

Към дисертантът имам някои незначителни забележки и въпроси:

1. На стр. 17 е използвал термините „пероксилен и хидропероксилен радикали“, вместо „пероксиден и хидропероксиден радикали“.
2. На стр. 7 е написано, че „Черно море е най-голямото вътрешно море на Земята и част от междуконтиненталното Средиземно море. То се простира между Югоизточна Европа и Мала Азия на площ от 420 000 km² и вмества около 537 000 km³ вода.“, а на стр. 31 – „Черно море е малко вътрешно море с площ от 420 000 km²“. Кое е вярното твърдение?
3. Какви са бъдещите идеи и планове на докторанта по отношение прилагането на трите иновативни индекса: прооксидативен ензимен индекс, антиоксидативен ензимен индекс и специфичен индекс на оксидативния стрес за изследване състоянието не само на морски, но и на сухоземни екосистеми?

7. Автореферат

Представеният автореферат на дисертационния труд на Лъчезар Петров Якимов отговаря напълно на съдържанието на дисертацията и дава много добра информация за проведените експерименти, получените резултати, обсъждане и анализ на изследванията.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

От извършената и блестящо представена научно-изследователска работа мога да обобщя, че Лъчезар Петров Якимов е подготвен млад учен за провеждане на задълбочени научни изследвания, притежаващ необходимите експериментални умения и способности да обсъжда получените авторски резултатите и да ги съпоставя с литературни източници. С публикациите и участията в научни форуми той отговаря на изискванията в Закона за развитие на академичния състав в Република България, Правилника за прилагане на Закона за развитие на академичния състав в Република България

и Правилника за условията и реда за придобиване на научни степени и за заемане на академични длъжности в Института по биоразнообразие и екосистемни изследвания при БАН.

Всичко това ми дава основание убедено да препоръчам на дисертанта **Лъчезар Петров Якимов** да бъде дадена образователната и научна степен “**доктор**” в научна специалност 02.22.01. ”Екология и опазване на екосистемите”.

10.03.2020 г.

Изготвил становището:

/доц. д-р Албена Йорданова/