

**Хабилитационна справка
на гл. ас. Надежда Христова Тодорова**

предоставена във връзка с участието в конкурс за заемане на академичната длъжност „доцент“ по професионално направление 4.3. Биологически науки, за нуждите на секция "Биомониторинг и екологичен риск" към отдел "Екосистемни изследвания, екологичен риск и консервационна биология" към ИБЕИ-БАН

Екологията изучава взаимоотношенията между организмите и тяхната среда, т.е. комплекса от физични, химични и биотични фактори (като климат, почва и живи същества), които въздействат върху даден организъм или екологична общност и в крайна сметка определят нейното оцеляване (Encyclopedia Briatannica, Stuart L. Pimm).

В хабилитационната справка са включени петте статии от група В [B4.1–B4.5], както и материали от статии група Г [Г7.23; Г7.8, Г7.9, Г7.14, Г7.19; Г7.7, Г7.13] и [Е]. Те очертават основното научно направление на кандидата – ксенобиотиците и биологичните им ефекти на различно ниво на организация на биотата. Основната част от публикациите свързани с темата на конкурса са в областта на микробната екология, екотоксикологията, биомониторинга на ксенобиотици и оценка на екологичния риск на организмово и клетъчно ниво.

Environmental Protection Agency (EPA) дава следното определение за екологичен риск - рискът е вероятността от вредни последици за човешкото здраве или за екологичните системи, в резултат от излагането на даден екологичен стресов фактор. А стресов фактор е всяка физическа, химическа или биологична единица, която може да предизвика неблагоприятно въздействие върху хората или екосистемите (<https://www.epa.gov/risk/about-risk-assessment>).

Терминът ксенобиотик се използва за химични вещества, които са чужди на организмите, и като примери могат да се разглеждат замърсителите на околната среда, промишлени химикали, пестициди, лекарства, козметика, ароматизатори, хранителни добавки (Patterson et al. 2010).

Типичен пример за замърсяване с ксенобиотик е морското крайбрежие, където хроничния вток на нефт и нефтопродукти е свързан с търговския риболов и туризма. ПцАВ (полициклени ароматни въглеводороди), част от тежката нефтена фракция, са сред приоритетните замърсители в Рамковата директива за водите от 2000 г. на Европейската комисия (2000/60/ЕС) и поради тенденцията им за акумулиране в седимента, както и токсичния и канцерогенния им ефект върху морската флора и фауна и се правят опити за включването им в програми за мониторинг. Въпреки положителната тенденция, показваща подобрене в екологичното състояние на българската част от Черноморското крайбрежие, отразена в Националната стратегия за регионално развитие на България, 2005-2015 г., бентосните местообитания все още са засегнати от хронично замърсяване с нефт.

Промяната в състава на бързо реагиращото прокариотно съобщество, обитаващо природната матрица е проследено в [B4.1] с цел оценка на екологичния статус на крайбрежна екосистема, подложена на хронично замърсяване с ксенобиотик. Крайбрежната екосистема е особено продуктивна зона, като немалка нейна част са пада на прокариотната компонента, основно царство *Bacteria*. Обитателите както на водния стълб, така и на дънния субстрат са активно

действащи в кръговрата на природните вещества и на тези с антропогенен произход. Тъй като само микроорганизми (и гъби) са способни да разграждат нефта, тяхната роля в самовъзстановяването на засегнатите местообитания е значителна. Тези процеси са активно протичащи в крайбрежните морски екосистеми, където биоремедиацията се определя като основен естествен процес, чрез който нелетливите въглеводороди се елиминират от околната среда. Много бактериални видове са способни да разграждат директно или индиректно нефтени въглеводороди. Бързата реакция на бактериите дори към относително ниски концентрации на замърсители, настъпва преди другите компоненти на крайбрежната екосистема да покажат забележим ефект. Поради тази причина реакцията на микробните популации при промяна в околната среда ги прави обещаващ индикатор за замърсители. Но макар че продължават да се правят опити за дефиниране на ясна микроорганизмова реакция на хронично замърсяване с нефт, замърсителят се явява С-източник за техния растеж и начинът по който той повлиява структурата на микробното съобщество е непредвидима и не може да се ползва като индикатор.

С оглед търсене на ефекта на хронично замърсяване с нефтопродукти върху прокариоти, са събрани данни за естествените бактериални съобщества [B4.1]. Използваните snap-shot техники дадоха информация за основните представители на съобществото, което естествено обитава неповлияни и повлияни от ксенобиотика зони, които са подбрани използвайки анализа за наличието и количеството на приоритетните ЕРА замърсители. Чрез прилагане на молекулярни методи са получени първите за българското черноморско крайбрежие данни както за естествените така и за подложените на антропогенно въздействие бактериални съобщества в морски седименти и вода [B4.1]. Snap-shot данните за бактериалните съобщества са първи по рода си, получени с fingerprint методът ARDRA. До момента на публикуване на статията информацията за разпространението и съотношението на големите групи бактерии в морски седименти дори с класически микробиологични методи бяха оскъдни.

Предполагаше се развитие на уникални прокариотни обитатели, поради уникалните условия на околната среда в Черно море (средна соленост 17,5‰), тъй като солеността се счита за основен екологичен фактор, определящ микробните съобщества. Методичната сложност при работата е продиктувана и от особеността на ксенобиотика. Нефтените въглеводороди проявяват при пречистването на изолираните биомакромолекули (ДНК) близки физични и химични свойства, което наложи оптимизиране на методиката за изолиране. Разработената модификация на методиката за изолиране на биомакромолекули се основава на публикуваните техники за директна изолация на ДНК от естествена матрица и е оптимизирана за пясъчен черноморски седимент.

Тъй като естествените бактерии трудно се поддават на култивиране, основният източник на информация за разнообразието им е разпространението в околната среда на тяхната ДНК, като приетият стандарт в микробиологията за вид е 16S рДНК. Генерираните по-дълги (обхващащи цялата дължина на 16S рДНК) последователности чрез секвениране по Sanger са подходящи за определяне на филогенетична принадлежност и това бе използваната стратегия за получаване на информация и анализ на микробни асоциации в околната среда (времето на издаването на статията, 2013). 16S рДНК е използвана като синоним на понятието бактериален вид, според съвременните и световно възприети стандарти в микробната екология. За пръв път са публикувани пълни 16S рДНК секвениции на 17 некултивируеми бактерии от българското черноморско крайбрежие, с GenBank номера FJ624296-624301, GU270861-270864 и GU452686-452692 в NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/FJ624296>; Uncultured bacterium clone 44SZ2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence).

За пръв път са доказани къси високоспецифични ДНК фрагменти от ароматни диоксигенази РАН-RHD алфа от Грам (-) бактерии, т.е. катаболитни гени, чиито най-близки открити роднини са ароматни диоксигенази от некултивируеми бактерии или обогатени консорциуми в GenBank. Основна трудност при работата с уникални черноморски проби е липсата на култивируеми представители на откритите 16S рДНК секвенции, с които да бъде свързана катаболитната активност на съобществото спрямо ксенобиотика. Изолирането на катаболитни прокариотни гени, участващи в разграждането на ПцАВ, доказва функциониращо бактериално съобщество, като в зоната на екологичен риск е установено присъствие на бактерии, способни да разграждат ароматни въглеводороди.

Откритите данни за доминиране на представителите на *α-Proteobacteria* в съобществото, подложено на хронично замърсяване с ПцАВ е в съгласие с факта, че само бактериите от отделите *Proteobacteria*, *Actinobacteria* и *Firmicutes* (Fuentes et al. 2014) могат успешно да разграждат въглеводороди, което е подкрепено от изследвания на сукцесията на бактериалните съобщества след нефтени разливи [B4.1] [E].

Първа по рода си изчерпателна характеристика, макар и еднократна, за основните групи бактерии, обитаващи морската вода на южното българско черноморие е получена с участието в инициативата Ocean Sampling Day (OSD 2014; OSD 2015). При съвместната работа е уеднаквена методологията по пробосъбиране, а публикуваните данни са сравнени с пробите от различни точки на Световния океан (данните са публикувани в статия извън списъка, с който авторът участва в конкурса, поради големия брой съавтори: Kopf et al. 2016, DOI: 10.1186/s13742-015-0066-5), като дават база данни и за бъдещи изследвания и сравнения.

Обобщението на микробно-екологичните анализи като начин за оценка на въздействието върху околната среда [B4.2] е резултат от научна колаборация, на база получените резултати и с оглед желанието за задълбочаване на изследванията.

За разлика от широко признатото значение на микробните процеси във функционирането на морските екосистеми, в Рамковата Директива по Морската Стратегия (РДМС) е взет предвид само фитопланктонът, зоопланктона и големите метазои (т.е. бентосната макрофауна и риби) и не се включва по-голямата част от микробите като автотрофни и хетеротрофни прокариоти. [B4.2] се фокусира върху потенциалната пригодност на прокариотите и свързаните с тях променливи за оценка на състоянието на морската среда, като се подчертават причините, поради които те трябва да бъдат взети предвид в РДМС с оглед на по-нататъшното изпълнение на мониторинговите програми.

Предложено е към Дескриптор 8, който изисква концентрациите на замърсителите да са на нива, които не предизвикват ефекти на замърсяване, да се включи оценка на наличните деградирани гени, свързани със специфични замърсители, които са широко застъпени в крайбрежната среда. Тези катаболитни гени са потенциални кандидати за интегриране в критериите на РДМС за оценка на Добро Екологично Състояние (Good Environmental Status).

Въздействието на замърсителя при акутно замърсяване е непосредствено разпознаваемо на ниво видове и съобщества, но дългосрочните ефекти на хроничните въздействия върху макробиотата се нуждаят от по-дълго време, за да се развият и да станат очевидни. Мониторингът на приоритетни замърсители все още не се прилага в европейското законодателство, докато някои местни програми (напр. за Черно море: SAP, 1996; Рамковата директива за водите, 2000 г.) дават пример за добра екологична практика, като ясно заявяват след първоначалното им въвеждане

нуждата от повече взети проби от седименти и биота, за да се подобри оценката на екологичното състояние. Друга препоръка към екипа, отговорен за оптимизиране на РДМС е спешна необходимост е да се определи референтна стойност на веществата, приемани за въведени от човека замърсители.

Направено е и предложение за включване на прокариотната променлива в мониторинга на бентосните местообитания (в рамките на Дескриптор 6 относно интегритета на морското дъно). Появата и/или увеличаването на специфични прокариотни групи, свързани с физични или химични показатели за замърсяване може да се използва като дескриптор на въздействието на антропогенното замърсяване върху екосистемата. За проследяване на процеса на биоремедиация след замърсяване с нефтопродукти е предложено да се прави не директно химичен анализ на замърсителя, а да се изследва наличието и динамиката на специфични катаболитни гени, свързани със съответния замърсител в крайбрежната зона. Това би позволило да се мониторира процеса на елиминиране на замърсителя.

Бентосните микроорганизми притежават висока чувствителност и бърза реакция към промените в околната среда, включително към различни видове антропогенни въздействия както в местен, така и в глобален мащаб. Тези характеристики ги правят обещаващ биологичен инструмент за оценка на качеството на околната среда и на екологичния риск.

Предложени са прокариотни характеристики, като тяхното обилие и активност, които да се използват като потенциални индикатори за качеството на околната среда. Като най-подходящи за морски мониторинг и за дефиниране на границите за Добър Екологичен Статус, е предложено отчитането на общата численост на прокариотите и на нефторазграждащите бактерии (hydrocarbonoclastic bacteria) тъй като те са потенциално готови за използване показатели, силно препоръчани за мониторинговите програми на РДМС. Предложението за имплементиране на бактериалната компонента като обект за оценка в РДМС, макар и да не е въведено (в момента се отчита само цъфтежът на опасни цианобактерии), е значим принос за бъдещо подобрене в оценката на биоразнообразието и функционирането на морските екосистеми.

Ефектът на ксенобиотици върху прокариотно съобщество с оглед функционирането на биогеохимичните цикли бе анализиран в рамките на участието на автора в международна колаборация. Чрез *in vitro* експериментални методи е оценено бактериалното разнообразие и процесите, свързани с обитаваната бактериална ниша в оризищата [B4.3]. Оризищата заемат няколко милиона хектара в света, като част от тях са кисели сулфатни почви и крайбрежни солени почви с естествено високо съдържание на сулфати. Концентрациите на сулфатите в почвата обикновено намаляват от 0.4 - 5.0 mM в първите дни след наводняването на оризището, до стабилна концентрация (1 - 99 μ M), но въпреки това нивата на сулфат редукия си остават високи в близост до корените (200 - 500 nmol cm⁻³d⁻¹) няколко седмици по-късно. Установено е, че интензивно реокисление на редуцирана сяра обратно до SO₄²⁻ протича и при условия на частична аноксия, като редуцираните серни видове могат да се окислят отново с помощта на железни минерали или редокс-активни части на хумусния материал, като хиноновите функционални групи. За измерване във времето на динамиката на SO₄²⁻, CH₄ и CO₂ са конструирани оризища-микрокосмоси, с и без добавяне на гипс (източник на SO₄²⁻). Уникалният състав и рН на биотопа са предизвикателство за получаване на качествен материал от биомакромолекули за анализ, което наложи модифициране и оптимизиране на методиката за изолиране. Получените 16S рРНК от третираните с гипс и контролните маркирани с ¹³CO₂-микрокосмоси са използвани за конструиране на сорудНК клонови библиотеки, които след секвениране са групирани в OTUs (Operational Taxonomic Units) на видово ниво при почти пълна

дължина на секвенциите на 16S рРНК. Секвенциите на 16S рРНК са депозираны в GenBank под номера KT985479 – KT985613 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KT985479>; Uncultured bacterium clone 101_S6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence), а OTUs, които представляват основните терминални рестрикционни фрагменти (T-RFs) в тежките фракции са анализирани с T-RFLP.

Описаната уникална екологична ниша хвърля светлина върху функционирането на биогеохимичния цикъл на сярата и взаимоотношенията в комплексното бактериално съобщество. Серният цикъл, който работи с висока скорост в оризищата, контролира метан продукцията, като ефектът се усилва от сулфат-съдържащи торове или почвени добавки. Изказано е предположението, че двата най-многочислени (>1%) OTU (*Desulfobulbaceae*, *Rhodocyclaceae*) играят централна роля за редукирните и окислителните части на серния цикъл.

Най-впечатляващият резултат е, че макар добавката на SO_4^{2-} да намалява CH_4 емисии с до 99%, не се отчита сериозно въздействие върху основния филогенетичен състав на бактериалното съобщество, феномен, с който авторът имаше опит при работата си с друг тип хронично замърсяване с ксенобиотик. Благодарение на колаборацията с тогавашния DOME (Department Of Microbial Ecology, Vienna University) при последвало посещение в рамките на проект на МОН (Д04-149/2014, точното заглавие фигурира в 13._Списък_проекти) бяха направени анализи и на стабилния филогенетичен маркерен ген за микроорганизми, разпадащи серни съединения - *dsrAB* гена (дисимилаторна бисулфит редуктаза) в уникални български сулфат-редуциращи бактерии. Българските проби са филогенетично класифицирани чрез използването на най-пълното консенсусно дърво на *dsrAB* гена непубликувано тогава (2014 г.) (публикувано от Mueller et al. 2015 като фиг.1). Всички секвенирани *dsrAB* гени, изолирани от седиментни и водни проби, принадлежат на некултивируеми сулфат-редуциращи бактерии от Environmental supercluster 1, uncultured *dsrAB* lineage 8 на редукирния бактериален тип DsrAB (данни, съобщени само в отчета на проект Д04-149/2014 към МОН, но непубликувани).

В поредицата на Elsevier Световните морета - World Seas: An Environmental Evaluation, главата, посветена на Черно море [Г8.23], участието като кореспондиращ автор даде възможност за цялостно изграждане на концепцията за главата, както и координацията на екип от съавтори с експертиза в различни области на науката от няколко черноморски държави.

Основната цел на главния редактор, която е следвана и реализирана, е да се направи обобщение на екологичното състояние на моретата по света, като се представи актуалния екологичен статус, основните проблеми, произхождащи от човешката намеса, както и експертни коментари по основните посоки, проблеми, успехи и препоръки за бъдещето.

Направен е извод, в заключителната част на главата, че настоящата екосистема на Черно море бавно се възстановява от влошеното си състояние през 70-те години на миналия век. Изказано е предположение, че ниският темп на възстановяване е свързан с неподходящо управление, както и с продължаващото силно антропогенно въздействие. Акцентирано е на факта, че това е уникален случай сред големите морски екосистеми в света – Черно море представлява почти срината екосистема с размер $\sim 400\,000\text{ km}^2$. Изказана е препоръка за спешно планиране на допълнителни мерки на ниво екосистема, както и необходимост от намаляване на еутрофикацията, намаляване капацитета на флота и забрана на риболов за определени рибни запаси или региони. Направен е изводът, че Черно море не поддържа големи рибни запаси (с изключение на югоизточната част) поради десетилетията на неустойчив риболов. Авторът

предлага като инструмент за стабилизиране и устойчиво функциониране на черноморската екосистема да се прилагат екосистемно базирани стратегии за управление, които да се разработват в сътрудничество между черноморските държави.

Засиленото антропогенно влияние и свързания с това екологичен риск както върху елементи от естествените екосистеми така и върху човека засили интересът ми към ксенобиотиците. Те се срещат повсеместно, техният ефект оказва значимо влияние върху биотата и получането и разпространението им, свързано с човека, оказва все по-глобален ефект. Методите за изследване на ефекта на ксенобиотиците варират от биохимични и молекулярни до изцяло теоретични. *In silico* методите са относително нови методи в областта на екологията, но тяхното прилагане в световен мащаб расте експоненциално (Astuto et al. 2022). Ще отбележа и особената ценност на използваните теоретични методи при изследване на ксенобиотиците, тъй като тези методи имат не само тълкувателна стойност при налични експериментални резултати, но и предсказваща, което силно съкращава необходимите средства и ресурси необходими за организирането на бъдещ експеримент (Madden et al. 2003).

Влиянието на факторите от околната среда има първостепенно значение за развитието на автоимунните заболявания. Установено е, че е нужно продължителното време между пусков сигнал, предизвикан от фактор на средата и появата на автореактивност. Всъщност околната среда, в по-голяма степен от генома, формира имунната система (Selmi et al. 2018). Генетичните фактори са необходими, но недостатъчни за обяснение на загубата на толерантност, която се обяснява с факторите на околната среда и стохастичните фактори. Терминът "експозом" се отнася кумулативно до ненаследствените (т.е. екологичните) фактори, които обясняват негенетичната податливост на организма и са предмет на автоимунната екология (Selmi et al. 2018; Anaya et al. 2016). Натрупващите се доказателства сочат, че излагането на инфекции, лекарства, ваксини и химикали може да допринесе за загубата на толерантност. Механизмите, чрез които факторите на околната среда могат да оформят имунната система, за да се породят автоимунитет, включват молекулярна мимикрия, модификация на собствен антиген, модулация на имунната реактивност и други (Perricone and Shoenfeld 2019).

Системният лупус еритематозус (СЛЕ) е прототипно автоимунно заболяване, характеризиращо се с производството на антитела срещу компоненти на клетъчното ядро и изявата му е свързана с разнообразни клинични прояви. Точната причина за възникване на СЛЕ е неизвестна, но се предполага изключително сложно и многофакторно взаимодействие между различни фактори. Множество гени допринасят за предразположението към заболяването, но началото му вероятно се дължи на няколко стартиращи фактора от околната среда - ксенобиотици като инфекциозни агенти, токсини/лекарства. Тези стартови фактори са изключително важни, тъй като отстраняването им води до значима позитивна промяна, както показват клиничните проучвания при пациенти.

На база открит и описан от нас нов елемент на молекулярна мимикрия е изказана хипотезата, за прогресия на автоимунното заболяване СЛЕ и предполагаемия механизъм на нарушаване на толерантността (тематично свързаните статии [B4.5], [B4.4] и [Г7.6]).

При тези изследванията на клетъчно ниво основен молекулен обект е C1q молекулата и ролята ѝ в развитието на СЛЕ. C1q е част от системата на комплемента и играе важна разпознавателна роля в адаптивния и вродения имунитет. Тя взаимодейства с глобуларните си части (6А-, 6-В и 6-С "глави") с имуноглобулинови и неимуноглобулинови молекули, което води до активиране на системата на комплемента.

За първи път в [Г7.6] е съобщено за наличие на анти-C1q автоантитела (наричани по-нататък в текста просто автоантитела) при болни от СЛЕ, които разпознават и свързват части от глобуларната област на човешкия C1q. Първоначалното предположение за значението на автоантителата е, че допълнително влошават способността на C1q да изчиства имунните комплекси.

В по-нататъшните изследвания е търсен отговор на въпроса кои са точните места от C1q (автоепитопи), разпознавани от автоантителата, които присъстват в серуми на болни с прогресиращ СЛЕ. Чрез *in vitro* и *in silico* методи са селектирани синтетични едноверижни антиядлови молекули (scFv), имитиращи тези части от глобуларните области от нативния C1q, които автоантителата разпознават. Успешният скрининг даде като най-добро попадение молекула, която при инхибиторния анализ в най-голяма степен наподобява C1q, тя е секвенирана и депозирана с номер в GenBank KX981596 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/KX981596>; Synthetic construct anti-idiotypic scFv A1 antibody gene, partial cds). Конструиран е нейн хомоложен модел, който е използван за сравнителен анализ с кристализиран човешки C1q. Намерени са конформационно и електростатично подобни части, чрез които са характеризирани ключови за биологичното свързване области на C1q.

Направено е структурно сравнение (на база първична и вторична белтъчна структура) между глобуларните части на C1q и хипервариабилните части на scFv молекулата. Сравнението се основава на предположението, че реагиращите аминокиселини са разположени в гъбавите примки на двете структури, а не в структурно компактните и твърди бета-листови структури. Бримките (участъци от белтъка без изразена вторична структура) на трите хипервариабилни участъка на scFv молекулата са сравнени с бримките в отделните вериги на C1q и е намерено сходство основано на полярността на аминокиселинните остатъци.

Конструираният модел за сходство на бримките показва, че трите хипервариабилни участъка на scFv имат аналози на върха на нативната глобуларна част на C1q. Тези части - апекса на C1q, са важни за ангажирането на автоантителата. Мимикрията на scFv към частите на всички глобуларни глави А, В и С на C1q разкрива възможното участие на всички тях във взаимодействието с автоантителата, съответстващо на инхибиращата активност на scFv към трите глобуларни глави, като по този начин се потвърждава конформационният характер на мимикриания автоепитоп.

Чрез генерираният 3D модел на scFv молекулата за първи път косвено се картографира глобуларен автоепитоп на C1q (където автоепитоп е участък от C1q, разпознаван от автоантитела). Сходните региони са разположени в трите глобуларни глави, което предполага, че глобуларният автоепитоп може да се състои от няколко линейни участъка, формиращ конформационен епитоп.

СЛЕ се характеризира и с производството на патогенни автоантитела, насочени срещу нуклеинови киселини и свързващите ги протеини (анти-ДНК автоантитела), което отразява глобалната загуба на толерантност към своето. Анти-ДНК автоантителата се срещат при повече от 95% от пациентите със СЛЕ и са централен биомаркер и патогенетичен фактор, като най-забележителна е асоциацията им с гломерулонефрита, водещ до летален изход на болестта (Mok et al. 2003; <https://jcp.bmj.com/content/56/7/481>; Choi et al. 2012).

Една от подобните бримки между scFv и C1q, съдържа последователността GSEAD, която се съобщава и като участък разпознаван от анти-ДНК автоантитела (Gaboriaud et al. 2003). Това е основание за изказване на хипотеза, че част от А главата на C1q е кръстосан епитоп, разпознаван както от анти-C1q автоантитела, така и от анти-ДНК автоантитела. Предложен е механизъм на база на изказаната хипотеза, че кръстосано реагиращите анти-ДНК автоантитела увеличат първоначално C1q в контекста на автоимунния отговор, като го превръщат в автоантиген. Това предположение е в съгласие с наблюденията, че хронологично при развитието на СЛЕ анти-C1q автоантителата се появяват след анти-ДНК автоантителата.

За пръв път се описва предполагаем механизъм за ангажиране на набор от молекули в патофизиологичния процес, който дава важен маркер за определяне на групата болни, при които заболяването ще прогресира и тъй като това е летално заболяване, разработката има важно приложно значение в търсене на лечение за прекъсване на ефекта от тези външни фактори.

Метаболитните ензими и системи са еволюирали, за да осигурят защита срещу ксенобиотиците (чужди и потенциално опасни молекули от околната среда). Терминът ксенобиотик се използва за химични вещества, които са чужди на организмите. Повечето от тези химикали, които достигат до организма чрез храната, въздуха, питейната вода, употребата на лекарства и начина на живот, преминават през широк спектър от процеси на детоксикация, които като цяло ги правят по-малко токсични, по-полярни и лесни за екскреция. Важно да се разберат както качествените, така и количествените аспекти на метаболизма на ксенобиотиците, за да се придобие представа за механизма на елиминирането им, а *in silico* методите значително подпомагат идентифицирането на метаболитите, получени от биотрансформацията на изследвания ксенобиотик (Patterson et al. 2010).

Оценка на ефекторното въздействие на ксенобиотик върху реагираща еукариотна рецепторна система с различни съвременни *in silico* методи е получена в [Г7.8], [Г7.9], [Г7.14], [Г7.19].

Съвременните *in silico* изчислителни методи позволяват работа с големи молекули и точност, сравнима с експерименталната. Те дават възможност за интерактивна оптимизация на най-обещаващите съединения, при значително по-ниски разходи в сравнение с *in vitro* и *in vivo* подходите. В контекста на метаболизма, *in silico* инструментите най-често се използват за прогнозиране на оптималните химични структури на субстрати и ефектори на метаболитни ензими и рецептори. Тези прогнози могат да се използват при решаването на широк кръг задачи като предсказване на токсичността на ксенобиотици към определени метаболитни системи или уточняването на структури на нови лекарствени съединения.

Едни от предполагаемите ефектори на клетъчни рецептори със съответна изява за организма са хеморфините. Те са естествено срещащи се къси ендогенни пептиди, съдържащи от 4 до 10 аминокиселини, получени от части на β -веригата на хемоглобина. Все още не е ясен прицелният рецептор за хеморфините, поради сложността на невротрансмитерна мрежа и това е основна цел на изследванията в [Г7.8], [Г7.9], [Г7.14], [Г7.19] - ефекта и метаболитните пътища, в които участват хеморфините и техни аналози. Известно е, че хеморфините имат афинитет към δ - (DOR) и κ -опиоидните (KOR) рецептори и проявяват морфиномиметични свойства. Посредством докинг изследване на модели на DOR и KOR е изучен ефекта на ксенобиотици, синтетични аналози на хеморфините, съдържащи непротеиногенни и/или естествени аминокиселини, както и N-модифицирани техни аналози с аминокиселинна част. Установените взаимодействия между всички ефектори и KOR са енергетично по-изгодни с повече от 20 %, в сравнение с взаимодействията им с DOR, и ефекторите се позиционират в непосредствена

близост до известни консервативни аминокиселинни мотиви с решаващо значение за функционирането на опиоидните рецептори. Получената информация доведе до предположения за възможния молекулен механизъм на действие на ефекторите, като включването на аминокиселинната част на първа позиция в хеморфиновия скелет трябва да се проучи в последващи изследвания. Резултатите от докинг анализа потвърждават експерименталните данни, получени върху животински модели и ни дават основание да предположим, че не само позицията на модификацията, но и естеството на включената група водят до значителни промени в активността и афинитета на новосинтезираните пептидни ефектори.

В процеса на уточняване на рецепторите-мишени бе продължена работата с хеморфиновите аналози, модифицирани с неестествени, конформационно ограничени аминокиселини. На база съществуващи литературни данни, че хеморфините и биологично активния ангиотензин IV (притежаващ антиконвулсивна активност) са функционални агонисти на активността на ензима IRAP (инсулин-регулирана аминопептидаза) (Stragier et al., 2008), определихме тази Zn^{2+} -съдържаща металопротеаза като потенциален рецептор за хеморфините. Тъй като хеморфините дозозависимо променят каталитичната активност на IRAP *in vitro* проведохме докинг изследване върху модел на IRAP с цел изясняване на възможния молекулярен механизъм на действие на новите пептидни ефектори.

Докингът на молекули с голяма конформационна свобода, каквито са нашите ефектори, поражда много предизвикателства в повечето от етапите на процедурата за докинг. Резултатите от него показват, че най-важни за свързването на ефекторите с IRAP са директните Н-връзки и йонните им взаимодействия с аминокиселинните остатъци, отговорни за координацията на Zn^{2+} , както и хидрофобните взаимодействия с активния център на IRAP. За разлика от естествените ефектори на ензима, които позиционират своя N-край в близост до Zn^{2+} , благоприятното позициониране на нашите новосинтезирани ефектори е с техния C-край до Zn^{2+} , което се дължи на амидирания C-край, позволяващ формирането на благоприятни Н-връзки и йонни взаимодействия. Активността на най-активният ефектор P4-5, тестван експериментално на миши модел, е потвърдена от докинг анализа. P4-5 съдържа едновременно адамантанови и циклохексанови групи и притежава висока биологична активност, която се основава на благоприятни липофилни взаимодействия между него и свързващия джоб на IRAP. Използвайки тълкувателната стойност на *in silico* методите, е предположено участието на хеморфиновите аналози в множество метаболитни и невротрансмитерни системи: KORs, IRAP, NMDA каналите и GABAA-BZD-хлоридния канал (последните два са йонни канали) което лежи в основата на действието им.

Последните резултати от цялостната концепция за изследване на ефекторното взаимодействие на пептидните аналози на хеморфините върху множество невротрансмитерни системи, са свързани с моделиране на волт-зависими йонни канали (Na^{+} , Ca^{2+}). Новосинтезираните N-модифицирани хибридни аналози на хеморфини, съдържащи C-5 замесен хидантоинов остатък, са тествани като потенциални антиконвулсанти. Всички наши ефектори, както и естествените хеморфини, се свързват вътре в централната кухня на канала, за разлика от много изследвани полипептидни токсини, които се свързват с йонните канали извън централната им кухня. Ефекторите с 4 аминокиселинни остатъка показаха по-слаба активност от тези с 5, което потвърждава получените експериментални данни от животински модел. При цялостния анализ на серията ефектори е направен изводът, че по-големите молекули по-трудно биха влезли в централната кухня, което се явява кинетична пречка за тях, въпреки термодинамично по-изгодното им взаимодействие. Резултатите от докинг изследването показват, че Ph-5 е мощен ефектор на натриевите канали и че механизмът на действие на модифицираните пептидни ефектори с антиконвулсивна активност би могъл да е блокада на волт-зависимите натриеви канали.

Моделирането на взаимодействието на хеморфиновите аналози с рецептори на множество невротрансмитерни системи демонстрира тълкувателната сила на *in silico* методите, чрез които е оценено взаимодействието на ксенобиотиците с метаболитните модели.

Йонните канали са еволюционно стари системи, възникнали още при прокариотите и са участници в редица биологични процеси, поради което са широко използвани в токсикологичните изследвания, тъй като се регулират от редица екологични замърсители, включително някои пестициди. Свързването на токсикологията и йонните канали категорично предполага, че тези белтъци са отлични кандидати за проследяване на токсичните ефекти на ксенобиотиците (Restrepo-Angulo et al. 2010). Има ясни данни, че волт-зависимите натриеви канали са основен прицелен белтък на пестицидите от групата на пиретроидите (Ray and Fry, 2006). В тази посока са правени *in silico* анализи за оценка на въздействието на друг масово използван хербицид, глифосат, върху бактериални йонни канали при провеждан няколкогодишен *in vivo* експеримент в рамките на секция “Биомониторинг и екологичен риск” (непубликувани резултати). В многогодишния анализ на ниво холобионт се работи с интегрална система от висше едногодишно растение и неговия коренов микробиом. Поради спецификата от ефекта на ксенобиотика върху почвените бактерии, а именно нуждата от многогодишна акумулация на замърсителя, са получени и публикувани почвен анализ и частични резултати за доминиращите членове на бактериалното съобщество [Г7.7] и [Г7.13]. Йонните канали на прокариотните обитатели е обещаваща токсикологична цел за проследяване на ефект на ксенобиотик върху холобионтна моделна система, тенденция която се е наложила в много области на науките за живота (life sciences) (Simon et al. 2019).

В заключение, работата ми в областта на биомониторинга и изследване на ефектите на ксенобиотиците на различни нива на организация на живото налага интердисциплинарен подход, с прилагане на методи от различни групи в тази бързо развиваща се област на научното познание.

С уважение: Надежда Тодорова

София, 06.06.2022 г.

Литература

Рамковата Директива по Морската Стратегия (РДМС)

Рамковата директива за водите от 2000 г. на Европейската комисия (2000/60/EC)

Националната стратегия за регионално развитие на България, 2005-2015 г.

Anaya JM, Ramirez-Santana C, Alzate MA, Molano-Gonzalez N and Rojas-Villarraga A. The Autoimmune Ecology. *Front. Immunol.* 2016; 7:139. doi: 10.3389/fimmu.2016.00139

Alonso-Gutiérrez J, Figueras A, Albaigés J, Jiménez N, Viñas M, Solanas AM, Novoa B. Bacterial communities from shoreline environments (Costa da Morte, Northwestern Spain) affected by the prestige oil spill. *Appl. Environ. Microbiol.* 2009. 75, 3407–3418. <https://doi.org/10.1128/AEM.01776-08>

Astuto M.C. et al. (2022) In Silico Methods for Environmental Risk Assessment: Principles, Tiered Approaches, Applications, and Future Perspectives. In: Benfenati E. (eds) In Silico Methods for Predicting Drug Toxicity. Methods in Molecular Biology, vol 2425. Humana, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1960-5_23

Choi J, Kim ST, Craft J. The pathogenesis of systemic lupus erythematosus-an update. *Curr Opin Immunol.* 2012 Dec;24(6):651-7. doi: 10.1016/j.coi.2012.10.004.

Encyclopedia Briatannica, Stuart L. Pimm, <https://www.britannica.com/science/ecology>

Environmental Protection Agency, About Risk Assessment, <https://www.epa.gov/risk/about-risk-assessment>

Fuentes S, Méndez V, Aguila P, Seeger M. Bioremediation of petroleum hydrocarbons: catabolic genes, microbial communities, and applications. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2014. 98, 4781–4794. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5684-9>

Gaboriaud C, Juanhuix J, Gruez A, Lacroix M, Darnault C, Pignol D, Verger D, Fontecilla-Camps JC, Arlaud GJ. The crystal structure of the globular head of complement protein C1q provides a basis for its versatile recognition properties. *J. Biol. Chem.* 2003, 278, 46974–46982. DOI: 10.1074/jbc.M307764200

Madden JC, Enoch SJ, Paini A, Cronin MTD. A Review of In Silico Tools as Alternatives to Animal Testing: Principles, Resources and Applications. *Alternatives to Laboratory Animals.* 2020. 48(4):146-172. doi:10.1177/0261192920965977

Mok CC, Lau CS. Pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *J Clin Pathol* 2003;56:481–490. <http://dx.doi.org/10.1136/jcp.56.7.481>

Müller A, Kjeldsen K, Rattei T, Pester M, Loy A. Phylogenetic and environmental diversity of DsrAB-type dissimilatory (bi)sulfite reductases. *The ISME J.* 2015. 9, 1152–1165. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.208>

Patterson AD, Gonzalez FJ, Idle JR. Xenobiotic metabolism: a view through the metabolometer. *Chem Res Toxicol.* 2010;23(5):851-60. doi: 10.1021/tx100020p

Perricone C and Shoenfeld Y. Eds. The Mosaic of Autoimmunity: The Novel Factors of Autoimmune Diseases. 2019, Elsevier, <https://doi.org/10.1016/C2017-0-01127-8>

Ray DE, Fry JR. A reassessment of the neurotoxicity of pyrethroids insecticides. *Pharmacol. Ther.* 2006. 11: 174–193

Restrepo-Angulo I, De Vizcaya-Ruiz A, Camacho J. Ion channels in toxicology. *Journal of Applied Toxicology*. 2010. 30 (6), 497-512. <https://doi.org/10.1002/jat.1556>

Stragier B, De Bundel D, Sarre S, Smolders I, Vauquelin G, Dupont A, Michotte Y, Vanderheyden P. Involvement of insulin-regulated aminopeptidase in the effects of the renin-angiotensin fragment angiotensin IV: a review. *Heart Fail Rev*. 2008 Sep;13(3):321-37. doi: 10.1007/s10741-007-9062-x.

Selmi C, Bin Gao, Gershwin ME. The long and latent road to autoimmunity. *Cell Mol Immunol* 2018; 15, 543–546. <https://doi.org/10.1038/s41423-018-0018-y>

Simon JC, Marchesi JR, Mougel C, Selosse M-A. Host-microbiota interactions: from holobiont theory to analysis. *Microbiome*. 2019. 7, 5. <https://doi.org/10.1186/s40168-019-0619-4>

Справка за научните приноси на Надежда Христова Тодорова,

предоставена във връзка с участието в конкурс за заемане на академичната длъжност „доцент“ по професионално направление 4.3. Биологически науки, за нуждите на секция "Биомониторинг и екологичен риск" към отдел "Екосистемни изследвания, екологичен риск и консервационна биология" към ИБЕИ-БАН

Основната част от публикациите, свързани с темата на конкурса, са в областта на микробната екология, екотоксикологията, биомониторинга на ксенобиотици и оценка на екологичния риск на организмово и клетъчно ниво. Научните и научно-приложни приноси на кандидата могат да се обобщят в следните основни направления, както следва:

1. Приноси в екологията на микробните съобщества

- За пръв път чрез молекулярни методи е събрана информация за разпространението и съотношението на големи групи бактерии в морски седименти и вода от българското черноморско крайбрежие [B4.1] [E]. Поради необичайната соленост на Черно море (17,5‰), е изказана хипотеза за уникалността на естествените обитаващи прокариоти, тъй като солеността е основният екологичен фактор, определящ микробните съобщества [B4.1].
- Данните за доминиране на представителите на *α-Proteobacteria* в съобществото, подложено на хронично замърсяване с ПцАВ, е в съгласие с факта, че само бактериите от отделите *Proteobacteria*, *Actinobacteria* и *Firmicutes* (Fuentes et al. 2014) могат успешно да разграждат въглеродороди [B4.1] [E].
- Получена е информация за доминиращите прокариотни обитатели в почва, третирана с ксенобиотик (пестицид). Анализът на коренова зона и извън нея с молекулярни fingerprint и класически микробиологични методи показва липса на промени, като ефектът е продиктуван от краткия период на въздействие на ксенобиотика [Г7.7] и [Г7.13].

2. Методични приноси в екологичния мониторинг

- Оптимизиране на методика за изолиране на биомакромолекули (ДНК, РНК) от природна матрица с уникални рН и органичен и неорганичен състав (седимент от оризища), които интерферира със свойствата на нуклеиновите киселини и се явяват инхибитори на последващите молекулярни техники за анализ [B4.3].
- Уеднаквена и успешно е приложена методика за събиране на водни проби и изолиране на ДНК, съобразена със съвременните познания в областта на микробната екология, осигуряваща достатъчно количество изолирани бактерии и избягване на често срещани проблеми, дължащи се на методични особености, вкл. PCR количествена работа [E].

3. Молекулярно-таксономични и филогенетични приноси:

- За пръв път са публикувани пълни 16S рДНК секвениции, отговарящи в микробиологията на понятието вид или OTU, на 17 некултивируеми бактерии от българското черноморско крайбрежие, с GenBank номера FJ624296-624301, GU270861-270864 и GU452686-452692 в NCBI

(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/FJ624296>; Uncultured bacterium clone 44SZ2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence) [B4.1].

- За пръв път са доказани къси високоспецифични ДНК фрагменти от ароматни диоксигенази РАН-RHD алфа от Грам (-) бактерии, т.е. катаболитни гени, чиито най-близки открити роднини са ароматни диоксигенази от некултивируеми бактерии или обогатени консорциуми от GenBank [B4.1].

- За пръв път са депозиран в GenBank 16S рРНК секвенции на некултивируеми бактерии от оризища, свързани със “скрита” сулфат редукция под номера KT985479 – KT985613 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KT985479>; Uncultured bacterium clone 101_S6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence) [B4.3].

- Депозирана в GenBank е нова секвенция KX981596 на синтетична молекула (artificial taxon), явяваща се аналог на глобуларна част от C1q, която се разпознава от автоантитела от болни от СЛЕ (Системен Лупус Еритематозус) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KX981596>; Synthetic construct anti-idiotypе scFv A1 antibody gene, partial cds) [B4.5].

4. Приноси към устойчивото екосистемно управление, имащи отношение към климатичните промени

- Изследван е балансът на отделяните газове в *in situ* моделна система на оризаще, като е отчетено, че добавката на SO_4^{2-} води до намаляване с до 99% на емисиите на парниковия газ CH_4 , без да се отчита сериозна промяна и въздействие върху основния филогенетичен състав на бактериалното съобщество. Новополучените данни показват адаптивния потенциал на бактериите, участващи в серния цикъл за поддържане на условия, благоприятни за намаляване на парниковите емисии [B4.3].

5. Методични приноси, свързани с Рамковата Директива по Морската Стратегия (РДМС) и препоръки за постигане на устойчиво развитие на екосистемата на Черно море

- Направено е обобщение на екологичното състояние на почти срутената екосистема на Черно море, което е уникален случай сред големите морски екосистеми в света. Анализирани са актуалният екологичен статус на Черно море, което бавно се възстановява от влошеното си състояние през 70-те години на XX век. Посочени са основните проблеми, произхождащи от човешката намеса, като еутрофикация и засилен риболов. Направени са препоръки за устойчиво управление: препоръчано е спешно планиране на допълнителни мерки на ниво екосистема като инструмент за стабилизиране и устойчиво функциониране на черноморската екосистема, които да се разработват в сътрудничество между черноморските държави [Г8.23].

- Разработени са прокариотни променливи за оценка на състоянието на морската среда, които са предложени за имплементиране в мониторинговите програми на РДМС.

Към Дескриптор 8, който изисква концентрациите на замърсителите да са на нива, които не предизвикват ефекти на замърсяване, е предложено да се включи оценка на наличните гени, отговорни за разграждането на специфични замърсители, които са широко застъпени в крайбрежната среда. Тези катаболитни гени са потенциални кандидати за интегриране в критериите на РДМС за оценка на Добро Екологично Състояние (Good Environmental Status). Тъй като мониторингът на приоритетни замърсители все още не се прилага в европейското законодателство е препоръчано да се определи референтна стойност на веществата, приемани за

въведени от човека замърсители. Направено е и предложение за включване на прокариотната променлива в мониторинга на бентосните местообитания (в рамките на Дескриптор 6 относно интегритета на морското дъно). Появата и/или увеличаването на специфични прокариотни групи, свързани с физични или химични показатели за замърсяване може да се използва като дескриптор на въздействието на антропогенното замърсяване върху екосистемата, което ги прави обещаващ биологичен инструмент за оценка на качеството на околната среда и на екологичния риск [B4.2].

6. Приноси в областта на екологичния риск и екотоксикологията

- Изказана е нова хипотеза относно причините за поява на автореактивност в резултат на фактори на околната среда. Описана е молекулна мимикрия, която води до прогресия на автоимунното заболяване СЛЕ (Системен Лупус Еритематозус) и предполагаем механизъм на нарушаване на толерантността посредством *in vitro*, *in situ* и *in silico* методи. За пръв път се формулира предполагаем механизъм за ангажиране на набор от молекули в патофизиологичен процес, който дава важен маркер за определяне на групата болни, при които заболяването ще прогресира. Разработката има важно приложно значение в търсене на лечение чрез прекъсване на ефекта от външните фактори [B4.5], [B4.4] и [Г7.1].

- Оценено е ефекторното въздействие на ксенобиотик върху метаболитни модели на еукариотна рецепторна система с различни съвременни *in silico* методи. Изказани са предположения за възможния молекулен механизъм на действие на ксенобиотици, като не само позицията на модификацията, но и естеството на включената група, водят до значителни промени в активността и афинитета на новосинтезираните пептидни ефектори - факт потвърден от експериментални данни. Използвайки тълкувателната стойност на *in silico* методите, е предположено участието на модифицираните пептидни ефектори в множество метаболитни и невротрансмитерни системи: KORs, IRAP, NMDA каналите и GABAA-BZD-хлоридния канал (последните два са йонни канали), като се предполага че основният механизъм на действие се дължи на блокада на волт-зависимите натриеви канали [Г7.8], [Г7.9], [Г7.14], [Г7.19].

7. Приноси в биомониторинга на ксенобиотици

- При биомониторинга на ефекта на пестицида глифосат не се открива промяна в богатството и относителното обилие на доминиращите членове на микробното съобщество. Изказана е хипотеза, че поради спецификата на ксенобиотика, който е C-източник за почвените бактерии, е нужна няколкогодишната му акумулация за проявяване на токсичен ефект върху прокариотите [Г7.7] и [Г7.13].