

## Обобщена справка за научните трудове:

Общ брой научни трудове- **69 (48 след доцент)**

Общ брой научни трудове за ОНС :”доктор”- **7**

Общ брой научни трудове за придобиване на академичната длъжност, доцент”- **21**

Общ брой научни трудове - „доктор на науките”-**31**

Общ брой научни трудове извън дисертацията „доктор на науките”-**18**

Общ импакт фактор – **83.19 (48.60 след доцент)**

Публикации в периодични и други научни издания

А. В списания с импакт фактор , импакт ранк- **44**

Б. Статии в пълен текст на научни форуми -**16**

В. 1 глава в книга

Г. **2** заявки за патенти и **7** авторски свидетелства

2. Участия в научни форуми (лекции и постери) общ брой **54 (42 след доцент)**

Забелязани цитати, общ брой **463 (313 след доцент)**, H-фактор -**13**

Основните научни изследвания и приноси отразени в дисертацията ми за ОНС „доктор” и академичната длъжност „доцент” са свързани с изследване на S-P и S’-P’ специфичността в действието на протеинази. Разработен е нов подход за изследване на протеазната P’ специфичност, отразяващ връзката между структурата на нуклеофила и стойността на аминокислотно-хидролизното отношение. Тези изследвания имат важно значение както в научен, така и в приложен аспект. Работите свързани с развитието на теорията и практиката на ензимно катализирания синтез на биоактивни пептиди, чрез механистични изследвания на ензимната солволиза са пионерски изследвания в България и са намерили широко отражение в научната литература. Успешно е проведен ензимен семисинтез на Фен<sup>15</sup>-апротинин (базичен панкреатичен трипсинов инхибитор) като е постигната промяна на неговото инхибиторно действие. Постигнато е и реализирането на ензимохимичен синтез на диастереомерни енкефалин амиди, чрез вграждане на непротеиногенни D-амино киселини. Получените химически и хирално чисти опиодни пептиди проявяват 50 пъти по-висока биоактивност в сравнение с морфина. Разработен е оригинален метод за синтез на пептиди, чрез итеративна процедура в нуклеофилна баня и многократно използване на ензима. Създаден е и метод за ди-ензимен синтез на пептидния аспартам и други вкусови пептиди.

Естествено продължение на тези изследвания е насочване на научните ми интереси към изследване на гликоконюгати в това число и гликолипиди – ново направление, както за лабораторията, така и за ИОХЦФ, изучаване на хидролизата и синтеза на N-гликозидна

връзка, дизайн и синтез на нови биоактивни пептиди и биоконюгати имащи отношение към биотехнологията и опазване на човешкото здраве и околната среда.

Изследванията ми са фокусирани главно върху изучаването на иновативни биоактивни съединения - природни или синтетични чрез прилагане подходите на биоорганичния синтез.

## **Справка за научните приноси (след доцент)**

### ***1. Изследвания върху гликопротеини и хидролиза на гликозидна връзка***

#### ***1. 1. Хистохимични изследвания на гликозиласпарагинази и други ензими (труд 24, 27)***

Ензимът гликозиласпарагиназа играе ключова роля при метаболизма на гликопротеините като катализира хидролизата на N-гликозидна връзка. Самият той е гликопротеин с около 15% въглехидратно съдържание. Частичната или пълната липса на ензима гликозиласпарагиназа в бозайници е причина за възникване на генетичното заболяване аспартилглюкозаминоурия, водещо до сериозни скелетни и ментални нарушения.

Въз основа на субстратен анализ е извършен дизайн и е синтезиран ниско молекулен моделен субстрат  $\beta$ -1-(3-метил-4-хидрокси-нафтил) аспарат за специфичен хистохимичен тест за изследване на ензима гликозиласпарагиназа. Проведени са експерименти с новия субстрат в присъствие на тетразолиевата сол Нитро БТ, при което се наблюдава формирането на неразтворимо цветно съединение-формазан, като тъмносини отлагания в местата с ензимна локализация и може да се наблюдава под светлинен микроскоп. Изследвана е и е установена лизозомалната локализацията на гликозиласпарагиназа в следните тъкани: чернодробни клетки, бъбрек, епидимис и слезка от плъх (труд 27).

Придобитият опит върху субстрати за хистохимични изследвания стимулира изследвания за разработване на нов метод за хистохимична локализация на ензима дипептилпептидаза IV (DPP IV) на базата на нов субстрат синтезиран от нас Gly-L-Pro-1-хидрокси-4-нафтиламид (труд 24).

#### ***1. 2. Изследвания върху човешка гликозиласпарагиназа и L-аспарагинази (труд 23, 25, 26, 28)***

Растителни и бактериални L-аспарагинази, както и гликозиласпарагиназа изолирана от бозайници проявяват много общи свойства, като обща димерна/тетрамерна структура, принадлежност към семейството на N-крайните хидролази и др. По-ранни изследвания на субстратната специфичност на човешка гликозиласпарагиназа че L-установяват, че аспарагинът не е субстрат за ензима. Проведените изследвания от нас с детайлен количествен анализ с ВЕТХ показаха, че човешка гликозиласпарагиназа

**хидролизира L-аспарагинин.** Определени бяха и кинетичните параметри на аспарагина за  $K_m = 656 \mu\text{M}$ ,  $V_{\max} = 1.49 \mu\text{M}$  и  $K_i = 454 \mu\text{M}$  като конкурентен инхибитор за GlcNAc-Asn.

Следващите наши изследвания за пръв път доказаха ролята на човешка гликозиласпарагиназа да катализира синтез на **N-гликозидна** в реакция на N- $\beta$ -аспартиране на 1-амино-N-ацетил глюкозамин (**труд 28**). Ензимният синтез на гликозиласпарагин който е синтон при синтеза на много N-гликопротеини, разкрива възможност за препаративно получаване на това ключово съединение за въглехидратната химия..

Експерименталните ни изследвания доказаха възможността човешката гликозиласпарагиназа да участва в реакция на кинетично контролиран **синтез на  $\beta$ -аспартил пептиди** (H-Asp(Gly-OH)-OH, H-Asp(Phe-OMe)-OH и H-Asp((Gly)4-OH)-OH), чрез аминолиза на H-Asp(OMe)-OH/Asn с аминокиселинни и пептидни нуклеофили (**труд 25**).

Проведени бяха и сравнителни изследвания с човешка гликозиласпарагиназа и L-аспарагинази (EcAII и Eg.AII) в реакция на хидролиза  $\beta$ -аспартил пептиди и беше установено ново свойство на ензима L-аспарагиназата, а именно да хидролиза  $\beta$ -аспартил пептиди. Известно е, че ензимът L-аспарагиназата се прилага при лечение на акутна лимфобластна левкемия, очаква се установеното ново свойство да намали наблюдаваните странични ефекти причинени от присъствие на  $\beta$ -аспартил пептиди при някои пациенти..

**Основен принос в тези изследвания е, че установените от нас нови субстратни свойства на човешката гликозиласпарагиназа стимулираха изследванията за развитието на ензимно заместваща терапия при лечението на заболяването аспартилглюкозаминоурия.**

## ***1. 2. Изследвания върху ензими изолирани от плесенни шампве - $\alpha$ -галактозидаза и инвертаза (труд 1, 21)***

Ензимът  $\alpha$ -галактозидаза [EC 3.2.1.22,  $\alpha$ -D-галактозид галактохидролаза] катализира хидролизата на  $\alpha$ -1,6-свързани  $\alpha$ -галактозни остатъци от олигозахариди (мелибиоза, рафиноза, стахиоза) и полизахариди (галактоманани).  $\alpha$ -Галактозидазите не се секретират от човека и непреживните животни, поради което  $\alpha$ -галактозидите преминават непроменени през стомашно-чревния тракт и причиняват стомашен дискомфорт. Това определя и важността на изследването на този ензим за получаването на нови храни на достъпни цени.

Установихме, че шамът *Humicola lutea*120-5 продуцира  $\alpha$ -галактозидаза с максимална ензимна активност (2000 U.l-1) като се използва като среда, екстракт от соево брашно, съдържащ 5% сухо вещество. След хроматографско пречистване със Sephadex G-

100 и DEAE-целулоза се получава пречистена  $\alpha$ -галактозидазна фракция със специфична ензимна активност от 37 U.mg<sup>-1</sup>. Ензимът показва рН оптимум 4.5-5.0 и широка рН стабилност от 2.0 до 7.5 и температурен оптимум 55°C. Проведеният анализ с ВЕТХ доказва, че суров ензимен препарат лесно хидролизира рафиноза, като не се наблюдава активност при дизахариди като захароза и мелибиоза.

При същите условия шамът *Penicillium chrysogenum* sp.23. продуцира  $\alpha$ -галактозидаза с максимална ензимна активност 4200U/л и е придружено с регистриране и на инвертаза. Регистрираните оптималните параметри като рН 4,5-5,0 и температурен максимум 50°C на  $\alpha$ -галактозидаза фракция се измерват чрез използване на р-нитрофенил- $\alpha$ -D-галактопиранозид като субстрат.

Хидролизата на рафиноза, катализирана от  $\alpha$ -галактозидаза в присъствието на инвертаза беше последвано от анализ с ВЕХТ. Ясно е установено, че наличието на инвертаза в този случай, основно води до значително преобразуване на рафиноза до мелибиоза и фруктоза.

Способността на плесененият шам *Penicillium chrysogenum* sp.23 да продуцира едновременно  $\alpha$ -галактозидаза и инвертаза го прави особено атрактивен за индустриално приложение. Комбинираното действие на двата ензима води до бърза хидролиза на олигозахаридите в бобовите и соеви храни освобождавайки усвоими монозахариди.

Приносът от това изследване е, че частично пречистеният ензимен препарат от шам *Penicillium chrysogenum* sp.23 **става много полезен при преработката на соеви култури за хранителни цели, поради синергичното действие на двата ензима.**

Приносът от разработването на метод за продуциране на високо активна  $\alpha$ -галактозидаза с евтина изходна суровина има голямо значение, **тъй като ензимът може да се използва в модерната медицината за преобразуване на кръвни групи и при лечението на болестта на Фабри като ензимно заместваща терапия.**

### ***I. 3. Изследване на биоактивен продукт (гликопротеин) изолиран от лечебното растение Galega officinalis L. -силен инхибитор на тромбоцитната агрегация (труд 4, 52)***

Разработен е метод за получаване на биологично активен продукт от растителен произход с дезагрегиращо действие при тромбоцитната агрегация. Изходната биомаса от растението жаблек (*Galega officinalis*, L.) се екстрахира с воден разтвор при рН 6-8. Екстрактът се филтрува, концентрира се при намалено налягане и температура до 30°C и се фракционира върху DEAE-целулоза с градиент от разтвор на NaCl от 0 до 0,5 M. Биологично активният продукт се елюира при концентрация на градиента - 0.22-0.25 M NaCl след което разтворът се обезсолява и лиофилизира.

След ензимна модификация със специфична глюкозидаза на изходна активна лиофилизирана фракция и разделяне чрез гел-филтрация върху Sephadex G-25 се

получават 5 фракции дефинирани като високомолекулни и нискомолекулни. Измерената антиагрегантна активност на фракциите по метода на Born показва, че активна е само 1-ва фракция, но активността и е около 50-60 пъти по-ниска спрямо изходната, необработена с ензим фракция. Този резултат дава яснота за механизма на действие на получения продукт. Той показва, че **полизахаридната част на биоактивния препарат играе основна роля в потискането на тромбоцитната агрегация .**

Активността на получения биоактивен продукт се определена чрез измерване на 50%-ното потискането на тромбоцитната агрегация на човешка, богата на тромбоцити плазма по метода на Born е 35µg/ml. Измерена е и активността на същата фракция по метода на „Flow cytometry analyses” с използването на моноклонални антитела: anti-CD62P-FITC (Serotec, UK) срещу P-selectin експресия върху тромбоцитната повърхност на активираните с аденозиндифосфат тромбоцити. По тази методика частично е изяснен механизма на действието/потискането/ на тромбоцитната агрегация от високоактивната фракция получена от *Galega officinalis* L.

**Приносът на това изследване се изразява в получаването на биологично активен продукт с дезагрегиращо действие при агрегацията на тромбоцитите и метод за неговото получаване от растителен екстракт. Вещества изолирани от растителни източници с изявено дезагрегиращо действие при агрегацията на тромбоцитите практически не са известни досега. Те могат да намерят приложение в медицината при третиране на пациенти с инфаркти и инсулти.**

Важно приложно значение имат резултатите получени при изпълнението на успешно приключил проект с МОН С-1509. **Разработена е полупромишлена лабораторна технология (5 kg суха изходна дрога от лечебното растение) за препаративно получаване на лиофилизирана и обезсолена изходна фракция от водния извлек на лечебното растение *Galega officinalis* L.**

## ***II. Биоактивни пептиди/полипептиди с приложение за социално значими заболявания***

### ***II. 1. Ензимо-химичен синтез на инсулин***

Получаването на полипептидният хормон инсулин, прилаган при лечението на **диабет**, може да бъде осъществено или чрез биосинтез (рекомбинантни технологии) или чрез семисинтез (ензимна трансформация).

При изпълнение на договор със Софарма АД за разработване на технология за получаване на човешки инсулин бяха получени и важни фундаментални резултати. При катализираната от трипсин ензимна трансформация на свински в човешки инсулин беше намерен отговор на един спорен в научната литература въпрос за механизма на ензимната реакция - транспептидиране или кондензация?

Проведените от нас изследвания за получаване на семисинтетичен човешки инсулин от свински инсулин в присъствие 1,4- бутан диол показаха, че алкохолът

действа като нуклеофил. При проследяване на ензимната реакция с ВЕТХ в отсъствие на аминния компонент треонин метилов естер се регистрира образуването на дезаланин-4-хидрокси бутилов естер и се освобождава аланин. В присъствие на треонин метилов естер се наблюдава бързо изчерпване на междиния продукт - дезаланин инсулинов естер и образуване на метилов естер на човешки инсулин. Такава реакция се наблюдава за пръв път и показва, че по време на ензимната трансформация на свински в човешки инсулин, получаването на дезаланин-4хидрокси бутилов естер е кинетично контролиран процес (постер 6-тиБПС).

**Приносът на изследването се изразява в това, че ние недвусмислено доказваме, че семисинтезът на човешки инсулин протича по-кондензационен механизъм. С помощта на ВЕТХ за пръв път регистрираме директно участие на алкохол при образуването на реактивоспособно междинно съединение способстващо за ускоряване на реакцията и намаляване на страничните реакции.**

## ***II. 2. Природни и синтетични пептиди с потенциални свойства за превенция и терапия при хипертония***

Артериалната хипертония е едно от предизвикателствата на съвременната медицина и е главен рисков фактор за инсулт, инфаркт на миокарда, сърдечна недостатъчност, аневризъм на артериите, периферна артериална болест и е причина за хронични бъбречни заболявания.

### ***II.2.1. Молекулен дизайн и химичен синтез на пептиди с потенциални биологични свойства (труд 3, 47, 48, 53, 57)***

Природните АСЕ-инхибитори, притежаващи антихипертензивен ефект *in vivo* най-често са пролиновите трипептиди - Valyl-L-Prolyl-L-Proline и L-Isoleucine-L-Prolyl-L-Proline или пептиди съдържащи тези фрагменти. Избраният от нас подход да използваме Fmoc-стратегия при твърдофазен пептиден синтез се оказа особено ефективен и добивите на целевите пептиди са в границите 55-85 %.

Лакто-трипептидите Val-Pro-Pro и Ile-Pro-Pro, които се прилагат за инхибиторни изследвания *in vivo* и *in vitro* обикновено са изолирани от казеинови хидролизати и не се предлагат от фирмите производители на пептиди получени чрез химичен синтез, поради синтетични затруднения. Избраната от нас стратегия , а именно твърдофазен пептиден синтез (SPPS) с използване на 2-Cl-третил-хлоридна-смола, се оказа особено ефективна при синтеза на пролинови три- и тетрапептиди. Предимството на този метод е, че се избягват трудоемките и продължителни пречистващи процедури, които съпътстват течено-фазния синтез на всеки етап. Предложен е молекулен дизайн и е осъществен твърдофазен синтез на трипептидите: H-Val-Ala-Trp-OH, H-Val-Pro-Pro-OH, H-Ile-Pro-Pro-OH, H-Leu-Lys-Pro-OH, H-Leu-Ala-Pro-OH, H-Val-Ala-Pro-OH, H-Ile-Ala-Lys-OH, H-Ile-Trp-Pro-OH, H-

Leu-Arg-Pro-OH и H-Leu-Lys-Pro-OH. Синтезираните пролинови пептиди са с изразено антихипертензивно действие и имат потенциално приложение за превенция и терапия в биомедицината, а също така и като хранителни добавки.

### **II.2.2. Спектрален и конформационен анализ на пролинови пептиди (труд 19, 56)**

С прилагане на линейно-поляризирана ИЧ – спектроскопия в твърдо състояние е извършен спектрален анализ на пролинови пептиди. Изследваните трипептиди Val-Pro-Pro и Ile-Pro-Pro се характеризират със серия от валентни трептения  $\nu^{\text{as}}_{\text{NH}_2}$ ,  $\nu^{\text{s}}_{\text{NH}_2}$  и  $\nu_{\text{C=O}(\text{COOH})}$  с ивици около  $3200\text{ cm}^{-1}$ ,  $3100\text{ cm}^{-1}$  and  $1730\text{ cm}^{-1}$ . Наблюдава се липсата на типична за  $-\text{NH}_3^+$  (L-Val и L-Ile ) и  $-\text{COO}^-$  (L-Pro ) ивици при  $1630 - 1550\text{ cm}^{-1}$  и при около  $1400\text{ cm}^{-1}$ . Последователното елиминиране на  $\nu_{\text{C=O}(\text{COOH})}$  при  $1733\text{ cm}^{-1}$ , и  $\nu_{\text{C=O}(\text{Amide I})}$  при  $1675\text{ cm}^{-1}$  и  $1640\text{ cm}^{-1}$  е в съответствие с наблюдаваната различна ориентация на посоката на всяка ковалентна връзка при образуването на водородна връзка при изследваните трипептиди .

Експерименталната линейно поляризирана ИЧ спектроскопия (IR-LD) в твърдо състояние и протонните NMR спектри ( $^1\text{H-NMR}$ ) във воден разтвор ясно показват, че и двата три пептида – Val-Pro-Pro и Ile-Pro-Pro предпочетено съществуват в неутрална форма –  $\text{H}_2\text{N-R-COOH}$ .

### **II.2.3. Цис/транс изомери на пролинови пептиди (труд 16)**

Известно е, че *цис* и *транс* изомерите на пролиновите пептиди в разтвор се намират в динамично равновесие в зависимост от рН , температура, разтворител и други фактори. Съотношението на *цис/транс* конформерите при пролиновите пептиди се определя от отношението на относителните интегрални на  $\alpha$ -, $\delta$  – H протоните в пролиновото ядро

Определянето на протонните резонансни сигнали на дипептида Val-Pro е осъществено чрез анализ на 2D  $^1\text{H}/^1\text{H}$  COSY,  $^1\text{H}/^1\text{H}$  TOCSY и  $^1\text{H}/^1\text{H}$  NOESY NMR спектри. Получените NMR данни, показват че синтезираният от нас дипептид в разтвор е смес от два изомера (*cis* и *trans*).

За доказване на рН индуцираното изменение на протонните химични сигнали в молекулата на дипептида Val-Pro и *cis- trans* изомеризацията на пептидната връзка, бяха получени  $^1\text{H}$  NMR спектри при рН в диапазона от 3-13 при  $279^\circ\text{ K}$ , като *cis- trans* равновесието беше определено като функция от рН.

Най-важните рН зависими химични промени се наблюдават при  $\alpha\text{H}_{\text{Val}}$  протоните на двете изомерни форми, докато  $\alpha\text{H}_{\text{Pro}}$  остават относително незасегнати.

Установено беше, че дипептидът Val-Pro преминава преимуществено в *trans* изомерна форма (65-74%) при рН от 3 до 7. Това е в съответствие с пресмятанията за катионната форма на *cis* Val-Pro , която е предпочитана на всички изчислителни нива. Пресмятанията за анионните изомерни форми на Val-Pro на нива HF и CCSD(T) също предполагат съществуване на двата изомера.

**Получените резултати показват, че *cis - trans* изомеризацията е строго рН зависима, като *trans* изомера на Val-Pro е преобладаваща изомерна форма, когато**

**аминогрупата е протонирана. Наблюдава се почти равно разпределено на *cis* и *trans* изомерите при неутралните и анионни форми на дипептида.**

#### ***II.2.4. Аминокиселинни естери на захари като синтетични ACE инхибитори (труд 49, 55)***

От литературните данни също е известно, че моно-и полиацилирани захари с аминокиселини също проявяват ACE инхибиторна активност и това ни стимулира да проведем изследвания за разработване на лесен и точен метод за химичен синтез на аминокиселинни естери на захари.

Изследвана е реакция на трансестерифициране на аминокиселинни естери за получаване на ацилирана захароза и глюкоза. Поради лесния синтез и високите добиви на крайният продукт, като аминоацилиращи агенти се използваха слабо активирани цианметилови естери на N-защитени аминокиселини. За провеждането на реакцията на трансестерификация (аминоацилиране) бяха избрани едни и същи условия - стайна температура, сух DMF, сух Et<sub>3</sub>N и ацилиращи агенти цианметилови естери на съответните аминокиселини (валин, пролин и изолевцин). Получените производни на глюкозата и захарозата бяха доказани с <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, DEPT135, COSY, HSQC анализи.

С ЯМР техники (COSY, DEPT, HSQC) е доказана структурата на **2<sup>g</sup>-O-, 3<sup>g</sup>-O-, 6<sup>g</sup>-O-, 1<sup>f</sup>-O- естери на захарозата с аминокиселините - валин, пролин и изолевцин.**

Намерен е лесен и ефективен начин чрез BETX за разделяне на получените региоизомери на естерифицирани с аминокиселини захари с използване на амино-колона с обърната фаза и градиентно елуиране.

#### ***II.2.5. Докинг симулации (труд 51)***

С прилагане на програмата MOE2011 бяха осъществени докинг симулации с три от синтезираните пролинови пептида Val-Pro, Val-Pro-Pro, Val-Pro-Pro-Pro. За целта е ползван така наречения "Induced Fit" протокол, а замените са оптимизирани с прилагането на MMFF94x силово поле. Най-силните взаимодействия между подцентрове от активния център на ензима бяха регистрирани при взаимодействието с трипептида Val-Pro-Pro чрез осъществяване на хидрофобни, електростатични и водородни връзки. Получените предварителни резултати показват, че отрицателно заредената група на крайния пролинов остатък осъществява взаимодействие с Trp<sup>523</sup> от активния център на ензима. При тетрапептида Val-Pro-Pro-Pro се регистрира взаимодействие с Trp<sup>520</sup> и Lys<sup>511</sup>. Двата пролинови остатъка при трипептида са разположени в хидрофобния S<sub>2</sub> джоб на ензима. Предполага се, че те осъществяват взаимодействие чрез хидрофобни връзки с Phe<sup>512</sup>, Trp<sup>352</sup>, Val<sup>518</sup> и Ala<sup>386</sup>.

Получените резултати са в съответствие с регистрираната биологична активност на съответните пептиди, като с най-висока активност е трипептида.

### ***III. Молекулен дизайн и синтез на биоконюгати с потенциално приложение в биомедицината***



### **III.1. Синтез, спектрални свойства и биологична активност на $\alpha$ -аминофосфонатни конюгати (труд 5)**

Аминофосфоновите киселини и техните производни представляват важен клас на биологично активни съединения, които притежават голям потенциал за приложение в медицината и фармацията. Поради структурната прилика с  $\alpha$ -аминокиселини,  $\alpha$ -аминофосфонатите могат да действат много ефективно като инхибитори на ензими, имитиращи тетредричен интермедиат или да упражняват антимикробна, антитуморна и антивирусна активност. Те са много обещаващи вещества в разработването на потенциални лекарства срещу различни метаболитни нарушения.

Синтезирани са нови хибридни структури съчетаващи антрацен и фуран съдържащ аминофосфонат: [N-метил(диетоксифосфонил)-1-(9-антрил)фурфуриламин и [N-метил(диметоксифосфонил)-1-(9-антрил) използвайки класически реакцията на Pudovik и микровълнов синтез на Kabachnik-Fields. Проведени са детайлни  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{31}\text{P}$  ЯМР анализи, спектрални (абсорбционни и флуоресцентни) рентгеноструктурни и биологични изследвания. Особено важно достижение в това изследване е разделянето на рацемичните смеси до чисти енантиомери както в аналитичен така и в полупрепаративен режим с използване на хирална колона. Високата енантиомерната чистота на изолираните енантиомери позволи провеждането на биологични изследвания като ниви на генотоксичност и цитотоксичност *in vivo*. Всички тествани съединения показват слаб генотоксичен ефект. Те имат умерен кластогенен и висок антипролиферативен ефект върху клетки от костен мозък на мишки. Пролiferативният капацитет на костната популация се запазва почти наполовина в сравнение с нетретирана контрола.

Анализът на рентгено-структурните изследвания показва, че целовото съединение кристализира в орторомбична пространствена група  $Pbca$  ( $N^\circ 61$ ) в една асиметрична клетка. Данните от кристалната структура доказват, че е възможно осъществяването на междумолекулни водородни връзки от типа  $\text{N-H}\dots\text{O}$  и слаби  $\pi \dots \pi$  взаимодействия между антраценовите ядра,  $\text{CH}_3\dots\pi$  и  $\text{O}\dots\pi$  между фурановия кислород и антраценовото ядро.

### **III.2. Синтез на конюгати с 3-бензотиазол-2-ил-2H-кумарин (труд 46).**

С цел получаването на нов титрант за липази, посредством три стадийна процедура е синтезиран орфаносфорен естер на 3-(бензотиазол-2-ил) -7-хидрокси-2H-хромен-2-он. Доказано е, че присъствието на хетероцикличен заместител в третата позиция на кумариновият пръстен и удължаването на спрегнатата система има изразено влияние върху фотофизичния свойства на целевото съединение.

Чрез прилагане на режим в нормална фаза с ВЕТХ се извършва пречистване на суровото съединение. Структурата и чистоата на новия инхибитор се определят чрез ЯМР и спектрални анализ и ВЕТХ в аналитичен режим.

Панкреатична липаза от *Candida rugosa* AY "Amano" се използва за определяне на свойствата на органофосфорният естер на бензотиазолил хроменона. Предварителните резултати показват, че новосинтезираният органофосфорен естер на бензотиазолил хроменон притежава обещаващи свойства за качествено и количествено определяне на липази в различни хетерогенни системи или на имобилизирани ензими, които трудно може да бъдат изследвани с други спектрални методи.

Синтезиран е и доказан с  $^1\text{H}$ - и  $^{31}\text{P}$ -ЯМР хромогенният и флуорогенен субстрат - олеинов естер на 3-бензотиазол-2-ил-2Н кумарина. Панкреатична липазата *Candida rugosa* беше използвана за предварителни качествени анализи и успешно бяха доказани спектралните (абсорбционни и флуоресцентни) свойства.

**Като принос може да се отбележи, че полученият от нас олеинов естер 3-бензотиазол-2-ил-2Н кумарина притежава обещаващи свойства като хромогенен и флуорогенен ензимен субстрат за липази.**

Резултатите от тези изследвания са включени в успешно защитената докторската работа на Теодора Цветкова.

### ***III.3. Дизайн, синтез, фотофизични и биологични свойства на фталоцианинови конюгати (труд 2, 6,7)***

При фотодинамична терапия от основно значение за ефективността на процеса имат както физикохимичните свойства на фотосенсибилизатора така и процесите на взаимодействие с третираните биологични обекти – натрупване, локализация и цитотоксичност (нативна и индуцирана). Фотофизичните свойства (абсорбция, флуоресценция, квантови добиви и др.), фотохимичните свойства, (генерирането на синглетен кислород и радикали) и фармакокинетичните свойства (натрупване, задържане и селективност спрямо тумори, патогенни микроби и вируси) на фотосенсибилизатора съществено зависят от структурата му.

Синтезирани са нови фотосенсибилизатори на базата на мономолекулни лутеций фталоцианини с кватернизирани периферни и непериферни заместители (**труд 7**). Фотохимичните и фотофизичните им свойства - високи стойности на квантовия добив на синглетен кислород, повишена фотостабилност, подобрена селективност и др. са предпоставка за ефективността им при фотодинамична терапия. Проведени са изследвания за цитотоксичност и фотодинамична активност по отношение на туморни клетъчни линии и патогенни микробактерии на синтезираните съединения. Проучени са възможностите за използване на съединения с подчертани способности за трансфер на протони и образуване на водородни връзки в качеството им на радикали, подобряващи съществено селективността и натрупването в целевия биологичен обект на фотоактивните съединения.

Получени са нови съединения, които са конюгати на Zn фталоцианин с аминокиселините тирозин, аргинин и фенилаланин **ZnPcTyrBoc (труд.6)**, **ZnPcTyr** , **ZnPcBocArg(Tos)** , **ZnPcBocPhe** .

Използван е нов подход на редукция на нитро- групи чрез каталитично хидрогенолиза в присъствие на катализатор 10% Pd/C, като тази реакция се прилага за първи път при фталоцианинови комплекси (труд 2).

Приложен е и нов подход за активиране на карбоксилната група на аминокиселините чрез използване на реагента DMTMM.BF<sub>4</sub> и 4-метилморфолин в среда на ниско-кипящ разтворител тетраhydroфуран. В резултат на тези изследвания и приложени модификации на работната прожедура, получените съединения са с висока чистота и времето за активиране на карбоксилната група е по-кратко.

#### **IV. Изследвания върху гликоконюгати- биосърфактанти (труд 8, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 17, 18, 20,49,50)**

Обекти на интензивни изследвания в тази нова за мен тематика, бяха повърхностно активни вещества, продуцирани от бактериални щамове от родовете *Rhodococcus*, *Micrococcus* *Nocardia*, *Pseudomonas* и *Candida bombicola* ATCC 22214. Те продуцират богато разнообразие от гликолипиди структура, известни като биосърфактанти. Изследваните щамове бяха култивирани при използване на различни минерални среди и различни въглеродородни и водоразтворими субстрати.

Новоизолираните биосърфактанти от суровата реакционна смес бяха обект на пречистване, структурно охарактеризиране и доказване на техните повърхностно активни свойства. Приложени бяха разнообразни хроматографски техники за пречистване при средно налягане и комбинации от различни елуационни системи. Качественото доказване на новите продукти беше извършено чрез проявяване със специфични реагенти-анисалдеhid, орцинол или  $\alpha$ -нафтол. Установено беше, че получените гликолипиди са трехалозолипиди, рамнолипиди, или софоролипиди. Използвана беше и ВЕТХ за определяне чистотата на новоизолираните гликолипиди при прилагане на градиентно елуиране.

Структурата на пречистените гликолипиди беше определена чрез мас спектрален анализ и комбинация от <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, DEPT135, COSY, HSQC NMR анализи

Сравнителният анализ на получените данни показва, че щам *Nocardia farcinica* BN 60 продуцира смес от трехалозо тетраестери, като съотношението на двата основни продукта с молекулна маса 848 и 876 е **1:4**, докато при другите изследвани от нас щамове (*Rhodococcus* и *Micrococcus*) това съотношение е **1:2**.

Щам *Pseudomonas aeruginosa* BN10 продуцира смес от моно- и ди-рамнолипиди с молекулна маса 503 и 648, като се наблюдава отношение на ди/моно – 7:2, което е необичайно и не е описано в научната литература.

С цел да се подобри ефективността при продуцирането на софоролипиди бяха проведените изследвания с щам *Candida bombicola* ATCC 22214, като е експериментиран интегриран процес с прилагане на ултразвук. Тази нова технология се прилага за пръв път при *Candida bombicola* за разделяне на клетките и се постигна ефективност около 99% и тотално количество 73,3 г/л софоролипид. При експеримент с добавяне на втори субстрат

– смес от необичайни разклонени мастни алкохоли, съдържащи предимно 2-хексил-1-деканол, беше установено и доказано получаването на нов продукт 1-O- $\beta$ -глюкопиранозил-2-хексил-деканол.

### **Приложение на биосърфактанти**

Проведени са изследвания за доказване на антимикробната активност на рамнолипидите продуцирани от шам *Pseudomonas aeruginosa* BN 10. Резултатите ни показват, че изследваните рамнолипиди силно потискат растежа на Грам-положителни бактерии от родовете *Staphylococcus*, *Streptococcus* и *Bacillus*, като най-висока активност притежава моно-рамнолипидната фракция, следваща по-активност е рамнолипидната смес и с най-ниска активност е ди-рамнолипидната фракция.

За изясняване на цитотоксичната и антитуморна активност бяха проведени експерименти с рамнолипидните фракции от шам *Pseudomonas aeruginosa* BN10 и на трехалозолипидния сърфактант от новоизолирания шам *Nocardia farcinica* BN60. Използвани бяха различни клетъчни линии: HL-60 (остра миелоидна левкемия), BV-173 (хронична миелоидна левкемия), SKW-3 (Т-лимфоцитна левкемия) and JMSU-1 (карцином на пикочния мехур).

**За пръв път беше доказано, че моно-рамнолипидната фракция е в пъти по-активна при всички изследвани клетъчни линии в сравнение с ди-рамнолипидите.** Тази активност е концентрационно зависима, като 50% инхибиране на клетъчната животоспособност се достига при концентрация от около 50  $\mu\text{M}$ .

Получените резултати за трехалозо-тетраестера, изолиран от *Nocardia farcinica* BN60 показват, че той проявява висока активност при всички клетъчни линии при много ниска концентрация (30  $\mu\text{M}$ ) и представлява интерес за пълно фармакологично охарактеризиране.

Обект на изследвания бяха и редица физикохимични свойства на суровата реакционна смес и пречистените продукти. Регистрирани са изключително ниски стойности в сравнение с цитираните в литературата данни, като понижение на повърхностното напрежение до 24.4  $\text{mN m}^{-1}$ , междуфазовото напрежение до 1.3  $\text{mN m}^{-1}$  и СМС от 5 до 25  $\text{mg.l}^{-1}$ .

Проведени бяха изследвания за определяне на контактния ъгъл  $\theta_r$  на разтвор на дирамнолипид на граничната повърхност с хидрофилна твърда повърхност -  $\text{SiO}_2$  (**труд 12**). Измерените стойности за контактния ъгъл  $\theta_r$  са относително ниски 4-18°.

Получените резултати от изследванията на тънки течни филми показват, че въпреки близката си структура физикохимичните отнасяния на, отделните компоненти(моно и ди) на рамнолипидната смес се различават от рамнолипидната смес. Тези различия се наблюдават както в обема (различен тип и конфигурация на съществуващите самоорганизиранни структури), така и на фазовата граница разтвор/въздух или разтвор/твърда повърхост.

Установените много добри емулгиращи свойства на изследваните биосърфактанти разкриват възможност за приложението им като стабилизатори на емулсии в козметиката и хранителната промишленост.

#### **Приложение на биосърфактанти в екологията**

Проведените от нас изследвания установиха, че щам *Micrococcus luteus* BN56 разгражда нефтопродукти до 93 % след 10 дни инкубиране. Този резултат има важно приложно значение и показва големия потенциал на новите биосърфактанти.

С адаптирани клетки на щам *Nocardia farcinica* BN26 беше регистрирано едновременно биоразграждане до пълното им изчерпване на фенол (3.5 г/л) и н-хексадекан (0.5 г/л) в продължение на 18-24 часа.

Проведени бяха и експерименти за интензифициране на процеса на фенолно разграждане чрез имобилизиране на микробните клетки на щам *Rhodococcus wratislawiensis* BN38 върху носител метилцелулоза. Доказани са четиридесет активни цикъла на фенолна биодеградация, като общото количество прибавен и разграден фенол достига до 20 g/l.

Получени бяха положителни резултати и при експериментите с имобилизирани клетки върху криогелна матрица (hydroxypropylcellulose/poly (Nisopropylacrylamide - НРС/PNIPAAm) на щам *Rhodococcus wratislawiensis* BN38 за едновременна биодеградация на хидрофилен (фенол) и хидрофобен (н-хексадекан) ксенобиотик. Такъв експеримент в условия на полунепрекъснат процес с имобилизирани клетки се провежда за пръв път (**труд 8**). Тази моделна система притежава способност за разграждане на двата ксенобиотика до концентрации от 2.4 грама / L и може да се използва многократно.

**Свойствата на изследваните бактериални щамове, в свободно и имобилизирано състояние, да разграждат нефт, алифатни и ароматни въглеводороди, разкриват потенциала им като екологичен материал при биологичното пречистване на нефтени разливи и отпадни води, съдържащи смес от ксенобиотици.**

Разработен е метод за химичен синтез на моделни биосърфактанти (**труд 49, 50**). Проведена е естерификация на незащитени моно и дизахариди с цианометилови естери на наситени мастни киселини.

Детайлният анализ на  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , DEPT135, COSY, HSQC и HMQC ЯМР спектрите на синтезираните естери на захарозата доказва, че в пречистената реакционна смес има три компонента - 3<sup>g</sup>-О-, 4<sup>g</sup>-О-и **неочаквания 3<sup>f</sup>-О- моноацилен естер**. Получената смес от палмитинови естери за трехалозата е очаквана - два естера при първичните 6-ОН and 6'-ОН и един при вторична 3-ОН група.

Измерените стойности за понижението на повърхостното напрежение и на междуфазовото напрежение за естерите на захарозата са  $34.7 \text{ mN m}^{-1}$  и  $2.1 \text{ mN m}^{-1}$ , а за трехалозните естери съответно  $34 \text{ mN m}^{-1}$  и  $2.6 \text{ mN m}^{-1}$ .

**Наблюдава се много добро съответствие в повърхностните свойства на синтетично получените сърфактанти и биосърфактантите.**

### **I.8. Резултати, свързани с моделни изследвания на образуване на пептидна връзка *in vivo* (труд 22)**

Обект на интензивни изследвания е изясняването на ролята на 2'-ОН групата при 3'-крайния аденозин на пептидил-РНК за протеиновия биосинтез, но нейния ефект все още е обект на дискусии. Ролята на А76 2'-ОН групата в катализа на рибозомата най-напред е разглеждана като обща киселина, в други изследвания - и като обща база, а по-късно молекулярно-биологичните изследвания показаха предполагаемата роля на бифункционален катализатор на А76 2'-ОН групата при рибозомния катализ.

Чрез изследване на зависимостта на скоростта на етанолиза на мимики на пептидил-тРНК - производни на 2'/3' О- безилоксикарбонил-L-р- нитрофенилаланил 5'-О- тритил-аденозинови производни е изследвана ролята на 2'-ОН групата в катализа.

Получените резултати ни дават основание да допуснем, че 2'-ОН едновременно може да приема протон от атакуващия нуклеофил и да подава протон на съседния 3'-кислород от естерната връзка. По този начин се формира циклично шестчленно преходно състояние, което може да се разглежда и като субстрат подпомогнат каталитичен механизъм на рибозомата.

Подобна каталитичната роля - **като протонна совалка** в биокатализа като тази на 2'-ОН групата от А76 се наблюдава и при имидазола на хистидина в активния център на сериновите и цистеиновите протеинази.

### **Перспективи за бъдещи изследвания, като някои от тях вече са ход**

1. Изолиране и изследване на иновативни пептиди с антибактериални свойства от природни източници (земноводни) или химичен синтез на моделни структури като алтернатива на антибиотиците (**труд44**).

2. Изследвания върху непатогенен щам *Ps. Putida* за изолиране и доказване на нови природни продукти, като нови рамнолипидни структури, терпеноиди, нерибозомни пептиди и други.

3. Изследване на антитуморна активност на биосърфактанти чрез електропорация, един нов перспективен метод.