

БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ
ИНСТИТУТ ПО НЕВРОБИОЛОГИЯ

ЦВЕТА ДИМИТРОВА СТОЯНОВА

БИОЛОГИЧНА АКТИВНОСТ НА ПРОИЗВОДНИ НА
ДИТИОКАРБОНОВАТА КИСЕЛИНА

/КСАНТОГЕНАТИ/

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

на дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен
„ДОКТОР”

Научна специалност „Фармакология (вкл. Фармакокинетика и химиотерапия)”
(шифър 03.01.24)

НИЗ: „Биологични ефекти на природни и синтетични вещества”

Научен ръководител: доц. Албена Александрова

Научен консултант: д-р Станислав Янев

Официални рецензенти:

Доц. д-р Милка Милева, Институт по микробиология, БАН

Доц. д-р Любомир Петров, Институт по невробиология, БАН

София

2019

Дисертационният труд е написан на 139 страници и е онагледен с 45 фигури и 13 таблици. В библиографския списък са включени 233 литературни източника.

Дисертационният труд е одобрен и насочен за защита на научен семинар на направление „Биологични ефекти на природни и синтетични вещества” към Институт по невробиология- БАН, проведен на 17.09.2019 година.

Дисертационният труд е насочен за защита пред научно жури в състав:

Проф. д-р Яна Чекаларова, дм, Институт по невробиология, БАН

Проф. д-р Румяна Цонева, Институт по биофизика и биомедицинско инженерство, БАН

Доц. д-р Милка Милева, Институт по микробиология, БАН

Доц. д-р Любомир Петров, Институт по невробиология, БАН

Доц. д-р Иванка Цаковска, Институт по биофизика и биомедицинско инженерство

Резервни членове:

Проф. д-р Росица Замфирова-Митова, Институт по невробиология, БАН

Доц. д-р Симеон Тодоров, Институт по невробиология, БАН

Защитата на дисертационния труд ще се състои на 14.11.2019 год. От 11 часа в заседателната зала на Институт по невробиология1 БАН, ул. „Акад. Георги Бончев, бл. 23, ет. 2.

Материалите по защитата са на разположение в канцеларията на *Институт по невробиология, БАН*, ул. „Акад. Георги Бончев, бл. 23, ет. 2.

БЛАГОДАРНОСТИ

Сърдечно благодаря на научния ми ръководител доц. д-р Албена Александрова за безценните съвети и напътствия! Бих искала да изкажа огромната си благодарност към научния ми консултант др. Станислав Янев за безкрайната подкрепа, за търпението и съветите по време на експерименталната работа и обработката на резултатите!

Благодаря, че ме въведохте в света на науката и ми помогнахте да усвоя ценни методики!

Изказвам искрена благодарност и признателност към колегите от Институт по невробиология химик Вилияна Тодорова и ас. Диамара Узунова за разбирането, подкрепата и помощта в хода на работа.

Специални благодарности на гл.ас. д-р Виолета Вълчева от Институт по Микробиология, БАН за съдействието и помощта при провеждането на микробиологичните изследвания.

Благодаря безкрайно на д-р Иглика Лесигярска от Институт по биофизика и биомедицинско инженерство, БАН за проведения Докинг анализ.

Благодаря на семейство ми за безкрайната подкрепа и съпричастност!

Съдържание

ВЪВЕДЕНИЕ	6
1. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР	6
1.1 Ксантогенати	6
1.1.1 Приложение на ксантогенатите в химията и индустрията	7
1.1.2 Биологични ефекти на ксантогенатите	7
2. Цел и задачи	11
3. Материали и методи	11
3.1 Химикали	11
3.2 Изследвани ксантогенати	11
3.3 Ензими	12
3.4 Методи	12
3.4.1 Определяне на ензимна активност	12
3.4.2 Изследване на взаимодействието и метаболизма на ксантогенатите от реактивни форми на кислорода	13
3.4.3 Изследване на антиоксидантното действие на ксантогенатите	14
3.4.4 Изследване на антимикуобактериалната активност на ксантогенатите	14
3.4.5 Методи за определяне метаболизма на ксантогенатите	15
3.4.6 Молекулно моделиране	17
3.4.7 Статистическа обработка на резултатите	17
4. Резултати	18
4.1 Взаимодействие на ксантогенатите с ензимни и неензимни системи образувачи супероксиден радикал (O ₂)	18
4.2 Взаимодействие на ксантогенатите с ензимни и неензимни системи, използващи водороден пероксид	31
4.3 Взаимодействие на ксантогенатите с неензимни системи генериращи хидроксилен радикал	41
4.4 Изследване на механизма на антиоксидантното действие на ксантогенатите	45
4.5 Взаимодействие на ксантогенатите със системи, генериращи азотен оксид (NO)	51
5. ОБЩА ДИСКУСИЯ	54
6. ИЗВОДИ	67
7. ПРИНОСИ	68
8. Публикации, свързани с темата на дисертацията	69
9. Участия в научни прояви	69

Използвани съкращения

7-EFC – 7-етокси-4-трифлуорометилкумарин
ABTS – 2,2'-азино-бис-(3-етилбензотиазолин-6-сулфонова киселина)
Asc – аскорбат
BSA – говежди серумен албумин
CYP – цитохром P450
DDC – натриев дитиокарбамат
DPPH – 2,2-дифенил-1-пикрилхидразил
DTNB – 5,5'-дитиобис-(2-нитробензоена киселина)
EDTA – етилендиаминтетраоцетна киселина
EtaA – флавин монооксигеназа в *Mycobacterium tuberculosis*
ETH – етионамид
FMO – флавин-монооксигеназа
GSH – глутатион
HFC – хидрокси-трифлуорометилкумарин
HPA – 16-хидроксипалмитинова киселина
HRP – пероксидаза от хрян
iNOS – индуцируема азотенксид синтетаза
LA – лауринова киселина
MIC - минимална инхибиторна концентрация
Mtb – микобактериум туберкулозис
NED – нафтил-етилендиамин
PC-PLC – фосфатидилхолин фосфолипаза C
PLC – фосфолипаза C
QSAR – количествено съотношение структура-активност
Rf – фактор на задържане
ROS – реактивни форми на кислорода
SMS – свингомиелин синтетаза
SNP – натриев нитропрусид
SOD – супероксид дисмутаза
TBARS – тиобарбитурова киселина реактивни продукти
tBHP – терт-бутил-хидропероксид
TCA – трихлороцетна киселина
TrxR – тиоредоксин редуктаза
Unithiol – 2,3-димеркапто-1-пропансулфонова киселина

ВЪВЕДЕНИЕ

През последните години нарасна много интересът към изследване на химичните и биологични свойства на сяро-съдържащите органични съединения, т.е. съединения, в които сярата е под формата на една или повече реактивоспособни тиолови групи.

Редица небелтъчни и белтъчни съединения, присъщи на живите организми, дължат своята биологична активност на тиоловите групи в молекулите си. Много ензимни и други биохимични реакции, които лежат в основата на голям брой биологични процеси, се извършват при непосредственото участие на тези групи. Блокирането на тиоловите групи води до нарушаване на жизненоважни функции и до патологични промени, често несъвместими с живота.

Познати са голям брой синтетични тиолови съединения. Те се използват широко в промишлеността, селското стопанство, аналитичната химия и др. Много от тях проявяват висока биологична активност и някои са намерили приложение в медицинската практика като ценни лекарствени средства.

В настоящата дисертация са изследвани някои нови биологични свойства на представители на дитиокарбоните киселини – ксантогенати, наричани още ксантати. Един от основните научни проблеми, изследвани в Лабораторията по лекарствена токсикология в Института по невробиология - БАН е биологичната активност на ксантогенатите. Резултатите от тези изследвания са публикувани в голям брой статии, дисертации, обзори и книги.

1. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР

1.1 Ксантогенати

Ксантогенатите са соли (калиеви или натриеви) или естери на различни арил- или алкил-заместени производни на дитиокарбоната киселина, с обща формула: $R-O-CS_2Me(R')$ (където Me^+ е K^+ или Na^+ , а R' е естерна група) (Фигура 1).



Фигура 1. Структурна формула на ксантогенатите

Научният интерес към ксантогенатите датира още от 70-те години на миналия век, когато са изследвани техните основни физични и химични свойства, описани в редица сборници, обзори и книги ([Rao, 1971](#)).

Свойството на ксантогенатите да образуват комплекси с тежки метали е в основата на широкото им използване в химията и индустрията, а така също обясняват и някои техни биологични ефекти. Разтворимостта във вода на комплексите на етил-ксантогената в зависимост от метала се увеличава в реда: Au^+ , Hg^{2+} , Cu^+ , Ag^+ , Pb^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} . От тази зависимост следва, че във вода ксантогенатите практически не хелират феро йони.

1.1.1 Приложение на ксантогенатите в химията и индустрията

Въз основа на някои от най-важните им химически свойства, ксантогенатите се използват от дълги години в аналитичната химия и в някои отрасли на химическата индустрия ([Rao, 1971](#)) като: микроопределяне на метали; производството на целофан и вискозни влакна; флотационни реагенти; синтеза на блок и графт кополимери; вулканизацията на каучук; производство на фотографски материали; пречистване на замърсени води от метали; фунгициди, акарициди и инсектициди.

Познаването на основните физични и химични свойства на ксантогенатите, хелаторната им активност спрямо различни метали при различни условия на средата, отношенията им към реактивните форми на кислорода, химическата им стабилност и характера на получените разградни продукти е важна основа за пълноценното разбиране на разнообразните им биологични свойства.

1.1.2 Биологични ефекти на ксантогенатите

Биологичните ефекти на ксантогенатите за разлика от химичните са далеч по-слабо изучени, особено по отношение на механизма им на действие. Проучванията на основните биологичните ефекти са дело главно на два колектива: този на Sauer и Amtmann в Центъра по вирусология и рак в Хайделберг, Германия и този на Стойчев и Янев от Лабораторията по лекарствена токсикология на Института по физиология на БАН.

Накратко те могат да бъдат изброени по следния начин:

Токсичност: На експериментални животни токсичността на ксантогенатите може да бъде определена като средно висока ([Zagradnik et al., 1962](#)). Симптомите при остро отравяне могат да бъдат описани така: седация, диспнея, тремор, тонични

гърчове, парализа на дишането. Токсичността зависи от структурата на заместителите и се увеличава с удължаване на веригата на заместителите.

Антидоти при отравяне с тежки метали ([Stoytchev, 1975](#)): кадмий, мед, живак, олово.

Инхибиране на **метал съдържащи ензими** ([Ivanov, 1954](#)): полифенолоксидазите в растенията, тирозинази, карбонанхидрази.

Антивирусна активност ([Amtmann et al., 1985](#); [Mellert et al., 1988](#)): спрямо - *Vaccinia virus* от сем. Poxviridae, *Herpes simplex virus* от сем. Herpesviridae, *Coxsackie virus*, *Vesicular stomatitis Indiana virus*, *Simian virus 40* (включително и HIV-вируса от сем. Retroviridae). Антивирусният ефект се обяснява с потискане на фосфорилирането на вирус специфични белтъци чрез повлияване на активността на фосфатидилхолин фосфолипаза С (PC-PLC) и някои протеин кинази от Tricyclodecan-9-yl-xanthogenate (D609) ([Amtmann et al., 1987](#)).

Антибактериално и антигъбично действие: спрямо *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* и *Pseudomonas aeruginosa* и *Fusarium oxysporium*.

Антитуморна активност *in vitro* и *in vivo* ([Amtmann and Sauer, 1987](#)): основна роля за това действие играе инхибирането от ксантогенатите на фосфатидилхолин-специфичната фосфолипаза С и сфингомиелин синтазата и активирането на киселата и неутралната сфингомиелиназа, вследствие на което се повишава нивото в клетката на про-апоптозни медиатор церамид ([Adibhatla et al., 2012](#)). За доизясняването на механизма на това действие е важно да се разбере дали за това допринася ефекта на ксантогенатите като антиоксиданти, стимулатори на NADPH оксидазата, инхибирането на тиоредоксин редуктаза ([Gandin et al., 2010](#)) и ангиогенезата *in vivo* ([Maragoudakis et al., 1990](#)).

Ефекти на ксантогенатите върху ЦНС: основно ефектите се дължат на инхибирането на някои важни ензими, включващи в активния си център различни микроелменти, като допамин-β-хидроксилаза и моноаминооксидаза В, в резултат на което се променят нивата на допамина и норадреналина проявяващ се в промени във възбудимостта на ЦНС.

Метаболизъм на ксантогенатите

След интраперитонеално инжектиране на различни ксантогенати на плъхове, инкубиране с хепатоцити и чернодробни микрозомни, се отделят като крайни метаболити съответните въглеродородни остатъци от молекулата им ([Yanev et al., 1985](#)). Анализът на резултатите от тези експерименти показва, че метаболизмът на ксантогенатите зависи от присъствието на кислород, на редуциращи еквиваленти (NADPH) и е придружено в различна степен от намаление на количеството на

цитохром P450. Метаболизмът се засилва от предварително индуциране на животните с фенобарбитал и не се влияе от метилхолантрен. Всички тези предварителни изследвания са показали, че ксантогенатите се метаболизират от определена изоформа на цитохром P450, при който процес един или повече метаболити водят до инхибиране на ензима ([Yanev et al., 1988](#); [Yanev, 1989](#)).

Обобщените резултати от описаните по-горе експерименти показват, че ксантогенатите изпълняват напълно критериите за така наречените „субстрати самоубийци“ (suicide substrates или mechanism-based inhibitors/inactivators) на CYP450 ([Kent et al., 1999](#)). Селективно се инактивират само на два CYP450 изоензима CYP2B1/2B6 и CYP2E1 ([Yanev et al., 1999b](#)).

Установено е, че образуваният метаболит се свързва ковалентно с белтъчната ензимната молекула, като при това се намалява скоростта на обмен на електрони от редуказата, а електронният поток се декупелува чрез насочване на по-голямата му част към образуване на H₂O₂, а не към субстрата ([Yanev et al., 2000](#)).

В продължение на много години са извършени редица изследвания за действието на ксантогенатите при едновременното им приложение с редица ксенобиотици и лекарства. Установено е, че инхибирането на метаболизма им от CYP2B1/2B6 или CYP2E1 довежда до промяна в биологичния ефект и токсичността на редица ксенобиотици: хексобарбитал ([Mitcheva et al., 1976](#)); пентобарбитал ([Yanev et al., 1982b](#)); анилин ([Mitcheva, 1980](#)); пропофол ([Khokhar and Tyndale, 2011](#)); хлорпирифос ([Khokhar and Tyndale, 2012;2014](#)); никотин ([Garcia et al., 2015](#)); диметилнитрозамин ([Yanev et al., 1983](#); [Hadjiolov et al., 1986](#); [Frank et al., 1988](#); [Hadjiolov et al., 1988](#)); диметилхидразин ([Wattenberg et al., 1977](#); [Yanev et al., 1983](#)); ацетаминофен ([Dimova and Stoytchev, 1989;1990](#); [Dimova et al., 2000](#); [Dimova et al., 2005](#)); етанол ([Yanev, 1978](#)); тетрахлорметан ([Kirova and Stoytchev, 1977](#); [Stoytchev and Kirova, 1977](#); [Stoytchev et al., 1987](#))

Метаболизъм на ксантогенатите и активни форми на кислорода

Модерен подход за детайлното анализиране на взаимодействието и метаболизирането на ксенобиотиците с ензимни системи при които участват различни активни форми на кислорода, е сравняването на тези процеси със съответните химически моделни системи, възпроизвеждащи етапите на химическата трансформация на дадения ксенобиотик в биологичната среда.

При планирането на експерименти в докторската работа за участието на различни активни форми на кислорода при метаболизма на ксантогенатите от изоформи на CYP, би трябвало да се имат предвид следните факти:

1. Несъответствието между стойността на спектралната константа на дисоциация (1 mM) получена от диференциален спектър на свързване на ксантогенатите с CYP2B1 и инактивационните константи за повлияване на ензимната активност (от порядъка на 1 μ M) ([Yanev et al., 2000](#)).
2. Нехарактерните промени в съотношението low/high spin на желязото в CYP2B1 при взаимодействие с ксантогенатите като субстрати тип I.
3. На нивото на активния център на CYP2B1, окислението на ксантогената до активни метаболити е възможно да се осъществи и без наличието на поток от редуциращи еквиваленти, т.е. без NADPH, а от други източници на реактивни форми на кислорода, като tBHP ([Yanev et al., 2000](#)). Това говори в полза на хипотезата за разлики в „потока“ на радикали при различните CYP изоформи, като възможно обяснение за разликите на метаболизма на ксантогенатите от различните изоформи.
4. Структурните промени на ксантогенатите под въздействие на водородния пероксид (окисление при сярата до перксантат с добре очертан абсорбционен пик при 347 nm) са описани в многобройни статии свързани с охарактеризирането на флотационния процес при използването им като хелатори на мед. Би било важно да се провери дали същите промени биха се наблюдавали в биологични среди при участието на водороден пероксид.
5. В бъдещите изследвания на метаболизма на ксантогенатите е много важно да се разбере дали има разлика в естеството на структурните промени предизвикани от двата хем съдържащи ензима CYP и HRP. Може да се предположи, че крайните продукти на активирането на кислорода при двете пероксидази *compound I* (CYP) и *compound II* (HRP) биха довели до различни метаболити при метаболизма на ксантогенатите.

Липсата на експериментални данни за взаимодействието на ксантогенатите с други оксидо-редуктазни ензими (монооксигенази и пероксидази), в механизмите на катализа на които участват междинни комплекси с кислорода, аналогични на тези при системата CYP450, а така също и необходимостта от изясняване на участието на реактивните форми на кислорода в метаболизма на ксантогенатите до реактивни метаболити, обоснова целта и поставените задачи на настоящата докторска работа.

2. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Целта на настоящата дисертация е да се изследва *in vitro* взаимодействието и метаболизма на ксантогенатите от биологични (монооксигеназни и пероксидазни ензими) и химични моделни системи, генериращи различни реактивни форми на кислорода за изясняване на механизма на антиоксидантното им действие.

За реализиране на целта бяха поставени следните задачи:

1. Да се изследва *in vitro* метаболизма на някои ксантогенати в системата на CYP450 (пречистени изоформи CYP2B1/2B6, CYP 2E1 и CYP 4A) и да се изясни значението на реактивните форми на кислорода при този процес.
2. Да се изследва *in vitro* взаимодействието и метаболизма на ксантогенатите от флавин монооксигенази и пероксидази.
3. Да се изследва взаимодействието и метаболизма на ксантогенатите с реактивни форми на кислорода (водороден пероксид, хидроксилен радикал и супероксиден радикал) в моделни химически системи.
4. Да се изследва антиоксидантната активност на ксантогенатите по отношение на свободния радикал DPPH.
5. Да се изследва възможното GSH-миметично действие и NO-скавинджер ефект на ксантогенатите.

3. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

3.1 Химикали

В експерименталната работа бяха използвани чисти за анализ химикали и реактиви осигурени от Sigma Chemical Co. Водороден пероксид (H_2O_2 30%, v/v) е закупен от Merck, 7-етокси-трифлуорометил-кумарин (7-EFC) от Molecular Probes, Inc. и 7-хидрокси-кумарин (HFC) от Enzyme Systems Products.

3.2 Изследвани ксантогенати

D609 (Tricyclodecan-9-yl xanthogenate·K) е закупен от Sigma Chemical Co. Другите изследвани ксантогенати са синтезирани в лабораторията по Лекарствена Токсикология при Институт по Невробиология, БАН, по метода на Rao ([Rao, 1971](#)).

Всички изследвани ксантогенати са калиеви соли с обща формула R-O-CS₂K, където R са различни въглеводородни вериги, кодирани при изложението, като – C1 (метил), C2 (етил) и т.н. до C20. Ксантогенатите бяха разтваряни във вода или буфери (pH 6-8); използвана беше бидестилирана и дейонизирана вода;

ксантогенатите от C10 до C20 бяха разтворени в DMSO. Разтворите са съхранявани на -28°C.

3.3 Ензими

В различните еспериментални процедури бяха използвани следните пречистени ензими:

- CYP2B1 (Цитохром P450, изоформа 2B1), закупен от Gentest, BD Biosciences, USA
- HRP C (Пероксидаза от хрян, тип VI-C, Reinheitszahl (RZ) (A403nm/A275nm) = 3.1), закупена от Sigma Chemical Co.
- EtaA (FAD-съдържаща монооксигеназа от *Mycobacterium tuberculosis*) (изолиран и пречистен в лабораторията по фармацевтична химия на Фармацевтичния факултет, Сан Франциско)
- CYP2E1 (бактериално експресиран заешки Цитохром P450, изоформа 2E1), закупен от Gentest, BD Biosciences, USA
- CYP4A11 (Пречистен човешки Цитохром P450, изоформа 4A11), закупен от Gentest, BD Biosciences, USA

3.4 Методи

Бяха използвани следните методи за:

3.4.1 Определяне на ензимна активност

- Метаболизиране на ксантогенатите от **CYP2B1** ([Yanev et al., 1999a](#)).

Реконституирането на ензимната система с пречистен CYP2B1 включва: 0,5 µM ензимен белтък, 0,5 µM NADPH-хемопротеин редуктаза, 200 µg/ml DLPC и 110 U/ml каталаза в 50 mM калиево фосфатен буфер (pH 7.4).

- Етоксид-трифлуорометил-кумарин O-деетилазна активност (ECOD) на **CYP2E1** ([DeLuca et al., 1988](#)).

Към реакционна среда (1 mL) съдържаща 0.1 mM 7-EFC, 40 mg BSA/mL, и 0.2 mM NADPH в 50 mM калиево фосфатен буфер (pH 7.4) се добавя 40 pmol CYP2E1. След инкубация при 30°C за 15 min реакцията се спира след прибавяне на студен ацетонитрил и продукта на реакцията (HFC) се измерва на спектрофлуориметър при $\lambda_{ex} = 410 \text{ nm}$; $\lambda_{em} = 510 \text{ nm}$. Количеството на образувания HFC се изчисляваше от стандартна крива.

- Активност на **CYP4A11** чрез ω -хидроксилиране на лауринова киселина ([Mason et al., 1994](#)).

Към реакционна среда (200 µL) съдържаща 0.1 M Tris-HCl буфер, pH 7.4, 5 mM MgCl₂, 5 mM NADPH и 125 µM LA, се добавя 3 pmol CYP4A11. След инкубация

при 37°C за 20 min реакцията се спира с добавянето на 1 mL студен разтвор на етил ацетат. След изпаряване, продуктът на реакцията 12-HDA в сухия остатък се определя след куплиране с PDAM (1-пиренилдиацетат) чрез HPLC с флуоресцентен детектор ($\lambda_{ex} = 345 \text{ nm}$; $\lambda_{em} = 395 \text{ nm}$) при използване на HPA (16-хидроксипалмитинова киселина), като вътрешен стандарт.

- Peroxidazna aktivnost na **HRP** със субстрати H_2O_2 и о-анизидин ([Martinkova et al., 2012](#)).

Реакционната среда съдържа 0.1 μg HRP, 0.03 – 0.6 mM H_2O_2 , 0.07–0.75 mM о-анизидин в краен обем 1.0 mL от 0.1 M фосфатен буфер, pH 6.5. Реакцията се стартира след добавянето на H_2O_2 , като промените в абсорбцията при 460 nm отразяват скоростта на образуване на диимина на о-анизидина.

- Метаболизиране на ксантогенатите от флавин монооксигеназа **EtaA** ([Vannelli et al., 2002](#)).

Крайната реакционна среда съдържа EtaA (400 nM), говежди серумен албумин (BSA, 0.1 mg/mL), супероксид дисмутаза (100 U/mL), каталаза (100 U/mL), KCl (100 mM), NADPH (200 μM) и различни концентрации на ксантогенати в HEPES буфер (50 mM, pH 7.5). След две минути на преинкубация при 37°C реакцията се стартира чрез прибавянето на ензима в опитната кювета и еднакво количество вода в референтната кювета, с използване на Cary 300 Bio dual-beam spectrophotometer (Varian, Inc., Palo Alto, CA). Сканира се спектъра между 250 и 400 nm. Скоростта на намаляване на субстрата и образуването на метаболита се определя при 301 nm ($\epsilon = 17600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) и 347 nm ($\epsilon = 10400 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), съответно ([Hao et al., 2000](#)).

3.4.2 Изследване на взаимодействието и метаболизма на ксантогенатите от реактивни форми на кислорода

- Супероксиден радикал ($\text{O}_2^{\cdot-}$), генериран чрез UV-облъчване на системата рибофлавин/метионин ([Beauchamp and Fridovich, 1971](#))

Реакционната среда съдържа рибофлавин (1.7 μM) и метионин (0.01 M) в 50 mM K-PO_4 буфер, pH 7.8 при инкубация на стайна температура в кварцови кювети.

- Изследване на взаимодействието с H_2O_2 ([Hao et al., 2000](#))

В експерименти *in vitro* различни ксантогенати се инкубират в 0.05 M фосфатен буфер, pH 7.4 с различни концентрации на водороден пероксид. Проследяват се във времето промените в спектъра между 200 и 400 nm.

- Хидроксилен радикал ($\cdot\text{OH}$), генериран в система на Фентонова реакция и тестиран с дезоксирибозен тест ([Gutteridge and Halliwell, 1988](#))

Инкубационната среда (20 mM K-PO₄ буфер, pH 7.2) съдържа в различни комбинации: 0.1 mM FeCl₃ или FeSO₄; +/- 0.1 mM аскорбинова киселина; +/- 0.1 mM EDTA и 0.5 mM H₂O₂. Акцепторни системи: 3.4 mM дезоксирибоза и ксантогенат

Процедура за доказване на разграждането на дезоксирибозата (Halliwell et al., 1987): след инкубация за 30 min на 37°C, реакцията се прекъсва със смес на TCA:HCl:TBA в съотношение 2:1:2, следва 15 min на кипяща водна баня (100°C). След центрофугиране се измерва абсорбцията на супернатантата при 532 nm срещу контрола (буфер).

3.4.3 Изследване на антиоксидантното действие на ксантогенатите

- Взаимодействие със стабилния радикал DPPH ([Molyneux, 2004](#)).

В 1.89 mL метанол се прибавят 100 µL DPPH (75 µM) и 10 µL от изследваните вещества. Проследява се промяната на абсорбцията при 515 nm за най-малко 5 минути или до достигане на плато.

- Взаимодействие с реактива на Ellman за тестиране на реактивността на тиоловата група ([Ellman et al., 1961](#)).

Реакцията се осъществява в 0.01 M K-PO₄ буфер, pH 7.4 и 2 mM DTNB. След 5 минутна инкубация при стайна температура със или без различни концентрации на тиолови съединения се измерва абсорбцията на получения 2-nitro-5-thiobenzoate dianion при 412 nm срещу реагент бленк.

- Взаимодействие с NO след спонтанно отделяне от натриев нитропрусид и тестиране с реактив на Griess ([Sun et al., 2003](#))

Проби с разтвори на SNP дихидрат (5, 2 и 1 mM) в 0.1 M K-PO₄ буфер, pH 7.4 се инкубират за 30, 60 и 120 min на стайна температура и светлина в отсъствие или присъствие на изследвания ксантогенат. Взимат се по 0.5 mL двойни проби за определяне на нитрита чрез реагента на Griess.

Тест на Griess за определяне на нитрит.

Към 0.5 mL стандартен разтвор се прибавя 0.25 mL разтвор на сулфаниламид (1% в 5% фосфорна киселина). След инкубиране 5 min на стайна температура, на тъмно се прибавят 0.25 mL 0.1% NED. След 30 min инкубация на тъмно се измерва абсорбцията при 546 nm.

3.4.4 Изследване на антимикобактериалната активност на ксантогенатите

- чрез пропорционалния метод на Canetti ([Canetti et al., 1969](#)).

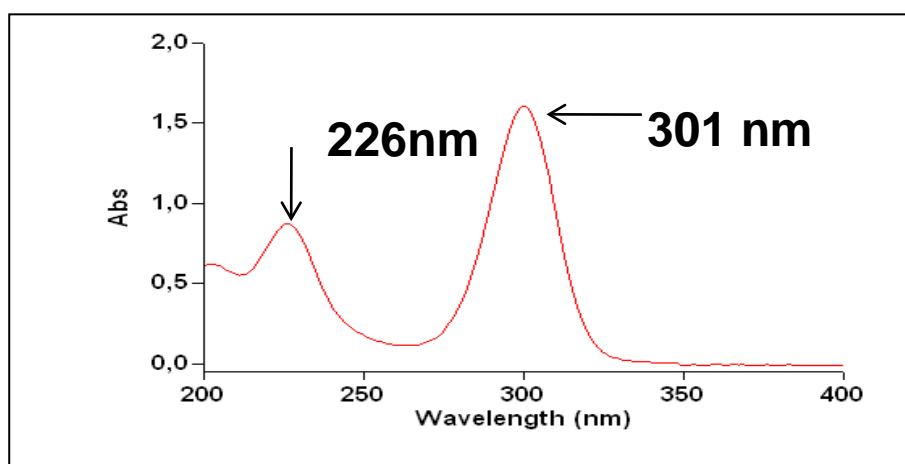
Епруветки със среда на Löwenstein-Jensen (5 mL), съдържащи тестваните съединения и такива без тях (контроли) се инокулират с 0.1 mL суспензия на *M.*

tuberculosis H37Rv (10^5 клетки/mL) и се инкубират за 45 дни при 37°C. Отношението на броя на колонии в средата с към тези без изследваните съединения се представят като процент на инхибиране. Минималната инхибиторна концентрация (MIC) се определя като минималната концентрация на изследваното вещество (в μM) необходима да подтисне напълно бактериалния растеж (0% растеж).

3.4.5 Методи за определяне метаболизма на ксантогенатите

3.4.5.1 Спектрални методи

Разтворени в буфер с рН 7.4 различните ксантогенати имат характерен абсорбционен спектър с два максимума на 301 и 226 nm, с екстинкционни коефициенти 17600 и $8750 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, съответно (Фигура 3.1).



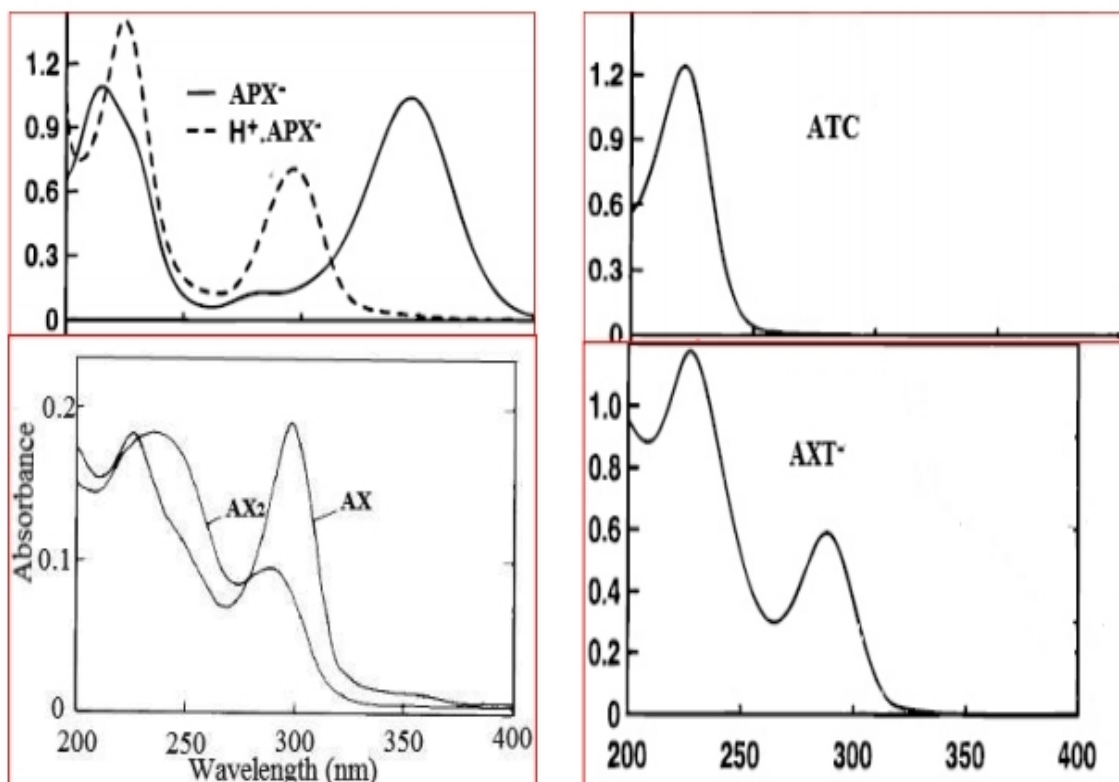
Фигура 3.1. Абсорбционен спектър на К-етилксантогенат (0.1 mM в 0.05 mM фосфатен буфер рН 7.4).

По литературни данни различните окислени продукти на ксантогенатите имат различна спектрална характеристика ([Hao et al., 2000](#)) (Таблица 3.1, Фигура 3.2).

Таблица 3.1. Общи структурни формули, химически наименования, абсорбционни максимуми и молекулярни екстинкционни коефициенти на различни ксантогенатни производни.

Структурна формула	Химическо наименование	Код	Абсорбционни максимуми	Моларен екстинкционен коефициент ($\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)
$\text{R}-\text{O}-\overset{\text{S}}{\parallel}{\text{C}}-\text{S}-\text{K}$	O-alkyl (aryl) dithiocarbonate	PAX	226 nm 301 nm	≈ 50 17600

	(xanthate)		380 nm	8750
$\text{R}-\text{O}-\text{C}(=\text{S})-\text{SH}$	O-alkyl S-peroxido dithiocarbonate (perxanthate)	APX	215 nm 285 nm 347 nm	≈ 10900 1300 10400
$\text{R}-\text{O}-\text{C}(=\text{S})-\text{S}-\text{OH}$	O-alkyl S-hydroperoxido dithiocarbonate (perxanthate)	H.APX	225 nm 297 nm 350 nm	≈ 14000 ≈ 7000 ≈ 100
$\text{R}-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{SH}$	O-alkyl thiocarbonate	ATC	222 nm	12400
$\text{R}-\text{O}-\text{C}(=\text{S})-\text{S}-\text{S}-\text{C}(=\text{S})-\text{O}-\text{R}$	Bis[alkoxy (thiocarbonyl)] disulfide	AX ₂	238 nm 283 nm	17800 8600
$\text{R}-\text{O}-\text{C}(=\text{S})-\text{S}-\text{S}-\text{C}(=\text{O})-\text{OH}$	O-alkyl S-thiosulfonato dithiocarbonate	AXT	229 nm 289 nm 350 nm	≈ 12000 ≈ 6000 ≈ 100



Фигура 3.2. Абсорбционни спектри на производните на ксантогенатите описани в Таблица 3.1.

Промените във времето и абсорбцията от 200 до 400 nm бяха проследени на двулъчев спектрофотометър Cary Bio 300 в кварцови кювети с оптичен път 1cm. Данните бяха обработени със специализиран софтуер CaryWin.

3.4.5.2 Разделяне на ксантогенатите и техните метаболити чрез високоефективна течна хроматография (HPLC)

Беше използван метод описан от Нао ([Hao et al., 2000](#)) с известни модификации.

Хроматографска система: Waters; кватернерна помпа 600E; фотодиоден детектор (996 PDA); колона: xTerra C18, 150x4.6mm, 5µm; подвижна фаза: ацетонитрил/вода (5mM TBAP, 5 mM фосфорна киселина, достигане на рН 9.2 с помощта на 1N NaOH) (за C2 20/80; за C8 60/40); t=25°C; Скорост на потока: 1 mL/min; софтуер Empower 2.0.

Количеството на C2 и C8 се определяше по предварително изградена калибровъчна крива на отношението на площта под хроматографския пик към концентрацията на съответния ксантогенат.

3.4.6 Молекулно моделиране

Беше приложен подходът на молекулното моделиране **докинг**. При докинга молекулата на ксантогената се позиционира виртуално в активните центрове на CYP 4A11 и CYP2E1, Определят се докинг пози (геометрия на молекулата в активния център) и се изчислява енергия на взаимодействие с използването на оценъчна функция (scoring function). Докингът беше проведен в МОЕ софтуерна платформа с приложение на 3D protonate tool и Docking tool.

3.4.7 Статистическа обработка на резултатите

Бяха използвани:

1. Линејни и нелинейни регресионни методи за оценка на взаимодействието на ксантогенатите с ензимни и неензимни системи със софтуер GraphPad Prisma 6.0.
2. t-Тест и ANOVA за оценка на статистическата значимост на наблюдаваните ефекти.
3. Експерименталните данни са представени като средни стойности от най-малко 4 повторения със съответното стандартно отклонение (SD).

4. РЕЗУЛТАТИ

4.1 Взаимодействие на ксантогенатите с ензимни и неензимни системи образуващи супероксиден радикал (O_2^-)

Въведение

По стойностите на инактивационните константи на CYPB1/2B6 и CYP2E1 може само индиректно да се съди за скоростта на метаболизиране на отделните ксантогенати, тъй като инактивационната константа, скоростта на инактивиране и т. нар. отношение на разпределение (броя на метаболизираните молекули към една инактивирана ензимна молекула) включва в себе си и афинитета на метаболита за взаимодействие с ензима ([Yanev et al., 1999b](#)). За допълване на тази информация бяха направени няколко експеримента с пречистен CYP2B1, като се проследяваше директно изчерпването на ксантогенатите в реакционната среда чрез аналитична спектрофотометрия и HPLC. Търсеха се нови доказателства за мястото и характера на промените в структура на ксантогенатите под действието на CYP2B1 и какви реактивни форми на кислорода участвуват в тези процеси. Също така бяха направени и допълнителни експерименти за взаимодействието на ксантогенатите с други изоформи на цитохромите, а именно CYP4A и CYP2E1. Двата ензима изпълняват важна роля в организма за метаболизма на мастните киселини. В тези сравнителни експерименти се търсеше и отговор на въпроса за значението на ориентацията на субстратната молекула към ензимния център и резултата от това взаимодействие.

4.1.1 *Метаболизиране на ксантогенатите от пречистен CYP2B1*

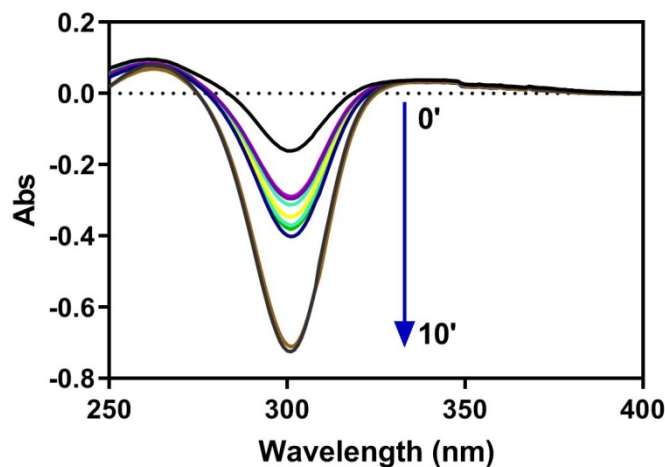
Експериментална процедура

В двулъчев спектрофотометър към реконституираната ензимна система в буферна среда се прибавя ксантогенат (в концентрации от 20 до 100 μ M). Реакцията се стартира с NADPH (20 mM) при 30°C. Сканира се спектъра на 0, 1, 3, 6, 10 мин. Изчислява се началната скорост на метаболизиране на ксантогената (по промените на 301 nm) и беше проведен хроматографски анализ на реакционната смес.

Резултати

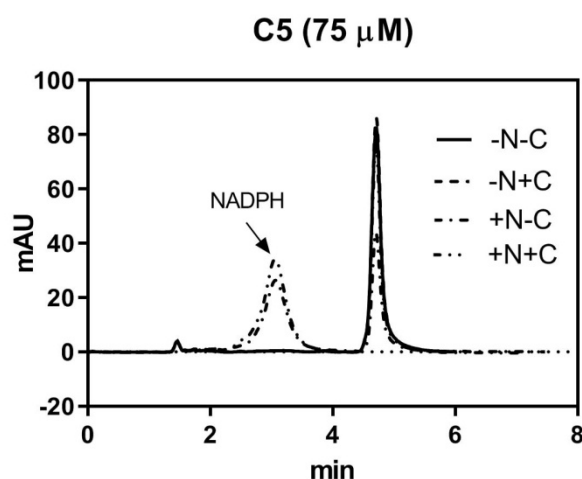
В експериментите за проследяване на скоростта и характера на метаболизиране на отделните ксантогенати от CYP2B1, субстратът присъстваше при старта на реакцията и в двете кювети. Така намаляването на абсорбцията във времето под нулевата линия говори за изчерпване на субстрата в опитната кювета след добавянето на NADPH. Промените в спектъра на бутилксантогената (C4) (50

μM), представени на **Фигура 4.1**, се характеризират с намаление на характерния абсорбционния пик на 301 nm, като не се наблюдава образуване на други окислени метаболити.



Фигура 4.1. Промени в спектъра на бутилксантогенат след инкубация с CYP2B1

Хроматографският анализ показва, че ксантогенатите се метаболизират до все още неидентифициран метаболит с различно хроматографско поведение на задържане. Количеството на метаболизирания ксантогенат (според площта на пика) се увеличава в отсъствие на каталаза, т.е. в условия на увеличено образуване на водороден пероксид и/или супероксиден радикал (**Фигура 4.2** и **Таблица 4.1**). Такива промени са възможни само в присъствие на NADPH в средата. От **Таблица 4.1** може да се направи извода, че степента на метаболизъм на ксантогената от CYP2B1 зависи в много по-голяма степен от концентрацията на реактивни форми на кислорода отколкото от тази на редуциращите еквиваленти.

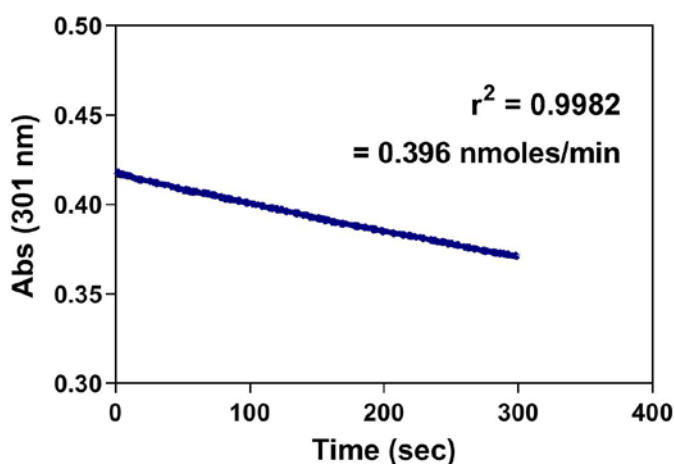


Фигура 4.2. Хроматографски анализ на среда с C5 ($75 \mu\text{M}$) след 5 минутно инкубиране с или без NADPH (N) и/или каталаза (C).

Таблица 4.1. Количествен анализ на хроматографския пик с $R_f=4.71$ мин изразено със стойността на mAU

Условия	mAU
- N - C	82.25
- N+C	85.98
+N - C	43.91
+N +C	75.73

Намаляването на абсорбцията при 301 nm е линейно във времето до 5 min и е показател за началната скорост на метаболизма (**Фигура 4.3**).



Фигура 4.3. Промени в абсорбцията при 301 nm при метаболизма на октилксантогенат (20 μ M) от CYP2B1

Важно е да се отбележи, че изчислените началните скорости на метаболизиране на ксантогенатите не зависят от изходната концентрация на субстрата в концентрационния диапазон от 20 до 100 μ M. Липсата на зависимост на скоростта на реакцията от изходната концентрация на ксантогената може да се дължи на достигане на максимална скорост още при 20 μ M. Началната скорост на метаболизъм не е еднаква при различните изследвани ксантогенати, тя е най-висока при C1 и D609 и е най-ниска при ксантогенатите с дълговерижни заместители (C10 – C16) (**Таблица 4.2**).

Таблица 4.2. Начални скорости на метаболизъм на различни ксантогенати от CYP2B1

Ксантогенат	Концентрация (μM)	Начална скорост (nmol/min)
C1	20 - 100	0.784
C2	20 - 100	0.350
iC3	20 - 100	0.515
2C4	20 - 100	0.495
C4	20 - 100	0.682
C8	20 - 100	0.396
C10	20 - 100	0.322
C12	20 - 100	0.277
C14	20 - 100	0.204
C16	20 - 100	0.200
Cyclo	20 - 100	0.478
D609	20 - 100	0.768

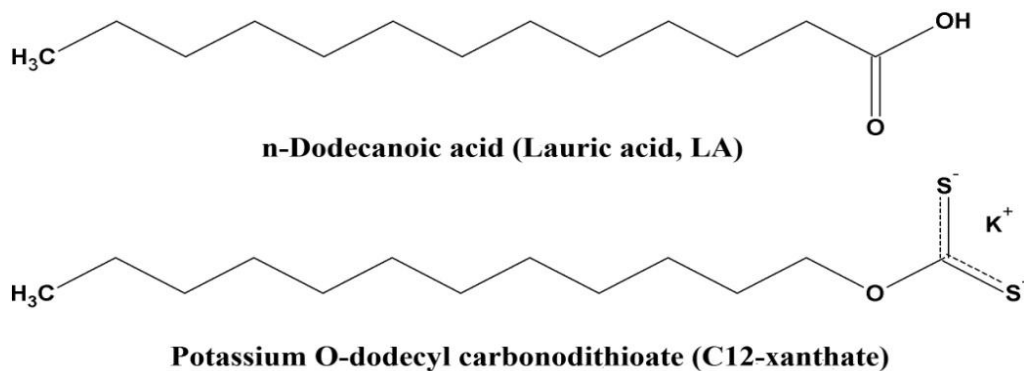
4.1.2 Метаболизиране на ксантогенати от CYP2E1 и CYP4A11

Въведение

Наситените мастни киселини (FA), като лауриновата киселина (LA), се метаболизират от CYP-зависими реакции до ω - и (ω -1)-хидроксилирани продукти. CYP изоензимите, участващи в метаболизма на FA, са от 4A и 2E фамилии.

Структурата на ксантогенатите с дълга алкилна верига е подобна на FA, които се хидроксилират с най-голяма скорост от изоформите CYP4A и CYP2E1 (**Фигура 4.4**) ([Powell et al., 1996](#)).

Провеждането на експериментите с тези две CYP изоформи в настоящата работа цели да се получи повече информация за значението на взаимодействието на ксантогенатите с различните ензимни центрове за техния метаболизъм.



Фигура 4.4. Химическа структура на лауринова киселина (LA) и калиев О-додecil карбонодитиоат (C12-ксантогенат).

Експериментална процедура

Ензимна активност

В експериментите беше приложен класическият протокол за изследване на ензимни инактиватори: (i) пре-инкубиране на ксантогенати в различни концентрации с ензимен източник (суперзоми) в буферна среда, в присъствие на редуциращ кофактор NADPH (*първична среда*); (ii) измерване на остатъчната ензимна активност след различно време на инкубиране чрез стартиране на реакцията във *вторична среда* – LA-хидроксилиране от CYP4A11 и 7-EFC-деетилиране от CYP2E1.

Първична среда

Реакционната среда (200 μ L) съдържа 0.1 M Tris-HCl буфер, pH 7.4; 5 mM MgCl₂; ензим (суперзоми, съдържащи 15 pmoles CYP4A1 или 320 pmoles CYP2E1) описана подробно от Yanev et al., 1999 ([Yanev et al., 1999b](#)). Ксантогенатите се тестват в крайна концентрация от 100 μ M (в система с CYP4A11) или от 50 до 600 μ M за C12-ксантогената (в система с CYP2E1). Реакцията се стартира с 10 μ L NADPH (100 μ M); след различно време на инкубация при 37°C се взимаха малки количества от средата за стартиране на вторичната реакция.

Вторична среда

Остатъчната активност на CYP2E1 бе определена при субстрат 7-Етокситрифлуорометилкумарин-О-деетилазна (7-EFC), а на CYP4A11 бе тествана чрез ω -хидроксилирането на лауриновата киселина.

Инхибиторната активност на C12 спрямо LA- ω -хидроксилиращата активност на CYP4A11 беше тествана чрез инкубиране на ензима в присъствие на различни концентрации на C12 (10, 25, и 50 μ M) и различни концентрации на LA (от 10 до 100 μ M).

Молекулно моделиране (Docking)

Структурата на C12-ксантогената беше построена и оптимизирана с MMF94 силово поле при използване на MOE софтуер v. 2014.09 (Chemical Computing Group). Структурата на CYP2E1 беше взета от Протеиновата база данни (PDB ID 3KOH, съ-кристализирана с омега-имидазоллил октаноева киселина. Структурата на CYP4A11 беше взета от Swiss Model repository (ID Q02928). Тъй като структурата не съдържа хем, Fe атом на хема се свързва с Cys457. Съгласно Hoch and Ortiz de Montellano ([Hoch and Ortiz De Montellano, 2001](#)) хемът се свързва с CYP4A11 чрез естерна връзка към Glu321, която аминокиселина се прогнозира, че се намира в активния център на ензима ([Chang and Loew, 1999](#)). Хемът се позиционира в структурата на CYP4A11 със същата ориентация като тази в структурата на CYP2E1. Протеиновата структура беше оптимизирана с Amber12: EHT силово поле.

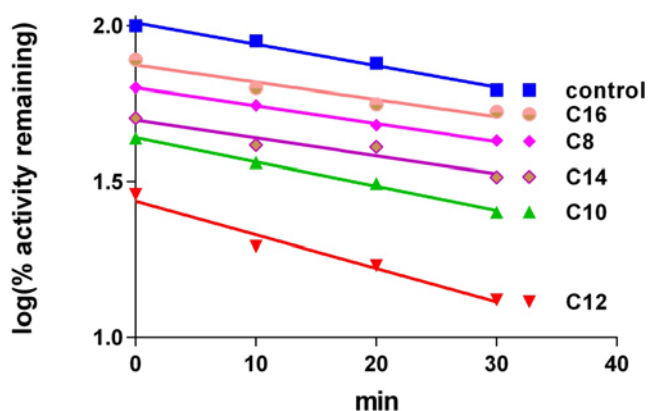
Молекулното моделиране (docking) към активните центрове беше осъществено чрез Docking tool на MOE. Докинг резултатите бяха rankirani на база оценка (score) при използване на оценъчната функция GBVI/WSA за апроксимиране на свободната енергия на свързване. Анализирани бяха 10-те докинг пози (позите с най-нисък резултат) за C12-ксантогената. Мястото за докинг в активния център на CYP2E1 се дефинира посредством всички аминокиселинни остатъци локализиращи на разстояние 4.5Å (стандартна MOE конфигурация) от хема и лиганда в кристалната структура на ензима. За CYP4A11 бе избран активния център, в който всички аминокиселинни остатъци са разположени на 4.5Å от хема, прибавяйки аминокиселинните остатъци описани като част от активния център според Chang and Loew ([Chang and Loew, 1999](#)), включващ хема. За избягване на грешка поради начина на прибавяне на хема в структурата на CYP4A11, бе извършен докинг анализ и без хем. В този случай, активният център се дефинира от аминокиселинните остатъци описани като част от активния център.

Резултати

Ефект на различни ксантогенати върху метаболизма на LA от CYP4A11

Инкубирането на различните ксантогенати с CYP4A11-суперзоми в концентрация от 100 µM и NADPH за 30 min не води до никакво времезависимо инактивиране на хидроксилирането на LA във вторичната инкубационна среда. Наклонът на линията описваща намалението на активността на CYP4A11 в пробите с C12 (-0.006928 ± 0.0005986) след различно време на преинкубиране не се различава статистически от този на контролните проби (-0.01078 ± 0.001414) ($p = 0.066$, чрез paired t-test). Пробите при тестиране на хидроксилирането на LA не

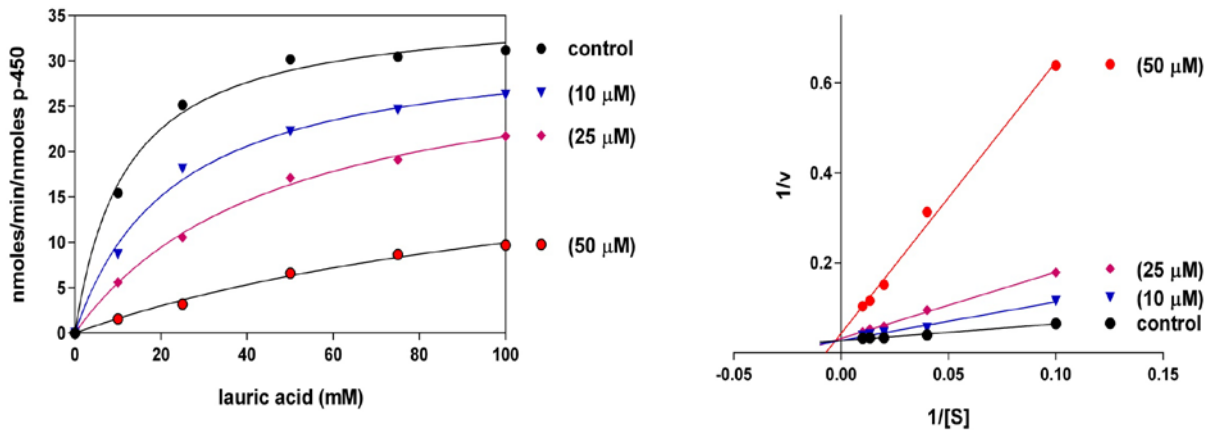
могат да бъдат разредени в по-голяма степен, защото количеството на ензима в пробата (3 pmoles CYP4A11) трябва да бъде достатъчно за постигането на оптимум на ензимната реакция във вторичната среда. Така, крайната концентрация на ксантогенатите от 20 μM във вторичната среда е достатъчно висока, за да доведе до различна степен на инхибиране от ксантогенатите с различно дълга алкилна верига, като C8, C10, C12, C14 и C16 в нулево време (**Фигура 4.5**). Най-силният инхибитор беше показано, че е C12-ксантогената, чиято химическа структура е най-близка до тази на ендегенния субстрат (LA) (**Фигура 4.4**). Не се наблюдава никаква инхибиторна активност от C3-ксантогената, който е с къса алкилна верига и D609, ксантогенат с циклична арилна структура.



Фигура 4.5. Хидроксилиране на лауринова киселина от пречистен човешки CYP4A11. Зависими от времето промени предизвикани от различни ксантогенати (100 μM в първичната среда, 20 μM във вторичната среда). Стойностите са средни от три различни измервания.

Инхибиране на LA- ω -хидроксилиране от CYP4A11 от C12-ксантогенат

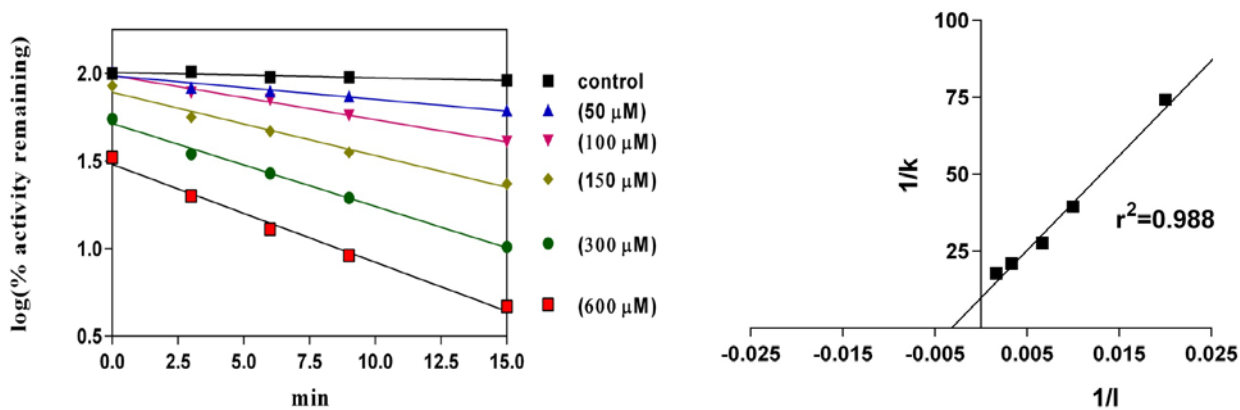
Инкубиране на C12 ксантогената в различни концентрации (10, 25, и 50 μM) с CYP4A11 суперзоми води до инхибиране на LA- ω -хидроксилиране (**Фигура 4.6A**). Хидроксилирането на LA показва Михаелис-Ментенова кинетика с $K_m=11.8 \mu\text{M}$ и $V_{max}=35.8 \text{ nmoles/min/nmoles CYP450}$. Типът на C12 инхибирането е конкуритивно (**Фигура 4.6B**). Изчислената константа на инхибиране K_i е $9.0 \pm 1.0 \mu\text{M}$. При използваните по-високи концентрации (50 и 100 μM) инхибирането е от смесен тип.



Фигура 4.6. Ефекти на различни концентрации на С12-ксантогенат спрямо СYP4A11 LA-хидроксилиране (А) Михаелис-Ментенова кинетика (анализ с нелинейна регресия); (В) Изображение по Лайнуивер-Бърк (анализ с линейна регресия). Стойностите са средни от три различни измервания.

Ефект на С12-ксантогенат спрямо СYP2E1 зависимия 7-EFC метаболизъм

С12-ксантогенатът в концентрации от 50 до 600 μM повлиява СYP2E1 метаболизирането на 7-EFC като типичен „mechanism-based” инактиватор (Фигура 4.7А). Изчислените скоростна константа (k_{inact}), време на полу-инактивиране ($t_{1/2}$) и инактивационна константа (K_i) са 0.1 min⁻¹, 7 min и 312 μM, съответно (Фигура 4.7В).



Фигура 4.7. Време- и концентрация- зависими промени под влияние на С12-ксантогенат (50 до 600 μM в първичната среда) спрямо активността на EFC-деетилирането от пречистен заешки СYP2E1 (стойностите са средни от три различни измервания). (А) log зависимост на остатъчната ензимна активност; (В) Изчисляване на константата на инактивиране чрез отнасяне 1/инхибиторната концентрация (1/I) към 1/наклона (1/k) (анализ чрез линейна регресия).

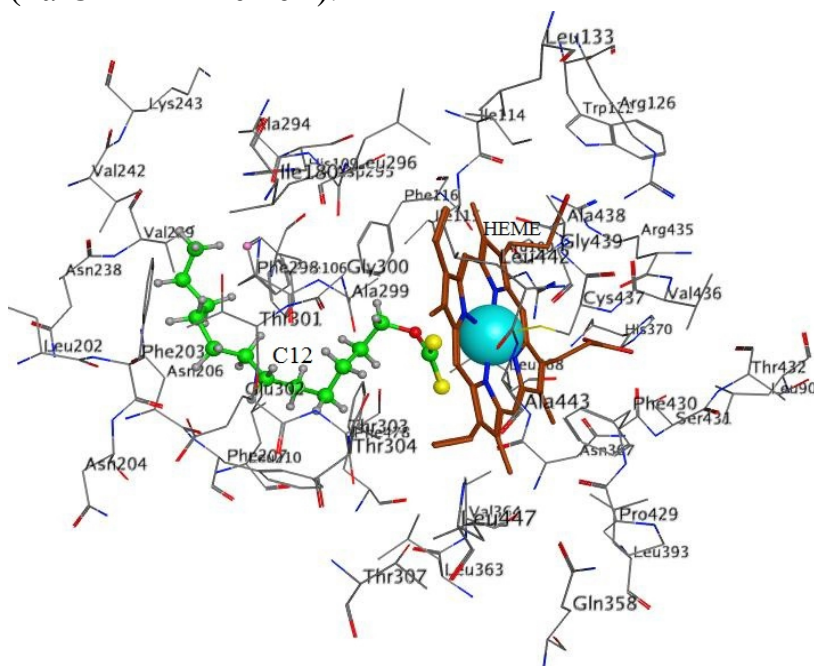
Молекулно моделиране

Резултатите от докинг анализа на ксантогената C12 към CYP2E1 и CYP4A11 са показани в **Таблица 4.3** и **4.4.**, респективно. E_{place} отразява енергията, свързана с позициониране на лиганда в активния център. Взаимодействието на лиганда с ензима се оценява чрез оценката S-value, като по-ниска S отговаря на по-силно взаимодействие (MOE v. 2014.09).

В **Таблица 4.3** и **4.4** са показани минималните и максималните стойности за най-добрите 10 докинг пози на ксантогената C12, като са представени и най-добрите пози (с най-ниски S-стойности) за CYP2E1 и CYP4A11 във **Фигура 4.8** и **4.9**. Най-добрите 10 пози имат подобни S-стойности с разлика по-малка 3.5 kcal/mol.

При CYP2E1 всички 10 пози на C12 са ориентирани с дитиокарбоновата група към хема (**Фигура 4.8**), показващо че тази поза на C12 е предпочитаната.

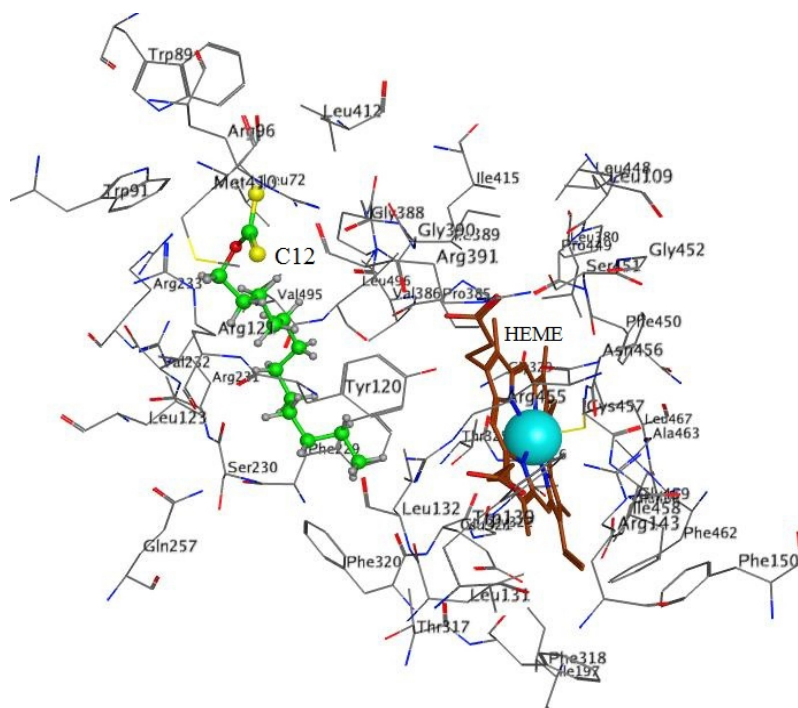
При CYP4A11, ксантогенатът C12 се ориентира с алкилната верига към хема в 9 позиции (**Фигура 4.9**), която може да се счита за предпочитаната, независимо че в една поза лиганда е ориентиран с дитиокарбоновата група към хема. Докинг резултатите със структурата на CYP4A11 без хем не се различават от тези на **Фигура 4.9** (на CYP4A11 с хем).



Фигура 4.8. Докинг на C12 към CYP2E1. C12-Ксантогенатът е ориентиран към хема със своята дитиокарбонова група. Цветовете на атомите означават: С в C12 – зелен, С в хема – кафяв, С в протеина – сив, О – червен, S – жълт, N- тъмно синьо, Fe – светло синьо

Таблица 4.3. Докинг на C12 към CYP2E1. S – резултат от лиганд-ензимното взаимодействие, E_conf – конформационна енергия на C12, E_place – резултат от енергията на докинг настаняването

	S	E_conf	E_place
min	-13.57	-59.81	-96.88
Поза на Фиг. 4.8	-13.57	-49.94	-56.10
max	-10.28	-48.92	-47.51



Фигура 4.9. Докинг на C12-ксантогената към CYP4A11. C12-ксантогенатът е ориентиран със своята алкилна верига към хема. Цветовете на атомите са като на Фигура 4.8

Таблица 4.4. Докинг на C12-ксантогената към CYP4A11. S – резултат от лиганд-ензимното взаимодействие, E_conf – конформационна енергия на C12, E_place – резултат от енергията на докинг настаняването.

	S	E_conf	E_place
min	-8.59	-65.88	-67.48
Поза на Фиг. 4.9	-8.59	-62.73	-62.86
max	-7.80	-55.64	-47.61

Хидроксилирането на LA се повлиява от ксантогенатите по различен начин в зависимост от изоформата на CYP, осъществяваща реакцията.

LA- ω -хидроксилирането от CYP4A11 се инхибира конкурентивно от ксантогенатите с дълга алкилна верига (C12 е най-силния инхибитор).

Реакцията на LA-(ω -1)-хидроксилиране от пречистената CYP2E1 е инактивирана по „mechanism-based” тип. Инактивационната константа на C12 изчислена при тези експерименти е по-ниска от тази на C8, измерена при предишни експерименти ([Yanev et al., 1999b](#)).

Между активните центрове на CYP4A11 и CYP2E1 изоформи съществуват както подобия, така и някои разлики.

QSAR (количествено съотношение структура-активност) анализът на взаимодействието на различни субстрати и инхибитори на CYP4A11 с ензимния му център показва не само голяма зависимост на активността от дължината на молекулата (около 14Å разстояние между полярното място на свързване на субстрата в белтъка и хемната ферилна група), но също така силна зависимост от стерични фактори (само съединения с „права” алкилна верига имат възможност да се координират към хема) ([Bambal and Hanzlik, 1996](#)). Тази стерична зависимост обяснява факта, че CYP4A11-зависимото LA-хидроксилиране се осъществява на крайния въглероден атом (ω), въпреки, че от термодинамична гледна точка е най-неблагоприятното място.

Активният център на CYP2E1 е подобен на CYP4A11, но притежава малък „джоб” близо до хема, чиято хидрофобност позволява LA да бъде хидроксилирана предимно на (ω -1) място, най-благоприятното място от енергетична гледна точка ([Wang et al., 1995](#); [Adas et al., 1999](#)).

Нашите резултати показваха, че ксантогенатите с дълга алкилна верига (като C12-ксантогената) са относително добри субстрати на двете CYP изоформи, осъществяващи LA-хидроксилиране. Нашите опити с молекулното моделиране на C12 подкрепя хипотезата, че разликите се дължат на различния начин на взаимодействие с P450 ензимите. Резултатите показват, че активният център на CYP2E1 позволява на C12-ксантогената да се координира към хема с най-уязвимата си дитиокарбонова група, което води до инактивиране на ензима. В активния център на CYP4A11 ксантогенатът е ориентиран с алкилната си верига към хема, така може да се допусне, че се извършва ω -хидроксилиране на ксантогенатната молекула, която може да инхибира по конкурентивен начин хидроксилирането на LA. Важно е да се отбележи, че константата на инхибиране на C12 за CYP4A11 ($9 \pm 1.0 \mu\text{M}$) е от

същата величина с константата на Михаелис-Ментен за LA- ω -хидроксилирането наблюдавана с пречистена СУР4А11: 11 μ М ([Gainer et al., 2005](#); [Kim et al., 2014](#)).

4.1.3 Взаимодействие на ксантогенати със супероксидни радикали

За проследяване на промените в структурата на ксантогенатите от химическа моделна система, продуцираща супероксиден радикал, ние избрахме процедурата описана за определяне на супероксиддизмутазна активност от Beauchamp и Fridovich ([Beauchamp and Fridovich, 1971](#)).

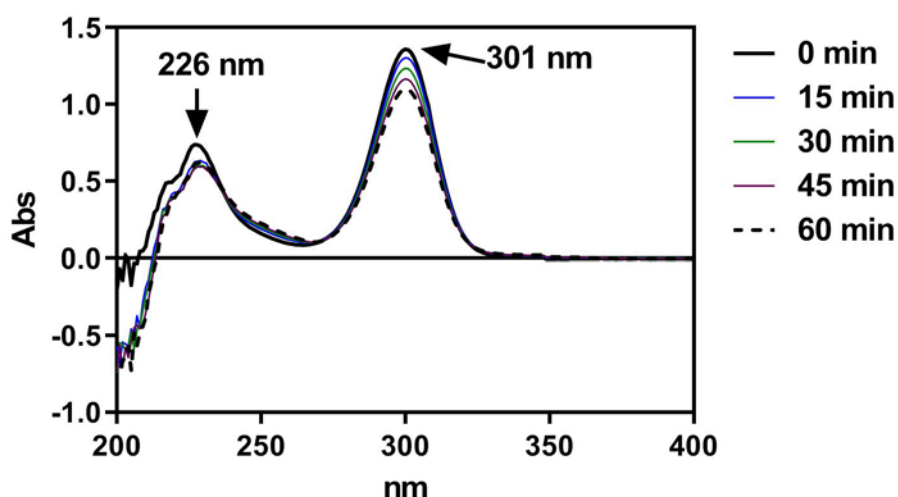
Експериментална процедура

Към пробите в кварцови кювети се добавяха различни ксантогенати (100 μ М), разтворени в общата реакционна смес. Пробите се осветяваха за различен период от време - 0, 15, 30, 45 и 60 минути на стайна температура. Проследяваха се промените в спектъра от 200 до 400 nm.

За проследяване на промените в структурата на ксантогенатите, бяха взимани и проби за хроматографски анализ.

Резултати

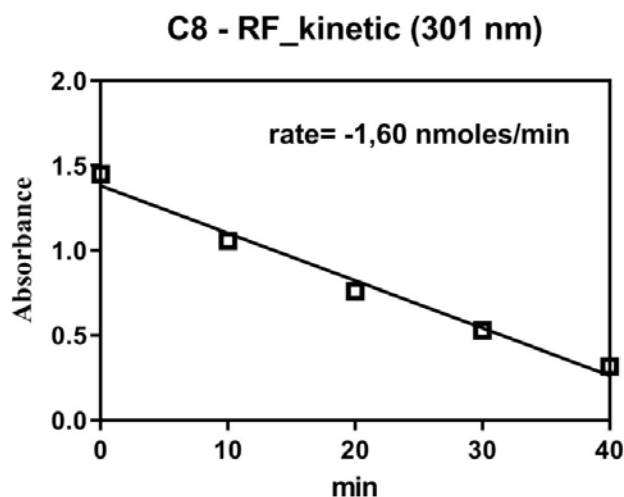
Инкубирането на С8-ксантогената в среда, генерираща супероксиден радикал, води до отчетливо във времето намаляване на интензитета на абсорбцията при 301 nm, без появата на други промени в спектъра (**Фигура 4.10**). Спектралните промени, отразени на фигурата, са след компенсиране на абсорбцията в областта под 280 nm в референтната кювета, поради високата абсорбция на компонентите на средата (метионин и рибофлавин) в тази област на спектъра.



Фигура 4.10. Промени в абсорбционния спектър на С8 (75 μ М) в среда на рибофлави+метионин след различно време на UV облъчване

Хроматографският анализ на пробите показва също отчетливо намаление на количеството на ксантогената в зависимост от времето на инкубиране, без поява в условията на хроматографията на различен разграден продукт (метаболит). Скоростта на метаболизма е от порядъка на $1.54 \mu\text{M}/\text{min}$.

Скоростта на метаболизъм не зависи от началната концентрация на ксантогената (**Фигура 4.11**).



Фигура 4.11. Скорост на метаболизъм на C8 ($100 \mu\text{M}$) в система, генерираща супероксидни радикали

При изследване на скоростта на метаболизиране на различните ксантогенати се вижда, че скоростта не е еднаква при различните производни (**Таблица 4.5**).

Таблица 4.5. Скорост на метаболизиране на ксантогенатите в система, продуцираща супероксидни радикали (рибофлавин+метионин).

Ксантогенат ($100 \mu\text{M}$)	Скорост (nmoles/min)	Линеен корелационен коэффициент (r^2)
C2	-0.644	0.9719
iC3	-1.311	0.9930
2-C4	-1.06	0.9990
C5	-0.828	0.9932
C8	-1.60	0.9985
Cyclo	-1.016	0.9503
TEMPO	-0.695	0.9747
C10	-0.798	0.9869
D609	-0.568	0.8970

Промените, които настъпват в структурата на ксантогената в тази система, съвпадат с промените при метаболизма на ксантогенатите от CYP2B1. При тези условия е доказано, че атаката на супероксидния радикал в активния център на цитохрома води до отделяне на двата протона от първия въглероден атом на ксантогенатната молекула ([Kent et al., 1999](#)). В контекста на търсене на механизмите на селективното метаболизиране на ксантогенатите от едни изоформи на цитохрома (CYP2B1/2B6 и CYP2E1) и липсата на такова от други изоформи, трябва да се отбележи, че в каталитичния цикъл на активиране на кислорода при някои изоформи на цитохром P450 (CYP2E1) се образува преимуществено супероксиден радикал ([Sakai et al., 1992](#)).

4.2 Взаимодействие на ксантогенатите с ензимни и неензимни системи, използващи водороден пероксид

4.2.1 *Метаболизъм на ксантогенати от пероксидаза от хрян (Horse-radish peroxidase, HRP)*

Въведение

Ензимите от системата на CYP450, участващи в многобройни реакции на окисление и окисдиране на различни субстрати изискващи наличието на O₂ и NADPH, са в състояние да катализират и пероксид-зависимо хидроксилиране ([Hollenberg, 1992](#)). При пероксидазите от животински и растителен произход, Fe³⁺ в хема на ензима претърпява двуелектронно окисление до т.нар. *Compound I*, където желязото се окислява до ферил (Fe^{IV}=O) и се съхранява под формата на порфирин в пероксидазата от хрян ([Rodriguez-Lopez et al., 2001](#)). Интерес представлява сравнението на профила на метаболизма на ксантогенатите от двата вида оксидоредуктазни ензими и проследяване на наличието или липсата на промени в ензимната активност при окислението на ксантогенатите от HRP. При проведени предварителни опити в Лабораторията по лекарствена токсикология е било показано, че при използването на водороден пероксид, HRP окислява ксантогенатите до различни метаболити (с абсорбционните максимуми близки до тези на тиосулфонат дитиокарбонатните съединения) от CYP2B1, които не водят до инактивиране на ензима. В дисертацията бяха планирани и проведени допълнителни опити с HRP, целящи изясняване на типа на взаимодействие на ксантогенатите с други субстрати на пероксидазната реакция.

Експериментална процедура

1. *Ефект на С8 върху окислението на ABTS от HRP.* ABTS е пероксидазен субстрат, който при окислението си в присъствие на H_2O_2 в типична пероксидазна реакция, генерира стабилен радикал с характерен абсорбционен спектър и максимум при 414 nm. Реакционната среда съдържа 2 nM HRP, 2.5 mM H_2O_2 и различни количества ABTS в 50 mM натриев фосфотен буфер (pH 7.0) със или без различни концентрации на С8.

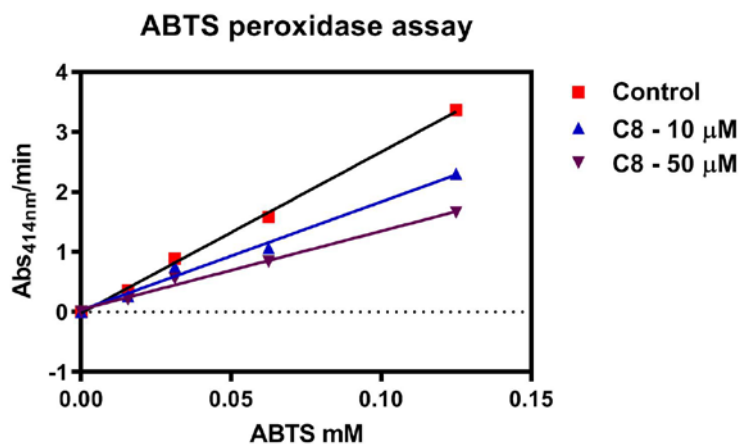
2. *Окисление на о-анизидин от HRP/ H_2O_2 и ефект на С8.*

Два вида експерименти бяха проведени в отсъствие или присъствие на различни концентрации на С8 (от 25 до 250 μ M крайни концентрации): а) различни концентрации на H_2O_2 в присъствието на 0.75 mM о-анизидин и б) различни концентрации на о-анизидин в присъствие на 0.6 mM H_2O_2 .

Резултати

Ефект на С8 върху окислението на ABTS от HRP

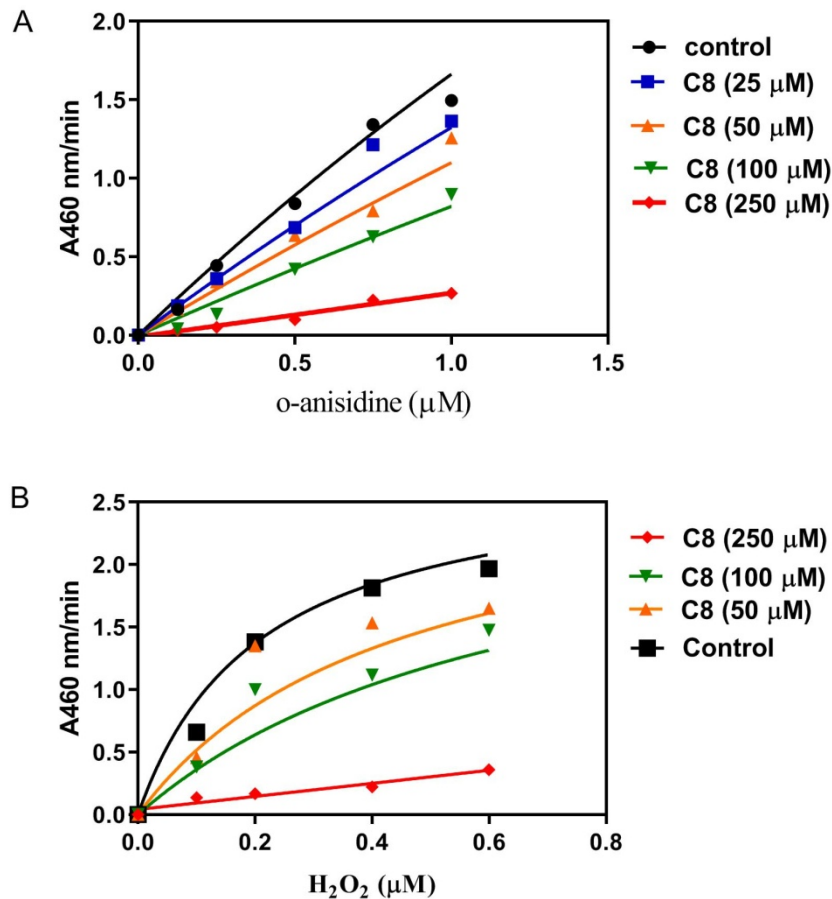
Ксантогенатите, като типични антиоксиданти, намаляват по концентрационно зависим начин скоростта на окислението на ABTS в HRP реакционната среда (Фигура 4.12).



Фигура 4.12. Кинетика на окисление на ABTS от HRP в отсъствие или присъствието на различни концентрации на С8

Окисление на о-анизидин от HRP/ H_2O_2 и ефект на С8

Изследване кинетиката на окислението на о-анизидин от HRP дава възможност да се изследва скоростта на реакцията чрез промени в концентрацията, както на о-анизидина, така и на H_2O_2 .



Фигура 4.13. Ефект на различни концентрации на С8 върху окислението на о-анизидин от HRP: **А)** В присъствие на 0.6 mM H₂O₂; **В)** В присъствие на 0.75 mM о-анизидин

Използването на този подход за изследване на инхибитори на HRP позволява не само да се определи типа на инхибиране, но и да се изчислят инхибиторните константи по отношение, както на о-анизидина, така и на H₂O₂. В това отношение С8 е типичен конкурентен инхибитор на HRP с K_i при субстрат о-анизидина = 110 μM и K_i при субстрат H₂O₂ = 44 μM (Фигура 4.13А и В).

Както беше изтъкнато, съществуват значителни разлики в пътищата на метаболизиране на ксантогенатите от пероксидазните ензими и СYP450. Въпреки че простетичните групи на хемопротеина на СYP450 и на пероксидазата от хрян са идентични, разликите в каталитичните механизми и следователно в различните метаболити на едни и същи субстрати, са резултат от разликите в ензимните протеини около хем активния център (Hollenberg, 1992).

При изследване на кинетиката на инхибиране на катализираната от HRP реакция, както с о-анизидин, така и с H₂O₂, С8 показва подобен ефект на диетидитиокарбамата (DDC), който инхибира по конкурентен начин активността на

HRP по отношение и на двата субстрата ([Martinkova et al., 2012](#)). Разликата между C8 и DDC е, че ксантогенатът показва по-силен инхибиторен ефект върху пероксидазната реакция по отношение на H₂O₂ (K_i=44 μM), отколкото към о-анизидина. Ефектът на C8 е дори по-силен от инхибиращия ефект (K_i=60 μM) на пропил галат, акцептор на радикали, използван като моделен „пероксидазен инхибитор” ([Reddan et al., 2003](#)).

4.2.2 Метаболизиране на ксантогенати от флавинзависими монооксигенази

Въведение

Флавин зависимите монооксигенази (FMO) участват в окислението на редица азот- и сяро-съдържащи съединения ([Cashman and Zhang, 2006](#)). Различията в процесите на активиране на кислорода от двете монооксигенази CYP450 и FMO, представлява интерес за сравняване метаболизма на ксантогенатите, които са и сяросъдържащи съединения, от двете ензимни системи. От друга страна, инхибирането на активността на специфичната флавин-монооксигеназа (EtaA) в *Mycobacterium tuberculosis*, е в основата на антитуберкулозното действие на сяросъдържащия препарат Етионамид (ETH). Това е основание в дисертацията да се изследва взаимодействието и механизма на действие на различни ксантогенати с EtaA в *Mycobacterium tuberculosis*.

Експериментална процедура

Спектрофотометричен анализ

Метаболизмът на различни ксантогенати беше изследван чрез промени в спектралната им характеристика. Концентрираните разтвори на C2, C5 и C8 ксантогенатите бяха направени във вода; C10 и C12 бяха разтворени в DMSO; ETH беше разтворен в ацетонитрил. Крайната концентрация на органичния солвент се поддържаше да бъде под 0.1% (v/v).

Спектралните промени на ксантогенатите и ETH се изследваха след инкубация в 0.1 М фосфатен буфер, рН = 7.4 с 10 mM водороден пероксид или след инкубация с EtaA.

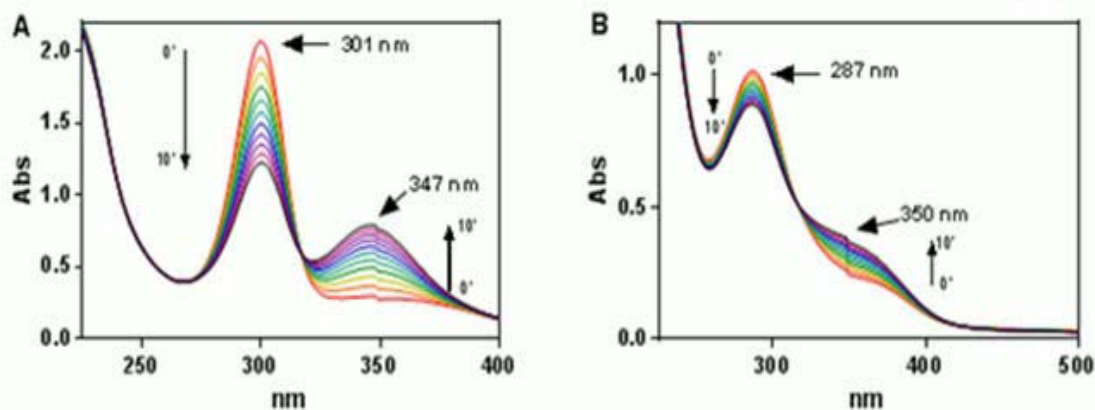
Антимикобактериална активност на ксантогенати и ETH

In vitro антибактериалната активност на C2, C5, C8, D609 и ETH беше определяна спрямо референтния щам *M. tuberculosis* H37Rv. Всяко съединение се тестираше в седем концентрации – 10 μg/mL, 5 μg/mL, 2 μg/mL, 1 μg/mL, 0.5 μg/mL, 0.2 μg/mL и 0.1 μg/mL в DMSO.

Резултати

Окисление на ксантогенатите и ЕТН от водороден пероксид

Водородният пероксид окислява ксантогенатите и ЕТН до един метаболит перксантат или сулфин (λ_{\max} 347 nm) и етионамид-S-оксид (λ_{\max} около 350 nm), съответно (**Фигура 4.14А и В**).



Фигура 4.14. Спектрални промени на **А**) С5-ксантогенат (50 μM) и **В**) ЕТН (200 μM) в 0.1 M фосфатен буфер, рН 7.4, от 10 mM водороден пероксид

Рязкото увеличаване на перксантата с времето, сравнено с това на ЕТН-S-оксида, се дължи не само на по-високия екстинкционен коефициент на първия – $\epsilon = 10400 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ([Hao et al., 2000](#)) спрямо $\epsilon = 6000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ([Vannelli et al., 2002](#)). Скоростта на окисление на С5 от H₂O₂ до неговия метаболит е два пъти по-висока (2.34 nmoles/min) в сравнена с тази на ЕТН (1.0 nmoles/min).

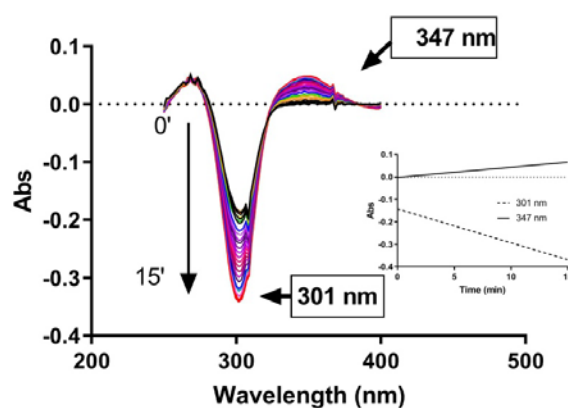
Метаболизъм на ксантогенати от флавинмонооксигеназа от *M. tuberculosis*

Сканираща кинетика. Предварителните изследвания с NADPH генерираща система и EtaA позволи директното определяне на скоростите на образуването на продуктите и намаляване на субстратите. Тези данни са представени за някои ксантогенати на **Таблица 4.6** и илюстрирани на **Фигура 4.15**.

Намаляването на концентрацията на субстрата (намаляване на абсорбцията при 301 nm) и образуването на продукта (увеличаването на абсорбцията при 347 nm) след инкубация с EtaA показва превръщането на субстрата до един единствен метаболит, съответния перксантат.

Таблица 4.6. Метаболизъм на различни ксантогенати (100 μM) от EtaA (400 nM); представени са скоростите на намаляване на субстрата при 301 nm и увеличаване на продукта при 347 nm. Стойностите са средни \pm SD от три различни експерименти.

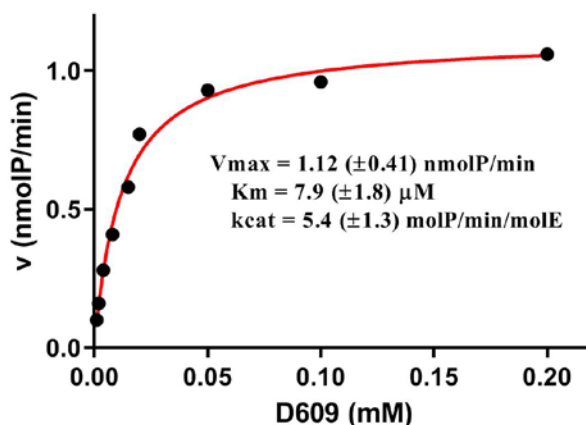
Ксантогенат	V_{301} (nmoles/min)	V_{347} (nmoles/min)
C3	- 1.27 \pm 0.07	0.97 \pm 0.077
2-methyl-C3	- 0.38 \pm 0.06	0.22 \pm 0.012
C4	- 1.57 \pm 0.12	0.93 \pm 0.065
C5	- 1.53 \pm 0.09	0.74 \pm 0.052
C8	- 1.35 \pm 0.08	0.90 \pm 0.072
Cyclo	- 0.8 \pm 0.07	0.71 \pm 0.064
C10	- 2.47 \pm 0.18	0.49 \pm 0.110
C12	- 1.51 \pm 0.10	0.03 \pm 0.007
D609	- 0.89 \pm 0.08	0.58 \pm 0.040



Фигура 4.15. Спектроскопски характеристики на метаболизма на D609 (75 μM) от EtaA измерени за 15 min; **Вътре:** Промени във времето на абсорбцията при 301 (----), и 347 (—) nm

Steady-State кинетика. Зависимостта на скоростта на окисление от субстратната концентрация на C8 и D609 от EtaA следва модела на Michaelis-Menten. На **Фигура 4.18** са представени резултатите от опитите с D609, линията от

удолетворяване на модела и изчислените кинетични стойности въз основа на модела. Максималната скорост на окисление на D609 от EtaA е практически същата, получена от други автори за окислението на ЕТН ($V_{\max}=1.46$ nmol P/min и 7.73 mol P/min/mol E, съответно). Важно е да се отбележи, че стойностите за k_{cat} за окисление на повечето субстрати от EtaA са практически едни и същи. Това се дължи на факта, че лимитиращото скоростта звено в каталитичния цикъл на FMO е отделянето на водата от ензима с придружаващо дехидриране на С4а-флавин хидроксида ([Beaty and Ballou, 1981](#)).



Фигура 4.16. Steady-state кинетика на окисление на D609 от EtaA. Линията е прекарана след прилагане на нелинейна регресия на най-добро съвпадение ($r^2=0.9898$). Параметрите на Michaelis-Menten са представени като средни \pm SD от три различни експеримента

Стойностите на K_m за D609 показват, че той е със значително по-голям афинитет за EtaA от ЕТН ($K_m=7.9$ μM спрямо 194 μM , съответно) ([Vannelli et al., 2002](#)). Определящ фактор е нуклеофилността на сярния атом ([Poulsen and Ziegler, 1995](#)), която при всички изследвани ксантогенати е значително по-висока от тази на ЕТН. По-високата реактивност на ксантогенатите е в съгласие също и с по-високата скорост на окисление от водородния пероксид.

Резултатите показват, че скоростта на S-окислението нараства с увеличаването на броя на въглеродните атоми в алкилната верига на ксантогенатите при инкубацията с EtaA. Двата ксантогената с най-дълги алкилни вериги (C10 и C12), които не са разтворими във вода (концентрираните разтвори са пригответи с DMSO) се окисляват от EtaA сравнително по-бавно от съответните водноразтворими ксантогенати, независимо, че концентрацията на DMSO в пробите е ниска (по-малка от 1%).

Антимикобактериална активност на различните ксантогенати и ЕТН

Резултатите от антимикобактериалната активност на ксантогенатите сравнени с тази на ЕТН са представени на **Таблица 4.7**.

Ксантогенатите с къси до средно дълги алкилни заместители имат стойности за МІС десет пъти по-малка от тази на ЕТН, докато тази на D609, с цикличен заместител, е сравнима с тази на ЕТН.

Като цяло, някои от тестираните аналози в това изследване показват умерена стапен на бактериостатична антимикобактериална активност, в повечето случаи сравнима или по-висока от тази на референтния лекарствен препарат Етамбутол ([Jadaun et al., 2007](#)).

Таблица 4.7. Антимикобактериална активност на ксантогенати и ЕТН измерена по пропорционалния метод

Съединение	МІС (μМ)
С2 - ксантогенат	1.25
С5 - ксантогенат	0.99
С8 - ксантогенат	2.05
D609	18.8
Етионамид	12.0

Получените резултати показват, че ксантогенатите се окисляват от EtaA до съответните перксантати или сулфини, които имат максимум на абсорбция при 347 nm. Изчислените кинетични параметри на образуване на тези метаболити са значително по-високи от тези на окисление на ЕТН от същия ензим.

4.2.3 Взаимодействие на ксантогенати с водороден пероксид

Въведение

Взаимодействието на ксантогенатите с водородния пероксид е добре известно и е главна цел на многобройни изследвания за химическите и физикохимическите промени в структурата им в процеса на флотацията на тежки метали (предимно мед), в които процеси използването на ксантогенатите като хелиращи агенти е все

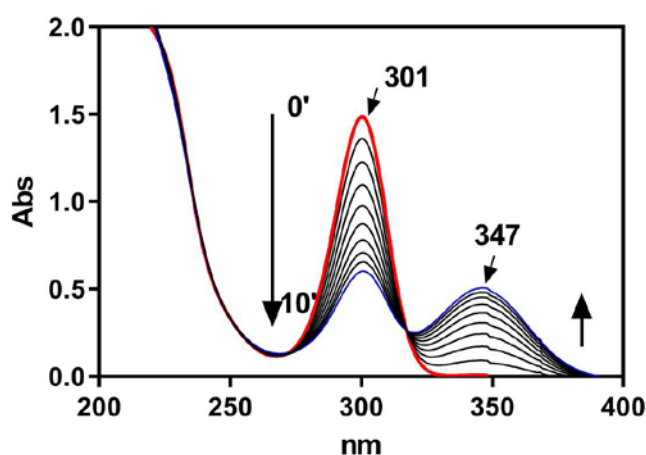
още актуално, но все още има някои неизяснени детайли особено за това взаимодействие в биологични среди.

Експериментална постановка

В настоящите опити, промените в спектъра на ксантогенатите са изследвани в буферирана среда с рН 7.4, т.е. може да се предположи, че рН не се променя по време на реакцията.

Резултати

Ксантогенатите се окисляват сравнително бързо под действието на водороден пероксид до един метаболит (**Фигура 4.17**), който се установява чрез нарастване на абсорбционен пик при 347 nm и наличието на изосбестна точка в спектъра при 321 nm, а така също и в появата на само един хроматографски пик с абсорбционна характеристика на перксантат.



Фигура 4.17. Промени в спектъра на C8 (75 μM в 0.1M фосфатен буфер, рН 7.4) след инкубиране с 10 mM H_2O_2

Получените перксантати от различните ксантогенатни производни са с един и същ екстинкционен коефициент ([Jones and Woodcock, 1979](#)).

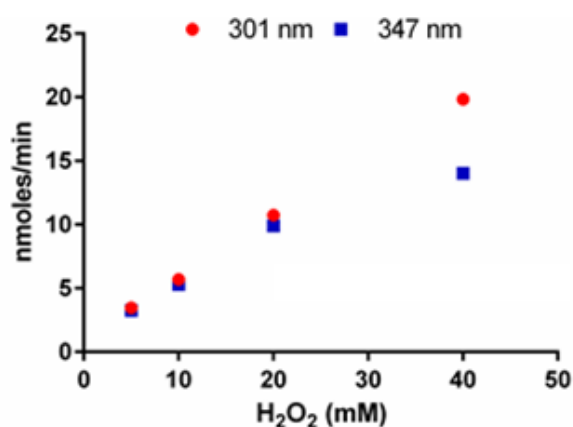
На **Таблица 4.8** и **Фигура 4.18** са обобщени резултатите за скоростта на окисление на различните ксантогенати от водороден пероксид в зависимост от структурата на ксантогената или концентрацията на водородния пероксид.

Получените резултати показват, че скоростта на окисление на ксантогенатите до перксантат зависи от структурата на ксантогената и концентрацията на водородния пероксид.

Таблица 4.8. Начална скорост на метаболизиране на различни ксантогенати до перксантати в присъствие на 10 mM H₂O₂

Ксантогенат (nmoles)	347 nm (nmoles/min)	301 nm (nmoles/min)
C1 (50)	3.02	-4.94
C2 (40)	2.98	-4.34
C3 (50)	3.12	-4.60
iC3 (50)	3.48	-4.85
C4 (50)	3.24	-4.69
2-C4 (50)	3.70	-5.17
Allyl (50)	1.65	-4.28
C5 (50)	2.34	-4.24
C8 (50)	2.64	-4.03
TEMPO (50)	2.16	-3.06
D609 (50)	3.17	-4.58
Cyclo (100)	4.13	-9.51
Choline (140)	2.74	-5.50
C10 (50)	3.22	-10.3
C12 (40)	2.69	-5.76
C14 (50)	2.98	-5.55
C16 (40)	2.95	-6.00
C18 (50)	2.93	-5.81

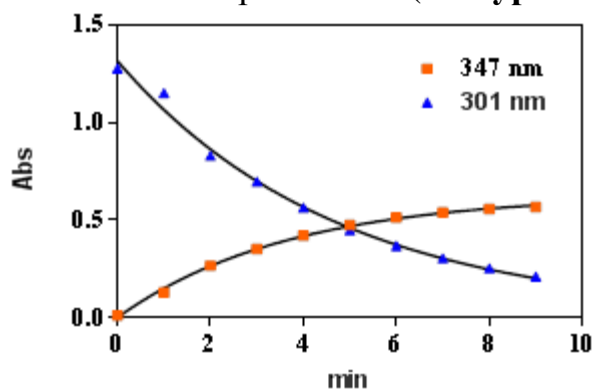
Изчислените скоростни константи за окислението на ксантогените, чрез проследяване намаляването на абсорбцията при 301 nm, са значително по-големи при ксантогенатите с ароматна структура (цикло, холин) или с по-дълга алкилна верига (C10 - C18).



Фигура 4.18. Начални скорости на метаболизъм на C8 (100 μM) в зависимост от концентрацията на водородния пероксид (скоростта при 301 nm е показана за прегледност в абсолютни стойности)

Тези резултати са в съгласие с данните на Hao et al. ([Hao et al., 2000](#); [Silvester et al., 2002](#)) и Nava-Alonso et al. ([Nava-Alonso et al., 2002](#)). Препоръчителната концентрация на H₂O₂ спрямо концентрацията на ксантогената трябва да бъде 8 пъти по-голяма, ако се цели пълното му окисление в разтвора до 4 часа. В нашите опити използвахме съотношение далече по-голямо от препоръчителното. Въпреки това, началната скорост на метаболизъм нарастваше линейно до 20 mM водороден пероксид, след което скоростта на образуване на перксантата беше по-ниска от очакваната при линейна зависимост.

Важно е да се отбележи, че промените във времето в структурата на ксантогенатите под действие на водороден пероксид е линейно само в началото на реакцията. Реакцията е линейна по-дълго време само при ниски концентрации на пероксида. При по-високи концентрации, тя бързо добива характера на моноекспоненциална крива за намаление на основната структура при 301 nm и съответно увеличение за метаболита при 347 nm (**Фигура 4.19**).



Фигура 1.19. Нелинеен характер на промените в структурата на С8 (100 μM) във времето при висока концентрация на водороден пероксид (20 mM)

4.3 Взаимодействие на ксантогенатите с неензимни системи генериращи хидроксилен радикал

Въведение

Желязо-зависимото (Fe²⁺) разлагане на водородния пероксид до хидроксилни радикали, известно в неорганичната химия като Фентонова реакция, е от важно значение за редица физиологични и патологични процеси. Това се обуславя от голямата реактивоспособността на хидроксилния радикал и съответно извънредно краткия му полуживот. Най-общо Фентонова реакция изглежда така:



При наличие на редуциращ агент (аскорбат) в реакционната среда, фери йоните непрекъснато се редуцират до феро йони и реакцията добива цикличен характер.

Много често Fe-зависими ензими, като СУР450, освобождават микроколичества свободно желязо и се създават условия за генериране на хидроксилни радикали. Хелирането на желязото би повлияло драстично на скоростта на образуване на радикалите в зависимост от афинитета на хелатора към феро- и фери-йоните. Хелатори с висок афинитет към феро йоните инхибират Фентоновата реакция. Обратно, хелатори с по-висок афинитет към фери йоните, потенцират реакцията. Fe-EDTA хелаторният комплекс е с нисък редокс потенциал ($\log K_{(\text{Fe}^{\text{II}})}=14,2$, $\log K_{(\text{Fe}^{\text{III}})}=25$, K-афинитетна константа). При наличието на такъв комплекс в системата за протичане на Фентоновата реакция, се улеснява окислението на Fe(II) до Fe(III), при което като окислител действа наличния в системата H_2O_2 .

Изследването на промените в структурата на ксантогенатите при реакциите им с хидроксилни радикали, има важно значение не само за изясняване на механизмите на взаимодействието им с различните активни форми на кислорода, но и за определяне дали хелаторната им активност към различни метали би обяснило многообразните им биологични ефекти в условия *in vivo*. За целта се проведеха експерименти във Фентонова среда с или без EDTA, като се проследяваше метаболизма на С8 с или без конкурентен субстрат дезоксирибоза (DR).

Резултати

Проследяването на метаболизма на С8 бе осъществено в различни системи, в които в една или друга степен протича Фентонова реакция. Те могат да бъдат групирани при следните условия:

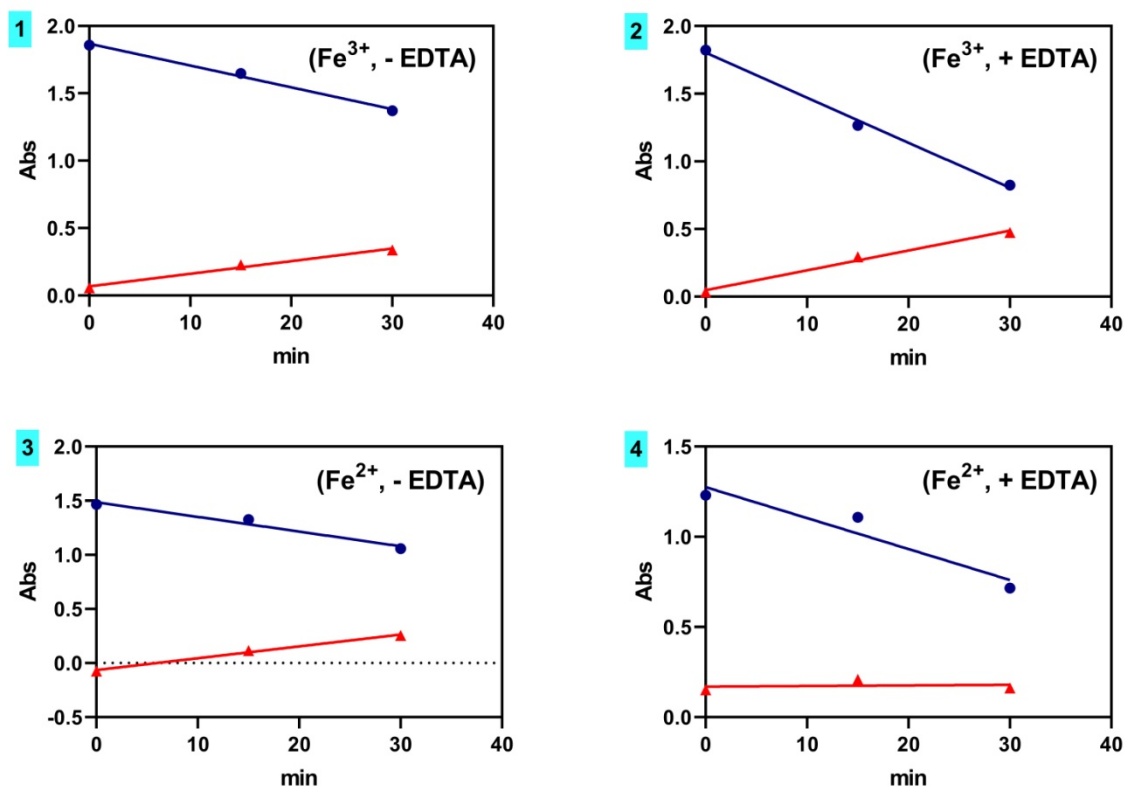
Проба 1: фери йони, аскорбат, -EDTA

Проба 2: фери йони, аскорбат, +EDTA

Проба 3: феро йони, -EDTA

Проба 4: феро йони, +EDTA

Опитите са проведени най-малко след 5 повторения, като на **Фигура 4.20** са проследени най-характерните промени в абсорбцията във времето, а на **Таблица 4.9** са представени скоростните константи на тези промени в структурата на С8 при посочените различни условия.



Фигура 4.20. Промени в абсорбцията при 301 nm (●—) и 347 nm (▲—) след инкубацията на С8 (100 μ M) при условията на проби 1 до 4.

Таблица 4.9. Скорост на метаболизиране на С8 при различни условия на Фентонова реакция

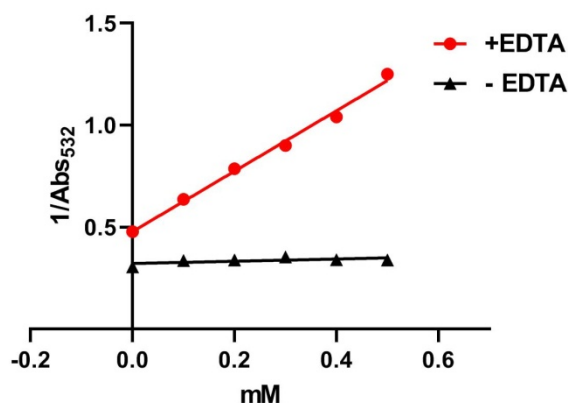
	301 nm (nmoles/min)	347 nm (nmoles/min)
Проба 1	- 0.919 \pm 0.07	0.899 \pm 0.72
Проба 2	- 1.89 \pm 0.12	1.41 \pm 0.15
Проба 3	- 0.769 \pm 0.14	1.05 \pm 0.09
Проба 4	- 0.975 \pm 0.29	0.031 \pm 0.19

В така подобрите експериментални условия ясно личи, че октилксантогенатът се метаболизира с малки разлика в скоростта (намаление на абсорбцията при 301 nm), независимо дали реакцията се стартира директно с Fe^{2+} , или при която Fe^{3+} се редуцира до Fe^{2+} от аскорбата. При това спектроскопски това се проявява с появата на абсорбционен пик при 347 nm, което показва, че се извършва окисление на единия S-атом до перксантат от наличния в средата водороден пероксид. В условията на високо ниво на продукция на хидроксилни

радикали (**проба 4**) спектроскопските данни говорят за метаболизиране на ксантогената основно до метаболити без спектроскопска характеристика и незначително количество перксантат.

Окислението на **дезоксирибозата (DR)** до TBARP в среда на генериране на хидроксилни радикали е широко използван метод за определяне на антиоксидантните свойства на различни съединения. В отсъствие на екзогенен хелатор желязото се асоциира с дезоксирибозата и Фентонова реакция протича върху повърхността на въглехидрата. При наличие на хелатор (EDTA) в системата, $\cdot\text{OH}$ радикали се генерират в целия обем на разтвора.

Проследяване на промените в количеството на DR ($1/\text{Abs}_{532}$) след съвместното инкубиране с различни количества С8 (0.1 до 0.5 mM) при различни условия на генериране на хидроксилни радикали (със или без EDTA в средата) ни дава възможност да определим характера на това взаимодействие (**Фигура 4.21**).



Фигура 4.21. Разграждане на DR за 30 мин при условията на проби 3 и 4 в присъствието на различни концентрации на С8.

При отсъствие на хелатор (**проба 3**), степента на инхибиране на разграждането на дезоксирибозата от С8 е много слабо и не зависи от концентрацията му. Този факт може да се обясни от една страна с известно намаляване на концентрацията на водородния пероксид, а от друга и със способността на ксантогената да отнема и свързва желязните йони от повърхността на въглехидрата. От многобройните данни за химията и физикохимията на ксантогенатите е известно, че хелиращата им способност е силно рН-зависима. Тя е максимална при рН около 3.0, т.е. далеч от физиологичното рН ([Ortiz de Montellano, 2002](#)). При това в тези условия, те имат по-голям афинитет за свързване с феро отколкото с феро йони.

В условията на **проба 4** инхибирането на разграждането на дезоксирибозата се дължи на конкуренция на С8 за образуваните хидроксилни радикали, при което ксантогенатът се метаболизира до все още неизвестни метаболити. С това той се проявява като силен “scavenger”. Зависимостта на степента на подтискане на разграждането на DR от С8 концентрацията е линейна и позволява изчисляването на скоростната константа на взаимодействие на С8 с $\cdot\text{OH}$ радикали. Тя е от порядъка на $k = 1.48 (1.3 - 1.65) \times 10^9 \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$, сравнима с данните за много известни “scavengers”, като манитол и етанол ([Halliwell et al., 1987](#)).

От получените резултати става ясно, че конкуренцията от страна на ксантогенатите за взаимодействие с $\cdot\text{OH}$ радикали преобладава над способността им за хелиране на желязото.

4.4 Изследване на механизма на антиоксидантното действие на ксантогенатите

4.4.1 Взаимодействие на ксантогенати със стабилния радикал DPPH

Експериментална процедура

Тестът се извършва въз основа на процедурата описана от Molyneux et al. ([Molyneux, 2004](#)).

DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (α, α -diphenyl- β -picrylhydrazyl)) е стабилен радикал, който разтворен в метанол придава на разтвора виолетово оцветяване с абсорбционен пик около 515 nm. Когато към разтвора на DPPH радикала се добави реагент, който може да отдаде протон, това води до образуване на редуцирана форма на DPPH с преминаване на виолетовия цвят до бледо жълт цвят. Бяха изследвани С8 (100 μM), аскорбат (25 μM) и Trolox (50 μM) при 20°C след 30 min инкубация (до достигане на равновесие).

Резултати

DPPH антирадикална активност на ксантогенати

За оценка на антирадикалната активност на С8 се изчислиха различни параметри по процедурата описана от Sanchez-Moreno et al. ([Sánchez-Moreno et al., 1998](#)):

1. Реакционната кинетика на ксантогенатите с DPPH \cdot се регистрира за всяка тествана концентрация (**Фигура 4.22**). На графиката по оста Y се нанася

процента на остатъчния DPPH• в условие на равновесие (DPPH• rem), който се определя като %: $\text{DPPH}\bullet \text{ rem} = (A_x/A_0) \times 100$, където A_0 и A_x отговарят на абсорбцията на радикала при 515 nm в началото на реакцията и при достигане на равновесие, съответно. Времето за достигане на равновесие (означено по оста X) се използва за да се удостовери, че реакцията не продължава повече.

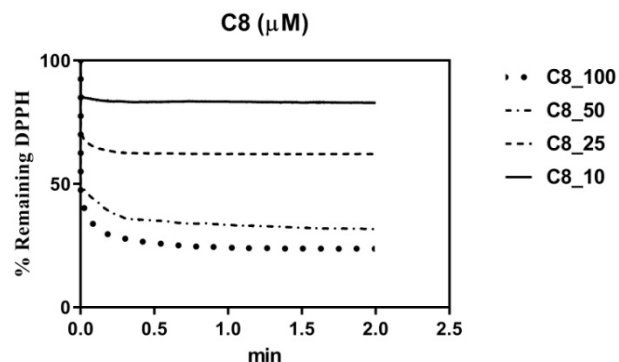
2. Процентът на остатъчния DPPH• в края на реакцията се отнасят към различните концентрации на ксантогената в реакционната среда, за да се определи EC_{50} (след прилагане на принципите на линейната регресия), дефинираща количеството на антиоксиданта необходимо за намаляване на началната DPPH• концентрация с 50% - EC_{50} (**Фигура 4.23a**).
3. За по-голяма яснота се въвежда понятието **антирадикална мощ (ARP)**, която се изчислява като $1/\text{EC}_{50}$. Колкото по-голяма е стойността на ARP, толкова по-мощен е антиоксиданта.
4. Времето за достигане на равновесие при концентрация равна на EC_{50} (**TEC₅₀**) също така се изчислява графично след прилагане на принципите на линейната регресия (**Фигура 4.23b**).
5. Антирадикалната ефикасност (**АЕ**), която е комбинация от тези два фактора, се определя като:

$$\text{AE} = 1/(\text{EC}_{50} \times \text{TEC}_{50})$$

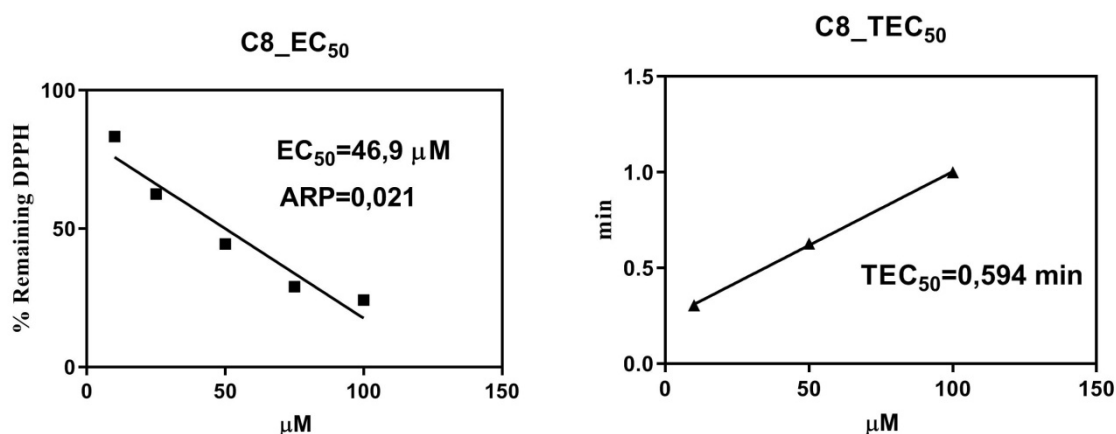
6. Общата стехиометрия на реакцията дефинира броя на редуцираните DPPH• молекули от съответния брой молекули на антиоксиданта и се изчислява по формулата ([Villano et al., 2007](#)):

$$n_{\text{total}} = \frac{A_0 - A_x}{\epsilon} c_0 l$$

където c_0 е началната концентрация на антиоксиданта (M); A_0 е абсорбцията при 515 nm на радикала при $t = 0$; A_x е абсорбцията при 515 nm на радикала при равновесие; ϵ е моларният екстинкционен коефициент на DPPH• радикал ($\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$) и l е оптичният път на кюветата (cm). В метанол $\epsilon = 11563 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$.



Фигура 4.22. Промени на концентрацията на DPPH под въздействие на различни концентрации на C8 до достигане на равновесие



Фигура 4.23. Определяне на стойностите на **EC₅₀**, **ARP** (a) и **TEC₅₀** (b) за C8

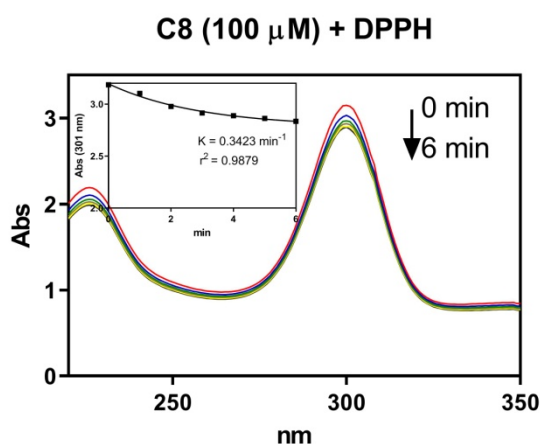
Таблица 4.10. DPPH антирадикална активност на различни ксантогенати

параметър ксантогенат	EC ₅₀ (µM)	ARP	TEC ₅₀ (min)	AE (x10 ⁻³)	Обща стехиометрия (n _{total})
C2	54.80	0.018	1.009	18.08	3.70
C5	46.50	0.021	1.267	16.97	1.29
C8	46.90	0.021	0.594	35.90	3.97
C10	42.69	0.023	1.655	14.15	1.39
Trolox	11.90	0.080	1.926	43.63	1.71

Промени в абсорбционния спектър на ксантогенатите по време на взаимодействието с DPPH

Антиоксидантното действие на ксантогенатите спрямо DPPH радикала е придружено с промени в техните абсорбционни характеристики. На **Фигура 4.24** са показани промените в спектъра на C8 (100 µM) след старта на реакцията с DPPH. Експонентциалното намаляване на абсорбцията при 301 nm (и 226 nm) със

скоростна константа около 0.3423 min^{-1} предполага промяна в структурата на ксантогената, вероятно дължаща се на отнемане на един или два водородни атома.



Фигура 4.24. Промени в спектъра на C8 след взаимодействие с DPPH

Анализът на тези резултати показват, че изследваните ксантогенати са съединения с висока антиоксидантна ефективност (АЕ) сравнена с тази на Trolox. Тази антиоксидантна ефективност е от типа „скавенджери“ на радикали (с капацитет да отдават H) (**Таблица 4.10**). Дори най-мощният от тях C8 достига до равновесие 4 пъти по-бързо от Trolox. Водородният атом отделен от молекулата на ксантогената е вероятно този при α въглеродния атом на алкилната верига, за който е доказано, че е най-вероятното място за метаболитна атака ([Lesigiarska et al., 2002](#)) и за образуване на реактивни метаболити с последващо селективно инактивиране на CYP2B1/2B6 от типа „субстрати самоубийци“ ([Yanev et al., 1999b](#)).

4.4.2 Взаимодействие на ксантогенати с DTNB

DTNB (дителиобис-нитро-бензоена киселина) е широко използван реагент за определяне на тиолови групи. DTNB беше използван при тези опити за определяне на реактивността на тиоловите групи при различните ксантогенати, преди и след окислението им с H_2O_2 .

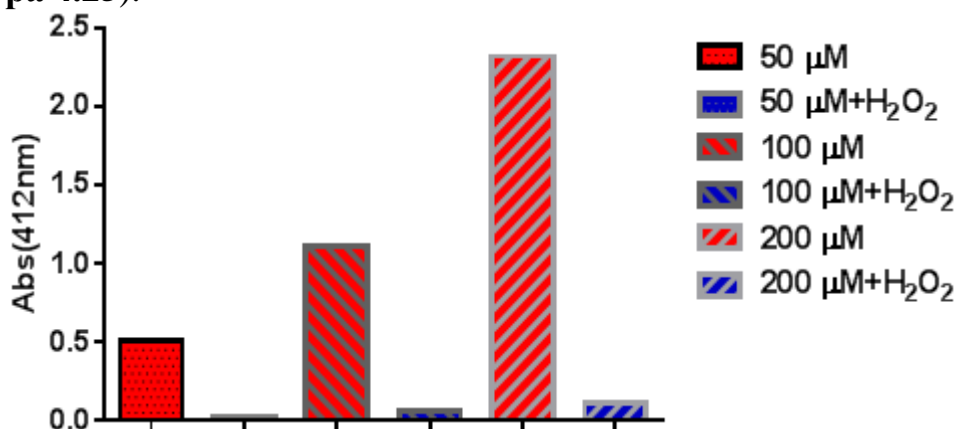
Експериментална процедура

Глутатион (GSH), натриев дитиокарбамат (DDC) и някои моно- и ди-тиолови съединения като Unithiol (2,3-Димеркапто-1-пропансулфонова киселина) и Penicillamine като 0.5 mM разтвори в PBS, бяха тествани за взаимодействие с DTNB като положителни контроли.

Резултати

Всички представени резултати са средни стойности от най-малко 3 повторения.

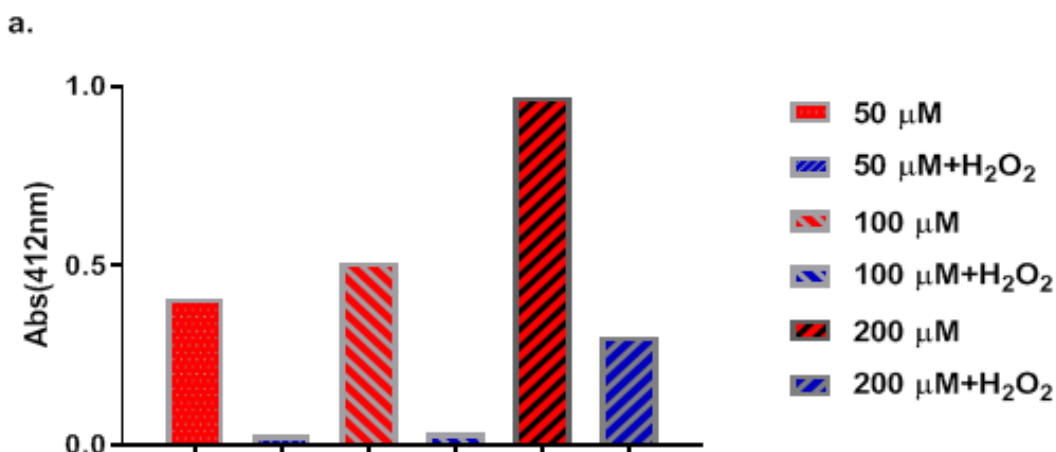
Тиоловата група на GSH реагира с DTNB. Окислението на GSH до GSSG от H_2O_2 води до загуба на тиоловите групи и съответно до отсъствие на реакция с DTNB (Фигура 4.25).

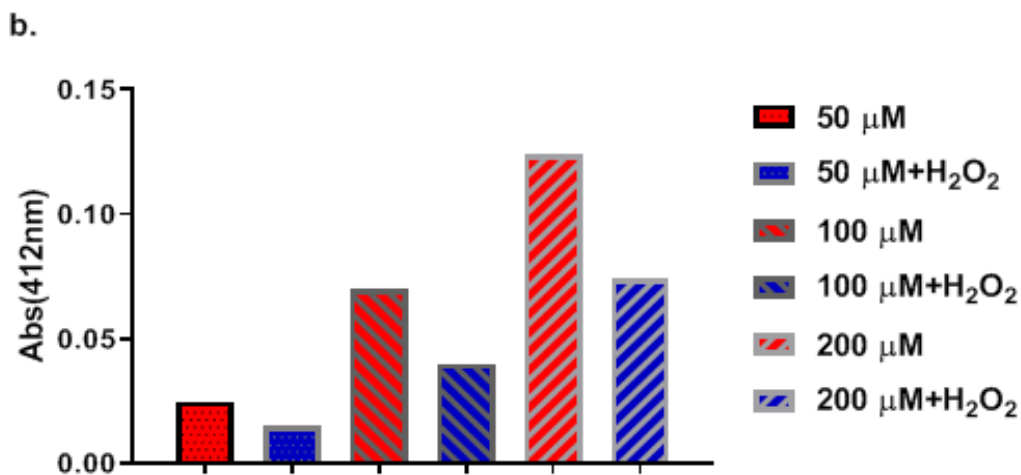


Фигура 4.25. Взаимодействие на GSH (в концентрации 50, 100 и 200 μM) с DTNB в отсъствие или присъствие на H_2O_2 (200 μM)

Някои други моно- и ди-тиолови съединения, като Penicillamine и Unithiol реагират с DTNB и H_2O_2 по подобен начин както GSH. Трябва да се отбележи, че реактивността на монотиоловите съединения (GSH и Penicillamine) с DTNB е почти два пъти по-висока от тази с Unithiol, съединение с две сулфхидрилни групи.

Двете съединения етилдитиокарбонат (C2-ксантогенат) и диетилдитиокарбамат (DDC) реагират в твърде различна степен с DTNB (Фигура 4.26A и B). Те се различават значително и по отношение на степента на окисление с H_2O_2 . DDC отчетливо се окислява до Disulfiram ([Mankhetkorn et al., 1994](#)), докато C2-ксантогената слабо се метаболизира до перксантат или сулфин ([Silvester et al., 2002](#)).





Фигура 4.26 А. Взаимодействие на DDC (в концентрации 50, 100 и 200 μM) с DTNB в отсъствие или присъствие на H_2O_2 (200 μM); **В.** Взаимодействие на C2 (в концентрации 50, 100 и 200 μM) с DTNB в отсъствие или присъствие на H_2O_2 (200 μM)

Разкъсването на дисулфидната връзка в DTNB с образуване на жълто оцветения 2-нитро-5-тиобензоат дианион се реализира в различна степен от различните ксантогенати (**Таблица 4.11**).

Таблица 4.11. DTNB реактивност на различни ксантогенати (200 μM) преди или след инкубация за 5 min с H_2O_2 (200 μM) на стайна температура

Съединение	-H ₂ O ₂ (A ₄₁₂)	+ H ₂ O ₂ (A ₄₁₂)	+ H ₂ O ₂ /- H ₂ O ₂ (%)
C1	0.253	0.154	60
C2	0.124	0.074	59
C3	0.464	0.299	64
i-C3	0.536	0.311	58
C4	0.483	0.298	61
2-C4	0.462	0.245	53
C5	0.278	0.158	57
C8	0.583	0.309	53
Allyl	0.31	0.191	61
D609	0.501	0.260	51
Cyclo	0.563	0.343	60
GSH	2.322	0.116	4.9

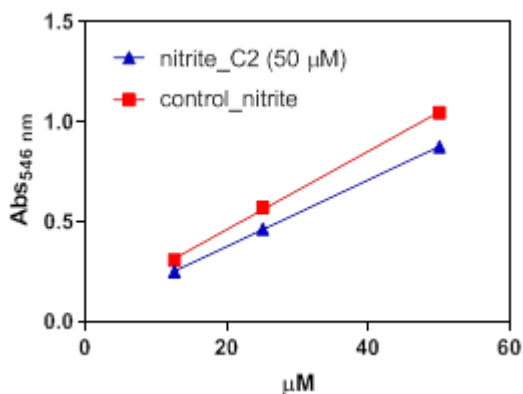
Разкъсването на дисулфидната връзка в DTNB от различните ксантогенати е значително по-неефективно от това на монотиоловите съединения (GSH и Penicillamine). Това се дължи на факта, че сулфхидрилната група в монотиоловите съединения значително се отличава в своите химически отнасяния от дитиоловата група в дитиокарбонатите и дитиокарбаматите, доказано в редица сравнителни експерименти. Така например Unithiol е съединение с две сулфхидрилни групи, но в сравнение с ксантогенатите няма никакъв ефект върху метаболизма на ксенобиотиците ([Yanev et al., 1982a](#)). Степента на окисление на различните ксантогенати от H_2O_2 е практически една и съща - около 50%, в сравнение с окислението на GSH (близо 95%). В клетката GSH се окислява до GSSG и се редуцира обратно до GSH чрез глутатион редуктаза и NADPH и така упражнява своето антиоксидантно действие. Ксантогенатите се окисляват от H_2O_2 до S-оксиди (перксантати), а не до диксантогенати ([Hao et al., 2000](#)). Окислението е придружено с намаляване на абсорбционния пик при 301 nm и появата на характерен пик при 346-347 nm. Подобни промени в абсорбционния спектър на D609 след въздействие с H_2O_2 е показано и от Lauderback et al. ([Lauderback et al., 2003](#)). Тези автори правят погрешното заключение, че това е спектърът на диксантогената и че антиоксидантното действие на ксантогенатите е „глутатион-миметично”. Обратното редуциране до основното съединение на окисления D609 от глутатион редуктаза и NADPH в същата публикация, и използвано от авторите като аргумент, че окисленият продукт на ксантогената е подобен на GSSG, е било наблюдавано също при други сяро съдържащи съединения (сулфини) ([Qian and Ortiz de Montellano, 2006](#)). Това е в съгласие с нашите данни за естеството на метаболитното окисление на различните ксантогенати до съответните перксантати от H_2O_2 .

4.5 Взаимодействие на ксантогенатите със системи, генериращи азотен оксид (NO)

Резултати

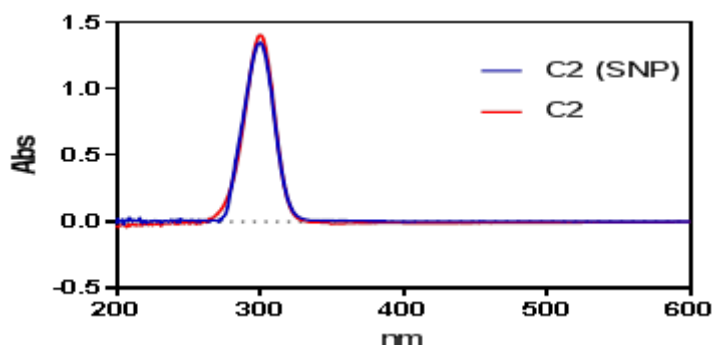
Един от първите експерименти имаше за цел да провери дали ксантогенатите не реагират с компонентите на реагента на Griess, тъй като по този начин биха могли да компрометират анализа на резултатите, т.е дали се дължат на промени в скоростта на отделяне на NO или в количеството на образувания нитрит. Sun et al. са наблюдавали, че пикът на ксантогенатите при 226 nm намалява при наличие в средата на натриев нитрат ([Sun and Forsling, 1997](#)). В условията на нашите експерименти е малко вероятно образуваният нитрит да се окисли до нитрат.

На **Фигура 4.27** са показани резултатите от тестване на промените в калибровъчната крива за определяне на нитрит с реагента на Griess в присъствие и отсъствие на C2. Присъствието на C2-ксантогенат в средата понижава макар и слабо отчетените стойности за концентрацията на нитрит.



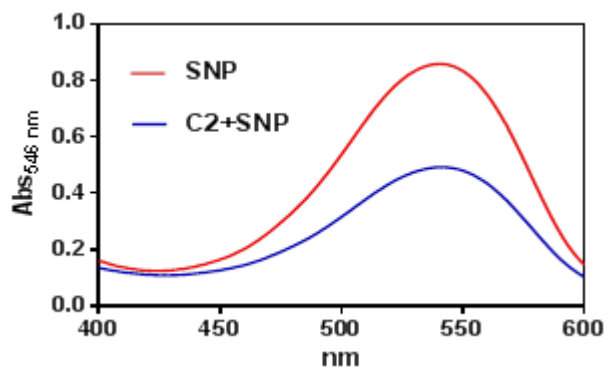
Фигура 4.27. Калибровъчна крива за нитрит с реагента на Griess, в присъствие и отсъствие на C2

След 45 min инкубация на C2 (100 μM) в буфер с SNP (2 mM) не се наблюдава намаляване на концентрацията на C2 (**Фигура 4.28**).



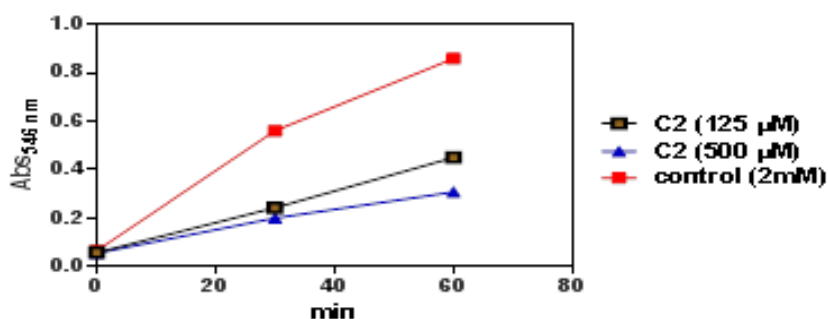
Фигура 4.28. Спектър на C2 преди и след 45 min инкубация с SNP

В същото време след 60 минутна инкубация същата концентрация на C2 с SNP води до значително намаляване на концентрацията на образувания нитрит в средата проследено с промяна на абсорбцията при 546 nm (**Фигура 4.29**).



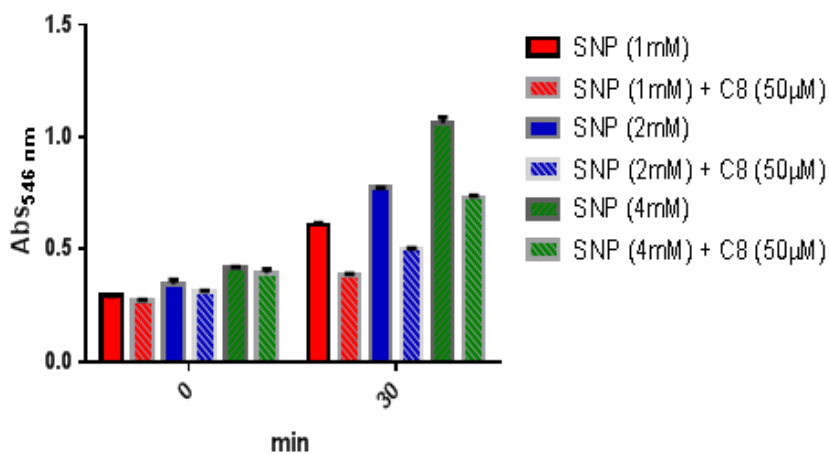
Фигура 4.29. Промени в концентрацията на нитрит след инкубация с C2

Намалението на концентрацията на нитрит след инкубацията с C2 е време и концентрационно зависимо (**Фигура 4.30**).



Фигура 4.30. Образуването на нитрит след инкубация с C2 в зависимост от времето и концентрацията

Количеството на отделения NO зависи от началната концентрация на SNP и времето на отчитане. То е най-голямо при 4 mM SNP и време на инкубация най-малко 30 минути. Ефектът на C8 върху отделянето на NO зависи в еднакъв процент от концентрацията на NO (**Фигура 4.31**).



Фигура 4.31. Ефект на C8 върху отделяне на NO от SNP след 30 min инкубация

Експериментите за изследване на антиоксидантното действие на ксантогенатите чрез взаимодействие с NO, като един от възможните радикали образуващи се в биологичните среди, срещна обясними трудности. Това на първо място се дължи на използването на моделна химическа система на образуване на NO, която е далече от тези в биологична среда. При модела на спонтанно отделяне на NO при разтваряне на SNP беше установено, че ксантогенатите влияят количествено на този процес. На базата на този експеримент, обаче, не може да се определи по какъв механизъм става това. За разлика от антиоксидантното действие на ксантогенатите при теста с DPPH, където се наблюдаваше промяна в структурата на ксантогената, при взаимодействието на ксантогенатите с NO не се регистрира такава промяна. От друга страна има значителен брой изследвания, които показват, че ксантогенатите повлияват синтеза на азотния оксид в различни биологични обекти ([Perluigi et al., 2006](#)).

5. ОБЩА ДИСКУСИЯ

1. Метаболизъм на ксантогенатите до реактивни метаболити от CYP1B1/1B6 и CYP2E1.

Като ензим, използващ кислорода за осъществяване на биологично окисление, CYP450 е един от потенциалните източници на реактивни форми на кислорода (ROS) в клетката ([Bondy and Naderi, 1994](#); [Paolini et al., 2001](#); [Dostalek et al., 2008](#)). Различните форми на CYP450 се различават по специфичността на метаболизиране на различни субстрати (различна стерео- и региоселективност). Можем само да спекулираме, че една от причините за разликата в метаболизма на ксантатите от различните форми на CYP450 могат да се дължат на различни начини на хелиране на желязото в тези изоформи. Това от своя страна може да доведе до различна степен на декупелуване (разспрягане) на ROS от някои изоформи (CYP2B1/2B6 и CYP2E1), способстващи за образуването на реактивни метаболити на ксантатите, инактивиращи ензима по механизма на субстратите „самоубийци”. Те действат по радикалов механизъм, алкилирайки хема или апопротеина.

В каталитичния цикъл на CYP450 се преминава през два интермедиата с радикалова природа – фери-супероксиден комплекс, който се получава след първата едно-електронна редукция и свързването на кислородната молекула и оксо-ферил порфириновия радикал, който се приема като основен окислител в CYP-катализираните реакции. Необходими условия за опитното възпроизвеждане на тази

реакция е оптималното реконструиране на системата във фосфолипидна среда, с участието на източник на редуциращи еквиваленти (NADPH) и NADPH-зависима CYP450 редуктаза (cytochrome P450 reductase, CPR) в количествено съотношение 1:3 спрямо CYP450 ([Morehouse and Aust, 1988](#)).

В настоящите изследвания за първи път се описва и анализира спектроскопската и хроматографска картина на получаване на един и същ метаболит на ксантогенатите от CYP2B1 и химическа система, продуцираща супероксиден радикал.

От сравнението на резултатите получени при метаболизма на ксантогенатите от CYP450 и пероксидазата, ензим чийто механизъм на катализа включва като ключов окислител-интермедиент оксо-ферил порфириновия радикал, може да се направи заключението, че в окислението на ксантогенатите от двата вида ензими участват различни междинни комплекси с кислорода. Получените резултати от метаболизма на ксантогенатите в системата за продукция на супероксидни радикали, показват че ксантогенатите участват в реакция със супероксидния анион. Подобно на метаболизма, осъществяван от CYP450, крайните продукти на окисление не са окислени продукти на сярата или диксантогенати и данните от спектрофотометричното и HPLC изследване говорят само за намаление на количеството на ксантогената в средата, но не и за естеството на метаболита. Всичко това дава основание да се допусне, че в CYP-катализираното окисление на ксантогенатите и в механизма на инактивиране е възможно участието на феро-супероксидния интермедиерен комплекс ([Ortiz de Montellano and De Voss, 2002](#)).

Класическата схема на активиране на цикъла за осъществяване на метаболизма на един субстрат от системата на CYP450 е промяна в спиновото състояние (електронното състояние) на желязото в хема на активния център след взаимодействие със субстрата. Това е сигнал за приток на редуциращи еквиваленти от NADPH-зависима CYP450 редуктаза и активиране на кислорода до супероксиден радикал с последващо многостъпково окисление, оксидиране или пероксидиране на субстрата. В последните години се появи нова теория за функционирането на мембранно свързания транспорт на протони и електрони, свързани с метаболизма на ксенобиотиците, от хем съдържащите CYP450. Това е т.нар. „murburn“ концепция (“mured burning” или “леко ограничено изгаряне”), която обяснява каталитичният механизъм на хем-съдържащите ензими, процесът на пренос на електрони и регулацията на потребление на редуциращи еквиваленти ([Manoj et al., 2016](#)). Тази концепция включва нова информация, застъпвайки важната роля на дифундиращите ROS при този процес. Тя не изисква високо афинитетно свързване на субстрата към

отдалечения хем център на ензима (първият и най-критичен момент от съществуващото разбиране за процеса) или CYP-CPR протеин-протеин свързване (оперативния „гръбнак“ на предишния цикъл). CYP-CPR-NADPH комплексът осигурява непрекъснат поток от ROS (главно супероксиден радикал) независимо от присъствието на субстрат. Субстратът стабилизира този процес на приток на електрони, като не е задължително това да стане след взаимодействие с желязото в активния център. Големината на активния център на различните изоформи на цитохрома, с различни „пори“ определя до голяма степен субстратната специфичност. За CYP2E1 е характерно, че той има много тесен канал водещ към дисталния активен център ([Adas et al., 1999](#)), от друга страна се характеризира с голямо количество на „декупелуван“ поток на супероксиден радикал. Тези характеристики на радикалния, а не на йонния характер на взаимодействие, при това при ниски концентрации на ензима и различна кинетична характеристика, осигуряваща определено място за атакуване на молекулата на субстрата при метаболитния процес ([Venkatachalam et al., 2016](#)). Трябва да се изтъкне, че отделянето на двата протона може да стане последователно едно след друго. Тази добре обоснована и защитена от солидни експерименти концепция, обяснява най-добре как ксантогенатите се метаболизират само от определени изоформи на цитохрома, при това определено по един и същи механизъм при участието на супероксиден радикал.

2. Промени в структурата на ксантогенатите след експозиция на супероксиден радикал, образуван от биологична или химическа система

При провеждане на експериментите в дисертацията са получени нови данни за механизма и мястото на промяна на структурата на ксантогенатите от два CYP изоензима.

От предишни експерименти се знае, че атаката на ензима и супероксидния радикал спрямо молекулата на ксантогената, води до отдаване на два протона при първия въглероден атом (αC), доказано чрез двойно белязани с изотоп молекули (по C^{14} и H^3) ([Kent et al., 1999](#)). При последващ QSAR анализ на връзката между структура и инхибиторна и инактивационна способност на различните производни на ксантогенатите спрямо активността на CYP2B1 е показано, че енергийното състояние на αC в структурата на въглеводородната верига на различните ксантогенати е такъв, че предполага по-висока лабилност на двата водорода към него ([Lesigiarska et al., 2002](#)).

Друг важен резултат потвърждаващ мястото в структурата на ксантогената подлежащо на атака от супероксидния радикал, отделен при ензимната реакция (отдаване на 2H^+ при αC) е съвпадението на промените в абсорбционния спектър с тези получени след взаимодействие със стабилния радикал DPPH, променящ структурата си след редукция от протоните отделени от молекулата на ксантогената.

В скорошна публикация се съобщава важна информация, вероятно обясняваща мястото на атакуване на молекулата на ксантогенатите от CYP2B6. Дискутира се въпросът за специфичното място на хидроксилиране на въглеводородната „опашка“ на мастните киселини от няколко изоензима на CYP450 ([Choi et al., 2018](#)). Посочва се, че наред с добре известното ω -хидроксилиране от CYP4A11 и ω -1 хидроксилиране от CYP2E1, CYP2B6 е способен да осъществи хидроксилиране на αC на мастната киселина. Това е още едно доказателство за това, че мястото на метаболизиране на подобната структура на ксантогенатите от CYP2B1/2B6 е възможно.

3. Разлики в метаболизма на ксантогенатите в зависимост от ориентацията им към активните центрове на CYP2E1 и CYP4A11

Проучването на взаимодействието на CYP2E1 и CYP4A11 с дълговерижни производни на ксантогенатите показва, че резултатът от това взаимодействие зависи от различното ориентиране на ксантогенатната молекула към активните центрове на двата изоензима. Ориентирането на дитиокарбоновата глава на ксантогенатите към активния център на CYP2E1 води до инактивиране на ензима от реактивния метаболит след отделянето на 2H^+ от αC атом на молекулата. При експеримента с CYP4A11, взаимодействието е конкурентно с най-голям афинитет при C12 ксантогената (с подобна структура на най-оптималния ендогенния субстрат - лауриновата мастна киселина). Проведеният docking анализ показва, че ксантогенатът е ориентиран с въглеводородната си опашка към активния център и най-вероятно се хидроксилира на ω -място.

Намерената в нашите експерименти взаимовръзка между метаболизма на мастните киселини и това на ксантогенатите, дава ново обяснение на наблюдаваното потенциращо действие на мастните киселини (при това отново с най-голяма ефективност е лауринова киселина) при описване на антивирусното ([Amtmann et al., 1987](#)) и антицитотоксичното ([Amtmann and Sauer, 1987](#)) действие на ксантогенатите. Най-приемливото обяснение би било, че това взаимодействие води до повишаване на клетъчната концентрация за ксантогенатите, тъй като CYP4A ензимите са локализирани в клетъчната мембрана и играят роля за нейната пропускливост.

В търсенето на обяснение за синергичното действие на D609 с определени мастни киселини при осъществяването на противовирусното му действие, е намерено конкуритивно взаимодействие на свързване с BSA, като най-силен е ефекта с лауриновата киселина ([Music et al., 1989](#)).

Има клинични данни за възможно такова взаимодействие, макар и с различен резултат. Потискане на абсорбцията на мастни киселини ([Watt et al., 2019](#)) чрез повлияване на ензимните системи продуциращи ω -хидроксилиращите им продукти (CYP4A и CYP4F) е дало благоприятен резултат при терапия на рак на простатата ([Alexanian and Sorokin, 2013](#)). Обратно, има данни, че експресията на CYP4A11 mRNA в хепатоцелуларни ракови клетки при хора, говори за благоприятен развой на заболяването ([Eun et al., 2019](#)).

4. Селективно атакуване на сярните атоми на ксантогенатите от водороден пероксид и образуване на перксантати

Като биологични източници на H_2O_2 могат да се посочат: NADPH оксидази; митохондриалната дихателна верига и други оксидази; едно и дву-електронно редуциращи системи (SOD), ендоплазматичен ретикулум (CYP450), пероксизоми. Разграждащи H_2O_2 биологични фактори са ензимите: каталаза, пероксидази, глутатион пероксидаза.

При метаболизма на ксантогенатите от **HRP** се образуват няколко продукта, като най-вероятно е получаването на димерни съединения – като тиосулфонат дитиокарбонати. Въпреки, че в цикъла на катализа участват кислородни интермедиенти аналогични на Fe-кислородните комплекси при каталитичния механизъм на CYP450, продуктите на окисление на ксантогенатите от HRP са различни и ензимната активност не се влияе от образуваните метаболити.

Важна информация бе получена при сравняване на инхибиращото действие на C8-ксантогенат спрямо пероксидазната реакция със субстрат о-анизидин осъществена от HRP при различни концентрации на о-анизидина и ко-субстрат H_2O_2 . При сравняване на отношението към двата субстрата може да се определи ефекта на дадено вещество като инхибитор на CYP и на пероксидазните ензими. C8-ксантогентът има значително по-висок афинитет към водородния пероксид, отколкото към о-анизидина при сравнение с подобния по структура диетилдитиокарбамат (DDC). DDC е много силен пероксидазен инхибитор на окислението на о-анизидина с $K_i=10 \mu M$ по отношение на о-анизидина и $K_i=60 \mu M$ по отношение на H_2O_2 ([Martinkova et al., 2012](#)).

Сравняването на метаболизма на сяросъдържащите съединения, каквито са ксантогенатите, от две монооксигенази CYP450 и FMO е от интерес главно заради разликата в механизма на активиране на кислорода от двете ензимни системи.

Флавиномоноксигеназите (FMO) осъществяват NADPH-зависимо редуциране на свързания с ензима флавин, което води до образуване различни ROS, т.нар. С4а-флавин (хидро) пероксид ([Phillips and Shephard, 2017](#)).

Класическите, т.нар. Baeyer-Villiger монооксигенази (BVMOs), генерират реактивните (хидро) пероксидни междинни продукти, които извършват нуклеофилните и електрофилни окислителни реакции. За разлика от класическите Baeyer-Villiger реакции, когато окислението на сяросъдържащите субстрати се осъществява от EtaA (BVMO флавин монооксигеназа от *M. tuberculosis*), неговият С4а-адукт по-вероятно реагира като хидропероксид отколкото като пероксид ([Ballou, 2013](#)). Хетероложната експресия и пречистване на EtaA направи възможно използването на ензима за тестиране на метаболизма на N- и S-съдържащи съединения в *in vitro* условия ([Vannelli et al., 2002](#)), което бе направено и при нашите изследвания.

Много данни показват, че окислението на сулфид с FAD-съдържащи монооксигенази включва нуклеофилна атака на двувалентната сяра от ROS в активния център на ензима. Окислението от CYP450 започва с едноелектронен пренос от сулфида към активните форми на ензима ([Oae et al., 1985](#)). Така, за разлика от FMO, които приемат електрони директно от NADPH, CYP450 приема електрони от NADPH чрез допълнителен протеин, NADPH-CYP редуктаза и свързва и активира кислорода едва след свързването на окисляващия се субстрат. Докато FMO стабилизират активния хидроперокси флавинов компонент, CYP450 образуват сравнително нестабилен феро- O_2 комплекс. FMO метаболизират предимно нуклеофилни съединения, докато CYP450 - по-слабо нуклеофилни. FMO и CYP450 имат някои общи субстрати, но често произвеждат различни метаболити. Въпреки че CYP450, подобно на FMO могат да окислят азотния или серния атом в съединенията, те много по-често катализират хидроксилиране на въглероден атом, отделяне на хетероатом (деалкилиране) или епоксидиране.

Като хетероатом съдържащи съединения ксантогенатите са добри субстрати за флавин монооксигеназните ензими. Продуктът на окисление е един – перксантат (сулфин). Същият продукт се получава и в чисто химична система при окисление на ксантогенатите с H_2O_2 . За разлика от системата с H_2O_2 , където скоростта на окисление не зависи от химичната структура на ксантогената, флавиновите

монооксигенази осъществяват окисление на ксантогенатите с различна скорост в зависимост от химичната им структура.

Както вече беше изтъкнато още през 1956 г. Иванов публикува данни, че различни производни на ксантогенатите имат антибактериална активност спрямо микобактериум туберкулозис (Mtb), която той отдава на окисление на последните до токсични метаболити ([Ivanov, 1956](#)). Чрез използването на пречистена бактериална EtaA-FMO бе доказано, че чрез окислението си до перксантати някои от ксантогенатите упражняват значително по-висока антибактериална активност от лекарствения препарат Етионамид при тестиране върху референтен бактериален щам.

Резултатите от тези експерименти допринасят за утвърждаването на идеята, че бактерицидната активност на различни тиоамидни и тиоурейни съединения спрямо туберкулозния бактерия и клиничното им приложение може да бъде подобро чрез намаляване на дозата, така че да се намалят нежеланите ефекти и да се подобри приема от страна на пациентите. Това може по принцип да бъде постигнато чрез манипулиране на ефикасността на EtaA:

- a. Увеличаване на активността чрез засилване на ензимната генна експресия.
- b. Чрез съединения с по-голям афинитет към EtaA, при което с намаляването на дозата, се постига същата ефективност при намалена токсичност.

При сравняването на антимикуобактериалната активност на ЕТН с тази на ксантогенатите, трябва да се изтъкне че последните имат много различни биологични ефекти, които могат да допринесат за тяхната по-висока активност. Някои от тези възможни ефекти се основават на:

- Наличието на тиоредоксин редуктазна (TrxB2) активност в *M. tuberculosis*, показана в скорошни публикации ([Lin et al., 2016](#)).

- Инхибирането на Mbt карбоанхидрази (фамилия металоензими катализиращи хидрирането на въглеродния диоксид до бикарбонат и протони), които биха могли да бъдат друг възможен таргет за антимикуобактериалното действие на ксантогенатите ([Maresca et al., 2013](#)).

- Значението на различните изоформи на фосфолипаза С за вирулентността на *M. tuberculosis* ([Raynaud et al., 2002](#)) чрез индуциране на цитотоксични ефекти върху макрофагите на гостоприемника чрез директна или индиректна ензимна хидролиза на клетъчните мембранни фосфолипиди ([Bakala N'Goma et al., 2010](#)).

- В *M. tuberculosis* са намерени над 20 P450 ензими, някои от които са получени в пречистена форма ([McLean and Munro, 2008](#); [Ouellet et al., 2010](#)). От голям интерес за обяснението на възможните механизми на антимикуобактериалното

действие на ксантогенатите е откриването на CYP124 methyl-branched lipid ω -хидроксилаза в Mtb ([Johnston et al., 2009](#)).

5. Промени в структурата на ксантогенатите от хидроксилни радикали и значение на хелаторните свойства на ксантогенатите

Генерирането на хидроксилни радикали в биологични системи от редица оксиредуктази включително и от системата на CYP450 е добре известно ([Morehouse and Mason, 1988](#)). В плана ни да демонстрираме промените в структурата на ксантогенатите от различни активни форми на кислорода, генерирани от биологични или химически системи, използването на класическата Фентонова реакционна система за генериране на хидроксилни радикали, даде изключително важни резултати. В проведените от нас опити бе показано, че в отсъствие на генериране на хидроксилни радикали в средата /т.е. при липсата на хелатор ЕДТА/, независимо от това дали реакцията стартира от феро или фери йони, ксантогенатът слабо се окислява от водородния прекис до перксантат, като по този начин слабо намалява количеството на хидроксилните радикали, тествани с позитивния маркер, дезоксирибозата. При генериране на хидроксилни радикали в средата /присъствие на хелатор /при тези рН условия (7.2), ксантогенатът /не хелатира нито феро, нито фери йони/ се метаболизира до друг метаболит, който не може да бъде определен спектрофотометрично

В предварителни опити, извършени в Лабораторията по токсикология при Институт по невробиология БАН е показано чрез използването на газ хроматографска техника, че в условията на системи продуциращи хидроксилни радикали (Фентонова система, хемоглобин), ксантогенатите се метаболизират след пиролитична реакция до съответния въглеродород ([Yanev et al., 1985](#)). Такъв краен метаболит е доказан след инкубиране на изолирани хепатоцити и микростоми с ксантогенати. Друг пример за такава реакция са данните за инхибиране от различни ксантогенати на салицилатното хидроксилиране, стимулирано от хидроксилни радикали, генерирани в системата ксантин/ксантин оксидаза. Наред с инхибирането на салицилатното хидроксилиране, е показано и метаболизирането на ксантогенатите до съответния въглеродород ([Yanev and Stoytchev, 1985](#)).

6. Още за антиоксидантното действие на ксантогенатите

В многобройни публикации се съобщават, анализират и дискутират антиоксидантните свойства на ксантогенатите. В голяма част от тях този ефект коректно се отбелязва, но заключението е само „симптоматично”, т.е. направено е само защото в средата, в която се наблюдава има доказано образуване на активни

форми на кислорода. Не се дискутира детайлния механизъм на този ефект. В други случаи, механизмът на наблюдавания ефект не се интерпретира правилно, защото авторите са подведени от факта, че ксантогенатите са сяро съдържащи съединения и по аналогия им се преписват качества, които не притежават. Затова преди да разискваме намерените от нас данни в аспекта на разкриване на нови механизми на антиоксидантното действие на ксантогенатите е важно да опишем разнообразния спектър на отнасяне на сяросъдържащите съединения като антиоксиданти, като по този начин намерим точното място на новите данни. И така на въпроса:

Какво прави сяро-съдържащите съединения толкова добри антиоксиданти?

Има няколко фактора, които заедно правят серните съединения толкова ефективни антиоксиданти. Първо, серните съединения често съдържат S-H връзки /меркаптани/ и са отлични скавенджери /"ловители"/ на радикали, защото серните радикали са термодинамично по-стабилни от съответните радикали на кислорода. Ако в молекулата има множество меркапто групи (например множество тиолови групи в един белтък), те могат да се окислят до съответния дисулфид като редуцират окислителя.

Този окислителен процес предоставя на сярните съединения друг път за улавяне и трансформиране, съответно за инактивиране на ROS.

Освен, че са много ефективни ROS скавенджери, серните съединения също така комплексират много метални йони. Тези метални йони често играят важна роля в генерирането на ROS. Свързвайки ги, серните съединения ефективно ги отстраняват от процеса на генериране на ROS, като по този начин допълнително намаляват ROS в клетката.

От изтъкнатите по-горе свойства на серните съединения като важен прерогатив за техните антиоксиданти свойства, ксантогенатите се различават значително. Първо те като дитиолови съединения (т.е. два серни атома към един въглероден) не притежат истинска сулфхидрилна група. Те са соли на калия или натрия или естери. Солите във воден разтвор дисоциират до анион. Дитиокарбоновата киселина не е разтворима във вода. Затова сравняването на химичните и биологичните свойства на ксантогенатите с други съединения, които имат два серни атома в молекулата (например димеркаптопропион, Унитиол), въпреки че са комплексообразователи, се различават рязко по други свои отнасяния. Такива разлики има даже между много сходни по структура съединения, като диетилдитиокарбамата и етилксантогената.

От проведените от нас експерименти ксантогенатите проявяват свойства на скавенджери, не описани до сега. Те се окисляват до различни метаболити в зависимост от реактивната форма на кислорода: биологичните и химични системи образуващи *супероксиден радикал* отнемат един или два протона от α C на алкилната или арилна верига. Това води до високо реактивни метаболити, които или се свързват ковалентно с най-близкия ензимен белтък или при участието на хидроксилен радикал отделят съответния въглеродород след пиролитична реакция, осъществена при физиологични условия на 37°C. В този тип на взаимодействие на молекулата на ксантогената с активирания кислород, дитиокарбоновата глава вероятно взема само индиректно участие, като реакцията е необратима. За разлика например от участието на антиоксидантите, като глутатиона, които при осъществяване на ефекта си влизат в окси-редукционен цикъл и могат да възстановят първичната си структура.

Взаимодействието на ксантогенатите с *водороден пероксид* довежда само до окисление на сярата до сулфин (перксантат), метаболит с много характерен абсорбционен спектър и съответно с характерни химични и биологични отнасяния. Перксантатите за разлика от метаболитите след супероксидната и хидроксилната атака при определени условия могат да възстановят предишната си структура.

Химическите отнасяния на ксантогенатите при взаимодействие с различни форми на кислорода и особено в присъствие на водороден пероксид и различни метали е изключително задълбочено разработван проблем. Обяснението е просто – от близо сто години и до днес ксантогенатите се използват широко във флотационната индустрия, т.е при условия на окисление и тежки метали. Затова е нелогично за толкова добре обмислени, проведени опити *ин витро* и *ин vivo* за изследване предимно на D609 като:

- антиоксиданти в модели на йонизираща радиация ([Zhou et al., 2001](#));
- цитотоксично действие ([Bai et al., 2004](#));
- невропротекция при експериментален модел на Алцхаймер ([Butterfield, 2014](#); [Butterfield and Boyd-Kimball, 2018](#)); намалено образуване на амилоид- β протеин ([Ansari et al., 2006](#); [Perluigi et al., 2006](#)); антиоксидантен ефект ([Sultana et al., 2004](#); [Di Domenico et al., 2015](#)); скавенджери на хидроксилни радикали ([Joshi et al., 2005](#));

с резултати публикувани в множество статии, когато се говори за механизма на това антиоксидантно действие, механично да се твърди, че ксантогенатите имат „глутатион миметично“ ([Joshi et al., 2005](#); [Yang et al., 2018](#)) действие и се дават фалшиви примери с окисление на D609 до диксантогенат от водороден пероксид,

като публикуват картина на абсорбционен спектър на перксантат ([Lauderback et al., 2003](#)). Предполагаме, че подвеждането им се дължи на непознаване на литературата за ксантогенатите от изследвания във флотационната индустрия. В този аспект можем само да добавим, че в биологична среда за окисление на ксантогенатите до диксантогенати условия няма. Това може да се реализира в химическа среда след взаимодействие с йодни и хипохлористи съединения ([Rao, 1961](#)). За разлика от ксантогенатите, диетилдитиокарбаматът много бързо се окислява до Дисулфирам в среда на супероксиден радикал и водороден пероксид ([Liu et al., 1996](#)).

При анализиране на резултатите от използването на класическия тест за антиоксидантно действие (DPPH) на едно съединение, е важно да се обърне внимание, че при тестиране на повлияването на стабилността на DPPH радикала е приложен кинетичен подход (по време и концентрация), който дава възможност за детайлно описване на антиоксидантния капацитет на изследваните съединения в количествен аспект. Тъй като предполагаемият механизъм на антиоксидантното действие на ксантогенатите в случая е отделяне на два протона, е много важно да се види изчислените стойности за стехиометрията на реакцията, т.е. броя на редуцираните молекули на DPPH спрямо една молекула ксантогенат. За изследваните ксантогенати това число е значително над 1, а за C8 е почти 4. Процесът на отделяне на двата протона от α C може да бъде на два етапа, като при това в тях може да участва не само супероксидния радикал от окислителя, но и кислородният атом на ксантогената. Като продължение на тази реакция в присъствие на феро- или фери-атом може да се продължи с фентонова реакция при която да се стигне до пиролиза на връзката C-O и отделяне на съответния въглеродород и междинни продукти на сярата.

От нашите опити с взаимодействие на ксантогенатите с азотен оксид не може да се даде конкретен отговор на какво се дължи видимия ефект на намаление на концентрацията на NO в системата. При това не се наблюдава образуване на метаболити или адукти проследени, по промени в абсорбцията. Има доказани такива взаимодействия при използване на други експериментални модели, предимно в биологични среди. Така например, в стимулирани с LPS фагоцитиращи клетки D609 намалява отделянето на NO, което се обяснява с инхибиране на iNOS чрез повлияване от ксантогената на PC-PLC ([Tschaikowsky et al., 1994](#)).

Новите изследвания позволяват да се даде по точна интерпретация на твърдението за ксантогенатите като *невропротективни* агенти. Можем да ги групираме главно в два аспекта:

- позитивните резултати от прилагането на антиоксиданти за развитието на невродегенеративните заболявания, предимно Алцхаймер (те са важен член на лекарствената група дискутирана в този аспект от групата на Butterfield ([Butterfield, 2014](#)));
- като средства за блокиране активирането на различни ксенобиотици до невротоксични метаболити, като хлорпирифос, пропофол и др. ([Khokhar and Tyndale, 2011;2012](#)).

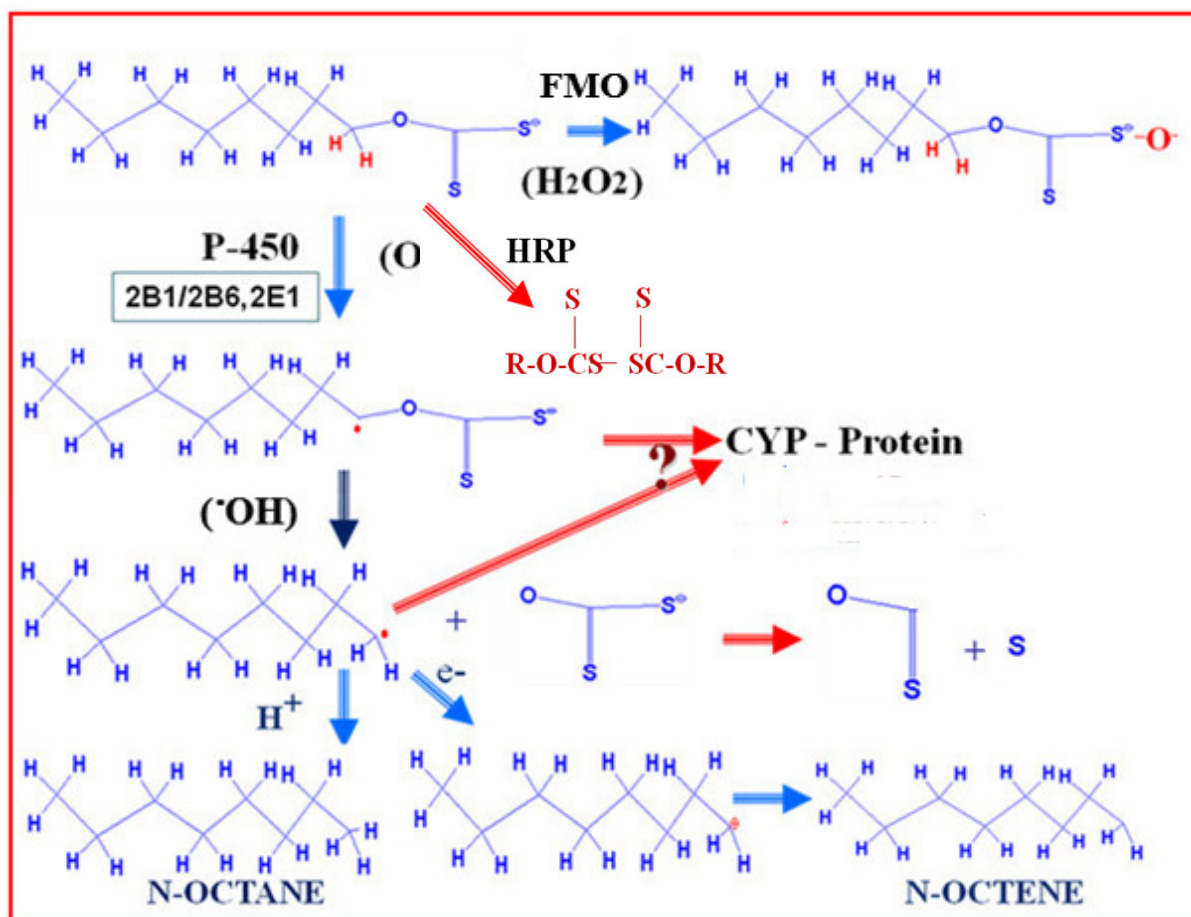
При внимателното анализиране на разностранните биологични ефекти на ксантогенатите се вижда, че в много от случаите в основата е повлияване на някой ензим, в който за проявяване на активността му е необходим метал, примерно желязо, цинк, мед и др. Това показва, че взаимодействието на ксантогенатите с металите не се изчерпва с тяхното хелиращо действие, примерно в случаите на отравяне, свободни несвързани метали и т.н. Все още недостатъчно е изследването на конкретното взаимодействие на ксантогенатите при обмен на протони или електрони с металите в активните центрове на тези ензимни системи. Бъдещите експерименти в тази насока биха били полезни не само за разширяване на познанията ни за биологичното действие на ксантогенатите, но и за изясняване на някои недостатъчно проучени страни от работата на тези ензимни системи.

При изследване на промените в структурата на ксантогенатите при взаимодействието им с различни биологични и химични системи, продуциращи реактивни форми на кислорода, бяха получени нови данни в няколко направления:

1. Разликите в типа на взаимодействие на ксантогенатите с различни биологични системи се определя в по-голяма степен от реактивните форми на кислорода, участващи в реакцията, отколкото от директното взаимодействие с биологичните структури.
2. Различните реактивни форми на кислорода водят до различни метаболити на ксантогенатите.
3. Основният механизъм на антиоксидантното действие на ксантогенатите е ролята им на „scavenger”, т.е. на “ловители” на свободни радикали.
4. Участието на ксантогенатите в различни процеси с участието на свободни радикали в клетката дава нова информация за механизма им на биологично действие.

От проведенния анализ на окисление на ксантогенатите в химични системи, в които се продуцират различни реактивни форми на кислорода става ясно, че

ксантогенатите действат като „ловители“ на супероксидни радикали, взаимодействат с хидроксилни радикали и се окисляват от водородния пероксид. Важно е да се подчертае, че при това взаимодействие се получават различни метаболити. Освен за изясняване на антиоксидантните свойства на ксантогенатите спрямо ROS, тези системи служат и като биомиметични модели на окислението на ксантогенатите от ензимите, използващи „активен“ кислород в механизмите си на катализа. Ксантогенатите се окисляват от H_2O_2 и от FMO до перксантати, които обясняват някои от техните полезни биологични ефекти. Сходство в метаболизма на ксантогенатите се наблюдава при окислението им от CYP450 и в системи продуциращи супероксидни радикали до силно реактивни метаболити. Получените нови данни за взаимодействието на ксантогенатите в биологични и химични среди със системи продуциращи активни форми на кислорода, ни дават основание да се допълни първоначалната схема на метаболизма им (Фигура 5.1):



Фигура 5.1. Разширено схематично представяне на метаболизма на ксантогенатите

6. ИЗВОДИ

1. Метаболизирането на ксантогенатите от CYP2B1/CYP2B6 се осъществява от супероксидни радикали чрез отделяне на два протона при α C атом. Скоростта на метаболизиране зависи от структурата на различните ксантогенати и в много по-голяма степен от концентрацията на реактивни форми на кислорода, отколкото от тази на редуциращите еквиваленти.
2. Взаимодействието и метаболизма на ксантогенатите от CYP4A11 и CYP 2E1 е различно:
 - a. LA- ω -хидроксилирането от CYP4A11 се инхибира конкурентно поради ориентиране на алкилната верига към хема на активния център;
 - b. Активността на CYP2E1 се инактивира след образуване на реактивни метаболити поради ориентиране на дитиокарбоновата глава на ксантогенатите към хема на активния център.
3. Взаимодействието и метаболизма на ксантогенатите от хем съдържащи пероксидази (HRP) води до конкурентно инхибиране на пероксидазната реакция и образуване на различни метаболити в сравнение с тези получени под действието на CYP2B1.
4. Взаимодействието на ксантогенатите с водороден пероксид и флавин монооксигенази води до образуване на S-O⁻-окислени метаболити, перксантати.
5. В среда на генериране на хидроксилни радикали ксантогенатите най-вероятно се метаболизират чрез пиролитична реакция на разкъсване на C-O връзката до съответните въглеводороди и серни продукти.
6. Ксантогенатите са специфични антиоксиданти (*scavengers*, ловители). Взаимодействието им с различни реактивните форми на кислорода и различни радикали води до различни промени в структурата им. Това се реализира:
 - a. чрез отдаване на един електрон;
 - b. чрез отдаване на един до два протона от α C на ксантогенатната молекула;
 - c. чрез протектиране на сулфхидрилната група на глутатион от окисление;
 - d. чрез „гасене” на NO радикали;
 - e. метал-хелиращото свойство на ксантогенатите играе незначителна роля за тяхната антиоксидантна активност.

7. ПРИНОСИ

На основата на **новите данни** получени в дисертацията могат да се отбележат няколко **приноса в изясняване** на механизма на действие на ксантогенатите върху различни биологични системи:

1. Потенциращият ефект на мастните киселини при реализиране на антивирусното и антибактериалното действие на ксантогенатите вероятно се осъществява посредством взаимодействие с СУР4А.
2. В биологична среда, пиролитичният път на метаболизъм на ксантогенатите до съответните въгледороди, се осъществява чрез съвместната активност на системи, продуциращи супероксидни и хидроксилни радикали.
3. Бактериостатичното действие на ксантогенатите спрямо *Mycobacterium tuberculosis* се дължи на преференциалното им окисление до перксантати от бактериалната флавин монооксигеназа.
4. Ксантогенатите показват не-глутатион миметичен антиоксидантен (scavenger) механизъм на действие, който вероятно лежи в основата на невропротективния им ефект, описан при редица изследвания на експериментален модел на Алцхаймер.

8. Публикации, свързани с темата на дисертацията

1. **Tsveta Stoyanova**, Igljika Lessigiarska, Ilza Pajeva, Momir Mikov, Stanislav Yanev, Xanthates as useful probes for testing the active sites of cytochromes P450 4A11 and 2E1: molecular modeling study, *Frontiers of Pharmacology, Drug Metabolism and Transport*, 2017, 8, 672; doi: 10.3389/fphar.2017.00672 (IF=4.4)

2. Stanislav G. Yanev, **Tsveta D. Stoyanova**, Violeta V. Valcheva, Paul R. Ortiz de Montellano, Xanthates: metabolism by flavoprotein-containing monooxygenases (FMO) and antimycobacterial activity, *Drug Metabolism and Disposition*, 2018, 46 (8), 1091-1095; doi: 10.1124/dmd.118.081984 (IF =4.2)

3. **Tsveta Stoyanova**, Daniela Ivanova, Albena Alexandrova, Stanislav Yanev, Interaction and Metabolism of n-Octylxanthate by Horseradish Peroxidase, *CRABS*, 2019, 72, 4, 472-478, doi:10.7546/CRABS.2019.04.06 (IF=0.270)

9. Участия в научни прояви

1. **Tsveta Stoyanova**, Viliana Todorova, Stanislav Yanev, Xanthates (dithiocarbonates): heavy metals chelation properties and biological effects, Proceedings of the 5th Workshop on experimental models and methods in biomedical research, April 7-9, 2014, Institute of Experimental Morphology, Pathology and Anthropology with Museum at the Bulgarian Academy of Sciences, Sofia, p.76

2. **Tsveta D. Stoyanova**, Viliana Todorova, Stanislav G. Yanev, Xanthate metabolism by different monooxygenases and reactive oxygen species, Seventh National Congress of Pharmacology, *J Biomed Clin Res* Volume 7, Number 1, Supplement 1, 2014, p. 38

3. **Tsveta Stoyanova**, Viliana Todorova, Stanislav Yanev, Criteria for mechanism-based enzyme inactivation, 9th Workshop on biological activity of metals, synthetic compounds and natural products, November 26-28, 2014, Institute of Experimental Morphology, Pathology and Anthropology with Museum at the Bulgarian Academy of Sciences, Sofia, p. 85

4. **Tsveta Stoyanova**, Viliana Todorova, Stanislav Yanev, Xanthates (dithiocarbonates): heavy metals chelation properties and biological effects, Scientific conference - 145 years since the establishment of the Bulgarian Academy of Sciences „Neuroscience – from theory to experiment, December 4, 2014, p.11

5. **Tzveta Stoyanova**, Viliana Todorova, Stanislav Yanev, Criteria for mechanism-based enzyme inactivation, Interdisciplinary Doctoral Forum, Education Center BAS, April 6 – 7, 2016, Sofia. p.33

6. **Tsveta D. Stoyanova**, Viliana Todorova, Albena Alexandrova, Stanislav G. Yanev, Xanthates (dithiocarbonic acid derivatives) as powerful radical scavengers, 26th International conference, Stara Zagora, June 2 – 3, 2016

7. Igljika Lessigiarska, **Tsveta Stoyanova**, Ilza Pajeva, Stanislav Yanev, Xanthates as useful probes for testing the active sites of cytochromes P450 4A11 and 2E1: molecular modeling study, 3rd National Congress on Physical Sciences, 29 Sep. – 2 Oct. 2016, Sofia.

8. **Stoyanova T.**, Yanev,S., Valcheva,V., Najdenski,H., S-oxygenation of dithiocarbonic acid derivatives (xanthates) by flavoprotein monooxygenases as the primary mechanism of their antimycobacterial activity, 10th Balkan Congress of Microbiology, Sofia, November 16-18 th, 2017, AntM-54

9. Violeta Valcheva, **Tsveta Stoyanova**, Paul R. Ortiz de Montellano, Stanislav Yanev, Xanthates: metabolism by flavoprotein-containing monooxygenases and antimycobacterial activity, 39th Annual Congress of the European Society of Mycobacteriology, July 1 -4, 2018, Dresden, Germany, P211

10. Забелязани цитирания

1. Stanislav G.Yanev, **Tsveta D. Stoyanova**, Violeta V. Valcheva, Paul R. Ortiz de Montellano, Xanthates: metabolism by flavoprotein-containing monooxygenases (FMO) and antimycobacterial activity, *Drug Metabolism and Disposition*, 2018, 46 (8), 1091-1095

a. Цитиране: Duncan D., Auclair K., The coenzyme A biosynthetic pathway: A new tool for prodrug bioactivation, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2019, 672, art. no. 108069, doi: 10.1016/j.abb.2019.108069

11. Награди и отличия

1. Награда за изявен млад учен, Институт по Невробиология, БАН, Декември 2017 година.

2. Best poster award, II Place, Young scientist acknowledgment, 10th Balkan Congress of Microbiology, Microbiologia Balkanica' 2017. Sofia, Bulgaria, November 16'h -18' 2017.