



СОФИЙСКИ УНИВЕРСИТЕТ „СВ. КЛИМЕНТ ОХРИДСКИ“

ФАКУЛТЕТ ПО ХИМИЯ И ФАРМАЦИЯ

КАТЕДРА АНАЛИТИЧНА ХИМИЯ

---

**Калина Венелинова Каменова**

**Изследване на потенциалното приложение  
на нови хелатни агенти като антидоти  
при интоксикации с метални йони**

*АВТОРЕФЕРАТ*

*на дисертационен труд за придобиване  
на образователната и научна степен  
„доктор“*

Професионално направление: 4.2 – Химически науки  
(Аналитична химия)

**Научен ръководител:**  
**доц. д-р Юлияна Милкова Иванова-Тумбева**

София,  
2018



СОФИЙСКИ УНИВЕРСИТЕТ „СВ. КЛИМЕНТ ОХРИДСКИ“

ФАКУЛТЕТ ПО ХИМИЯ И ФАРМАЦИЯ

КАТЕДРА АНАЛИТИЧНА ХИМИЯ

---

**Калина Венелинова Каменова**

**Изследване на потенциалното приложение  
на нови хелатни агенти като антидоти  
при интоксикации с метални йони**

*Дисертационен труд за придобиване  
на образователната и научна степен  
„доктор“*

Професионално направление: 4.2 – Химически науки (Аналитична химия)

**Научен ръководител: доц. д-р Юлияна Милкова Иванова-Тумбева**

**Рецензенти:**

**Научно жури:**

проф. д-р Стефан Леонидов Цаковски  
доц. д-р Юлияна Милкова Иванова-Тумбева  
чл. кор. проф. дхн Димитър Любомиров Цалев  
проф. д-р Славина Кирилова Сурчева, дм  
доц. д-р Албена Кирилова Дечева-Чакърва

**София,  
2018**

Дисертацията съдържа 166 страници, в които са включени 19 фигури, 25 таблици, 19 схеми и 381 цитирани литературни източника.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита от Катедрения съвет на Катедра Аналитична химия към Факултета по химия и фармация на Софийски университет „Св. Климент Охридски“, състоял се на 25.06.2018 г.

Дисертантът е бил редовен докторант към Катедра Аналитична химия, ФХФ-СУ.

Защитата на дисертационния труд ще се състои на \_\_\_\_\_.\_\_\_\_.2018 г. от \_\_\_\_:\_\_\_\_ часа в Заседателната зала (1 етаж, стая 108) на Факултета по химия и фармация на Софийски университет „Св, Климент Охридски“.

Материалите по защитата са на разположение в Деканата на ФХФ, СУ, бул. Джеймс Баучър“ №1, стая 107, и са публикувани на интернет страницата на ФХФ, СУ.

*Забележка:* В автореферата номерата на таблиците и фигурите съответстват на номерата в дисертационния труд.

## Съдържание

I.	Увод .....	4
II.	Цел на дисертационния труд .....	6
III.	Резултати .....	8
III.1.	Резултати от хематологични, биохимични и атомноабсорбционни анализи .....	8
III.1.1.	Резултати от хематологични анализи .....	8
III.1.2.	Резултати от биохимични изследвания .....	9
III.1.2.1.	Влияние на Cd и хелатните агенти върху чернодробните функционални маркери .....	10
III.1.2.2.	Влияние на Cd и хелатните агенти върху бъбречните функционални маркери .....	11
III.1.2.3.	Други функционални маркери. ....	11
III.1.3.	Резултати от атомноабсорбционен анализ .....	14
III.1.3.1.	Резултати от атомноабсорбционен анализ на кръв .....	15
III.1.3.2.	Резултати от атомноабсорбционен анализ на органи на животни, подложени на подостро отравяне с Cd(II) ацетат. ....	16
III.2.	Резултати от хематологични, биохимични и атомноабсорбционни анализи .....	26
III.2.1.	Резултати от хематологични анализи .....	26
III.2.2.	Резултати от биохимични анализи .....	27
III.2.2.1.	Влияние на олово и хелатните агенти върху чернодробните функционални маркери .....	27
III.2.2.2.	Влияние на Pb и хелатните агенти върху бъбречни функционални маркери .....	29
III.2.2.3.	Други функционални маркери. ....	29
III.2.3.1	Резултати от атомноабсорбционен анализ на кръв .....	30
III.2.3.2	Резултати от атомноабсорбционен анализ на органи .....	31
IV.	Изводи .....	40
V.	Приноси .....	42
	Публикации, свързани с дисертационния труд .....	43
	Участия в национални и международни форуми, свързани с дисертационния труд .....	43
	Участия в проекти, свързани с дисертационния труд .....	45

## I. Увод

Металите и техните съединения отдавна са признати като основни токсични агенти, причиняващи остри, подостри и хронични отравяния. През последните години беше доказано, че експозицията на ниски дози на токсични метали може да има важен принос към етиологията и патогенезата на различни болести. Това показва колко е важно да се предприемат действия за намаляване на заболяванията, причинени от интоксикации с метални йони.

Информацията за токсичните ефекти на металите е получена при изследване на работници в промишлеността, както и при масови отравяния чрез консумация на замърсена храна и вода. Все по-разпространени са неблагоприятните ефекти, вследствие на метална експозиция върху отделни групи от населението.

Кадмият е един от най-широко използваните метали. Токсичният метал намира приложение в производството на Cd-Ni батерии, оцветители и фосфатни торове. Полупроводниковите кадмиеви съединения (CdS, CdSe, CdTe) и нанокристалите са подходящи материали за биологични сонди заради уникалните им фотофизични характеристики. В резултат на това източниците на експозицията на кадмий се увеличават, а високото ниво на замърсяване с  $Cd^{2+}$  на почвата и агрокултурите са причина за безпокойство. Експозицията на кадмий може да стане чрез консумацията на замърсена храна и вода или вдишване на цигарен дим. Кадмият се акумулира в бъбреците, черния дроб, стомашно-чревния тракт, мозъка и костите, което е предпоставка за възникване и развитие на сериозни здравословни проблеми, както и на някои видове рак. Освен това, този метален йон се счита за основен фактор за развитие на невродегенеративни заболявания – болест на Паркинсон, болест на Алцхаймер и амиотрофична латерална склероза. ATSDR и Агенцията по опазване на околната среда на САЩ класифицират кадмия като седмия най-токсичен метал в света.

Оловото може би е най-добре изученият токсичен агент. Вследствие на многобройните приложения на този метал (в автомобилната индустрия, бои, керамика, пластмаси и др.) се повишава концентрацията му в биологичните системи. Някои от източниците на експозиция на хора са индустриалните процеси (топене на олово и горене на въглища), оловни бои, оловни тръби и/или оловни спойки за нуждите на водоснабдяването и др. Токсичността на оловото причинява необратими последици за

здравето – засягат се централната нервна система, хемopoетичната система, черният дроб и бъбреците. Остро отравяне с оловни съединения се наблюдава в професионална среда. Хроничната токсичност, причинена от експозиция на олово е по-често срещана и ако не бъде лекувана се достига до постоянно повръщане, енцефалопатия, летаргия, делириум, конвулсии и кома.

При отравяне с метали и техни съединения се прилага терапия с хелатни агенти. Целта на терапията е да се извлече токсичният метален йон от клетъчните и извънклетъчните пространства, като се предизвика екскрецията му чрез урината или фецеса.

В момента липсват ефективни терапевтични протоколи за лечение на отравяне с кадмий. В клиничната практика се прилага лечение с  $\text{CaNa}_2\text{EDTA}$ , но без особена ефективност. Недостатък на терапията с  $\text{CaNa}_2\text{EDTA}$  е, че лечението трябва да започне незабавно след експозицията. Хелатният агент се прилага парентерално, което нарушава качеството на живот на пациентите, и ако терапията се забави се наблюдава задържане на токсичния метал в тъканите.  $\text{CaNa}_2\text{EDTA}$  не може да извлече  $\text{Cd(II)}$  от вътреклетъчното пространство и е силно нефротоксичен.

В клиничната практика за лечение на отравяне с олово се използва *мезо*-2,3-димеркаптосукцинилова киселина. Този хелатен агент е одобрен от Агенцията за контрол на храните и лекарствата (FDA) към Министерството на здравеопазването и социалната политика на САЩ. Терапията с DMSA при лечение на отравяне с олово е ефективна, но трябва да се започне непосредствено след експозицията на токсичния метален йон. Невъзможността да извлече токсичния метал от вътреклетъчните пространства, нарушаването на хомеостазата на  $\text{Cu(II)}$  и продължителното приложение се считат за основни недостатъци на терапията с този хелатен агент.

## II. Цел на дисертационния труд

След направения литературен обзор се очертаха няколко основни проблема при провеждането на *in vivo* изследвания, посветени на приложението на хелатни агенти като антидоти при отравяния с метали и техни съединения. Основен недостатък на голяма част от научните изследвания в областта е несъответствието на експозицията при експерименталните модели и експозицията при хора. Изследваните хелатни агенти се прилагат във форма, която би нарушила качеството на живот на пациентите. Друг голям проблем, който се очерта от прегледа на литературата е, че изследванията не са мащабни, засягат определен орган и/или система, а не се разглеждат основни органи и системи и целия организъм едновременно. Липсва ясна връзка между хематологични, биохимични, хистологични изменения, съдържание на токсичния метален йон в органите. Липсва и информация за влиянието на тестваните хелатни агенти върху хомеостазата на биометалните йони.

На базата на направения литературен обзор беше формулирана и целта на настоящата работа: **да се направи мащабно сравнително изследване на потенциалното приложение на монензин, салиномицин и DMSA като антидоти при интоксикация с метални йони.**

**За реализирането на целта на дисертационния труд беше необходимо да се решат следните задачи:**

- 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) влиянието 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) определяне на влиянието 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 кадмий/олово, калций, мед, желязо и цинк в органи на животни:**

- а) подложени на подостро отравяне с Cd(II);
- б) подложени на подостро отравяне с Pb(II).

**6. Статистическа обработка на получените резултати.**



### III. Резултати

#### III.1. Резултати от хематологични, биохимични и атомноабсорбционни анализи.

##### III.1.1. Резултати от хематологични анализи

Нашите резултати от хематологичните анализи са представени в таблица 18. Подострото отравяне с Cd(II) ацетат в среднодневна доза от 20 mg/kg т.т., предизвиква статистически значимо понижаване на броя на червените кръвни клетки (RBC), концентрацията на хемоглобина (Hb) и стойността на хематокрита (HCT) в сравнение с нетретирания контролна група. Тези резултати потвърждават литературните данни, че при отравяне с кадмий се развива анемия. Третирането с DMSA, тетраетиламониева сол на монензин или тетраетиламониевата сол на салиномицин киселина на Cd-интоксикирани животни възстановява броя на червените кръвни клетки, концентрацията на хемоглобина и стойността на хематокрита до нормални контролни стойности. Тези резултати показват, че DMSA, тетраетиламониевата сол на монензин киселина и тетраетиламониевата сол на салиномицин киселина благоприятно повлияват Cd-индуцираната анемия. Не се наблюдава значително повлияване на останалите хематологични показатели на експерименталните животни от всички групи.

**Таблица 18. Влияние на DMSA, монензин и салиномицин върху хематологични показатели на експериментални животни, подложени на подостро отравяне с Cd(II).**

Показател	Ctrl	Cd	Cd+DMSA	Cd+Mon	Cd+Sal
WBC, $\times 10^9/L$	3,2 $\pm$ 0,9	2,8 $\pm$ 1,6	5,4 $\pm$ 2,0	3,1 $\pm$ 1,3	3,6 $\pm$ 1,5
Ly, $\times 10^9/L$	1,3 $\pm$ 0,9	2,4 $\pm$ 1,3	2,6 $\pm$ 1,8	2,5 $\pm$ 1,6	2,3 $\pm$ 0,9
Mon, $\times 10^9/L$	0,18 $\pm$ 0,09	0,34 $\pm$ 0,25	0,36 $\pm$ 0,12	0,31 $\pm$ 0,24	0,4 $\pm$ 0,2
Gran, $\times 10^9/L$	2,1 $\pm$ 1,3	2,3 $\pm$ 0,9	2,1 $\pm$ 0,7	1,6 $\pm$ 0,6	2,4 $\pm$ 1,6
Ly, %	46 $\pm$ 24	58 $\pm$ 9	54 $\pm$ 21	50 $\pm$ 14	53 $\pm$ 12
Mon, %	5,3 $\pm$ 1,7	6,8 $\pm$ 2,0	6,4 $\pm$ 1,6	7,3 $\pm$ 2,2	6,2 $\pm$ 1,3
Gran, %	49 $\pm$ 24	89 $\pm$ 4	45 $\pm$ 20	41,6 $\pm$ 13,4	39,2 $\pm$ 10,2
RBC, $\times 10^{12}/L$	8,2 $\pm$ 0,7	6,9 $\pm$ 1,5 <sup>a</sup>	8,4 $\pm$ 1,3 <sup>b</sup>	9,3 $\pm$ 1,3 <sup>b</sup>	8,4 $\pm$ 0,9 <sup>b</sup>
HGB, g/L	111 $\pm$ 10	90 $\pm$ 9 <sup>a</sup>	104 $\pm$ 10 <sup>b</sup>	115 $\pm$ 17 <sup>b</sup>	106 $\pm$ 12 <sup>b</sup>
HCT, L/L	0,37 $\pm$ 0,04	0,28 $\pm$ 0,08 <sup>a</sup>	0,38 $\pm$ 0,08 <sup>b</sup>	0,38 $\pm$ 0,09 <sup>b</sup>	0,38 $\pm$ 0,06 <sup>b</sup>

<b>MCV, fL</b>	46 ± 4	45 ± 4	45 ± 4	42 ± 7	46 ± 4
<b>MCH, pg</b>	12,7 ± 1,0	13,7 ± 1,0	12,4 ± 0,7	12,9 ± 0,8	12,6 ± 3,7
<b>MCHC, g/L</b>	280 ± 24	310 ± 40	275 ± 15	315 ± 54	279 ± 23
<b>RDW, %</b>	19,1 ± 3,4	20,1 ± 2,9	21,7 ± 3,5	20,1 ± 4,9	20,1 ± 5,2
<b>PLT, x10<sup>9</sup>/L</b>	789 ± 275	534 ± 130	525 ± 108	478 ± 144	515 ± 170
<b>MPV, fL</b>	4,4 ± 0,3	4,6 ± 0,5	4,5 ± 0,2	4,4 ± 0,5	4,6 ± 0,4
<b>PDW, %</b>	15,8 ± 0,3	16,0 ± 0,4	15,8 ± 0,3	16,0 ± 0,5	16,0 ± 0,4
<b>PCT, ml/L</b>	0,35 ± 0,13	0,24 ± 0,09	0,28 ± 0,09	0,21 ± 0,07	0,27 ± 0,05

Легенда: Ctrl – контролна (нетретирана) група. Cd – токсична контролна (кадмиева) група. Cd+DMSA животни, интоксикирани с Cd(II) ацетат и третирани с DMSA. Cd+Моп – животни, интоксикирани с Cd(II) ацетат и третирани с монензин. Cd+Sal – животни, интоксикирани с Cd(II) ацетат и третирани със салиномицин.

<sup>a</sup> – показва статистически значима разлика между средните стойности на нетретираната контролна група и токсичната контролна група.

<sup>b</sup> – показва статистически значима разлика между средните стойности на токсичната контролна група и третираната с DMSA, с монензин, или със салиномицин.

### III.1.2. Резултати от биохимични изследвания

В таблица 19 са представени измерените и референтните стойности на Human Control Serum (Giese Diagnostics) на изследваните от нас показатели.

**Таблица 19. Измерени и референтни стойности на Human Control Serum.**

Показател	Измерена стойност	Normal Human Control Serum
Общ белтък, g/L	68,7±3,7	64,8 [54,0-72,6]
Албумин, g/L	49,7±1,0	46,8 [38,4-55,2]
Глюкоза, mmol/L	5,08±0,6	5,47 [4,60-6,35]
Креатинин, μmol/L	148±8,0	130 [101,4-159]
Урея, mmol/L	7,8±0,9	6,48 [5,05-7,90]
Общ билирубин, μmol/L	15,3±1,1	16,4 [13,4-19,4]
Директен билирубин, μmol/L	12,1±0,5	11,2 [8,47-13,8]
AST, U/L	50,3±4,5	44,3 [36,2-52,4]
ALT, U/L	51,7±0,6	49,5 [40,5-58,5]
GGT, UL	48,3 ± 2,5	44,6 [36,6 – 52,6]
ALP, U/L	154,0±8,5	184 [151-217]
α-амилаза, U/L	74,3±4,6	81,6 [66,9-96,3]

Желязо, $\mu\text{mol/L}$	13,9 $\pm$ 0,2	19,7 [15,9-23,4]
---------------------------	----------------	------------------

От резултатите, представени в таблица 19 се вижда, че има добро съответствие между измерените от нас стойности и посочените от производителя. По-ниската измерена стойност на серумно желязо се дължи на неговата нестабилност в контролния серум.

### *III.1.2.1. Влияние на Cd и хелатните агенти върху чернодробните функционални маркери.*

Резултатите от направените от нас биохимични анализи на кръвен серум от експерименталните животни са представени в таблица 20. Маркери за чернодробно увреждане след експозиция на кадмий са ензимите AST, ALT, ALP, GGT. Експозицията на животните на Cd(II) ацетат значително повишава серумната активност на ензимите AST, ALT, GGT и ALP в сравнение с нетретираната контролна група (табл. 20). Повишената активност на изследваните от нас ензими, потвърждава литературните данни, че експозицията на Cd предизвиква хепатотоксичност. Ние не наблюдаваме статистически значима разлика в концентрацията на общия и директния билирубин между петте експериментални групи. От резултатите, представени в таблица 20, се вижда, че животните, третирани с Cd(II) имат по-високо съотношение общ/директен билирубин спрямо нетретираната контролна група. Направените от нас изследвания показват, че подострото отравяне с кадмий значително понижава концентрацията на албумина в кръвния серум спрямо нетретираната контролна група. Резултатите демонстрират, че DMSA, тетраетиламониевата сол на монензин киселина и тетраетиламониевата сол на салиномицин киселина понижава до контролни стойности ензимната активност на AST, ALT, GGT и ALP (табл. 20). DMSA и тетраетиламониевата сол на салиномицин киселина възстановяват съотношението общ/директен билирубин до контролни стойности. Тетраетиламониевата сол на монензин киселина не понижава съотношението общ/директен билирубин спрямо токсичната контролна група. Тетраетиламониевата сол на салиномицин киселина възстановява серумната концентрация на албумина до стойности, характерни за контролната група. DMSA и тетраетиламониевата сол на монензин киселина леко повишават концентрацията на албумина в кръвния серум на животните, но стойността остава по-ниска спрямо нетретираната контролна група. Изследваните хелатни агенти инхибират в различна

степен Cd-индуцираната хепатотоксичност. **Тетраетиламониевата сол на салиномицин киселина показва най-добър ефект върху чернодробните функционални маркери на интоксикирани с Cd животни.**

*III.1.2.2. Влияние на Cd и хелатните агенти върху бъбречните функционални маркери.*

Бъбреците са най-чувствителни при експозиция на Cd. При изследвания с експериментални животни, най-често се съобщава за бъбречна дисфункция. Бъбречните маркери, които показват увреждане са креатинина и уреята. Направените от нас биохимични изследвания демонстрират, че подострото отравяне с Cd(II) ацетат значително повишава серумната концентрация на креатинина в сравнение с контролната група (табл. 20). DMSA, тетраетиламониевата сол на монензин киселина и тетраетиламониевата сол на салиномицин киселина понижават до контролни стойности серумната концентрация на креатинина. Установихме, че животните, третирани с тетраетиламониевата сол на монензин киселина и тетраетиламониевата сол на салиномицин киселина имат по-висока концентрация на урея в кръвния серум. Това най-вероятно се дължи на метаболизма на двете соли в организма.

*III.1.2.3. Други функционални маркери.*

В таблица 20 са представени резултатите за влиянието на Cd и хелатните агенти върху серумната концентрация на Fe и общия желязо свързващ капацитет (ЖСК). Ние забелязваме значително понижаване на серумното желязо и слабо повишаване на ЖСК в серума на Cd-интоксикирани животни. Тези резултати потвърждават литературните данни, че Cd инхибира абсорбцията на Fe от стомашно-чревния тракт и предизвиква Fe-дефицитна анемия. Резултатите от направените от нас биохимични изследвания показват, че DMSA и тетраетиламониева сол на монензин киселина възстановяват концентрацията на серумното желязо до контролни стойности. Тетраетиламониевата сол на салиномицин киселина значително повишава серумната концентрация на желязото спрямо токсичната контролна група, но тя остава по-ниска спрямо нетретирани животни (табл. 20). В същото време, установихме, че трите хелатни агента слабо понижават ЖСК спрямо кадмиевата група. Трите хелатни агента благоприятно

повлияват Cd-индуцираните изменения в хомеостазата на Fe в серума на експерименталните животни (табл. 20).

Резултатите, от направените от нас биохимичните анализи, показват, че оралната експозиция на Cd(II) ацетат значително повишава серумната концентрация на глюкозата. Високата концентрация на глюкоза в серума на Cd-интоксикирани животни най-вероятно се дължи на нарушена функция на панкреаса, черния дроб, бялата мастна тъкан и надбъбречните жлези. DMSA, тетраетиламониевата сол на монезин киселина или тетраетиламониевата сол на салиномицин киселина инхибират Cd-индуцираната хипергликемия. Ензимната активност на алфа-амилазата също е показател, който дава информация за функцията на панкреаса. Нашите резултати показват, че няма статистически значима разлика в серумната активност на алфа-амилазата при животните от петте експериментални групи.

**Таблица 20. Влияние на Cd, DMSA, монензин и салиномицин върху някои биохимични показатели на мишки, подложени на подостро отравяне с Cd.**

Група	Общ белтък [g/L]	Албумин [g/L]	Глюкоза [mmol/L]	Креатинин [ $\mu\text{mol/L}$ ]	Урея [mmol/L]	Общ билирубин [ $\mu\text{mol/L}$ ]	Директен билирубин [ $\mu\text{mol/L}$ ]	Общ/ директен билирубин	AST [U/L]	ALT [U/L]	GGT [U/L]	ALP [U/L]	$\alpha$ -Амилаза [U/L]	Fe [ $\mu\text{mol/L}$ ]	ЖСК [ $\mu\text{mol/L}$ ]
<b>Ctrl</b>	48,5 $\pm$ 4,6	27,0 $\pm$ 1,1	10,9 $\pm$ 1,5	18,6 $\pm$ 1,3	7,7 $\pm$ 2,3	7,9 $\pm$ 1,3	5,2 $\pm$ 0,9	1,52	102 $\pm$ 12	82,0 $\pm$ 12,3	3,0 $\pm$ 0,0	83,9 $\pm$ 14,3	2994 $\pm$ 341	69,4 $\pm$ 6,7	63 $\pm$ 6
<b>Cd</b>	51,6 $\pm$ 5,0	21,9 $\pm$ 0,9 <sup>a</sup>	13,6 $\pm$ 2,0 <sup>a</sup>	22,1 $\pm$ 3,8 <sup>a</sup>	8,7 $\pm$ 2,8	9,2 $\pm$ 3,2	3,9 $\pm$ 1,6	2,36	160 $\pm$ 20 <sup>a</sup>	139,8 $\pm$ 73,5 <sup>a</sup>	4,4 $\pm$ 1,4 <sup>a</sup>	130,0 $\pm$ 47,1 <sup>a</sup>	3247 $\pm$ 121	40,7 $\pm$ 6,5 <sup>a</sup>	80 $\pm$ 12
<b>Cd+DMSA</b>	49,7 $\pm$ 3,0	24,6 $\pm$ 1,4 <sup>b,б</sup>	9,2 $\pm$ 1,7 <sup>б</sup>	17,9 $\pm$ 1,8 <sup>б</sup>	7,5 $\pm$ 1,9	5,0 $\pm$ 0,8	3,1 $\pm$ 0,6	1,61	95 $\pm$ 15 <sup>б</sup>	68,5 $\pm$ 11,6 <sup>б</sup>	3,0 $\pm$ 0,0 <sup>б</sup>	87,0 $\pm$ 20,1 <sup>б</sup>	2828 $\pm$ 328	60,5 $\pm$ 3,1 <sup>б</sup>	71 $\pm$ 3
<b>Cd+Mon</b>	49,2 $\pm$ 1,7	23,5 $\pm$ 1,1 <sup>b,б</sup>	9,8 $\pm$ 1,8 <sup>б</sup>	18,3 $\pm$ 1,1 <sup>б</sup>	9,7 $\pm$ 1,9	5,8 $\pm$ 0,7	2,8 $\pm$ 0,3	2,07	100 $\pm$ 10 <sup>б</sup>	60,3 $\pm$ 10,3 <sup>б</sup>	3,0 $\pm$ 0,0 <sup>б</sup>	90 $\pm$ 13,0 <sup>б</sup>	2835 $\pm$ 148	62,2 $\pm$ 11,3 <sup>б</sup>	66 $\pm$ 8
<b>Cd+Sal</b>	51,3 $\pm$ 3,0	26,3 $\pm$ 1,3 <sup>б</sup>	9,7 $\pm$ 1,9 <sup>б</sup>	17,38 $\pm$ 2,1 <sup>б</sup>	9,8 $\pm$ 0,8	6,0 $\pm$ 0,9	3,8 $\pm$ 0,5	1,58	90 $\pm$ 9,2 <sup>б</sup>	73,9 $\pm$ 16,0 <sup>б</sup>	3,0 $\pm$ 0,0 <sup>б</sup>	87,1 $\pm$ 15,3 <sup>б</sup>	3307 $\pm$ 321	55,8 $\pm$ 4,8 <sup>б,в</sup>	66 $\pm$ 5

Легенда: Ctrl – контролна (нетретирана) група. Cd – токсична контролна (кадмиева) група. Cd+DMSA животни, интоксикирани с Cd(II) ацетат и третирани с DMSA. Cd+Mon – животни, интоксикирани с Cd(II) ацетат и третирани с монензин. Cd+Sal – животни, интоксикирани с Cd(II) ацетат и третирани със салиномицин.

<sup>a</sup>- статистически значима разлика между Cd-третираните животни и нетретираната контролна група ( $p < 0,05$ )

<sup>б</sup>- статистически значима разлика между групата, третирана с DMSA и Cd-третираната контролна група, или между групата третирана с монензин и Cd-третираната контролна група, или между групата, третирана с салиномицин и Cd-третираната контролна група ( $p < 0,05$ )

<sup>в</sup>- статистически значима разлика между групата, третирана с DMSA и нетоксичната контролна група ( $p < 0,05$ ).

### III.1.3. Резултати от атомноабсорбционен анализ

В таблица 21, таблица 21а и таблица 21б са представени измерените и сертифицираните стойности за съдържанието на Cd, Cu, Zn, Fe, Ca и Pb. Както се вижда от таблиците, има добро съответствие между измерените от нас стойности и сертифицираните за съдържанието на съответните метали. Границите на откриване за Ca, Cu, Fe, Zn и Cd (в бъбреци и черен дроб) са определени чрез пламъкова атомноабсорбционна спектрометрия и са: 0,2 mg/L за Cu, 0,1 mg/L за Zn, 0,5 mg/L за Ca и Fe и 0,1 mg/L за Cd. Границата на откриване за Cd (в слезка, бял дроб, сърце, мозък и тестиси) и Pb (във всички органи) са определени с електротермична атомна абсорбция и са съответно: 0,01 ng/mL и 1,0 ng/mL. Границата за откриване на Cd в кръв е 1 ng/mL, а за Pb е 30 ng/mL.

**Таблица 21. Съдържание на Cd, Cu и Zn в сравнителен материал-Н-4-мускул.**

SRM-Н-4	Измерена стойност	Сертифицирана стойност
<b>Cd</b>	43 µg/kg ± 35	44 µg/kg ± 39
<b>Cu</b>	4 mg/kg ± 2	4 mg/kg ± 1
<b>Zn</b>	86 mg/kg ± 9	86 mg/kg ± 11

**Таблица 21а. Съдържание на Cd, Cu, Zn, Fe и Ca в сравнителен материал-Н-8-бъбреци.**

SRM-Н-8	Измерена стойност	Сертифицирана стойност
<b>Cd</b>	190 mg/kg ± 15	189 mg/kg ± 23
<b>Cu</b>	29 mg/kg ± 2,4	32 mg/kg ± 2,7
<b>Zn</b>	179 mg/kg ± 20	192 mg/kg ± 13
<b>Fe</b>	318 mg/kg ± 63	265 mg/kg ± 15
<b>Ca</b>	918 mg/kg ± 80,0	924 mg/kg ± 76,7

**Таблица 21б. Съдържание на Pb в сертифициран сравнителен материал-1400-пепел от кости.**

SRM-1400	Измерена стойност	Сертифицирана стойност
<b>Pb</b>	0,326 ppm ± 0,05	0,335 ppm ± 0,05

### III.1.3.1. Резултати от атомноабсорбционен анализ на кръв

В таблица 22 са представени резултатите за съдържанието на кадмий в кръвта на животните от петте експериментални групи. Нашите резултати показват, че при подостро отравяне на експериментални животни с Cd се повишава съдържанието на токсичния метал в кръвта спрямо нетретираната контролна група.

**Таблица 22. Влияние на DMSA, монензин и салиномицин върху концентрацията на кадмий в кръв на полово зрели мъжки мишки, подложени на подостро отравяне с Cd(II) ацетат.**

	Cd, ng/mL
Ctrl	< 1 ng/mL
Cd	12,38 ± 3,04
Cd+DMSA	4,63 ± 1,49 <sup>б</sup>
Cd+Mon	2,95 ± 0,55 <sup>б</sup>
Cd+Sal	2,13 ± 0,63 <sup>б</sup>

Легенда: Ctrl – контролна (нетретирана) група. Cd – токсична контролна (кадмиева) група. Cd+DMSA животни, интоксикирани с Cd(II) ацетат и третирани с DMSA. Cd+Mon – животни, интоксикирани с Cd(II) ацетат и третирани с монензин. Cd+Sal – животни, интоксикирани с Cd(II) ацетат и третирани със салиномицин.

<sup>б</sup> – показва статистически значима разлика между средните стойности за съдържанието на Cd(II) в кръв на животните от токсичната контролна група и третираната с DMSA, с монензин, или със салиномицин ( $p < 0,05$ ).

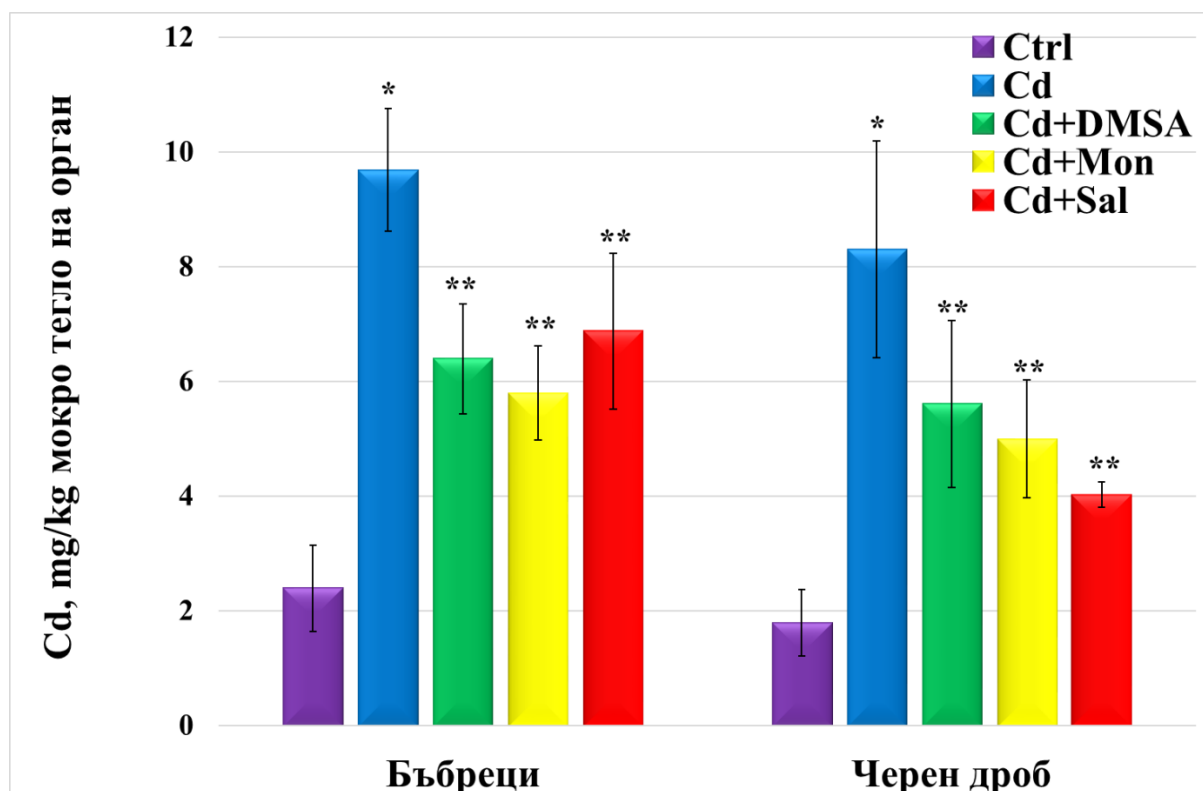
Представените в таблица 22 резултати показват, че при орална експозиция на Cd(II) ацетат в среднодневна доза 20 mg/kg т.т. в продължение на 14 дни, концентрацията на Cd в кръвта нараства значително. Както се вижда от таблицата, в кръвта на нетретираните контролни животни не се открива Cd(II). DMSA понижава 3 пъти концентрацията на Cd(II) в кръвта в сравнение с токсичната контролна група. Приложението на тетраетиламониевата сол на монензин или салиномицин киселина след подостро отравяне с Cd(II) редуцира концентрацията на токсичния метален йон съответно 4 и 6 пъти.

**В обобщение на нашите резултати може да заключим, че тетраетиламониевата сол на монензин киселина и тетраетиламониевата сол на салиномицин киселина са по-ефективни хелатни агенти при извличане на кадмий.**



*III.1.3.2. Резултати от атомноабсорбиционен анализ на органи на животни, подложени на подостро отравяне с Cd(II) ацетат.*

Нашите резултати показват, че кадмият се разпределя по следния начин: най-високо е съдържанието му в бъбреците и черния дроб, след това в сърцето, мускулите, слезката, белия дроб, тестисите и мозъка (фиг. 7 и 8). Приложението на DMSA като хелатен агент понижава съдържанието на кадмий с 34% в бъбреците и с 32% в черния дроб в сравнение с токсичната контролна група. Третирането на Cd-интоксикирани животни с тетраетиламониевата сол на монензин киселина понижава съдържанието на кадмий в бъбреците и черния дроб с 40% в сравнение с токсичната група. Ефектът на тетраетиламониевата сол на салиномицин киселина е по-добре изразен в черния дроб. Данните на фигура 7 показват, че хелатният агент понижава с 52% съдържанието на кадмий в този орган спрямо токсичната контролна група. Наблюдаваният ефект в бъбреците е 29% спрямо кадмиевата група. Трите хелатни агента извличат в еднаква степен токсичния метален йон от бъбреците, докато в черния дроб най-добър ефект проявява тетраетиламониевата сол на салиномицин киселина.



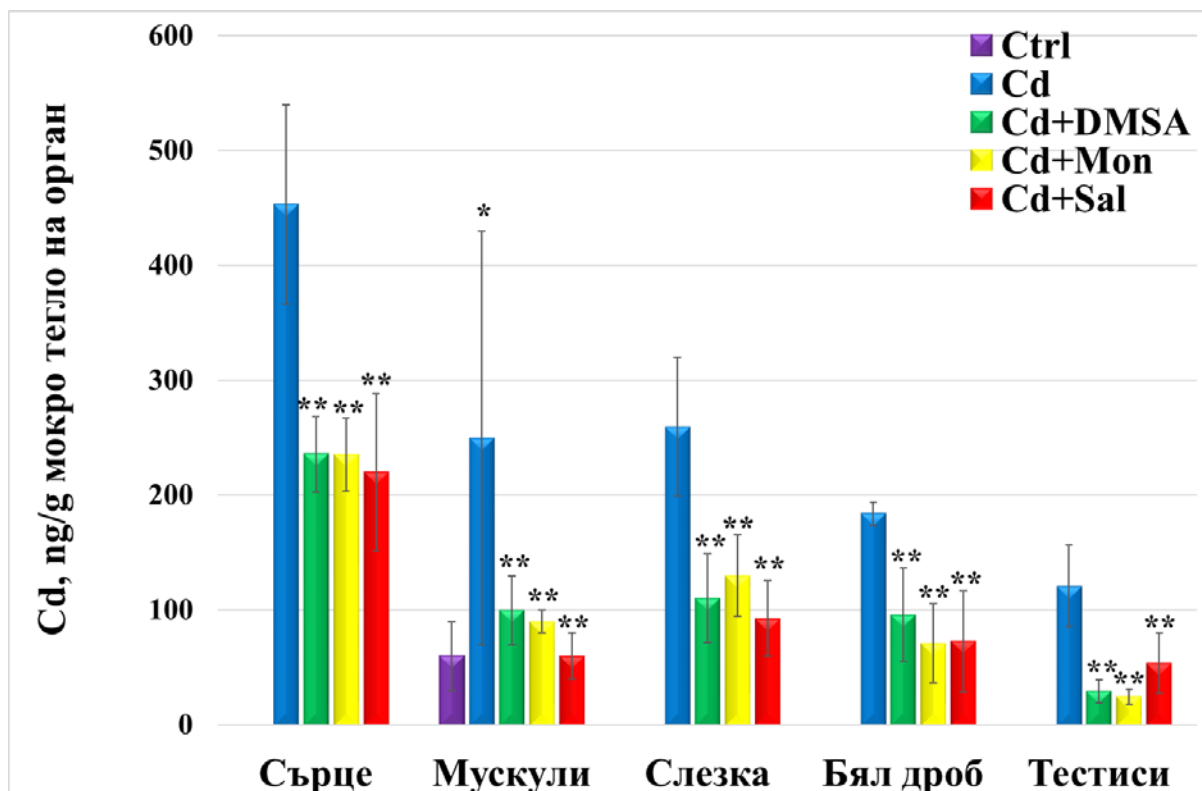
**Фиг. 7. Влияние на DMSA, монензин и салиномицин върху съдържанието на кадмий в бъбреци и черен дроб на половозрепи мъжки мишки, подложени на подостро отравяне с Cd(II) ацетат.**

Легенда: Ctrl – нетретирана контролна група. Cd – токсична контролна група. Cd+DMSA – Cd-интоксикирани експериментални животни, третирани с DMSA. Cd+Mon – Cd-интоксикирани експериментални животни, третирани с монензин. Cd+Sal – Cd-интоксикирани експериментални животни, третирани със салиномицин.

\* - показва статистически значима разлика между средните стойности за съдържанието на кадмий в бъбреците и черния дроб на кадмий-интоксикираните животни спрямо нетретираните контролни животни ( $p < 0,05$ ).

\*\* - показва статистически значима разлика между средните стойности за съдържанието на кадмий в бъбреците и черния дроб на кадмий-интоксикираните животни спрямо животните, третирани с DMSA, с монензин, или със салиномицин ( $p < 0,05$ ).

На фигура 8 са представени резултатите от атомноабсорбционния анализ на сърце, слезка, бял дроб, тестиси и мозък от експериментални животни за определяне на съдържанието на кадмий. Както се вижда от фиг. 8, след бъбреците и черния дроб, токсичният метален йон се натрупва в най-голяма степен в сърцето, а най-малко в тестисите. Третирането на Cd-интоксикираните животни с DMSA понижава съдържанието на токсичния метален йон в сърцето и белия дроб с 48%, в слезката – с 58%, в мускулите – с 60% и в тестисите – със 75%. От резултатите, представени на фиг. 8 се вижда, че тетраетиламониевата сол на монензин киселина понижава съдържанието на кадмий в сърцето с 46%, в мускулите – с 64%, в слезката – с 50%, в белия дроб – със 61%, в тестисите – с 80%. В сравнение с тетраетиламониевата сол на монензин киселина, тетраетиламониевата сол на салиномицин киселина понижава концентрацията на токсичния метален йон с 51% в сърцето, с 76% в мускулите, със 64% в слезката, с 60% в белия дроб, и с 55% в тестисите. Резултатите, позволяват да се направи заключението, че **трите хелатни агента проявяват съизмерим ефект при извличане на токсичния метален йон от представените на фиг. 8 органи, като ефекта варира е от 50% за сърцето до 90% за тестисите.**

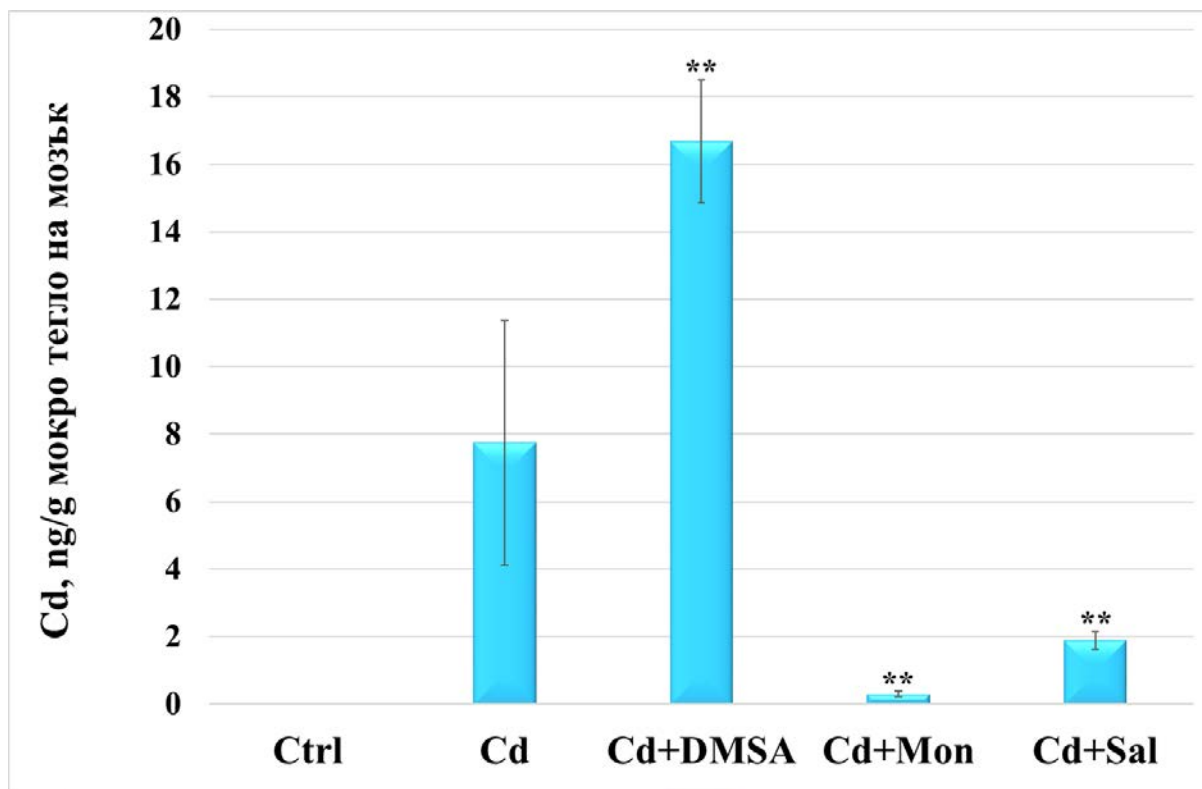


**Фиг. 8.** Влияние на DMSA, монензин и салиномицин върху съдържанието на кадмий в сърце, мускули, слезка, бял дроб и тестиси на половозрепи мъжки мишки, подложени на подостро отравяне с Cd(II) ацетат.

Легенда: Ctrl – нетретирана контролна група. Cd – токсична контролна група. Cd+DMSA – Cd-интоксикирани експериментални животни, третирани с DMSA. Cd+Mon – Cd-интоксикирани експериментални животни, третирани с монензин. Cd+Sal – Cd-интоксикирани експериментални животни, третирани със салиномицин.

\* - показва статистически значима разлика между средните стойности за съдържанието на кадмий в органите на кадмий-третираните животни спрямо нетретираните контролни животни ( $p < 0,05$ ).

\*\* - показва статистически значима разлика между средните стойности за съдържанието на кадмий в органите на кадмий-третираните животни спрямо животните, третирани с DMSA, с монензин, или със салиномицин ( $p < 0,05$ ).



**Фиг. 9.** Влияние на DMSA, монензин и салиномицин върху съдържанието на кадмий в мозък на половозрели мъжки мишки, подложени на подостро отравяне с Cd(II) ацетат.

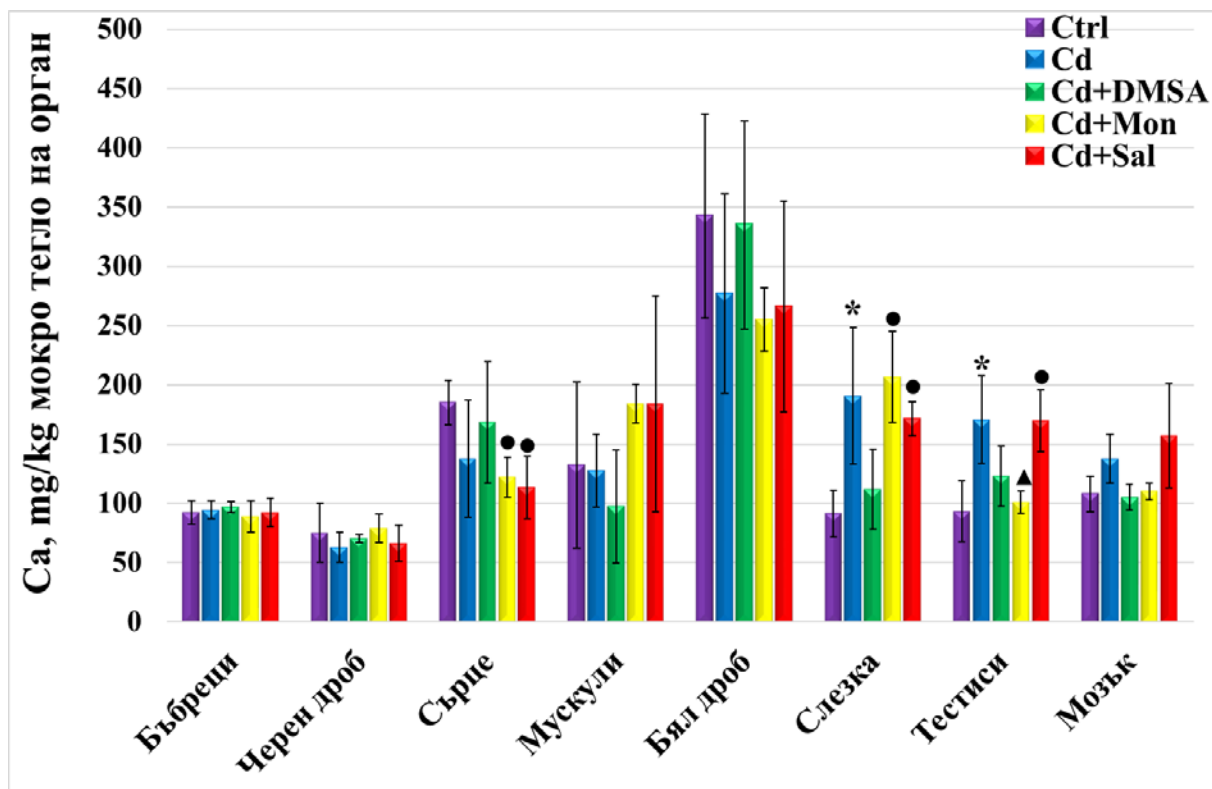
Легенда: Ctrl – нетретирана контролна група. Cd – токсична контролна група. Cd+DMSA – Cd-интоксикирани експериментални животни, третирани с DMSA. Cd+Mon – Cd-интоксикирани експериментални животни, третирани с монензин. Cd+Sal – Cd-интоксикирани експериментални животни, третирани със салиномицин ( $p < 0,05$ ).

\*\* - показва статистически значима разлика между средните стойности за съдържанието на кадмий в органите на кадмий-третираните животни спрямо животните, третирани с DMSA, с монензин, или със салиномицин ( $p < 0,05$ ).

На фигура 9 е представено съдържанието на Cd в мозъка на животните от петте експериментални групи. Концентрацията на Cd в мозъка на животните от токсичната контролна група е почти 8 ng/g. **За първи път** се доказва, че приложението на DMSA като антидот при подостро отравяне с Cd(II) преразпределя токсичния метален йон като повишава концентрацията му в мозъка със 116% в сравнение с Cd-третираните животни. Този резултат показва, че DMSA не е подходящ антидот при интоксикации с кадмий. Третирането на Cd-интоксикирани животни с тетраетиламониева сол на монензин киселина понижава съдържанието на Cd в мозъка с 96% спрямо токсичната контролна група. Тетраетиламониевата сол на салиномицин киселина понижава съдържанието на токсичния метал със 76% спрямо интоксикирани животни.

Известно е, че един от възможните механизми за възникване на Cd-индуцирана токсичност е свързан с нарушаване (поотделно или заедно) на хомеостазата на биометалните йони – Ca, Cu, Fe, Zn и др. Поради сходните химични и физични свойства на Cd с метали като Ca, Fe и Zn, той постъпва в клетките чрез мимикрия. Есенциалните метални йони участват в редица ензими, които изпълняват важни функции в организма. При изследване на потенциални хелатни агенти е особено важно да се мониторира ефекта им върху разпределението на биометалите в органите. На фигури 10-13 са представени данните за разпределението на Ca, Cu, Fe и Zn в изследваните органи.

Ние установихме, че най-високо е съдържанието на Ca в белия дроб, и намалява в реда: сърце > мускули > мозък > тестиси > бъбреци > слезка > черен дроб (фиг. 10). Експозицията на Cd променя разпределението на Ca и то е както следва: бял дроб > слезка > тестиси > мозък > сърце > мускули > бъбреци > черен дроб. Нарушаването на разпределението на този есенциален елемент в изследваните органи и потенциалната промяна на хомеостазата му може да бъде причина за наблюдаваните токсични ефекти на кадмия. Най-значимо спрямо нетретираната контролна група повишаване на съдържанието на Ca се наблюдава в слезката и тестисите на експерименталните животни. Предполагаме, че повишеното съдържание на Ca в слезката на Cd-третираните животни се дължи на увеличеното разрушаване на еритроцитите. Тетраетиламониевата сол на салиномицин киселина не повлиява кадмий-индуцираните изменения в хомеостазата на калция, като в слезката и тестисите съдържанието на калция остава по-високо спрямо нетретираната контролна група. Трябва да се отбележи, че тетраетиламониевата сол на монензин киселина възстановява съдържанието на Ca в тестисите. Тетраетиламониевата сол на монензин киселина и тетраетиламониевата сол на салиномицин киселина не възстановяват съдържанието на Ca в сърцето на експерименталните животни. Не се наблюдава значителна промяна в ендогенната концентрация на Ca в бъбреците, черния дроб, мускулите, белия дроб и мозъка на експерименталните животни от петте експериментални групи.



**Фигура 10. Влияние на DMSA, монензин и салиномицин върху съдържанието на калций в органи на полове зрели мъжки мишки, подложени на подостро отравяне с Cd(II) ацетат.**

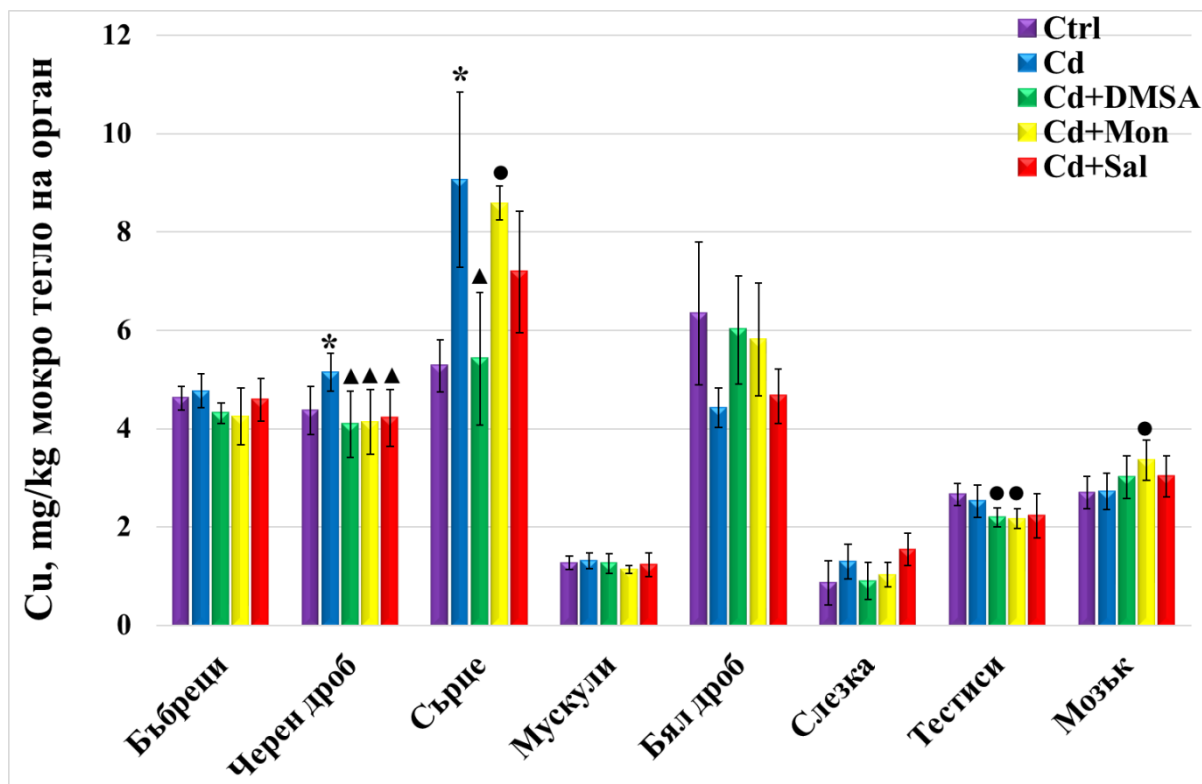
Легенда: Ctrl – нетретирана контролна група. Cd – токсична контролна група. Cd+DMSA – Cd-интоксикирани експериментални животни, третирани с DMSA. Cd+Mon – Cd-интоксикирани експериментални животни, третирани с монензин. Cd+Sal – Cd-интоксикирани експериментални животни, третирани със салиномицин.

\* – показва статистически значима разлика между средните стойности на нетретираната контролна група и токсичната контролна група ( $p < 0,05$ ).

▲ – показва статистически значима разлика между средните стойности на токсичната контролна група и третираната с DMSA, с монензин, или със салиномицин ( $p < 0,05$ ).

● – показва статистически значима разлика между средните стойности на нетретираната контролна група и групите, третирани с DMSA, с монензин, или със салиномицин ( $p < 0,05$ ).

Представените на фиг. 11 резултати показват, че в черния дроб и сърцето на Cd-интоксикираните животни съдържанието на мед е значително по-високо спрямо нетретираната контролна група. Експозицията на Cd преразпределя биометалния йон, като съдържанието му намалява в реда: сърце > черен дроб > бъбреци > бял дроб > мозък > тестиси > слезка > мускули. Изследваните от нас три хелатни агента възстановяват съдържанието на Cu в черния дроб до контролни стойности (фиг. 11). DMSA и тетраетиламониевата сол на салиномицин киселина понижават значително съдържанието на Cu в тестисите на животните спрямо нетретираната контролна група. Тетраетиламониевата сол на монензин киселина повишава съдържанието на мед в мозъка на животните спрямо нетретираната контролна група.



**Фигура 11. Влияние на DMSA, монензин и салиномицин върху съдържанието на мед в органи на половозрепли мъжки мишки, подложени на подостро отравяне с Cd(II) ацетат.**

Легенда: Ctrl – нетретирана контролна група. Cd – токсична контролна група. Cd+DMSA – Cd-интоксикирани експериментални животни, третирани с DMSA. Cd+Mon – Cd-интоксикирани експериментални животни, третирани с монензин. Cd+Sal – Cd-интоксикирани експериментални животни, третирани със салиномицин.

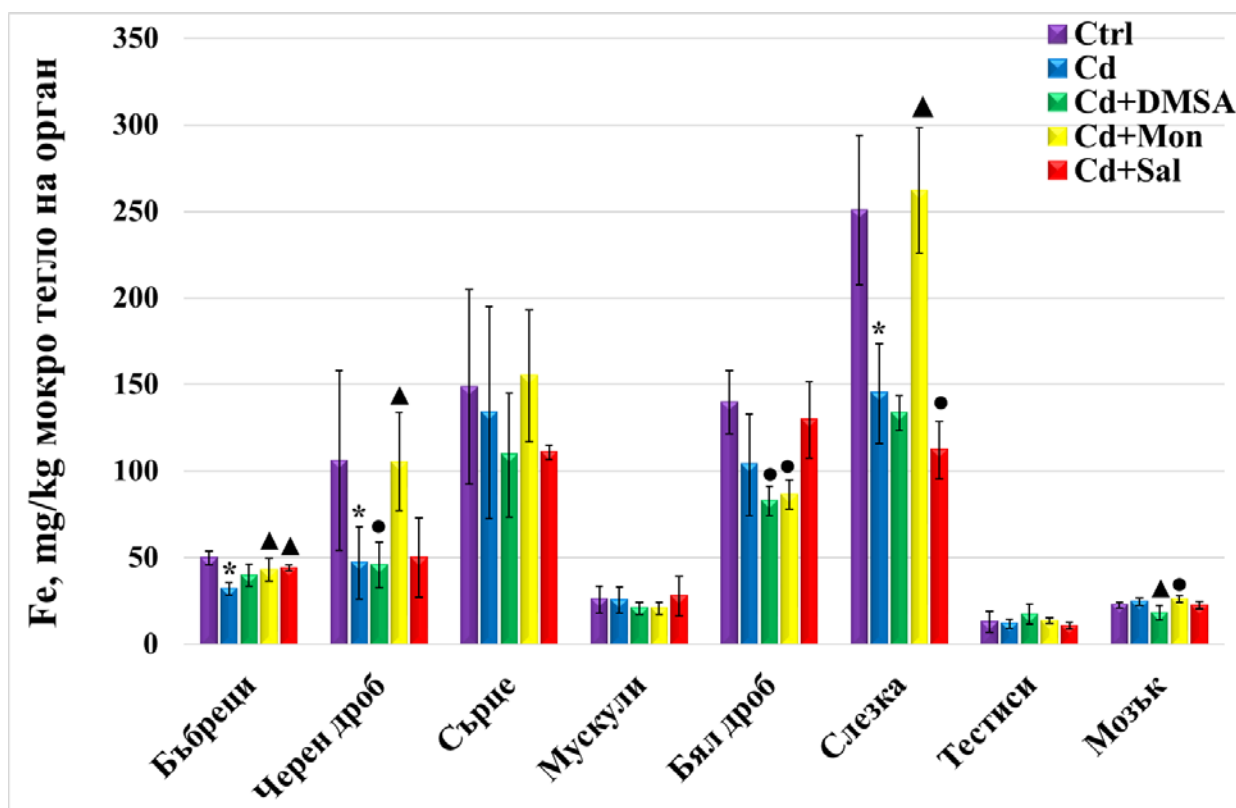
\* – показва статистически значима разлика между средните стойности на нетретираната контролна група и токсичната контролна група ( $p < 0,05$ ).

▲ – показва статистически значима разлика между средните стойности на токсичната контролна група и третираната с DMSA, с монензин, или със салиномицин ( $p < 0,05$ ).

● – показва статистически значима разлика между средните стойности на нетретираната контролна група и групите, третирани с DMSA, с монензин, или със салиномицин ( $p < 0,05$ ).

Резултатите, представени на фигура 12 показват разпределението на Fe и то е както следва: най-високо е съдържанието на Fe в слезката и намалява в реда: сърце > бял дроб > черен дроб > бъбреци > мускули > мозък > тестиси. Експозицията на Cd значително понижава съдържанието на Fe в бъбреците, черния дроб и слезката, като се забелязва тенденция за понижаване и в белия дроб и сърцето. Разпределението на Fe в органите на Cd-третираните животни е в следния ред: сърце > слезка > бял дроб > черен дроб > бъбреци > мускули > мозък > тестиси. DMSA възстановява разпределението на желязото – то е както в нетретираната група. Забелязва се, че приложението на DMSA не повлиява Cd-индуцираното изменение на съдържанието на Fe в черния дроб, и

допълнително понижава съдържанието на Fe белия дроб и слезката на животните спрямо нетретирания контролна група. За разлика от DMSA, тетраетиламониевата сол на монензин киселина напълно възстановява съдържанието на Fe в черния дроб и слезката до контролни стойности. Трябва да обърнем внимание, че двата природни полиетерни йонофорни антибиотици повлияват в различна степен Cd-индуцираните изменения в хомеостазата на желязото. Разпределението на Fe в органите на животните, третирани с монензин е подобно на това на контролната група. На фигура 12 се вижда, че животните, третирани с тетраетиламониевата сол на салиномицин киселина имат следното разпределение на Fe в органите: бял дроб ~ слезка ~ сърце ~ черен дроб ~ бъбреци ~ мускули ~ мозък ~ тестиси. Животните, които са приемали тетраетиламониевата сол на монензин киселина имат по-високо съдържание на есенциалния метал в мозъка спрямо нетретирания контролна група. Третирането на Cd-интоксикирани животни със салиномицин не възстановява съдържанието на Fe в слезката на животните, но запазва разпределението на този есенциален елемент в другите органи.



Фигура 12. Влияние на DMSA, монензин и салиномицин върху съдържанието на желязо в органи на половозрели мъжки мишки, подложени на подостро отравяне с Cd(II) ацетат.

Легенда: Ctrl – нетретирана контролна група. Cd – токсична контролна група. Cd+DMSA – Cd-интоксикирани експериментални животни, третирани с DMSA. Cd+Mon – Cd-интоксикирани



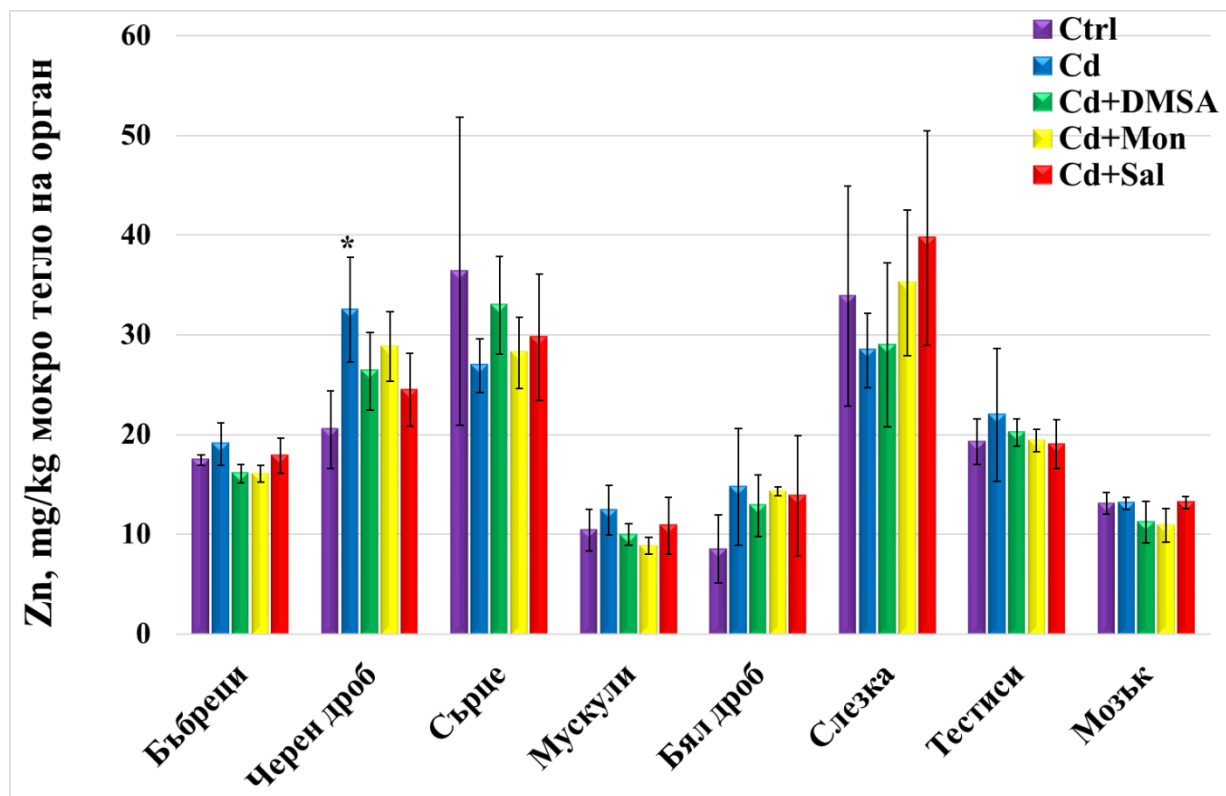
експериментални животни, третирани с монензин. Cd+Sal – Cd-интоксикирани експериментални животни, третирани със салиномицин.

\* – показва статистически значима разлика между средните стойности на нетретираната контролна група и токсичната контролна група ( $p < 0,05$ ).

▲ – показва статистически значима разлика между средните стойности на токсичната контролна група и третираната с DMSA, с монензин, или със салиномицин ( $p < 0,05$ ).

● – показва статистически значима разлика между средните стойности на нетретираната контролна група и групите, третирани с DMSA, с монензин, или със салиномицин ( $p < 0,05$ ).

Резултатите, представени на фигура 13 показват разпределението на Zn в органите на животните от петте експериментални групи. Разпределението в контролната група е както следва: сърце > слезка > черен дроб > тестиси > бъбреци > мозък > мускули > бял дроб. Експозицията на Cd променя разпределението в реда: черен дроб > слезка > сърце > тестиси > бъбреци > бял дроб > мозък > мускули. Приложението на трите хелатни агента възстановява разпределението на Zn в изследваните органи и то е както в контролната група.



**Фигура 13. Влияние на DMSA, монензин и салиномицин върху съдържанието на цинк в органи на полове зрели мъжки мишки, подложени на подостро отравяне с Cd(II) ацетат.**

Легенда: Ctrl – нетретирана контролна група. Cd – токсична контролна група. Cd+DMSA – Cd-интоксикирани експериментални животни, третирани с DMSA. Cd+Mon – Cd-интоксикирани експериментални животни, третирани с монензин. Cd+Sal – Cd-интоксикирани експериментални животни, третирани със салиномицин.

\* – показва статистически значима разлика между средните стойности на нетретираната контролна група и токсичната контролна група ( $p < 0,05$ ).

▲ – показва статистически значима разлика между средните стойности на токсичната контролна група и третираната с DMSA, с монензин, или със салиномицин ( $p < 0,05$ ).

● – показва статистически значима разлика между средните стойности на нетретираната контролна група и групите, третирани с DMSA, с монензин, или със салиномицин ( $p < 0,05$ ).

В обобщение на получените резултати от хематологичните, биохимичните и атомноабсорбционните анализи, може да се направи следния извод: **Тетраетиламониева сол на монензин киселина и тетраетиламониева сол на салиномицин киселина са по-ефективни от изследваните до момента хелатни агенти при отравяне с кадмий. Все пак, трябва да се обърне внимание на някои от ефектите на двата полиетерни антибиотици. При приложението на тетраетиламониевата сол на монензин киселина при отравяне с кадмий трябва да се мониторира концентрацията на албумина и съотношението общ/директен билирубин в кръвния серум (табл. 20). При потенциалното приложение на тетраетиламониевата сол на монензин киселина трябва да се вземе под внимание изменението на съдържанието на Ca в сърцето и слезката, Cu в сърцето, тестисите и мозъка, Fe в белия дроб и мозъка спрямо нетретираната контролна група. Внимание трябва да се обърне и на ефекта на тетраетиламониевата сол на салиномицин киселина върху съдържанието на Ca в сърцето, слезката и тестисите и Fe в слезката. Поради повишеното съдържание на кадмий в мозъка след третиране с DMSA, този хелатен агент не е подходящ антидот при отравяне с кадмий.**

## III.2. Резултати от хематологични, биохимични и атомноабсорбционни анализи

### III.2.1. Резултати от хематологични анализи

Резултатите от нашите изследвания, представени в таблица 23, показват, че експозицията на 80 mg/kg Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> в продължение на 14 дни не предизвиква значителни изменения в изследваните хематологични показатели.

**Таблица 23. Влияние на DMSA, монензин и салиномицин върху хематологичните показатели на експерименталните животни, подложени на подостро отравяне с Pb(II).**

Показател	Ctrl	Pb	Pb+DMSA	Pb+Mon	Pb+Sal
WBC, x10 <sup>9</sup> /L	3,1±1,3	5,1±2,5	2,5±1,2	3,8±2,1	2,6±1,4
Ly, x10 <sup>9</sup> /L	1,4±0,8	2,4±1,2	1,8±1,5	2,6±2,3	1,4±1,1
Mon, x10 <sup>9</sup> /L	0,25±0,06	0,14±0,09	0,14±0,11	0,33±0,22	0,1±0,15
Gran, x10 <sup>9</sup> /L	2,0±0,8	3,4±1,4	2,6±1,6	3,0±1,5	1,6±1,1
Ly, %	51±11	49±12	37±13	38±18	63±11
Mon, %	2,3±1,0	3,2±1,2	3,3±0,8	3,6±1,5	3,1±0,4
Gran, %	46±11	52±18	62±13	59±18	47±22
RBC, x10 <sup>12</sup> /L	9,6±0,9	10,2±0,8	10,2±1,0	9,0±1,1	8,3±0,7
HGB, g/L	139±12	150±10	143±11	129±14	127±13,5
HCT, L/L	0,46±0,04	0,49±0,03	0,48±0,04	0,43±0,04	0,4±0,04
MCV, fL	48±2	49±1	47±2	48±2	48±2
MCH, pg	14,5±0,8	14,6±0,3	14,0±0,8	14,0±0,3	15 ±0,7
MCHC, g/L	302±4	302±6	299±4	302±5,0	317±8
RDW, %	17,9±2,9	16,3±1,3	18,3±2,4	17,4±2,1	15,0±0,9
PLT, x10 <sup>9</sup> /L	494±135	714±132	704±123	677±182	505±120
MPV, fL	5,0±0,4	5,1±0,6	4,9±0,4	5,0±0,5	5,0±0,5
PDW, %	16,8±0,7	16,8±0,4	16,5±0,7	16,7±0,4	17,0±0,6
PCT, ml/L	0,25±0,07	0,33±0,06	0,32±0,09	0,33±0,07	0,25±0,05

Легенда: Ctrl – нетретирана контролна група. Pb – токсична контролна група. Pb+DMSA – Pb-интоксикирани експериментални животни, третирани с DMSA. Pb+Mon – Pb-интоксикирани експериментални животни, третирани с монензин. Pb+Sal – Pb-интоксикирани експериментални животни, третирани със салиномицин.

### *III.2.2. Резултати от биохимични анализи*

Биохимичните показатели са изключително важни за поставяне на точна диагноза, а също и за оценка за приложената терапия. За да оценим влиянието на  $Pb(NO_3)_2$  върху функцията на основни органи, определихме концентрацията на общия белтък, албумина, глюкозата, креатинина, желязото и ЖСК и активностите на ензимите AST, ALT, GGT, ALP,  $\alpha$ -амилаза в кръвния серум на животните. Същите показатели бяха изследвани и за сравнителна оценка на потенциалното приложение на монензин, салиномицин и DMSA като антидоти при отравяния с Pb.

Резултатите от биохимичните анализи на кръвен серум на мишки са представени в таблица 24.

#### *III.2.2.1. Влияние на олово и хелатните агенти върху чернодробните функционални маркери.*

Направените от нас биохимични изследвания, показват, че експозицията на  $Pb(NO_3)_2$  повишава активността на ALT, GGT и ALP в кръвния серум на животните спрямо нетретираната контролна група. Високата концентрация на ALP в кръвния серум може да се дължи на увреждане или обструкция на жлъчните пътища, което нарушава и кръвообращението в черния дроб. Трите хелатни агента понижават серумната активност на тези ензими до нормални контролни стойности (табл. 24) При експозиция на  $Pb(NO_3)_2$  се забелязва тенденция за понижаване на серумната концентрация на общия белтък. Следва да се отбележи обаче, че не се наблюдава статистически значима разлика в серумната концентрация на общия белтък и албумина на животните от петте експериментални групи.

**Таблица 24. Влияние на Pb, DMSA, монензин и салиномицин върху някои биохимични показатели на мишки, подложени на подостро отравяне с Pb**

Група	Общ белтък [g/L]	Албумин [g/L]	Глюкоза [mmol/L]	Креатинин [ $\mu$ mol/L]	Урея [mmol/L]	AST [U/L]	ALT [U/L]	GGT [U/L]	ALP [U/L]	$\alpha$ -Амилаза [U/L]	Fe [ $\mu$ mol/L]	ЖСК [ $\mu$ mol/L]
<b>Ctrl</b>	71,9 $\pm$ 2,8	39,0 $\pm$ 1,8	9,0 $\pm$ 1,9	20,5 $\pm$ 1,5	8,1 $\pm$ 1,1	359 $\pm$ 25	75,8 $\pm$ 7,3	3,0 $\pm$ 0,0	106,3 $\pm$ 22,3	2624 $\pm$ 319	53,0 $\pm$ 2,4	94,3 $\pm$ 8,9
<b>Pb</b>	65,2 $\pm$ 5,3	41,6 $\pm$ 2,6	5,7 $\pm$ 1,0 <sup>a</sup>	25,7 $\pm$ 1,4 <sup>a</sup>	11,2 $\pm$ 1,0 <sup>a</sup>	402 $\pm$ 45	97,3 $\pm$ 33,0	10,5 $\pm$ 5,0 <sup>a</sup>	141,3 $\pm$ 42,5	3133 $\pm$ 300	27,5 $\pm$ 2,8 <sup>a</sup>	94,5 $\pm$ 14,7
<b>Pb+DMSA</b>	65,05 $\pm$ 7,3	40,9 $\pm$ 4,1	7,7 $\pm$ 1,9	24,7 $\pm$ 2,5 <sup>b</sup>	10,0 $\pm$ 1,3 <sup>b</sup>	403 $\pm$ 95	71,1 $\pm$ 10,8	3,0 $\pm$ 0,0 <sup>b</sup>	84,3 $\pm$ 26,4	2859 $\pm$ 311	55,1 $\pm$ 12,4 <sup>b</sup>	105,6 $\pm$ 16,3
<b>Pb+Mon</b>	68,1 $\pm$ 3,5	-	9,8 $\pm$ 3,2	27,0 $\pm$ 1,6 <sup>b</sup>	9,7 $\pm$ 1,4	376 $\pm$ 76	66,1 $\pm$ 30,0	3,0 $\pm$ 0,0 <sup>b</sup>	81,3 $\pm$ 17,3	2812 $\pm$ 372	50,7 $\pm$ 16,9 <sup>b</sup>	97,2 $\pm$ 25,1
<b>Pb+Sal</b>	72,0 $\pm$ 4,42	41,3 $\pm$ 3,1	6,1 $\pm$ 1,0	21,8 $\pm$ 3,4 <sup>b</sup>	9,1 $\pm$ 1,8 <sup>b</sup>	480 $\pm$ 111	76,0 $\pm$ 30,0	3,0 $\pm$ 0,0 <sup>b</sup>	89,5 $\pm$ 14,2	2647 $\pm$ 437	54,0 $\pm$ 6,1 <sup>b</sup>	85,0 $\pm$ 7,5

Легенда: Ctrl – нетретирана контролна група. Pb – токсична контролна група. Pb+DMSA – Pb-интоксикирани експериментални животни, подложени на третиране с DMSA. Pb+Mon – Pb-интоксикирани експериментални животни, подложени на третиране с монензин. Pb+Sal – Pb-интоксикирани експериментални животни, третирани със салиномицин.

<sup>a</sup> – показва статистически значима разлика между средните стойности на нетретираната контролна група и токсичната контролна група ( $p < 0,05$ ).

<sup>b</sup> – показва статистически значима разлика между средните стойности на токсичната контролна група и третираната с DMSA, с монензин, или със салиномицин ( $p < 0,05$ ).

<sup>c</sup> – показва статистически значима разлика между средните стойности на нетретираната контролна група и група, третирана с DMSA, с монензин, или със салиномицин ( $p < 0,05$ ).

### *III.2.2.2. Влияние на Pb и хелатните агенти върху бъбречни функционални маркери.*

Оловото оказва неблагоприятни ефекти и върху бъбреците. Когато концентрацията на креатинина е над горната граница се счита, че налице е бъбречна недостатъчност. Третирането на експериментални животни с  $Pb(NO_3)_2$  значително повишава серумната концентрация на креатинина и уреята в сравнение с контролните животни. От нашите резултати, представени в таблица 24 се вижда, че приложението на DMSA след експозиция на олово не понижава серумната концентрация на креатинина и урея и тя остава по-висока спрямо нетретираната контролна група. Третирането на Pb-интоксикирани животни с тетраетиламониевата сол на монензин киселина също не възстановява серумната концентрация на креатинина. Тетраетиламониевата сол понижава серумната концентрация на уреята, но стойността остава по-висока спрямо нетретираната контролна група. Възстановяването на серумната концентрация на креатинина и уреята се забелязва в групата, третирана с тетраетиламониевата сол на салиномицин киселина (табл. 24).

### *III.2.2.3. Други функционални маркери.*

Експозицията на олово предизвиква значително понижаване на серумната концентрация на глюкозата спрямо нетретираната контролна група. Предполагаме, че хипогликемията при животните, третирани с Pb(II) нитрат може да се дължи на глюкозурия вследствие на бъбречно увреждане. Други възможни причини са чернодробно увреждане и начален стадий на онкологично заболяване. DMSA, тетраетиламониевата сол на монензин киселина и тетраетиламониевата сол на салиномицин киселина инхибират Pb-индуцираната хипогликемия.

Нашите резултати показват също, че животните, изложени на въздействието на Pb(II) нитрат имат по-висока серумна активност на ензима алфа-амилаза спрямо нетретираната контролна група. Трите тествани хелатни агента понижават серумната активност на този ензим до нормални контролни стойности (табл. 24).

Направените от нас биохимични изследвания показват, че животните, третирани с Pb(II) нитрат в продължение на 2 седмици имат 2 пъти по-ниско серумно желязо

спрямо контролната група (таблица 24). Това потвърждава литературните данни, че експозицията на Pb предизвиква понижаване на концентрацията на серумното желязо. Представените в таблица 24 резултати, показват, че трите хелатни агента възстановяват напълно серумната концентрация на желязото. Резултатите показват, че не се наблюдава статистически значима разлика в ЖСК на животните от петте експериментални групи (табл. 24).

**В обобщение на получените резултати, може да кажем, че ефектът от приложението на DMSA, тетраетиламониевата сол на монензин киселина и тетраетиламониевата сол на салиномицин киселина е съизмерим. Хелатните агенти в еднаква степен инхибират Pb-индуцираните изменения в изследваните от нас биохимични показатели.**

### *III.2.3.1 Резултати от атомноабсорбционен анализ на кръв*

Резултатите, представени в таблица 25 показват концентрацията на олово в кръвта на експерименталните животни. Експозицията на  $Pb(NO_3)_2$  в доза 80 mg/kg в продължение на 14 дни повишава концентрацията на Pb в кръв до 92,6 ng/mL. Концентрацията на олово в кръвта на животните, третирани с DMSA и тетраетиламониева сол на салиномицин киселина остава значително по-висока в сравнение с контролната група. В сравнение с токсичната група, животните, третирани с DMSA имат по-висока концентрация на олово в кръвта – 126,1 ng/mL. Най-висока е концентрацията на олово в кръвта на животните, третирани с тетраетиламониевата сол на салиномицин киселина. Предполагаме, че когато двата хелатни агента извличат токсичния метален йон от органите, той попада в кръвта. Допускаме, че тетраетиламониевата сол на салиномицин киселина извлича в по-голяма степен оловото от костите поради по-липофилния си характер. Най-вероятно това е причината, поради която концентрацията на олово в кръвта на животните, третирани със салиномицин е значително по-висока спрямо токсичната контролна група. Необходимо е да се проведат допълнителни изследвания, за да се установи колко време след третирането се екскретира токсичния метален йон от кръвта.

**Таблица 25. Влияние на DMSA, монензин и салиномицин върху концентрацията на кадмий в тотална кръв на половозрели мъжки мишки, подложени на подостро отравяне с Pb(II) нитрат.**

	<b>Pb, ng/mL</b>
<b>Ctrl</b>	< 30 ng/mL
<b>Pb</b>	92,9 ± 30,6
<b>Pb+DMSA</b>	126,1 ± 56,7 <sup>б</sup>
<b>Pb+Mon</b>	-
<b>Pb+Sal</b>	268,0 ± 128,0 <sup>а</sup>

Легенда: Ctrl – контролна (нетретирана) група. Pb – токсична контролна (оловна) група. Pb+DMSA – животни, интоксикирани с Pb(II) нитрат и третиран с DMSA. Pb+Mon – животни, интоксикирани с Pb(II) нитрат и третиран с монензин. Pb+Sal – животни, интоксикирани с Pb(II) нитрат и третиран с салиномицин.

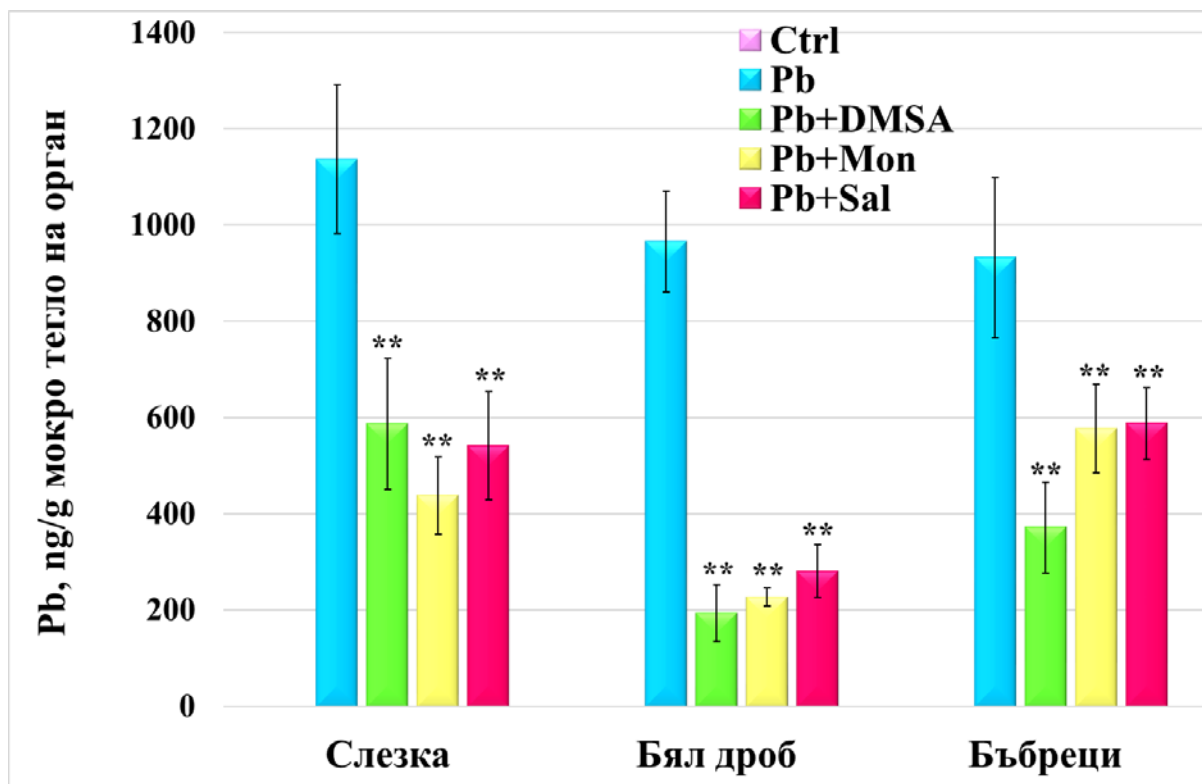
<sup>а</sup> – показва статистически значима разлика между средните стойности на токсичната контролна група със салиномицин ( $p < 0,05$ ).

<sup>б</sup> – показва статистически значима разлика между средните стойности на третираната с DMSA група, и третираната със салиномицин ( $p < 0,05$ ).

### III.2.3.2 Резултати от атомноабсорбционен анализ на органи

Резултатите от атомноабсорбционния анализ на органи от експериментални животни за определяне на съдържанието на олово са представени на фигури 14 и 15.





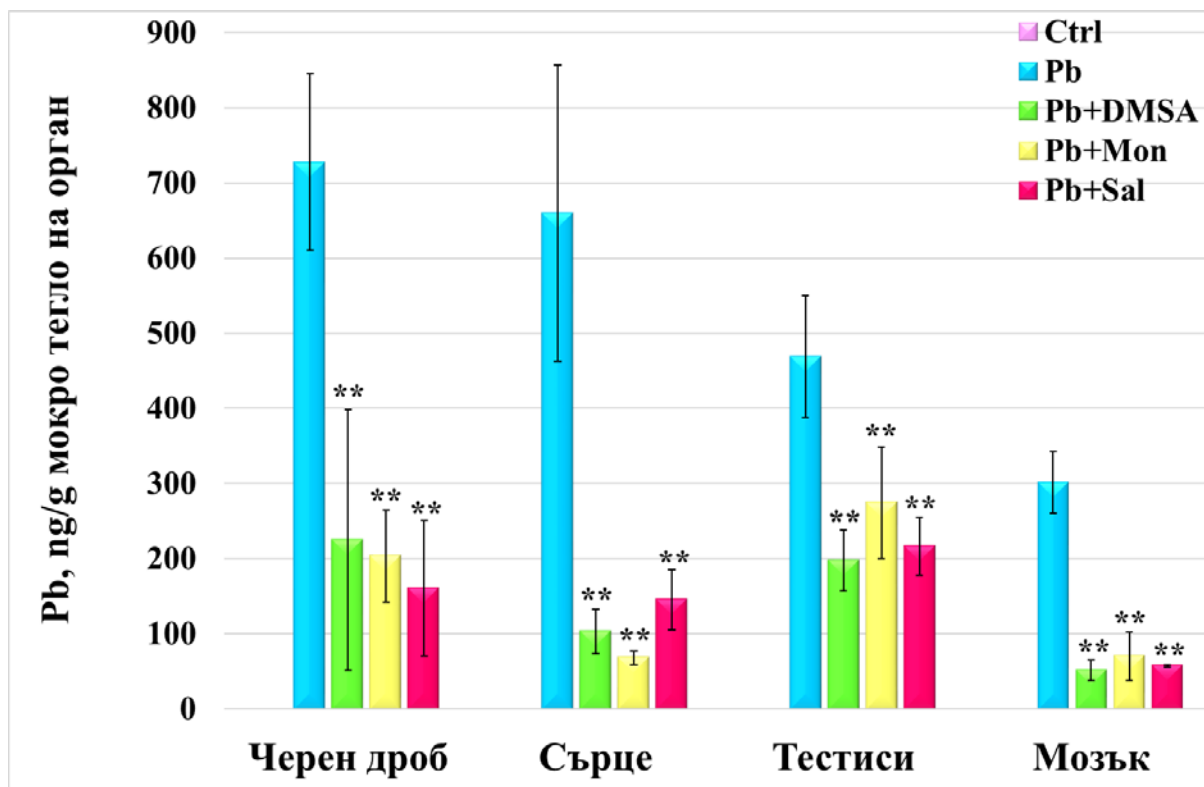
**Фиг. 14** Влияние на DMSA, монензин и салиномицин върху съдържанието на олово в слезка, бял дроб и бъбреци на половозрели мъжки мишки, подложени на подостро отравяне с Pb(II) нитрат.

Легенда: Ctrl – нетретирана контролна група. Pb – токсична контролна група. Pb+DMSA – Pb-интоксикирани експериментални животни, третирани с DMSA. Pb+Mon – Pb-интоксикирани експериментални животни, третирани с монензин. Pb+Sal – Pb-интоксикирани експериментални животни, третирани със салиномицин.

\* - показва статистически значима разлика между средните стойности за съдържанието на олово в органите на оловно-интоксикирани животни спрямо нетретираните контролни животни ( $p < 0,05$ ).

\*\* - показва статистически значима разлика между средните стойности за съдържанието на олово в органите на оловно-интоксикирани животни спрямо животните, третирани с DMSA, с монензин, или със салиномицин ( $p < 0,05$ ).

Както се вижда от резултатите, представени на фигури 14 и 15, токсичният метал се натрупва във всички изследвани органи. Най-висока концентрация на Pb беше регистрирана в слезката, а най-ниска в мозъка на експерименталните животни. Приложението на DMSA като хелатен агент понижава концентрацията на токсичния метал в слезката с 48%, в белия дроб – с 80% и с 60% в бъбреците в сравнение с токсичната група (фигура 14). Ефективността на тетраетиламониевата сол на монензин киселина се изразява в понижаване на концентрацията на Pb в слезката с 62%, със 77% в белия дроб и с 38% в бъбреците в сравнение с Pb-интоксикирани животни. Тетраетиламониевата сол на салиномицин киселина извлича 52% от натрупаното олово в слезката, 71% от белия дроб и 37% от бъбреците спрямо токсичната група.



**Фиг. 15** Влияние на DMSA, монензин и салиномицин върху съдържанието на олово в черен дроб, сърце, тестиси и мозък на полово зрели мъжки мишки, подложени на подостро отравяне с Pb(II) нитрат.

Легенда: Ctrl – нетретирана контролна група. Pb – токсична контролна група. Pb+DMSA – Pb-интоксикирани експериментални животни, третирани с DMSA. Pb+Mon – Pb-интоксикирани експериментални животни, третирани с монензин. Pb+Sal – Pb-интоксикирани експериментални животни, третирани със салиномицин ( $p < 0,05$ ).

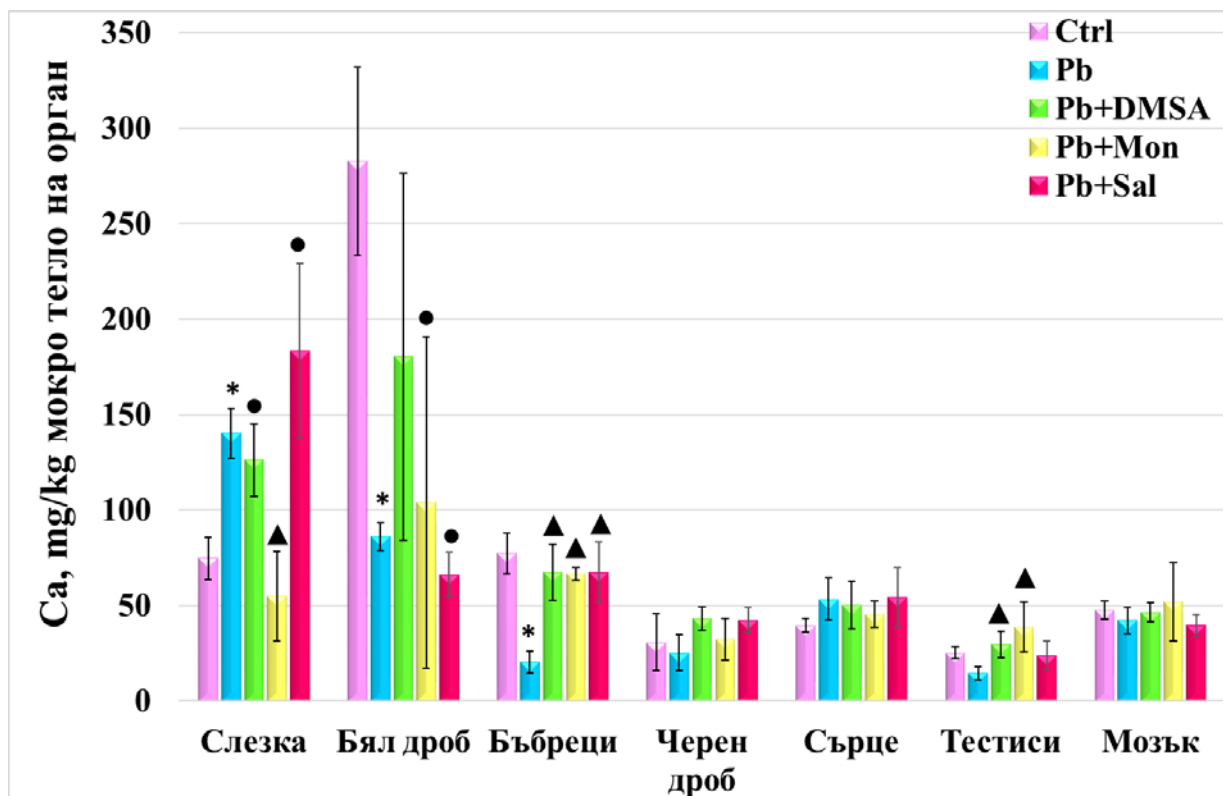
\* - показва статистически значима разлика между средните стойности за съдържанието на олово в органите на олово-интоксикираниите животни спрямо нетретираните контролни животни.

\*\* - показва статистически значима разлика между средните стойности за съдържанието на олово в органите на олово-интоксикираниите животни спрямо животните, третирани с DMSA, с монензин, или със салиномицин ( $p < 0,05$ ).

Резултатите, представени на фигура 15 показват, че приложението на DMSA понижава със 69% концентрацията на Pb в черния дроб, с 84% в сърцето, с 58% в тестисите и с 83% в мозъка в сравнение с токсичната група. Приложението на тетраетиламониевата сол на монензин киселина извлича 72% от Pb в черния дроб, 90% от сърцето, 42% от тестисите и 77% от мозъка в сравнение с Pb-интоксикираниите животни. Използването на тетраетиламониевата сол на салиномицин киселина мобилизира 78% от Pb от черния дроб и сърцето, 54% от тестисите и 81% от мозъка в сравнение с токсичната контролна група. С изключение на бъбреците, трите хелатни агента имат съизмерим ефект по отношение на извличането на токсичния метален йон от органите на експерименталните животни.

Един от възможните механизми за възникване на Рb-индуцирана токсичност е нарушаване на хомеостазата на есенциалните метали. Освен това, основен недостатък на хелатотерапията е липсата на селективност към токсичния метален йон. Хелатният агент трябва да е с висока степен на селективност към токсичния метален йон и да не предизвиква изменения в хомеостазата на биометалните йони. Поради тази причина ние изследвахме разпределението на есенциалните метали Ca, Cu, Fe и Zn в органите на животните от петте експериментални групи.

Според резултатите от нашите изследвания, разпределението на Ca в органите е в следния ред: бял дроб > бъбреци > слезка > мозък > сърце > черен дроб > тестиси (фигура 16). Експозицията на Рb предизвиква преразпределяне на калция, чието съдържание намалява в реда: слезка > бял дроб > сърце > мозък > черен дроб > бъбреци > тестиси. Забелязва се значително повишаване на съдържанието на Ca в слезката и понижаване в белия дроб и бъбреците. От представените на фигура 16 резултати, се вижда, че приложението на DMSA не възстановява разпределението на Ca в органите и то е както следва: бял дроб > слезка > бъбреци > сърце > мозък > черен дроб > тестиси. Важно е да се обърне внимание, че DMSA не възстановява Рb-индуцираните изменения в съдържанието на Ca в слезката. Резултатите, представени на фиг. 16 показват, че двата полиетерни йофорни антибиотици имат различно поведение по отношение на съдържанието на Ca в слезката. Трябва да отбележим, че тетраетиламониевата сол на монензин киселина напълно възстановява разпределението на калция в органите на животните и то е както в контролната група. Животните, третирани с тетраетиламониевата сол на салиномицин киселина имат по-ниско съдържание на Ca в белия дроб и по-високо в слезката и черния дроб спрямо контролната група. Съдържанието на калций в органите на животните от тази група намалява в реда: слезка > бъбреци > бял дроб > сърце > черен дроб > мозък > тестиси. **От резултатите, представени на фигура 16, може да направим извода, че тетраетиламониевата сол на монензин киселина има по-добър ефект от DMSA върху запазването на разпределението и съдържанието на Ca в органите на животните.**



**Фигура 16. Влияние на DMSA, монензин и салиномицин върху съдържанието на калций в органи на полове зрели мъжки мишки, подложени на подостро отравяне с Pb(II) нитрат.**

Легенда: Ctrl – нетретирана контролна група. Pb – токсична контролна група. Pb+DMSA – Pb-интоксикирани експериментални животни, третирани с DMSA. Pb+Mon – Pb-интоксикирани експериментални животни, третирани с монензин. Pb+Sal – Pb-интоксикирани експериментални животни, третирани със салиномицин.

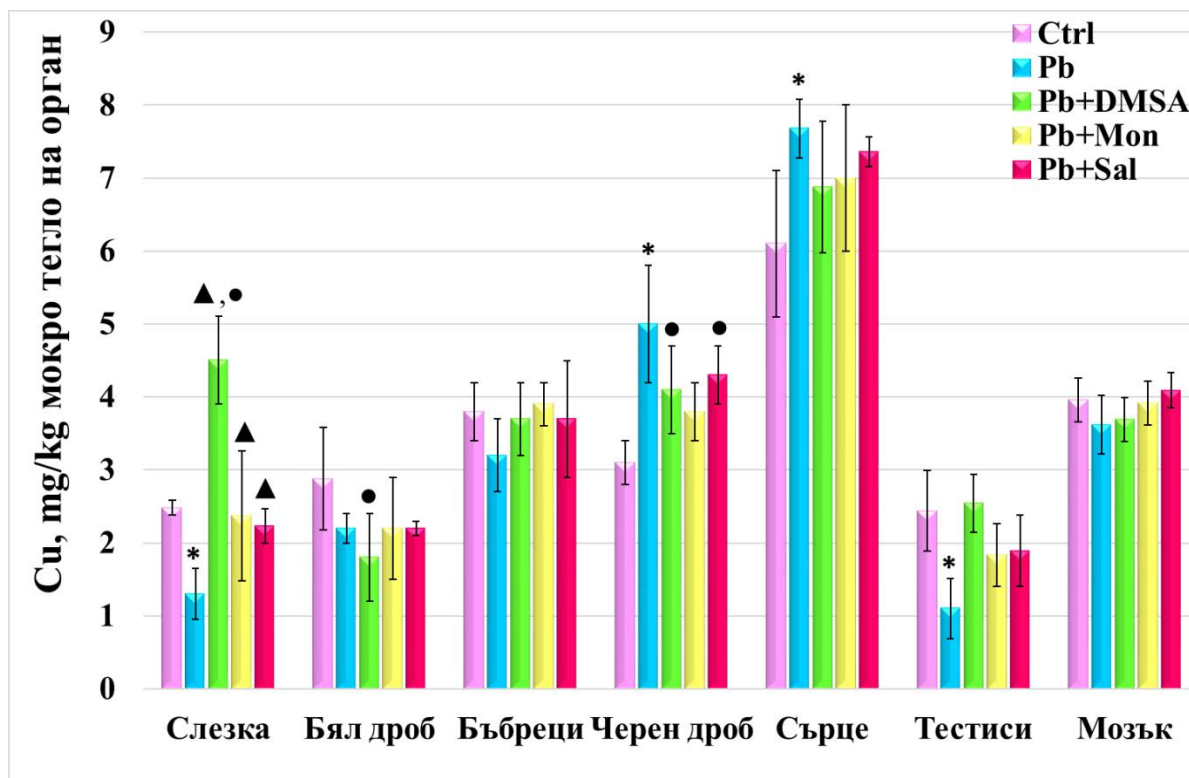
\* – показва статистически значима разлика между средните стойности на нетретираната контролна група и токсичната контролна група ( $p < 0,05$ ).

▲ – показва статистически значима разлика между средните стойности на токсичната контролна група и третираната с DMSA, с монензин или със салиномицин ( $p < 0,05$ ).

● – показва статистически значима разлика между средните стойности на нетретираната контролна група и група, третирана с DMSA, с монензин или със салиномицин ( $p < 0,05$ ).

Резултатите от нашите изследвания показаха, че разпределението на Си в органите на животните от контролната група е както следва: сърце > мозък > бъбреци > черен дроб > бял дроб > слезка > тестиси (фиг. 17). Експозицията на Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> предизвиква промяна в съдържанието на Си в слезката, черния дроб, сърцето и тестисите, и разпределението се променя: сърце > черен дроб > мозък > бъбреци > бял дроб > тестиси > слезка. Приложението на DMSA като хелатен агент променя разпределението на Си в изследваните органи: сърце > слезка > черен дроб > мозък > бъбреци > тестиси > бял дроб. Прави впечатление, че DMSA значително повишава съдържанието на Си в слезката и черния дроб, докато в белия дроб забелязваме понижаване на съдържанието

на този биометал спрямо нетретирания контролна група. Важно е да се обърне внимание, че съдържанието на Cu в черния дроб на животните третирани с двата полиетерни йонофора остава по-високо спрямо нетретирания контролна група. От представените резултати, убедително може да твърдим, че двата полиетерни йонофорни антибиотика имат по-добър ефект от DMSA върху разпределението и съдържанието на Cu(II) в органите на животните.



**Фигура 17. Влияние на DMSA, монензин и салиномицин върху съдържанието на мед в органи на половозрепи мъжки мишки, подложени на подостро отравяне с Pb(II) нитрат.**

Легенда: Ctrl – нетретирана контролна група. Pb – токсична контролна група. Pb+DMSA – Pb-интоксикирани експериментални животни, третирани с DMSA. Pb+Mon – Pb-интоксикирани експериментални животни, третирани с монензин. Pb+Sal – Pb-интоксикирани експериментални животни, третирани със салиномицин.

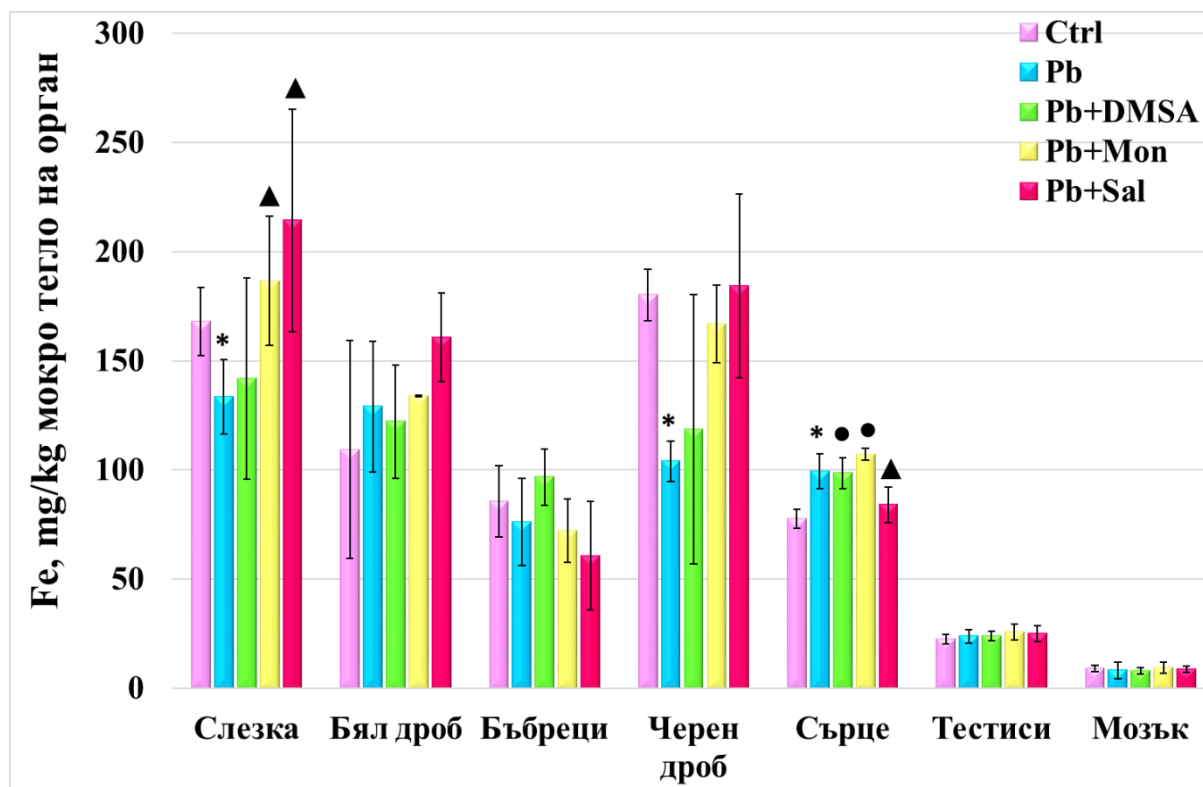
\* – показва статистически значима разлика между средните стойности на нетретирания контролна група и токсичната контролна група ( $p < 0,05$ ).

▲ – показва статистически значима разлика между средните стойности на токсичната контролна група и третиранията с DMSA, с монензин или със салиномицин ( $p < 0,05$ ).

● – показва статистически значима разлика между средните стойности на нетретирания контролна група и група, третирана с DMSA, с монензин или със салиномицин ( $p < 0,05$ ).

Ние установихме, че в органите на животните от контролната група най-високо е съдържанието на Fe в черния дроб, и намалява в реда: слезка > бял дроб > бъбреци > сърце > тестиси > мозък (фиг. 18). В органите на Pb-интоксикирания животни

разпределението на Fe е в следния ред: слезка > бял дроб > черен дроб > сърце > бъбреци > тестиси > мозък (фиг. 18). Животните, третирани с DMSA имат следното разпределение на Fe в органите: слезка > бял дроб > черен дроб > бъбреци > сърце > тестиси > мозък. Третирането на Pb-интоксикирани животни с DMSA не възстановява съдържанието на желязо в черния дроб на животните – то остава по-ниско спрямо контролната група. Полиетерните йонофорни антибиотици възстановяват концентрацията на Fe по-добре отколкото DMSA.



**Фигура 18. Влияние на DMSA, монензин и салиномицин върху съдържанието на желязо в органи на половозрепи мъжки мишки, подложени на подостро отравяне с Pb(II) нитрат.**

Легенда: Ctrl – нетретирани контролна група. Pb – токсична контролна група. Pb+DMSA – Pb-интоксикирани експериментални животни, третирани с DMSA. Pb+Mon – Pb-интоксикирани експериментални животни, третирани с монензин. Pb+Sal – Pb-интоксикирани експериментални животни, третирани със салиномицин.

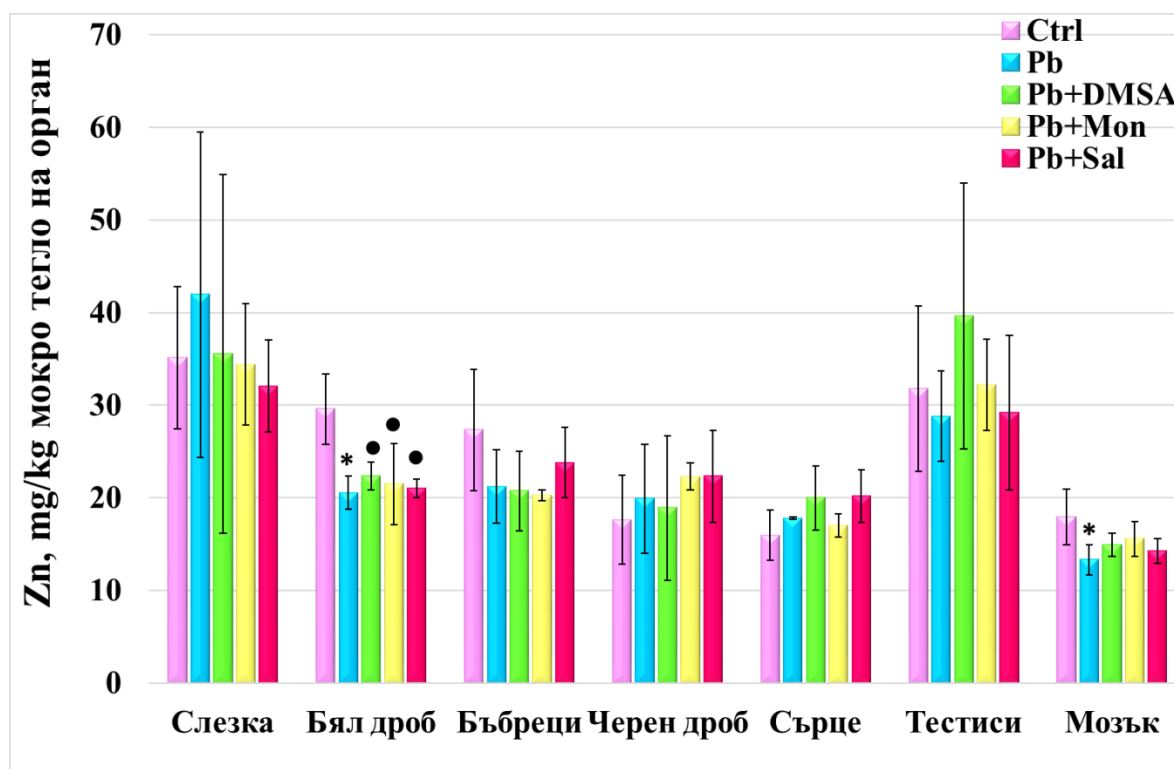
\* – показва статистически значима разлика между средните стойности на нетретираната контролна група и токсичната контролна група ( $p < 0,05$ ).

▲ – показва статистически значима разлика между средните стойности на токсичната контролна група и третираната с DMSA, с монензин или със салиномицин ( $p < 0,05$ ).

● – показва статистически значима разлика между средните стойности на нетретираната контролна група и група, третирана с DMSA, с монензин или със салиномицин ( $p < 0,05$ ).

Според нашите резултати разпределението на Zn в органите на животните от контролната група е както следва: слезка > тестиси > бял дроб > бъбреци > мозък > черен

дроб > сърце (табл. 33). Нашите резултати показаха, че експозицията на Pb променя разпределението на Zn и то е както следва: слезка > тестиси > бъбреци > бял дроб > черен дроб > сърце > мозък. Пониженото съдържание на Zn в мозъка може да се дължи на намалена невронна функция, което е условие за развитие на болестта на Алцхаймер. Приложението на DMSA като хелатен агент при отравяне с олово не възстановява разпределението на Zn и то е както следва: тестиси > слезка > бял дроб > бъбреци > сърце > черен дроб > мозък. Разпределението на Zn в органите на животните, третирани с тетраетиламониевата сол на монензин киселина и тетраетиламониевата сол на салиномицин киселина е подобно: слезка ~ тестиси ~ черен дроб ~ бял дроб ~ бъбреци ~ сърце ~ мозък. Двата йонофорни антибиотика не възстановяват съдържанието на Zn в белия дроб на животните – ендогенните нива на Zn са значително по-ниски спрямо контролната група (фиг.19).



**Фигура 19. Влияние на DMSA, монензин и салиномицин върху съдържанието на цинк в органи на половозрепи мъжки мишки, подложени на подостро отравяне с Pb(II) нитрат.**

Легенда: Ctrl – нетретирани контролна група. Pb – токсична контролна група. Pb+DMSA – Pb-интоксикирани експериментални животни, третирани с DMSA. Pb+Mon – Pb-интоксикирани експериментални животни, третирани с монензин. Pb+Sal – Pb-интоксикирани експериментални животни, третирани със салиномицин.

\* – показва статистически значима разлика между средните стойности на нетретираната контролна група и токсичната контролна група ( $p < 0,05$ ).

▲ – показва статистически значима разлика между средните стойности на токсичната контролна група и третираната с DMSA, с монензин или със салиномицин ( $p < 0,05$ ).

● – показва статистически значима разлика между средните стойности на нетретираната контролна група и група, третирана с DMSA, с монензин или със салиномицин ( $p < 0,05$ ).

Одобреният от FDA хелатен агент - DMSA, прилаган в клиничната практика, несъмнено има по-добър ефект от тетраетиламониевата сол на монензин киселина при извличането на Pb от бъбреците. Особено важно при хелатотерапия е да не се нарушава хомеостазата на есенциалните метали. DMSA не само променя хомеостазата на някои есенциални метали, но и ги преразпределя. За разлика от мезо-2,3-димеркаптосукциниловата киселина, тетраетиламониевата сол на монензин киселина и тетраетиламониевата сол на салиномицин киселина в много по-малка степен оказват неблагоприятно влияние върху съдържанието на Ca, Cu, Fe и Zn в органите на животните. **Това ни дава основание да предположим, че тетраетиламониевата сол на монензин киселина и тетраетиламониевата сол на салиномицин киселина може да са потенциални хелати агенти, които да намерят приложение при отравяне с олово.**



## IV. Изводи

**В обобщение на представените резултати могат да бъдат направени следните изводи:**

1. Експозицията на Cd(II) ацетат предизвиква понижаване на някои хематологични показатели (броя на червените кръвни клетки, концентрацията на хемоглобина и стойността на хематокрита). DMSA, тетраетиламониевата сол на монензин киселина и тетраетиламониевата сол на салиномицин киселина възстановяват нормалните стойности на тези показатели.
2. Интоксикацията с кадмий предизвиква понижаване на концентрациите на албумина и желязото, повишаване на концентрациите на кръвната захар и креатинина и повишаване на активността на AST, ALT, GGT, ALP и  $\alpha$ -амилазата в кръвния серум. Грите хелатни агента възстановяват нивата на изследваните биомаркери в различна степен, като най-добро поведение има тетраетиламониевата сол на салиномицин киселина.
3. Концентрацията на Cd в кръвта на експерименталните животни се повишава след експозицията. Тетраетиламониевата сол на салиномицин киселина понижава концентрацията на Cd в кръвта на животните в най-голяма степен.
4. 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 и тетраетиламониевата сол на салиномицин киселина понижават съдържанието на токсичния метален йон, без да го преразпределят. DMSA повишава съдържанието на Cd в мозъка на експерименталните животни, което го прави неподходящ при интоксикации с кадмий.
5. Cd 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). Това потвърждава литературните данни, че повлияването на хомеостазата на биометалните йони е един от възможните механизми за възникване на Cd-индуцирана токсичност в тези органи. Полиетерните йонофорни антибиотици възстановяват в по-голяма степен Cd-индуцираните изменения в хомеостазата на есенциалните метали от DMSA.

6. Експозицията на 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  $\alpha$ -амилазата в кръвния серум на животните. Трите хелатни агента инхибират в еднаква степен Pb-индуцираните нарушения в биохимичните показатели.
7. Експозицията на Pb(II) нитрат предизвиква увеличаване на концентрацията на олово в кръвта на експерименталните животни спрямо нетретираната контролна група.
8. 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.
9. Оловото повлиява хомеостазата на биометалните йони (Ca – в слезка, бял дроб и бъбреци, Cu – слезка, черен дроб, сърце и тестиси, Fe – в слезка, черен дроб и сърце, Zn – в бял дроб и мозък). Това потвърждава литературните данни, че повлияването на хомеостазата на биометалните йони е един от възможните механизми за възникване на токсичните ефекти на оловото. Двата полиетерни йонофорни антибиотика инхибират в по-голяма степен Pb-индуцираните изменения в хомеостазата на биометалните йони от DMSA.

## V. Приноси

**От представените резултати могат да бъдат обобщени следните приноси:**

1. Направена е детайлна оценка на влиянието на два токсични метални йона Cd(II) и Pb (II) върху биоразпределението на важни есенциални йони в експериментални животни. Представените резултати могат да се използват в бъдещи проучвания, целящи изясняването на ролята на йоните на Ca, Cu, Fe и Zn при отравяния с кадмий и олово.
2. За първи път се доказва, че приложението на DMSA при Cd-интоксикирани животни повишава съдържанието на кадмий в мозъка спрямо нетретираната контролна група. Това показва, че DMSA не е подходящ антидот при отравяния с кадмий.
3. За първи път се доказва, че салиномицинът (под формата на тетраетиламониева сол на салиномицин киселина) е подходящ потенциален антидот при интоксикации с кадмий.
4. Представените резултати значително обогатяват наличните данни за потенциалното приложение на монензин като антидот при интоксикации с кадмий и олово. Направено е и детайлно изследване на потенциалното приложение на салиномицин като антидот при подостро отравяне с олово. Доказано беше, че двата полиетерни йонофора проявяват по-добър антидотен ефект в сравнение с DMSA.
5. Представена е детайлна сравнителна оценка на тестваните хелатни агенти върху биоразпределението на металните йони Ca(II), Cu(II), Fe(II) и Zn(II) в органите на животните, интоксикирани с Cd(II) и Pb(II). Получените данни позволяват да се определят потенциалните рискове от хелатотерапията с тези агенти.
6. Представените данни са с потенциално практическо значение предвид факта, че DMSA е одобрен антидот при отравяне с олово. Получените резултати обогатяват наличната информация за биологичните свойства на монензин и салиномицин. Следва да се отбележи, че в момента природният полиетерен йонофорен антибиотик салиномицин се разработва от американска фармацевтична компания като антитуморен агент срещу стволови ракови клетки с потенциално приложение в хуманната медицина.

## Публикации, свързани с дисертационния труд

1. Gluhcheva, Y., **Kamenova, K.**, Dorkov, P., Lobanova, Y, Skalnaya, M., Ivanova, J. Comparative effects of meso-2,3-dimercaptosuccinic acid, monensin and salinomycin on the concentrations of cadmium and some essential elements in skeletal muscles of Cd-exposed mice. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 2018, doi: 10.1016/j.jtemb.2018.04.015, **article in press, IF=3.225**
2. **Kamenova, K.**, Gluhcheva, Y., Vladov, I., Stoykova, S., Ivanova, J., Ameliorative effect of the anticancer agent salinomycin on cadmium-induced hepatotoxicity and renal dysfunction in mice, *Environ Sci Pollut Res* 25, 2018, 3616. **IF=2.741**  
**Цитирана от:** Maksymchuk N. O., Konovchuk V. M. Features of sorbilact-L-arginine-combined action on the kidneys' volumoregulatory function of patients with purulent-septic complications. *Journal of Education, Health and Sport*. 2018; 8(1):215-220. eISSN 2391-8306.
3. Ivanova, J., Petrova, E., **Kamenova, K.**, Gluhcheva, Y., Comparative effects of meso-2,3-dimercaptosuccinic acid, monensin, and salinomycin on cadmium-induced brain dysfunction in cadmium-intoxicated mice. *Interdisciplinary Toxicology*, 10(3), (2017). pp. 107-113. doi:10.1515/intox-2017-0017. **SNIP (2016)=0.901, SJR(2016)=0.378.**

## Участия в национални и международни форуми, свързани с дисертационния труд

1. **Kalina Kamenova**, Yordanka Gluhcheva, Donika Dimova, Juliana Ivanova, „A study on the effects of Pb, meso-2,3-dimercaptosuccinic acid (DMSA) and salinomycin on the spleen of Pb-intoxicated mice“, Национална конференция по фармацевтични и химични науки, 19-20 април 2018 г., София, България, Факултет по химия и фармация.
2. **Kalina Kamenova**, Yordanka Gluhcheva, Juliana Ivanova, „A study on the effect of lead on the biodistribution of calcium, copper, iron, lead and zinc in Pb-intoxicated mice“, 9th Edition of International Conference on Analytical Chemistry, March 26-28, 2018, Vienna, Austria.
3. Pavlova E, Ivanova J, Dimova D, Gluhcheva Y, Petrova E, **Kamenova K**, Atanassova N, “Ameliorative effect of salinomycin on some quantitative parameters of spermatogenesis in cadmium-intoxicated mice”, XXIII CONGRESS OF THE BULGARIAN ANATOMICAL SOCIETY, Varna, Bulgaria, 5-7 October 2017
4. **Kalina Kamenova**, Yordanka Gluhcheva, Ekaterina Pavlova, Juliana Ivanova, „Preliminary results on acute toxicity of tetraethylammonium salt of salinomycin acid“, EuroTox 2017, 53rd Congress of the European Societies of Toxicology, September 10-13, 2017, Bratislava, Slovakia.
5. **Kalina Kamenova**, Yordanka Gluhcheva, Juliana Ivanova, “Effects of salinomycin, monensin and DMSA on Pb-induced renal dysfunction”, Seventh International Conference “Modern Trends in Science” FMNS-2017, 14-18.06.2017, Blagoevgrad, Bulgaria.

6. Yordanka Gluhcheva, Emilia Petrova, Ivelin Vladov, Ekaterina Pavlova, **Kalina Kamenova**, Juliana Ivanova, “Salinomycin ameliorates hematological parameters after cadmium-induced intoxication” VIII работна среща „Експериментални модели и методи в биомедицинските проучвания“ 14-16 юни 2017 г. ИЕМПАМ-БАН.
7. **К. Каменова**, Й. Глухчева, Ю. Иванова, „Изследване на влиянието на DMSA и салиномицин върху биоразпределението на олово и някои есенциални метални йони в мишки, подложени на подостро отравяне с олово“, XVI Национална конференция по химия за студенти и докторанти, 17-19 май 2017 г., София.
8. **К. Каменова**, Й. Глухчева, Ю. Иванова „Сравнително изследване на влиянието на ДМСА, монензин и салиномицин върху оловно-индуцирани изменения в някои биохимични показатели в серум на мишки, подложени на субостра интоксикация с олово“, Научна сесия на Факултет по Химия и Фармация при СУ „Св. Кл. Охридски“, 24 ноември 2016.
9. **Kalina Kamenova**, Y. Gluhcheva, S. Arpadjan, Ju. Ivanova, “A comparative study on the effects of salinomycin, monensin and DMSA on the biodistribution of cadmium, calcium, copper, iron and zinc in Cd-intoxicated mice”, 9th National Conference on Chemistry Science and Technology for Better Life, 29 September – 1 October 2016, Sofia, Bulgaria.
10. Juliana Ivanova, Emilia Petrova, **Kalina Kamenova**, Yordanka Gluhcheva, “Effects of salinomycin, monensin and DMSA on Cd-induced neurodegenerative disorders”, 13th European Biological Inorganic Chemistry Conference, 28 August – 1 September, 2016, Budapest, Hungary.
11. Yordanka Gluhcheva, Juliana Ivanova, Ivelin Vladov, **Kalina Kamenova**, “Subacute cadmium intoxication and subsequent detoxification with chelating agents /a hematological study” IVth International Conference on Radiation and Application in Various Fields of Research, May 23-27, 2016, Niš, Serbia.
12. **К. Каменова**, Й. Глухчева, С. Стойкова, В. Атанасов, Ю. Иванова, “Сравнителна оценка на влиянието на салиномицин, монензин и DMSA върху кадмий-индуцирана нефро- и хепатотоксичност“, XV национална конференция по химия за студенти и докторанти – 18-20 май 2016 г., София.
13. **Калина Каменова**, Й. Глухчева, С. Арпаджян, Ю. Иванова, „Атомно абсорбционна спектрометрия – метод за оценка на Cd-индуцирана токсичност“ VII работна среща „Експериментални модели и методи в биомедицинските проучвания“ 18-20 май 2016 г. ИЕМПАМ-БАН.
14. Juliana Ivanova, Yordanka Gluhcheva, **Kalina Kamenova**, Silviya Stoykova, Vasil Atanasov, Ivelin Vladov, Donika Dimova, „Comparative assessment of the potential application of the polyether ionohorous antibiotics monensin and salinomycin as antidotes for cadmium poisoning“, Antwerp, Belgium, September 14-16, 2015.

## Участия в проекти, свързани с дисертационния труд

1. “Сравнително изследване на потенциалното приложение на нови хелатни агенти като антидоти при интоксикации с олово“, договор №80-10-168/25.04.2018 г., НИС-СУ „Св. Климент Охридски“, ръководител: доц. д-р Юлияна Иванова-Тумбева (МФ, СУ).
2. „Изграждане и развитие на млади висококвалифицирани изследователи и преподаватели за иновативни интердисциплинарни изследвания от полза за биомедицината“, договор BG05M2OP001-2.009-0019-C01/02.06.2017 г., финансиран от Оперативна програма „Наука и образование за интелигентен растеж“ 2014-2020.
3. „Изследване на острата и подострата токсичност на тетраетиламониевата сол на салиномицин киселина“, договор №80.10-102/2017 г. НИС-СУ „Св. Климент Охридски“, ръководител: доц. д-р Юлияна Иванова-Тумбева (МФ, СУ) – **отличен за най-успешно проведен проект в Медицински факултет, СУ „Св. Климент Охридски“.**
4. „Сравнително разглеждане на потенциалното приложение на салиномицин, монензин и DMSA като антидоти при интоксикации с кадмий“, договор №5/2016, НИС-СУ „Св. Климент Охридски“, ръководител: доц. д-р Юлияна Иванова-Тумбева (МФ, СУ).
5. „Изследване на потенциалното приложение на салиномицин като антидот при субостро отравяне с кадмий“, договор №64/2015, НИС-СУ „Св. Климент Охридски“, ръководител: доц. д-р Юлияна Иванова-Тумбева (МФ, СУ).

**Бих искала да изкажа моите сърдечни благодарности:**

На моята научна ръководителка доц. д-р Юлиана Иванова-Тумбева за всеотдайността, отделеното време, внимание, усилия, подпомагайки работата и израстването ми в тематиката на дисертационния труд, в частност.

На колегите от Факултета по химия и фармация и на колегите от Института по експериментална морфология, патология и антропология с музей при БАН за съпричастността.

На семейството ми и приятелите ми, за търпението, разбирането и подкрепата през изминалите години.