

СПРАВКА ЗА НАУЧНИТЕ ПРИНОСИ

**на доц. д-р инж. Весела Денева Кънчева
за участие в конкурс за академичната длъжност „професор“ в професионално
направление 4.2 Химически науки, научна специалност „Биоорганична химия, химия на
природните и физиологичноактивни вещества“ за нуждите на Лаборатория по „Химия
на липидите“, Институт по органична химия с Център по фитохимия, БАН,
обнародван в Държавен вестник бр. 94 от 24.11.2017 г.**

Научната тематика и научните ми интереси след придобиване на академичната длъжност „доцент“ (2005 г.) са насочени към изучаване предимно на зависимостта структура-активност на природни био-антиоксиданти и техни синтетични аналози чрез прилагане на различни комбинации от кинетични, спектрални, хроматографски и теоретични модели и създаване на база данни. Създават се антиоксидантни композиции (двойни и тройни смеси), които могат да се използват като хранителни добавки (за превенция) или за терапия на различни заболявания. Изучават се ефектите на синергизъм (положителен), адитивизъм (сумарен) и антагонизъм (отрицателен) между индивидуалните компоненти. Нашата изследователска група е единствената в страната, която изучава кинетиката и механизма на свободно-радикалови процеси в присъствие на липиден субстрат. Моделира се кинетиката на липидното окисление в многокомпонентни системи, в присъствие на прооксиданти, антиоксиданти и сърфактанти, което дава възможност да се изясни механизма на тяхното действие. Изследователската ми работа е свързана и с оценка на окислителната стабилност на липиди като мярка за качеството им и търсене на пътища за нейното повишаване чрез добавяне на природни и синтетични антиоксиданти – индивидуално и в смеси.

Научните приноси на изследванията, обект на научната ми работа, имат фундаментален и приложен характер и спомагат за изясняване на факторите, които имат значение при дизайна на нови био-антиоксиданти и за по-задълбочено разбиране на връзката между структурата и активността на изследваните антиоксиданти. Научната ми работа допринася за разширяване на научната тематика на лабораторията по „Химия на липидите“ към ИОХЦФ – БАН и за повишаване компетентността ѝ като съвременна лаборатория по био-протектори. Работата ни в екип с колеги от страната и чужбина повишава престижа на лаборатория „Химия на липидите“ в национален и в международен аспект.

Научните приноси на изследванията могат да бъдат обобщени в следните тематични области:

- 1. Кинетика и механизъм на липидното окисление.**
- 2. Зависимост структура - антиоксидантна активност.**
- 3. Създаване на нови антиоксидантни композиции на база двойи и тройни смеси.**

1. Кинетика и механизъм на липидното окисление

Оксидативният стрес възниква в резултат на дисбаланс между повишената продукция на свободни радикали и антиоксидантната защитна система. Свободно радикаловите процеси е доказано, че водят до увреждания и смърт на клетките и се свързват с патогенезата на огромен бр ой заболявания – рак, сърдечно-съдови заболявания, астма, артрит, възпаления, невродегенерация, болестта на Паркинсон, Алцхаймер и деменция. Остаряването също е сума от свободно-радикаловите реакции, които въздействат върху клетките и тъканите. Различни са причините, специфични за отделните болестни състояния, но във всички случаи се наблюдава изменение на скоростта на липидното пероксидно окисление. В тр. 66, 67, 71 се обсъжда

проблема с оксидативния стрес, свободните радикали и липидната пероксидация и е направен обобщен анализ на ролята на редица ендогенни и екзогенни медиатори като прооксиданти и антиоксиданти, включени в окислителните процеси *ин vivo* (тр. 66). Представена и дискутирана е кинетиката и механизма на ненаситено липидно окисление, включващо изомеризация на липидните пероксидни радикали и разпадането на липидните хидропероксиди до свободни радикали (тр. 67). Направена е оценка на вличието на различни фактори (структурни и физични). Предложено е компютърно моделиране на липидното окисление, за да се изясни ролята на про- и антиоксидантно действащите компоненти.

1.1. **Оценка на окислителната стабилност на липиди като параметър за контрол на качеството им** (тр. 68,71,74,79,44).

Известно е, че в повечето хранителни продукти, козметични средства и лекарствени препарати, най-уязвимите към кислорода се явяват липидните компоненти и именно тяхната окислителна деструкция обуславя загубата на качеството им и на рязкото влошаване на органолептичните и потребителските им свойства. Броят на инхибиторите, обаче, които са разрешени за добавяне в хранителни, козметични и лекарствени продукти, е ограничен, затова се поставя задачата за тяхното най-ефективно използване.

- ✓ Чрез мониторинг на кинетиката на липидното автоокисление се дава обективна и комплексна оценка на стабилността на липиди и съдържащите ги продукти спрямо окислителна развала. Отчитат се субстратните фактори, които оказват влияние върху окислителната стабилност на липидите: а) тип и степен на ненаситеност на липидния субстрат, б) свързване на мастните киселини в естери с метанола и глицерола (метилови естери и триглицериди), в) присъствие на синергисти -съединения, способни да регенерират антиоксиданта и да повишат неговата ефективност, г) присъствие на съединения, способни да образуват комплекси на база водородна връзка с антиоксиданта и да понижат неговата ефективност, д) присъствие на прооксиданти, които ускоряват разпадането на липидните хидропероксиди и да увеличат скоростта на окисление, е) присъствие на сурфактанти (повърхностно активни вещества), водещи до образуването на „обърнати мицели“ (тр. 69,71,74).

Получените резултати показват, че трябва да се изследва системата като цяло-окисляем субстрат-антиоксидант, а не изолирано само структурните особености на антиоксиданта. Един и същ антиоксидант може да прояви различна активност в зависимост от свойствата на окисляемия субстрат.

1.2. **Изучават се възможностите за повишаване на окислителната стабилност на липидите (природни и моделни) чрез използване на природни антиоксиданти, смеси от тях, подправки и растителни екстракти и др.** (тр. 36, 53, 57-59, 69).

Растенията, вследствие на неспособността си да избягват вредните условия, притежават комплекс от предпазни средства. Едно от тези неблагоприятни условия е оксидативния стрес, срещу който редица антиоксидантно действащи компоненти присъстват в растенията.

- ✓ *Carthamus Lanatus L* е растение, което има важно фито-фармакологично значение поради съдържанието на флавоноиди (кверцетин, лутеолин, кверцетрин, рутин, и 7-О-глюкозиди на кверцетин и лутеолин). Доказано е, че негови екстракти и фракции значително подобряват окислителната стабилност на липидите (тр. 58, 69).
- ✓ *Tribulus terrestris* се използва в народната медицина на Индия, Китай и България за лечение на различни заболявания. Сапониновата фракция на това растение, която е богата на стероидни сапоници и флавоноиди, намира приложение в съвременната медицина като компонент на лекарствени препарати, ефективни при лечението на импотентността и при проблеми на сърдечно-съдовата система. Доказано е, че *Tribulus terrestris* притежава висок капацитет да улавя свободни радикали и да инхибира окислителния процес (тр. 59, 69)

Последното се дължи на изолираните и доказани флавоноиди: кверцетин, кампферол, изорамнетин, техните 3-О-глюкозиди и рутинозиди и новооткритите 3-О-р-куароилглюкозиди на кампферола и изорамнетина. Подробен сравнителен анализ е представен в изследване на зависимостта структура-активност (тр. 59, 69).

- ✓ Различни екстракти и фракции от традиционни индийски подправки (черен пипер и червено чили), както и от лечебните растения мариголд и каранджа, които намират приложение в Аюрведик медицината на Индия, показват висок капацитет да улавят свободни радикали и да инхибират липидното автоокисление (тр. 53, 56, 69). Работата е изпълнена по линия на съвместен проект с Национален център по хранителни технологии на Индия. Тези резултати могат да се използват за разработването на хранителни добавки за пособряване на храненето и здравето на хората.
- ✓ Предложено е прилагането на полимерни наомембрани, резистентни към агресивните органични разтворители, за екстракция към 40 растения с фармацевтично приложение. Реализирането на т.нар. "хибридна екстракция", която протича като нанофилтриращ процес, се осъществява на два етапа (тр. 75): първият етап се състои в тестване на моделни разтвори на познати активни съединения с природен произход, а вторият етап - в прилагането им към реални екстракти. Подбрани са 50 фенолни съединения, които са изолирани от природни източници (лечебни растения, прополис, подправки и др.) с широк спектър на хидрофилно-липофилен баланс, биологична активност и/или антиоксидантна активност. Те са подходящи за експериментите и имат молекулна маса между 150-600, което кореспондира с размера на кухините на наомембраните. Изборът на природни екстракти за нанофилтруване е направен на база предварителна експертна оценка. Нанофилтруването се осъществява в две направления: за концентриране на екстракта и за модифициране на екстракта (тр. 75).
- ✓ Изучена е възможността за повишаване на окислителната стабилност на липиди от екстракти на ленено семе (тр. 40, 45, 47). Сравнен е антиоксидантният потенциал на хексановия екстракт и неговия алкален хидролизат в две моделни системи: хомогенно липидно автоокисление и окисление на бета-каротен в емулсия. Определено е тоталното съдържание на феноли и индивидуалните компоненти са доказани чрез използване на високоефективна течна хроматография. Установено е, че тоталното фенолно съдържание нараства след алкална хидролиза с около 10%. Фенолните компоненти в екстракта на лененото семе присъстват като голяма макромолекула. Установено е, че основният продукт, намерен след алкална хидролиза, секоизоларицирезинол диглюкозид, не е в състояние ефективно да инхибира липидното автоокисление. Неговият агликонов метаболит (секоизо-ларицирезинол) обаче показва висока антиоксидантна активност в двете моделни системи. Намерени са малки количества пара-кумарова и ферулова киселини (тр. 47). Работата е изпълнена по линия на съвместен проект с Полската академия на науките по линия на ЕБР.

1.3. Изучен е ефекта на гама облъчването върху окислителната стабилност на липиди (тр. 33, 35, 43, 77).

Хранителните технологии за облъчване се прилагат за намаляване риска от развиването на патогенни микроорганизми в храните и удължаване срока на тяхната годност и намаляват загубите за съхранението им. Главната цел е да се понижи риска от увреждане здравето на хората. Освен положителен ефект са възможни негативни промени в биологично-активните компоненти на облъчените храни. Ионизиращото лъчение води до генериране на свободни радикали, които проявяват силен токсичен ефект и могат да увредят клетъчни липидни мембрани, протеини, нуклеинови киселини.

- ✓ За първи път е установено, че окислителната стабилност и мастно-киселинният профил на телешко месо се променят след облъчване с гама лъчи в различни дози. Доказано е, че облъченото месо е с понижена окислителна стабилност, като ефектът се засилва с увеличение на дозите на облъчване. Мастно-киселинният профил на триглицеридите е

определен с ¹H-ЯМР анализ, който показва промяна в концентрацията на наситените и полиненаситени мастни киселини след облъчването. Установено е увеличение на наситените мастни киселини (стеаринова, палмитинова) и понижение на полиненаситените мастни киселини в облъченото месо в сравнение с необлъченото (тр. 77). Разработката е изпълнена по линия на съвместен проект с Национален център по радиационна защита с финансовата подкрепа на ФНИ.

- ✓ Подбрани са от Министерство на здравеопазването за облъчване с гама лъчи български традиционни чайове (мащерка, мурсалски чай, старопланински чай, лека нощ, тракийски и планински чай), прилагани при имуноподтиснати пациенти. Дозата на облъчване е подбрана на база предварителен микробиологичен тест. Доказано е за първи път, че при облъчване на чайовете с умерени дози гама лъчи, антиоксидантният им капацитет не се понижава. (тр. 33, 43). Направен е сравнителен анализ на етанолни и водни екстракти на изследваните чайове преди и след облъчване с гама лъчи. Намерено е съдържание на феноли и танини в облъчените чайове. Наблюдавано е за първи път, че мащерката след облъчване показва по-висок антиоксидантен потенциал (тр. 33, 43). Това е изключително важен резултат, защото показва, че мащерката има потенциал да се прилага като протектор срещу гама облъчване. Разработката е по линия на съвместен проект с Международната агенция по атомна енергия.
- ✓ Изследван е фенолният профил на етанолни екстракти на мащерката (*Thymus serpyllum L.*) (тр. 35) чрез прилагане на високоефективна течна хроматография. Установени са 32 фенолни съединения, от които 12 са идентифицирани като производни на хидроксibenзоената и хидроксиканелената киселини, флавонови и флаванони. Доказано е и наличието на тимол. Най-високо е съдържанието на кафеената, розмариновата и хлорогеновата киселини, както и на лутеолин и лутеолин-7-О-глюкозид. Установено е, че гама облъчването не води до качествени промени във фенолният профил на мащерката, а само до слаби количествени промени. Разработката е по линия на съвместен проект с Полската академия на науките.

1.4. **Моделира се кинетиката на липидното окисление в многокомпонентни системи за изясняване особеностите в механизма на липидното окисление (тр. 63, 68, 76, 62,).**

Протичането на окислителни процеси в липидните мембрани се свързва с редица заболявания. Образуваните при липидното окисление хидропероксиди инициират допълнително процеса поради способността си да се разпаднат на свободни радикали. Най-новите изследвания съобщават за установена по-висока повърхностна активност на липидните хидропероксиди от съответните неокислени липидни продукти. Способността на повърхностно-активните мицели да увеличават окислителната стабилност на емулсиите масло-вода може да бъде използвана в хранителната промишленост за подобряване качеството на продуктите. В мицеларна среда (микрочетерогенна) в присъствие на вода реактивоспособността на фенолните антиоксиданти спрямо пероксидните радикали се понижава.

- ✓ Обобщени са резултатите, получени през последните 20 години за кинетиката и механизма на липидното окисление в присъствие на прооксиданти, антиоксиданти и сърфактанти (тр. 68). Резултатите са получени съвместно с колеги от Руската академия на науките, Институт по химична физика по съвместен проект по линия на ЕБР.
- ✓ Изведени са кинетични модели, описващи липидното окисление в инициран и автоокислителен режим, за неинхибиран и инхибиран процес, за метиллинолеат при умерени температури (тр. 47, 68). Тези модели дават възможност да се оцени делът на отделните етапи на липидното окисление като се сравняват експериментално получените резултати с кинетичните криви от теоретичния модел. Чрез вариране на скоростните константи на отделните етапи се постига пълно съвпадение на експерименталните резултати и

теоретичните криви. С помощта на такива модели е доказана значимостта на реакцията на хомодиспропорциониране на фенооксилните радикали, водещо до регенериране на изходната молекула на фенолните антиоксиданти. Доказано е, че делът на тази реакция е много по-значим в условия на липидно автоокисление в сравнение с инициран режим на процеса. Това е изключително важен резултат, защото дава възможност да се изясни механизма на действие на различни фенолни антиоксиданти в хода на липидното автоокисление.

- ✓ Предложени са оригинални модели, описващи кинетиката на натрупване и разпадане на липидните хидропероксиди самостоятелно и в присъствие на прооксиданти (кислородсъдържащи съединения). Установено е, че разпадането на линолеатните хидропероксиди протича по псевдомономолекулен механизъм (тр. 63,68).
- ✓ Изучен е ефекта на различни повърхностно-активни вещества (ПАВ) върху кинетиката и механизма на липидното окисление. Доказано е, че ПАВ спомагат за образуването на „обърнати мицели“ в липидна среда. Изучена е кинетиката на образуване на прави и обърнати мицели в присъствие на липидни хидропероксиди и ПАВ (СТАС, СТАВ, STASH, SDS, AOT). В случай на йоногенни ПАВ тези обърнати мицели, по своята същност, представляват нано-реактор, в който в зависимост от природата на ПАВ и хидропероксида протича едно или друго превръщане на хидропероксида (тр. 54). Установено е, че катионните ПАВ действат като прооксиданти като ускоряват разпадането на липидните хидропероксиди до свободни радикали, докато анионните ПАВ проявяват инхибиращ ефект (тр. 62,68,78).
- ✓ Изследвано е влиянието на природни ПАВ върху инхибирано липидното окисление. Основно внимание е обърнато на нейногенни ПАВ (октадеканол, монопалмитоил глицерол и дипалмитоилглицерол) върху антиоксидантната ефективност на инхибиторите (алфа-токоферол, кафеена киселина и бутилхидрокситолуен) по реакция с пероксидните радикали. Установено е, че нейногенните ПАВ понижават антиоксидантната ефективност на инхибиторите и увеличават скоростта на натрупване на липидните хидропероксиди. Получените резултати свидетелстват за това, че нейногенните ПАВ, подобно на катионните, водят до увеличение на скоростта на инициране на свободни радикали в окисляемия липиден субстрат. Сравнителният анализ показва, че ефектът на ПАВ по степен на понижение на антиоксидантната ефективност при липидното окисление корелира с относителното нарастване на хидрофилността на антиоксиданта (тр. 62, 68,78).
- ✓ Изучена е кинетиката на образуване на прави и обърнати мицели в присъствие на кверцетин, рутин и ПАВ (цетилтриметиланиониевхлорид, СТАС) (тр. 54, 62, 68). Доказано е, че кверцетинът се изразходва 10 пъти по-бързо от рутина в системи на обърнати мицели на хидропероксиди и катионен сърфактант, а при прави мицели (във водна среда) съответно 4 пъти по-бързо от рутина. Показано е, че скоростите на изразходване на кверцетина и рутина не зависят от изходните концентрации на флавоноидите, което е в сила, когато се улавят всички образувани в системата свободни радикали.
- ✓ Приложени са дифузионна DOSY и NOESY NMR спектроскопия за изследване структурата и определяне размера на мицелите в присъствие на СТАС, кверцетин или рутин. Резултатите от DOSY спектрите показват, че молекулите на кверцетина и рутина са интегрирани в мицелите. Структурата на мицелите и взаимното разположение на сърфактанта СТАС, кверцетина и рутина, са определени с NOESY ЯМР спектроскопия. Установено е за първи път, че молекулите на кверцетина и рутина са локализираны предиимно в периферията на мицелите (тр. 76).

2. Зависимост структура - антиоксидантна активност

Понякога се счита, че антиоксидантната активност е синоним на биологичната, но в действителност няма пряка връзка на едната с другата. Има антиоксиданти, които проявяват и широк спектър на биологична активност, но има и антиоксиданти, които не

само че не проявяват биологична активност, но което е по-лошо - имат токсично действие. За съжаление и сред природните антиоксиданти има такива с токсично действие. Биоантиоксидантите (притежаващи едновременно антиоксидантна и биологична активност) играят много важна роля през последното десетилетие за предпазване здравето на хората (като хранителни добавки) и в терапията на различни заболявания (като монотерапия при високи концентрации на антиоксиданта и в комбинирана терапия с лекарствени средства като в този случай антиоксиданта е в ниска концентрация).

Получаването на нови биоантиоксиданти може да се реализира като се приложат две стратегии. От една страна това се постига като се съчетаят в една молекула различни функционални фрагменти, които могат взаимно независимо да действат синергистично на различни стадии на сложния многостадийен процес на липидното окисление. Проф. Бурлакова предлага избирането на молекула на антиоксидант като се добавят фрагменти, носители на биологична активност, или молекула на биологично активно съединение, като се добавят заместители с антиоксидантен потенциал.

Трябва да се има предвид, че наличието на силна антирадикалова активност е необходимо, не и достатъчно условие за проява на антиоксидантна активност. С други думи, способността на един антиоксидант да улавя свободни радикали е предпоставка за проява на антиоксидантна активност (т.е. да инхибира липидното автоокисление).

По-долу са представени получените по-важни резултати през последните 13 години за зависимостта структура антиоксидантна активност на общо 154 фенолни съединения: 50 кумаринови производни, 39 аналози на куркумин, 4 бензоксантенови и неолигнана, 6 хидрокси-халкона, 15 флавоноида, 25 производни на фенолни киселини, 6 стандартни антиоксиданти (токоферол, бутилхидрокситолуен, хидрохинон, третбутилхидрохинон, резвератрол, розмаринова киселина), 6 хидролизуеми танина.

В **тр.47** е изследвана връзката между структурата и антирадикаловата, антиоксидантна активност и полезния ефект за здравето на хората на познати и нови фенолни биоантиоксиданти (каротеноиди, катехоламини, фосфолипиди, халкони, кумарини, фенолни киселини, флавоноиди, лигнани и танини)

По-долу са представени някои от по-важните резултати, които са получени.

2.1. Кумаринови производни (тр. 32, 46, 50, 51, 55, 65, 69,70,73)

Кумарините са вторични метаболити, широко разпространени в природата. Те са ефективни при лечението на лимфоаденоми, но за сега не е изяснен механизма им на действие. Заболяването на черния дроб, което се наблюдава след инжектиране на кумарин, се дължи на образуването на 3,4-епоксидни междинни продукти при плъхове. Поради споменатия риск от образуване на епоксиди и възможна хепатотоксичност и канцерогенеза, повечето изследователи използват предимно 4 заместени кумарини (метил, хидрокси, фенил), защото те блокират възможното образуване на епоксиди.

Природният кумарин не притежава нито антиоксидантна, нито биологична активност.

- ✓ Представен е сравнителен анализ на общо 50 кумарина (10 природни и 40 техни синтетични аналози) и е изучена зависимостта структура-антирадикалова, антиоксидантна и биологична активност чрез прилагане на различни комбинации от експериментални и теоретични подходи. Получените резултати дават възможност за дизайн на нови кумаринови производни с очаквана антиоксидантна и антирадикалова активност (**тр. 65**).

Прости кумарини (тр. 32, 46, 50, 65,69,70,73). Интересен и успешен е подходът на проф. Пармар от Университета в Делхи, Индия, за дизайн на нови кумаринови производни, който избира структурата на простия кумарин – природно съединение, което не притежава нито антиоксидантна, нито биологична активност и чрез вариране на различни заместители по

синтетичен път успяват да създадат серия от нови кумаринови производни, с разнообразна антиоксидантна и биологична активност.

- ✓ Доказан е структурният фрагмент, отговорен за антиоксидантната активност на кумарините и е показано, че не броят, а взаимното разположение на фенолните групи, е от значение за антиоксидантната активност. Потвърдено е, че наличието на катехолова структура има съществена роля за високата антиоксидантна активност като резултат от възможното регенериране на дихидроксикумарините по реакция на хомо-диспропорциониране на семихиноновите им радикали (тр. 32, 46, 50).
- ✓ Доказано е, че заместителите в пириновия пръстен не оказват съществено влияние върху антиоксидантната активност, но имат важна/съществена роля за разно-образната биологична активност (тр. 32, 46, 50).
- ✓ За първи път е проследена цялостната кинетика на реакцията между кумариновите производни и DPPH радикала и са определени скоростните константи на серия 4-метилзаместени кумарини и техните стехиометрични коефициенти (показващи колко радикала загиват от една молекула инхибитор). Получените нови резултати дават възможност да се изясни механизма на действие на кумариновите производни и да се изведат реакционни схеми, описващи наблюдаваните ефекти (тр. 32).
- ✓ По-високата антирадикалова активност на 7,8-дихидрокси-4-метил-кумарините е обяснена със солватирания ефект на разтворителя. Ангажирането на двете фенолни групи във вътрешно-молекулни водородни връзки при 7,8-дихидрокси заместените кумарини ги прави по-стабилни спрямо ефекта на разтворителя в сравнение с 6,7-дихидрокси-4-метил-кумарините, при които едната фенолна група е свободна и нейната активност се понижава от образувания комплекс с разтворителя (тр. 32, 51).
- ✓ Показано е, че при определянето на антирадикаловата активност спрямо DPPH радикала, единствено кумарините със свободни фенолни групи имат положителен ефект. Наблюдаваният от други автори положителен ефект на 7,8-диацетокси-4-метил-кумарините производни е изяснено от нас, че се дължи на разтворителя метанол, в който е възможно протичането на частична хидролиза и не се наблюдава при разтворител ацетон. Препоръчва се работа в разтвор на ацетон и при интерпретацията на резултатите да се отчита ефекта на разтворителя (тр. 51).
- ✓ Установено е наличието на Лекарствено подобие за изследваните кумаринови производни като е приложено „Правило 5” на Липински, което определя дали дадена молекула е подобна на известно лекарство (тр. 51).
- ✓ Направена е пълна оптимизация на геометрията на неутралните молекули на кумариновите производни и съответните им моно- и бирадикали с помощта на теорията на плътностния функционал. Изчислени са стойностите на енталпите на хомолитична дисоциация на O-H връзката в газова фаза и ацетон, което дава възможност да се хвърли светлина върху ефекта на разтворителя (тр. 32, 46).
- ✓ Въз основа на намерената много добра корелация между теоретичната и експериментална антиоксидантна активност са предложени структурите на нови три кумаринови 4-метилзаместени производни, за които е изказана хипотезата, че ще проявят същата антиоксидантна активност като тези без заместители в пириновия пръстен. След синтеза им, нашата хипотеза бе потвърдена (тр. 32, 46). Това е един много важен резултат, защото показва, че притежаваме ключа за дизайн на нови кумаринови производни (и други фенолни съединения) на база получена добра корелация между подходящо подбрана комбинация от експериментални и теоретични подходи
Бис-кумарини (тр. 32, 50, 55, 47).
- ✓ За първи път е изследвана антирадикаловата и антиоксидантна активност на 5 новосинтезирани бис-кумарина, производни на 4-хидроксикумарина, с потенциална анти-СПИН активност, синтезирани от колеги от Фармацевтичния Факултет на МУ-София.

Установено е, че бискумаринът с катехолова структура в бензеновото ядро показва най-ниска стойност за BDE (70.74 kcal/mol), последван от бискумарина с две метоксигрупи в орто положение спрямо фенолната (BDE= 76.06 kcal/mol). Получена е много добра корелация между експериментално наблюдаваните и теоретично предсказаните антирадикалова и антиоксидантна активност. Доказано е, че структурният фрагмент, отговорен за антиоксидантната активност на бис-кумарините е бензеновото ядро и заместителите в него, а не 4-хидроксикумарина. Последният не показва не проявява антиоксидантна активност и не е в състояние да инхибира липидното окисление (тр. 32, 46).

2.2 Куркумин и негови синтетични аналози (тр. 37- 42, 44, 48, 72)

Куркуминът е един от най-силните природни антиоксиданти с широк спектър на биологична активност, който предпазва биомембраните от пероксидна деструкция предимно като уловител на свободни радикали. Едно от най-важните органичения на куркумина е неговата бионаличност, която се дължи на хидрофобната природа на молекулата. Неговото потенциално използване във фармацевтичната и хранителната промишленост силно зависи от стабилността му. Ето защо се търсят начини за преодоляване на този недостатък на куркумина чрез създаването на негови синтетични аналози, устойчиви във физиологичен разтвор.

С цел да се запазят структурните фрагменти, отговорни за антиоксидантния потенциал на куркумина и да се повиши стабилността му при физиологични условия, колеги от Италия предлагат интересен дизайн и синтезират негови аналози като C₂ симетрични хидроксилирани бифенилни съединения. Същността се състои в следното. Приема се, че куркуминът се състои от две еднакви части и ако условно се „разреже“ молекулата му ще се получат две еднакви молекули дехидроцингерон. Ако двете еквивалентни части на дехидроцингерона се „съшият“/свържат при фенолните ядра с C-C мост, се образуват C₂ симетрични бифенилни съединения (димери). Първоначално те синтезират димери на разпадните продукти на куркумина – дехидроцингерон, ферулова киселина и ванилин – за краткост наречени мономери. Но с цел да се изясни ролята на страничната верига в пара положение спрямо фенолната група, са синтезирани и мономери и димери на аналози на дехидроцингерона и цингерона с удължена странична верига, наподобяваща тази на куркумина, както и на познати метоксифеноли и природни продукти.

- ✓ Представени са за първи път експериментални и теоретични модели за оценка на антирадикаловата и антиоксидантна активност в безводна и водна среда на общо 39 синтетични аналога на куркумина, като от тях 18 са C₂ симетрични хидроксилирани бифенили (димери), 17 са съответните им мономери и 4 са новосинтезирани куркуминоиди. От мономерите само 8 са новосинтезирани, останалите 9 са познати природни био-антиоксиданти (ферулова киселина, евгенол, креозол, ванилин, апоцианин, тимол, карвакрол, резорцинол, цингерон). Направен е и сравнителен анализ на получените резултати с тези на стандартни антиоксиданти – куркумин, алфа-токоферол, тролокс (водоразтворим аналог на токоферола) и аскорбинова киселина (тр. 48, 37- 42, 44, 47,48).
- ✓ Представена е комплексна оценка на антирадикаловия и антиоксидантен потенциал на мономерите и димерите като са приложени 5 модела: 1) определяне на антирадикалова активност спрямо DPPH радикала - качествена и количествена оценка с отчитане ефекта на разтворителя и на реакционното време; 2) определяне на скоростната константа (k_A) на ключовата реакция на инхибираното окисление (реакцията между пероксидните радикали, водещи окислителната верига, и фенолния антиоксидант, чрез изучаване на хемилуминесценцията на моделен въглеродороден субстрат, (етилбензол) в безводна среда; 3) оценка на способността на антиоксиданта да улавя моделни пероксидни радикали, генерирани от азоинициатора във водна среда, с прилагане на ORAC (oxygen radical absorbance capacity) метод; 4) оценка на способността на антиоксиданта да прекъсва окислителната верига като чрез

проследяване кинетиката на липидното автоокисление; 5) теоретичен модел, използван за изясняване на зависимостта между структурата и антирадикаловата и/или антиоксидантната активност на фенолните съединения и на тази база предсказване способността на изследваните съединения да улавят свободните радикали чрез H атомен трансфер от O-H групата. Отчетен е и ефекта на рзтворителя (тр. 42).

- ✓ За първи път са получени резултати за антиоксидантните свойства на новосинтезирани бифенилни съединения - димери, както и за съответните им мономери, структурни аналози и/или разпадни продукти на куркумина. 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, 37°C) във вода - не се наблюдават съществени различия в активността на мономерите и димерите. Присъствието на α,β -ненаситената верига в *пара*-позиция спрямо фенолната група на изследваните съединения е от значение за резонансното стабилизиране на феноксилния/те радикал/и. Във водна среда мономерите и димерите са стабилни (за разлика от куркумина) и показват сходна активност спрямо пероксидните радикали в инициран режим на процеса (тр. 42).
- ✓ Изчислени са близки стойности на BDE за мономерите и димерите. Получените теоретични резултати са в съответствие с експериментално определените кинетични параметри (скоростни константи и фактор на стабилизиране) (тр. 37-42,48)
- ✓ По три независими метода (липидно автоокисление, хемилуминесцентен метод и квантово-химични изчисления) е доказано, че няма значение как са свързани двата еквиваленти структурни фрагмента в структурата на куркумина и на димера на дехидроцингерона за антиоксидантната им активност (тр. 42).
- ✓ За първи път са определени скоростните константи на ключовата реакция при инхибирано окисление с хемилуминесцентен метод и е доказано, че димерите са 2-2.5 пъти по-активни от мономерите спрямо пероксидните радикали (тр. 42).
- ✓ За първи път са определени скоростните константи и стехиометричните константи на реакциите между DPPH радикала и мономерите и димерите, синтетични аналози на куркумина, което дава възможност да се изясни механизма на тяхното антирадикалово действие и да се изведат нови реакционни схеми, описващи наблюдаваните ефекти (тр. 37,38,42, 48).
- ✓ За първи път е доказано, че куркуминът и димерът на дехидроцингерона имат еднакви стойности за BDE (тр. 42).
- ✓ За първи път е доказано, че бифенилният фрагмент има по-съществена роля за антиоксидантната активност в сравнение със страничната верига (тр. 37, 38,42).
- ✓ За първи път е доказано, че удължаването на страничната верига не води до повишаване на антиоксидантния капацитет (тр. 47)
- ✓ Получените резултати показват, че замяната на -COOH (при феруловата киселина и нейният димер) с -COCH₃ (при дехидроцингерона и неговия димер) води до увеличаване на антиоксидантния потенциал на двойката мономер/димер (тр. 42).
- ✓ Двойките дехидроцингерон/димер на дехидроцингерона и дехидроцингерон /куркумин показват най-висока разлика в антиоксидантната ефективност (5кратно) при липидното окисление в сравнение с тези, получени за останалите двойки мономери/димери (тр. 42).
- ✓ Наблюдаваните малки разлики в относителните кинетични параметри за двойката мономер/димер на цингерона, могат да се свържат с отсъствието на алфа-бета-ненаситена странична верига в пара позиция на бензеновите пръстени и липсата на резонансно стабилизиране на образуваните феноксилни радикали (тр. 42).
- ✓ Всички двойки мономер/димер с алфа-бета-ненаситена кето верига се характеризират с по-ниски BDE в сравнение с останалите. Карбоксилната група при феруловата киселина и нейния димер води до повишаване на стойностите за BDE с около 0.56 kcal/mol в сравнение с мономера и димера на дехидроцингерона (тр. 42).

- ✓ И тук наличието на катехолова структура има ключова роля за многократно по-високата антиоксидантна активност в сравнение с метоксифенолите.
- ✓ Данните от квантовохимичните изчисления показват, че в газова фаза няма особена разлика в стойностите на BDE на момомерите и димерите. Това потвърждава факта, че двете фенолни групи в молекулите на димерите действат самостоятелно и независимо една от друга. При сравняването на отделните двойки мономер/димери се вижда, че димерите като цяло показват по-ниски стойности от тези на мономерите, което е в съгласие с получените експериментални данни от изследванията в неполярна среда (**тр. 37,38,42**).

Направен е сравнителен кинетичен анализ на двойките мономер/димер на тимол, карвакрол, евгенол и креозол (като димерите са синтезирани от партньорите ни от Италия).

Изяснено е, за тимол/димер на тимола, карвакрол/димер на карвакрола, за евгенол/димер на евгенола, че няма разлика в ефективността им като антиоксиданти; единствено за двойката креозол/димер на креозола е установено, че димерът е 3-кратно по-ефективен. Получен е нов ред за антиоксидантна ефективност за изследваните двойки-мономер/димер. Установено е, че димерът на креозола проявява най-висока антиоксидантна ефективност като обезпечава 7-кратно по-висока окислителна стабилност на липидния субстрат в сравнение с контролната проба и 3-кратно по-висока ефективност от мономера. Предложена е реакционна схема, която включва възможното регенериране на креозола и неговия димер по реакция на хомо-диспропорциониране на феноксилните им радикали в хода на липидното автоокисление, което повишава тяхната активност. Отчетен е ефекта на разтворителя (DMSO), добавен към евгенол, креозоли димера на креозола върху тяхния антиоксидантен потенциал. Наблюдавано е понижение на антиоксидантния потенциал в присъствие на DMSO. Разработката е по линия на съвместен проект с Италия по линия на ЕБР между БАН и CNR.

Изследвана е кинетика на реакцията на куркумин и негови синтетични аналози с DPPH• радикала (**тр. 41**).

- ✓ За да се изследва влиянието на кето-енолната част върху механизма на реакцията на куркумина с DPPH• радикала, колеги от Италия под ръководството на проф. М.Фоти синтезират две производни с една и две метилни групи в централната позиция 4 (4-метилкуркумин и 4,4-диметилкуркумин - съединения 3 и 4). 4,4-Диметил-куркуминът е бета-дикетон. За 4-метилкуркумина е установено с ЯМР спектроскопия, че кето-енолния му тавтомер е в равновесие с бета-дикетоформата в разтвор на деутериран хлороформ при стайна температура. Едно от обясненията защо бета-дикетоформата присъства в такова голямо количество може да бъде хиперконюгацията или стеричното запрещване между CH_3 групата и двата Н атома от съседните двойни връзки, което може да организира ротацията на CH_3 групата в кето-енолния тавтомер (**тр. 41**).
- ✓ Разпадането на DPPH• радикала в абсолютен етанол при стайна температура и в присъствието на куркумин (1), 4-метилкуркумин (3), 4,4-диметилкуркумин (4) или куркумин 4'-метилол етер (5) следва биекспоненциална кинетика. Тази необичайна кинетика на реакцията е съвместима с двуетапен процес, в който се натрупва интермедиат (междинно съединение) в обратимия първи етап, последван от необратим процес. Както и в други подобни случаи е предположено, че междинното съединение е π -комплекс, образуван между един куркумин анион (в случая на 1, 3 и 5-енолатен анион) и пикриловата част на DPPH•, в който се осъществява вътрешно-комплексен електронен трансфер от (енолатния) анион. Чрез сравняване на кинетиката на куркумин 4',4"-диметилетер (2) (без фенолна ОН група), (5) (една фенолна ОН група) и (1) (две фенолни ОН групи), заключихме, че процесът на трансфер на електрони трябва да бъде придружен от протонен трансфер от фенолните ОН групи до обемния разтворител (отделен/изолиран свързан

протон-електронен трансфер). Скоростните константи за реакцията на 2, 5 и 1 с DPPH• са в зависимост от броя на фенолните ОН групи (тр. 41).

- ✓ Установено е, че енолната форма на 4-метилкуркумин е приблизително 24 пъти по-активна от 4,4-диметилкуркумин и 3 пъти по-активна от куркумина. По-високата реактивоспособност на 4-метилкуркумин в сравнение с куркумина може да се дължи на факта, че метилната група има по-нисък йонизационен потенциал и следователно свободна енергия на елакторния трансфер. Освен това метилната група може да има стабилизиращ ефект върху енолния радикал (тр.41).

2.3. Хидроксид-халкони (тр. 52, 47, 66, 67, 68, 69, 70)

Хидроксид халконите са биологични прекурсори на флавоноидите.

- ✓ Подбрани са 6 новосинтезирани хидроксид халкона от колеги от лаборатория „Химия на природните вещества“ – ИОХЦФ-БАН със заместители в пръстен Б: 3,4-дихидроксид-халкон, 2-хидроксид-3-метокси-халкон, 3-хидроксид-4-метокси-халкон, 2-хидроксид-халкон, 3-хидроксид-халкон и 4-хидроксид-халкон.. Активността им е сравнена с тези на кафеена, ферулова и р-кумарова киселини, които има сходни структурни фрагменти в молекулите си с тези на хидроксид-халконите (тр. 51).
- ✓ Най-ниски стойности за енталпите на дисоциация на О-Н връзките (BDE), 81.4 и 81.5 kcal/mol, са изчислени за 3,4-дихидроксидхалкона и кафеената киселина (с катехолова структура). Останалите съединения показват по-здрава О-Н връзка – от 84 до 88 kcal/mol (тр. 51, 47, 66).
- ✓ За първи път е доказано, че 3,4-дихидроксид халконът е по-силен антиоксидант от кафеената киселина. Орто-метокси заместените халкони проявяват умерена активност спрямо пероксидните радикали, подобно на феруловата киселина. Монохидроксидзаместените халкони показват слаба активност, подобно на р-кумаровата киселина.
- ✓ Установена е за първи път неklasическа кинетика на халконите в реакция с моделни пероксидни радикали при инициирано окисление с помощта на високочувствителен хемилуминесцентен метод. Този метод е единствен, който позволява с един експеримент да бъдат определени двата основни кинетични параметъра на инхибираното окисление- абсолютна скоростна константа на реакцията между инхибитора и пероксидните радикали и стехиометричния коефициент, показващ колко радикала загиват от една молекула антиоксидант. За 3,4-дихидроксидхалкона и кафеената киселина са установени високи стойности за скоростните константи и в същото време ниски стойности за стехиометричните им коефициенти. Изказана е хипотезата за възможността феноксилните /ароксилни радикали да присъединяват кислород с последваща циклизация и образуване на диоксиетани. С помощта на кинетични и теоретични модели тази хипотеза е потвърдена и е доказано, че сложният механизъм на действие на хидроксид халконите се дължи на това, че едновременно с антиоксидантно действие, те проявяват и прооксидантно, дължащо се на образуването на диоксиетани (тр. 51, 66).
- ✓ Квантово-химичните изчисления показват, че е възможно при други структури на фенолни антиоксиданти (обикновено с по-прости структури на монофеноли) да не протича тази реакция на присъединяване на молекула кислород към OAr• с образуване на диоксиетан-радикал. Съответно, техният механизъм на действие се описва с "klасическата" схема на окисление, при която от една молекула ArOH загиват два пероксидни радикала (един от ArOH, а другия - от OAr•). Разработката е извършена съвместно с съвместно с Институт по биохимична физика "Н.М.Эмануэль" – РАН и работата е класирана на Първо място и с награда като най-добро научно постижение за 2010 г.там.

2.4. Бензо[k]ксантенови лигнани и дихидробензофуранови неолигнани (тр. 49, 47)

За пръв път е изследван потенциала на новосинтезирани по биомиметичен подход бензоксантенови лигнани и дихидробензофуранови неолигнани да улавят свободни радикали (т.е. да проявяват антирадикалова активност) и да инхибират верижно-радикаловия автоокислителен процес на липиди (т.е. да проявяват антиоксидантна активност).

- ✓ Направена е качествена и количествена оценка на антирадикаловата им активност. Получените резултати доказват необходимостта от цялостно проследяване на кинетиката на процеса.

Изчислените стехиометрични коефициенти дават възможност да се оцени делът на участие на междинните продукти в хода на процеса. Комбинирането на получените резултати за скоростната константа и стехиометричния коефициент дават възможност да се изясни механизма на тяхното действие.

- ✓ Получена е отлична корелация между експерименталните и теоретични резултати за лигнаните с най-висока и най-ниска антирадикалова и антиоксидантна активност.
- ✓ Един от двата бензоксантенови лигнана с катехолова структура показва най-висока антиоксидантна ефективност в сравнение с всички изследвани до сега фенолни антиоксиданти в същия кинетичен модел в лаборатория „Химия на Липидите” (тр. 47).

Това е много важен резултат, защото показва потенциала на бензоксантеновия лигнан като ефективен био-антиоксидант - активен срещу сърдечно-съдови заболявания и с максимално висок антиоксидантен потенциал.

2.5. Флавоноиди–агликони, глюкозиди, рутинозиди, пара-кумароилглюкозиди, изолирани от лечебните растения *Carthamus lanatus L.* и *Tribulus terrestris* (тр. 47, 56, 58, 59, 69).

- ✓ Изследвана е зависимостта на 16 флавоноида – 5 агликона, 6 глюкозида, 3 рутинозида и 2 кумароил-глюкозида, изолирани от *Tribulus terrestris* и *Carthamus Lanatus L.*, от България. Експерименталните данни са представени като %АРА (антирадикалова активност), определена чрез бърз DPPH тест, а теоретичните стойности за %АРА_{теор} са определени на база изведената емпирична зависимост от Амич и сътр. Статистическият анализ на теоретично предсказаната с експериментално определената антирадикалова активност може да се използва за сравнение на нашите данни с тези, намерени от други автори.
- ✓ Въз основа на изчислените теоретични стойности на (%АРА_{теор}) за флавоноидните агликони (кампферол, изорамнетин и кверцетин) се вижда, че те имат една и съща теоретична антирадикалова активност и то доста висока 88.40%. За флавоноидните съединения, при които липсва катехолова структура в пръстен В (или отсъствие на 3-ОН) теоретичната стойност за тяхната антирадикалова активност е 12.40%. Получен е двумерен статистически модел, като се оформят се две зони - едната за съединения с висока антирадикалова активност и втората за съединения с ниска антирадикалова активност. В първата зона попадат кверцетина и неговите производни. Прави впечатление, че заместването на 3-ОН с глюкозиден остатък не води до понижение на антирадикаловата активност на кверцетина.
- ✓ Най-високата антирадикалова активност на кверцетина и неговите производни може да се обясни с възможното образуване на орто- и пара-хиноидни флавоноиди като резултат от диспропорционирането на семихиноновия радикал, образуван в пръстен В и регенериране на изходната молекула. Доказано е, че в случай на наличие на катехолова структура в пръстен В, останалата част от молекулата не оказва влияние върху способността да се улавят свободни радикали.
- ✓ Ниската антирадикалова активност на кампферола и изорамнетина, съдържащи захарен остатък (глюкоза, рутиноза и /или р-кумароил-глюкоза), е обяснена със заместването и на двете позиции 3 и 3'-ОН. При този случай съединенията не могат да се окислят нито до о-, нито до р-хинони.
Получените нови резултати са от изключително значение и за практиката за подбор на подходящи съединения за ефективно и оптимално стабилизиране на различни липидни продукти.

2.6. Фенолни киселини (производни на бензоената и канелената киселини) и киселинни амиди (тр. 34, 47, 56, 60, 61, 67 - 69, 70, 72)

Производни на бензоената киселина – р-хидроксibenзоена, сирингова, ваниолова, 3,4-дихидроксibenзоена и галова киселини (тр. 68, 69, 70).

- ✓ Потвърдено е и тук, че наличието на катехолова структура има ключова роля за високата антиоксидантната активност. 3,4-Дихидрокси-бензоената и галовата киселини поазват най-висок антиоксидантен капацитет, последвани от сиригова (3,5-диметокси), ванилова (3-метокси) киселини. Пара бензоената киселина не е в състояние да инхибира липидното автоокисление.
- Канелени киселини - срещат се в различни растителни материали и се считат за биологични прекурсори на халконите и кумарините.
- ✓ Антиоксидантният потенциал на подобрите р-кумарова, ферулова, синапова и кафеена киселини е установено, че намалява в реда кафеена > синапова > ферулова > р-кумарова киселини. Потвърдено е и тук, че структурният фрагмент, отговорен за високата антиоксидантна активност, е наличието на катехолова структура в молекулата на кафеената киселина (**тр. 47, 56, 67, 68, 69, 70**).
- ✓ Сравнителният анализ на феруловата киселина и нейни производни: изоферулова киселина, метилферулат, етилферулат и конифериллов алдехид показва, че те проявяват активност, подобна на тази на феруловата киселина, единствено изоферуловата киселина – значително по-ниска. Получените резултати показват, че решаващ структурен фрагмент за антиоксидантната им активност е орто-метокси фенолната (гваяколовата) част, а не заместителите в страничната верига. Изо-феруловата киселина показва по-слаба активност поради отсъствие от резонансно стабилизиране на феноксилния радикал, включващо и страничната верига (**тр. 34**).
Заместени амиди на канелените киселини са изолирани от растителни източници в различни форми. Тяхното натрупване в растителния материал се приема като предпазна функция срещу оксидативен стрес, предизвикан в растения, които са в неекологична среда.
- ✓ Девет киселинни амиди, 6 производни на феруловата киселина и 3 на синаповата са изследвани в процес на липидно автоокисление. Доказано е за първи път, че новосинтезираните киселинни амиди на феруловата и на синаповата киселини проявяват антиоксидантна активност, подобна на тази на феруловата и синаповата киселина, съответно.. Производните на синаповата киселина проявяват по-силна активност от тази на феруловата. Следователно, и тук структурният фрагмент, отговорен за антиоксидантния потенциал е бензеновото ядро и заместителите в него, докато страничната верига не оказва съществено влияние. (**тр. 60, 61**).

Прогнозира се структурата на нови синтетични аналози на природни био-антиоксиданти на база получените резултати от зависимостта структура-активност чрез прилагане на различни комбинации от кинетични, спектрални, хроматографски и теоретични подходи

Зависимостта структура - антиоксидантна активност за широк кръг антиоксиданти е установена чрез прилагане на различни квантово-химични и статистически методи. Поставено е началото на създаването на база данни за зависимостта структура - антиоксидантна и/или антирадикалова активност за общо 200 фенолни антиоксиданта с различен брой фенолни групи (моно-би и полифеноли), както и с различен хидрофилно-липофелан баланс. Приложен е нов статистически модел, разработен от проф. Естрада от Университета в Сантяго де Компостела, Испания - т.нар. TOPS - MODE анализ към голям брой фенолни антиоксиданта в зависимост от тяхната степен на инхибиране. Полученият тримерен теоретичен модел показва 100% съвпадение с експерименталните резултати. На тази основа е намерен структурният елемент в молекулата на антиоксидантите, отговорен за тяхната висока активност и са предложени структурите на 16 нови съединения с потенциална висока антиоксидантна активност (**тр. 56, 69, 80**).

Подобно на структурата на кумарина, която бе модифицирана по подходящ начин от групата на проф. Пармар от Индия, е възможно да се получи нова серия от био-антиоксиданти, како се вземе като основна структура тази на кафеената киселина, на която О-Н групата от карбоксилната група се замести с подходящ заместител.

3. Създаване на нови антиоксидантни композиции на база двойни и тройни смеси

Антиоксидантната терапия е съвременен метод, който е ефективен за предотвратяване на аномалното производство на агресивни кислородсъдържащи частички (ROS-reactive oxygen species) и ограничаване на тяхното вредно въздействие върху организма. В тази връзка лечението на редица заболявания се базира на „традиционни“ лекарства с целева функционалност и различни антиоксиданти.

Проф. Бурлакова от Руската академия на науките публикува изследвания, които установяват, че независимо от вида на заболяването във всички случаи се наблюдават повишени нива на липидна пероксидация. Ето защо за успешна терапия на много заболявания се търсят ефективни био-антиоксиданти. Наблюдавано е, че на ранен стадий на заболяването е ефективна т.нар. „монотерапия“ само с антиоксиданти във висока концентрация, докато в напреднал етап – по-ефективна се оказва „комбинираната терапия“ на терапевтичното средство с антиоксидант в ниска концентрация. Проф. Гаджева и сътр. докладват неотдавна, че противотуморни препарати и някои, използвани при невродегенеративни заболявания, индуцират допълнителен оксидативен стрес в болния организъм, което затруднява ефективното лечение, докато в смес с природни и синтетични антиоксиданти, комбинираната терапия показва много по-добър ефект.

3.1. Нови антиоксидантни композиции на база еквимоларни двойни смеси

С цел да се направи научно обоснован подбор на нови антиоксидантни композиции, които да са ефективни и да могат да се прилагат като хранителни добавки (за превенция) и в комбинирани терапии (за лечение) на труднолечими заболявания, са проведени настоящите изследвания. Стратегията на настоящите изследвания е следната. Когато не е възможно да се получат нови биоантиоксиданти по синтетичен път да се създадат т.нар. антиоксидантни композиции, които представляват механични смеси на подходящо подбрани съединения с биологична и антиоксидантна активност. Антиоксидантният капацитет на сместа може да се повиши като се добави синергист, който да регенерира фенолния антиоксидант.

Така получените антиоксидантни композиции са тествани за наличие на синергизъм между компонентите (по-силен ефект), на сумарен ефект (адитивизъм) и по-слаб ефект (антагонизъм). В повечето случаи алфа-токоферолът е по-силният антиоксидант и синергизмът се дължи на регенерирането му в хода на окислителния процес.

Създадени са общо 57 нови антиоксидантни композиции на база двойни смеси в отсъствие (17) и в присъствие на алфа-токоферол (40).

А. Двойни смеси без алфа-токоферол

- ✓ Установено е за първи път, че еквимоларни двойни смеси на флавоноиди: два агликона (кверцетин+лутеолин), агликон и гликозид/рутинозид (кверцетин+рутин) и два 7-О-глюкозида на кверцетин и лутеолин, изолирани от лечебното растение *Carthamus lanatus L.* не проявяват синергизъм между компонентите, като ефектът не се променя с повишение на концентрацията. Наблюдавано е, че двойните смеси от кверцетин+лутеолин и при двете изследвани концентрации проявяват по-висока антиоксидантна активност от тази на лутеолина, но по-ниска от тази на кверцетина. Двойните смеси кверцетин+рутин проявяват почти 6-кратно по-висока антиоксидантна ефективност от тази на рутина, но приблизително 2.2 пъти по-ниска от тази на кверцетина, добавен самостоятелно. Не се наблюдава синергизъм между кверцетина и рутина в двойните смеси при окисление в хомогенна липидна среда (тр. 58).

- ✓ Доказано е за първи път, че куркуминът проявява многократно по-висока антиоксидантна активност от двойните смеси на разпадните му продукти: ферулова киселина+ванилин, ферулова киселина+дехидроцингерон и от тройната смес ферулова киселина+дехидро-цингерон+ванилин. Не е установен синергизъм между индивидуалните компоненти. Тези резултати доказват необходимостта от търсене на алтернативи за получаване на нови синтетични аналози на куркумина. Както бе вече показано по-горе, новосинтезираните С2 симетрични хидроксилирани бифенилни съединения са удачно решение (**тр. 39**).
- ✓ Установено е, че сместа на С2 симетрични хидроксилирани бифенилни съединения без и със антиоксидантен потенциал (т.е. без и със свободни фенолни ОН групи) проявява същата инхибираща способност както индивидуалните съединения с антиоксидантен потенциал. Заместените С2 хидроксилирани бифенили проявяват силна биологична активност, но не оказват влияние върху инхибиращата способност на техните аналози със свободни ОН групи. Смесите се препоръчват единствено, за да се комбинират двете активности- биологична и антиокси-антна (**тр. 72**).
- ✓ Установено е за първи път, че еквимоларни двойни смеси на противотуморния препарат 5-флуороурацил с тимол, димер на тимола, карвакрол, димер на карвакрола, куркумин, и евгенол не проявяват синергизъм, но антиоксидантните композиции запазват инхибиращата си способност, като за куркумина тя е максимално висока. Получените резултати могат да се използват за изясняване механизма на действие на смеси от два природни продукта при нови фитохимични терапии. Разработката е изпълнена по линия на съвместен проект с Италия по линия на ЕБР между БАН и CNR.

Б. Двойни смеси с алфа-токоферол

- ✓ Направен е сравнителен анализ на 20 антиоксидантни композиции от двойни еквимоларни смеси, съдържащи алфа-токоферол и моно-, би- или полифеноли. Различни кинетични параметри и теоретични дескриптори са използвани, за да се обяснят наблюдаваните ефекти и механизмите на действие на тези композиции. Доказано е, че синергизмът между компонентите се дължи на регенерирането на алфа-токоферола, който е по-силният антиоксидант в смесите. Различните ефекти на антиоксидантните композиции са сравнени и дискутирани като са предложени нови реакционни схеми, описващи наблюдаваните ефекти (**тр. 64**).
- ✓ Изяснени са основните фактори, отговорни за наличието на синергизъм между индивидуалните компоненти (**тр. 31, 64, 72**). Един от важните теоретични дескриптора е енталпията на хомолитична дисоциация на О-Н връзката (BDE). Когато BDE на двата индивидуални антиоксиданта е близка и няма изявен лидер между тях, те действат самостоятелно и независимо един от друг и се наблюдава сумарен ефект. Когато са смесени два антиоксиданта, за които има разлика в BDE ($\Delta BDE = BDE_{\text{АОН}} - BDE_{\text{ТОН}}$) са възможни два случая $\Delta BDE > 0$ (наблюдава се синергизъм) и $\Delta BDE < 0$ (наблюдава се антагонизъм). Резонансното стабилизиране на феноксилните радикали и делът на страничните реакции, в които участват, също оказва значимо влияние върху наблюдаваните ефекти. Оценена е възможността единият или двата компонента да се регенерират по реакция на хомо- или кръстосано диспропорциониране. Фенолните антиоксиданти с катехолова структура са в конкуренция с токоферола, защото е възможно и те да се саморегенерират по реакция на хомо-диспропорциониране на семихиноновите им радикали в хода на окислителния процес. Регенерирането на двата антиоксиданта може да протече по реакция на Н атомен трансфер между феноксилния радикал на единия антиоксидант и молекулата на втория като тази реакция е обратима. При наличие на равновесие се наблюдава адитивизъм между компонентите. Ако равновесието е изтеглено в посока на регенериране на по-силния антиоксидант се наблюдава синергизъм (това е условието за наличие на синергизъм – регенерирането на по-силния антиоксидант). В случаите, когато равновесието е изтеглено в посока на регенериране на по-слабия антиоксидант, се наблюдава антагонизъм. Вторият механизъм за регенериране на антиоксидантите е по реакция между двата феноксилни радикала,

която може да протече като кръстосано рекомбиниране до получаване на неактивни продукти (като резултатът е антагонизъм) или като кръстосано диспропорциониране с регенериране на по-силния антиоксидант (като резултатът е синергизъм), на с регенериране на по-слабия (като резултатът е антагонизъм).

Тази хипоотеза е потвърдена с доказване на регенерирането на токоферола в хода на окислителния процес в случай на синергизъм и отсъствие на регенерирането му в случаите на антагонизъм като се проследява концентрацията на токоферола с времето с HPLC съвместно с колеги от Полската академия на науките, където бяха проведени изследванията (тр. 44).

- ✓ Предложен е комплексен механизъм за регенериране на токоферола по време на липидното автоокисление като индивидуален антиоксидант и в двойни смеси, както и на страничните реакции, в които участват феноксилните радикали, водещи до понижаване на активността на токоферола (тр. 44, 72).
- ✓ Установено е, че еквимоларните двойни смеси на кверцетина и рутина с алфа-токоферол при ниската концентрация 0.1 mM водят до ясно изразен синергизъм между тях (46% за кверцетина и 89% за рутина). На база получените резултати не се препоръчва механичното смесване на два флавоноида, а да се използват в смеси с алфа-токоферол, за постигане на по-силен инхибиращ ефект (тр. 58, 69).
- ✓ Получени са нови резултати за инхибиращият ефект на нови антиоксидантни композиции на канелени киселини (кафеена, синапова, ферулова) и стандартни антиоксиданти с алфа-токоферол върху окислителната стабилност на липидните субстрати (линолеатен и олеатен тип). Доказано е, че двойни смеси от фенолни антиоксиданти, съдържащи токоферол, в повечето случаи показват синергизъм (по-силно действие). Получените резултати са от изключителна важност за практиката за подбор на съединения, които добавени като двойни смеси до доведат до многократно по-висока окислителна стабилност на липидните проби (тр. 64, 69, 72).
- ✓ Създадени са еквимоларни двойни смеси на алфа-токоферол с 6 хидрокси производни на 4-метилкумарина (бензо-алфа-пинонови) и 4 сродни съединения (бензо-гама-пинонови) и е изследвана способността им да инхибират липидното автоокисление. Доказана е 2- до 8-кратно по-висока антиоксидантната активност на двойните смеси на кумарините и 9-кратно по-висока за сродните съединения в сравнение с тази на индивидуалните съединения (тр. 31). Очевидно е, че добавянето на токоферол във всички случаи обезпечава по-висока окислителна стабилност на липидния субстрат. Два от кумарините показват по-силен ефект (синергизъм), а други два сумарен ефект (адитивизъм). Тези двойни смеси са използвани за създаване на еквимоларни тройни смеси с добавяне на аскорбинова киселина. Представени са реакционни схеми, описващи наблюдаваните ефекти (тр. 31).
- ✓ За първи път са изследвани еквимоларни двойни смеси с токоферола на двата бис-кумарина, показали най-висока антиоксидантна активност, за наличие на възможен синергизъм. Наблюдавана е по-висока окислителна стабилност на липидния субстрат в присъствие и на двете двойни смеси в сравнение с тези за индивидуалните компоненти, но не е установено наличието на синергизъм между компонентите. Сравнителният кинетичен анализ показва, че окислителната стабилност на липидния субстрат е значително по-висока в присъствие на двойните смеси от кафеена киселина и токоферол, в сравнение с тази за 4-хидрокси-бис-кумарина с катехолова структура. Двойната смес на синаповата киселина с токоферола също показва по-висока окислителна стабилност на липидния субстрат от тази на съответния 4-хидрокси-бис-кумарин с токоферола (тр. 50). На база получените резултати не се препоръчва прилагането на бискумарините в смеси с токоферола.
- ✓ Доказано е за първи път, че бензоксантеиновите лигнани са с по-висока антиоксидантна активност от неוליганите, и че еквимоларните двойни смеси на неוליганите с DL- α -токоферол показват синергизъм, докато тези на бензоксантеиновите лигнани – антагонизъм (тр. 50). За постигане на висок инхибиращ ефект се препоръчва прилагането на неוליганите в смеси с токоферола,

докато бензоксантеновите лигнани е по-добре да се използват самостоятелно, а не в смеси с токоферола.

- ✓ Създадени са нови антиоксидантни композиции от два и три компонента на хидроксилирани бифенилни съединения и съответните мономери с алфа-токоферол и аскорбинова киселина/палмитат, които повишават значително окислителната стабилност на липидния субстрат и могат да се приложат като хранителни добавки (тр. 44, 64, 72). Предложени са нови комбинирани механизми на действие на еквимоларни двойни и тройни смеси с алфа-токоферол и аскорбилпалмитат, обясняващи наблюдаваните ефекти на синергизъм, адитивизъм и антагонизъм (тр. 31, 44).
- ✓ За първи път е доказано с високоефективна течна хроматография, че синергистичният ефект между дехидроцингерона и токоферола, както и в тройната смес в присъствие на аскорбинова киселина, се дължи на регенерирането на токоферола, като най-силен антиоксидант в сместа. (тр. 44).

3.2. Нови антиоксидант ни композиции на база еквимоларни тройни смеси

- ✓ Предложен е комбиниран механизъм на действие в тройната смес за дехидроцингерона и неговия димер с токоферол и аскорбилпалмитат. За първи път е доказано, че еквимоларната двойна смес на дехидроцингерона, както с токоферола, така и с аскорбилпалмитата, проявява значим синергизъм. Като се отчете и синергизма между токоферола и аскорбиновата киселина, се изяснява защо общият краен ефект на тройната смес е синергизъм. Получените нови резултати показват, че е по-изгодно дехидроцингеронът да се използва в смеси, отколкото като индивидуален антиоксидант, което е много важно за практиката.
- ✓ Димерът на дехидроцингерона обаче не показва синергизъм, а само сумарен ефект (адитивизъм) и при двете изследвани концентрации. За да се обясни наблюдавания ефект трябва да се анализират ефектите на двойните смеси. Димерът на дехидроцингерона с токоферола проявява адитивизъм, а с аскорбиновата киселина – антагонизъм. Комплексният механизъм на тройната смес може да се обясни като компенсация на синергизма между токоферола и аскорбиновата киселина и на антагонизма на последната с димера, към които се добавя адитивизма на димера с токоферола. Не се препоръчва прилагането на димера на дехидроцингерона в смеси.
- ✓ Цингерона и неговия димер показват слаб синергизъм при 10-кратно по-висока концентрация на компонентите, докато при ниската сместа не показва по-висока ефективност. От димерите единствено димерът на феруловата киселина показва синергизъм с алфа-токоферола (тр. 44).
- ✓ Четири нови еквимоларни тройни смеси, съдържащи хидрокси-кумарини са създадени като са използвани двойните смеси, показали синергизъм и адитивизъм, и към тях е добавена аскорбинова киселина. Всички тройни смеси проявяват силен синергизъм като резултат от възможното регенериране на токоферола (като най-силен антиоксидант) от другите два компонента – кумарина (АОН) и аскорбиновата киселина. Представени са нови реакционни схеми за обяснение на възможните реакции, които протичат и дават информация за механизма (тр. 31).
- ✓ В литературата има единствено публикувана зависимост за изчисляване на синергизъм на двойна смес (от Франкел). По аналогия с нея, ние предложихме нови зависимости, с които да се изчисляват количествено синергизма за тройни смеси и антагонизма за двойни и тройни смеси (тр. 31). Теоретичните изчисления са използвани като индикатори на очакваните ефекти между индивидуалните компоненти в двойната смес. Изведените нови зависимости дават възможност да се оцени ролята на всеки компонент в многокомпонентна система и да се изяви този компонент, който има ключова роля за наблюдавания ефект (тр. 31).
Възможни са следните случаи: 1) Когато всички компоненти в тройната смес действат самостоятелно и независимо един от друг, се изяснява ролята на най-силният антиоксидант (токоферола) и 2) Когато е налице синергизъм между два от компонентите, може да се оцени

ролята на третия. При синергизъм между АОН и ТОН, може да се оцени ролята на аскорбиновата киселина, а при синергизъм между ТОН и аскорбиновата киселина- тази на АОН.

- ✓ Получените резултати демонстрират, че всички тройни смеси проявяват не само по-висока окислителна стабилност на липидния субстрат от тази в присъствие на индивидуалните компоненти, но също така и синергизъм, което е много по-важен резултат. Дори в случаи на адитивизъм между компонентите на двойната смес АОН+ТОН, добавянето на аскорбиновата киселина води до значимо нарастване на инхибиращата способност на сместа. Това се дължи на възможността ТОН да се регенерира и от двата компонента- АОН и аскорбинова киселина (тр. 31).
- ✓ Установено е, че тройните смеси показват по-слаб синергизъм, когато индивидуалните компоненти участват независимо един от друг. В този случай се изяснява ролята на токоферола като най-силен антиоксидант. Ролята на кумарините (другият антиоксидант, АОН) е много по-малка при наличие на синергизъм между токоферола и аскорбиновата киселина. Това означава, че синергизмът между ТОН и аскорбиновата киселина е достатъчно силен и добавянето на АОН не може да го промени. Ролята на аскорбиновата киселина е по-голяма от тази на АОН за синергизма, който се наблюдава. Последното се дължи на участието на аскорбиновата киселина в процесите на регенериране както на ТОН, така и на АОН (тр. 31).

Въз основа на получените резултати за антиоксидантните композиции е направен научно обоснован подбор на нови антиоксидантни композиции от 2 и 3 компонента за ефективно стабилизиране на липиди.

Бъдещи перспективи

Разработване и внедряване на съвременни методи за оценка на окислителната стабилност като мярка за качеството на липидите и съдържащите ги продукти.

Търсене на нови природни източници и възможности за участие в разработки, свързани с оползотворяване на отпадни продукти – липидни фракции и растителни екстракти с антиоксидантен потенциал.

Да продължи и се задълбочи работата по изучаване ефекта на гама облъчването върху окислителната стабилност на липиди и антиоксидантния потенциал на природни антиоксиданти за намиране на ефективни био-протектори срещу гама-облъчване.

Да продължи и се разшири прилагането на дифузионна ЯМР спектроскопия и Ефект на Оверхаузер за доказване структурата на образуваните мицели и търсене на възможности за продължаване на сътрудничеството с Руската академия на науките.

Да се задълбочи и разшири работата по дизайн на нови синтетични аналози на природни био-антиоксиданти на база резултатите от зависимостта структура-активност.