Българска Академия на Науките

Институт по Органична Химия с Център по Фитохимия

Адриана Каменова Славова-Казакова

КИНЕТИКА И МЕХАНИЗЪМ НА ЛИПИДНОТО ОКИСЛЕНИЕ В ПРИСЪСТВИЕ НА МОНО- И БИФЕНИЛНИ АНТИОКСИДАНТИ– САМОСТОЯТЕЛНО И В СМЕСИ

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

на дисертация за присъждане на образователна и научна степен „Доктор"

По научната специалност с шифър 01.05.10: „Биоорганична химия, химия на природните и физиологично активни вещества"

Научен ръководител: доц. д-р Весела Кънчева

Официални рецензенти: проф. дхн Веселина Гаджева
доц. д-р Даниела Бътовска

София, 2015

Експерименталните и теоретични изследвания по настоящия дисертационен труд са проведени в Институт по органична химия с Цнтър по фитохимич (ИОХ ЦФ) при БАН

Част от есперименталните изследвания са проведени в:

Институт по биофизична химия при Руска Академия на науките (РАН)

Институт по животинска репродуктивност и изследване на храни при Полска Академия на науките (ПАН)

Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита от Колоквиума „Химия на природните вещества” при– БАН на заседание, състояло се на 09.12.2014г.

Дисертационният труд съдържа 206 печатни страници, 20 таблици, 41 фигури, 13 схеми и 2 приложения. Цитирани са 209 литературни източника.

Зашитата на дисертационния труд ще се състои на 14.05.2015г. от 14.00 ч. в зала „Акад. Богдан Куртев” на ИОХ ЦФ – БАН, ул. „Акад. Г.Бончев”, бл. 9

Материалите по защитата се намират на разположение на интересуващите се в канцеларията на ИОХ ЦФ – БАН, ул. „Акад. Г.Бончев”, бл. 9

Бих искала да изкажа благодарност на научния си ръководител доц. д-р Весела Кънчева за съдействието и помощта при разработването и подготовката на настоящия дисертационен труд.

Бих желала също да изкажа благодарността си на :

- гл. ас. д-р С. Ангелова за провеждането на теоретичните изследвания и за помощта и при дискутиране на проблемите, отразени в дисертационния труд и във всички съвместни публикации, в които са публикувани резултати от дисертационния труд.
- проф. дхн В. Енчев за помощта в теоретичните изследвания, публикувани в списание BIOCHIMIE 94 2012.
- доц. д-р П. Денев и доц. д-р М. Крачанова за предоставената ми възможност за използване на лабораторната база в лаборатория „Биологично-активни вещества”- Пловдив (ИОХ ЦФ - БАН), както и на проф. Л. Антонов от лаборатория „Органичен синтез и стереохимия” (ИОХ ЦФ - БАН) и по-специално – на доц. д-р П. Денев за съдействието му при извършване на част от експерименталните изследвания.

Квантовохимичните изчисления са направени, благодарение на изчислителен комплекс за авангардни изследвания по молекулен дизайн ПРОЕКТ „МАДАРА”.

Част от експерименталната работа е осъществена с подкрепата на Договор №BG051PO001-3.3.06-0025, финансиран от Европейския социален фонд и Оперативна програма Развитие на човешките ресурси (2007–2013) и съфинансирана от Министерството на образованието и науката в Република България.

ВЪВЕДЕНИЕ

Оксидантният стрес, който е нарушен баланс между антиоксидантните защитни системи на организма и агресивните кислородсъдържащи радикалови частици, води до увреждане на живата клетка. Първата „мишена” на атаката на свободните радикали са липидните молекули от клетъчната мембрана.

Липидното окисление се асоциира с патогенезата на голям брой трудно лечими заболявания. За лечението на повечето от тях паралелно с прилагането на традиционни терапевтични средства с целенасочено действие се използват и антиоксиданти. Създаването на нови биологично активни съединения с антиоксидантен потенциал, т.е. на нови био-антиоксиданти е с доказана ефикасност при лечение на онкологични, невродегенеративни, сърдечносъдови и други заболявания. Установено е, че на ранен стадий на атеросклероза и онкологични заболявания е достатъчна монотерапия, включваща само антиоксиданти във високи дози (*Бурлакова, 2007*). В напреднал етап се прилага комбинирана терапия (с лекарствен препарат и антиоксидант). Важно е да се отбележи, че във всички случаи, независимо от вида на заболяването в болния организъм е на лице високо ниво на липидна пероксидация. Ето защо в търсенето на нови, алтернативни терапевтични решения е важно и търсенето и предлагането на високоефективни инхибитори на липидното окисление- с цел да бъде възстановен доколкото е възможно нарушения баланс между антиоксидантните защитни системи на организма и продуцираните свободни радикали.

Усилено се работи в предлагането на синтетични аналози на природни био-антиоксиданти. Като се има предвид, че природните антиоксиданти не са априори безвредни и могат да бъдат токсични, предлагането на нови съединения, които освен минимална токсичност притежават биологична активност е от особено значение за практическото им приложение. Природните био-антиоксиданти служат като основа за синтеза, както на нови лекарствени препарати, така също и на хранителни добавки.

В настоящия дисертационен труд са подбрани за изследване фенолни антиоксиданти – представители на три различни групи органични съединения:

- Четири лигнана (2 бензо[kl]ксантенови лигнана и 2 дихидробензофуранови неолигнана) - синтетични аналози получени чрез биомиметичен синтез, за два от които се знае, че притежават антитуморна (Apers et al., 2004; Van Miert et al., 2005; Prasad et al., 2005; Micco et al., 2010) и антиангиогенна активност

(Basini et al., 2010). Те са предоставени за изследване от групата на проф. Mario Foti - Институт по Биомолекулярна химия - Катания, Италия;

- Четири хидроксилирани бифенилни съединения (димери), синтетични аналози на куркумина и съответните им мономери (4+1) – някои от които са негови разпадни продукти. За два от димерите е доказано, че имат инхибиращо действие спрямо α-синуклеин (Marchiani et al, 2013) – основен протеин, играещ ключова роля в невродегенеративните процеси. Тези съединения са предоставени за изследване от групата на проф. Giovanna Delogu - Институт по Биомолекулярна химия- Сардиния, Италия;
- Единайсет хидроксикумарина, които са синтетични аналози на природни хидроксикумарини, притежаващи широк спектър от биологични свойства (антитуморни, противовъзпалителни, хипохолестеролемични и др.) и са синтезирани и предоставени за изследване от групата на проф. Viringer Parmar- Университета в Делхи, Индия.

Подбраните съединения е важно да бъдат изследвани не само като индивидуални компоненти в определен концентрационен диапазон, но и в антиоксидантни композиции (смеси) от два и три компонента. Целта е да се повиши антиоксидантния потенциал на смесите, в следствие на синергизъм между отделните компоненти. От съществено значение е биологично активните съединения, които проявяват от слаба до умерена антиоксидантна активност, да бъдат изследвани в композиции с по-силни антиоксиданти. Необходимо е да се установи и в кои случаи смесването на отделните компоненти не води до синергизъм, а до обратния ефект – антагонизъм.

ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ

Цели:

1) Да се изяснят особеностите в кинетиката на взаимодействието между нови синтетични аналози на природни антиоксиданти и моделни свободни радикали (антирадикалова активност), както и на инхибираното липидно окисление (антиоксидантна активност) и да се предложат вероятни механизми на тяхното действие.
2) Да се изследва зависимостта ”структура-антирадикалова и антиоксидантна активност”, на подбрани съединения, чрез комбиниране на експериментално получената и теоретично предсказаната активност. Да се предложат нови ефективни био-антиоксиданти – индивидуални съединения и в композиции за осигуряване на висока окислителна стабилност на липидите с потенциал да бъдат прилагани като лекарствени средства и като хранителни добавки.

Задачи:

- Определяне на антирадикаловата способност на новосинтезирани фенолни съединения с биологична активност и цялостно проследяване кинетиката на взаимодействието им с моделен радикал ($DPPH^{\bullet}$).
- Изследване на способността на фенолните съединения да инхибират процеса на липидното автоокисление, т.е. на антиоксидантната им ефективност и способността им да съкращават дължината на окислителната верига – степента им на инхибиране;
- Определяне на абсолютните стойности на скоростните константи на ключовата реакция на взаимодействие между антиоксидантите и моделни пероксидни радикали с прилагане на високочувствителен хемилуминисцентен метод (ХЛ).
- Прилагане на квантово-химични изчисления за определяне на теоретичните дескриптори, които да обяснят някои от получените експериментални резултати.
- Създаване на нови еквимоларни двойни и тройни смеси, т.нар. антиоксидантни композиции от изследваните съединения с α-токоферол (**TOH**) и/или аскорбил-палмитат (**AscPH**), с цел – комбиниране на биологична и антиоксидантна активност.
- Изучаване на ефектите (синергизъм, адитивизъм и антагонизъм) на еквимоларните двойни и тройни смеси на съединенията с DL α-токоферол и

аскорбилпалмитат, за постигане на максимален инхибиращ ефект в условия на липидно автоокисление.

- Сравнителен кинетичен анализ на всички получени експериментални резултати и избор на подходящи високоефективни антиоксиданти – индивидуални и в композиции за оптимално стабилизиране на липидното автоокисление.
- Прилагане на ORAC метод за изследване на способността на подбрани съединения да проявяват антиоксидантна активност във водна среда.
- Изследване на хелатиращата способност на избрани фенолни съединения, притежаващи определени структурни фрагменти, отговорни за образуването на комплекси с метали от преходна валентност.

<u>Неинхибирано окисление</u>

Зараждане на веригата

*(**0**) $2LH + O_2$ (Y) ì $2L^{\bullet} + H_2O_2$* — ***R_{IN}*** *(скорост на иницииране)*

Продължениие на веригата

*(**1**) $L^{\bullet} + O_2$ ì $LO_2^{\bullet}$* — ***k_1*** *(до пероксидни радикали)*

*(**2**) $LO_2^{\bullet} + LH$ ì $LOOH + L^{\bullet}$* — ***k_2*** *(ключова реакция)*

Разклонение на веригата

*(**3**) $LOOH$ ì $LO^{\bullet} + HO^{\bullet}$* — ***$k_3$*** *(мономолекулно)*

*(**3'**) $LOOH + LH$ ì $LO^{\bullet} + H_2O + L^{\bullet}$* — ***$k_3$'*** *(псевдо-мономолекулно)*

*(**3"**) $2LOOH$ ì $LO_2^{\bullet} + H_2O + LO^{\bullet}$* — ***$k_3$''*** *(бимолекулно)*

Прекъсване на веригата

*(**4**) $L^{\bullet} + L^{\bullet}$ ì $L - L$* — ***k_4*** *(димеризация)*

*(**5**) $L^{\bullet} + LO_2^{\bullet}$ ì $L\text{-}O\text{-}O\text{-}L$* — ***$k_5$*** *(кръстосано)*

*(**6**) $LO_2^{\bullet} + LO_2^{\bullet}$ ì продукти* — ***k_6*** *(ключова реакция)*

<u>Инхибирано окисление</u> - в присъствие на антиоксидант (АН)

Реакции, които водят до инхибиране на окислителния процес:

(***7***) $LO_2^{\bullet} + AOH \rightarrow LOOH + AO^{\bullet}$ — ***k_7*** (*ключова реакция*)

(***8***) $LO_2^{\bullet} + AO^{\bullet} \rightarrow AOOL$ — ***k_8*** (*хинолидни пероксиди*)

(***9***) $2AO^{\bullet} \rightarrow D_{AO}$ — ***k_9*** (*рекомбинация до димер*)

(***9a***) $2AO^{\bullet} \rightarrow AOH + A_{(-H)}$ — ***k_{9a}*** (*диспропорциониране с регенериране на АОН*)

Реакции, които водят до намаление на инхибиращата способност:

(***-7***) $LOOH + AO^{\bullet} \rightarrow LO_2^{\bullet} + AOH$ — ***k_{-7}*** (*обратна на 7ма реакция*)

(***10***) $AO^{\bullet} + LH\ (+O_2) \rightarrow AOH + LO_2^{\bullet}$ — ***k_{10}*** (*генериране на радикали*)

(***11***) $AOH + LOOH \rightarrow AO^{\bullet} + LO^{\bullet} + H_2O$ — ***k_{11}*** (*разпадане на пероксидите*)

(***12***) $AOH + O_2 \rightarrow AO^{\bullet} + HO_2^{\bullet}$ — ***k_{12}*** (*окисление на антиоксиданта*)

(***13***) $AOOL \rightarrow AO^{\bullet} + LO^{\bullet}$ — ***k_{13}*** (*разпадане на хинолидни пероксиди)*

(***14***) $AO^{\bullet} + O_2 \rightarrow P_{AO}$ — ***k_{14}*** (*окисление на феноксилния радикал)*

Схема 1. Основна кинетична схема на липидното автоокисление.

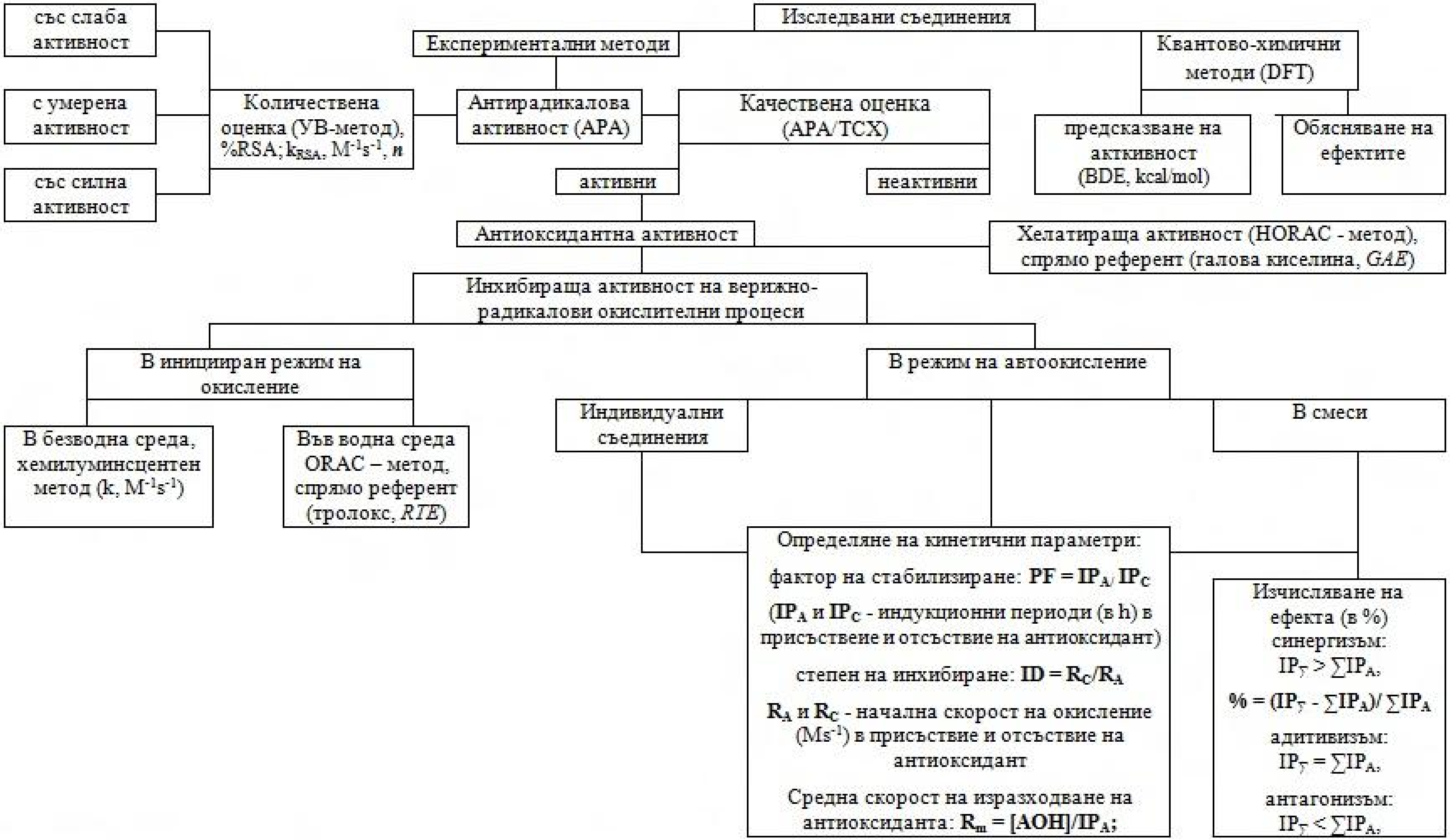
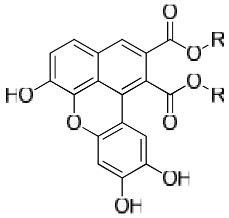


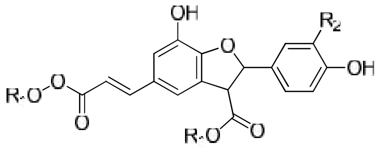
Схема7. Комплексен подход при избора на методи за изследване на антирадикаловата и антиоксидантна активност

РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ

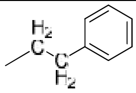
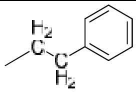
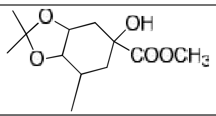
1. **Бензо[*kl*]ксантенови лигнани (1** и **2) и дихидробензофуранови неолигнани** (**3** и **4**).



1-2



3-4

Съкр.	R	Съкр.	R_1	R_2
1		**3**		-OH
2		**4**	$-CH_3$	$-OCH_3$

Фигура 15. Структури на изследваните съединения **1-4**, бензо[*kl*]ксантенови лигнани (**1** и **2**) и дихидробензофуранови неолигнани (**3** и **4**).

1.1 Антирадикалова активност спрямо моделен радикал (DPPH$^\bullet$).

Проследена е т.нар. "тотална" кинетика за интервал от време 20 min, обхващащ целия процес на взаимодействие на изследваните лигнани **1-4** с DPPH$^\bullet$. На Фиг.17 (А-Г) са представени кинетичните криви на намаляване на абсорбцията и нарастване на процента на антирадикалова активност, в присъствие на изследваните лигнани, изчислена съгласно уравнението: $\% RSA = [Abs_{(0)} – Abs_{(t)} / Abs_{(0)}] \times 100\%$

Ефект на концентрацията. Най-силно изразена промяна (нарастване) на антирадикаловата активност (% RSA) с увеличаване на концентрацията се наблюдава при съединения **2** и **3**. Бензоксантеновият лигнан **2** показа 2-кратно нарастване на стехиометричния фактор $\boldsymbol{n_{tot}}$ за целия реакционен интервал (20 min) както и най-голямо увеличение на скоростната константа $\boldsymbol{k_{RSA}}$ с DPPH$^\bullet$ (4-кратна) с промяна в концентрацията.

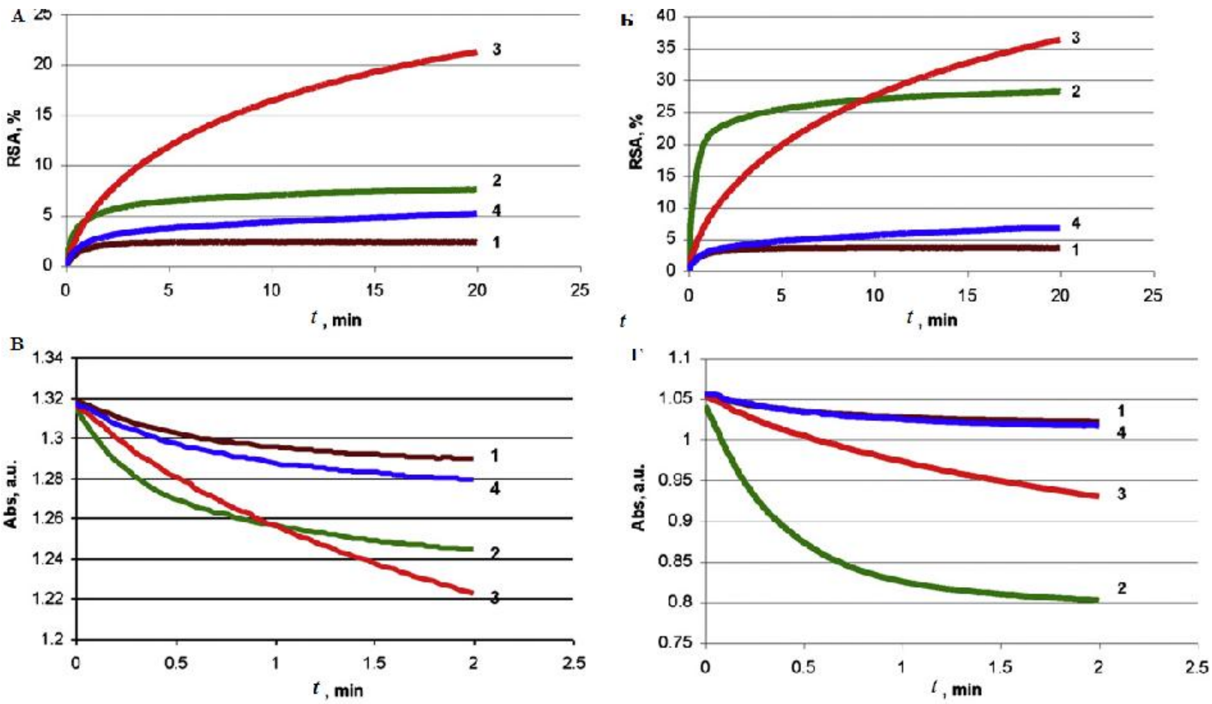
$\boldsymbol{n_{tot}}$ при [AOH]/[DPPH$^\bullet$] = 0.25: **3** (0.9) >> **2** (0.3) > **4** (0.2) >**1** (0.1)

$\boldsymbol{n_{tot}}$ при [AOH]/[DPPH$^\bullet$] = 0.40: **3** (0.8) > **2** (0.6) >> **4** (0.2) >**1** (0.1)

$\boldsymbol{k_{RSA}}$ **($M^{-1}s^{-1}$)** при [AOH]/[DPPH$^\bullet$] = 0.25: **2** (53) > **3** (32) > **4** (18) > **1** (13)

$\boldsymbol{k_{RSA}}$ **($M^{-1}s^{-1}$)** при [AOH]/[DPPH$^\bullet$] = 0.40: **2** (207) >> **3** (50) > **1** (23) ≥ **4** (22)

При двете изследвани съотношения [AOH]/[DPPH$^\bullet$] (0.25 и 0.40 mol/mol) бензоксантеновият лигнан **2** проявява многократно (от 4 до 8 пъти) по висока активност, според получените резултати за скоростната константа $\boldsymbol{k_{RSA}}$**,** от своя аналог - лигнан **1**. Този резултат е неочакван, защото единствената разлика в структурите между тези две съединения са естерно свързаните заместители R (Фиг. 15). Последните не са свързани директно в нито един от двата фенолни пръстена и не би следвало да имат пряко влияние върху антирадикаловата активност. Стеричната екранираност на фенолните групи в катехоловата част на лигнани **1** и **2** от страна на различните заместители е различна. Блокиращият ефект на разтворителя е по-силен при по-слабо екранираните фенолни групи и по-този начин достъпът до тях от страна на свободния радикал (DPPH•) е по-затруднен. За отчитане на стеричния фактор са направени квантово-химични изследвания на възможните ротамери на лигнани **1** и **2**, както и на техните феноксилни радикали, представени в т. 1.3.



Фигура 17 Кинетика на намаляване на абсорбцията на DPPH•, получена с прилагане на УВ-спектрофотометричен метод при λ = 517 nm и t = 37 °C, при две различни съотношения – [AOH]/[DPPH•] = 0.25 mol/mol, като % RSA и абсорбция (**А** и **В**) и аналогично при [AOH]/[DPPH•] = 0.40 mol/mol (**Б** и **Г**).

Ефект на реакционното време. От фиг. 17(Б) се вижда, че за реакционно време 2 min (т.нар. „бърза кинетика”) най-висока активност от всички лигнани проявява бензо[*kl*]ксантеновия лигнан **2**, като за време 10 min лигнаните **2** и **3** проявяват еднаква активност, докато за целия реакционен интервал 20 min (т.е. „тотална кинетика”) – най-активен е неолигнан **3**.

Получен е нов ред на намаляване на стойностите, определени от отношението между стехиометричните коефициенти за реакцията между DPPH• и изследваните лигнани за максималния реакционен интервал (20 min) $\boldsymbol{n_{tot}}$ и този - определен в началото на процеса (n_f): n_{tot}/n_f : **3** (20) >> **4** (7.9) > **1** (4.2) > **2** (3.5), който показва, че стехиометричният коефициент се променя от бързата към тоталната кинетика в най-голяма степен за неолигнан **3** (20 пъти). Наблюдаваният ефект може да се обясни с по-слабата стерична екранираност на неолигнаните в сравнение с ксантеновите лигнани, поради което са възможни допълнителни реакции с участието на междинните съединения със свободни фенолни групи, получени в хода на процеса. При неолигнан **4**, което е монофенол, е получено n_{tot}/n_f = 7.9 и следователно проявената по-ниска активност е напълно обяснима и увеличаването на реакционното време в този случай е от съществено значение.

На база получените резултати за k_{RSA}, за % RSA и стехиометричния фактор n_{tot}, може да се предложат различни реакционни механизми на изследваните лигнани със $DPPH^•$:

В присъствие на монофенолно съединение 4:

$AOH + DPPH^• \rightarrow DPPH\text{-}H + AO^•$

$AO^• + DPPH^• \rightarrow$ неактивен продукт

$2AO^• \rightarrow$ неактивен продукт

В присъствие на катехоли (съединение 3):

$Q(OH)_2 + DPPH^• \rightarrow DPPH\text{-}H + Q(OH)O^•$

$Q(OH)O^• + DPPH^• \rightarrow Q(OH)O\text{-}DPPH$

$2Q(OH)O• \rightarrow [Q(OH)O]_2$

$Q(OH)O\text{-}DPPH + DPPH^• \rightarrow Q(O^•)O\text{-}DPPH + DPPH\text{-}H$

$[Q(OH)O]_2 + DPPH^• \rightarrow Q(OH)\text{-}QO^• + DPPH\text{-}H$

Получените резултати за антирадикалова активност дават основание да се продължат изследванията с изучаване на антиоксидантната активност на двете двойки лигнани и неолигнани, т.е. способността им да инхибират процеса на липидното автоокисление. Наличието на антирадикалова активност е необходимо, но не и достатъчно условие за наличие на антиоксидантна активност.

1.2 Изследване на инхибиращата способност на двете двойки лигнани и неолигнани в условия на липидно автоокисление - самостоятелно и в двойни смеси.

Използва се ускорен метод на липидно окисление и се следи кинетиката на натрупване на първичните продукти на липидното автоокисление - липидните хидропероксиди. За целта се използват кинетично чисти липидни субстрати, освободени от про- и антиоксидантно действащи компоненти. От кинетичните криви на натрупване на липидните хидропероксиди са определени основните кинетични параметри, характеризиращи липидния автоокислителен процес на ТГСМ при 80°C в присъствие на 0.1 и 1.0 mM от изследваните лигнани **1-4**, изразени като:

антиоксидантна ефективност (PF), антиоксидантна реактивоспособност (ID) и антиоксидантен капацитет (R_m), които са представени в табл. 6.

Направен е сравнителен кинетичен анализ със стандартни антиоксиданти, един от които е кафеената киселина (**CA),** поради факта, че съединения **1-4** са получени от нейни фенетилови и/или метилови естери. Феруловата киселина (**FA**) е избрана, поради структурни сходства с неолигнан **4**, а DL-α-токоферолът (**TOH**) – тъй като с него са приготвени еквимоларни двойни смеси с изследваните съединения.

Бензоксантеновият лигнан **2** показва най-висока активност и в двете изследвани концентрации, като в ниската концентрация (0.1 mM) неговата антиоксидантна ефективност (**PF**) е близка до тази на **TOH** и по-висока от тази на **CA**. Установено е, че лигнан **2** съкращава в доста по-висока степен дължината на окислителната верига (от данните за **ID**) в сравнение със **TOH** и **CA**. Степента на инхибиране в присъствие на този лигнан (в 0.1 mM) е 2-кратно по-висока от тази на **TOH**, 4-кратно по-висока от **CA**, 5.5- и 14-кратно по-висока от тази на лигнани **1** и **4**, съответно.

10-кратното увеличение на концентрацията на лигнан **2** (до 1.0 mM) води до 10-кратно увеличение на антиоксидантната му ефективност. За лигнан **1** нарастването в ефективността е 7-кратно, а за **TOH** и **CA** то е съответно 2- и 4- кратно. Във високата концентрация (1.0 mM) е показано, че **TOH** е по-слабо ефективен от лигнан **1**.

Нарастването в степента на инхибиране (**ID**) с повишаване на концентрацията (до 1.0 mM) е по-силно изразено при лигнан **1** и неолигнан **3** (5- и съответно 6-кратно), в сравнение с **2** (2-кратно). Независимо от това, присъствието на лигнан **2** води до най-ефективно съкращаване на дължината на окислителната верига на липидния субстрат (ТГСМ). Този резултат се дължи на високата стерична екранираност на образувания семихинонов радикал от лигнан **2**, което води до по-нисък дял на страничните реакции, отговорни за понижението на степента на инхибиране. Интересно е да се отбележи, че бензоксантеновият лигнан **2** показва най-висока антиоксидантна ефективност в концентрация 1.0 mM в сравнение с всички изследвани до сега фенолни антиоксиданти в същия кинетичен модел в лаборатория „Химия на Липидите”.

В заключение може да се допълни, че за изследваните лигнани **1** и **2**, както и за неолигнан **3** се препоръчва да се прилагат при по-високата концентрация (1.0 mM), тъй като това води до значително нарастване на най-важните кинетични параметри (PF и ID) и осигуряване на едно доста високо ниво на защита на окисляемия субстрат.

Таблица 6 Основни кинетични параметри, характеризиращи автоокислението на ТГСМ при 80°С в присъствие на 0.1mM и 1.0 mM от изследваните съединения: А) индивидуални съединения **1-4**; В) Стандартни антиоксиданти; С) Двойни смеси със ТОН (1:1) 0.1mM

Лигнани Съкр..	Конц., mM	IP_A, h	PF -	R_A,10^{-6} M/s	ID -	R_m M/s	RR_m -	Активност/ ефект
	А) Индивидуални съединения							**Активност**
1	**0.1**	4.0±0.3	3.1	1.1±0.3	8.0	6.9 10^{-9}	6.6 10^{-3}	**умерена**
	1.0	30±3	21.5	0.2±0.1	44	9.9 10^{-9}	2.0 10^{-2}	**умерена**
2	**0.1**	9.3±0.8	7.2	0.2±0.1	44	3.0 10^{-9}	15.0 10^{-2}	**силна**
	1.0	93±5	73.1	0.1±0.1	88	2.9 10^{-9}	2.9 10^{-2}	**силна**
3	**0.1**	2.8±0.3	2.2	3.2±0.3	2.8	9.9 10^{-9}	3.1 10^{-3}	слаба
	1.0	18.4±2.1	14.1	0.5± 0.1	17.6	1.4 10^{-8}	2.8 10^{-2}	**умерена**
4	**0.1**	0.8±0.1	0.6	9.6±0.5	0.9	3.5 10^{-8}	3.6 10^{-3}	няма активност
	1.0	3.3± 0.3	2.5	2.8± 0.2	3.1	9.3 10^{-8}	3.3 10^{-2}	слаба
	В) Стандартни антиоксиданти							
ТОН	**0.1**	10.5±0.8	7.0	0.3±0.1	18.7	0.3 10^{-8}	1.0 10^{-2}	**силна**
	1.0	20± 2	13.3	0.4±0.1	14.0	1.4 10^{-8}	3.5 10^{-2}	**умерена**
FA	**0.1**	2.0±0.2	1.5	5.6±0.5	1.0	1.3 10^{-8}	2.3 10^{-3}	слаба
	1.0	4.0±0.3	2.7	1.8±0.3	3.1	6.9 10^{-8}	3.8 10^{-2}	слаба
CA	**0.1**	10.0±0.8	6.7	0.6±0.2	9.3	0.3 10^{-8}	0.5 10^{-2}	**силна**
	1.0	43±3	33.1	0.2±0.2	28.0	0.6 10^{-8}	3.0 10^{-2}	**силна**
	С) Двойни смеси с ~-токоферол							**Ефект**
1+ ТОН	**0.1**	10.0±0.8	8.0	0.5± 0.3	18.3	0.3 10^{-8}	0.6 10^{-2}	антагонизъм 31%
2+ ТОН	**0.1**	15.0±0.8	12.0	0.4± 0.2	22.2	0.2 10^{-8}	0.5 10^{-2}	антагонизъм 24%
3+ ТОН	**0.1**	14.0±0.8	11.2	0.4± 0.2	22.2	0.2 10^{-8}	0.5 10^{-2}	**синергизъм 5.3%**
4+ ТОН	**0.1**	13.8±0.8	11.0	0.5± 0.3	19.0	0.2 10^{-8}	0.4 10^{-2}	**синергизъм 22%**

Относителният стехиометричен коефициент на неолигнан **4,** изчислен спрямо този на ТОН ($\mathbf{n_{TOH}}$ = 2) е очаквано по-нисък ($\mathbf{n_4}$ = 0.15), в сравнение с този на останалите полифенолни съединения **1-3** (**$\mathbf{n_1}$**= 0.8**;** **$\mathbf{n_2}$** = 1.9**;** **$\mathbf{n_3}$** = 0.5**)**. Феноксилните радикали АО$^{\bullet}$ на съединение **4** рекомбинират с образуване на неактивни продукти от рекомбинацията. За разлика от лигнан **4** и **FA,** семихиноновите радикали на **CA,** както на лигнаните с катехолова структура **1-3**, участват преимуществено в реакциите на диспропорциониране, водещи до регенериране на изходната молекула на антиоксиданта, което многократно увеличава тяхната активност. Токоферилните радикали също участват в реакции на диспропорциониране с регенериране на изходната молекула на **ТОН**. Като резултат от гореизложеното, се наблюдава слаб инхибиращ ефект при високата концентрация и дори лек прооксидантен ефект при ниската концентрация при лигнанът от монофенолен тип -неолигнан **4**, което се обяснява от една страна с очакваното по-трудното отцепване на Н атом от ОН групата в сравнение със съединенията с катехолова структура, и от друга с невъзможността му да се саморегенерира по реакция на диспропорциониране на феноксилния му радикал.

Изследване ефекта на еквимоларни двойни смеси с α-токоферол (ТОН).

Приготвени са еквимоларни двойни смеси от изследваните съединения с **ТОН** с цел да се създадат антиоксидантни композиции с висок инхибиращ ефект, способни да обезпечат висока окислителна стабилност на липидния субстрат. Зависимостите, съгласно които се определят ефектите, както и формулите, по които се изчисляват процентно, са представени на схема 7.

Установено е, че добавянето на **ТОН** в еквимоларно съотношение към изследваните лигнани при ниската концентрация (0.1 mM), осигурява по-висока окислителна стабилност на липидния субстрат. Синергизъм се наблюдава единствено за двойните смеси на неолигнани **3** и **4,** който е по-силно изразен за неолигнан **4**:

IP_{Σ} (14.0) > IP_3 (2.8) + IP_{TOH} (10.5) за двойната смес **3 + ТОН -** синергизъм

IP_{Σ} (13.8) > IP_4 (0.8) + IP_{TOH} (10.5) за двойната смес **4 + ТОН** - синергизъм

За двойните смеси на ксантеновите лигнани **1** и **2** (**1**+**ТОН** и **2**+**ТОН)** се наблюдава антагонизъм:

IP_{Σ} (10.0) < IP_1 (4.0) + IP_{TOH} (10.5) за двойната смес **1** + **ТОН –** антагонизъм (5.3 %)

IP_{Σ}(15.0) < IP_2 (9.3) + IP_{TOH} (10.5) за двойната смес **2** + **ТОН –** антагонизъм (22 %)

Вижда се, че съединенията със силна (**2**) и умерена (**1**) антиоксидантна активност показват антагонизъм в двойни смеси с **ТОН**. В действителност, стойността за **IP** на двойната смес **1**+**ТОН** е близка до тази на **ТОН**, добавен в субстрата като индивидуален компонент. От друга страна, двойната смес **2**+**ТОН** води до по-добро стабилизиране, в сравнение с всеки един от индивидуалните компоненти на сместа, но въпреки това не се наблюдава синергизъм между тези два изключително силни антиоксиданта. Това поведение е наблюдавано и в други случаи, в които **ТОН** е в смес със силни антиоксиданти, като двата силни антиоксиданта работят самостоятелно, но не в тандем (*Kancheva, 2009*).

Синергизмът, наблюдаван между неолигнаните **3** и **4** в смес с **ТОН** се дължи на реакции, при които се регенерира **ТОН**, който е по-силният от двата антиоксиданта :

При монофеноли (съединение 4):

по реакция на H-трансфер:

$TO^{\bullet} + AOH \rightarrow TOH + AO^{\bullet}$

(регенериране на **TOH**)

При бифенолни съединения (съединение 3):

А) по реакции на кръстосано диспропорциониране:

$Q(OH)O^{\bullet} + TO^{\bullet} \rightarrow Q(OH)_2 + T{=}O$ (регенериране на $\mathbf{Q(OH)_2}$)

$TO^{\bullet} + Q(OH)O^{\bullet} \rightarrow TOH + Q$ (регенериране на **TOH**)

Б) по реакции на H-трансфер:

$Q(OH)O^{\bullet} + TOH \rightleftharpoons Q(OH)_2 + TO^{\bullet}$

Антагонизъм се наблюдава, когато обратно – в системата преимуществено се регенерира по-слабия антиоксидант, или реакцията на регенериране е затруднена по една, или друга причина.

Реакцията на H-трансфер между $\mathbf{Q(OH)O^{\bullet}}$ и **TOH**, както и между $\mathbf{Q(OH)_2}$ и $\mathbf{TO^{\bullet}}$ е обратима и зависи от структурните особености на двата антиоксиданта. В случай на лигнан **2 -** не е от съществено значение в коя посока е изместено равновесието, защото двата антиоксиданта (лигнан **2** и **TOH**) имат много близки активности: IP_2 = 9,3 h; IP_{TOH} = 10.5 h . В този случай установеният антагонизъм между **2** и **TOH** може да се обясни с реакция на кръстосано рекомбиниране между феноксилните радикали до образуване на неактивни продукти: $Q(OH)O^{\bullet} + TO^{\bullet} \rightarrow P_{un}$

По този начин се елиминира възможността за регенериране на който и да е от двата силни антиоксиданта.

Получени са нови резултати за ефектите на еквимоларни двойни смеси на изследваните лигнани **1-4** с **TOH**. Установен е антагонизъм за смесите на ксантеновите лигнани, проявяващи умерено-силна антиоксидантна активност. Неолигнаните, които показаха слаба до умерена инхибираща способност като индивидуални компоненти, присъстващи в окисляемия липиден субстрат, в смес с **TOH** проявяват синергизъм. Препоръчва се използването на ксантеновите лигнани самостоятелно, а на неолигнаните – в смес с **TOH**.

1.3 Квантово-химични изчисления

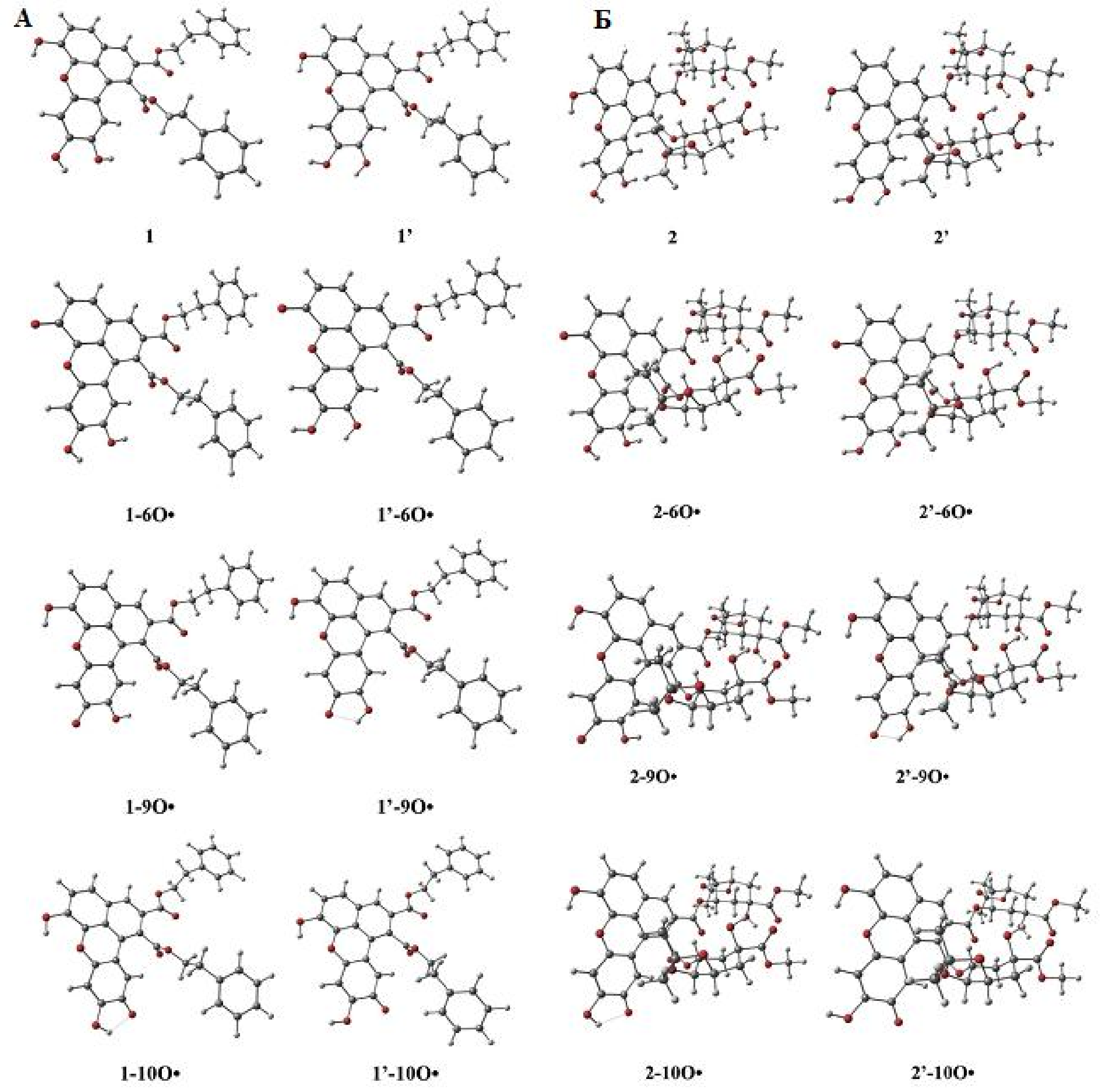
За да се обяснят различията в антирадикаловата и антиоксидантна активности на двете двойки бензо[*kl*]ксантенови лигнани **1** и **2** и дихидробензофуранови неолигнани **3** и **4**, са оптимизирани геометриите на **1-4** и всички възможни феноксилни радикали. Ротамерите и възможните феноксилни радикали на стандартните антиоксиданти - **CA**,

FA и **TOH** също са изследвани за сравнение. Възможните енантиомери са четири: RR, SS, SR и RS, като са взети под внимание единствено (**2R,3R**)- и (**2S,3S**)- енантиомерите на съединения **3** и **4.** Причината за това е съществената разлика в биологичната активност на енантиомерите на съединение **4**, като (**2R,3R**)-енантиомерът има обещаващи антитуморни свойства против рак на гърдата и е по-активен от *(***2S,3S***)*-енантиомера. В настоящото теоретично изследване е доказано, че по-стабилният от двата разгледани енантиомера е **(2R,3R)**, като разликите в енталпиите (ΔH) са съответно 1.92 и 3.69 kcal/mol.

За лигнани **1-3** са изследвани единствено ротамерите с вътрешномолекулни водородни връзки. За по-стабилните ротамери на двойката лигнани **1** и **2**, най-ниската стойност за BDE е изчислена за O-H групите в позиция 10 (**1-10O$^{\bullet}$** и **2-10O$^{\bullet}$**). Тези резултати могат да бъдат обяснени с образуването на вътрешномолекулни водородни връзки в катехоловите фрагменти и последваща стабилизация на съответните радикали (Фиг 20 А и Б). Стойностите за енталпия на дисоциация на връзката O-H (BDE) за ротамерите на съединение **3** (и при двата енантиомера) са по- високи в сравнение с тези на бензо[*kl*]ксантенови лигнани **1** и **2**. За съединение **4**, при което такъв вид стабилизиране не е възможно, стойностите за BDE са доста по-високи.

Резултатите за съединения **1-4** са сравнени с тези на стандартните антиоксиданти - **CA**, **FA** и **TOH**. Стойностите за BDE (**1-10O$^{\bullet}$**) и BDE (**2-10O$^{\bullet}$**), отнасящи се за по-стабилните ротамери на съединения **1** и **2** са много близки до тези на най-силните стандартни антиоксиданти (**CA** и **TOH**). В заключение може да се каже, че съединения **1** и **2** (и до известна степен съединение **3**) биха показали антиоксидантна активност, близка до тази на **CA** и **TOH**.

Установено е, че HOMO (най-високата заета от електрона свързваща молекулна орбитала) е неподходящ дескриптор за охарактеризиране на наблюдаваната експериментално антиоксидантна активност на съединения **1-4** и на стандартните антиоксиданти (**CA**, **FA** и **TOH**). Този извод е в несъответствие с твърдението, че колкото по-високата стойността за HOMO енергията на даден съединение, толкова по-активно е то като антиоксидант (*Zhang & Chen, 2000*). Това може да се обясни с предположената слабост на този дескриптор при предсказване на активността на антиоксиданти с вътрешномолекулни водородни връзки.



Фигура 20 (**А** и **Б**). B3LYP/6-31G(d,p) оптимизирани структури на различни изомери и възможните радикали на изследваните бензоксантенови лигнани **1** (**А**) и **2**(**Б**).

1.4 Сравнителен анализ между експериментални и теоретични данни

Корелацията между получените експериментални и теоретични резултати показва, че бензоксантеновият лигнан **2** е с най-силна активност при всички приложени методи на изследване. Лигнаните **1** и **3** показват умерена, а в някои случаи и силна антиоксидантна активност, докато неолигнанът с монофенолна структура **4** показва най-слаба активност. Има отлична корелация между резултатите за скоростните константи от първи порядък, т.е. на реакцията между лигнаните **2** и **4** и $DPPH^{\bullet}$, техните стойности за фактора на стабилизиране на липидния субстрат **PF** -един от основните кинетични параметри на инхибирания автоокислителен процес и теоретичния дескриптор BDE за тези две съединения. В заключение може да се допълни, че синергизъм се наблюдава за двойни смеси на **TOH** със съединения (**3** и **4**), чиито стойности за BDE са по-високи от тези на **TOH**. Двойни смеси със **TOH** на съединения (**1** и **2**) с по-ниски стойности за BDE от **TOH** дори показват антагонизъм между двата компонента на сместа.

1.5 Изводи

Съединение **2** е най-силният антиоксидант в двете изследвани концентрации (0.1 и 1.0mM), в сравнение с останалите фенолни съединения, в т.ч. и с два от най-мощните антиоксиданти **– TOH** и **CA**.

Парадоксален е фактът, че съединение **1** проявява доста по-ниска антирадикалова способност от съединение **2**, отличаващо се структурно от **1** единствено по естерно свързаните заместители R. Последните екранират фенолните групи от катехоловия фрагмент в структурата на лигнани **1** и **2** в различна степен, но не са свързани директно в нито един от фенолните пръстени. Следователно не се очаква прякото им влияние върху антирадикаловата активност на лигнаните (**1** и **2**), което се потвърди и от изчислените стойности за енталпия на дисоциация на O-H -връзка (BDE). Блокиращият ефект на разтворителя е по-силен при по-слабо екранираните фенолни групи и по-този начин достъпът до тях от страна на свободния радикал (DPPH$^{\bullet}$) е по-затруднен.

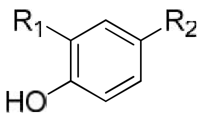
2. Бифенилни аналози на куркумин с C2-симетрична структура (димери) и съответните им мономери, някои от които са разпадни продукти на куркумин

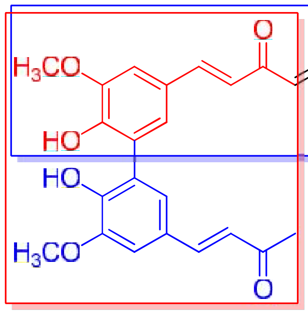
Въпреки големия антиоксидантен и противотуморен потенциал, употребата на куркумин като хемопревентивно и хемотерапевтично средство е ограничена, поради неговата слаба бионаличност, дължаща се на слабата абсорбируемост, бързото му разграждане и на неразтворимостта му във вода.

Понастоящем са предприети няколко стратегии за да се преодолеят тези ограничения. Една от тях е е създаването на фармацевтични, козметични и др. съставки, или комбинации в различна форма, в които съдържащият се куркумин да е с повишена абсорбируемост и понижена хидрофобност.

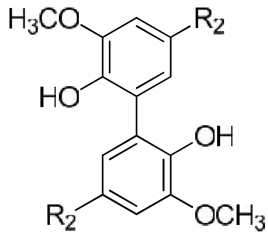
Целенасоченият синтез на модифицирани структурни аналози на куркумин, които да имат по-добра бионаличност и по-силна активност е втората основна стратегия за преодоляване на ограниченията, свързани с фармацевтичните приложения на куркумина.

Мономери (M_iOH)





Димери $D_i(OH)_2$

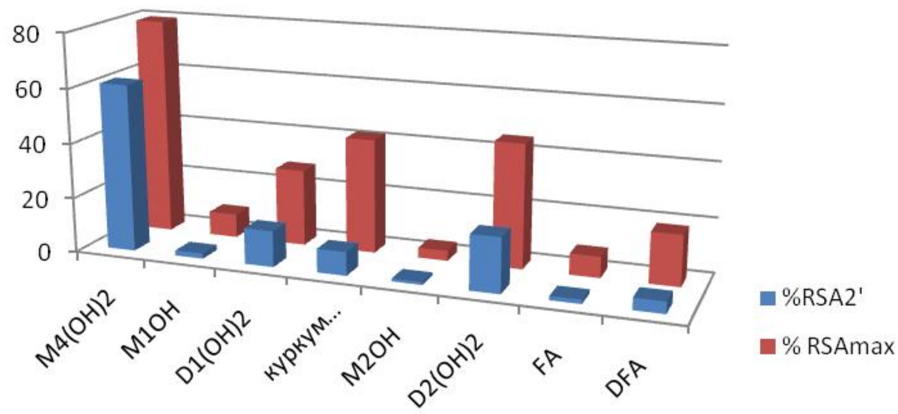


А *Орто*-метоксифеноли: R_1 = -OCH_3		
M_1OH	R_2: -CH=CH-$COCH_3$	**$D_1(OH)_2$**
M_2OH	R_2:-CH_2-CH_2-$COCH_3$	**$D_2(OH)_2$**
M_3OH	R_2: -CH=CH-CO-CH=C(OH)CO-OC_2H_5	**$D_3(OH)_2$**
FA (ферулова к-на)	R_2: -CH=CH-COOH	**DFA**
Б Катехоли ($M_i(OH)_2$): R_1 = -OH		
$M_4(OH)_2$	R_2: -CH=CH-$COCH_3$	**-**
CA (кафеена к-на)	R_2: -CH=CH-COOH	**-**

Фигура 21 (А и Б). Структури на изследваните съединения –мономери **M_iOH** (i=1÷3) и **FA** и димери **- $D_i(OH)_2$** (i=1÷3), куркумин и **DFA** (**А**); катехоли **- $M_4(OH)_2$** и **CA** (**Б**).

2.1 Антирадикалова активност на изследваните мономери и димери

Експериментално получените резултати за антирадикаловата активност (%RSA) на избраните мономери и димери са представени графично на Фиг. 22 (Б).



Фиг. 22 Б. Антирадикалова активност (%RSA) при стайна температура за бързата (2 min.) и тоталната кинетика (20 min.) в съотношения [M_iOH]/[$DPPH^•$] и [$D_i(OH)_2$]/[$DPPH^•$] 0.4 mol/mol.

Увеличението на концентрацията на всички мономери и димери води до нарастване на тяхната антирадикалова активност.

От получените резултати за %RSA и $\boldsymbol{n_{2'}}$ за бързата кинетика (Фиг. 22 Б) на куркумина и **$D_1(OH)_2$** се вижда, че те проявяват близка, т.е. сравнима активност.

Може да се заключи, че новосинтезираните бифенилни съединения, като синтетични аналози на куркумина са по-активни уловители на свободни радикали от съответните мономери. Най-голяма е разликата в активността е отчетена за двойката **$M_2OH/D_2(OH)_2$**, последвана от двойките **M_1OH/куркумин** и **$M_1OH/D_1(OH)_2$**, а най-малка за **FA/DFA**.

2.2 Изследване на инхибиращата способност на мономерите и димерите в условия на липидно автоокисление – самостоятелно и в смеси.

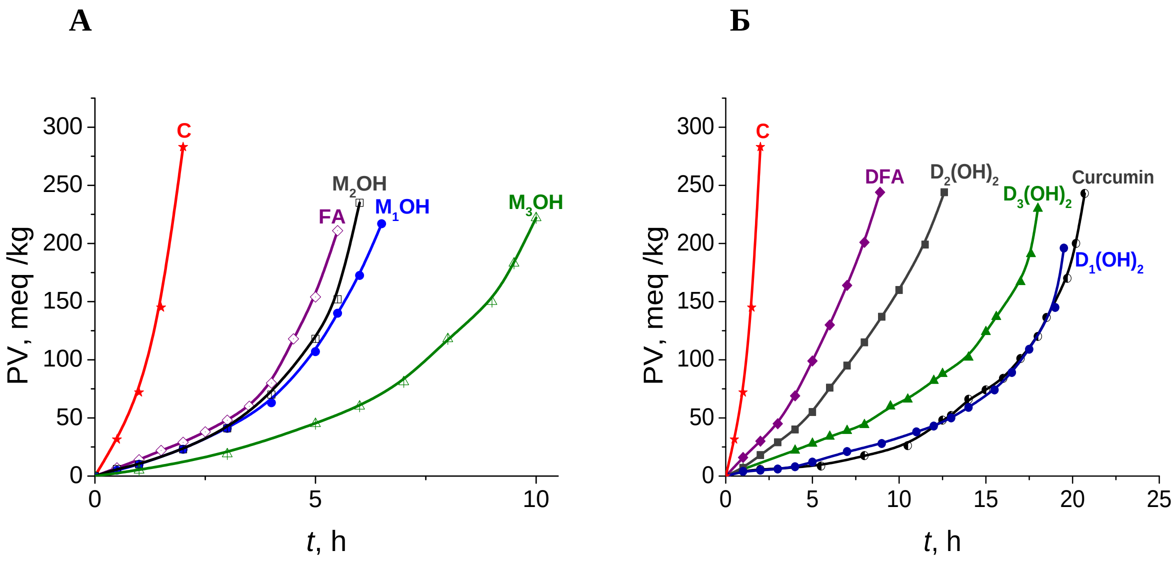
Кинетичните криви на натрупване на липидните хидропероксиди (LOOH) при 80 ^{0}C в отсъствие (контролна проба **C**) и в присъствие на 1.0 mM от изследваните двойки мономер/димер (**$M_iOH/D_i(OH)_2$**) са представени на Фиг. 24 (А и Б). Няма съществени разлики в ниската концентрация (0.1 mM) при **M_iOH** и **$D_i(OH)_2$**. Основните кинетични параметри на всички изследвани мономери **M_iOH** и **$M_i(OH)_2$** и димери **$D_i(OH)_2$** и в двете изследвани концентрации (0.1 и 1.0 mM) са представени в Таблица 9.

2.2.1 Зависимост структура и антиоксидантна активност

Двойките **$D_1(OH)_2$/M_1OH** и **куркумин/M_1OH** показаха еднакви разлики в антиоксидантната ефективност (PF_d/PF_m = 4) и антиоксидантната реактивоспособност (ID_d/ID_m = 5). Този факт е показателен за това, че начинът по който са свързани двата еквивалентни фенолни фрагмента в една молекула – като куркумин, или директно в C2-симетричен бифенил **$D_1(OH)_2$**, не оказва влияние на антиоксидантната активност на двата димера, в качеството им на инхибитори на верижно-радикаловия окислителен процес. На практика, те са еднакво активни като класически фенолни антиоксиданти от първи род.

Разликата в относителната ефективност (PF_d/PF_m), получена за двете двойки **$D_1(OH)_2$/M_1OH** и **куркумин/M_1OH** е най-значителна, в сравнение с тези на останалите двойки мономер/димер. Предложен е реакционен механизъм на инхибирания автоокислителен процес в присъствие на **M_iOH** и **$D_i(OH)_2$**, като всяка от възможните реакции е представена и разгледана в т.2.2.1 на дисертационния труд.

Тези две двойки **$D_1(OH)_2$/M_1OH** и **куркумин/M_1OH** показаха също най висока относителна антиоксидантна реактивоспособност (ID_d/ID_m = 5), като резултат от наличието на α-β-ненаситена верига в позиция ***4*** от бензеновия пръстен, отговорна за резонансното стабилизиране на феноксилния радикал и респективно – за по-ниското му дялово участие в странични реакции.



Фигура 24 Кинетични криви на натрупване на липидните хидропероксиди при автоокислението на ТГСМ, 80°C в отсъствие (C) и в присъствие на 1.0 mM от изследваните мономери (M_iOH): M_1OH, M_2OH, M_3OH, и FA (A) и съответните им димери $D_i(OH)_2$, DFA и куркумин (Б)

Отсъствието на двойна връзка в страничната верига при **M_2OH** и **$D_2(OH)_2$** елиминира възможността от резонансно стабилизиране на феноксилния радикал по веригата, като го прави по-реактивоспособен. Това от своя страна води до нарастване на дела на страничните реакции (10-13 от кинетичната схема), водещи до намаляване на инхибиращата способност.

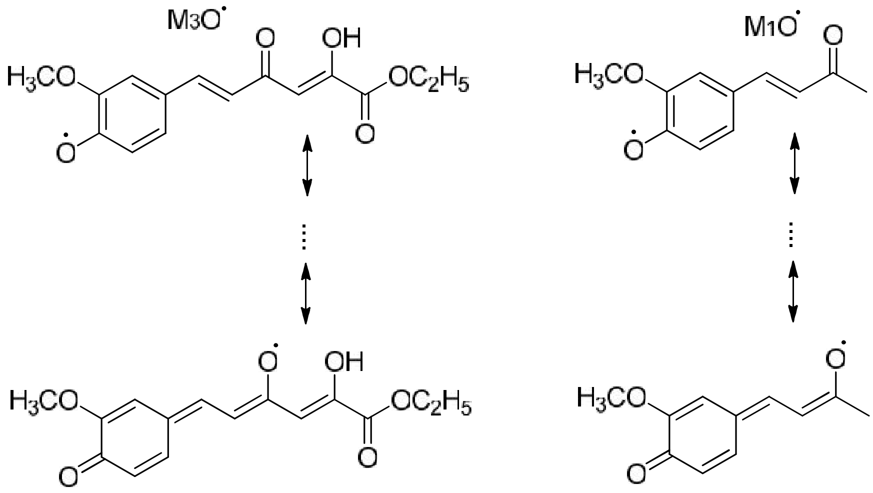
При наличие на по-дълга спрегната верига в *пара*-позиция при двойката **M_3OH/$D_3(OH)_2$** резонансното стабилизиране на феноксилния радикал е ограничено до кислородния атом от кето-енолната част, независимо, че след нея има втора кето-група (Фиг. 25). Най-висока антиоксидантна активност от изследваните *орто*-метоксизаместени мономери проявява **M_3OH**, докато активността на неговия димер **$D_3(OH)_2$** е близка до тази на куркумина и **$D_1(OH)_2$**, но е по-ниска. Няма съществена разлика във фактора на стабилизиране при сравняване на стойностите за **PF** на **$D_1(OH)_2$** и **$D_3(OH)_2$**, но **$D_1(OH)_2$** проявява почти три пъти по-висока степен на инхибиране (**ID**) на окисляемия липиден субстрат в сравнение със **$D_3(OH)_2$**.

Таблица 9. Основни кинетични параметри, характеризиращи автоокислението на ТГСМ при 80^{0}C, в присъствие на 0.1 и 1.0 mM на: А) Индивидуални съединения (M_iOH, $D_i(OH)_2$, $M_i(OH)_2$ и $D_i(OH)_4$) Б) Стандартни антиоксиданти и В) Двойни смеси с ТОН); Кинетични параметри на контролата: IP_c= (1.3 ± 0.5) h, R_c= (8,8 ± 0.5)10^{-6}, M/s

Съединения/смес Абрев..	**[Съединение] mM**	**IP_A, h**	**PF, -**	**R_A,10^{-6}, M/s**	**ID, -**	**R_m,10^{-8} M/s**	**RR_m, 10^{-3} -**	**Активност/Ефект**
А) Индивидуални съединения (мономери и димери)								
M_1OH	0.1	1.3 ±0.2	1.0	8.8 ±0.5	1.0	2.1 ±0.2	2.4	няма активност
	1.0	4.6 ±0.5	3.5	1.4 ±0.3	6.3	6.0 ±0.3	42.9	**умерена**
$D_1(OH)_2$	0.1	3.4 ± 0.4	2.6	3.0 ±0.3	2.9	0.9 ±0.2	3.0	**умерена**
	1.0	17.5 ±1.5	13.5	0.3 ±0.2	29.3	1.6 ±0.2	53	**силна**
M_2OH	0.1	1.4 ±0.3	1.1	8.9 ±0.5	1.0	2.0 ±0.2	2.2	няма активност
	1.0	4.6 ±0.5	3.5	1.6 ±0.2	5.5	6.0 ±0.3	37.5	**умерена**
$D_2(OH)_2$	0.1	2.1 ±0.3	1.6	5.6 ±0.5	1.6	1.3 ±0.2	2.3	слаба
	1.0	7.5 ±0.9	5.8	1.0 ±0.3	8.8	3.7 ±0.3	37	**умерена**
M_3OH	0.1	2.5 ±0.5	1.9	2.8 ±0.2	3.1	1.1 ±0.2	3.9	слаба
	1.0	7.5± 0.9	5.8	0.7 ±0.2	9.8	3.7 ±0.3	52.8	**умерена**
$D_3(OH)_2$	0.1	3.8 ±0.4	2.9	2.8 ±0.2	3.1	0.7 ±0.2	2.5	**умерена**
	1.0	16.6± 0.9	12.8	0.8±0.2	11.0	1.7 ±0.2	21.3	**силна**
$M_4(OH)_2$	0.1	19.0 ±1.5	14.6	0.3 ±0.2	29.3	0.15 ±0.05	5.0	**силна**
	1.0	60 ±4	46.2	0.15 ±0.05	58.7	0.5 ±0.2	33.3	**силна**
DFA	0.1	2.0 ±0.3	1.5	4.4 ±0.5	2.0	1.4 ±0.2	3.2	слаба
	1.0	4.3 ±0.5	3.3	2.1 ±0.3	4.2	6.5 ±0.3	31.0	**умерена**
Б) Стандартни антиоксиданти								
AscPH	0.1	1.3±0.2	1.0	8.8 ±0.5	1.0	21.4	24.3	няма активност
	1.0	1.3±0.2	1.0	8.8 ±0.5	1.0	21.4	24.3	няма активност
FA	0.1	1.9 ±0.3	1.5	5.6 ±0.5	1.6	1.5 ±0.2	2.6	слаба
	1.0	4.2 ±0.5	3.2	2.0 ±0.3	4.4	6.6 ±0.3	33	**умерена**

CA	0.1	10.0 ±0.8	7.7	0.6 ±0.2	14.7	0.28 ±0.02	4.7	**силна**
	1.0	44 ±4	33.8	0.12 ±0.02	73.3	0.63 ±0.03	52.5	**силна**
TOH	0.1	10.5 ±0.8	8.1	0.3 ±0.2	29.3	0.26 ±0.02	8.7	**силна**
	1.0	27.5 ±1.7	21.2	0.3 ±0.2	29.3	1.0 ±0.2	33	**силна**
Куркумин	0.1	4.0 ±0.5	3.1	2.0 ±0.2	4.4	0.69 ±0.03	3.5	**умерена**
	1.0	17.9 ±1.6	13.8	0.3 ±0.2	29.3	1.6 ±0.2	51.7	**силна**
B) Двойни Смеси (1:1) на изследваните мономери и димери със DL-~- токоферол (TOH)								
M_1OH +TOH	0.1	14.8 ±1.2	11.4	0.22 ±0.05	40.0	0.19 ±0.02	8.6	**синергизъм, 25.4%**
	1.0	42.5 ±3.5	32.7	0.34 ±0.02	25.9	0.65 ±0.04	19.1	**синергизъм , 32.4%**
$D_1(OH)_2$ +TOH	0.1	13.2 ±0.9	10.2	0.28 ±0.02	31.4	0.21 ±0.02	7.5	адитивизъм
	1.0	46 ±3	35.4	0.30 ±0.02	29.3	0.60 ±0.03	20	адитивизъм
M_2OH +TOH	0.1	10.3 ±0.9	7.9	0.54 ±0.02	16.3	0.27 ±0.02	5.0	без ефект/антагонизъм, 13.4%
	1.0	37 ±3	28.5	0.40 ±0.02	22.0	0.75 ±0.04	18.8	**синергизъм , 15.3%**
$D_2(OH)_2$ +TOH	0.1	11.5 ±0.9	8.8	0.30±0.05	22.0	0.24±0.02	6.0	без ефект/антагонизъм, 8.7%
	1.0	38.5 ±3.5	29.6	0.37±0.02	23.8	0.72±0.04	19.5	**синергизъм , 10.0%**
M_3OH+TOH	0.1	20.5 ±1.5	15.8	0.10 ±0.05	88.0	0.14 ±0.02	14	**синергизъм 57.7%**
	1.0	40 ±3	30.8	0.12 ±0.02	73.3	0.69 ±0.03	57.5	**синергизъм 14.3%**
$D_3(OH)_2$+TOH	0.1	17.0 ±1.5	13.1	0.34 ±0.02	25.9	0.16 ±0.02	4.7	**синергизъм 18.9%**
	1.0	36 ±3	27.7	0.40 ±0.05	22.0	0.77 ±0.04	19.3	антагонизъм, 22.5%
FA+TOH	0.1	18.5 ±1.5	14.2	0.30 ±0.02	29.3	0.15 ±0.02	5.0	**синергизъм , 49.2%**
	1.0	45 ±5	34.6	0.30 ±0.02	29.3	0.62 ±0.03	20.7	**синергизъм , 42.0%**
DFA+TOH	0.1	21.5 ±1.5	16.5	0.25 ±0.02	33.8	0.13 ±0.02	5.0	**синергизъм , 72%**
	1.0	43 ±3	33.1	0.40 ±0.02	22.0	0.65 ±0.03	16.3	**синергизъм , 35.2%**

Получените резултати за **M_3OH** могат да се обяснят единствено със стеричния ефект на по-дългата верига в молекулата, водеща до по-ниско ниво на участие на **$M_3O^{\bullet}$** в странични реакции. При **$D_3(OH)_2$** същият стеричен ефект има двустранна роля – от една страна не позволява участието на **$D_3(OH)O^{\bullet}$** в странични реакции (аналогично на случая с **$M_3O^{\bullet}$**), водещи до понижаване на активността му.



Фигура 25 Възможни резонансни структури на феноксилните радикали на **M_1OH** и **M_3OH**

От друга страна обаче именно този стеричен фактор на по-дългата верига вероятно затруднява достъпа до фенолните групи на димера. Предвид факта, че двете ядра са свързани в *орто*-позиция и спрямо двете фенолни групи при димерите, стеричният фактор на един и същи заместител, може да влияе по различен начин при дадена двойка мономер/ димер, какъвто е случаят с **M_3OH** / **$D_3(OH)_2$**.

Сравнена е антиоксидантната активност на мономерите **M_iOH** и **$M_i(OH)_2$**. (Схема 8). Отчетен е ефекта на замяна на *орто*-метоксифенолната част от молекулата на **M_1OH** и **FA** с катехолова при **$M_4(OH)_2$** и **CA** върху активността им. Наблюдавано е, че мономерът с катехолова структура **$M_4(OH)_2$** проявява почти 2 пъти по-висока ефективност в сравнение със **CA** и 15 пъти по-висока от тази на **M_1OH** в концентрация 0.1mM. Резултатите за степента на инхибиране (**ID**), представени в таблица 9 показват, че **$M_4(OH)_2$** съкращава в доста по-висока степен дължината на окислителната верига, в сравнение със **CA** и **M_1OH**. Изследвана е активността на двете двойки *орто*-метоксифеноли **M_1OH** и **FA** и катехоли **$M_4(OH)_2$** и **CA**.

Отчетен е ефекта на замяната на –CO-CH_3-групата в края на страничната верига с карбоксилна група (-COOH) при: мономерите с катехолова структура (**$M_4(OH)_2$** и **CA**), мономерите (**M_1OH** и **FA**) и димерите (**$D_1(OH)_2$** и **DFA**) с *орто*-метоксизаместени бензенови пръстени.

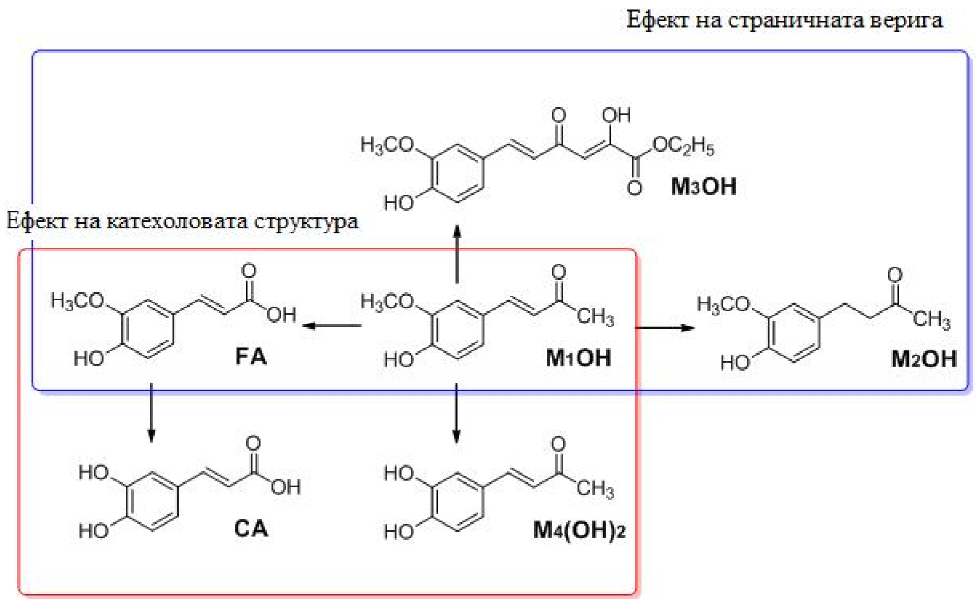


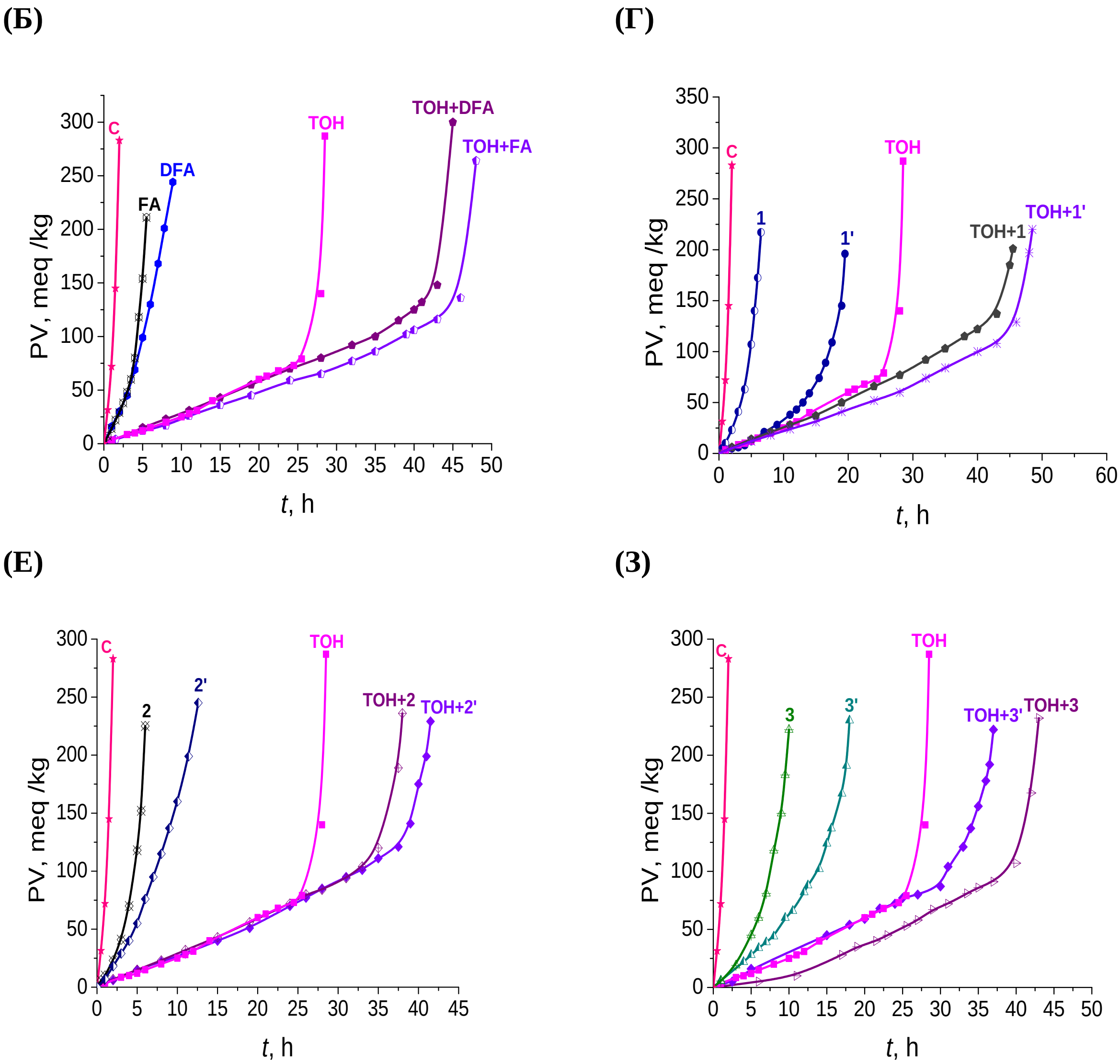
Схема 8. Структури на подбрани мономери (**M_1OH**, **M_2OH**, **M_3OH**, **$M_4(OH)_2$**) и стандартни антиоксиданти (**FA** и **CA)** с разлики във фенолното ядро и в страничната верига, подходящи за изследвания на зависимостта „структура-активност”.

Наблюдавано е, че при мономерите тази замяна води до понижаване на активността и е по-силно изразена при по-силните антиоксиданти, т.е. при катехолите и съответно – по-слабо изразена при по слабите антиоксиданти. Присъствието на -COOH-групи в края на двете странични вериги в молекулата на **DFA** води до 4-кратно понижаване на антиоксидантната ефективност (изразена като **PF**) и 7-кратно понижаване на антиоксидантната реактивоспособност (**ID**) в сравнение с **$D_1(OH)_2$**. Нещо повече - при двойката **DFA**/**FA** не се наблюдава разлика в активността, което се вижда от приблизително еднаквите стойности за **PF** и **ID**, представени в табл. 9 (PF_d/PF_m = 1.0 и ID_d/ID_m = 1,0). Карбоксилната група(-COOH) в края на страничната верига е способна да ускори липидното окисление, като разпада липидните хидропероксиди (LOOH) до свободни пероксидни радикали. В молекулата на **DFA** има две –COOH групи, които вероятно компенсират ефекта от наличие на две фенолни групи, с по-високото си дялово участие в реакциите на разпадане на LOOH до радикали, в сравнение с **FA**. Като резултат, не се наблюдава по висок антиоксидантен потенциал за **DFA** , в сравнение с **FA**.

2.2.2 Ефект на еквимоларни двойни смеси с TOH

На фигура 26 (Б, Г, Е и З) са сравнени кинетичните криви при същите условия на окисление за следните двойки мономер/димер: **$M_1OH/D_1(OH)_2$**, **$M_2OH/D_2(OH)_2$**, **$M_3OH/D_3(OH)_2$** и **FA/ DFA**, както индивидуално, така и в еквимоларни (1:1) двойни смеси с α-токоферол (**TOH**) при концентрация 1.0 mM. Стойностите на основните кинетични параметри за двойните смеси на изследваните съединения с **TOH** при двете концентрации (0.1 и 1.0 mM) са представени в таблица 9.

От получените резултати се вижда, че почти във всички случаи присъствието на еквимоларни двойни смеси (**M_iOH+TOH** и **$D_i(OH)_2$+TOH**) осигурява по-висока окислителна стабилност на липидния субстрат в сравнение с който и да е от индивидуалните компоненти: **M_iOH**, **$D_i(OH)_2$**, и **TOH**.



Фигура 26 Кинетични криви на натрупване на липидните хидропероксиди при автоокисление на ТГСМ, при 80^{0}С, в отсъствие (С) и в присъствие на 1.0 mM от изследваните двойки FA/DFA (Б), $M_1OH/D_1OH)_2$ (Г), $M_2OH/D_2OH)_2$ (Е) и M_3OH /$D_3OH)_2$ (З), TOH, както и техните еквимоларни (1:1) двойни смеси.

*Забележка: Кинетичните криви 1, 2 и 3се отнасят за мономери M_1OH, M_2OH и M_3OH съответно, а с 1’, 2’ и 3’ са означени кривите на съответните им димери.

Таблица 10. Основни кинетични параметри, характеризиращи автоокислението на ТГСМ при 80^0C, в присъствие на изследваните съединения в концентрация 1.0 mM в: А) Двойни смеси (1:1) с аскорбилпалмитат (AscPH) и Б) Тройни смеси (1:1:1) с AscPH и TOH

Съединения/ смес/ (съкр.)	**[Съединение]mM**	**IP_A, h**	**PF, -**	**R_A,10^{-6}, M/s**	**ID, -**	**R_m,10^{-8} M/s**	**RR_m, 10^{-3} -**	**Активност/Ефект**
А) Двойни Смеси (1:1) на изследваните мономери и димери с аскорбилпалмитат (AscPH)								
TOH+AscPH	1.0	41 ±3	31.5	0.3 ±0.2	29.3	0.68 ±0.03	22.7	**синергизъм 42.4 %**
M_1OH+AscPH	1.0	8.0 ±0.8	6.2	1.3 ±0.3	6.8	3.47 ±0.03	26.7	**синергизъм 35.6 %**
$D_1(OH)_2$+AscPH	1.0	13.5 ±0.9	10.4	1.0 ±0.3	8.8	2.06 ±0.02	20.6	антагонизъм 28%
M_2OH+AscPH	1.0	5.7 ±0.5	4.4	1.3 ±0.3	6.8	4.87 ±0.03	37.5	адитивизъм
$D_2(OH)_2$+AscPH	1.0	10.0 ±0.9	7.7	1.0 ±0.3	8.8	2.78 ±0.02	27.8	**синергизъм 14%**
FA+AscPH	1.0	7.7 ±0.8	5.9	1.7±0.3	5.2	3.61 ±0.02	21.2	**синергизъм 40%**
DFA+AscPH	1.0	8.3 ±0.8	6.4	1.7 ±0.3	5.2	3.35 ±0.02	19.7	**синергизъм 48%**
Б) Тройни смеси (1:1:1) на изследваните мономери и димери с DL-~- токоферол (TOH) и аскорбилпалмитат (AscPH)								
M_1OH+TOH+AscPH	1.0	43 ±3	33.1	0.30 ±0.02	29.3	0.65 ±0.03	21.7	**синергизъм 28.7%**
$D_1(OH)_2$+TOH+AscPH	1.0	46 ±3	35.4	0.25 ±0.02	35.2	0.60 ±0.03	24.0	адитивизъм
M_2OH+TOH+AscPH	1.0	46 ±3	35.4	0.25 ±0.02	35.2	0.60 ±0.03	24.0	**синергизъм 37.7%**
$D_2(OH)_2$ +TOH+AscPH	1.0	43 ±3	33.1	0.26 ±0.02	33.8	0.65 ±0.03	25.0	**синергизъм 18.5%**
M_3OH+TOH+AscPH	1.0	58 ±4	44.6	0.10 ±0.03	88.0	0.48 ±0.03	48.0	**синергизъм 59.8%**
$D_3(OH)_2$+TOH+AscPH	1.0	44 ±3	33.8	0.25 ±0.05	35.2	0.63 ±0.03	25.2	адитивизъм

Направената обработка на експерименталните резултати (табл. 9) показа, че двойните смеси с **TOH** на **M_1OH**, **M_3OH** и **FA** от мономерите проявяват значим синергизъм (от 14.3÷57.7%) и при двете изследвани концентрации. При ниската концентрация (0.1mM) добавянето на **M_2OH** не променя инхибиращия ефект на **TOH**, но при високата концентрация (1.0 mM) се наблюдава синергизъм и при този мономер.

При димерите няма ясно изразен ефект на двойните смеси с **TOH**. **$D_1(OH)_2$** проявява адитивизъм, т.е. сумарен ефект и при двете изследвани концентрации. Присъствието на **$D_2(OH)_2$** също както и на съответния му мономер при ниската концентрация не повишава ефективността на **TOH**, но при високата концентрация се наблюдава слаб синергизъм.

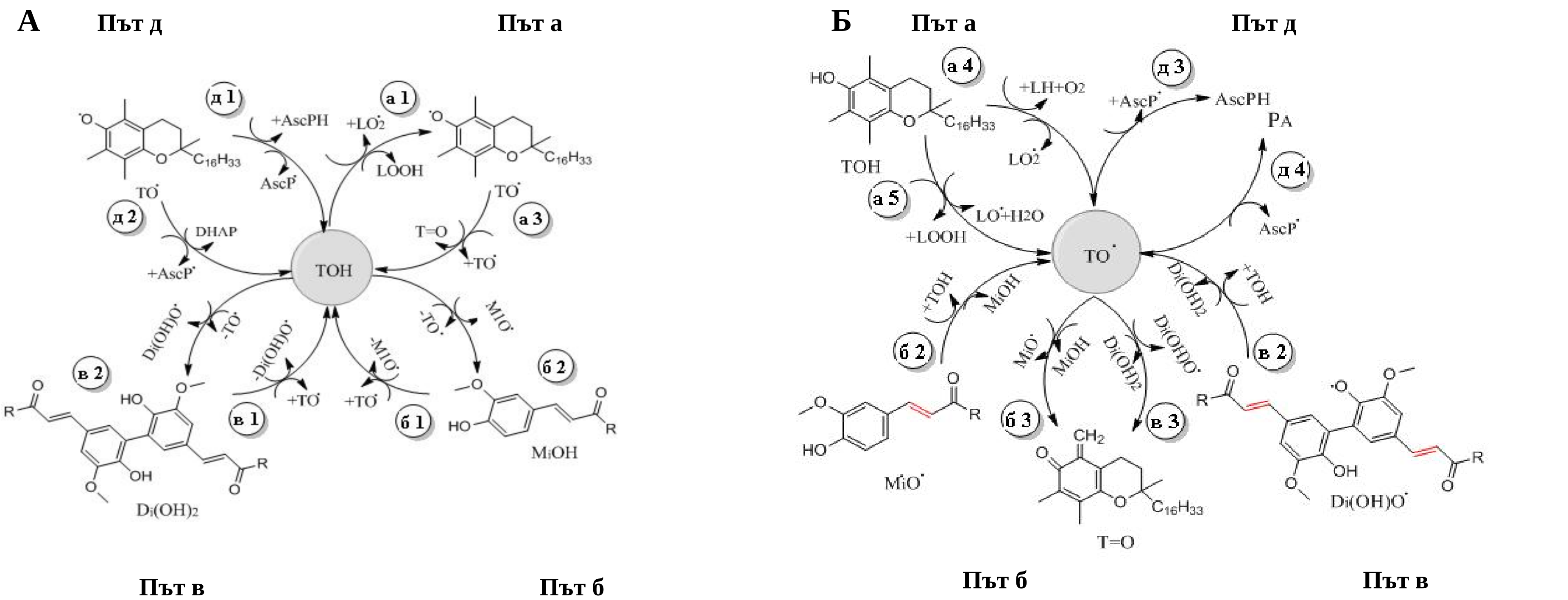
При двойката **M_2OH/$D_2(OH)_2$** 10-кратната промяна в концентрацията на компонентите от двойните смеси води до промяна в ефекта, но слабо изразена като %– от 8.7% антагонизъм за **M_2OH** (в 0.1 mM) до 10% синергизъм (в 1.0 mM) и съответно от 13.4% антагонизъм за **$D_2(OH)_2$** (в 0.1 mM) - до 15.3% синергизъм (в 1.0 mM).

$D_3(OH)_2$ проявява синергизъм (18.9 %) с **TOH** (1:1) в ниската концентрация, но при високата – антагонизъм (22.5%), т.е. по-слаб ефект, отколкото сумарния ефект от индивидуалните компоненти.

От димерите единствено **DFA** проявява синергизъм и при двете изследвани концентрации с **TOH**.

Известно е, че синергизъм се наблюдава тогава, когато в сместа се регенерира по-силният антиоксидант. Във всички изследвани двойни смеси това е **TOH**. Следователно установяването на синергизъм доказва възможното регенериране на **TOH** в хода на окислителния процес. Комплексният механизъм, включващ различни реакции, в които е възможно **TOH** да бъде регенериран, са представени на Схема 9 (А). Реакциите на Н-трансфер между изходната молекула на единия от компонентите към феноксилния радикал на другия компонент от двойната смес е обратима. Синергизъм се наблюдава в случай, че равновесието е изтеглено в посока на регенериране на изходната молекула на по-силния антиоксидант, т.е. на **TOH** (Схема 9 (А), път на реакции (б и в).

В случаите, когато двата компонента са с близък антиоксидантен потенциал, те много често действат независимо един от друг, а не в тандем. Такъв е случаят с **$D_1(OH)_2$+TOH**, за който се наблюдава адитивизъм (сумарен ефект). Инхибиращият ефект на сместа е много по-голям от този на индивидуалния **$D_1(OH)_2$**, но въпреки това няма синергизъм между компонентите.



Път а: а1 Н-атом трансфер от ТОН към $LO_2^\bullet$ (ключова реакция)

а3 хомо-диспропорциониране на токоферилните радикали $TO^\bullet$

Път б: б1 Н-атом трансфер от M_iOH към $TO^\bullet$ (с регенериране на ТОН)

б2 Н-атом трансфер от ТОН към $M_iO^\bullet$ (с регенериране на M_iOH)

Път в: в1 Н-атом трансфер от $D_i(OH)_2$ към $TO^\bullet$ (с регенериране на ТОН)

в2 Н-атом трансфер от ТОН към $D_i(OH)O^\bullet$ (с регенериране на $D_i(OH)_2$)

Път д: д1 Н-атом трансфер от AscPH към $TO^\bullet$ (с регенериране на ТОН)

д2 кръстосано диспропорциониране между $AscP^\bullet$ и $TO^\bullet$(регенериране ТОН)

Път а: а4 генериране на свободни радикали $LO_2^\bullet$ от реакция между ТОН и LH

а5 разпадане на LOOH до свободни радикали с участие на ТОН

Път б: б2 Н-атом трансфер от ТОН към $M_iO^\bullet$ (с регенериране на M_iOH)

б3 кръстосано-диспропорциониране между $TO^\bullet$ и $M_iO^\bullet$(реген. M_iOH)

Път в: в2 Н-атом трансфер от ТОН към $D_i(OH)O^\bullet$ (с регенериране на $D_i(OH)_2$)

в3 кръстосано диспропорциониране между $TO^\bullet$ и $D_i(OH)O^\bullet$

Път д: д3 кръстосано диспропорциониране между $AscP^\bullet$ и $TO^\bullet$

д4 кръстосано рекомбиниране между $AscP^\bullet$ и $TO^\bullet$(до неактивни продукти)

Схема 9 Комплексни механизми, включващи реакциите, с които се обясняват ефектите на (А) синергизъм и (В) антагонизъм в двойни смеси на изследваните мономери (M_iOH) и димери ($D_i(OH)_2$) със ТОН

Във всички случаи, в които е налице синергизъм, или адитивизъм между индивидуалните компоненти на една антиоксидантна композиция, може да се препоръча използването й за ефективно стабилизиране на липидния субстрат. Това е от значение за практиката и следователно въз основа на гореизложеното може да се препоръчат антиоксидантни смеси на мономерите **M_1OH**, **M_3OH**, **FA**, както и **DFA** със стандартния **TOH** (1:1) в концентрационен интервал от 0.1÷1.0mM. **$D_3(OH)_2$** може да се използва в двойни смеси с **TOH** единствено при ниски концентрации и на двата компонента, докато при 1.0 mM не се препоръчва. В някои случаи е възможно да се установи отсъствие както на синергизъм, така и на адитивизъм между индивидуалните компоненти. Обикновено при смесване на два силни антиоксиданта, когато не може да се изяви лидер между тях е възможно наблюдаване на т.нар. антагонизъм. В този случай инхибиращият ефект на сместа е по-малък от сумата от ефектите на индивидуалните компоненти.Независимо от натрупаните експериментални данни за наличие на антагонизъм между два антиоксиданта, все още е трудно да се даде категоричен и еднозначен отговор на какво се дължи този ефект. Факторите, които оказват влияние са много: структурни особености на индивидуалните компоненти, особености на окисляемия субстрат, или т.нар субстратни фактори, условия на експеримента и други.

2.2.3 Ефект на еквимоларни двойни смеси с аскорбилпалмитат (AscPH)

В таблица 10 са представени резултатите за основните кинетични параметри, получени за изследваните смеси, след обработване на съответните кинетични криви.

Присъствието на 1.0 mM от **$D_1(OH)_2$** в еквимоларно съотношение със **AscPH** осигурява по-висока окислителна стабилност на субстрата, в сравнение със **M_1OH** при същата концентрация и съотношение със **AscPH**. Независимо от това синергистичен ефект е получен само за двойната смес **M_1OH+AscPH**, докато при **$D_1(OH)_2$+AscPH** се наблюдава антагонизъм между двата компонента на сместа.

Важно е да се отбележи, че въвеждането на естерно свързана палмитинова киселина в молекулата на **AscAH** има отношение единствено към промяната в липофилността, но не и към антиоксидантните свойства на **AscAH** и **AscPH**. От сравнителни изследвания при различни концентрации на **AscAH** и **AscPH** в условия на липидно автоокисление, при едни и същи условия, проведени в лаборатория “Химия на липидите”, не се констатира промяна в получените кинетичните параметри за двете съединения. Механизмите, чрез които **AscPH** проявява своето антиоксидантно действие не са напълно изяснени. Настоящите изследвания потвърждават факта, че

AscPH е синергист, но не е инхибитор на верижно-радикаловия окислителен процес, т.е. не проявява антиоксидантна активност в изследваната система.

2.2.4 Ефект на еквимоларни тройни смеси с ТОН и AscPH

Целта е да се създадат и в последствие да се предложат високоефективни биоантиоксидантни композиции, съдържащи вещества с биологична и антиоксидантна активност, както и синергисти, какъвто е **AscPH**.

M_1OH и **M_2OH** са известни природни съединения, проявяващи биологична и антиоксидантна активност. **M_1OH** (дехидроцингерон) е активен спрямо плесени в храни (*Kubra et al. 2013*). Изследванията за този мономер като индивидуален компонент показаха, че той проявява слабо, или умерено инхибиращо действие (взависимост от концентрацията) в процеса на липидно автоокисление. Следователно е важно да се изследва ефекта от добавянето на **M_1OH** към стандартни антиоксидантни смеси, като **ТОН+ AscPH**.

Двата димера (**$D_1(OH)_2$** и **$D_2(OH)_2$**) са новосинтезирани съединения, наподобяващи по структура природните бифенили. Стабилни са при физиологични условия, за разлика от куркумина. Проявяват инхибиращо действие спрямо α-синуклеина - основен протеин, участващ в патогенезата на болестта на Паркинсон. Доказано е, че двата димера не са токсични спрямо клетъчни линии PC12 при дози от 40 μM и за разлика от куркумина. **$D_2(OH)_2$** предпазва PC12 от действието на $MnCl_2$.

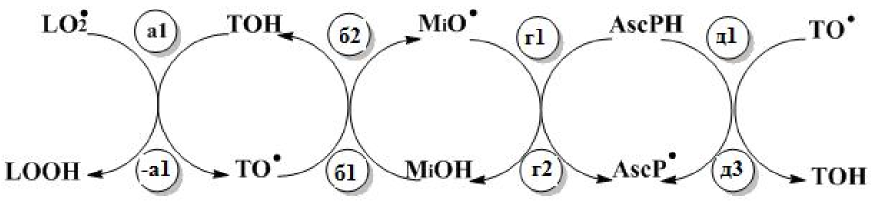
В таблица 10 са представени резултатите за основните кинетични параметри, получени за изследваните смеси, след обработване на съответните кинетични криви.

Тройната смес на **$D_1(OH)_2$** със **ТОН** и **AscPH** показа по-висока антиоксидантна ефективност и реактивоспособност от тази на **M_1OH**, докато при **M_2OH** и **$D_2(OH)_2$** се наблюдава обратната зависимост. Като цяло всички тройни смеси показаха фактор на стабилизиране (**PF**), сравним с този на двойната смес **ТОН +AscPH** (вж. табл. 10).

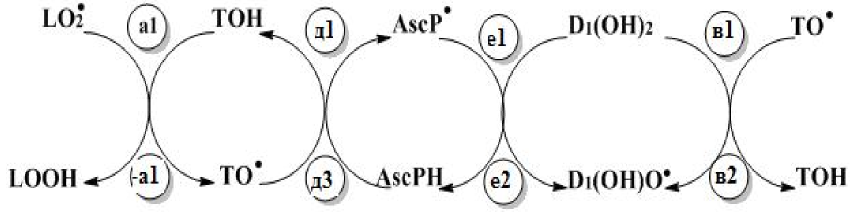
Очевидно присъствието на **AscPH** към двойните смеси с **ТОН** има съществено значение, както и присъствието на **ТОН** - за двойните смеси с **AscPH.** Важно е да се отчете какъв е ефектът от добавяне на изследваните новосинтезирани съединения към двойната смес **ТОН+AscPH,** предвид че максимално високият синергизъм е наблюдаван именно там.

На Схема 10 **(**А и Б) са представени комплексни реакционни механизми, обясняващи синергизма, получен при изследване на тройните смеси на мономерите и съответно - адитивизма (сумарния ефект), получен за **$D_1(OH)_2$+ТОН+AscPH**.

А



Б



)

В присъствие на:

M_1OH Синергизъм 32.4% Синергизъм 35.6% Синергизъм 42.4%

Синергизъм на тройната смес: 28.7% (при M_1OH) и 37.7% (при M_2OH)

Реакции, които са отговорни за синергизма:

а1 трансфер на Н-атом от ТОН към $LO_2^{•}$ (ключова реакция на инибираното окисление);

б1 трансфер на Н-атом от M_iOH към $TO^{•}$ (с регенериране на ТОН);

г1 трансфер на Н-атом от AscPH към $M_iO^{•}$ (с регенериране на M_iOH);

д1 трансфер на Н-атом от AscPH към $TO^{•}$ (с регенериране на ТОН).

Обратни реакции, водещи до понижаване на активността:

-а1 Участие на $TO^{•}$ в реакции на разпадане на LOOH до $LO_2^{•}$, водеща до понижаване на антиоксидантната активност на ТОН;

б2 трансфер на Н-атом от ТОН към $M_iO^{•}$ (с регенериране на M_iOH)

г2 трансфер на Н-атом от M_iOH към $AscP^{•}$ (с регенериране на AscPH)

д3 трансфер на Н-атом от ТОН към $AscP^{•}$ (с регенериране на AscPH)

В присъствие на:

D_1(OH)$_2$ Синергизъм 42.4% Антагонизъм 39.3% Адитивизъм

Ефект на тройната смес: адитивизъм

Реакции, които са отговорни за адитивизма между $D_1(OH)_2$ и ТОН:

а1 трансфер на Н-атом от ТОН към $LO_2^{•}$ (ключова реакция на инхибираното окисление);

д1 трансфер на Н-атом от AscPH към $TO^{•}$ (с регенериране на ТОН);

е1 трансфер на Н-атом от $D_1(OH)_2$ към $AscP^{•}$ (с регенериране на AscPH);

в2 трансфер на Н-атом от ТОН към $D_1(OH)O^{•}$ (с регенериране на $D_1(OH)_2$)

Допълнителни реакции:

-а1 Участие на $TO^{•}$ в реакции на разпадане на LOOH до $LO_2^{•}$, водеща до понижаване на антиоксидантната активност на ТОН;

д2 трансфер на Н-атом от ТОН към $AscP^{•}$ (с регенериране на AscPH)

е2 трансфер на Н-атом от AscPH към $D_1(OH)O^{•}$ (с регенериране на $D_1(OH)_2$)

в1 трансфер на Н-атом от $D_1(OH)_2$ към $TO^{•}$ (с регенериране на ТОН)

Схема 10. Комплексни механизми, включващи реакциите, с които се обясняват ефектите, получени в присъствие на еквимолатни тройни смеси със ТОН и AscPH на следните съединения: (А) мономери M_iOH и (Б) $D_1(OH)_2$

Механизмът, с който се обяснява синергизма в тройната смес на **$D_2(OH)_2$** включва реакции, аналогични на тези представени на Схема 10 **(**А) за мономерите.

Процентът синергизъм изчислен за тройната смес на **M_2OH** (37.7%) е много близък до този за двойната смес **TOH+AscPH** (42.4%). Предвид факта, че ефектът на двойната смес **M_2OH+AscPH** е сумарен (адитивизъм), а синергистичният ефект между **M_2OH** и **TOH** е едва 15.3 %, то реакции г1 и г2 Схема 10 **(**А) могат да се пренебрегнат и да се приеме, че двойната смес **TOH+AscPH** (42.4%) има основен дял в крайния ефект (на тройната смес **M_2OH+TOH+AscPH**).

Ефектите за тройните смеси при димерите (**$D_1(OH)_2$** и **$D_2(OH)_2$**) са адитивизъм и съответно синергизъм (18.5%). Реакциите, които обясняват адитивизма са представени на Схема 10 **(**Б) (а1, д1, е1 и в2). Вероятно в този случай синергизмът между **TOH** и **AscPH** се неутрализира от антагонистичния ефект между **$D_1(OH)_2$** и **AscPH**, като крайният ефект е адитивизъм, какъвто е получен и за двойната смес **$D_2(OH)_2$+TOH**.

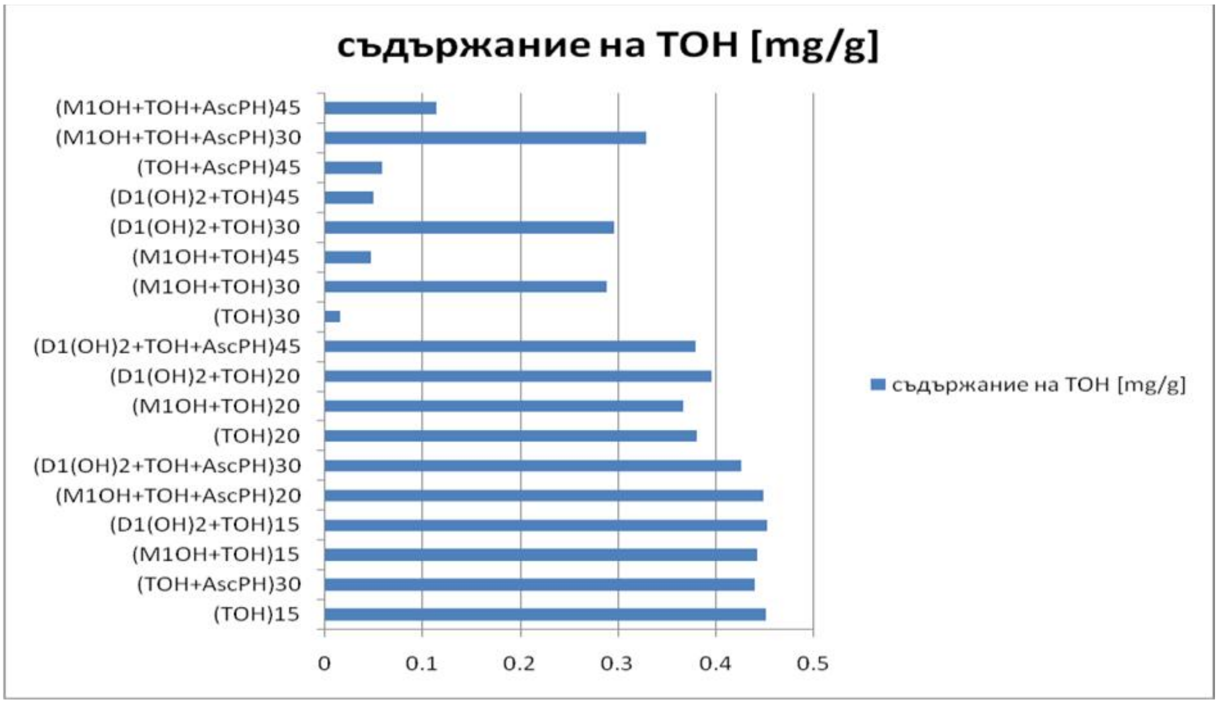
В заключение може да се каже, че добавянето на еквимоларно количество от **M_1OH** към двойната смес **TOH+AscPH (1:1)**, не води до положителна промяна, т.е. до увеличаване на синергистичния ефект (вж. табл. 10). Аналогично е и заключението ако се разгледа ефекта от добавянето на **AscPH** към двойната смес **M_1OH+TOH**. С други думи присъствието на **M_1OH+TOH** и/или на **TOH+AscPH** е достатъчно за осигуряване на оптимална стабилност на окисляемия липиден субстрат.

За двойната смес **M_2OH+TOH** е получен 15.3 % синергизъм, докато ефектът в присъствие на **M_2OH+AscPH** е адитивизъм. Вероятно тези два компонента действат самостоятелно и в тройната смес, като по този начин синергистът **AscPH** участва предимно в реакции с **$TO^\bullet$** и регенерира по-силния от двата антиоксиданта **– TOH**. Като резултат наблюдаваният ефект (37.7%) е много близък до този на **TOH+AscPH** (42.4%). Аналогичен е случаят и при **$D_2(OH)_2$+TOH+AscPH**. В присъствие на **$D_2(OH)_2$**, ефектите на смесите като цяло се характеризират с по-нисък процент синергизъм.

Синергизъм не се наблюдава в нито една от смесите (двойни, или тройни), в които **$D_1(OH)_2$** участва като компонент. В тройната смес **$D_1(OH)_2$+TOH+AscPH**, **AscPH** е антагонист спрямо действието на **$D_1(OH)_2$**, който е един сравнително силен антиоксидант при концентрация 1.0 mM. Като резултат ефектът на тази тройна смес е адитивизъм, какъвто е и ефекта на двойната смес **$D_1(OH)_2$+TOH**, а също и факторът на стабилизиране на двете смеси е еднакъв (**PF** = 35.4).

В продължение на 15 часа (при 80^{o}C) се запазва изходната концентрация на **TOH**, когато той присъства индивидуално в окисляемия липиден субстрат (Фиг. 29).

Това се дължи на реакцията на хомо-диспропорциониране между два токоферилни радикала, при което се регенерира изходната молекула на **TOH**. Същата изходна концентрация на **TOH** се подържа за два пъти по-дълъг интервал от време (вместо за 15, за 30 часа), когато **TOH** е в двойна смес с **AscPH**. Докато добавянето на **M_1OH** или неговия димер в еквимоларни количества към **TOH** не удължава интервала от време, в който се поддържа изходното ниво на **TOH**. Но ако се сравнят резултатите след 30 часа окисление се вижда за разлика от индивидуалния **TOH**, чието съдържание е почти изчерпано, в двойните смеси с мономера и димера неговото съдържание е все още доста високо. Това е от изключително значение за обясняване на ефектите на синергизъм и адитивизъм съответно при мономера и димера.



Фигура 29. Съдържание на **TOH**, определено през различни интервали от време, в h в хода на липидния автоокислителен процес на ТГСМ при 80 °С

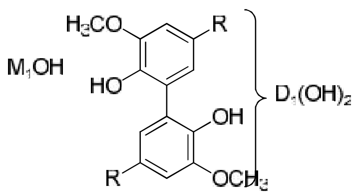
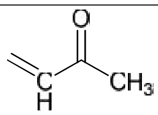
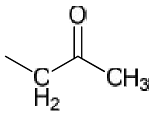
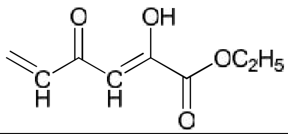
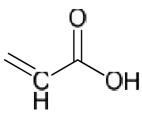
2.3 Определяне на абсолютни скоростни константи на изследваните двойки мономер/димер спрямо пероксидни радикали при инициирано окисление

Високочувствителният хемилуминисцентен метод е единственият, с който е възможно да бъдат определени абсолютните скоростни реакции на ключовата реакция на антиоксидантите с пероксидните радикали (ключова реакция на инхибираното окисление). Определени са абсолютните скоростни константи $k_{A,}$ $[M^{-1}s^{-1}]$ на изследваните мономери и димери спрямо пероксидни радикали на етилбензол

(Схема11) , съгласно уравнението: $(\mathrm{d}i_{rel}/\mathrm{d}t)_{max} = 0.237(k_A/(2k_t)^{0.5})R_{IN}$ и са представени в таблица 12.

Резултатите за скоростните константи k_A (табл. 12) на всички мономери и димери са от един и същи порядък (10^4), т.е. съединенията проявяват умерена антиоксидантна активност, сравнима с тази на бутилхидрокситолуена (BHT).

Таблица 12 Експериментално определени параметри за антиоксидантния потенциал на изследваните мономери и димери, получени от прилагане на различни моделни системи.

Кинетичен режим на окисление		**Инцииран, R_{IN} = const**		**Автоокисление**	
Мономери/ Димери	**Метод**	**ХЛ**	**ORAC**	**ЛАО**	
	**среда**	хлорбензол	вода	липидна	
	субстрат	етилбензол	флуоресцеин	ТГСМ	
	инициатор	AIBN	AAPH	-	
	температура	50^0C	37^0C	80^0C	
Заместител **R**	**параметър** **фенол**	**$k_{A,}$ 10^4 [$M^{-1}s^{-1}$]**	**RTE, [-]**	**PF, [-]**	**ID, [-]**
	M_1OH	1.7 ±0.1	3.12 ± 0.34	3.5	6.3
	$D_1(OH)_2$	4.2 ± 0.3	3.04 ± 0.10	13.5	29.3
	M_2OH	2.6 ± 0.2	3.85 ± 0.14	3.5	5.5
	$D_2(OH)_2$	5.1 ± 0.3	2.97 ± 0.12	5.8	8.8
	M_3OH	2.6 ± 0.2	5.6 ± 0.2	5.8	9.8
	$D_3(OH)_2$	3.4 ± 0.2	5.22 ± 0.13	12.8	11.0
	FA	1.6 ± 0.1	2.56 ± 0.10	3.2	4.4
	DFA	4.1 ± 0.3	1.98 ± 0.06	3.3	4.2

***За куркумин е определена следната стойност за k_A:** (4.3 ± 0.3) 10^4 $M^{-1}s^{-1}$

Димерите **$D_1(OH)_2$**, **$D_2(OH)_2$** и **DFA** показват от 2÷2.5 пъти по високи скоростни константи, в сравнение с тези, получени за съответните им мономери (**M_1OH**, **M_2OH** и **FA**). Следователно двата еднакви фенолни фрагмента при димерите действат самостоятелно и независимо една от друга, което е в съответствие с извода на *Ross и сътр.* за активността на куркумина и дехидроцингерона **M_1OH** (1/2 молекула куркумин) спрямо пероксидни радикали на стирол в същия кинетичен режим и разтворител. Нещо повече – резултатите от настоящото изследване доказват, че начинът на свързване в една молекула на двете *орто*-метоксизаместени „половини”, т.е. образувайки дълга спрегната хептадиенонова верига (както е при **куркумин**), или директно в C2-симетричен бифенил **$D_1(OH)_2$**, не е от значение за инхибиращата способност на съединенията.

Сравняването на стойностите на k_A за **M_1OH** и **FA** показва, че те са много близки, както бе установено и при изследването на способността им да улавят свободни радикали. Куркуминът и **$D_1(OH)_2$** показаха почти еднакви стойности за скоростните константи - 4.3 10^4 $M^{-1}s^{-1}$ и съответно 4.2 10^4 $M^{-1}s^{-1}$. И в това изследване **$D_2(OH)_2$** е с най-висока активност спрямо $RO_2^•$ от димерите, както се установи и при изследванията на антирадикаловата активност спрямо $DPPH^•$.

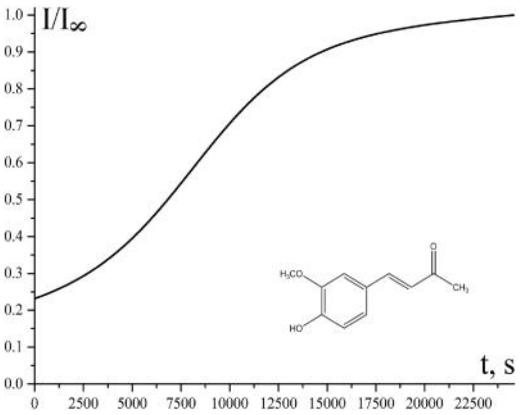
$D_3(OH)_2$ показа 1.3 пъти по-висока стойност за k_A в сравнение с тази, получена за съответния му мономер **M_3OH**, което вероятно се дължи на стерични фактори.

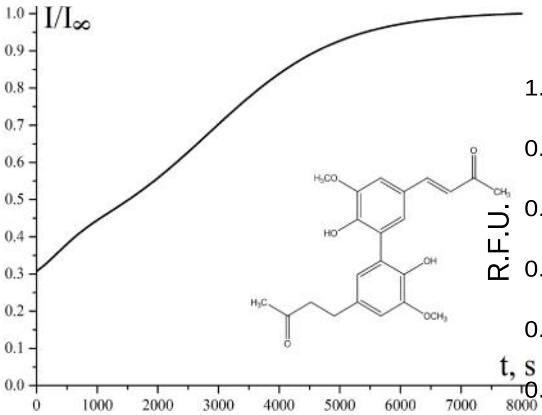
Важно е да се отбележи и фактът, че в същата моделна система и при същите условия, получената стойност за k_A на DL-α-токоферол (**TOH**) е с два порядъка по-висока, от тези на изследваните мономери/димери - $k_A^{TOH} = (1.0 \pm 0.1)\ 10^6\ M^{-1}s^{-1}$.

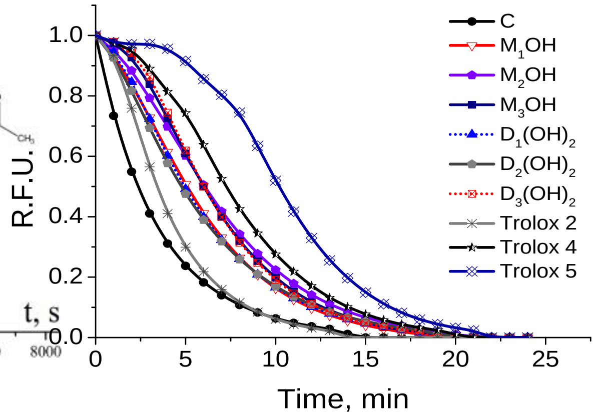
2.4 Определяне на активността на изследваните двойките мономер/димер димер спрямо пероксидни радикали в условия на иницирано окисление във водна среда (ORAC)

От изчислените резултати за RTE (табл. 12, Фиг. 31) се вижда, че димерите проявяват близка, а в някои случаи дори по-ниска активност от тази на съответните им мономери. Референтът (тролокс) проявява малко по-висока, но сравнима активност с тази на изследваните съединения единствено ако присъства в 5-кратно по-висока концентрация (2.5 μM) от тях (0.5 μM). При 0.625 μM тролоксът е изключително слабо активен и поведението на кинетичната крива в този случай е близко до това на празната проба.

От получените резултати (вж.табл. 12) може да се заключи, че във водна среда не се наблюдават различия в антиоксидантното действие между изследваните мономери и димери по класическия реакционен механизъм на водороден трансфер. Причината за това, би могла да е в солватиращия ефект на водата върху OH-групите, водещ до силно намаляване и загуба на активност.







Фигура **30.** Кинетични криви на инхибиране на верижно-радикаловия процес на окисление на етилбензол при 50 ^oC в присъствие на **M_1OH** (A) и **$D_1(OH)_2$**(A')

Фигура 31 Б. Кинетични криви на гасене на сигнала на **FLOH** в отсъствие (празна проба) и в присъствие на изследваните мономери **M_1OH - M_3OH** и димери **$D_1(OH)_2$ – $D_3(OH)_2$** в крайна концентрация 0.5 μM.

$$Y \rightarrow 2r^\bullet \qquad (R_{IN})$$

$$Y^\bullet + O_2 \rightarrow YO_2^\bullet$$

$$YO_2^\bullet + RH \rightarrow YOOH + R^\bullet$$

$$R^\bullet + O_2 \rightarrow RO_2^\bullet$$

$$RO_2^\bullet + RH \rightarrow ROOH + R^\bullet \qquad (k_p)$$

$$2RO_2^\bullet \rightarrow R{=}O^* + ROH + O_2 \qquad (2k_t)$$

При мономери:

$$RO_2^\bullet + M_iOH \rightarrow ROOH + M_iO^\bullet \qquad (k_{Am})$$

$$RO_2^\bullet + M_iO^\bullet \rightarrow \text{неактивни продукти} \qquad (k'_{Am})$$

При димери:

$$RO_2^\bullet + D_i(OH)_2 \rightarrow ROOH + D_i(O^\bullet)OH \quad (k_{Ad})$$

$$RO_2^\bullet + D_i(O^\bullet)OH \rightarrow ROOH + D_i(O^\bullet)_2 \quad (k'_{Ad})$$

$$2RO_2^\bullet + D_i(O^\bullet)_2 \rightarrow \text{неактивни продукти} \quad (k''_{Ad})$$

Схема 11 Основна кинетична схема в ХЛ.

$$Y \rightarrow 2r^\bullet \qquad (R_{IN})$$

$$Y^\bullet + O_2 \rightarrow YO_2^\bullet$$

$$YO_2^\bullet + FLOH \rightarrow YOOH + FLO^\bullet \qquad (k_{FL})$$

$$YO_2^\bullet + FLO^\bullet \rightarrow \text{неактивни продукти} \qquad (k'_{FL})$$

При мономери:

$$YO_2^\bullet + M_iOH \rightarrow YOOH + M_iO^\bullet \qquad (k_{Am})$$

$$YO_2^\bullet + M_iO^\bullet \rightarrow \text{неактивни продукти} \qquad (k'_{Am})$$

При димери:

$$YO_2^\bullet + D_i(OH)_2 \rightarrow YOOH + D_i(O^\bullet)OH \quad (k_{Ad})$$

$$YO_2^\bullet + D_i(O^\bullet)OH \rightarrow YOOH + D_i(O^\bullet)_2 \quad (k'_{Ad})$$

$$2YO_2^\bullet + D_i(O^\bullet)_2 \rightarrow \text{неактивни продукти} \quad (k''_{Ad})$$

Схема 12 Основна кинетична схема при ORAC

Другата по-вероятна причина за подобните активности на мономерите и димерите е, че те не са предпочетена „мишена” за атаката на пероксидните радикали спрямо флуоресцеина (Схема 12). Не би следвало да се очаква висок инхибиращ ефект, както на мономерите, така и на димерите (които в нашия случай са монофенолен тип съединения), спрямо окислителното деградиране на субстрата (**FLOH**) – друг монофенол. Всички съединения, в т.ч. и **FLOH** имат близки енталпии на дисоциация на O-H-връзката на фенолната група, които ще бъдат разгледани в т 2.5.

2.5 Квантовохимични изчисления

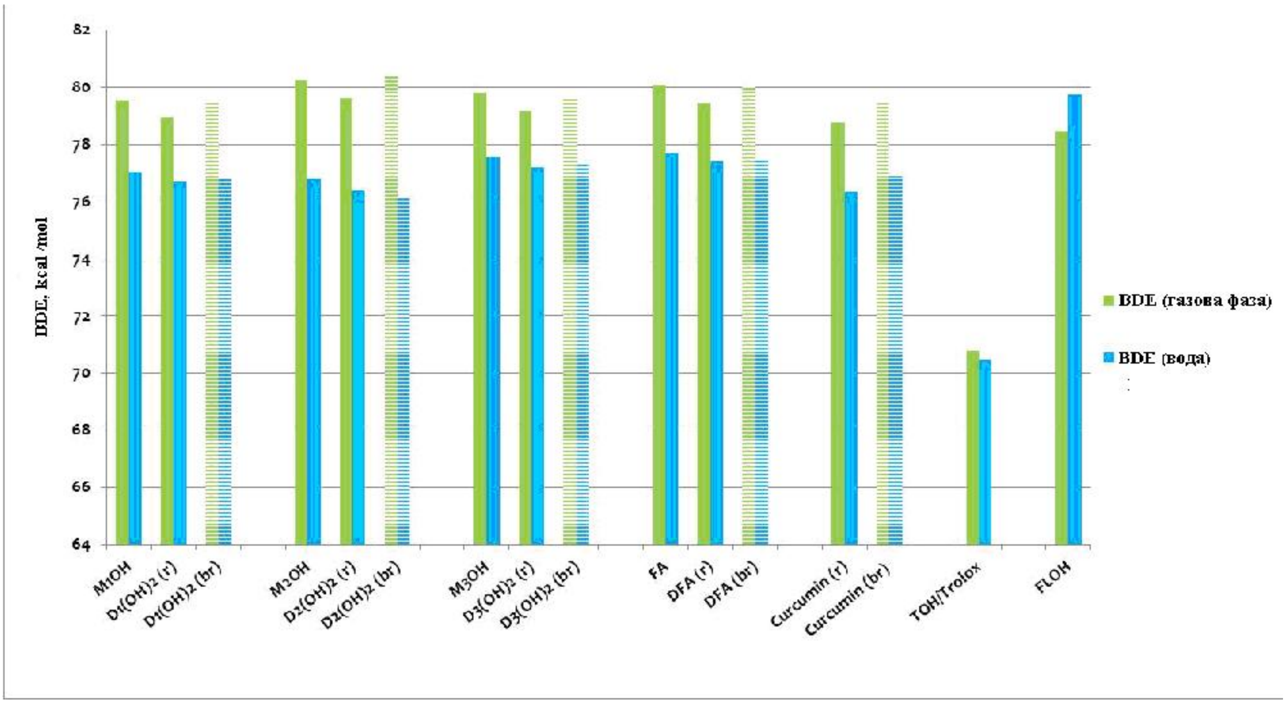
От мономерите са взети под внимание единствено ротамерите с вътрешномолекулни водородни връзки между фенолната и метокси-групата. При **M_3OH**, структурите с водородна връзка между енолната и кето-групата в страничната верига, са обект на настоящите изследвания. При хидроксилираните бифенили са взети под внимание, както структурите (i) с водородна връзка между фенолната и метокси-групата, така и тези (ii) с водородна връзка между двете фенолни групи от двата пръстена. Разликите в енталпиите на **$D_1(OH)_2$**, **$D_3(OH)_2$** и **DFA** са много близки по стойност (1.95-2.18 kcal/mol), докато разликата в енталпията, изчислена за **$D_2(OH)_2$** е само 0.63 kcal/mol. Имайки предвид факта, че **$D_2(OH)_2$** е единственият димер, при който страничните вериги са наситени, вероятно по-малката разлика в енталпията при него се дължи на по-високата „гъвкавост” (пространствена свобода) на структурата му. Структурите с вътрешномолекулни водородни връзки между OH-групите от двата пръстена отпадат от по-нататъшни изследвания, поради високата им енталпия (H_{298}) и деформирането на образуваният при това положение 7-членен пръстен.

При мономерите стойностите, изчислени за BDE са много близки (най-голямата разлика е 0.7, т.е. по-малко от 1 kcal/mol), следователно не се очакват съществени разлики в активността на мономерите спрямо $DPPH^{\bullet}$ и пероксидните радикали.

За всички мономери и димери са изчислени две стойности за BDE, съответстващи на способността им да образуват моно- (r) и бирадикали (br). Стойностите за BDE (birad) на димерите са еднакви или много близки до BDE на съответните мономери, като във всички случаи BDE (r) < BDE (br) с разлика в интервал от 0.45-0.84 kcal/mol.

Структурите на изследваните **M_iOH** и **$D_i(OH)_2$** са оптимизирани във вода, като целта е да се отчете ефекта на разтворителя като диелектрик. На Фиг. 32 е представено графично сравнение на стойностите за BDE (kcal/mol) на съединенията в газова фаза и във вода. Във водна среда всички съединения се характеризират като цяло с по-ниски стойности на BDE. За двойките **$M_3OH/D_3(OH)_2$** и **FA/DFA** тези стойност са много близки. Разликите от сравнението, представено на Фиг 33 са най-значителни при двойката **$M_2OH/D_2(OH)_2$**. Бирадикалът на **$D_2(OH)_2$** се характеризира с по-ниска стойност за BDE(br) от тази на монорадикала BDE(br). Наблюдаваната тенденция в промяната на диедричния ъгъл между бензеновите пръстени в структурите на димерите във водна среда, също е различна. Молекулите са” по-усукани”, образуването на радикал драстично намалява диедричния ъгъл, а последващото образуване на бирадикал отново го увеличава.

Във вода, стойностите за BDE(r) на **$D_2(OH)_2$** и **$D_1(OH)_2$** са почти еднакви. В газова фаза **FLOH** се характеризира с BDE, близка до тази на мономерите (**M_iOH**). Във водна среда, разликите в стойностите за BDE на **M_iOH** и **$D_i(OH)_2$** спрямо тази на **FLOH** се повишават, но относителните стойности за BDE_{FLOH}/BDE_{MiOH} и $BDE_{FLOH}/BDE_{Di(OH)2}$ са от порядъка на 1.03-1.04 kcal/mol, т.е. ≈ 1 kcal/mol. Следователно се очаква **M_iOH** и **$D_i(OH)_2$** да имат близка активност спрямо пероксидните радикали, но малко по-висока от тази на **FLOH**. Това е в съответствие с получените експериментални резултати от прилагането на метода ORAC.



Фигура 33. BDE (в kcal/mol) в газова фаза (в зелено) и във вода (в синьо). С плътно оцветените барграфи са представени стойностите за BDE за монорадикалите на мономерите и димерите– а със защриховани– тези на бирадикалите на димерите

2.6 Сравнителен анализ на резултатите от прилагане на комплексния подход, включващ различни методи

При еднакъв кинетичен режим (иницииран R_{IN} = const) на окисление, може да се търси корелация между получените резултати за двойките $\mathbf{M_iOH/D_i(OH)_2}$ от прилагане на метода ORAC (водна среда) и резултатите за скоростните им константи (ХЛ, в хлорбензол). Водната среда драстично променя условията на опита, независимо, че и в двата случая (при ORAC и ХЛ) имаме режим на иницииранo окисление - R_{IN} =const. В този случай се наблюдават два парадокса :

<u>1-ви парадокс:</u> Във водна среда, активността на изследваните мономери по класически механизъм на водороден атомен трансфер е близка, дори по-висока от тази на съответните димери.

<u>2-ри парадокс:</u> тролокс- водоразтворимия аналог на ТОН, проявява по-слаба антиоксидантна активност в сравнение с всички изследвани $\mathbf{M_iOH}$ и $\mathbf{D_i(OH)_2}$, които са *орто*-метоксифеноли с доста по-ниски стойности на BDE от тази на тролокс.

Подобната активност на изследваните $\mathbf{M_iOH}$ и $\mathbf{D_i(OH)_2}$ може да се обясни с близките стойности за BDE, получени за **FLOH**, $\mathbf{M_iOH}$ и $\mathbf{D_i(OH)_2}$

Солватиращият и йонизиращият ефект на водата играят ключова роля, не само спрямо активността на фенолните групи, но и спрямо други фрагменти от молекулите на изследваните съединения (например кето-енолната част, при $\mathbf{M_3OH/D_3(OH)_2}$, или карбоксилната група при тролокс, **DFA** и **FA**).

Данните от квантово-химичните изчисления показват, че в газова фаза няма съществена разлика в стойностите за BDE на мономерите и димерите, в т.ч. и куркумин. Това потвърждава за пореден път факта, че двете фенолни групи в молекулите на димерите действат самостоятелно и независимо една от друга. При сравняването на отделните двойки $\mathbf{M_iOH\ /D_i(OH)_2}$ се вижда, че димерите като цяло имат по-ниски стойности за BDE от съответните мономери, което е в съответствие с експерименталните резултати от изследванията в неполярна среда (ЛАО, ХЛ).

Изводи:

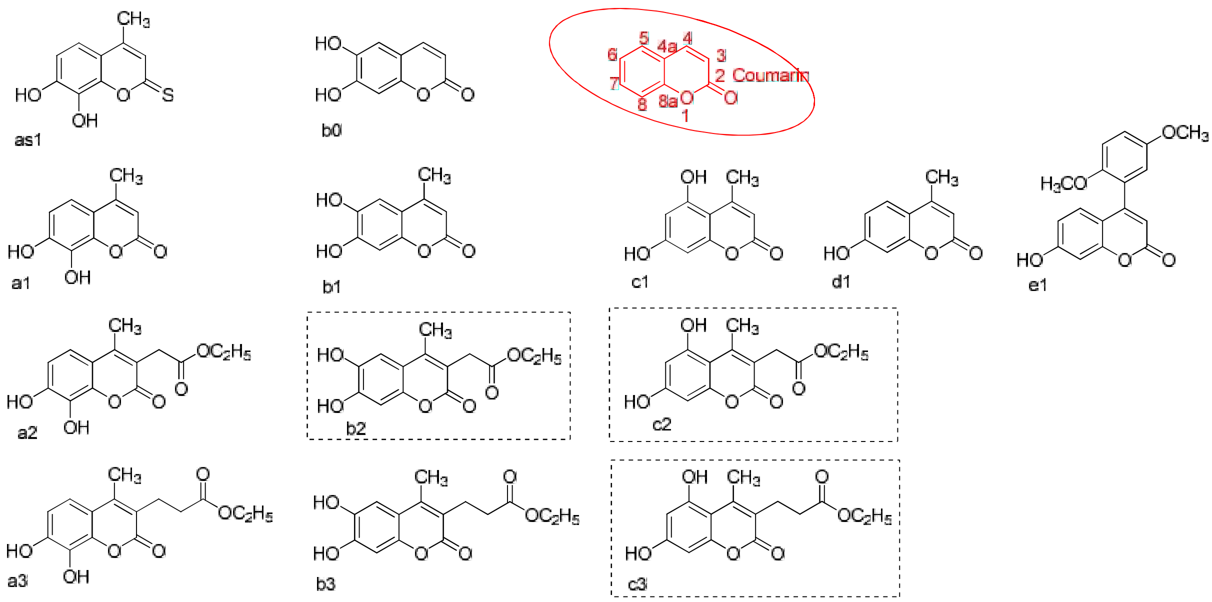
Получени са нови резултати за антиоксидантните свойства на новосинтезирани бифенилни съединения - димери, както и за съответните им мономери структурни аналози и/или разпадни продукти на куркумин. Димерите показват по-висока (от 2 до 4 пъти) антирадикалова и антиоксидантна активност от съответните мономери в безводна и хомогенна липидна среда. Обратно на това поведение – във водна среда мономерите и димерите показаха сходна активност спрямо пероксидни радикали.

Присъствието на α,β-ненаситената верига в *пара*-позиция спрямо фенолната група на изследваните съединения е от значение за резонансното стабилизиране на феноксилния радикал. **$D_2(OH)_2$**, който проявява най-силна антирадикалова активност спрямо DPPH•- не е ефективен инхибитор на верижно-радикалови процес на липидното автоокисление., поради липсата на ненаситена странична верига в пара-позиция, осигуряваща възможността за резонансно стабилизиране на феноксилния радикал. Като цяло получените теоретични резултати са в съответствие с експериментално определените кинетични параметри (скоростни константи и фактор на стабилизиране).

Изследвани са двойни и тройни смеси със стандартни антиоксиданти в условия на липидно автоокисление, на бифенилни съединения (димери), както и някои от техните съответни мономери. Доказано е с прилагане на ВЕТХ, че синергизма при двойни и тройни смеси с **ТОН** се дължи на неговото регенериране в хода на окислителния процес, като изходното му съдържание се запазва за един сравнително дълъг период на окисление. Получените резултати за синергизъм на двойните смеси на изследваните мономери и димери със **ТОН**, както и на тройните смеси на някои от тях, могат да се използват като база за по-нататъшни разработки като добавки в масла.

3. Кумарини

На фигура 35 са представени структурите на изследваните моно- и дихидроксикумарини.



Фигура 35. Структури на изследваните кумарини: серия **a*i*** (*i* = 1÷3), серия **b*i*** (*i* = 0÷3), серия **c*i*** (*i* = 1÷3), **d1, e1** и **as1.**

Някои кумарини (**a1**, **a2**, **b1**, **c1** и **d1)** са предоставени за изследване на по-ранен етап, като получените резултати за антиоксидантна активност са публикувани от Kancheva *et al* (*2010b*) и са използвани за сравнителен анализ с новосинтезираните и предоставени на по-късен етап кумаринови производни: **as1**, **a3**, **b2**, **b3**, **c2**, **c3** и **e1**. Предсказана е енталпията на дисоциация за OH-връзка (BDE) за фенолните групи на дихидрокси заместените кумарини: **b2**, **c2** и **c3.**

3.1 Антирадикалова активност спрямо моделен радикал (DPPH•)

Въз основа на получените резултати (вж. табл. 20), изследваните съединения са разделени в три основни групи. Направен е сравнителен анализ със стандартни антиоксиданти (**TOH**, **CA** и **GA**).

Група А съединения със силна активност (%RSA > 40%):

a3 (64.2%) >**TOH** (61.1%) >**CA** (58.6%) > **GA= a1** (45.8%)

Група Б съединения с умерена активност (15% < % RSA <40%):

b3 (21.2%) > **b1** (17.3%) > **as1** (15.8%)

Група В съединения със слаба активност (%RSA< 15%):

BHT(3.6%) > **d1** (2.2 %) ≈ **e1** (2.1%)

Таблица 20 . Теоретични дескриптори (BDE в газова фаза и в ацетон) и експериментално получени стойности за основни кинетични параметри: антиоксидантна ефективност, представена като фактор на стабилизиране (**PF**) на липидния автоокислителен процес, % RSA и стехиометричен фактор за бързата (n_2) и тоталната кинетика (% RSA и ***ntot***) на взаимодействие на кумарините с DPPH•

Кумарини	BDE в газова фаза	PF -	BDE в ацетон	RSA_{fast}, %	n_2, M	RSA_{tot}, %	n_{tot}, M
a1	77.76	1.3	75.54	35.8	0.9	49.1	1.1
a2	77.29	1.5	75.14	-	-	-	-
a3	77.25	1.4	75.15	48.8	1.2	64.2	1.6
b0	73.21a	3.7	75.04b	-	-	-	-
b1	73.38a	3.4	74.65b	16.3	0.4	17.3	0.4
b3	72.74a	3.4	74.38b	18.6	0.5	21.2	0.5
c1	81.96	1.2	82.67	3.0	0.1	3.0	0.1
c2	81.32	1.2	82.22	-	-	-	-
c3	81.09	1.1	81.60	-	-	-	-
d1	82.55	1.0	82.57	2.2	0.1	2.2	0.1

Ефект на реакционното време. От изчислените стойности за стехиометричните коефициенти за бързата и тоталната кинетика ($n_{2'}$ и n_{tot}) на моно- и дихидрокси-кумарините се вижда, че те остават непроменени с времето. Единствено при **a3** се наблюдава малка промяна в стойностите за $n_{2'}$ и n_{tot}.

Получените резултати за антирадикаловата активност на изследваните дихидроксикумарини показват следната тенденция - 7,8-дихидрокси-4-метил-кумарините (**a1** и **a3**) проявяват ясно изразена силна антирадикалова активност, 6,7-дихидрокси-4-метил-кумарините (**b1** и **b3**) показват умерена активност, а 5,7-дихидрокси-4-метил кумарина (**c1**) и 7-хидрокси-4-метил-кумарина (**d1**) слаба активност.

3.2 Изследване на инхибиращата способност на моно- и дихидрокси-4-метил-кумарини в условия на липидно автоокисление – самостоятелно и в смеси

Зависимост между структура и антиоксидантна активност

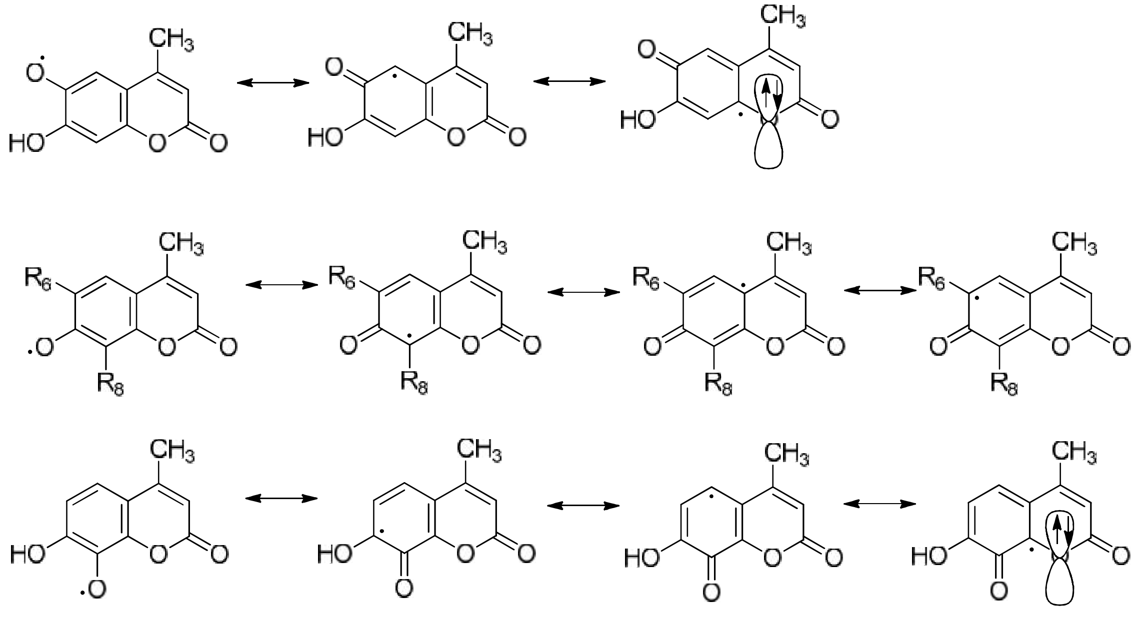
Ефект на заместителите в пръстен А. При дихидроксикумарините, освен разположението на двете ОН-групи една спрямо друга, от съществено значение е също и разположението им спрямо кислородния атом от хетероцикъла, т.е. от пироновия пръстен В. От това зависи къде ще бъде предпочетена атаката от страна на пероксидните радикали, както и възможните резонансни структури на феноксилния радикал. 5,7-дихидрокси заместените кумарини (**c*i***) проявяват активност, близка до тази на монофенола **d1**. От катехолите - 6,7-дихидрокси-заместените-4-метилкумарини от серия **b*i*** са по-силни инхибитори на верижно-радикаловия автоокислителен процес от 7,8-дихидроксизаместените аналози, независимо от това, че последните проявяват по висока активност като уловители на свободни радикали.

На Фиг. 38 са представени възможните резонансни структури на 6,7-дихидрокси- и 7,8-дихидрокси-4-метилкумарините от серии **a*i*** и **b*i***. От схемата се вижда, че отцепването на Н-атом от позиция С-6 осигурява път на резонансно стабилизиране, при който е възможно взаимодействие със свободната електронна двойка при кислородния атом от пироновия пръстен В. Такова взаимодействие не е възможно при отцепване на Н-атом от съседната позиция С-7.

Път а

Път б

Път в



Фигура 38. Възможни резонансни структури на 6,7-дихидрокси- и 7,8-дихидрокси-4-метилкумарините, в зависимост от позицията на фенолната група, от която се отцепва Н-атом.

При 7,8-дихидрокси-4-метилкумарините фенолната група в позиция С-8 е в непосредствена близост до кислородния атом от пръстен В и това може да доведе до повишаване на енергията, необходима за отцепване на водороден атом от групата.

Ефект на заместителите в пръстен В. Направени са сравнения между дихидроксикумарините от една и съща серия (серия **a*i*, b*i*,** или **c*i***), различаващи се единствено по наличието на заместител в С-3-позиция. От сравнението на резултатите за фактора на стабилизиране (**PF**) в присъствие на дихидроксикумарините с катехолова структура от серии **a*i*, b*i*** при високата концентрация (вж.таблица 20), се вижда че въвеждането на заместител в позиция С-3 в пръстен В води до известно повишаване на антиоксидантната ефективност. При 5,7-дизаместените кумарини се наблюдава обратна тенденция-, т.е. заместителя в позиция С-3 води до слабо понижаване в активността.

Изследване ефекта на еквимоларни двойни (1:1) смеси с ТОН и тройни (1:1:1) смеси с ТОН и аскорбилпалмитат (AscPH)

С цел изследване на ефекта на кумарините с **ТОН**, бяха подбрани следните представители: **a1**, **a3**, **as1**, **b1**, **b3**, **c1**, **d1** и **e1**, които се различават в: броя фенолните групи, взаимното им разположение в пръстен А и заместителите в пръстен В. Обработката на кинетичните криви и получените кинетични параметри са отразени в табл. 17. За разработване на тройни антиоксидантни композиции с **ТОН** и аскорбилпалмитат **AscPH** бяха избрани кумарините **a3**, **b3** и **d1**, които в еквимоларни двойни смеси с **TOH** показаха адитивен (сумарен) ефект и кумаринът **a1**, при който ефектът на двойната смес с **TOH** е синергизъм.

Доказано е наличие на синергизъм единствено за двойната смес **a1**+**TOH** , тъй като за нея е изпълнено условието: $IP_{AOH} + IP_{TOH} < IP_{AOH+TOH}$ (*Kancheva et al., 2010б*).

Адитивен ефект показаха двойните смеси на **a3** и **b3**: $IP_{AOH} + IP_{TOH} \approx IP_{AOH+TOH}$

По долу са представени редовете на намаляване в стойностите, определени за фактора на стабилизиране (PF) на окисляемия субстрат в присъствие на изследваните индивидуални съединения и техните еквимоларни (1:1) двойни смеси.

<u>**PF (0.1mM):**</u> a1+TOH (9.5) > TOH (8.1) >> a1 (1.3);
TOH (8.1) > as1+TOH (4.2) > as1 (1.6);
a3+TOH (9.9) > TOH (8.1) >> a3 (1.4);
b1+TOH (9.8) > TOH (8.1) > b1 (3.7);
b3+TOH (12.4) > TOH (8.1) > b3 (3.4);
TOH (8.1) > c1+TOH (7.3) >> c1 (1.2);

От представените по-горе редове се вижда, че еквимоларните двойни смеси на **a1** и **b1** (*Kancheva et al., 2010б*)**,** както и на **a3** и **b3** обезпечават по-висока окислителна стабилност на липидния субстрат в сравнение с индивидуалните компоненти. Независимо от това ефектът, получен за двойната смес **b1+TOH** е антагонизъм, тъй като е на лице зависимостта : $IP_{AOH} + IP_{TOH} > IP_{AOH+TOH}$.

Еквимоларните двойни смеси на **c1+TOH** и на **as1+TOH** обезпечават по-слабо стабилизиране на окисляемия липиден субстрат в сравнение с индивидуалния **TOH**. Ефектът от добавянето на тези два кумарина в комбинация с **TOH** е антагонизъм.

Замяната на кислородния атом от позиция С-2 от пироновия пръстен на 7,8-дихидрокси -4-метилкумарина **a1** със сяра при **as1** като цяло влияе негативно , както на антирадикаловата, така и на антиоксидантната активност (вж. табл 20).

Следователно не се препоръчва използването на: 5,7-дихидроксикумарина **c1**, и на 7,8-дихидрокси-4-метил-тиокумарина **as1** в двойни смеси с **TOH**.

Много са факторите, които влияят върху крайния резултат, но в конкретния случай е важно да се отбележат следните:

- При **TOH** и при кумарините от серии **a*i*** и **b*i*** е възможно ***хомо***-диспропорциониране с регенериране на изходната молекула на антиоксиданта;

- Скоростните константи на реакциите на **TOH,** както и на катехоли, с пероксидните радикали са доста високи и като цяло са от един и същи порядък (10^6 $M^{-1}s^{-1}$), т.е. – те са силни антиоксиданти.
- При кумарините от серии **a*i*** и **b*i*** е възможно допълнителното стабилизиране на феноксилния радикал със свободната електронна двойка на кислородния атом от пироновия пръстен B, който е доказан за **TOH**.

На Схема 13 е представен комплексен реакционен механизъм, включващ реакции, обясняващи получените ефекти за двойните смеси на 6,7-дихидроксикумарините с **TOH**.

От резултатите за индукционните периоди (IP) и фактора на стабилизиране (PF) при ниската концентрация (0.1 mM) се вида, че **TOH** е по-силния антиоксидант:

$PF_{TOH} > PF_{bi}$

Следователно реакцията на H-трансфер от изходната молекула на единия антиоксидант **$Q(OH)_2$** към феноксилния радикал на другия **$TO^{\bullet}$** , или обратната реакция – от **$Q(OH)O^{\bullet}$** към **TOH** са важни за обясняване на ефектите получени за двойните смеси на **b1** и **b3** с **TOH**. От съществено значение е дали тази равновесна реакция е изместена в посока на регенериране на **TOH**, или обратно.

Реакциите на кръстосано диспропорциониране между феноксилните радикали **$Q(OH)O^{\bullet}$** и **$TO^{\bullet}$**, при които е възможно, както регенериране на **TOH**, така и на **$Q(OH)_2$** също са от значение при положение, че $PF_{TOH} > PF_{bi}$.

От представените структури на резонансно стабилизиране на радикалите (вж схема 12), получени след отцепване на H-атом, се вижда, че 6,7-дихидроксикумарините могат да действат по сходен механизъм с **TOH**. Полученият адитивен ефект при **b3**, показва, че двата антиоксиданта действат независимо един от друг.

В Табл. 18 са представени резултатите за ефектите, отразяващи не само индивидуалния принос на всеки компонент на тройната смес, но също и ефекта между всеки два компонента. До момента няма общоприета зависимост (закономерност), съгласно която да се определя (процентно) синергистичния ефект на композиции, съдържащи повече от два компонента. В случаите, когато антиоксидантната смес е три- или многокомпонентна, ефекта може да се отчете следвайки класическия подход на формулиране (*Shahidi & Wanasundara, 1992*), по аналогия с двукомпонентните смеси (Ефект I, Табл. 18).

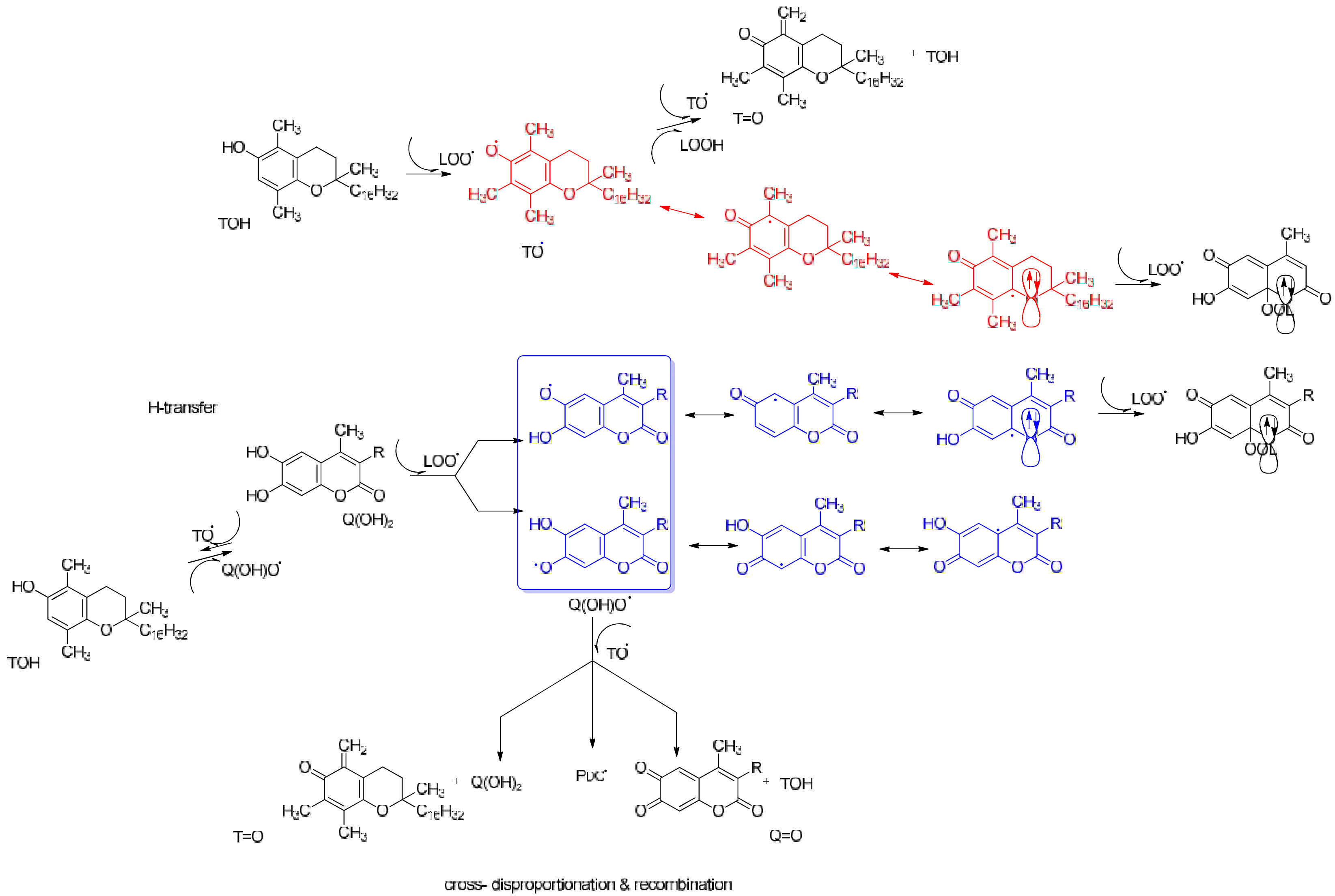


Схема13 Комплексен реакционен механизъм, включващ реакциите отговорни за наблюдаваните ефекти в двойните смеси на кумарините **b*i*** с **TOH**

В това изследване за първи път са представени зависимости, по които се определя синергизъм за тройни смеси (Ефекти II и III, Табл. 18), различни от класическия подход, за които се изисква детайлно изследване на ефектите между всеки два компонента на сместа.

От представените в таблица 18 резултати се вижда, че при всички случаи добавянето на кумарините към двойната смес **TOH**+ **AscPH** (IP = 16.3 h) в еквимоларни съотношения (1:1:1) стабилизира в по-висока степен окисляемия субстрат и също така изпълнява условието за синергизъм: **IP_p>($IP_{AscAH+TOH)}$ +IP_A.**

Таблица 18 Ефекти (I, II и III) на еквимоларните тройни смеси **$IP_{AscPH+TOH}$=16.3h**

Еквимоларни (1:1:1) тройни смеси с α-токоферол и аскорбилпалмитат, в концентрация 0.1mM						
1:1:1	**IP_p h**	**IP_{AH} h**	**pIP**	[1] **Ефект I** %	[2] **Ефект II** %	[3] **Ефект III** %
a1+TOH+AscPH	21.5±1.5	2.0	13.8	**Синергизъм 55.8%**	**Синергизъм 17.5%**	**Синергизъм 38.7%**
a3+TOH+AscPH	20.0±2.0	2.4	14.2	**Синергизъм 44.4%**	**Синергизъм 7.0%**	**Синергизъм 41.8%**
b3+TOH+AscPH	24.0±2.0	4.4	16.2	**Синергизъм 48.2%**	**Синергизъм 15.9.%**	**Синергизъм 39.7%**
d1+TOH+AscPH	15.0±1.0	1.5	13.3	**Синергизъм 12.8%**	[4] Антагонизъм 15.7%	**Синергизъм 14.5 %**

Забележки: [1] **Ефект I: IP_p>(IP_{AOH}+IP_{TOH}+IP_{AscPH})**

[2] **Ефект II: IP_p>($IP_{AscPH+TOH}$+IP_{AOH})**

[3] **Ефект III: IP_p>($IP_{AOH+TOH}$+IP_{AscPH}**

[4] **%Антагонизъм 5: {[(IP_{AOH}+$IP_{TOH+AscPH}$) - IP_p] /(IP_{AOH}+$IP_{TOH+AscPH}$)} 100, %**

3.3 Квантово-химични изчисления

Квантовохимичните изчисления показаха, че разликата в енталпиите между двата възможни ротамера при 7.8-дихидроксикумарините е около 5 kcal/mol, докато ротамерите на 6.7-дихидроксизаместените кумарини имат почти еднакви енталпии (ΔH_{298} = 0.06÷0.21 kcal/mol). Изчислените енталпии на дисоциация на O-H-връзка в газова фаза на по-стабилните ротамери на 7.8-дихидроксикумарините от серия **b*i***, са по-високи тези на ротамерите на 6,7-дихидроксикумарините, което е в съответствие с експериментално получените стойности на фактора на стабилизиране на липидния субстрат в присъствие на изследваните кумарини.

Получено е добро съответствие между теоретично предсказаната и експериментално определената антиоксидантна активност на моно- и дихидрокси-кумарините. На тази база бяха предложени структурите на три нови съединения 5,7-дихидроксизаместените кумарини (**c2** и **c3**) и на 6,7-дихидроксизаместения кумарин (**b2),** с очаквани антиоксидантни свойства. След синтезирането им и тестването на антиоксидантната им активност – хипотезата беше потвърдена.

Необходимо е да се отчете солватиращият ефект на разтворителя и възможното участие на фенолните групи в междумолекулни водородни връзки с молекулите на ацетона.

3.4 Сравнителен анализ между експериментални и теоретични резултати

Направени са сравнения на теоретичния дескриптор BDE с %RSA за бързата и тоталната кинетика и с основните кинетични параметри, характеризиращи антирадикаловата и антиоксидантната активност на изследваните съединения - стехиометричен фактор за бързата (n_2) и тоталната (n_{tot}) кинетика на взаимодействие на кумарините с $DPPH^{\bullet}$ и фактора на стабилизиране на липидния субстрат (PF).

Стойностите за PF на съединенията, показали най-ниска BDE в газова фаза (**b0**÷**b3)** се движат в интервал от 3.4÷3.7, докато при всички останали кумарини тези стойности са между 1.0÷1.5. С други думи – кумарините от серия **b*i*** проявяват най-висока антиоксидантна ефективност в хода на липидното автоокисление на ТГСМ. Това е в съответствие с изчислените в газова фаза BDE стойности на изследваните кумарини: съединенията с най-високи стойности за **PF** имат най-ниски BDE стойности и обратно. Кумарините от серия **a*i*** (**a1**÷**a3**) проявяват най-висока антирадикалова активност (%RSA > 40%), тези от серия **b*i*** (**b1**÷**b3**) – умерена активност (15%< %RSA < 40%), а най-слаба активност проявяват *мета*-заместените дихидроксикумарини от серия **ci** и 7-хидроксикумарина **d1**. BDE стойностите в ацетон за двете серии орто-заместени кумарини –**a*i*** и **b*i*** са близки, като варират в интервала от 74.38-75.54 kcal/ mol. Невъзможността да се разграничат кумарините от тези две групи с прилагане на квантово-химичните изчисления може да се обясни с незавършеното описание на възможните взаимодействия между разтворителя и кумарините.

Изчислените с прилагане на DFT стойности за BDE в газова фаза и в ацетон могат да разграничат ефектите на заместителите в позиции 3 и 4, но отпадат в описанието на активността на орто-дихидроксизаместените кумарини от сериите **a*i*** и **b*i***, при които е от значение ефекта на разтворителя.

ОБОБЩЕНИ ИЗВОДИ

1. Доказани са способностите на подбрани синтетични аналози на природни продукти да улавят свободни радикали (т.е. да проявяват антирадикалова активност) и да инхибират липидното окисление (т.е. да проявяват антиоксидантна активност) чрез проследяване на реакционните кинетики и са предложени вероятни механизми на тяхното действие.
2. За първи път е доказано, че изследваните бензоксантенови лигнани и дихидробензофурановите неолигнани притежават антирадикалова и антиоксидантна активност в различна степен, което съчетано с широкия спектър на биологичната им активност ги прави перспективни нови био-антиоксданти.
3. Доказано е за първи път, че бензоксантеновите лигнани са с по-висока антиоксидантна активност от неолигнаните, и че еквимоларните двойни смеси на неолигнаните с DL-α-токоферол показват синергизъм, докато тези на бензоксантеновите лигнани – антагонизъм.
4. Доказано е, че когато стойностите на енталпиите на отцепване на водороден атом от фенолната група на изследваните съединения е по-висока от тази на токоферола, в двойни смеси в повечето случаи се наблюдава синергизъм, а когато е по-ниска- антагонизъм.
5. Установено е, че в разтвор на ацетон 7,8-дихидроксикумарините проявяват по-висока активност от тази на 6,7- и 5,7-дизаместените кумарини, докато в липидна среда 6,7-дихидроксикумарините показват силна активност, 7,8-дихидроксикумарините- умерена, а 5,7-дихидроксикумарините- много слаба.
6. Показано е, че антиоксидантната активност и реакционна способност на изследваните съединения зависи не само от тяхната структура и разположението на фенолните групи в молекулата им, но и от особеностите на окисляемия липиден субстрат и възможното участие на образувания феноксилен радикал в странични реакции, които водят до понижение на активността им.
7. Показано е, че проследяването на кинетиката на взаимодействието между изследваните съединения и свободните радикали е изключително важно за изясняване механизма на действието им.

8. Определянето на стехиометричните коефициенти за бързата и тотална кинетика на реакцията с DPPH радикала дава възможност да се установи възможното участие на междинни продукти в процеса.
9. Доказано е, че новосинтезираните хидроксилирани бефенилни съединения като аналози на куркумина са с по-висока активност от съответните мономери в хомогенна липидна среда, докато във водна среда – мономерите и димерите проявяват близка активност спрямо пероксидните радикали.
10. За пръв път е установено, че мономерите и димерите имат по-висока активност от водоразтворимия антиоксидант тролокс спрямо пероксидни радикали във водна среда.
11. За първи път са определени абсолютните стойности на скоростните константи на ключовата реакция на инхибираното окисление за мономерите и димерите с прилагане на ХЛ-метод и е доказано, че димерите проявяват от 2- до 2.5 пъти по-висока активност спрямо пероксидните радикали от съответните мономери.
12. Показано е, че двете еквивалентни фенолни части от структурата на димерите действат самостоятелно и независимо една от друга. и начинът по който са свързани при димера на дехидроцингерона и куркумина не оказва влияние на антиоксидантната активност.
13. Създадените нови двойни и тройни антиоксидантни композиции от изследваните мономери и димери с DL-α-токоферол и аскорбилпалмитат обезпечават по-висока окислителна стабилност на липидния субстрат от индивидуалните компоненти.
14. Предложени са нови механизми на действие на изследваните мономери и димери (синтетични аналози на куркумина), които обясняват наблюдавания синергизъм в двойни смеси с токоферол като резултат от регенерирането на токоферола, както и антагонизма с реакциите, които възпрепятстват регенерирането му.

ПРИНОСИ

1. Представена е комплексна оценка на антирадикаловата и антиоксидантна активност на нови синтетични аналози на природни продукти (бензоксантенови лигнани, дихидробензофуранови неолигнани, кумарини и хидроксилирани бифенили), включващи различни експериментални подхода и един теоретичен.
2. Предложени са вероятни механизми на действие на изследваните съединения на база сравнителния анализ на получените експериментални данни с теоретично изчислените.
3. Доказано е за първи път, че начинът на свързване на двата еквивалентни фенолни фрагмента в структурата на куркумина и на димера на дехидроцингерона, считан за половин молекула куркумин – не е от значение за инхибиращата им способност.
4. Получените резултати от дисертационния труд могат да се използват за предлагане на нови индивидуални био-антиоксиданти като синтетични аналози на природни продукти, съчетаващи антиоксидантна и биологична активност.
5. Създадени са антиоксидантни композиции от два и три компонента на подбрани съединения с α-токоферол и аскорбилпалмитат, които повишават значително окислителната стабилност на липидния субстрат и могат да се предложат като хранителни добавки.
6. Предложени са нови комбинирани механизми на действие на еквимоларни двойни и тройни смеси с α-токоферол и аскорбилпалмитат, обясняващи наблюдаваните ефекти на синергизъм, адитивизъм и антагонизъм.
7. На база получената добра корелация между теоретично предсказаната и експериментално определена антиоксидантна активност на моно- и дихидроксикумарините беше предсказана антиоксидантната активност на 3 хипотетични съединения, която след синтезирането им беше определена експериментално.

Публикации на научни резултати по темата на дисертацията :

1. Vessela Kancheva, Adriana Slavova-Kazakova, "Radical Scavenging Activity of Some New Biologically Active Compounds", *Scientific Works of Plovdiv University*, **37** (5), 2010, 71-77.
2. Vessela Kancheva, Luciano Saso, Silvia Angelova, Mario Foti, Adriana Slavova-Kazakova, Carmelo Daquino, Venelin Enchev, Omidreza Firuzi, Jordan Nechev; "Antiradical and Antioxidant activities of New Bio-antioxidants", *BIOCHIMIE*, **94**, 2012, 403-415. (IF: 3.346)
3. Vessela Kancheva, Adriana Slavova-Kazakova, Davide Fabbri, Silvia Angelova, Maria Antonietta Dettori, Jordan Nechev,Giovanna Delogu, "Antiradical and Antioxidant activities of New Natural-like Hydroxylated Biphenyls of Dehydrozingerone, Zingerone and Ferulic acid", *Compt. Rend. Acad. Bulg. Sci.*, **66** (3), 2013, 361-368. (IF: 0.198)
4. Vessela Kancheva, Adriana Slavova-Kazakova, Davide Fabbri, Maria Antonietta Dettori, G.Delogu, Michal Janiak, Ryszard.Amarowicz, "Protective Effects of Equimolar Mixtures of Monomer and Dimer of Dehydrozingerone with α-tocopherol and/or Ascorbyl palmitate during Bulk Lipid Autoxidation", *Food Chemistry*, **157**, 2014, 263-274. (IF: 3.867)
5. Silvia Angelova, Adriana Slavova-Kazakova**,** Luciano Saso, Shashwat Malhortra, Ashok Prasad, Marc Bracke, Virinder Parmar, Vessela Kancheva, "DFT/B3LYP Calculated Bond-dissociation Enthalpies, Radical-scavenging and Antioxidant Activities of Natural-like Coumarins", *Bulg. Chem. Commun. ,* **46**, Special Issue, 2014, 187-195. (IF: 0.320)
6. Adriana Slavova-Kazakova[1], Silvia Angelova[1], Timur Veprintsev[2], Petko Denev[1], Davide Fabbri[3], Maria Antonietta, Dettori[3], Maria Kratchanova[1], Vladimir V. Naumov[2], Aleksei V. Trofimov[2], Rostislav F. Vasil'ev[2], Giovanna Delogu[3*], Vessela D. Kancheva[1*], "Comparison of antioxidant potential of curcumin-related compounds studied by four models" – подготвена за печат съгласно изискванията на списанието *BIOCHIMIE.*

Участия в международни и национални форуми с материали от дисертацията:

1. A. Slavova-Kazakova, D. Fabbri, S. Angelova, M.A. Dettori, G. Delogu, V. Kancheva, „Kinetics of Lipid Oxidation in Presence of Some New Biologically

Active Compounds – Individual and in Mixtures with Alpha-tocopherol”, 9-th Chemistry Conference, Plovdiv-Bulgaria, 14-16 October 2011 (постерен доклад).

2. A. Slavova-Kazakova, J. Nechev, D. Fabbri, M.A. Dettori, S. Angelova, G. Delogu, V. Kancheva, „Radical Scavenging Activity of Some New Biphenylic Compounds and Their Corresponding Monomers”, 9-th Chemistry Conference, Plovdiv-Bulgaria, 14-16 October 2011 (постерен доклад).
3. A. Slavova-Kazakova, S. Angelova, V. Kancheva, J. Nechev, L. Saso, G. Delogu, D. Fabbri, M.A. Dettori, M. Foti, A. Prasad, V.S. Parma, “Antiradical and Antioxidant Activities of Some New Bio-antioxidants”, 10-th Indo-Italian Workshop on Chemistry and Biology of Antioxidants, Sapienza University, Rome-Italy, 9-13 November 2011 (устен доклад).
4. Адриана Славова-Казакова „Изследване на антирадикаловата и антиоксидантна активност на някои нови био-антиоксиданти – самостоятелно и в смеси”, Традиционна научна сесия на ИОХ ЦФ - БАН, гр. София, 25-26 април 2012 (устен доклад).
5. Адриана Славова-Казакова „Антирадикалова и антиоксидантна активност на нови био-антиоксиданти – самостоятелно и в смеси”, Юбилейна научна конференция, посветена на 30-годишнината на Медицинския факултет към Тракийски Университет, гр. Стара Загора, 21-22 май 2012 (устен доклад).
6. A. Slavova-Kazakova, S. Angelova, J. Nechev, V. Kancheva, A. Prasad, V. Parmar, “Correlation between Experimentally Obtained and Theoretically Predicted Activities of New Bio-antioxidants” 10-th Euro Fed Lipid Congress, Cracow, Poland, 23-26 September 2012 (постерен доклад).
7. A. Slavova-Kazakova, T. Veprintsev, P. Denev, S. Angelova, D. Fabbri, M.A. Dettori, G. Delogu, M. Krachanova, V. Naumov, A. Trofimov, R. Vasilev, V. Kancheva, “Radical-scavenging and Chain-breaking Antioxidant Activities of Selected New Curcumin-related Compounds”, International Conference on Natural Products Utilization – from Plants to Pharmacy Shelf, Bansko-Bulgaria, 3-6 November 2013 (устен доклад).
8. A. Slavova-Kazakova, S. Angelova, P. Denev, M. Krachanova, V. Kancheva, T. Veprintsev, V. Naumov, A. Trofimov, R. Vasilev, D. Fabbri, M.A. Dettori, G. Delogu, „Antioxidant Potential of Curcumin Related Compounds”, Научна сесия по случай 120 години от рождението на акад. Димитър Иванов, проведена в

ИОХЦФ-БАН, 28-30 октомври 2014 (постерен доклад, отличен с награда в категорията за млади учени)

Забелязани цитати:

Статия 2:

1. Chegaev, K., C. Riganti, B. Rolando, L. Lazzarato, E. Gazzano, S. Guglielmo, D. Chigo, R. Fruttero, A. Gasco, "Doxorubicin-antioxidant Co-drugs", *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **23**, 2013, 5307-5310. (IF: 2.447)
2. Prevc., T, N. Segatin, N. Poklar Ulrih, B. Cigic, "DPPH Assay of Vegetable Oils and Model Antioxidants in Protic and Aprotic Solvents", Talanta, **109**, 2013, 13-19. (IF: 3.756)
3. Siddiqui, I.A., A. Jaleel, H.M. Al'Kadri, S. Akram, W. Tamimi, "Biomarkers of oxidative stress in women with pre-eclampsia", *Biomarkers in Medicine*, **7**, 2013, 229-234. (IF: 2.858)
4. Xi G.-L. & Z.-Q. Liu, "Antioxidant Effectiveness Generated by One or Two Phenolic Hydroxyl Groups in Coumarin –substituted Dihydropyrazoles", *Eur. J. Med. Chem.*, **68**, 2013, 385-393. (IF: 4.081)
5. Jahnert, T., M.D. Hager, U.S. Schubert, "Application of Phenolic Radicals for Antioxidants, as Active Materials in Batteries, Magnetic Materials and Ligands for Metal-complexes", *Journal of Materials Chemistry A*, **2**, 2014, 15234-15251. (IF: 6.626)
6. Zeller, W.E., "Synthesis of 1-O-methylchlorogenic acid: Reassignment of Structure for MCGA3 Isolated from Bamboo (*Phyllostachys edulis*) leaves", J. Agric. Food Chem., **62**, 2014, 1860-1865. (IF: 3.107)
7. Guo, C., Y. Hu, J. Li, Y. Liu, S. Li, K. Yan, X. Wang, J. Liu, H. Wang, "Identification of Multiple Peptides with Antioxidant and Antimicrobial Activities from Skin and its Secretions of *Hylarana taipehensis*, *Amolops lifanensis* and *Amolops granulosus*", *BIOCHIMIE*, **105**, 2014, 192-201. (IF: 3.346)
8. Aggarwal, K. & J.M. Khurana, "X-ray diffraction, Spectroscopic Characterization and Quantum Chemical Calculations by DFT and HF of Novel 2-hydroxy-12-(4-hydroxyphenyl)-9,9-dimethyl-9,10-dihydro-8H-benzo[a]xanthene-11(12H)-one", J. Mol. Struct., **1079**, 2015, 21-34. (IF:1.6)

Списък на използваните символи и съкращения:

Съкращения на използвани методи:

ВЕТХ – високоефективна течна хроматография

ТСХ – тънкослойна хроматография

АРА/ТСХ – качествено определяне на антирадикаловата активност с прилагане на ТСХ

ЛАО – липидно автоокисление

ХЛ - хемилуминисценция

Субстрати:	**Символ**
Етилбензен	**RH**
Липиден субстрат	**LH**
Хидропероксиди / **Липидни хидропероксиди**	**ROOH/** **LOOH**
Фенолни съединения:	
Монофенол	**AOH**
Мономер	**M_iOH**
Бифенил (димер)	**$D_i(OH)_2$**
Бифенол (катехол)	**$Q(OH)_2$**
Бутилхидрокситолуен	**BHT**
Галова киселина	**GA**
Елагова киселина	**EA**
Кафеена киселина	**CA**
Ферулова киселина	**FA**
Токоферол	**TOH**
Флуоресцеин	**FLOH**
Нефенолни съединения:	
Аскорбинова киселина	**AscAH**
Аскорбилпалмитат	**AscPH**
Дехидроаскорбилпалмитат	**DHAP**

Пероксидни радикали на:	**Символ/съкр.**
Въглеводороден субстрат	**$RO_2^{\bullet}$**
Липиден субстрат	**$LO_2^{\bullet}$**
Азоинициатор (**Y**)	**$YO_2^{\bullet}$**
Алкилни/алкоксилни радикали на:	
Въглеводороден субстрат	**$R^{\bullet}$**
Липиден субстрат	**$L^{\bullet}$; $LO^{\bullet}$**
Азоинициатор	**$Y^{\bullet}$**
Моделни радикали:	
1,1-дифенил-2-пикрил-хидрзил	**$DPPH^{\bullet}$**
Феноксилни монорадикали на:	
Монофенол (мономер)	**$AO^{\bullet}$** (**$M_iO^{\bullet}$**)
Бифенил (димер)	**$D_i(OH)O^{\bullet}$**
Бифенол (катехол)	**$Q(OH)O^{\bullet}$**
Токоферилен радикал	**$TO^{\bullet}$**
Аскорбатен радикал	**$AscP^{\bullet}$**
Бирадикали на:	
Бифинол (димер)	**$D_i(O^{\bullet})_2$** ($_{i\,=\,1\text{-}3}$)
Бифенол (катехол)	**$Q(O^{\bullet})_2$**

А Основни кинетични параметри	**Символ**	**Размерност**
Начална скорост на окисление в присъствие на антиоксидант	**R_A**	M/s
Начална скорост на окисление в отсъствие на антиоксидант	**R_C**	M/s
Скорост на иницииране в присъствие на инициатор	**R_{IN}**	M/s
Средна скорост на изразходване на антиоксиданта	**R_m**	M/s
Относителна средна скорост на изразходване на антиоксиданта	**RR_m**	-
Степен на инхибиране	**ID**	-
Индукционен период	**IP**	h
Фактор на стабилизиране	**PF**	-
Скоростна константа	*__k__	$M^{-1}s^{-1}$ (1/Ms)
Стехиометричен коефициент	****n****	mol
Б Квантовохимични параметри		
Енталпия на дисоциация на връзка	**BDE**	kcal/mol
Енергия на най-високо заетата от e^- свързваща молекулна орбитала	**HOMO**	eV
Енталпия (при 298 K)	**H_{298}**	kcal/mol
Разлика в енталпиите	**ΔH_{298}**	kcal/mol
Диедричен ъгъл	**φ**	° (градуси)
Спинова плътност	**-**	e^-

* За всяка конкретна реакция се въвежда допълнително означение като долен десен индекс след символа за скоростна константа (**k**) и стехиометричен коефициент (***n***)