

БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ ИНСТИТУТ ПО КАТАЛИЗ

СТАНОВИЩЕ

от проф. дн Славчо Кирилов Раковски
от ИК БАН

ОТНОСНО: дисертация на тема: „Кинетика и механизъм на липидното окисление в присъствие на моно- и бифенилни антиоксиданти – самостоятелно и в смеси“ за присъждане на образователна и научна степен „доктор“ по научната специалност Биоорганична химия, химия на природните и физиологично активни вещества - шифър 01.05.10. на Адриана Каменова Славова-Казакова

Магистър Адриана Каменова Славова-Казакова (р.1982) е докторант по научната специалност „Биоорганична химия, химия на природните и биологичноактивни вещества“, отчислена с право на защита през 2012. През 1995 завършва 96 СОУ „Лев Николаевич Толстой“ с изучаване на руски език. През 2006 става бакалавър, 2007 - магистър по специалността „Фин органичен синтез“ с професионална квалификация инженер-химик в ХТМУ–София с отличен успех от следването си. Владее руски, английски и немски езици. Не познавам лично докторантката, но от разговор с нея при представяне на автореферата останах с впечатление, че тя е квалифициран специалист със задълбочени познания по темата на дисертацията.

На основание чл.4, ал.2 във връзка с чл.9 от ЗРАС в РБ и т.1.4 от Правилника за условията и реда за придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности в ИОХ с ЦФ, решение на НС (Протокол 16/11.12.2014 т.4) и заповед на директора на ИОХ с ЦФ РД-09-193/11.12.2012 асистент Адриана Каменова Славова-Казакова е отчислена с право на защита, а със заповед на директора на ИОХ с ЦФ НО-05-05-4/27.01.2015 е утвърдено НЖ за откриване на процедура по защита на докторската дисертация.

Дисертационният труд е написан на 202 страници, едно приложение и съдържа 41 фигури и 20 таблици. Цитирани са 209 литературни източника. Резултатите по дисертацията са обобщени в 5 публикации в специализирани списания в с ОИФ – 7.721, участие в специализирани форуми у нас и в чужбина - 8. Забелязани са 8 цитата. Докторантката в публикациите си е 4-ри пъти втори автор, първа след ръководителя си и в научните мероприятия тя е 8 пъти първи автор. След като разгледах и оцених всички представени материали убедено смятам, че работата по дисертацията е изпълнена от дисертанта и личният му принос е неоспорим.

Дисертацията съдържа: Въведение – 2 стр., Литературен обзор – 62 стр., Експериментална част – 13 стр., Резултати и дискусия (три глави) – 107 стр., Литература - 14 стр. с 209 източника, изводи, приноси и приложения.

Авторефератът е написан на 50 стр. следва хронологията на дисертацията и вярно и пълно отразява съдържанието и.

АКТУАЛНОСТ

Стресът се определя като неспецифична реакция на тялото на всяко поставено пред него изискване за преустройство или приспособяване, осъществяваща се по стереотипен начин на базата на идентични биохимични промени. Важен част от него е свързана с увеличаване стационарната концентрация на свободните радикали в клетките. Увеличената стационарна концентрация на свободните радикали (СКСР) нарушава енергетическия и биохимичен баланс в тях и води до временното или постоянното им увреждане. От изключително значение в тази поредица са реакциите на кислорода с липидите в клетките и клетъчните стени. Към групата на липиди се отнасят мастни киселини, ацилглицероли, фосфолипиди, сфинголипиди и стероли. Нарушенията в липидното окисление (ЛО), води до неконтролирано увеличение на СКСР, а от там до появата на редица труднолечими заболявания, свързани с този феномен. Съгласно класическите представи за окисление на органични съединения в течна фаза, регулирането на ЛО може да се проведе с използването на антиокислителни (АО) добавки (инхибитори - ИН). Инхибирането води до регулиране на СКСР, а от там и до ремисия на някои онкологични, невродегенеративни и сърдечно-съдови заболявания предизвикани от нея. Търсенето на нови високоефективни биологично съвместими ИН е изключително важна и актуална задача, стояща пред химическата и биологична наука и медицината. В този смисъл предметът на настоящата дисертация е много актуален и съвременен.

ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР

В обзора, съдържащ 209 източника са разгледани и анализирани структурата, свойствата и реакционната способност различни класове липиди като мастни киселини, триацилглицероли и др. и процесите на окисление автоокисление и инхибиране, кинетиката и механизма на трансформации на субстратите и инхибиторите. Разгледани са и критически са осмислени резултатите в областта на по окислението в течна фаза на учени от всички световни школи в тази област. Специално внимание е отделено на веществата използвани като инхибитори, например лигнани и неוליгнани, куркумин, куркуминови метаболити и аналози и кумарин, прости кумарини: хидроксилирани, алкилирани и алкоксилирани кумаринови производни, тяхната структура, биологична активност, токсичност и инхибиращи свойства. Литературните източници са номерирани и дадени в азбучен ред на първите автори. При цитирането им не се използват номерата в литературния списък, а имената на авторите и годината на публикуване. Този подход на представяне, от една страна помага на читателя, но от друга затруднява проследяване пълнотата на цитиране на представените източници. Основавайки се на направения преглед и анализ дисертантът си поставя следните:

ЦЕЛИ

Изучаване кинетиката и механизма на действие на аналози на природни антиоксиданти със свободни радикали и в инхибирано липидно окисление. Изследване влиянието на структурата на подобрите съединения върху тяхната активност с теоретични и експериментални методи. Намиране на нови високо ефективни био-антиоксиданти и използването им като лекарствени средства и хранителни добавки.

ЕСПЕРИМЕНТАЛНА ЧАСТ

Последователно са описани характеристики на всички използвани химикали, разтворители, субстрати за окисление, инхибитори и кинетични, аналитични и теоретични процедури използвани в дисертацията. От анализа на тази част на дисертацията може да се каже, че докторантът е овладял серия техники: химични методи като йодометричен метод за определяне

на пероксидно число, окисление на липидните проби, инхибиране на липидните проби; Хроматографски методи като колонна хроматография, тънкослойна хроматография, високоефективна течна хроматография; спектрални методи като УВ-спектроскопия, спектрално следене на кинетиката на протичащите реакции; Флуориметрични методи за определяне на антиоксидантна активност - ORAC и HORAC методи; Хемилуминисцентен метод; теоретични за квантохимично пресмятане на енергията, структурата конфигурацията на изследваните молекули.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

В настоящия дисертационен труд са изследвани три групи органични съединения:

Лигнани

Четири лигнана – 2 бр. - бензо[*kl*]ксантенови лигнана и 2бр. - дихидробензофуранови неолигнана. Тези съединения са синтетични аналози, получени чрез биомиметичен синтез. Притежават анитуморна и антиангиогенна активност;

Куркумини

4 бр. - хидроксилирани бифенилни съединения (димери), синтетични аналози на куркумина и съответните им мономери (4+1) инхибитори на α -синуклеин.

Хидроксикумарини

11бр. хидроксикумарина - аналози на природни хидроксикумарини.

Изследваните природни и синтетични инхибитори, формират структурата на дисертацията, оформена в три глави озаглавени по названията на трите изследвани класа съединения.

Глава 1. Бензо[*kl*]ксантенови лигнани и дихидробензофуранови неолигнани.

За първия път се изследва антирадикаловата активност на новосинтезирани лигнани и неолигнани, както и способността им да инхибират ЛО. Съединение **2** е по-ефективния антиоксидант и при двете изследвани концентрации (0.1 и 1.0mM), в сравнение с останалите фенолни съединения, в т.ч. и с **ТОН** и **СА**. Неговата степен на инхибиране (ID) при ниската концентрация (0.1 mM) е 2, 4, 5.5 и 14 пъти по висока от тази, на **ТОН**, **СА**, **1** и **4**, докато при концентрация 1.0 mM, съединения **1** и **3** проявяват антиоксидантна активност, сравнима с тази на **ТОН** и **СА**. Установена е висока корелация между експериментални и теоретични резултати за съединения **2** и **4**. За отбелязване е фактът, че съединение **1** проявява по-ниска антирадикалова активност от съединение **2**, а се отличава само по естерното свързване на заместителите си R.

При двойните смеси с **ТОН**, се наблюдава синергизъм само при съединения **3** и **4**, което се обяснява с по-високите им стойности на BDE в сравнение с тези за **на ТОН**. Тези съединения регенерират с **ТОН**, който е по-силния антиоксидант, а съединения **1** и **2**, които са с по-ниски стойности за BDE от **ТОН** показват антагонизъм в двойните смеси.

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

Направена е корелация на получените експериментални резултати, с резултатите от квантохимичните изчисления на параметрите на изследваните съединения, имащи отношение към тяхната антирадикалова и антиоксидантна активност. Димерите показват по-висока (от 2 до 4 пъти) антирадикалова и антиоксидантна активност от съответните мономери в безводна и хомогенна липидна среда, докато при физиологични условия (pH = 7.2-7.4, 37⁰C във вода) - не се наблюдават съществени различия в активността на мономерите и димерите. Присъствието на α,β -ненаситената верига в *para*-позиция спрямо фенолната група на изследваните съединения е от значение за резонансното стабилизиране на феноксилния/те радикал/и. Димерите проявяват от 2 до 5 пъти по-висока степен на инхибиране на липидния

субстрат, в сравнение със съответните мономерни. Обратно на това поведение – във водна среда мономерите и димерите показваха сходна активност спрямо пероксидни радикали.

$D_2(OH)_2$, който проявява най-силна антирадикалова активност спрямо $DPPH^\bullet$ - няма висока активност като инхибитор на верижно-радикалови процес на липидното автоокисление, поради липсата на ненаситена странична верига в *para*-позиция, осигуряваща възможността за резонансно стабилизиране на феноксилния радикал.

Въпреки малките разлики в стойностите на BDE между мономерите и димерите, като цяло получените теоретични резултати са в съответствие с експериментално определените кинетични параметри (скоростни константи и фактор на стабилизиране).

Получени са нови резултати за двойни и тройни смеси на бифенилни съединения (димери), както и на съответните им мономерни със стандартни антиоксиданти в условия на липидно автоокисление. Доказано е с прилагане на BETX, че синергизмът 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. Двойните смеси на M_1OH , $D_1(OH)_2$, **FA** и **DFA** с **ТОН** обезпечават по-висока окислителна стабилност на липидния субстрат и имат по-висока антиоксидантна ефективност от **ТОН+AscPH**, което е от изключително значение за практиката. Получените резултати за синергизъм на двойните смеси на изследваните мономерни и димери със **ТОН**, както и на тройните смеси на някои от тях, могат да се използват като база за по-нататъчни разработки като добавки в масла.

Глава 3. Кумарини

При изследване кинетика и механизма на взаимодействие на моно- и дихидроксикумарини с $DPPH^\bullet$ не се наблюдава образуване на активни междинни продукти.

Установено е, че 7,8-дихидроксикумарините, които проявяват по-силна активност спрямо свободни радикали ($DPPH^\bullet$), но са по-слаби като инхибитори в сравнение с 6,7-дихидрокси заместените аналози. От съществено значение за проява на висока антиоксидантна активност е не само наличието на катехолова структура при кумарините, а също и позициите на двете съседни фенолни групи в пръстен А. От това зависи къде ще бъде предпочетена атаката от страна на пероксидните радикали, както и възможните резонансни структури на феноксилния радикал.

Квантовохимичните изчисления показват, че разликата в енталпиите между двата възможни ротамера на 7,8-дихидроксикумарините е около 5 kcal/mol, докато ротамерите на 6,7-дихидроксизаместените кумарини имат близки енталпии, а енергиите на дисоциация на О-Н - връзките в газова фаза на 7,8-дихидроксикумарините са по-високи тези на ротамерите на 6,7-дихидроксикумарините. Изчислените параметри са в съответствие с експериментално получените стойности на фактора на стабилизиране на липидния субстрат в присъствие на изследваните кумарини. От друга страна анализът на това съответствие по-скоро се базира на интуитивно схващане, за влиянието на изчислените теоретични параметри върху фактора на стабилизиране без да има строго математическо доказателство са това. По нататък на тази база са предложени структурите на три нови съединения - 6,7-дихидроксизаместения кумарин **b2** и 5,7-дихидроксизаместените кумарини **c2** и **c3** с очаквани антиоксидантни свойства. След синтезирането им и тестването на антиоксидантната им активност предсказаните свойства са установени.

BDE стойностите, изчислени в среда от ацетон за кумарините от серия a_i и b_i са близки и не обясняват различията в експериментално получените резултати за антирадикалова активност, представени в %RSA и стехиометричния фактор n за бързата и тоталната кинетика. Това означава, че е необходимо да се отчете солватиращият ефект на разтворителя и възможното участие на фенолните групи в междумолекулни водородни връзки с молекулите на ацетона.

ПРИНОСИ

- ❖ Установени са свойствата на подобрите синтетични аналози на природни продукти да прехващат свободни радикали и да инхибират липидно окисление. На основата на изучаване кинетиката на реакциите е предложен механизъм на процеса.
- ❖ За първи път е показано, че изследваните бензоксантенови лигнани и дихидробензофурановите неолигнани притежават антирадикалова и антиоксидантна активност, което ги прави перспективни нови био-антиоксиданти.
- ❖ За първи път е установено, че бензоксантеновите лигнани са с по-висока антиоксидантна активност от неолигнаните, и че еквимоларните смеси на неолигнаните с DL- α -токоферол формират синергични системи, докато тези с бензоксантеновите лигнани – антагонистични, което се свързва с различната реакционна способност на двете вещества по отношение на ТОН. Конкретната връзка са енергиите на връзката ОН в изучаваните вещества и ТОН. Когато тя е по-висока от тази на токоферола в повечето случаи се наблюдава синергизъм, а когато е по-ниска – антагонизъм.
- ❖ Установено е, че в разтвор на ацетон 7,8-дихидроксикумарините проявяват по-висока активност от тази на 6,7- и 5,7-дизаместените кумарини, а в липидна среда по своята активност тези съединения се подреждат в следния ред: 6,7-дихидроксикумарините > 7,8-дихидроксикумарините > 5,7-дихидроксикумарините.
- ❖ Реакционна способност на изследваните съединения зависи от тяхната структура, разположението на фенолните групи, липидния субстрат и участие на феноксилните радикали в странични реакции,
- ❖ Новосинтезираните хидроксилирани бефенилни съединения - аналози на куркумина са с по-висока активност от мономерните в липидна среда, а във водна среда мономерите и димерите проявяват близка активност спрямо пероксидните радикали. Освен това мономерите и димерите имат по-висока активност от водоразтворимия антиоксидант тролокс спрямо пероксидни радикали във водна среда.
- ❖ С използване на ХЛ-метод за първи път са определени абсолютните стойности на скоростните константи на реакцията на инхибиране за мономерите и димерите. Димерите проявяват от 2 до 2.5 пъти по-висока активност спрямо пероксидните радикали от съответните мономери.
- ❖ Показано е, че двете еквивалентни фенолни части от структурата на димерите действат самостоятелно и независимо една от друга, и начинът по който те са свързани в димера на дехидроцингерона и куркумина не оказва влияние на антиоксидантната им активност.
- ❖ Намерено е, че създадените нови двойни и тройни антиоксидантни смеси от мономерите и димерите с DL- α -токоферол и аскорбилпалмитат осигуряват по-висока окислителна стабилност на липидния субстрат от индивидуалните компоненти.
- ❖ Предложени са механизми на действие на изследваните мономери и димери, които обясняват наблюдавания синергизъм и антагонизма.
- ❖ Направена е комплексна оценка на антирадикаловата и антиоксидантна активност на новите синтетични аналози на природни продукти (бензоксантенови лигнани, дихидробензофуранови неолигнани, кумарини и хидроксилирани бифенили), включващи различни експериментални подходи и един теоретичен и е предложен вероятен механизъм на действие на изследваните съединения.
- ❖ Доказано е за първи път, че начинът на свързване на двата еквивалентни фенолни фрагмента в структурата на куркумина не е от значение за инхибиращата им способност.

- ❖ Получените резултати от дисертационния труд могат да се използват за търсене на нови индивидуални био-антиоксиданти като синтетични аналози на природни продукти с антиоксидантна и биологична активност.
- ❖ Антиоксидантните композиции от два и три компонента на подбрани съединения с α -токоферол и аскорбилпалмитат повишават окислителната стабилност на липидния субстрат и могат да се използват като хранителни добавки.
- ❖ На база получената добра корелация между теоретично предсказаната и експериментално определена антиоксидантна активност на моно- и дихидроксикумарините е предсказана антиоксидантната активност на 3 нови съединения и тя е потвърдена експериментално.

ПРЕПОРЪКИ И ЗАБЕЛЕЖКИ

1. Имам бележки от общ характер, които се отнасят до пропуски в правописа и граматиката, но графичният материал е представен с дизайнерски вкус и в цвят.
2. Не се използва номерацията на литературните източници за цитиране и това прави много трудно установавяването на пълнотата на използването им.
3. В схема 2 на стр.19 остава неясно при прехода от 2 в 3 стадий защо са пропуснати двата кислородни атома.
4. На стр.27 на „влиянието на структурата“ е посветено едно изречение без да е направено някакво изложение или заключение.
5. На стр.28 се използва израза „теоретичен дискриптор“, който не е някакъв общоприет начин за описание в химическата литература.
6. На стр.94 и 95 се използват жаргонни квалификации като силни, слаби, умерени което по своя характер не е научно издържано.
7. На стр.96 след израза „влиянието на конформацията, електронния и геометричен характер“ не е изяснено как тези параметри влияят на антиокислителните свойства на инхибиторите.

Направените забележки не променят високата ми оценка за настоящата дисертация.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Настоящият дисертационен труд, изпълнява напълно изисквания на ЗРАС в РБ и Правилника за неговото приложение. Дисертацията удовлетворява в значително по-голяма степен изискванията по съдържателна страна, направените приноси, обемът и качеството на представения материал. С удоволствие отбелязвам, че подкрепям присъждане на ОНС „доктор“ на асистент-магистър Адриана Каменова Славова-Казакова по научната специалност „Биоорганична химия, химия на природните и физиологично активни вещества“ - шифър 01.05.10 и моята оценка за дисертацията е положителна и е “да”.

17.03.2015, София

ПОДПИС:

/Проф. дн С. Раковски/