

Софийски Университет “Св. Климент Охридски”
Факултет по Химия и Фармация
Катедра по Инженерна Химия и Фармацевтично инженерство

Лилия Иванова Винарова

**Ин-витро изследвания на факторите,
влияещи върху солюбилизацията на
холестерол в храносмилателния тракт**

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертация, представена за присъждане на образователната и
научна степен “Доктор”

Професионално направление 4.2 Химически науки
(Теоретична Химия - Макрокинетика)

Научен ръководител: проф. д-р Славка Чолакова

Научен консултант: проф. дхн Николай Денков

София, 2015

Дисертационният труд съдържа 115 страници, 64 фигури и илюстрации и 3 таблици.
Цитирани са 132 литературни източника.

Номерацията на частите, фигурите и таблиците в автореферата съответства на тази от дисертацията.

Глава 1. Увод.

Холестеролът се среща в състава на всички мазнини от животински произход, където се намира под формата на естер на мастни киселини (холестеролов естер) или като свободна молекула. Основните източници на холестерол в човешкия организъм са синтеза му в черния дроб и абсорбцията му в храносмилателния тракт. Експериментално е установено, че синтезът на холестерол в черния дроб се стимулира от наситените мастни киселини (Glatz & Katan 1993).

Тъй като е неразтворим във вода, холестеролът в кръвта се пренася под формата на липопротеинови частици с различна плътност (VLDL, LDL и HDL). LDL-холестеролът е известен още като "лош" холестерол, тъй като високите концентрации на LDL-холестерол в кръвта са свързани с развиването на атеросклероза, която увеличава риска от миокарден инфаркт и други сърдечно-съдови заболявания (Konecka et al. 1996; Shiomi et al. 2004). Смята се, че високите концентрации на HDL-холестерол (т.нар. „добър“ холестерол) предпазват от атеросклероза, тъй като HDL-липопротеините пренасят холестерол в посока от стените на кръвоносните съдове към черния дроб и по този начин могат да възпрепятстват образуването на атеросклеротични плаки.

Широкото разпространение на атеросклерозата и връзката с високите нива на холестерол в кръвния серум е довело до задълбочено търсене на ефективни стратегии за намаляване на холестерола в кръвната плазма. Клинични изследвания с хора и животни са широко използвани за изследване влиянието на различни фактори върху нивата на холестерол в кръвния серум. По време на храносмилането в стомашно-чревния тракт (СЧТ), холестеролът се солюбилизира и транспортира през мукусния слой на тънките черва от смесените мицели на жлъчни киселини (ЖК), фосфолипиди и мастните киселини (МК), които се получават в резултат на хидролизата на мазнините (Hofmann 1963; Small et al. 1966; Carey & Small 1970; Christensen et al. 2004; Porter et al. 2007). Затова *in vitro* моделите на храносмилане са удобен подход за изследване на солюбилизацията на холестерол и допринасят за разбирането на механизмите, отговорни за редица ефекти.

От литературата е известно, че високи концентрации на калциеви йони в тънките черва могат да предизвикат утаяване на ЖК и на МК (Pohle 1941; Gu et al. 1992), което може да промени солюбилизационния капацитет на смесените мицели и така да повлияе на абсорбцията на холестерола в СЧТ, а следователно и на неговата концентрация в кръвта. Множество клинични изследвания показват, че повишеният прием на Ca^{2+} намалява общия и LDL-холестерол в кръвния серум на експериментални животни (Vitale et al. 1959; Fleischman et al. 1967; Yacowitz et al. 1967; Fleischman et al. 1972; Iacono 1974; Renaud et al. 1983; Hines et al. 1985; Van der Meer et al. 1985; Jacques et al. 1995; De Rodas et al. 1996). Този ефект се потвърждава и от редица клинични изследвания с хора (Yacowitz et al. 1965; Bhattacharyya et al. 1969; Carlson et al. 1971; Bierenbaum et al. 1972; Lehtonen & Viikari 1979; Groot et al. 1980; Bierenbaum et al. 1987; Bell et al. 1992; Denke et al. 1993; Shahkhalili et al. 2001; Reid et al. 2002). Предложени са три механизма на намаление на

серумния холестерол от Ca^{2+} (Vaskonen 2003): (1) утаяване на ЖК, поради което се намалява солубилизацията на серумния холестерол в техните мицели; (2) утаяване на наситените МК, което намалява синтеза на холестерол в черния дроб; и (3) директно взаимодействие между холестерола и калциевите йони, което намалява неговата абсорбция. Всеки един от изброените механизми се основава на намаляването на абсорбцията на вещество, което е важно за метаболизма на холестерол в организма. Все още обаче не е ясно дали и трите механизма са еднакво важни или някой от тях е определящ.

Литературните данни от *in vitro* изследванията за влиянието на калциеви йони върху солубилизацията на холестерол са доста оскъдни (Vinarov et al. 2012; Devraj et al. 2013). Те са получени чрез *in vitro* модели на храносмилане, които често се използват за определяне на биодостъпността за хидрофобни молекули и включват в състава си ензими, ЖК и фосфолипиди (Garrett et al. 1999; McDougall et al. 2005; Fatouros & Mullertz 2008).

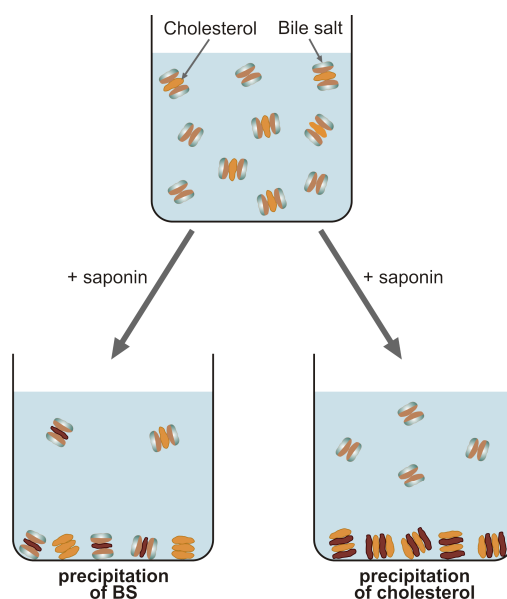
В работата на Devraj et al. (2013) е показано, че високи концентрации на калциеви йони предизвикват утаяване на МК, получени по време на ТГ липолиза. Това утаяване на МК води до намаляване на солубилизацията на даназол (лекарствено вещество, със структура близка до тази на холестерола) в сместа от ЖК и продукти на ТГ липолизата. Важно е да се отбележи обаче, че в експерименталната процедура на Devraj et al. не е използван бикарбонатен буфер, който също може да взаимодейства силно с Ca^{2+} йони.

В изследване проведено в нашта катедра (Vinarov et al. 2012) е установено, че калциевите йони влияят върху солубилизацията на холестерол в мицелите на жлъчни киселини, посредством утаяване на мастните киселини, които се пулчават в резултат на липолизата на трицилициди в стомашно-червния тракт. Получена много добра корелация между количествата на солубилизирания холестерол и МК в мицелите на ЖК. В проведеното изследване, обаче е използвано само слънчогледово масло, което съдържа основно ненаситени МК. В същото време, голяма част от хранителните продукти съдържат мазнини, богати на наситени МК (свинска мас, какаово масло, палмово масло и др.). Наситените МК се различават от ненаситените МК по редица физични свойства (точка на топене над $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, различни молекулни конфигурации и опаковане, по-хидрофобни са и др.) (Small 1986) и това може да предизвика различни взаимодействия между наситените МК и калция, ЖК и холестерола. Затова една от задачите на настоящата дисертация е да се провери дали ко-солубилизацията на МК и холестерол се наблюдава и при липолиза на масла, богати на наситени МК.

В литературата е изследван и хипохолестеролемичния ефект на сапонинови екстракти (Malinow et al. 1977; Gestetner et al. 1972; Malinow et al. 1979; Malinow et al. 1981; Sidhu & Oakenfull 1986; Oakenfull et al. 1984; Oakenfull & Sidhu 1983; Kim et al. 2003; Afrose et al. 2009; Bladon 1958). От проведени *in vivo* експерименти с животни е известно, че сапонините в люцерната (Malinow et al. 1977; Gestetner et al. 1972; Malinow et al. 1979; Malinow et al. 1981), соев сапонин (Sidhu & Oakenfull 1986; Oakenfull et al. 1984; Oakenfull & Sidhu 1983), Quillaja сапонини (Sidhu & Oakenfull 1986; Oakenfull et al. 1984; Oakenfull &

Sidhu 1983), Yucca сапонини (Kim et al. 2003), Karaya сапонини (Afrose et al. 2009) и дигитонин (Bladon 1958) притежават такъв хипохолестеролемичен ефект. Поради голямото разнообразие на сапонини в природата, съществуват редица сапонинови екстракти, които все не са изследвани и не е известно дали притежават хипохолестеролемичен ефект.

В работата на Milgate & Roberts 1995 са предложени два основни механизма за обяснение ефекта на понижаване на серумния холестерол от сапонини, като и двата механизма включват образуването на големи агрегати, които не се абсорбират в СЧТ (сапонин+ЖК или сапонин+холестерол), което пряко или косвено намалява серумния холестерол, виж Фигура 1.7.



Фигура 1.7. Механизми на намаляване на солубилизацията на холестерол в присъствие на екстракт от сапонини.

Резултатите от *ин vivo* експерименти с плъхове показват, че соеви сапонини образуват големи смесени агрегати с жлъчни киселини, с молекулна маса $> 10^6$ а.е., които не се абсорбират в тънките черва (Oakenfull et al. 1984; Sidhu & Oakenfull 1986). Това стимулира синтеза на ЖК от холестерол в черния дроб и по този начин предизвиква намаление на холестерола (Oakenfull et al. 1984; Oakenfull & Sidhu 1983; Sidhu & Oakenfull 1986).

Хипохолестеролемичният ефект на Quillaja сапонините е показан както в изследвания с животни (Oakenfull et al. 1984), така и в клинични изследвания при хора (Kim et al. 2003). За Quillaja сапонините обаче е известно, че слабо намаляват ре-абсорбцията на ЖК (Oakenfull et al. 1984; Oakenfull & Sidhu 1983; Sidhu & Oakenfull 1986), което показва, че те намаляват холестерола по друг механизъм.

Oakenfull et al. 1984 са показали, че приемът на Quillaja сапонини води до увеличение на холестерола, отделен с фекалиите и затова са изказали хипотезата, че Quillaja сапонините формират неразтворими комплекси холестерол+сапонин (Oakenfull et

al. 1984; Jenkins & Atwal 1994). Такава възможност косвено се подкрепя от факта, че други сапонини, по-специално дигитонин (Bladon 1958) и сапонините в люцерната (Gestetner et al. 1972; Malinow et al. 1977; Malinow et al. 1979; Malinow et al. 1981), наистина образуват неразтворими комплекси с холестерол. Въпреки това, все още няма експериментално доказателство за действителния механизъм, по който Quillaja сапонините влияят върху биодостъпността на холестерол и свободни МК.

Цел, задачи и структура на дисертацията.

Основната цел на изследванията, описани в дисертацията, е да се изясни ролята на калциевите йони и сапонините върху солубилизацията на холестерол при условия, близки до тези в стомашно-чревния тракт и да се изяснят механизмите, които водят до наблюдаваните ефекти.

Конкретните изследователски задачи могат да се формулират по следния начин:

(1) Да се изследва влиянието на калциевите йони върху солубилизацията на холестерол за триглицериди, при ензимната липолиза, на които се освобождават наситени и ненаситени мастни киселини в различни отношения.

(2) Да се изясни механизма на намаляване на солубилизацията на холестерол от Quillaja екстракти.

(3) Да се изследва ефекта на различни сапонинови екстракти върху солубилизацията на холестерол и свободни мастни киселини *ин vitro* и да се провери дали наблюдаваните ефекти *ин vitro* се проявяват като реални ефекти върху усвояването на холестерол *ин vivo*.

Дисертацията е структурирана по следния начин:

В Глава 2 са представени материалите и методите, използвани за провеждане на изследванията, описани в дисертацията.

В Глава 3 са описани резултатите от изследванията, насочени към изясняване на влиянието на калциевите йони върху солубилизацията на холестерол.

В Глава 4 са представени резултатите от изследванията, насочени към изясняване на механизма на намаляване на солубилизацията на холестерол от Quillaja екстракти.

В Глава 5 са представени резултатите от *ин vitro* и *ин vivo* изследванията на влиянието на различни сапонинови екстракти върху солубилизацията на холестерол и наситени МК. С два от екстрактите, предизвикващи намаление на биодостъпността на холестерол *ин vitro* проведохме *ин vivo* експерименти с мишки, за да проверим дали наблюдаваните тенденции от *ин vitro* изследванията се проявяват като реални ефекти при *ин vivo* изследванията върху холестерола в кръвния серум.

Основните резултати са описани след всяка глава, а основните приноси от проведените изследвания са сумирани в края на дисертацията.

Глава 2. Използвани материали и методи.

2.1. Използвани материали. За провеждане на експериментите използвахме без предварително пречистване следните масла, закупени от търговската мрежа: свинска мас (Бони Холдинг АД), краве масло (Димитър Маджаров ЕООД), какаово масло (Химакс фарма ЕООД), палмово масло (Cremana, WALTER RAU Lebensmittelwerke GmbH) и слънчогледово масло (Калиакра ЕООД). Съдържанието на мастни киселини в изследваните ТГ масла, определихме с газова хроматография след предварителна хидролиза с алк. КОН. Получените резултати показваха, че най-високо е съдържанието на наситени мастни киселини в кравето и какаовото масла около 65 %, в палмовото масло и свинската мас е около 55 % и най-ниско е съдържанието в слънчогледовото масло, където наситените мастни киселини са около 12.8 % от всички киселини.

Използвахме следните ензими и ензимни смеси: (1) Панкреатин от свински панкреас (Sigma-Aldrich, кат. ном. P1750), който съдържа амилаза, трипсин, липаза, рибонуклеаза и протеаза. Панкреатина използвахме като източник на панкреатична липаза и колипаза, които са в молно отношение 1:1 в панкреатичния сок (Wulff-Pérez et al. 2010; Patton et al. 1978). Според производителя активността му е 8 USP единици, като една единица от панкреатина освобождава 1 микроеквивалент мастни киселини от субстрат зехтин за минута при рН = 9.0 и температура 37 °С; (2) Пепсин от свинска стомашна лигавица (Fluka, кат. ном. 77160), който съдържа само пепсин (протеаза) като ензим. По спецификация от производителя активността му е 643 U/mg. Една единица отговаря на количество ензим, който повишава абсорбцията на хемоглобин с 0.001 AU за минута при 280 nm, рН = 2.0 и температура 37 °С.

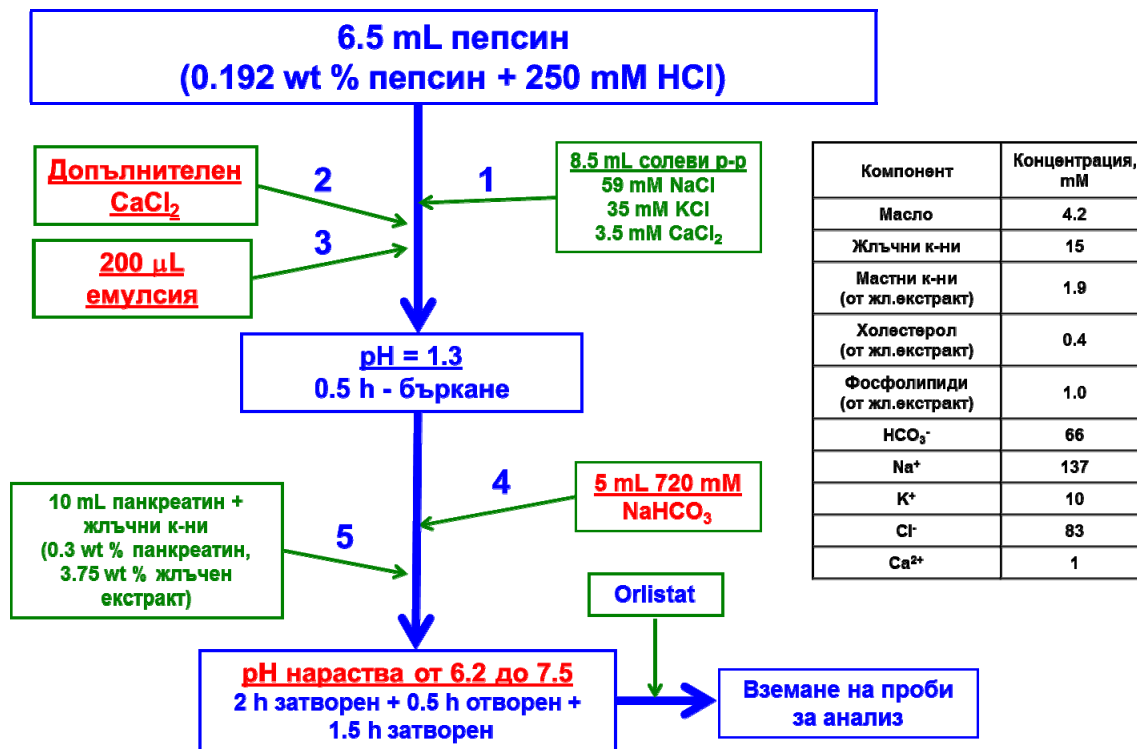
За да изследваме ефекта на различни сапонинови екстракти върху солубилизацията на холестерол и наситени МК, използвахме общо 7 сапонинови екстракта: шест с тритерпеноиден тип на агликона (Quillaja Dry 100 NP, Supersap, Sapindin, Escin, Ginsenosides, Ayurvedic saponin concentrate) и един със стероиден тип агликон (Fenusterols). Освен по тип на агликона, използваните екстракти се различаваха по растителния вид, от който са получени, и по % съдържание на сапонини в тях: от ≈ 20-30 % за Quillaja Dry 100 NP и Ayurvedic saponin concentrate до 95 % за Escin.

2.2. Методи и експериментални процедури.

2.2.1. Процедура за *ин витро* липолиза.

Наскоро в нашата катедра бе разработен *ин витро* модел за липолиза, който е описан подробно в дисертацията на Винаров (2014), както и в статията на Vinarov et al. 2012. Моделът е успешно приложен за изследване липолизата на ТГ от панкреатична липаза и фазовото разпределение на реакционните продукти и холестерола, при условия наподобяващи тези в стомашно-чревния тракт (Vinarov et al. 2012).

Последователността на смесване на различните разтвори при тази процедура е показана схематично на Фиг. 2.2.



Фигура 2.2. Схематично представяне на процедурата за смесване на разтвори и провеждане на *in vitro* липолиза в присъствие на бикарбонатен буфер. Таблицата от дясно показва моларните концентрации на основните компоненти в крайната реакционна смес.

За да започнем експериментите по липолиза, първо добавяхме 8.5 mL солеви разтвор към 6.5 mL разтвор на пепсин. За да изследваме ефекта на Ca²⁺, на тази стъпка добавяхме нужния обем от разтвор на 1 M CaCl₂ (между 0 и 300 µL). След това, към смесения разтвор на соли и пепсин, добавяхме 200 µL от 60 vol. % емулсия, стабилизирана с 1 wt % Tween 80. На този етап от експеримента, pH е ≈ 1.3. Така приготвената смес разбърквахме 30 min на магнитна бъркалка. След това, внимателно добавяхме 5 mL от разтвор на 720 mM NaHCO₃ и хомогенизирахме пробата на ръка. На следващата стъпка добавяхме 5 mL от разтвор на 90 mM жлъчни киселини към 5 mL разтвор на панкреатин (съдържащ 0.6 wt % панкреатин), смесвахме ги на ръка и ги добавяхме към реакционната смес. След края на реакционното време (4 h), добавяхме 24 mg гранули orlistat, за да инхибираме ензимното действие и разбърквахме за 10 min. След това, липофилните компоненти в реакционната смес екстрахирахме с хлороформ, филтрувахме или центрофугирахме пробата, за да отделим бистра водна фаза за анализ. При провеждане на експериментите в присъствие на сапонинови екстракти (Глава 4 и 5 от дисертацията) използвахме същите разтвори, като допълнително разтваряхме сапонинов екстракт в солевия разтвор (59 mM NaCl + 35 mM KCl + 3.5 mM CaCl₂) един ден преди експеримента.

2.2.2. Методи за фазово разделяне.

Изследвахме фазовото разпределение на продуктите на ТГ липолиза и холестерола с помощта на следните методи за фазово разделяне:

(А) *Филтруване*. След края на експеримента по *in vitro* липолиза, реакционната смес филтрувахме през филтърна хартия с размер на порите от 2-3 μm и тегло 84 g/m^2 (ВОЕСО, Германия). Филтруването провеждахме в стъклена фуния и филтратът събирахме в стъклен съд. Отделеният филтрат, филтрувахме през 200 nm NYLON филтър (Minisart NY25, Sartorius, Германия), при което получавахме бистър пермеат, който екстрахирахме с хлороформ, за да отделим маслоразтворимите компоненти от него. Всички филтрувания извършвахме при 37 °С.

(Б) *Центрофугиране*. Реакционната смес центрофугирахме за 1 час при 37 °С, при 3622 \times g (4500 rpm) на центрофуга SIGMA 3-16PK. След това, получената водна фаза (серум) отделяхме внимателно с помощта на спринцовка, снабдена с дълга метална игла. Липофилните вещества от серума екстрахирахме с хлороформ.

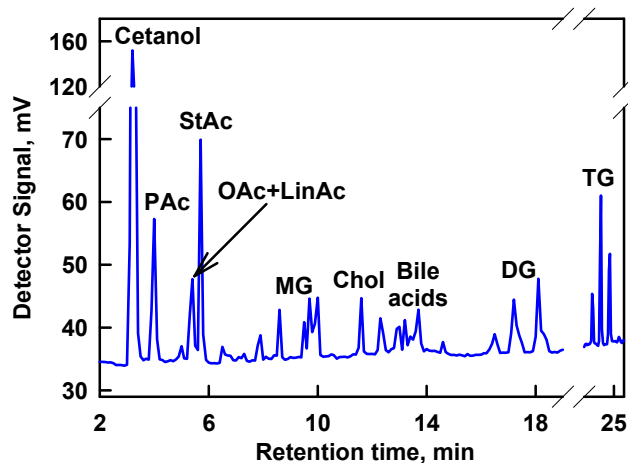
2.2.3. Процедура за екстракция на нехидролизирани триглицериди и реакционни продукти в хлороформ за анализ с ГХ.

След прекратяване на липолизата чрез добавяне на orlistat, охлаждахме реакционната смес до стайна температура и понижавахме рН до 2 чрез прибавяне на 2 М разтвор на HCl, за да намалим разтворимостта на реакционните продукти във водната фаза. След това добавяхме 6 mL хлороформ и соничирахме пробата за 15 min. На всеки 5 min от провежданата екстракция спирахме ултразвуковата вана и разклащаме ръчно и интензивно епруветките. Получената сложна дисперсия центрофугирахме за 30 min при 4500 rpm, за да разделим напълно водната от органичната фаза. Двете фази бяха бистри, което показваше, че маслените капки са преминали в хлороформената фаза. Последната подлагахме на по-нататъшен анализ с ГХ.

2.2.4. Процедура за анализ чрез газова хроматография (ГХ).

Количествата на продуктите на ТГ липолиза и количеството на солубилизирания в мицелите на жлъчни киселини холестерол определяхме чрез ГХ. ГХ анализите провеждахме на апарат TRACE GC (ThermoQuest, Италия), снабден с капилярна колона (Quadrex, САЩ) и пламъко-йонизационен детектор. Използвахме инжектиране от типа Cold on-column, обем на инжектираната проба 1 μL , вторично време за охлаждане от 0.3 min и температура в инжектора от 350 °С. Блокът, който термостатира колоната, програмирахме така че: началната температура да е 120 °С, задържане за 2 min, покачване до 325 °С при скорост от 10 °С/min, след това покачване до 345 °С при скорост от 5 °С/min и накрая задържане за 5 min. Температурата на детектора беше настроена на 350 °С. Като

подвижна фаза използвахме хелий, доставян в режим на постоянно налягане от 60 kPa. Газовете за детектора са водород, въздух и азот. Всички използвани газове бяха с чистота 99.999 %. При тази експериментална процедура, масните киселини се елуират първи, при времена на задържане от 2 до 6 min. След тях се появяват моноглицеридите, които се елуират на 8.7, 8.9 и 9.1 min. Холестеролът се елуира около 10.7 min, а неконюгираните жлъчни киселини – в диапазона от 12 до 14 min. Диглицеридите се елуират между 15 и 18 min, а триглицеридите – след 22 min. Трябва да се отбележи, че олеиновата и линоловата киселини образуват един общ пик, с правилна форма. Използвахме хексадеканол (цетанол) като вътрешен стандарт при концентрация 0.15 mg/mL.



Фигура 2.3. Типична хроматограма, получена след анализ на хлороформен екстракт от ензимно хидролизирана емулсия на какаово масло с газовия хроматограф.

2.2.6. Степен на ТГ липолиза.

Хидролизата на ТГ до ДГ и МГ се осъществява чрез последователни химични реакции (Verger 1984). Дефинирахме три количествени характеристики на ТГ липолизата: обща степен на ТГ липолиза, α ; степен на липолиза на ТГ до ДГ, β , и степен на липолиза до МГ, γ . Тези три характеристики са свързани чрез следното уравнение: $\alpha = \beta + \gamma$. Общата степен на ТГ липолиза се дефинира като:

$$\alpha = \frac{C_{TG}^{INI} - C_{TG}}{C_{TG}^{INI}} \quad (2.3)$$

където C_{TG}^{INI} е началната моларна концентрация на ТГ (която е предварително известна), и C_{TG} е моларната концентрация на остатъчния, нехидролизиран ТГ в края на реакцията. α може да приема стойности от 0 до 1 и отразява относителното количество ТГ, което е хидролизирано до МГ и ДГ. Степента на ТГ липолиза до ДГ се дефинира като:

$$\beta = C_{DG} / C_{TG}^{INI} \quad (2.4)$$

където C_{DG} е моларната концентрация на образувания и нехидролизиран ДГ. Стойността на β отразява количеството ТГ хидролизирано до ДГ, без по-нататъшна хидролиза до МГ.

Степента на ТГ липолиза до МГ се дефинира като:

$$\gamma = C_{MG} / C_{TG}^{INI} \quad (2.5)$$

където C_{MG} моларната концентрация на образувания МГ. Стойността на γ може да бъде определена и от следната връзка:

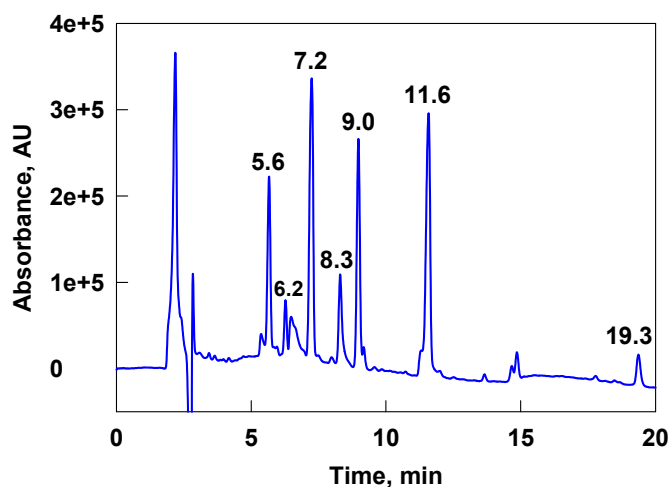
$$\gamma = \frac{C_{FA}}{C_{TG}^{INI}} - \alpha \quad (2.6)$$

където C_{FA} е концентрацията на образуванияте МК.

На практика, определяхме стойността на α от началната и крайната концентрация на ТГ, у-е (2.3), а стойността на γ от C_{MG} , използвайки у-е (2.5). Стойността на β беше определяна от връзката $\beta = (\alpha - \gamma)$, тъй като концентрацията на МК беше определяна с по-голяма точност от тази на ДГ. Концентрацията на ДГ беше използвана само за проверка дали масовият баланс на глицеридите е изпълнен.

2.2.11. Процедура за анализ на жлъчни киселини чрез високоефективна течна хроматография (ВЕТХ).

За да изследваме концентрацията на жлъчните киселини след *in vitro* липолиза използвахме ВЕТХ. Анализът проведохме на апарат Shimadzu (Япония), снабден с две помпи за високо налягане (LC-20AD), DGU-14A мембранен дегазер с четири линии, СТО-10Asvp колона и SPD-10Avp UV/VIS детектор. Разработихме следната процедура, при която дебитът на потока е 1 mL/min, при $T=37^\circ\text{C}$ и подвижна фаза А - мравчена киселина (1.5 об. % във вода) и фаза Б - ацетонитрил. Използвахме следния градиент на фазите: от 0 до 20 минути 40-75 % фаза Б, от 20 до 22 минути от 75-40 % фаза Б, от 22 до 35 минути 40 % фаза Б. UV-VIS детекторът настроихме на 200 nm, а инжектираното количество проба беше 20 μL . За да изследваме концентрацията на жлъчните киселини след *in vitro* липолиза, анализирахме промяната в общата площ на основните пикове в хроматограмата, а не отделните пикове за всяка ЖК.



Фигура 2.7. Типична ВЕТХ хроматограма на жлъчни киселини в пермеата, получен след филтруване (200 nm филтър) на реакционната смес след липолиза. Характерните времена на задържане за жлъчните киселини и соли са 5.6, 6.2, 7.2, 8.3, 9.0, 11.6 и 19.3 min.

Глава 3. Механизъм на намаление на солюбилизацията на холестерол от калциеви йони.

3.1. Експериментални резултати и дискусия.

За да изследваме системно ефекта на Ca^{2+} върху солюбилизацията на холестерол за триглицериди, при ензимната липолиза, на които се освобождават наситени и ненаситени мастни киселини в различни отношения проведохме експерименти с пет вида масла с различен състав на мастните киселини в тях: слънчогледово масло (18 % наситени МК), свинска мас (41 % наситени МК), палмово масло (65 % наситени МК), краве масло (65 % наситени МК) и какаово масло (85 % наситени МК).

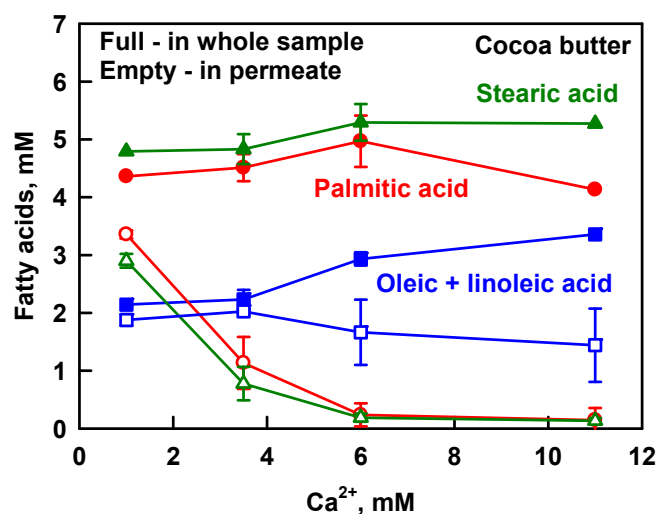
Пробите след липолизния експеримент, преди отделяне на водна фаза, ще наричаме отгук нататък „пълна проба”. Основните компоненти в нея са МГ и МК и компонентите, съдържащи се в жлъчния екстракт (допълнително 3 mM МК, 0.2 mM наситени МГ и ≈ 0.4 mM холестерол).

За всички изследвани масла общата степен на ТГ липолиза е почти пълна, $\alpha \geq 80$ %, основно ТГ се превръщат в МГ, $\gamma = 40$ до 80 % и в края на липолизния процес остават много малко нетрансформирани ДГ, $\beta < 15$ %.

Пробите след липолизния експеримент, преди отделяне на водна фаза, ще наричаме отгук нататък „пълна проба”. Основните компоненти в нея са ЖК, МГ, МК и холестерол. Концентрацията на холестерола при по-голяма част от експериментите в пълната проба е 0.4 mM. Концентрацията на мастни киселини е между 10 и 12 mM за всички масла, с изключение на кравето масло, при което е от 12 до 14 mM. Концентрацията на МГ е около 3 mM, като за част от изследваните масла слабо намалява с увеличаване концентрацията на калциевите йони.

3.1.2. Ефект на Ca^{2+} върху фазовото разпределение на продуктите на липолизата, холестерола и ЖК.

В настоящия раздел сравняваме състава на пълните проби с този на съответните водни фази, отделени чрез филтруване, за да изясним как различните липофилни компоненти са разпределени между смесените мицели и преципитатите, формирани по време на липолизата. На Фигура 3.5 са сравнени концентрациите на наситените стеаринова (StAc) и палмитинова (Pac) киселини, и на ненаситените олеинова+линолова киселини при различни концентрации на калций, след липолиза на какаово масло. Вижда се, че в пълната проба концентрациите на наситените Pac и StAc не се променят значително с повишаване на C_{Ca} ($C_{Pac} \approx 4.5$ mM, $C_{StAc} \approx 5.1$ mM), докато концентрацията на ненаситените МК се повишава леко от ≈ 2 до 3 mM. Това най-вероятно се дължи на повишената хидролиза на ненаситени МГ до глицерол при високи C_{Ca} .

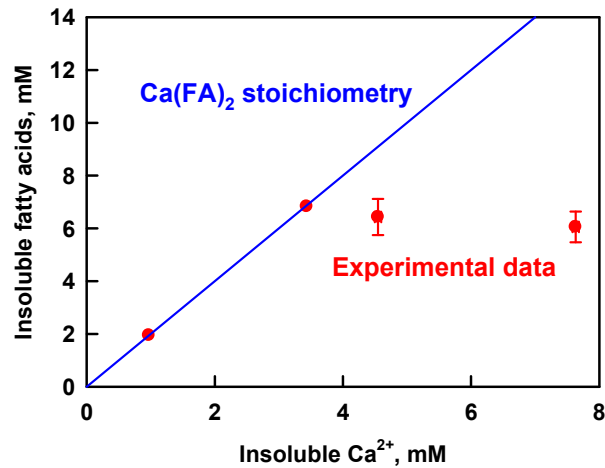


Фигура 3.5. Концентрация на олеинова+линолова киселина (сини квадрати), на стеаринова киселина (зелени триъгълници) и на палмитинова киселина (червени точки), като функция на концентрацията на калций, в пълната проба (пълни символи) и в пермеата след филтруване (празни символи), получени след липолиза на емулсия от какаово масло. Стойностите са усреднени от поне два независими експеримента.

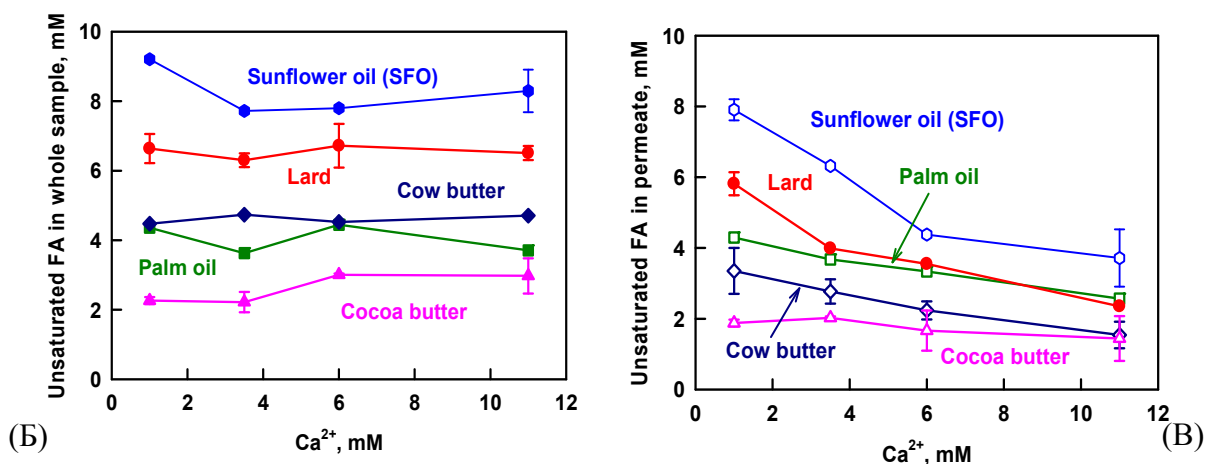
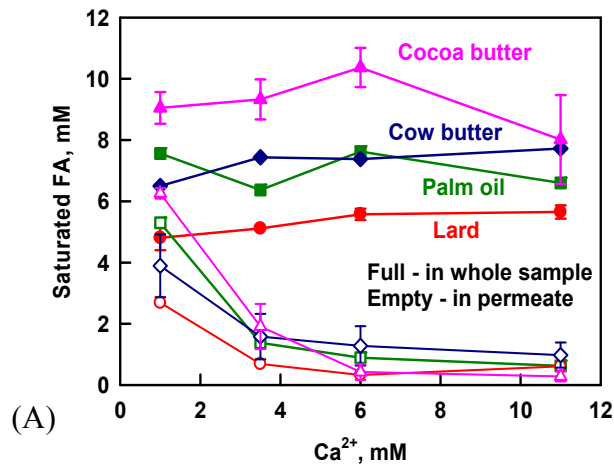
Противоположна зависимост се наблюдава за солубилизираните МК в смесените мицели (т.е в пермеата) - концентрациите на PAc и StAc намаляват значително с повишаване на C_{Ca} , от 3.1 mM StAc и 3.5 mM PAc при $C_{Ca} = 1$ mM, до 0.4 mM StAc и 0.4 mM PAc при $C_{Ca} \geq 6$ mM. Независимо от голямата солубилизация на PAc и StAc при ниски концентрации на калций, много малко от тях остават солубилизирани при високите C_{Ca} . За разлика от наситените МК, концентрацията на ненаситените МК в пермеата остава около 1.5 mM при всички изследвани C_{Ca} , т.е повечето ненаситени МК остават солубилизирани дори при високите C_{Ca} .

За да проверим дали намалението в солубилизацията на наситените МК се дължи на утаяване на калциеви сапуни, измерихме концентрацията на Ca^{2+} в пермеата с ААС (Глава 2, раздел 2.2.15). Фигура 3.6 представя зависимостта на утаените [МК в утайката, след центрофугиране] от концентрацията на неразтворимия Ca^{2+} (пресметнат от разликата [Ca^{2+} в пълната проба] – [Ca^{2+} в серума]). Вижда се, че до концентрация на калциеви йони 3.5 mM има много добра корелация между концентрациите на преципитирани МК и калций, което потвърждава образуването на калциеви сапуни. Наклонът на кривата показва, че при концентрация на калций до 3.5 mM стехиометрията на преципитатите е $Ca(MK)_2$, както се очаква за сапуните, образувани от МК и калциевите йони.

Трябва да отбележим, че не всички МК са преципитирани дори при най-високата $C_{Ca} = 11$ mM (Фигура 3.5). Това може да се дължи на наличието на друг калций-свързващ компонент в реакционната смес: бикарбонатните аниони и ЖК (Jones et al. 1986; Gu et al. 1992). Поради това, че калциевите йони участват в няколко реакции, те могат да преципитират само определена част от наличните МК.



Фигура 3.6. Концентрация на неразтворимите МК (определена в утайката, след центрофугиране), като функция на концентрацията на неразтворимия Ca²⁺ (пресметнат от разликата [Ca²⁺ в пълната проба] – [Ca²⁺ в серума]), след липолиза на емулсия от какаоово масло. Стойностите са усреднени от поне два независими експеримента.

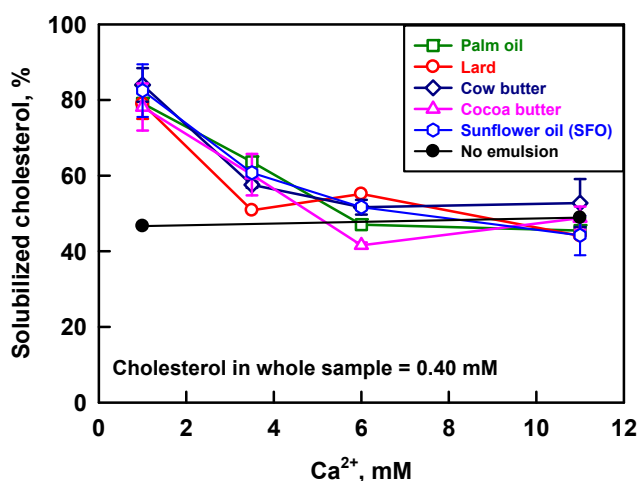


Фигура 3.7. Концентрация на (А) наситените МК в пълната проба (пълни символи) и в пермеата след филтруване (празни символи), (Б) ненаситените МК в пълната проба и (В) ненаситените МК в пермеата след филтруване, като функция на концентрацията на калций, получени след липолиза на емулсия от: какаоово масло (розови триъгълници), палмово масло (зелени квадрати), краве масло (тъмни сини ромбове), свинска мас (червени точки) и слънчогледово масло (сини хексагоми). Стойностите са усреднени от поне два независими експеримента.

На Фигура 3.7 са представени резултатите за зависимостта на сумата от всички наситени или ненаситени МК от концентрацията на калций, за всички изследвани масла. Най-важните резултати от тези експерименти могат да бъдат обобщени по следния начин:

- Концентрацията на наситени МК в агрегатите с размер < 200 nm намалява значително с повишение на концентрацията на Ca^{2+} и достига гранична стойност от около 0.5-1 mM при $C_{\text{Ca}} \geq 6$ mM за всички изследвани масла, виж Фигура 3.7;
- Концентрацията на ненаситени МК в тези агрегати също намалява с увеличение на Ca^{2+} , но не достига гранична стойност до 11 mM Ca^{2+} ;
- Наситените МК се утаяват преференциално от калция, в сравнение с ненаситените МК.
- Намалението в солубилизацията на МК се дължи на образуването на неразтворими сапуни калций-МК.

Наред със солубилизацията на наситените и ненаситените мастни киселини изследвахме и влиянието на калциевите йони върху солубилизацията на холестерол. Холестеролът в нашите експерименти произлиза от жлъчния екстракт и концентрацията му в пълната проба е винаги 0.40 mM. Солубилизираният холестерол в пермеата (CH_{perm}) е даден в проценти, пресметнат като отношението [СН в пермеата / СН в пълната проба]. На Фигура 3.11 са представени резултатите за солубилизацията на холестерол като функция на концентрацията на Ca^{2+} . Вижда се, че солубилизацията на холестерол намалява значително от $\approx 80\%$ до 47% с повишение на C_{Ca} , при всички изследвани масла. Солубилизационният капацитет на разтвора на ЖК, по отношение на холестерола, определихме с експерименти в отсъствие на емулсия и ензими (т.е в отсъствие на маслена фаза и реакционни продукти). Резултатите показаха, че солубилизационният капацитет на разтвора на ЖК е $\approx 47\%$ и не се влияе от концентрацията на Ca^{2+} в отсъствие на реакционни продукти, докато в присъствие на реакционни продукти (МК и МГ) наблюдаваме увеличение в солубилизацията на холестерол (до 80%) при ниски C_{Ca} .



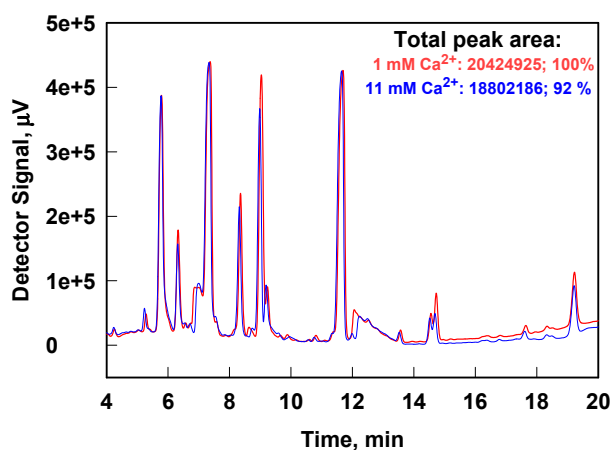
Фигура 3.11. Проценти солубилизиран холестерол в пермеата, като функция на концентрацията на Ca^{2+} , след липолиза на емулсия от: какаово масло (розови триъгълници), палмово масло (зелени квадрати), краве масло (тъмно сини ромбове), свинска мас (червени точки), слънчогледово масло (сини хексагони) или в отсъствие на емулсия (черни точки). Стойностите са усреднени от поне два независими експеримента.

В изследването на Vinarov et al. (2012) е показано, че повишението на концентрацията на холестерол в пермеата над солубилизационния капацитет на разтвора на ЖК се дължи на присъствието на МК, които ко-солубилизират с холестерола в жлъчните мицели. Това е в съгласие с резултатите и на други автори, които демонстрират, че солубилизацията на холестерол в моделни смеси ЖК-фосфолипиди се увеличава в присъствие на МК (Simmonds et al. 1967; Montet et al. 1979).

За да изследваме по-детайлно процеса на солубилизация на холестерол, проведохме допълнителни експерименти, при които повишихме концентрацията на холестерол в пълната проба от 0.40 до 0.85 mM, при $C_{Ca} = 1$ mM и $C_{Ca} = 11$ mM. В тези експерименти използвахме какаово и слънчогледово масло. Допълнителното количество холестерол добавяхме в разтвора на ЖК. Резултатите показаха, че повишението на C_{Ca} предизвиква двукратно намаление в концентрацията на холестерол в пермеата, както при експериментите, проведени при по-ниска концентрация на холестерол в пълната проба. Следователно можем да направим заключението, че повишението на концентрацията на Ca^{2+} от 1 до 11 mM води до значително намаление в солубилизацията на холестерол в агрегатите с размер < 200 nm, независимо от използваното масло (наличие на наситени МК между 13 и 65 %) или от тоталната концентрация на холестерол в пълната проба (варирана между 0.40 и 0.85 mM).

При условията на нашия експеримент по липолиза ($pH = 6.2$ до 7.5 , $T = 37$ °C), жлъчните киселини (ЖК) са в йонизирана форма и образуват мицеларни разтвори (Hofmann & Mysels 1988). Поради отрицателния си заряд обаче, могат да преципитират в присъствие на калций (Hofmann & Mysels 1992). Такова утаяване може драстично да намали солубилизационния капацитет на реакционната смес и би могло да обясни наблюдаваното намаление в солубилизацията на МГ и холестерола.

За да проверим това, определихме концентрацията на жлъчните киселини в пермеата при $C_{Ca} = 1$ и 11 mM, чрез ВЕТХ, Фигура 3.12. Резултатите показват, че калцият не повлиява площта на пиковите на основните ЖК. Следователно, наличието на калций в концентрации между 1 и 11 mM не предизвиква утаяване на ЖК за времето на нашия експеримент по липолиза (4.5 h).



Фигура 3.12. ВЕТХ хроматограма на жлъчните киселини в пермеата в присъствие на 1 mM Ca^{2+} (червена линия) или 11 mM Ca^{2+} (синя линия), след липолиза на емулсия от какаово масло.

3.2. Механизъм на намаляване на солубилизацията на холестерол от Ca^{2+} .

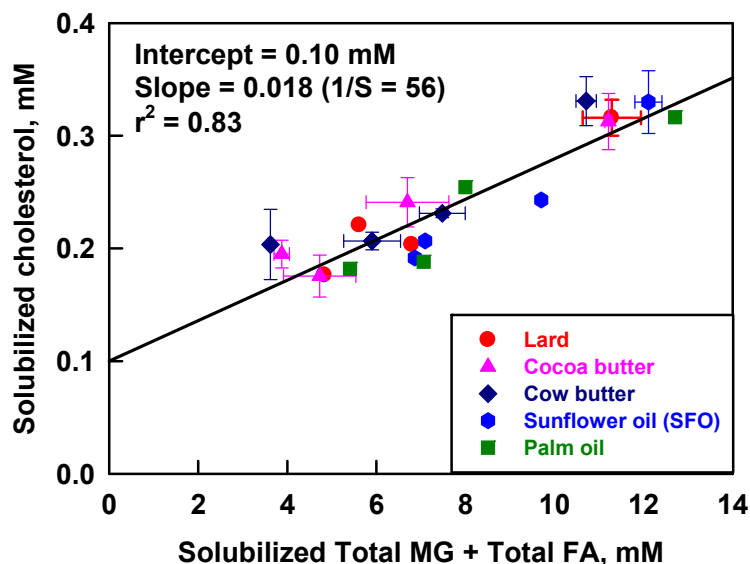
Молекулният механизъм, който води до значително намаление в солубилизацията на холестерол при повишение в концентрацията на калций не е очевиден, поради това че молекулата на холестерола е незаредена и не се преципитира директно от калция.

Има два принципно различни възможни механизми, които могат да обяснят наблюдаваното явление. Основната разлика между тези два механизма е начина на утаяване на холестерол от Ca^{2+} .

Механизъм 1 предполага, че калцият утаява първо жлъчните киселини (които определят солубилизационния капацитет на водната фаза) и така намалява количеството на солубилизирани холестерол, МК и МГ, но ние устаховихме, че над 90 % от жлъчните киселини остават разтворими, дори при най-високата изследвана концентрация на калций от 11 mM. Следователно, маханизъм 1 не е валиден за изследваните системи.

Механизъм 2 предполага, че калцият намалява солубилизационния капацитет на реакционната смес чрез намаление в концентрациите на солубилизирани МК и МГ, които подпомагат солубилизацията на холестерол. Ако е валиден този механизъм трябва да има корелация между солубилизираните холестерол и МГ и/или МК в края на липолизния процес.

Затова построихме зависимостите на солубилизирания холестерол от: концентрациите на солубилизирани ненаситени и/или наситени МК и/или МГ. Най-добра корелация се наблюдава за зависимостта на солубилизирания холестерол от общите солубилизирани МК+МГ (корелационен коефициент $r^2 = 0.83$), Фигура 3.15.



Фигура 3.15. Концентрация на солубилизирания холестерол в пермеата като функция на сумата [солубилизирани общи МГ + солубилизирани общи МК], след липолиза на емулсия от: какаово масло (розови триъгълници), палмово масло (зелени квадрати), краве масло (тъмни сини ромбове), свинска мас (червени точки), слънчогледово масло (сини хексагони) при различни концентрации на Ca^{2+} йони. Стойностите са усреднени от поне два независими експеримента.

На базата на проведените експерименти можем да направим заключението, че калцият намалява солубилизацията на холестерол главно чрез намаляване на концентрацията на солубилизираните МК и МГ в смесените мицели. Последното твърдение е в съгласие с резултатите от изследването на Vinarov et al. (2012) и с тези на Devraj et al. (2013), които показват че високите концентрации на калций могат да утаят МК, образувани по време на *in vitro* липолиза, което води до намалена солубилизация на хидрофобни лекарства в сместа жлъчни киселини+реакционни продукти.

3.3. Основни резултати и заключения от изследванията в глава 3.

Проведено е системно експериментално изследване на влиянието на калциевите йони върху солубилизацията на липолизните продукти, получени при ензимна хидролиза на емулсии от пет масла, с различен мастнокиселинен състав в смесените мицели на жлъчните киселини и реакционните продукти. Основните заключения са:

- За всички изследвани условия е установена пълна хидролиза на ТГ ($\alpha > 80\%$). Основните реакционни продукти са мастни киселини и моноглицериди, докато концентрацията на нетрансформираните диглицериди е много ниска.
- Солубилизацията на холестерол, мастни киселини (МК) и моноглицериди (МГ) намалява с нарастване на C_{Ca} , за всички изследвани масла.
- Концентрацията на солубилизираните наситени МК намалява в по-голяма степен (4 до 10 пъти) от концентрацията на ненаситените МК (намаление 2 до 3 пъти). Това показва, че наситените МК се утаяват преференциално от Ca^{2+} .
- При $C_{Ca} \geq 6$ mM, концентрацията на солубилизираните наситени МК достига стойност от 0.5 до 1 mM, независимо от източника на МК или дължината на веригата (C_{14} до C_{18}).
- Солубилизираният холестерол нараства значително със солубилизираните МК и МГ. Приблизително 50 молекули МК и МГ (в молно съотношение 1:1) ко-солубилизират 1 молекула холестерол в проведените експерименти по *in vitro* липолиза.
- Подобен ефект за ко-солубилизация на холестерола с МК и МГ наблюдавахме и с моделни смеси на жлъчни киселини+МК+МГ+холестерол, но без количествено съответствие с експериментите по *in vitro* липолиза. Последното сравнение показва, че солубилизацията на холестерол в такива сложни смеси зависи от конкретния начин на приготвянето им.

Най-важното заключение от настоящето изследване е, че калцият, приет с храната, намалява концентрацията на холестерол в кръвната плазма по два допълващи се механизма: (1) чрез намаляване на биодостъпността на холестерол в червата и (2) чрез намаление в абсорбцията на наситени МК, което от своя страна редуцира синтеза на холестерол в черния дроб (Glatz & Katan 1993).

Глава 4. Механизми на намаление на солубилизацията на холестерол и наситени мастни киселини от *Quillaja Saponaria*.

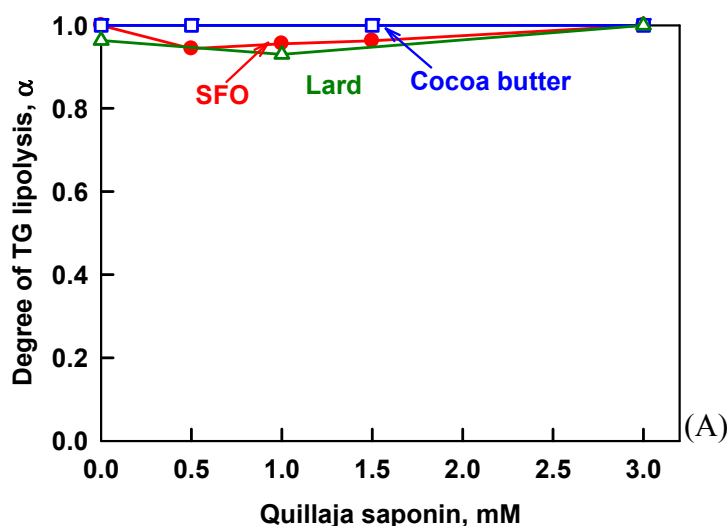
Получените в тази глава от дисертацията резултати и заключения са използвани като отправна точка в следващата глава 5 от дисертацията, където изследвахме как различни сапонинови екстракти влияят върху солубилизацията на холестерол *in vitro* и върху абсорбцията на холестерол *in vivo*.

За провеждане на експериментите в тази глава използвахме два вида *Quillaja* екстракти: *Quillaja Dry 100 NP (QD)* и *SuperSap* (предоставени от *Desert King Co.*, Чили). *QD* екстрактът съдържа: 26 wt % сапоници (определено от производителя с *BETH*), 1.25 wt % Ca^{2+} (определени чрез *AAC*), полифеноли, фенолни киселини и полизахариди (*FAO 2004*). Вторият екстракт, *SuperSap*, съдържа 90 % сапоници и е безцветен.

4.1. Ефект на *Quillaja Dry (QD)* върху ТГ липолиза.

За да изследваме системно ефекта на *QD* върху липолизата както на наситени, така и на ненаситени масла, проведохме експерименти с три вида масла с различен състав на мастните киселини в тях: слънчогледово масло (18 % наситени МК), свинска мас (41 % наситени МК) и какаово масло (85 % наситени МК).

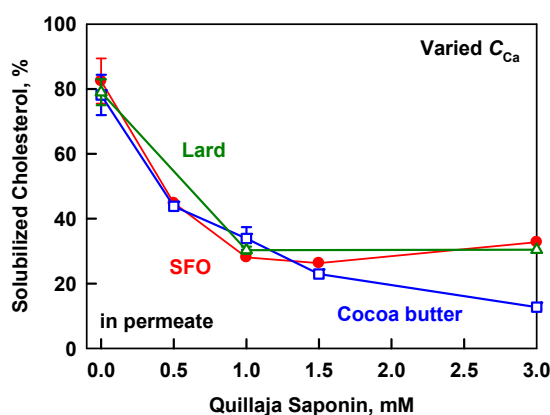
На Фигура 4.1А са представени резултатите за степента на ТГ липолиза като функция на концентрацията на *Quillaja* сапоници за изследваните масла. Вижда се, че ТГ хидролиза протича напълно, $\alpha \approx 1$, за всички изследвани масла, при всички изследвани концентрации на *QD* (от 0 до 3 mM сапоници).



Фигура 4.1. Степен на ТГ липолиза, α , като функция на: (А) концентрацията на *Quillaja* сапоници, за емулсии от слънчогледово масло (червени точки), какаово масло (сини квадрати) и свинска мас (зелени триъгълници).

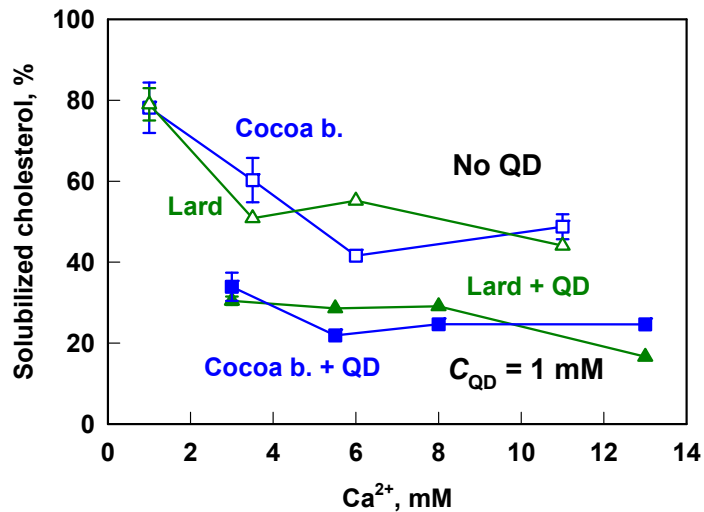
4.2. Ефект на Quillaja Dry върху солюбилизацията на липофилни компоненти.

Изследвахме ефекта на QD върху солюбилизацията на холестерол в пермеата, след липолиза на слънчогледово, какаово масло и свинска мас. Солюбилизацията на холестерол (СН) е дадена в проценти, пресметнати от отношението [СН в пермеата] / [СН в пълната проба]. Зависимостта на фракцията солюбилизиран холестерол в пермеата от концентрацията на QD, C_{QD} , за изследваните масла е представена на Фигура 4.3. Вижда се, че солюбилизацията на холестерол значително намалява с увеличаване на C_{QD} . Ефектът е най-изразен за какаово масло, където солюбилизацията на холестерол намалява от $\approx 80\%$ (в отсъствие на QD) до $\approx 15\%$ (при най-високата концентрация на QD от 3 mM).



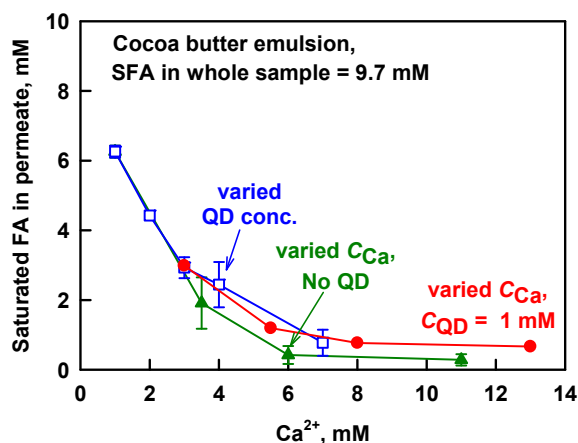
Фигура 4.3. Солюбилизирания холестерол в пермеата като функция на концентрацията на Quillaja сапонини, след липолиза на емулсии от слънчогледово масло (червени точки), какаово масло (сини квадрати) и свинска мас (зелени триъгълници). Концентрацията на холестерол в пълната проба е 0.4 mM. Всички стойности са усреднени от поне два независими експеримента.

Резултатите представени в Глава 3 от настоящата дисертация показват, че солюбилизацията на холестерол намалява с повишение на концентрацията на Ca^{2+} , поради намалената солюбилизация на МК и МГ. За да проверим каква част от ефекта на QD екстракта върху солюбилизирания холестерол се дължи на наличието на калциеви йони в него сравнихме резултатите от Фигура 4.3, получени в присъствие на QD и Ca^{2+} с резултатите, представени в предходната глава на дисертацията, които са получени само в присъствие на Ca^{2+} . Сравнението е показано на фиг. 4.4. Вижда се, че намалението на холестерола в присъствие на QD е много по-силно изразено от намалението в отсъствие на QD. Оттук можем да направим заключение, че значителното понижение на холестерола се дължи основно на активния компонент в екстракта (сапонини или полифеноли), докато приносът на Ca^{2+} йони, съдържащи се в този екстракт е по-малък.



Фигура 4.4. Солюбилизирания холестерол в пермеата като функция на (Б) концентрацията на Ca^{2+} за емулсии от какаово масло (сини квадрати) и свинска мас (зелени триъгълници), в присъствие (пълни символи) или отсъствие (празни символи) на QD. Концентрацията на холестерол в пълната проба е 0.4 mM. Наличието на Ca^{2+} йони в QD е отчетено. Всички стойности са усреднени от поне два независими експеримента.

Определихме и концентрацията на солюбилизираните мастни киселини в пермеат при различни концентрации на QD. Отново наблюдавахме значително понижени на концентрацията на МК с увеличаване концентрацията на QD в разтвора. За да проверим дали намалението в солюбилизацията на МК се предизвиква от калция, който се съдържа в QD екстракта, построихме зависимостта на концентрацията на МК в пермеата, като функция на C_{Ca} (1 mM QD набавя 2 mM Ca^{2+}), като добавихме и резултатите от експерименти, в които сме променяли C_{Ca} в отсъствие или в присъствие на 1mM QD (Фигура 4.7). Вижда се, че кривите за различните серии от експерименти попадат на една обща крива, което означава, че намалената солюбилизация на наситени МК в присъствие на QD екстракт се дължи на Ca^{2+} йони, съдържащи се в екстракта.



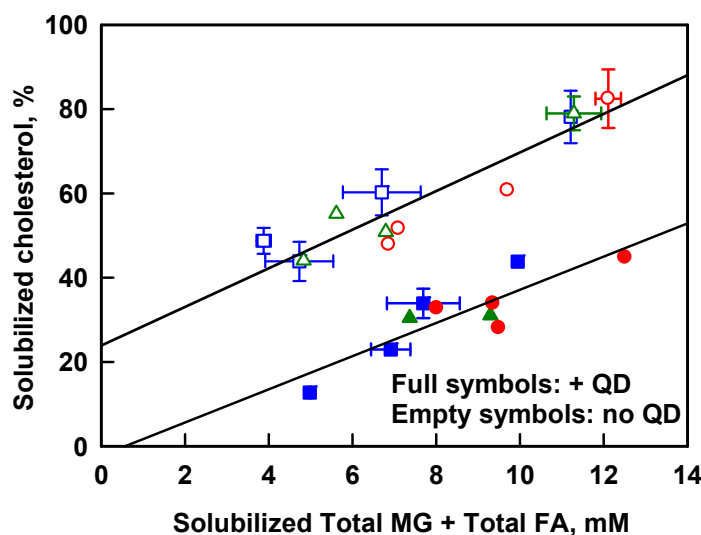
Фигура 4.7. Концентрация на солюбилизираните наситени МК, като функция на C_{Ca} за експерименти, проведени при различни концентрации на QD (сини квадрати), при различни C_{Ca} в отсъствие на QD (зелени триъгълници) или при различни C_{Ca} в присъствие на 1 mM QD (червени точки). 1 mM екстракт QD съдържа 2 mM Ca^{2+} йони. Всички данни са получени след липолиза на емулсия от какаово масло и стойностите са усреднени от поне два независими експеримента.

4.3. Механизъм на намаляване на солюбилизацията на холестерол от *Quillaja Saponaria* екстракт.

4.3.1. Механизъм на намаляване на солюбилизацията на холестерол от QD.

В Глава 3 от дисертацията показахме, че увеличението в солюбилизацията на МК или МГ води до съответно увеличение в солюбилизацията на холестерол. Тъй като QD намалява концентрацията на солюбилизирани МК (както показахме в раздел 4.2.2) поради съдържанието на Ca^{2+} йони в екстракта, изследвахме ролята на този ефект върху солюбилизацията на холестерол.

От данните на Фиг. 4.13 се вижда, че има добра корелация между концентрациите на солюбилизирани холестерол и солюбилизирани МК+МГ, което означава че тези вещества ко-солюбилизират в малките мицели на жлъчните киселини. Добавянето на QD намалява отреза на зависимостта, което пък показва, че екстрактът намалява солюбилизацията на холестерол, независимо от наличието на МК или МГ.

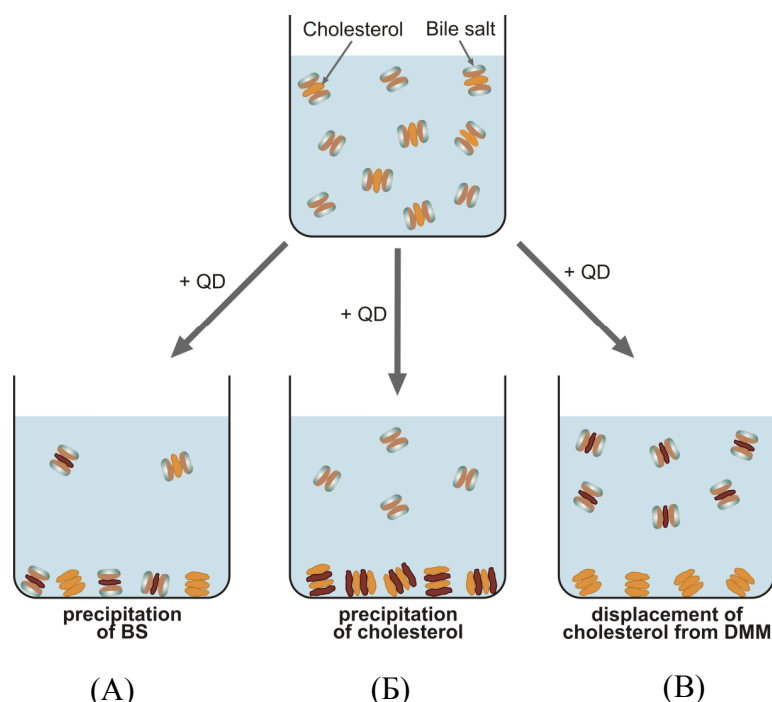


Фигура 4.13. Солюбилизираният холестерол като функция на солюбилизирания МК+МГ в пермеата, в отсъствие на QD (празни символи) и в присъствие на QD (пълни символи), получени след липолиза на емулсия от какаово масло (сини квадрати), свинска мас (зелени триъгълници) и слънчогледово масло (червени точки). Концентрацията на холестерол в пълната проба е 0.4 mM.

На базата на тези експериментални резултати можем да направим заключение, че QD екстрактът намалява солюбилизацията на холестерол чрез два допълващи се ефекта. От една страна, калциевите йони, съдържащи се в екстракта утаяват МК и така намаляват солюбилизацията на холестерол. От друга страна, QD екстрактът притежава специфична способност да намалява солюбилизацията на холестерол, което не е свързано с първия ефект. Комбинацията от тези два ефекта правят QD екстракта толкова ефективен в намаляването на солюбилизацията на холестерол в нашите *in vitro* експерименти.

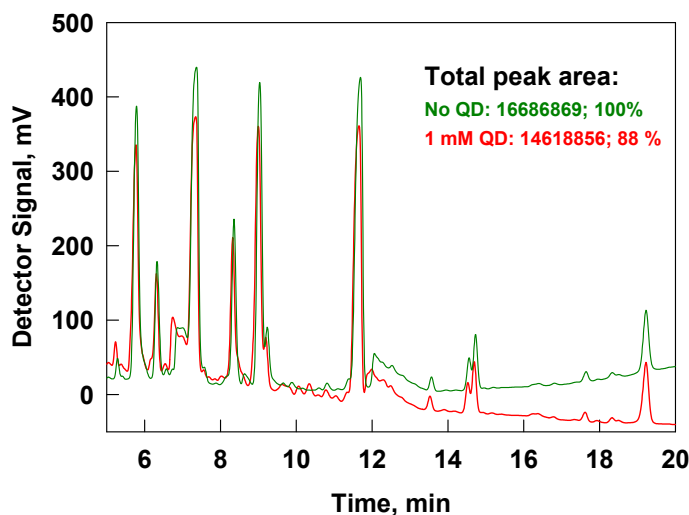
Възможните механизми за специфичния ефект на QD върху солюбилизацията на холестерол са показани схематично на Фигура 4.14. Основната разлика между тези три

механизма е начина на утаяване на холестерол от QD. Механизъм 1 предполага, че QD екстрактът утаява жлъчните киселини, в резултат на което солубилизационният капацитет на водната фаза намалява и излишният холестерол се утаява. Механизъм 2 предполага, че QD екстрактът образува неразтворими комплекси с холестерола и по този начин го утаява. Механизъм 3 предполага, че QD екстрактът измества холестерола от смесените мицели и по този начин предизвиква утаяването му. С други думи, и трите механизма ще доведат до съществено утаяване на холестерол.



Фигура 4.14. Схематично представяне на трите възможни механизма на утаяване на холестерол: (А) Активният компонент в QD екстракта утаява жлъчните киселини, в резултат на което солубилизационния капацитет на водната фаза намалява и излишният холестерол се утаява. (Б) Активният компонент в QD екстракта има много силен афинитет към холестерола, при което се образуват смесени преципитати. (В) Активният компонент в QD екстракта има много силен афинитет към смесените мицели и успява да измести холестерола от тях. В резултат на това изместеният холестерол се утаява, поради много ниската си разтворимост във вода.

За да изясним по кой от тези три механизма се утаява холестерола, проведохме допълнителни експерименти. За да проверим дали механизъм 1 е валиден, анализирахме концентрацията на ЖК в пермеата с ВЕТХ, в отсъствие и в присъствие на 1 mM QD, след липолиза на какаово масло. Резултатите са показани на Фигура 4.15. Вижда се, че тоталната концентрация на ЖК в пермеата намалява само с около 12 %, докато при тази концентрация на QD наблюдавахме значително намаление в солубилизацията на холестерол (от $\approx 80\%$ до 33% , виж Фигура 4.3). Толкова слабо намаление в концентрацията на ЖК в пермеата ($\approx 12\%$) не може да обясни 2.5-кратното намаление в солубилизацията на холестерол.



Фигура 4.15. ВЕТХ хроматограма на жлъчните киселини в пермеата в отсъствие (зелена линия) и в присъствие (червена линия) на 1 mM QD. Общото намаление в площта на пиковите в хроматограмата, в резултат на добавянето на QD е само 12 %.

За да изясним с кой от другите два механизма се обяснява ефекта на QD върху солюбилизацията на холестерол, проведохме експерименти при две различни концентрации на ЖК, при постоянна концентрация на QD и холестерол. В случай, че холестеролът се утаява директно, поради силното взаимодействие с компонентите в QD (механизъм 2), солюбилизацията му няма да се промени при повишаване на концентрацията на ЖК. От друга страна, ако солюбилизацията на холестерол се увеличи при повишение на концентрацията на ЖК, това би означавало, че по-високата концентрация на смесени мицели ще подпомогне солюбилизацията на холестерол, което потвърждава механизъм 3 (компонентите в QD изместват холестерола от смесените мицели).

Допълнителните експерименти проведохме с какаово масло, при две различни концентрации на ЖК (15 и 30 mM) и при постоянна концентрация на QD (1 mM) и на холестерол (0.8 mM) в пълната проба. Получените резултати показаха, че солюбилизацията на холестерол се увеличава от 0.17 до 0.24 mM при двукратно увеличение в концентрацията на ЖК от 15 до 30 mM. Това съответства на увеличение в солюбилизацията на холестерол от 21 до 29 %, което е по-малко от очакваното двукратно увеличение, ако само механизъм 3 е в сила.

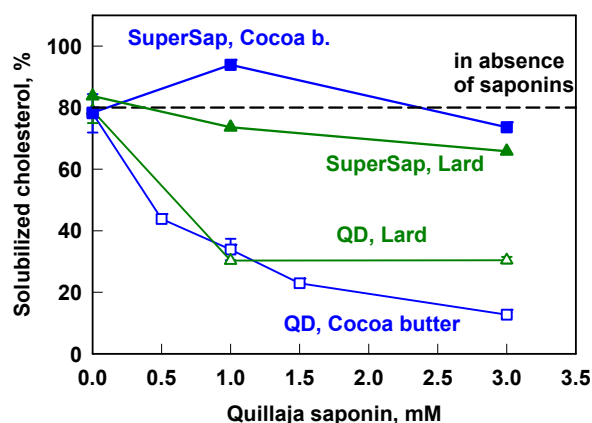
На базата на тези експериментални резултати можем да заключим, че и двата механизма 2 и 3 имат значение за наблюдаваното намаление в количеството на солюбилизирания холестерол.

4.3.2. Определяне на активния компонент в QD екстракта, предизвикващ изместване на холестерол от смесените мицели.

Quillaja Dry 100 NP е не-пречистен екстракт от *Quillaja Saponaria*, съдържащ 26 wt % сапонини, 1.2 wt % Ca^{2+} и голямо разнообразие от други химични съединения (полифеноли, фенолни киселини, полизахариди, и др.) в неизвестни концентрации (FAO 2004).

За да установим на кой от компонентите в екстракта се дължи наблюдаваното намаление в солубилизацията на холестерол, проведохме допълнителни експерименти с екстракт на Quillaja сапонини с висока чистота, който съдържа > 90 % сапонини и намира приложения във фармацията (с търговското наименование SuperSap) и с полифеноли, които отделихме от не-пречистения QD екстракт по процедура, описана в дисертацията.

Фигура 4.16 представя експерименталните резултати за солубилизацията на холестерол, след липолиза на какаово масло и свинска мас, в присъствие на 1 и 3 mM сапонини от SuperSap. Вижда се, че солубилизацията на холестерол не се променя в присъствие на SuperSap, за разлика от QD екстракта, който намалява солубилизирания холестерол от 80 % до 15 % и за двете изследвани масла.

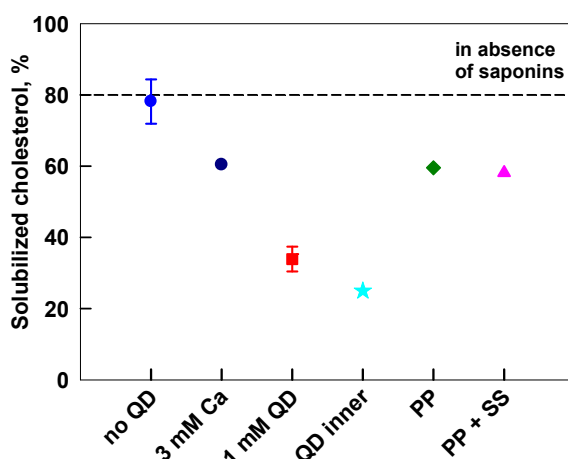


Фигура 4.16. Солубилизираният холестерол в пермеата, като функция на концентрацията на Quillaja сапонини в не-пречистения QD екстракт (празни символи) и в пречистения SuperSap екстракт (пълни символи), след липолиза на емулсия от какаово масло (сини квадрати) и свинска мас (зелени триъгълници). Концентрацията на холестерол в пълната проба е 0.4 mM. Всички стойности за QD са усреднени от поне два независими експеримента.

За да проверим дали другият основен клас молекули, присъстващи в QD екстракта, а именно полифенолите (ПФ) са отговорни за наблюдавания ефект върху холестерола, проведохме експерименти с отделените от QD екстракта полифеноли. Тоталното съдържание на ПФ в получения QD диализат определихме спектрофотометрично (Singleton & Rossi 1965). Резултатите сравнихме с остатъчното количество на ПФ в разтвора в диализната клетка и определихме, че успешно сме отделили $\approx 80\%$ от ПФ от

сапонините. Останалите 20 % по-високомолекулни ПФ останаха заедно със сапонините в разтвора в диализната клетка, без да преминат през диализната мембрана.

Концентрацията на ПФ в отделения диализат отговаря на тоталните ПФ, съдържащи се в 1 mM QD. Затова изследвахме ефекта на отделените ПФ върху солубилизацията на холестерол в сравнение с 1 mM QD. Намалението на солубилизацията на холестерол от QD екстракта може да се дължи и на комбинацията ПФ + сапонини, затова проведохме експерименти и с изолирани ПФ + 1 mM сапонини от SuperSap. Изследвахме също така и ефекта на компонентите на QD екстракта, задържани в разтвора вътре в диализната клетка (високомолекулни ПФ и сапонини). Получените резултати са представени на Фигура 4.20.



Фигура 4.20. Проценти солубилизиран холестерол в пермеата в отсъствие на QD (синя точка) или в присъствие на: 3 mM калций (тъмно синя точка), 1 mM QD (червен квадрат), вътрешна диализна фаза (светлосиня звезда), външна ПФ фаза (зелен ромб) и външна ПФ фаза + 1 mM SuperSap (розов триъгълник), след липолиза на емулсия от какаово масло. Концентрацията на холестерол е 0.4 mM. Всички стойности за QD са усреднени от поне два независими експеримента.

Вижда се, че добавянето на сапонини от SuperSap към ПФ не повлиява съществено солубилизацията на холестерол. Това означава, че ефектът на ПФ изолат, който съдържа ниско-молекулулните ПФ се дължи на калциевите йони, присъстващи в изолата. От друга страна, високомолекулулните ПФ от вътрешната диализна фаза имат сравним ефект с 1 mM QD екстракт (солубилизиращият холестерол намалява от 60 до 25%) и този ефект не може да се обясни с наличието на калциевы йони.

На базата на получените експериментални резултати можем да направим заключението, че способността на QD екстракта да намалява холестерола, не се дължи на сапонините, а по-скоро е свързана с наличието на най-високомолекулулните полифеноли, които остават в диализната клетка заедно със сапонините. Необходими са допълнителни експерименти с добре разделени ПФ, за да се докаже недвусмислено това заключение.

4.4. Основни резултати и заключения от изследванията в глава 4.

Проведени са *in vitro* изследвания на влиянието на не-пречистен екстракт от *Quillaja Saponaria* (*Quillaja Dry*, QD) върху солубилизацията на холестерол и мастни киселини. Основните заключения могат да се обобщят по следния начин:

- QD екстрактът намалява значително солубилизацията на холестерол в малките смесени мицели (сферични или нишковидни), които могат да преминат през мукусния слой на тънките черва.
- QD екстрактът предизвиква утаяване на холестерол по два възможни механизма, Фигура 4.14: (1) чрез директно утаяване на холестерол от активния компонент в QD екстракта, и (2) чрез изместване на молекулите холестерол от смесените мицели от активния компонент в QD (конкурентна солубилизация на активния компонент и холестерола). Необходими са допълнителни експерименти за да се изясни кой от тези два механизма преобладава.
- Активният компонент в QD екстракта, който намалява солубилизацията на холестерола, не са сапонините, а високомолекулните полифеноли, съдържащи се в екстракта.
- Солубилизацията на наситените мастни киселини в смесените мицели намалява значително в присъствие на QD (от 70 до 10 %). Този ефект се дължи на наличието на висока концентрация на калциеви йони, които образуват неразтворими калциеви сапуни в присъствие на мастни киселини.

Глава 5. Механизъм на намаление на солубилизацията на холестерол от сапонинови екстракти. *In vitro* и *in vivo* изследване.

Настоящата глава 5 от дисертацията е продължение на представеното в миналата глава изследване на механизма на намаление на солубилизацията на холестерол от *Quillaja Saponaria* екстракт. Там установихме, че QD екстракта намалява както солубилизацията на холестерол, така и солубилизацията на мастни киселини. Съществуват, обаче, редица сапонинови екстракти, които все още не са изследвани и не е известно дали притежават хипохолестеролемичен ефект.

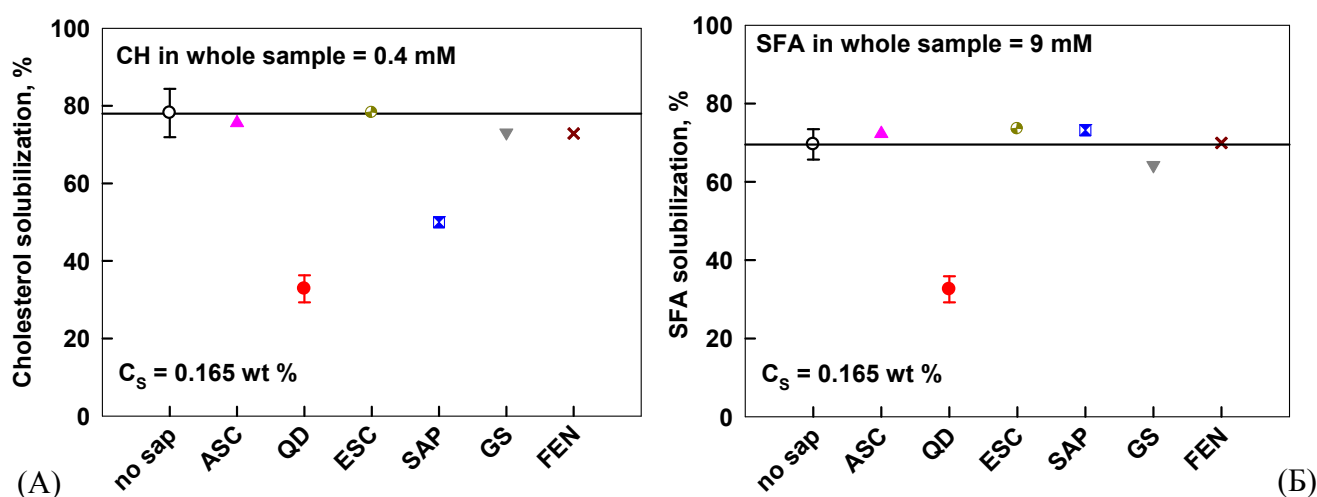
Целта на изследванията, описани в настоящата глава от дисертацията, е да се установи влиянието на сапонинови екстракти върху солубилизацията на холестерол и наситени МК в *in vitro* изследвания и да се провери дали наблюдаваните тенденции *in vitro* се проявяват като реални ефекти върху холестерола в кръвния серум *in vivo*.

5.1. Ефект на сапонинови екстракти върху ТГ липолиза и солубилизацията на холестерол и наситени МК.

Изследвахме влиянието на шест различни сапонинови екстракта: Quillaja Dry (QD), Sapindin (SAP), Aurvedic saponin concentrate (ASC), Ginseng (GS), Escin (ESC), Fenusterols (FEN), които се различават по процентното съдържание на сапонини в тях и по типа на агликона и са подробно в описани в Глава 2 на дисертацията. QD (26 % сапонини), SAP (50 % сапонини), ASC (30 % сапонини), GS (80 % сапонини), ESC (95 % сапонини) са с триперпеноиден тип агликон, а FEN (50 % сапонини) е със стероиден агликон.

5.1.2. Ефект на сапонинови екстракти върху солубилизацията на холестерол и наситени МК.

Резултатите за ефекта на различните сапонинови екстракти върху солубилизацията на холестерол и наситени МК, след хидролиза на какаово масло, са представени на Фиг.5.2. Тези експерименти проведохме при постоянна концентрация на сапонин в реакционната смес от 0.165 wt %. Вижда се, че в отсъствие на сапонини, солубилизираният в смесените мицели холестерол е около 78 %. Два от изследваните сапонинови екстракта намаляват значително солубилизацията на холестерол: QD от 78 % до 33 % и SAP от 78 % до 54 % (Фигура 5.2А). Всички останали изследвани екстракти (ASC, ESC, GS и FEN) не влияят върху солубилизацията на холестерол.

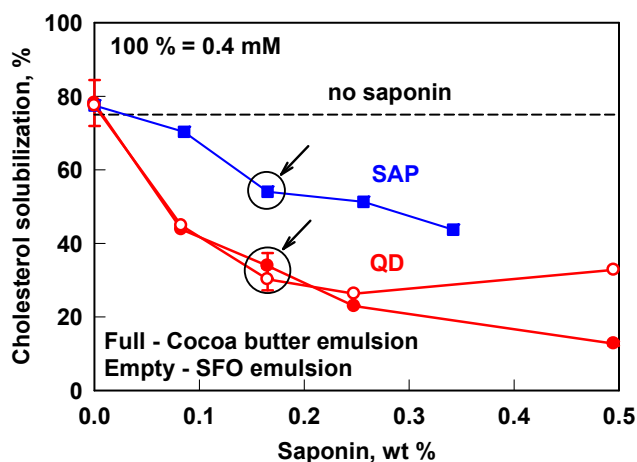


Фигура 5.2. Солубилизация на (А) холестерол и (Б) наситени мастни киселини, след липолиза на емулсия на какаово масло, в отсъствие или присъствие на различни сапонинови екстракти.

Фигура 5.2Б представя резултатите относно ефекта на сапониновите екстракти върху наситените МК. Отново, QD екстрактът намалява значително солубилизацията на наситени МК, от 69 % до 33 %. Всички останали изследвани екстракти (ASC, ESC, SAP, GS и FEN) не променят солубилизацията на наситени МК.

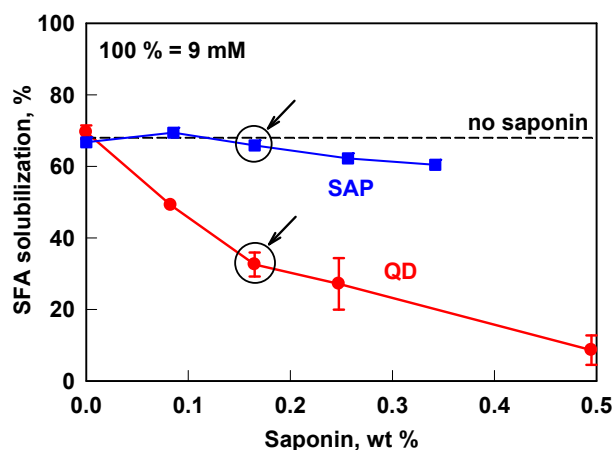
Само два от изследваните екстракти (QD и SAP) показаха значителен ефект върху солубилизацията на холестерол *in vitro* при концентрация на сапонини 0.165 wt %. По тази причина изследвахме ефекта от концентрацията на сапониновите екстракти само за QD и SAP.

На Фигура 5.3 са представени резултатите за ефекта от концентрацията на сапонини върху солубилизацията на холестерол. Вижда се, че увеличението на концентрацията на SAP води до значително намаление в солубилизацията на холестерола, от 78 % до 45 % при най-високата концентрация на SAP сапонини (0.35 wt %). При сравнение на ефектите на двата екстракта при близка тегловна концентрация на сапонини се вижда, че QD екстрактът е доста по-ефективен от SAP в намалението на солубилизацията на холестерол. Механизмите, отговорни за ефектите на изследваните екстракти върху солубилизацията на холестерол са обсъдени в раздел 5.3.



Фигура 5.3. Солубилизация на холестерола като функция на концентрацията на сапонинов екстракт, след липолиза на емулсия от какаово масло, в присъствие на QD (червени точки) и SAP (сини квадрати).

Резултатите за ефекта на QD и SAP върху солубилизацията на наситени МК са представени на Фигура 5.4. Вижда се, че QD екстрактът значително намалява солубилизацията на наситените МК от 69 % до 9 %. Същевременно обаче, SAP екстракт не променя солубилизацията на наситените МК.



Фигура 5.4. Солюбилизация на наситените мастни киселини като функция на концентрацията на сапонинов екстракт, след липолиза на емулсия от какаово масло, в присъствие на QD (червени точки) и SAP (сини квадрати).

В Глава 4 показахме, че ефектът на QD екстракта върху солюбилизацията на наситени МК се дължи на високото съдържание на Ca^{2+} (1.25 wt %), което предизвиква образуване на неразтворими преципитати от Ca^{2+} и наситените МК. От друга страна, екстрактът SAP съдържа само ≈ 0.04 wt % Ca^{2+} (определено чрез ААС, както е описано в раздел 2.2.15), което обяснява липсата на ефект върху наситените МК за този екстракт.

Резултатите за ефекта на QD върху солюбилизацията на наситени МК след липолиза на слънчогледово масло не са показани, тъй като измерената концентрация на наситени МК е много ниска (слънчогледовото масло съдържа по-малко от 13% наситени МК).

На базата на получените експериментални резултати можем да направим следните заключения: (1) SAP екстрактът намалява солюбилизацията на холестерол, като ефекта му е по-слаб от този на QD екстракта; (2) SAP екстрактът не повлиява солюбилизацията на наситените МК; (3) Останалите изследвани сапонинови екстракти (ASC, ESC, GS, FEN) не предизвикват намаление в солюбилизацията нито на холестерол, нито на наситени МК.

5.2. Ефект на сапонинови екстракти върху ТГ и серумния холестерол – *ин vivo* експерименти.

Продължихме изследването на ефектите на сапонинови екстракти чрез провеждане на *ин vivo* експерименти с мишки. Основната цел на тези експерименти е да се провери дали наблюдаваните тенденции *ин vitro* ще се проявяват като реални ефекти върху холестерола в кръвния серум *ин vivo*. В тази част от изследването използвахме само два от сапониновите екстракти: QD и SAP. Избрахме QD екстрактът по следните две причини: (1) екстрактът е одобрен за използване в храни в САЩ (FEMA № 2973) и в Европейския съюз (E999), като стабилизатор на емулсии и пени в хранителната индустрия; и (2) от литературата е известно, че QD екстрактът намалява холестерола в кръвния серум при плъхове (Oakenfull et al. 1984). Експериментите, проведени в присъствие на QD, използвахме като положителна контрола, която да валидира проведените *ин vivo*

експерименти. От друга страна, в литературата липсват данни за ефекта на SAP върху холестерола и наситените МК, както *in vitro*, така и *in vivo*. Наблюдаваният ефект на намаление на солубилизацията на холестерола от SAP се показва за първи път в настоящето изследване.

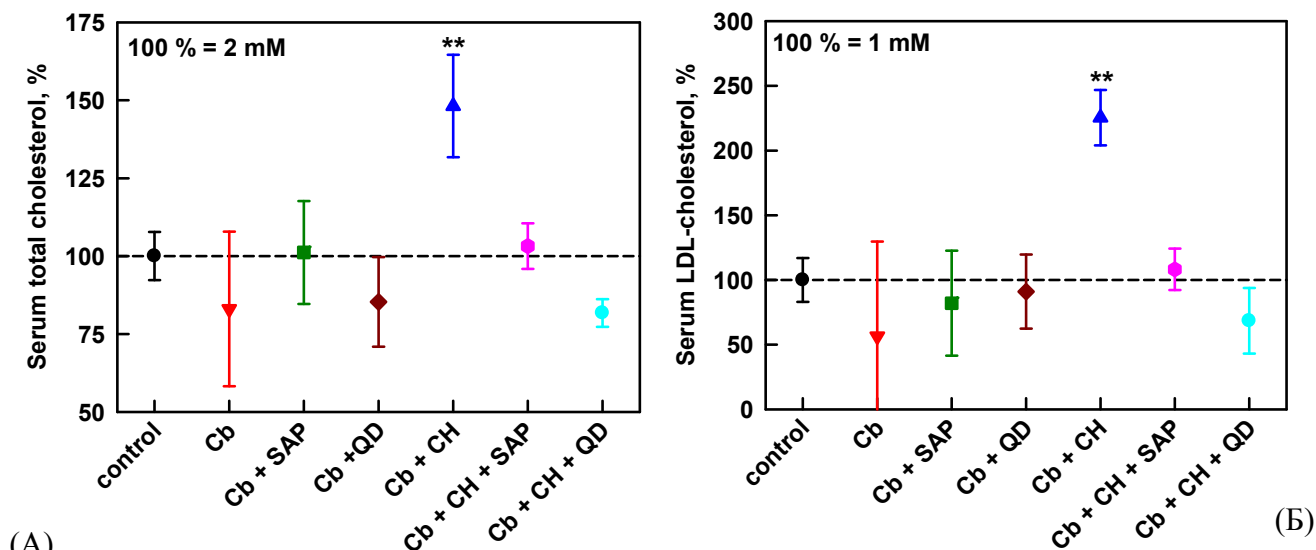
In vivo изследванията проведохме, с мъжки мишки, подложени на експериментална диета (в продължение на 7 дни), обогатена на наситени мазнини, холестерол и/или сапонинов екстракт. Всички експерименти и процедури с животни проведохме в периода от 01.10.2012 до 15.11.2012 г. в Институт по експериментална морфология, патология и антропология с музей при Българска академия на науките (ИЕМПАМ при БАН). Експериментите бяха одобрени от Етичната комисия за експерименти с животни при БАН. По време на *in vivo* експериментите животните бяха разделени на групи и хранени със стандартна храна за гризачи, към която добавяхме: масло, масло+сапонин, масло+холестерол, масло+холестерол+сапонин. Във всички експериментални храни тегловното съотношение сапонин:холестерол беше 10:1, което отговаря на концентрация на сапонини 0.165 wt % в *in vitro* експериментите по липолиза (концентрацията на холестерол *in vitro* беше 0.4 mM = 0.015 wt %). След края на експеримента, отделихме кръв от животните и я анализирахме за серумни липиди: общ холестерол, HDL-холестерол, LDL-холестерол и триглицериди (ТГ).

5.2.2. Влияние на сапонинови екстракти върху серумните липиди.

Животните бяха подложени на експериментална диета в продължение на седем дни, след което анализирахме концентрацията на ТГ, общ холестерол, LDL-холестерол и HDL-холестерол в кръвния им серум. Всички резултати са представени в процент спрямо контролната група, консумирала само стандартна храна за гризачи. Резултатите за всяка група са осреднени от петте животни в групата и съответните стандартни отклонения също са дадени. В този подраздел са показани експерименти в присъствие само на какаово масло, богато на наситени МК.

(А) Серумен холестерол.

На Фигура 5.6 са представени резултатите за общия и LDL-холестерола като функция на типа експериментална диета. Вижда се, че добавянето на какаово масло или какаово масло+SAP към стандартната храна за гризачи не оказва забележим ефект върху общия холестерол, Фигура 5.6А. От друга страна, богатата на холестерол диета води до голямо повишение от около 150 % за общия серумен холестерол. Важно е да се отбележи, че добавянето на SAP или QD към диетата, богатата на холестерол, успешно предотвратява повишението на общия серумен холестерол. За групата, подложена на диета с масло+холестерол+QD се наблюдава тенденция за намаляване на серумния холестерол дори под стойностите за контролната група, но разликата не е статистически значима.



Фигура 5.6. Промяна на (А) общия холестерол и (Б) LDL-холестерола в кръвния серум, като функция на типа експериментална диета: контролната група, хранена със стандартна храна за гризачи (черни точки) и групите, подложени на диета, обогатена на: какаово масло (червени триъгълници), какаово масло+SAP (зелени квадрати), какаово масло+QD (кафяви ромбове), какаово масло+холестерол (сини триъгълници), какаово масло+холестерол+SAP (розови хексагони) и какаово масло+холестерол+QD (светло сини точки).

Ако сравним серумния холестерол на групите, хранени с допълнителен холестерол и тези, хранени с холестерол+сапонини, можем да пресметнем намалението на серумния холестерол от сапониновите екстракти: 45% за QD и 30 % за SAP. Стойността за QD е в съответствие с резултатите от изследването на Oakenfull et al. (1984), където от подобни пресмятания се получава 38 %.

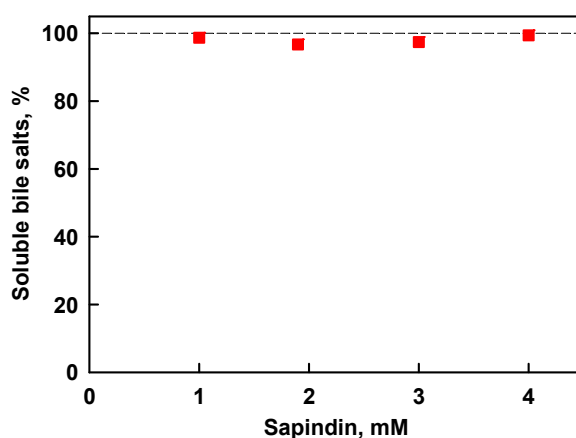
Резултатите за LDL-холестерола следват същите тенденции както тези за общия холестерол, Фигура 5.6Б. При животните подложени на експериментална диета, богата на какаово масло и какаово масло+ SAP не се наблюдава ефект върху LDL-холестерола. Добавянето на холестерол към храната увеличава значително LDL-холестерола (до 225 %, $p < 0.01$), а добавянето на SAP и QD предотвратява хиперхолестеролемичния ефект на богатата на холестерол диета. Подобно на резултатите за общия холестерол, за QD се наблюдава тенденция към намаляване на LDL-холестерола дори под стойностите за контролната група, но отново понижението не е статистически значимо.

На базата на показаните дотук резултати можем да направим следните заключения: (1) Богатата на холестерол диета (без сапонин) води до значително повишение на концентрациите на общия холестерол в серума, (2) Това повишение се дължи основно на повишение на LDL-холестерола, (3) И двата сапонинови екстракта (QD и SAP) могат да възпрепятстват това повишение на общия холестерол и на LDL-холестерола.

5.3. Механизъм на намаление на солубилизацията на холестерол от екстракта на Sapindin.

По-горе показахме, че екстрактите SAP и QD намаляват значително солубилизацията на холестерол както в *in vitro* така и в *in vivo* експериментите. „Липсващият“ холестерол в *in vitro* експериментите открихме в преципитати, които са прекалено големи, за да преминат през мукусния слой на тънките черва. Както и за екстракта на QD и за екстракта на SAP има три възможни механизма, които са схематично представени на фигура 4.11 в Глава 4 от дисертацията. За да изясним по кой механизъм SAP екстракт проявява своя ефект върху солубилизацията на холестерола проведохме допълнителни експерименти.

Първо изследвахме ефекта от концентрацията на SAP върху разтворимостта на ЖК. Експериментите проведохме чрез ВЕТХ анализ на ЖК (Глава 2, раздел 2.2.11) в пермеата, отделен след филтруване. Установихме, че $\approx 100\%$ от ЖК остават разтворими при всички изследвани концентрации на SAP, Фигура 5.10. Оттук можем да направим заключението, че първият механизъм не е този, по който SAP екстракт проявява своя ефект върху солубилизацията на холестерол.

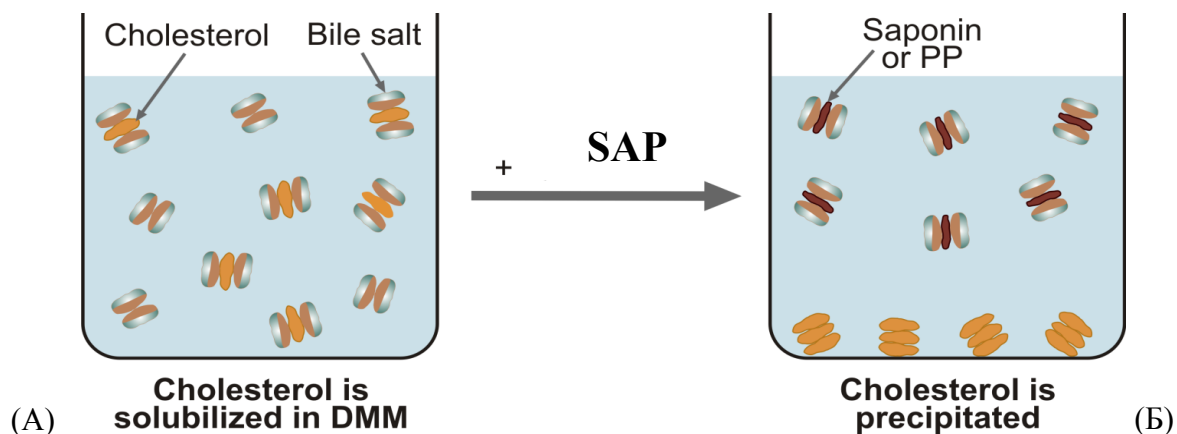


Фигура 5.10. Разтворимост на жлъчните киселини, като функция на концентрацията на SAP, определена *in vitro*. Прекъснатата хоризонтална линия показва концентрацията на жлъчни киселини в отсъствие на сапонини.

За да различим механизъм 2 от механизъм 3, сравнихме ефекта на 0.26 wt % SAP сапонини върху солубилизацията на холестерол при две различни концентрации на ЖК (15 и 30 mM), като поддържахме общата концентрация на холестерол 0.66 mM. Резултатите показаха, че двукратното увеличение в концентрацията на ЖК води до значително увеличение в солубилизацията на холестерол от 0.28 до 0.49 mM. Оттук можем да направим заключението, че механизмът, по който SAP екстракт намалява солубилизацията на холестерол е механизъм 3. В действителност, ако SAP утаява директно холестерола чрез образуване на неразтворими холестерол-сапонин комплекси (механизъм 2), утаяването на холестерола и солубилизацията му трябва да зависят само

от концентрациите на SAP и холестерол, докато концентрацията на ЖК трябва да има незначителен ефект (което е в противоречие с получения експериментален резултат). От друга страна, ако холестеролът се утаява поради изместването му от смесените мицели от компонентите в SAP (механизъм 3), солубилизацията на холестерол би трябвало да нарастне с повишаване на концентрацията на ЖК, както се наблюдава експериментално.

Оттук можем да направим заключението, че SAP екстракт предизвиква утаяване на холестерола чрез изместване на молекулите холестерол от смесените мицели от активния компонент в SAP екстракт, Фигура 5.11.



Фигура 5.11. Схематично представяне на механизма на солубилизация на холестерол: (А) В отсъствие на сапонинови екстракти, молекулите на холестерола са солубилизирани в смесените мицели; (Б) В присъствие на екстракт SAP, молекулите на холестерола са изместени от смесените мицели, от активния компонент в сапониновия екстракт, което води до излишък на холестерол във водната среда и неговото утаяване.

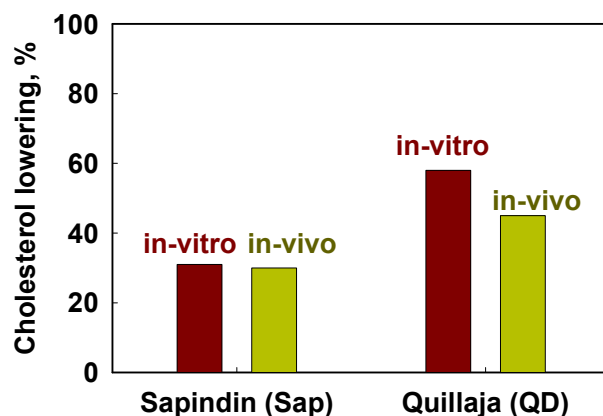
Трябва да отбележим, че в Глава 4 от настоящата дисертация показахме, че активните, холестерол-намаляващи компоненти в QD екстракта са полифенолите (не сапонините). Необходими са допълнителни експерименти, за да се изясни кои са активните компоненти, водещи до намаление на холестерола в присъствие на SAP екстракт в реакционната смес.

5.4. Сравнение на резултатите от *ин витро* и *ин vivo* изследванията.

Смята се, че абсорбцията на холестерол през мембраната на ентероцитите се осъществява както чрез пасивна дифузия, така и чрез рецепторно-медиран транспорт (Wilson 1994; Hauser et al. 1998). За да достигне мембраната на ентероцитите, холестеролът първо трябва да бъде солубилизиран в смесените мицели, изградени от ЖК и фосфолипиди (Woollett et al. 2006). Тези агрегати улесняват преноса на холестерол от чревния лумен, през мукусния слой на тънките черва до ентероцитите. Затова, наблюдаваната корелация между намалената солубилизация на холестерол в смесените мицели в присъствие на сапонинови екстракти и получените по-ниски концентрации серумен холестерол, валидира много добре използваните *ин витро* и *ин vivo* методи.

За да оценим тази *ин vitro-ин vivo* корелация, сравнихме намалението на биодостъпността на холестерола (дефинирана като отношението (в проценти) солюбилизиран холестерол/общ холестерол в реакционната смес и представлява количеството вещество, което е в разтворима форма и е достъпно за абсорбция) и намалението на серумния холестерол, определени в раздели 5.1. и 5.2. Намалението в биодостъпността на холестерола е пресметната спрямо биодостъпността на холестерол в отсъствие на сапонинов екстракт. Намалението на серумния холестерол е сметнато спрямо концентрацията на холестерол за групата, подложена на диета, богата на холестерол (където общия холестерол е повишен).

Както показахме в раздел 5.1. и 5.2., QD екстрактът намалява биодостъпността с 58 % и серумния холестерол с ≈ 45 %. SAP екстрактът съответно намалява биодостъпността с 31 % и серумния холестерол с 30 %. Фигура 5.12 представя сравнение между *ин vivo* и *ин vitro* ефектите на двата сапонинови екстракта. Следователно, имаме много добро полуколичествено съвпадение между биодостъпността на холестерола, определена *ин vitro*, и намалението на серумния холестерол, определено *ин vivo*. Резултатите, получени за QD са и в много добро съгласие с *ин vivo* изследванията с плъхове на Oakenfull et al.1984.



Фигура 5.12. Намаление на биодостъпността на холестерол *ин vitro* (кафяви стълбове) и на серумния холестерол *ин vivo* (зелени стълбове) под действие на SAP и QD.

5.5. Основни резултати и заключения от изследванията в глава 5.

Изследвахме ефекта на 6 сапонинови екстракта върху биодостъпността на холестерол и наситени МК *ин vitro*. От тези 6 екстракта, забележими ефекти наблюдавахме само за QD и SAP екстракти (Фигура 5.2). За тези 2 екстракта определихме липидите в кръвния серум чрез допълнителни *ин vivo* експерименти с мишки.

Основните заключения са както следва:

- QD и SAP намаляват значително солубилизацията на холестерол *ин vitro* (Фигура 5.3).
- Основният механизъм на понижаване на солубилизацията на холестерола от SAP е чрез изместване от смесените мицели, което води до образуването на преципитати от холестерол, които не могат да преминат през мукусния слой на тънките черва.
- Концентрацията на ЖК в смесените мицели се променя много слабо при добавянето на QD и SAP екстракти.
- QD намалява биодостъпността и на наситените МК. Този ефект обяснихме с утаяване на МК от Ca^{2+} йони, които се съдържат в екстракта от QD. SAP не променя биодостъпността на наситените МК, тъй като този екстракт не съдържа Ca^{2+} йони.
- В отсъствие на сапонинови екстракти диета, която е богата на холестерол, значително повишава общия и LDL-холестерола в кръвния серум при мишки. Добавянето на SAP или QD към същата диета предпазва от увеличение на серумния холестерол.
- Установено е добро полу-количествено съвпадение между биодостъпността на холестерол, определена *ин vitro*, и намалението на серумния холестерол, определено *ин vivo*.

Това изследване потвърждава, че *ин vitro* моделите са подходящи за изучаване на биодостъпността на малко-разтворими вещества, като холестерол и наситени МК. Затова тези модели могат успешно да се използват за откриването на нови вещества с холестерол-понижаваща активност. Един пример от това изследване е откриването на хипохолестеролемичния ефект на екстракта Sapindin, който не е изследван в литературата досега.

Основни приноси от дисертацията

1. Експериментално е установено, че солубилизацията на холестерол, мастни киселини и моноглицериди намалява с нарастване на концентрацията на калциеви йони в реакционна смес, моделираща чревната течност в храносмилателния тракт. Потвърдено е, че основният механизъм, посредством който калциевите йони намаляват солубилизацията на холестерол в смесените мицели на жлъчни киселини и реакционни продукти, е чрез утаяване на основните реакционни продукти (мастните киселини и моноглицеридите).
2. Експериментално е установено, че активният компонент в екстракта *Quillaja Dry*, който предизвиква утаяване на холестерол, не са сапонините, а високомолекулните полифеноли, съдържащи се в този екстракт. Допълнително е показано, че солубилизацията на наситените мастни киселини в смесените мицели намалява значително в присъствие на *Quillaja Dry* поради наличието на калциеви йони с висока концентрация в този екстракт.
3. Открит е нов сапонинов екстракт (Sapindin), който намалява солубилизацията на холестерол *in vitro* и предпазва от увеличение на серумния холестерол при *in vivo* експерименти с мишки. Установена е добра полуколичествена корелация между биодостъпността на холестерол, измерена *in vitro*, и намалението на серумния холестерол, определено *in vivo*. Експериментално е показано, че Sapindin измества холестерола от смесените мицели, което води до утаяването му от реакционната смес.

Литература

Списък на публикациите по дисертацията

- Д1. Vinarova L., Vinarov Z., Atanasov V., Pantcheva Iv., Tcholakova S., Denkov N., Stoyanov S. Lowering of cholesterol bioaccessibility and serum concentrations by saponins: *in vitro* and *in vivo* studies. *Food & Function* **2015** (6), 501–512.
- Д2. Vinarova L., Vinarov Z., Damyanova B., Tcholakova S., Denkov N., Stoyanov S. Mechanisms of cholesterol and saturated fatty acid lowering by *Quillaja saponaria* extract, studied by *in vitro* digestion model. *Food & Function* **2015**, DOI: 10.1039/C4FO01059K.
- Д3. Vinarova L., Vinarov Z., Tcholakova S., Denkov N., Stoyanov S., Lips A. Mechanism of lowering cholesterol absorption by calcium studied by *in vitro* digestion model. In preparation.

Материали по дисертацията са докладвани на следните форуми:

1. Л. Петрова, З. Винаров, Б. Дамянова, С. Чолакова, Н. Денков, „Ин-витро изследване на механизма на намаляване на холестерол от сапонинови екстракти“, XI конференция по химия за докторанти и студенти, май **2012** – устен доклад.
2. З. Винаров, Л. Петрова, Б. Дамянова, С. Чолакова, Н. Денков, «Механизъм на намаляване на солубилизирания холестерол от калциеви йони при ин-витро триглицеридна липолиза», май **2012** – устен доклад.
3. L. Petrova, Z. Vinarov, S. Tcholakova, N. Denkov, S. Stoyanov, A. Lips, “Effects of calcium and bicarbonate on phase distribution of the reaction products and cholesterol as studied in *in vitro* model”, ECIS 2012, 26th Conference of the European Colloid and Interface Society, Malmo, Sweden, 2-7 September **2012** – постер.
4. L. Petrova, Z. Vinarov, S. Tcholakova, N. Denkov, S. Stoyanov, A. Lips, “Effects of calcium and bicarbonate on phase distribution of the reaction products and cholesterol as studied in *in vitro* model”, 2nd International Conference on Food Digestion, Madrid, Spain, 6-8 March **2013** – кратък устен доклад.
5. L. Petrova, Z. Vinarov, S. Tcholakova, N. Denkov, S. Stoyanov, A. Lips, “Effects of calcium and bicarbonate on phase distribution of the reaction products and cholesterol as studied in *in vitro* model”, 2nd International Conference on Food Digestion, Madrid, Spain, 6-8 March **2013** – постер.
6. Л. Петрова, З. Винаров, С. Чолакова, Н. Денков, „Роля на киселините и моноглицеридите за солубилизацията на холестерол в мицелите на жлъчни киселини“, XII конференция по химия за докторанти и студенти, София, май **2013** - устен доклад.
7. З. Винаров, Л. Петрова, С. Чолакова, Н. Денков, В. Атанасов, Ив. Панчева. „Влияние на сапонинови екстракти върху холестерола: ин витро и ин виво експерименти“, XII конференция по химия за докторанти и студенти, София, май **2013** - устен доклад.

8. L. Petrova, Z. Vinarov, S. Tcholakova, N. Denkov, S. Stoyanov, A. Lips, „Mechanism of cholesterol lowering by calcium, as studied in-vitro”, ECIS 2013, 27th Conference of the European Colloid and Interface Society, Sofia, Bulgaria, 1-6 September **2013** – постер.
9. Z. Vinarov, L. Petrova, B. Damyanova, S. Tcholakova, N. Denkov, S. Stoyanov, „Mechanism of cholesterol and fatty acid lowering by Quillaja saponaria extract, studied by in-vitro digestion model”, ECIS 2013, 27th Conference of the European Colloid and Interface Society, Sofia, Bulgaria, 1-6 September **2013** – постер.
10. L. Petrova, Z. Vinarov, S. Tcholakova, N. Denkov, S. Stoyanov, A. Lips, „Mechanism of cholesterol lowering by calcium, as studied in-vitro”, Workshop Biophysics, Biochemistry and Physiology of Fat Digestion, Lorentz Center Leiden, The Netherlands, 16-20 September **2013** - кратък устен доклад.
11. L. Petrova, Z. Vinarov, S. Tcholakova, N. Denkov, S. Stoyanov, A. Lips, „Mechanism of cholesterol lowering by calcium, as studied in-vitro”, Workshop Biophysics, Biochemistry and Physiology of Fat Digestion, Lorentz Center Leiden, The Netherlands, 16-20 September **2013** – постер.
12. Z. Vinarov, L. Petrova, B. Damyanova, S. Tcholakova, N. Denkov, S. Stoyanov. „Mechanism of cholesterol and fatty acid lowering by Quillaja saponaria extract, studied by in-vitro digestion model“, Workshop Biophysics, Biochemistry and Physiology of Fat Digestion, Lorentz Center Leiden, The Netherlands, 16-20 September **2013** - кратък устен доклад.
13. Z. Vinarov, L. Petrova, B. Damyanova, S. Tcholakova, N. Denkov, S. Stoyanov. „Mechanism of cholesterol and fatty acid lowering by Quillaja saponaria extract, studied by in-vitro digestion model“, Workshop Biophysics, Biochemistry and Physiology of Fat Digestion, Lorentz Center Leiden, The Netherlands, 16-20 September **2013** – постер.
14. L. Petrova, Z. Vinarov, S. Tcholakova, N. Denkov, S. Stoyanov, A. Lips, „Mechanism of cholesterol lowering by calcium, as studied in-vitro”, 3rd International Conference on Food Digestion, Wageningen, The Netherlands, 11-13 March **2014** – постер.
15. Z. Vinarov, L. Petrova, V. Atanasov, Iv. Pantcheva, S. Tcholakova, N. Denkov, S. Stoyanov. „Lowering of serum cholesterol by saponin extracts: In-vitro and in-vivo studies“, 3rd International Conference on Food Digestion, Wageningen, The Netherlands, 11-13 March **2014** - устен доклад.
16. L. Vinarova, Z. Vinarov, S. Tcholakova, N. Denkov, S. Stoyanov, “In vitro study of the factors affecting the distribution of lipid molecules between different phases, formed during triglyceride lipolysis”, Beyond EVEREST, Workshop “Advanced Functional Materials”, Nessebar, 03-06 September **2014** – постер.