

РЕЦЕНЗИЯ

върху дисертационен труд и материали, представени от
маг. Калина Венелинова Каменова, редовен докторант към Катедра Аналитична химия,
Факултет по химия и фармация, Софийски университет „Св. Климент Охридски”
по професионално направление 4.2. „Химически науки” (Аналитична химия)
за присъждане на образователната и научна степен „Доктор” на тема
„Изследване на потенциалното приложение на нови хелатни агенти като антидоти при
интоксикации с метални йони”

от чл.-кор. проф. дхн Димитър Любомиров Цалев,
пенсиониран преподавател (последна месторабота Катедра аналитична химия,
Факултет по химия и фармация, Софийски университет „Св. Кл. Охридски”)

Кратки данни за дисертанта: Калина Венелинова Каменова завършва висше образование с отличен успех като бакалавър по спец. „Химия” (направление „Компютърна химия и учител по химия и опазване на околната среда“) във ФХФ на СУ „Св. Кл. Охридски” (2009–13) и е магистър по „Химия - медицинска химия“ във ФХФ-СУ, също с отличен успех (2013–15). Била е редовен докторант по професионално направление 4.2. „Химически науки” (Аналитична химия) към Кат. „Аналитична химия“ (2015–18) с научен ръководител доц. д-р Юлияна Иванова-Тумбева. Работила е като учител и медицински регистратор, а след 2014 г. е била организатор учебна дейност и химик в Медицински факултет-София. Положила е 4 докторантски изпити от учебния план и е отчислена с право на защита (2018).

Дисертационният труд е оформен на 166 стр., вкл. 25 таблици, 19 фигури, 19 схеми и 381 цитирани литературни източници.

Темата на дисертационния труд и поставените цел и задачи са **актуални** поради значимостта на токсичните елементи кадмий и олово, които са сред най-важните замърсители на околната и работната среда и имат ефекти на остри и хронични отравяния. От друга страна, литературните данни за използване на антидоти под формата на хелатообразуващи агенти показват противоречиви резултати, непълни данни и странични ефекти на използваните вещества. Сравнителното изследване на някои известни антидоти като DMSA и някои потенциални полиетерни йонофорни антибиотици като салиномицин и монензин по отношение на токсичните йони Cd(II) Pb(II) и някои есенциални йони представлява интересна изследователска задача. Тази тематика е част от научните интереси на Лабораторията по биокоординационна и биоаналитична химия в Катедрата по аналитична химия през последното десетилетие.

Общото впечатление от дисертационния труд и останалите материали: автореферат (46 стр.), 3 публикации, списък с 14 участия в конференции, в 5 научни проекта по договори и други документи е напълно положително. Рецензираните материали в е-формат, както и печатните копия на дисертационния труд и АР са редактирани и оформени много грижливо и качествено и са в добро съгласие помежду си.

Дисертационният труд е представен в 8 основни части, включително: Литературен обзор (60 стр.), Експериментална част (12 стр.), Резултати и обсъждане (47 стр.) и Литературни източници (27 стр.).

В литературния обзор (60 стр.) са разгледани последователно за двата токсични елемента Cd и Pb техните свойства, разпространение, експозиция, абсорбция, транспорт, биоразпределение, биотрансформация, токсични ефекти, диагноза, лечение; експериментални модели и клинични случаи на отравяния; хелатни агенти, използвани при отравяне с кадмий и олово. Демонстрирано е много добро познаване на съвременната научна литература (381 заглавия на латиница), като преобладаващата част от цитираните лит. източници са от последните 10 години (52% за периода 2009–2018 г.). Литературната част е добре структурирана и онагледена с 5 фигури, 19 схеми и 17 таблици. В бъдеще този материал би могъл да се обогати с експ. данни и да се подготви за публикуване като ценен критичен обзор. Направените заключения от литературния обзор са в основата на **целите и задачите** на дисертационния труд.

Целта на дисертационния труд е да се направи мащабно сравнително изследване на потенциалното приложение на монензин, салиномицин и мезо-2,3-димеркаптосукциниловата киселина (DMSA) като антидоти при интоксикация с метални йони.

Задачите на дисертационния труд са: (1) Получаване на салиномицин киселина и монензин киселина от съответните търговски продукти; (2) Разработване на *in vivo* модел за: (а) сравнително изследване на потенциалното приложение на DMSA, монензин и салиномицин като антидоти при подостро отравяне с Cd; (б) сравнително изследване на потенциалното приложение на DMSA, монензин и салиномицин като антидоти при подостро отравяне с Pb; (3) Хематологични анализи за сравнителна оценка на: (а) влиянието на DMSA, монензин и салиномицин върху някои хематологични параметри при Cd-интоксикирани животни; (б) влияние на DMSA, монензин и салиномицин върху някои хематологични параметри при Pb-интоксикирани животни; (4) Биохимични анализи за: (а) определяне на влиянието на DMSA, монензин и салиномицин върху някои биохимични показатели при Cd-интоксикирани животни; (б) влияние на DMSA, монензин и салиномицин върху някои биохимични показатели при Pb-интоксикирани животни; (5) Атомноабсорбционен анализ за сравнително изследване на влиянието на DMSA, монензин и салиномицин върху биоразпределението на Cd/Pb, Ca, Cu, Fe и Zn в органи на животни (а) подложени на подостро отравяне с Cd(II) и (б) подложени на подостро отравяне с Pb(II); (б) Статистическа обработка на получените резултати.

В Експерименталната част (12 стр.) са описани използваните апарати, реактиви и аналитични методики, които са адекватни на поставените цел и задачи. При изследванията са усвоени и компетентно приложени адекватни аналитични и изследователски методи, вкл. получаване на монензин киселина и салиномицин киселина; ЯМР, определяне на химичен добив; *in-vivo* модели с експериментални животни (50 броя половозрели мъжки мишки, линия ICR на възраст 60 дни с тегло 25–30 g); хематологични и биохимични анализи и изследвания; пламъкова атомноабсорбционна спектрометрия (FAAS); електротермична атомноабсорбционна спектрометрия ETAAS); масспектрометрия с индуктивно свързана плазма (ICP-MS); инфрачервена спектрометрия; статистически методи и тестове. Експерименталната част е изпълнена и описана прецизно.

Разделът **„Резултати и обсъждане”** (47 стр.; 29% от обема на дисертацията) е структуриран в подраздели, посветени съответно на експозиция с токсичните елементи кадмий и олово, резултати от хематологични, биохимични и атомноабсорбционни анализи и влиянието на токсичните елементи Cd и Pb и на третирането с трите потенциални антидота – хелатните агенти DMSA, Mon и Sal върху чернодробни, бъбречни и други функционални маркери и върху концентрациите на Ca, Cd, Cu, Fe, Pb

и Zn в кръв и биологични тъкани от органи на експерименталните животни. Представените резултати са в съгласие с направените 3 публикации и 14 научни доклади и са онагледени с 13 фигури и 8 таблици с илюстративен, доказателствен и обобщаващ характер.

Основните приноси в дисертационния труд могат да бъдат класифицирани като получаване на нови и потвърдителни факти с помощта на оптимизирани, адапирани и верифицирани аналитични процедури, основани на атомна спектрометрия (FAAS, ETAAS, ICP-MS) и хематологични и биохимични анализи (над 24 показателя) при експериментална подостра интоксикация на мишки с кадмий(II) и олово(II), с и без третиране с трите изследвани потенциални антидота: мезо-2,3-димеркаптосукциниловата киселина (DMSA), монензин (Mon), салиномицин (Sal).

1. Демонстрирана е пригодността за целта на използваните аналитични измервателни процедури по отношение на прецизност, точност, граници на определяне, приложимост към сертифицирани референтни материали.
2. Получени са количествени данни за влиянието на токсичните йони на Cd(II) (под формата на ацетат), на Pb(II) (под формата на нитрат) и на трите сравнявани антидота DMSA, Mon и Sal върху биоразпределението на есенциалните йони Ca(II), Cu(II), Fe(II) и Zn(II) и върху други 18 биохимични показатели в биологични течности и тъкани на експерименталните животни, с оглед определяне на потенциалните рискове при антидотна терапия.
3. Експозицията на Cd(II) ацетат предизвиква понижаване на някои хематологични показатели (броя на червените кръвни клетки, концентрацията на хемоглобина и стойността на хематокрита). И трите сравнявани антидота DMSA, Mon и Sal възстановяват нормалните стойности на тези показатели.
4. Концентрацията на Cd в кръвта се повишава след експозицията, а антидотът салиномицин понижава концентрацията на Cd в кръвта на животните в най-голяма степен.
5. Кадмий се натрупва във всички изследвани органи, като концентрацията му намалява в реда: бъбреци > черен дроб > сърце > мускули > слезка > бял дроб > тестиси. Тетраетиламониевата сол на монензин киселина (Mon) и тетраетиламониевата сол на салиномицин киселина (Sal) понижават съдържанието на Cd, без да го преразпределят.
6. Кадмий повлиява хомеостазата на биометалните йони (Ca в слезка и тестиси, Cu в черен дроб и сърце, Fe в бъбреци, черен дроб и слезка, Zn в черен дроб). Полиетерните йонофорни антибиотици (Mon, Sal) възстановяват в по-голяма степен Cd-индуцираните изменения в хомеостазата на тези есенциални елементи отколкото DMSA.
7. Интоксикацията с Cd предизвиква понижаване на албумин и желязо, повишаване на концентрациите на кръвната захар и креатинина и повишаване на активността на AST, ALT, GGT, ALP и α -амилазата в кръвния серум. И трите изследвани хелатни агента DMSA, Mon и Sal възстановяват нивата на изследваните биомаркери в различна степен, като най-добро поведение има салиномицина.
8. Показано е, че приложението на DMSA при Cd-интоксикирани животни повишава съдържанието на Cd в мозъка спрямо нетретираната контролна група, което прави DMSA неподходящ антидот при отравяния с кадмий.

9. Доказано е, че двата полиетерни йонофора Sal и Mon (като тетраетиламониени соли) проявяват по-добър антидотен ефект спрямо Cd в сравнение с DMSA. Салиномицинът (под формата на тетраетиламониена сол на салиномицин киселина) е подходящ потенциален антидот при интоксикации с Cd.
10. Потвърдено е, че експозицията към Pb(II) (като нитрат) предизвиква увеличаване на концентрацията на Pb в кръвта на експерименталните мишки спрямо нетретираната контролна група.
11. Оловото се натрупва във всички органи, като концентрацията му намалява в реда: слезка > бял дроб > бъбреци > черен дроб > сърце > тестиси > мозък. DMSA извлича в по-голяма степен Pb от бъбреците, докато в другите органи тестваните хелатни агенти имат съизмерим ефект.
12. Експозицията към олово предизвиква понижаване на концентрацията на глюкоза и желязо, повишаване нивата на креатинина и уреята и повишаване на активността на AST, ALT, GGT, ALP и α -амилазата в кръвния серум на животните. Трите хелатни агента инхибират в еднаква степен Pb-индуцираните нарушения в биохимичните показатели.
13. Оловото повлиява хомеостазата на изследваните биометални йони: Са в слезка, бял дроб и бъбреци; Си в слезка, черен дроб, сърце и тестиси; Fe в слезка, черен дроб и сърце; Zn в бял дроб и мозък. Това потвърждава литературни данни, че повлияването на хомеостазата на биометалните йони е един от възможните механизми за възникване на токсичните ефекти на Pb. Двата полиетерни йонофорни антибиотика Sal и Mon инхибират в по-голяма степен Pb-индуцираните изменения в хомеостазата на тези четири есенциални елемента, отколкото третирането с DMSA, който е сред одобрените антидоти при отравяне с олово.

Върху дисертационния труд са публикувани три статии в специализирани, реферирани международни научни списания на авторитетните издателства Elsevier, Springer и De Gruyter, съответно Gluhcheva et al (2018), *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, doi: 10.1016/j.jtemb.2018.04.015, article in press (IF=3.225); Kamenova et al (2018), *Environmental Science and Pollution Research*, **25**, 3616 (IF=2.741); Ivanova et al (2017), *Interdisciplinary Toxicology*, **10** (3) 107–113. doi:10.1515/intox-2017-0017 (SNIP (2016)=0.901; SJR(2016)=0.378). Публикацията в *ESPR* вече е цитирана от чуждестранни автори в межд. списание.

Основните резултати са докладвани на 14 научни форуми и семинари (5 международни в чужбина, 1 международен в България, 8 национални в България). Докторант Калина Каменова е първи автор в една статия и при 9 представяния на конференции. Нейни основни съавтори са научният ръководител доц. д-р Юлияна Иванова-Тумбева и други колеги от Лабораторията и Факултета.

Въпроси, забележки и пожелания:

Някои забележки и препоръки по оформянето и редактирането на дисертационния труд бяха направени по време на предварителната защита и при предишни докладвания на докторанта.

1. Част от текста в раздел „Резултати и обсъждане”, напр. на стр. 104, 106, 116, 120, 124 има характер на литературни данни и би изглеждал по-добре в Раздел II?
2. Един от използваните сертифицирани референтни материали “Пепел от кости” (стр. 93, Табл. 216 не е адекватен като матрица, т.к. в дисертационния труд не са анализирани проби от кости? Терминологично, изследваните референтни материали на IAEA (стр. 93) са по-скоро “сертифицирани референтни материали”, а не “стандартни референтни материали”.
3. Предвижда ли се публикуване на резултатите и за оловото, т.к. и в трите статии е включен материал само върху кадмия?

Лични впечатления: Познавам Калина Каменова от 2014 г. Като редовен докторант в Катедрата тя посети лекции, семинари, упражнения към курс от маг. програма „Съвременни спектрални и хроматографски методи за анализ”. Имам добри впечатления от нейни представяния и дискусии на пет конференции, от участието ѝ в конкурса за най-добра дипломна работа на СХБ (2015), както и от предзащитата на дисертационния труд. Заслужават отбелязване нейните участия в 5 договора по темата на дисертационния труд през периода 2015–2018 към НИС при СУ „Св. Кл. Охридски“ и един договор по Оперативна програма на ЕС.

Много добро впечатление правят някои постижения и признания на маг. Калина Каменова извън рецензирания дисертационен труд: още 6 публикации, три от които в списания с ИФ; участие в още 11 проекта; още 6 участия в научни форуми, както и отличия на Алма матер за 2012 и 2016 г. и Докторант на годината (2018).

В заключение: Дисертационният труд на редовния докторант маг. Калина Каменова напълно отговаря по обем и качество на изискванията на ЗРАСРБ и на правилниците на СУ и на ФХФ. Редовната докторантура несъмнено е изиграла голяма роля за научната квалификация и професионалното израстване на докторанта, а получените научни резултати надвишават традиционните изисквания. Представените материали извън рамките на дисертационния труд (публикации, научни доклади, участия в договори и получени награди) допълват общото, напълно положително впечатление за докторанта. Ще гласувам с „ДА” и убедено препоръчвам на научното жури да присъди на маг. Калина Венелинова Каменова образователната и научна степен „доктор” в професионално направление 4.2. „Химически науки” (Аналитична химия).

София, 13.09.2018 г.

РЕЦЕНЗЕНТ:

чл.-кор. проф. дхн Димитър Л. Цалев