



**БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ**  
**ИНСТИТУТ ПО ОРГАНИЧНА ХИМИЯ С ЦЕНТЪР ПО ФИТОХИМИЯ**  
*Лаборатория „Структурен органичен анализ“*

---

# **А В Т О Р Е Ф Е Р А Т**

на дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен „**Доктор**“ Професионално направление 4.2. „Химически науки“

Научна специалност: „Органична химия“

**Синтез на 1*H*-бензимидазол-2-ил хидразони и изследване на антихелминтното, антинеопластичното и радикал-улавящото им действие**

**инж. Мария Андреева Аргирова**

**Научен ръководител: проф. д-р Деница Панталеева**

София, 2023 г.

Дисертационният труд съдържа 219 страници. Включва 56 фигури, 20 таблици и 69 схеми. Библиографията обхваща 293 литературни източника.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита на колоквиума „Функционални материали, компютърно моделиране и технологии“, ИОХЦФ, БАН на 30.11.2022 г. (Протокол № 48)

Докторантът е зачислен на редовна форма на обучение по специалност „Органична химия“ към ИОХЦФ-БАН.

Изследванията в дисертационния труд са извършени в лаборатория „Структурен органичен анализ“ към ИОХЦФ-БАН; Департамент по химия към Нов лисабонски университет – Португалия, Фармацевтичен факултет и Медицински факултет към Медицински университет – София; Департамент по инфекциозни заболявания, паразитология и тропическа медицина, Медицински университет – Пловдив.

Защитата на дисертационната работа ще се състои на .... от.... в....., на открито заседание пред Научно жури, назначено със Заповед на директора на ИОХЦФ, БАН №..... в състав:

1. проф. д-р Антоанета Трендафилова-Савкова, ИОХЦФ, БАН
2. доц. д-р Снежана Бакалова, ИОХЦФ, БАН
3. проф. д-р Соня Илиева - Софийски университет "Св. Климент Охридски", Факултет по химия и фармация, Катедра "Фармацевтична и приложна органична химия"
4. доц. д-р Стела Миронова Статкова-Абегхе – Пловдивски Университет "Паисий Хилендарски", Катедра „Органична химия“
5. доц. д-р Живко Велков – Югозападен университет "Неофит Рилски", Природо-математически факултет, Катедра "Химия"

Резервни членове:

1. проф. д-р Адриана Бакалова – Медицински Университет – София, Фармацевтичен факултет, Катедра "Химия"
2. доц. д-р Надежда Маркова – ИОХЦФ, БАН

Номерацията на фигурите, схемите и таблиците в автореферата не отговаря на използваната в дисертацията.

## I. Въведение

Бензимидазоловата структура притежава обещаващ потенциал за разработване на фармакологично активни молекули. В клиничната практика са намерили приложение редица бензимидазоли – нокодазол, бендамустин, денибулин, довитиниб, албендазол, мебендазол и др. 2-Аминобензимидазоловият хетероцикъл присъства като структурна единица в различни биологично-активни молекули и е фармакофор от решаващо значение за разработване на противоракови и антихелминтни средства. Изследваните до момента 2-иминобензимидазолови производни, включително такива с хидразонови фрагменти, са показали висока активност спрямо ракови клетъчни линии от лимфоцитна левкемия L1210, лимфобластна левкемия СЕМ, цервикален карцином HeLa и панкреатичен карцином Mia Paca-2. Известно е също така, че 2-ацетилпиридин хидразонови производни на бензимидазола проявяват силна цитотоксична активност срещу левкемия, лимфоми, солидни тумори, цервикален карцином HeLa, костен остеосарком SOS, белодробни карциноми MB9812 и A549, аденокарцином на гърдата MCF-7. 1-Метил-2-бензимидазолил хидразонът на 2-ацетилпиридин (*EPH116*) и неговите производни проявяват силна цитотоксична активност *in vitro* спрямо широк спектър от човешки туморни клетъчни линии.

Един от ключовите фактори при процесите на канцерогенеза е продължителното излагане на оксидативен стрес, тъй като води до увреждане на клетъчната структура и функции, свързани с повишаване честотата на ДНК мутации, геномна нестабилност и повишена клетъчна пролиферация. Известно е, че реактивните форми на кислорода (ROS) действат в клетките като вторични прекурсори във вътреклетъчните сигнални каскади, които индуцират и поддържат онкогенния фенотип на раковите клетки. Повишената продукция на ROS, в резултат на ендогенни или екзогенни увреждания, е характерна за повечето ракови клетки, при които се наблюдава променена сигнална трансдукция. Това очертава прилагането на антиоксиданти като ценен инструмент, а разработването на лекарствени средства с комбинирано антиоксидантно и антинеопластично действие – като обещаващ и иновативен подход за търсенето на нова ефективна терапия в борбата с раковите заболявания. Предимствата на терапията, комбинираща антинеопластично с антиоксидантно действие са демонстрирани от изследванията върху мелатонин. Мелатонинът от една страна проявява мощен антиоксидантен ефект и радикалулавящо действие, а от друга страна - инхибира пролиферацията и нарастването на туморните клетки, като по този начин намалява тенденцията здрави клетки да се трансформират в неопластични. Комбинирана терапия с антиоксидантно действие би имала благоприятен ефект и при лечение на паразитни инфекции, които често се съпътстват от оксидативен стрес, причинен от увреждане на тъканите, дисфункция на имунната система и възникващата в следствие на медикаментозното лечение интоксикация от масираното умъртвяване на паразитите.

Съвременните стратегии за разработване на противоракови лекарства се фокусират върху таргетиране на различни клетъчни протеини. В последните години са идентифицирани много обещаващи мишени за ефективното лечение на рак, една от които е тубулинът. Понастоящем редица тубулинови инхибитори са одобрени като хемотерапевтични агенти от първа линия за различни видове рак. От друга страна, тъй като много от настоящите антимиотични лекарства проявяват нежелана токсичност, а раковите клетки често развиват резистентност към тях, разработването и изпитването на нови лекарствени кандидати е от първостепенно значение. Известно е, че

бензимидазоловите производни са способни да се свързват селективно с  $\beta$ -тубулина и да нарушават полимеризацията на микротубулите в паразитите, без да повлияват значително тубулиновия протеин на приемните бозайници. Това мотивира разширяване на изследванията и намиране на нови бензимидазолови антимиотични средства с противоракова активност.

От казаното дотук следва, че дизайнът и синтезът на нови бензимидазолови производни, съчетаващи в структурата си 2-аминобензимидазолов фрагмент, хидразонова верига и заместена арилна част, проявяващи комбинирано антиоксидантно и неопластично/антихелминтно действие, представлява значителен интерес от синтетична и фармакологична гледна точка.

## **II. Цели и задачи**

Настоящият дисертационен труд е насочен към синтеза на нови 1*H*-бензимидазол-2-ил хидразони и изследване на антихелминтното, антинеопластичното и радикал-улавящото им действие. За осъществяване на поставената цел бяха определени следните задачи:

1. Синтез на 1*H*-бензимидазол-2-ил хидразони, съдържащи фенилни фрагменти с флуоро-, диоксилилметил-, хидрокси- и метокси-заместители;
2. Синтез на метални комплекси на избрани 1*H*-бензимидазол-2-ил хидразони;
3. Изследване на структурата на синтезираните бензимидазолови производни и техните метални комплекси чрез ИЧ, ЯМР, Раманова спектроскопия, енергийно-дисперсионна рентгенова спектроскопия в комбинация със сканираща електронна микроскопия (SEM-EDX), елементарен анализ и теоретични методи;
4. Изследване на антинеопластичната и антихелминтната активност на синтезираните съединения;
5. Изследване на ефекта на получените хидразони върху полимеризацията на тубулин;
6. Изследване на радикал-улавящата им активност в химични и биологично релевантни системи;
7. Изследване на молекулните дескриптори, вероятните механизми на антиоксидантно действие и взаимодействията лиганд-рецептор чрез теоретични методи.

## **III. Резултати и обсъждане**

### **1. Синтез**

Въвеждането на разнообразни функционални групи беше осъществено чрез многоетапен синтез, чрез който от една страна в бензимидазоловото ядро бяха въведени хидразонови вериги с ароматни фрагменти, съдържащи различни комбинации от хидроксилни и други групи, а от друга страна – самото бензимидазолово ядро беше модифицирано на 5(6)-позиция. Структурите на изходните фенилендиамини бяха подбрани, с цел осигуряване на по-разнообразни възможности и вариране на липофилността на целевите съединения. Така получените производни ще притежават няколко фармакофора, подходящи за осигуряване на взаимодействие с лекарствените мишени и проявяване на желаната биологична активност.

### 1.1. Синтез на 1H-бензимидазол-2-ил хидразони

В хода на настоящото изследване изходните 1H-бензимидазол-2-тиоли **2.1** и **2.2** бяха получени при кипене на съответния 4-(не)заместен 1,2-диаминобензен, CS<sub>2</sub> и KOH в среда от етанол:

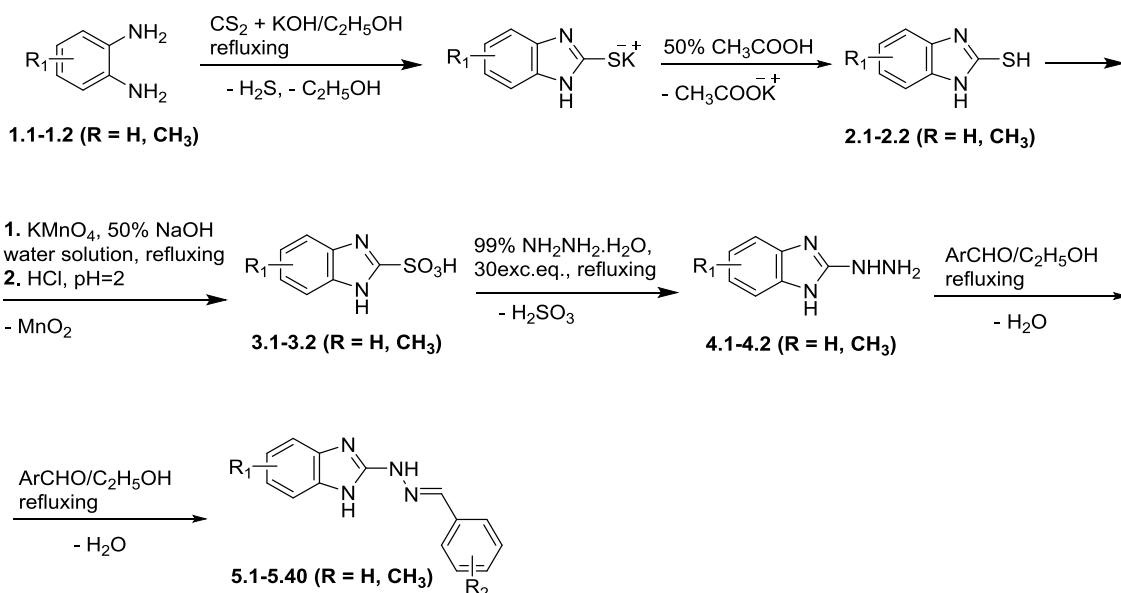


Схема 1. Синтез на 1H-бензимидазол-2-ил хидразони от серия А, Б и В

1H-бензимидазол-2-тиоли **2.1** и **2.2** бяха окислени до съответните 1H-бензимидазол-2-ил сулфонови киселини **3.1** и **3.2** в 50 %-ен разтвор на натриева основа с помощта на калиев перманганат. В следващия етап реакцията на бензимидазол сулфоновите киселини **3.1** и **3.2** с 99% хидразин хидрат в 30-кратен излишък осигури получаването на хидразидните производни **4.1** и **4.2**.

Пилотна серия от 1H-бензимидазол-2-ил хидразони (серия А, Схема 2) бяха получени чрез реакция на кондензация на двата хидразида **4.1** и **4.2**. с набор от хидрокси-, метокси-, флуоро-заместени бензалдехиди, както и пиперонал (в молно съотношение 1:1), в среда от абсолютен етилов алкохол.

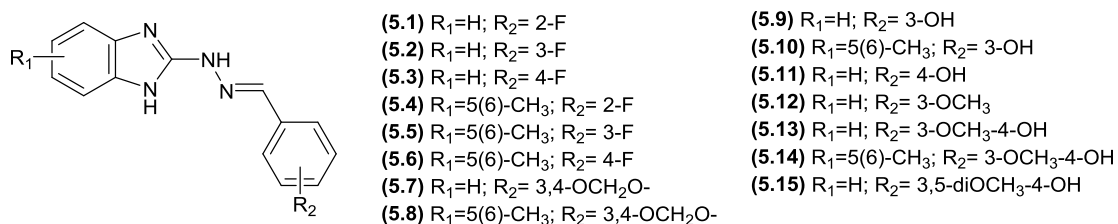
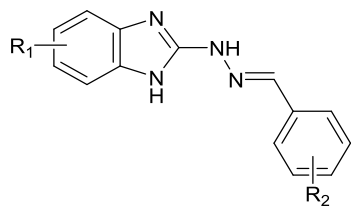


Схема 2. 1H-бензимидазол-2-ил хидразони от серия А

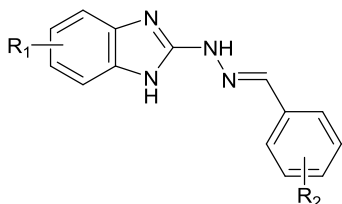
Проведените изследвания върху биологичната активност на 1H-бензимидазол-2-ил хидразоните от серия А (разгледани по-долу) очертаха като по-перспективни съединенията, съдържащи хидрокси и метокси заместители във фенилното ядро. Това даде тласък за получаване на втора серия хидразони (серия Б, Схема 3), съдържащи незаместен бензимидазолов фрагмент и бензалдехиди с нови комбинации от хидрокси и метокси заместители на различни позиции:



- (5.16)  $R_1=H$ ;  $R_2=2-OH$   
 (5.17)  $R_1=H$ ;  $R_2=2,3-diOH$   
 (5.18)  $R_1=H$ ;  $R_2=2,4-diOH$   
 (5.19)  $R_1=H$ ;  $R_2=3,4-diOH$   
 (5.20)  $R_1=H$ ;  $R_2=2,3,4-triOH$   
 (5.21)  $R_1=H$ ;  $R_2=4-OCH_3$   
 (5.22)  $R_1=H$ ;  $R_2=2,6-diOCH_3$   
 (5.23)  $R_1=H$ ;  $R_2=3,5-diOCH_3$   
 (5.24)  $R_1=H$ ;  $R_2=3,4,5-triOCH_3$   
 (5.25)  $R_1=H$ ;  $R_2=2-OH-3-OCH_3$   
 (5.26)  $R_1=H$ ;  $R_2=2-OH-4-OCH_3$   
 (5.27)  $R_1=H$ ;  $R_2=3-OH-4-OCH_3$

Схема 3. 1H-бензимидазол-2-ил хидразони от серия В

Като трета стъпка в структурната модификация, бяха получени серия хидразони, съдържащи метилна група в бензимидазоловия хетероцикъл и хидрокси и метокси заместители във фенолното ядро (серия В, Схема 4).



- (5.28)  $R_1=5(6)-CH_3$ ;  $R_2=2-OH$   
 (5.29)  $R_1=5(6)-CH_3$ ;  $R_2=2,3-diOH$   
 (5.30)  $R_1=5(6)-CH_3$ ;  $R_2=2,4-diOH$   
 (5.31)  $R_1=5(6)-CH_3$ ;  $R_2=3,4-diOH$   
 (5.32)  $R_1=5(6)-CH_3$ ;  $R_2=2,3,4-triOH$   
 (5.33)  $R_1=5(6)-CH_3$ ;  $R_2=4-OCH_3$   
 (5.34)  $R_1=5(6)-CH_3$ ;  $R_2=2,6-diOCH_3$   
 (5.35)  $R_1=5(6)-CH_3$ ;  $R_2=3,5-diOCH_3$   
 (5.36)  $R_1=5(6)-CH_3$ ;  $R_2=3,4,5-triOCH_3$   
 (5.37)  $R_1=5(6)-CH_3$ ;  $R_2=2-OH-3-OCH_3$   
 (5.38)  $R_1=5(6)-CH_3$ ;  $R_2=2-OH-4-OCH_3$   
 (5.39)  $R_1=5(6)-CH_3$ ;  $R_2=3-OH-4-OCH_3$   
 (5.40)  $R_1=5(6)-CH_3$ ;  $R_2=3,5-diOCH_3-4-OH$

Схема 4. 1H-бензимидазол-2-ил хидразони от серия В

Структурата на изолираните бензимидазол-ил хидразони, както и на интермедиатите, получени в хода на синтеза, са доказани и охарактеризирани чрез набор от аналитични техники като ИЧ-спектроскопия с Фурие трансформация,  $^1H$  ЯМР- и  $^{13}C$  ЯМР-спектроскопия. Чистотата на съединенията е потвърдена чрез тънкослойна хроматография.

За доказване на структурата на целевите 1H-бензимидазол-2-ил хидразони послужи идентифицирането на ИЧ ивицата за новополучената азометинова двойна връзка, както и липсата на дублета за валентните трептения на N-H връзките, характерен за първични амини, каквито са междинните продукти бензимидазол-ил хидразиди **4.1** и **4.2**. Валентните трептения на N-H връзките от бензимидазоловия фрагмент и хидразоновата верига водят до появата на ИЧ ивици в областта 3370-3160  $cm^{-1}$ , докато деформационното трептене за същите връзки варира в областта 1656-1626  $cm^{-1}$ . Валентното трептене на азометиновата двойна връзка се характеризира с ИЧ ивица в областта 1638-1606  $cm^{-1}$ , която в някои случаи се припокрива с тази на деформационното трептене на N-H връзките.

В  $^1H$  ЯМР спектрите на новосинтезираните 1H-бензимидазол-2-ил хидразони сигналът за протона от двойната азометинова връзка се наблюдава при около 7.9-8.2 ppm като интезивен синглет. Сигналите за протоните от бензимидазоловото ядро се появяват в областта 6.9-7.4 ppm под формата на мултиплети или дублети. Сигналите за N-H групите са отместени към по-слабите полета – 11.3-11.6 ppm. При охарактеризирането на представителите от различните групи съединения, съдържащи

в структурата си метокси групи, бяха идентифицирани ИЧ ивици за валентните трептения на С-О връзките при около 1265 и 1135  $\text{cm}^{-1}$ , както и за асиметричното и симетричното валентно трептене на метилната група – съответно в интервалите 2965-2927  $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu^{\text{ас}}_{\text{СН}_3}$ ) и 2847-2834  $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu^{\text{с}}_{\text{СН}_3}$ ). В ИЧ спектрите на съединенията, които имат една или повече хидроксилни групи в ароматното ядро, се наблюдават ивици за валентното трептене на О-Н връзките в областта 3468-3332  $\text{cm}^{-1}$  и ивици за валентното трептене на С-О връзките – съответно около 1200  $\text{cm}^{-1}$ . При наличие на О-Н групи, съответните сигнали в  $^1\text{H}$  ЯМР спектрите се откриват в по-широк интервал – 9.87-10.95 ppm. При заместител метилна група в бензимидазоловия хетероцикъл в  $^1\text{H}$  ЯМР спектрите се наблюдава интензивен синглет при силните полета - около 3.5-3.7 ppm.

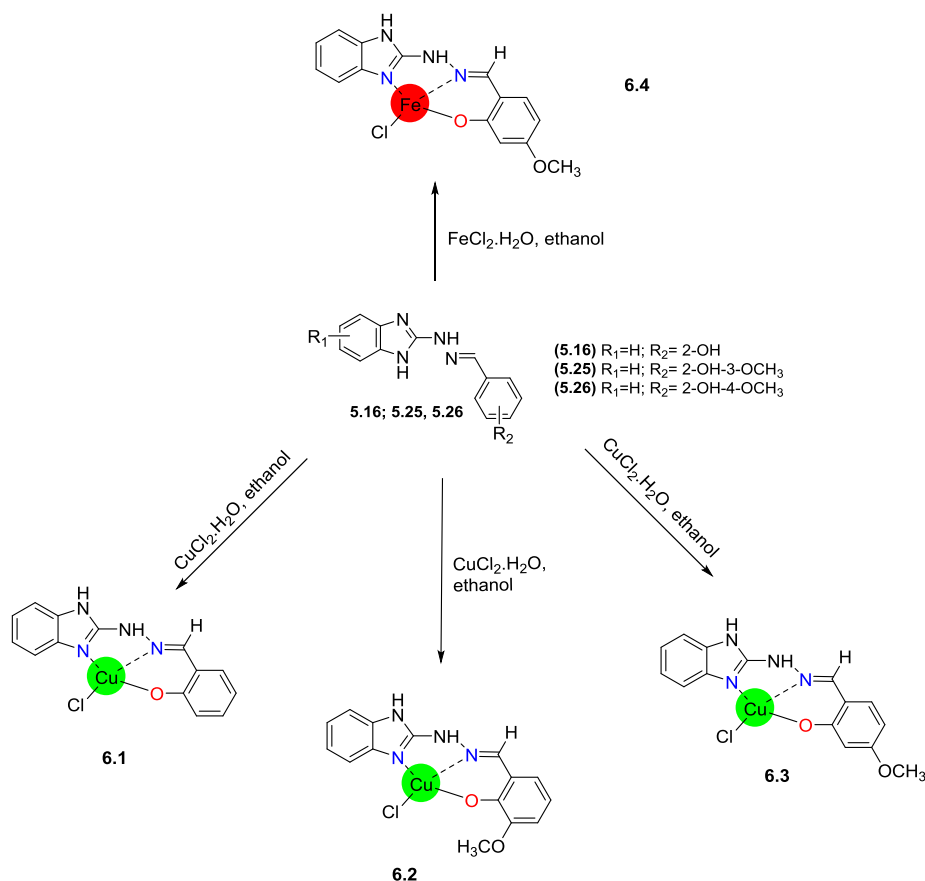
В  $^{13}\text{C}$  ЯМР спектрите сигналите за азометиновите въглеродни атоми и тези на 2-позиция в бензимидазоловия цикъл варират в по-широк интервал 127–145 ppm в зависимост от структурата на съединенията. Сигналите за ароматните въглеродни атоми от фенилното ядро и бензимидазоловия цикъл са регистрирани между 107 и 135 ppm. При наличие на метилна група на 5(6)-позиция в бензимидазоловия фрагмент в  $^{13}\text{C}$  ЯМР спектрите се наблюдават сигнали при 21-22 ppm. Сигналите за въглеродните атоми, свързани с хидроксилни групи се появяват между 161 и 145 ppm. Въглеродните атоми от метокси групите дават сигнали при 55-60 ppm.

## 1.2. Синтез на метални комплекси на 1H-бензимидазол-2-ил хидразони

Известен факт е, че йоните на метали с променлива валентност, като желязото, са един от възможните основни инициатори на оксидативно увреждане. Тези химични елементи участват с лекота в реакции на комплексообразуване и проявяват редуционни свойства, което предопределя понижената им податливост на контролните механизми на хомеостатичната регулация. В тяхно присъствие процесите на оксидативно увреждане протичат с по-голяма скорост. При наличие на високи нива на оксидативен стрес, антиоксидантните системи на организма не са в състояние да обезвредят свободните радикали.  $\text{H}_2\text{O}_2$  в присъствие на преходни метални йони, чрез желязо-медираната реакция на Фентън, води до формиране на силно реактивоспособните хидроксилни радикали, които инициират липидна пероксидация и клетъчна смърт.

Една от целите на настоящата дисертация е синтеза на метални комплекси с част от новосинтезираните 1H-бензимидазол-2-ил хидразони. Според литературни данни синтезът на метални комплекси на бензимидазолови производни може да се осъществи по два подхода. И при двата метода към етанолов разтвор на лиганда се прибавя етанолов разтвор на солта, като реакцията по-нататък може да се проведе с добавяне на натриева основа (при рН на средата в интервала от 7.5 до 8.0) или без добавяне на основа. В хода на настоящата работа, синтезът на комплексите беше осъществен като към етанолов разтвор на съответния 1H-бензимидазол-2-ил хидразон беше прибавян на порции етанолов разтвор на солта ( $\text{CuCl}_2$  или  $\text{FeCl}_2$ ) в молно съотношение 2:1. Получената реакционна смес беше разбърквана на ултразвукова вана при 40-50°C в продължение на 3-4 часа (Схема 5).

Структурата на изолираните метални комплекси беше уточнена чрез ИЧ и микро-Раманова спектроскопия, елементен анализ и SEM-EDX. В ИЧ спектрите на комплексите се наблюдават ивици за валентните трептения на N-H връзките ( $\nu_{\text{N-H}}$ ) в областта 3231-3221  $\text{cm}^{-1}$ , за валентното трептене на азометиновата връзка ( $\nu_{\text{C=N}}$ ) в областта 1607-1599  $\text{cm}^{-1}$ , както и за валентното трептене на връзката С-О ( $\nu_{\text{C-O}}$ ) в областта 1508-1491  $\text{cm}^{-1}$ .



**Схема 5. Синтез на метални комплекси 6.1-6.4., съдържащи като лиганд 1H-бензимидазол-2-ил хидразони**

В микро-Рамановите спектри присъстват ивици за валентното трептене на връзките Cu-O ( $\nu_{Cu-O}$ ) при  $589-587\text{ cm}^{-1}$  и Cu-N ( $\nu_{Cu-N}$ ) – съответно в областта  $491-477\text{ cm}^{-1}$ . Проведеният SEM-EDX анализ показва наличието на елементите Cu и Cl, съответно Fe и Cl, в съотношение 1:1. Като се имат предвид и данните за съдържанието на N, C и H, установени чрез елементен анализ, беше потвърдено, че комплексите са образувани чрез координация на една молекула хидразон с един метален атом.

## 2. Изследване на молекулната структура с теоретични методи

За целите на настоящата дисертация молекулната геометрия и електронната структура на новосинтезираните съединения, техните йонни и радикалови производни, са оптимизирани чрез теория на функционала на плътността (Density functional theory, DFT) с помощта на функционал (U)B3LYP и базисен набор 6-311++G\*\* в газова фаза, разтворители вода и бензен. Ефектите на разтворителя са оценени и включени в оптимизациите чрез използване на Модела на поляризационния континуум (Polarizable Continuum Model, PCM). Проведени са и изчисления с използване на функционал (U)M06-2X и базисен набор 6-311++G\*\* (single point calculations, SP) за пресмятане на честоти на база на геометрията, оптимизирана при използване на B3LYP/6-311++G\*\*.

1H-бензимидазол-2-ил хидразоните могат да съществуват в две тавтомерни форми: амино и имино тавтомерна форма. От друга страна при наличие на заместител метилна група в бензимидазоловия хетероцикъл се различават два позиционни изомера – на 5- и 6-позиция. На всяка от тези тавтомерни форми или позиционни изомери съответстват и различни конформери, в резултат от възможността за *Z* и *E*



конфигурацията на двойната азометинова C=N връзка, *s-cis* и *s-trans* конформация на простата N-N връзка и различна ориентация на заместителите във фенолното ядро спрямо хидразоновата верига.

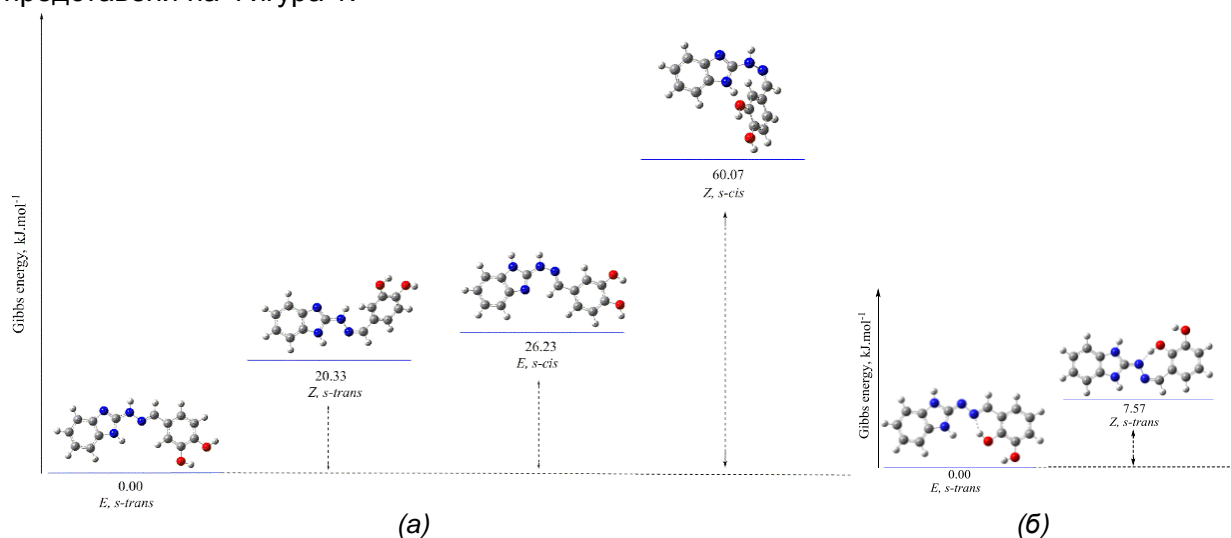
## 2.1. Молекулна структура на 1H-бензимидазол-2-ил хидразони, съдържащи незаместен бензимидазолов фрагмент

Обобщавайки резултатите за пресметнатите Гибсови енергии за 1H-бензимидазол-2-ил хидразоните от серия Б, беше установено, че имино формата е предпочетена за тези, съдържащи хидроксилна група на *орто*-позиция във фенолното ядро, докато amino формата преобладава при останалите съединения. Разликите в Гибсовите енергии между двете тавтомерни форми на съединенията варират от 2.06 до 12.88 kJ.mol<sup>-1</sup>.

За да се онагледят получените данни, по-долу са илюстрирани резултатите за два хидразона – **5.17** и **5.19** (Фигура 1). Съединение **5.19**, притежава две хидроксилни групи на 3- и 4- позиция в ароматния пръстен (Фигура 1а) и проявява най-добра радикал-улавяща активност при *in vitro* редукцията на стабилни радикали ABTS и DPPH (виж раздел 3.6.1). За този представител съотношението amino:имино тавтомерна форма е: 81.66:18.34 (газова фаза); 91.97:8.03 (вода); 96.18:3.82 (бензен), според проведените изчисления с функционал B3LYP. Данните, получени с функционал M06-2X, потвърждават тезата, че за хидразон **5.19** е предпочетена amino тавтомерната форма, като съотношението amino:имино е: 90.60:9.40 (газова фаза); 96.87:3.13 (вода); 98.37:1.63 (бензен).

Съединение **5.17** също съдържа две хидроксилни групи във фенолното ядро, но на 2- и 3-позиция и показва изявен протективен ефект при *in vitro* Fe-индуцирана пероксидация на лецитин и дезоксирибоза (виж раздел 3.6.2). За него е предпочетена имино тавтомерната форма (Фигура 1б), като съотношението amino:имино е съответно: 3.48:96.52 (газова фаза); 9.98:90.02 (вода); 4.60:95.40 (бензен), според изчисленията с функционал B3LYP.

Оптимизираните геометрии на различните възможни конформери за съединения **5.17** (в имино тавтомерна форма) и **5.19** (в amino тавтомерна форма) са представени на Фигура 1.

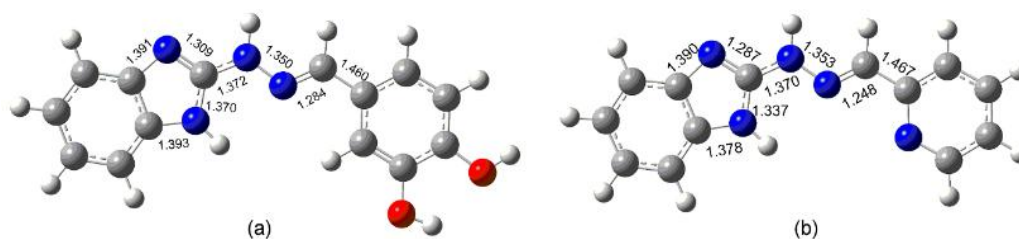


Фигура 1. Оптимизирана молекулна структура и Гибсови енергии (в kJ.mol<sup>-1</sup>) на възможните изомери на съединения **5.17** и **5.19**, получени на ниво B3LYP/6-311++G(d,p) в газова фаза

Въз основа на изчислените Гибсови енергии, може да се заключи, че структура на най-стабилните изомери е плоска и се характеризира с *E* конфигурация на двойната азометинова връзка и *s-trans* конфигурация за простата N-N връзка. Разликите в изчислените Гибсови енергии за възможните изомери на съединения **5.19**; **5.21-5.24** и **5.27**, за които е предпочетена amino тавтомерната форма, варират в следния интервал: *E, s-trans* → *E, s-cis* ( $\Delta G$  16.90-47.29 kJ.mol<sup>-1</sup>) → *Z, s-trans* ( $\Delta G$  16.91-34.60 kJ.mol<sup>-1</sup>).г

Разликата в изчислените Гибсови енергии за възможните изомери на съединения **5.16-5.18**; **5.20** и **5.25-5.26**, за които е предпочетена имино тавтомерната форма, варират в следния интервал: *E, s-trans* → *E, s-cis* ( $\Delta G$  0.88-35.34 kJ.mol<sup>-1</sup>) → *Z, s-trans* ( $\Delta G$  4.17-28.34 kJ.mol<sup>-1</sup>).

Теоретично определената най-стабилна *E, s-trans* геометрия на amino тавтомерната форма на съединение **5.19** е в отлична корелация с наскоро публикувани експериментални данни от рентгеноструктурен анализ. Изчислените дължини на връзки за съединение **5.19** са близки по стойности до тези на изследвания от Первова и колектив бензимидазол-2 хидразон на пиридин-2-карбалдехида (Фигура 2б). *E* конфигурацията на двойната C=N връзка на синтезираните хидразони също е в съответствие с публикуваните структури на хидразони, които съдържат бензотиазолов или бензимидазолов фрагмент.



Фигура 2. Избрани дължини на връзки при най-стабилния изомер на съединение **5.19** (а) и бензимидазолпил-2-хидразон на пиридин-2-карбалдехида (б)

## 2.2. Молекулна структура на 1*H*-бензимидазол-2-ил хидразони, съдържащи 5(6)-метил бензимидазолов фрагмент

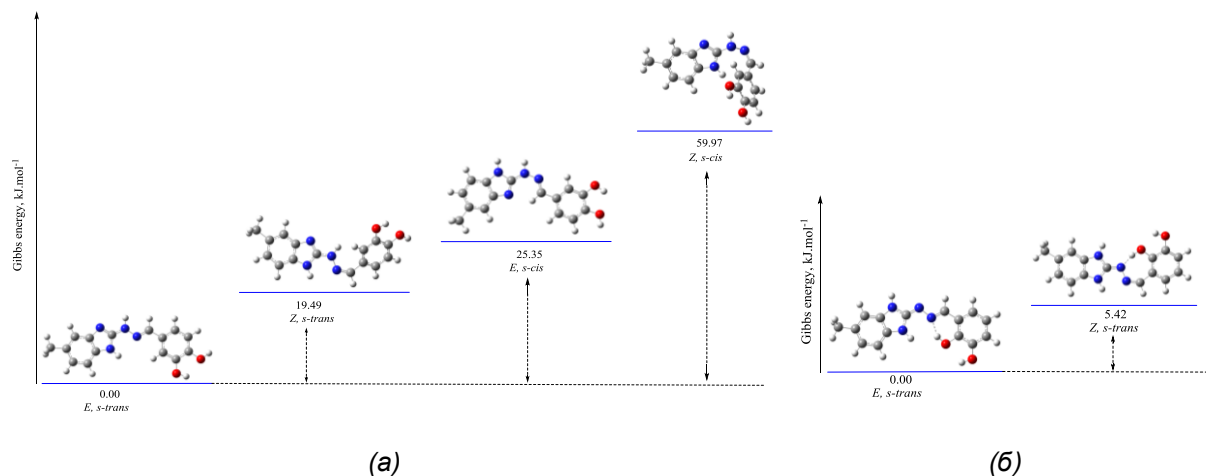
По отношение на тавтомерните форми на 5(6)-метил-1*H*-бензимидазол-2-ил хидразоните от серия В може да се обобщи, че в тяхната структура се наблюдава идентична тенденция с незаместените съединения **5.16-5.27**. Имино формата преобладава при представителите, които включват във фенолния си фрагмент хидроксилни групи на *орто*-позиция (**5.28-5.30**; **5.32** и **5.37-5.38**). Amino формата е предпочетената тавтомерна форма за останалите представители (**5.31**; **5.33-5.36** и **5.39-5.40**). Разликите в изчислените Гибсови енергии между двете тавтомерни форми на съединенията от серия В е 1.97-11.19 kJ.mol<sup>-1</sup>. Получените резултати са онагледени по-долу чрез съединения **5.29** и **5.31** – структурни аналози на **5.17** и **5.19**.

Въз основа на теоретичните данни, получени с функционал B3LYP, при хидразон **5.31** съотношението amino:имино тавтомерна форма е: 82.42:17.58 (газова фаза); 91:9 (вода); 82.16:17.84 (бензен). Данните при използване на функционал M06-2X потвърждават, че за този представител е предпочетена amino тавтомерната форма със съотношение amino:имино: 71.51:28.49 (газова фаза); 96.22:3.78 (вода); 92.22:7.78 (бензен).

За съединение **5.29** е предпочетена имино тавтомерна форма, като съотношението имино:amino форма е: 97.26:2.74 (газова фаза); 90.28:9.72 (вода); 99.23:0.77 (бензен), според изчисленията с функционал B3LYP. Данните от

изчисленията с използване на функционал M06-2X, са както следва – съотношение имино:амино тавтомерна форма 96.64:3.36 (газова фаза); 86.44:13.56 (вода); 87.65:12.35 (бензен).

Изчислените Гибсови енергии за възможните конформери на всички метилно заместени хидразони от серия В потвърждават гореспоменатите изводи, че енергетично най-изгодната молекулна структура е планарна, наблюдава се *E* конфигурация на двойната връзка и *s-trans* конформация на простата N-N връзка. За илюстрация на Фигура 3 са представени оптимизирани геометрии на конформерите на хидразони **5.29** и **5.31**.

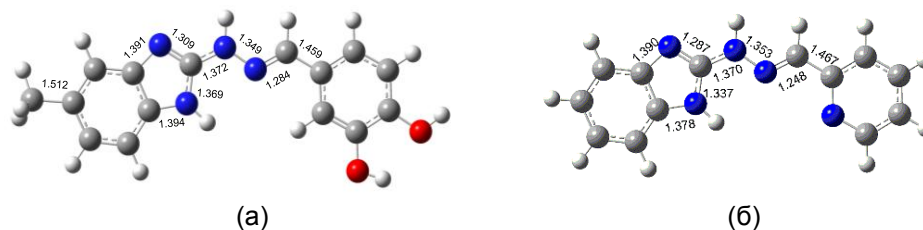


Фигура 3. Оптимизирана молекулна структура и Гибсови енергии (в kJ.mol<sup>-1</sup>) на възможните изомери на съединения **5.31** (а) и **5.29** (б), получени на ниво B3LYP/6-311++G(d,p) в газова фаза

Разликата в изчислените Гибсови енергии за възможните конформери на съединения **5.31**; **5.33-5.36** и **5.39-5.40** (в аминок тавтомерна форма) са в следните интервали: *E, s-trans* → *E, s-cis* ( $\Delta G$  8.46-47.26 kJ.mol<sup>-1</sup>) → *Z, s-trans* ( $\Delta G$  9.84-37.08 kJ.mol<sup>-1</sup>). Разликата в изчислените Гибсови енергии за възможните конформери на съединения **5.28-5.30**; **5.32** и **5.37-5.38** (в имино тавтомерна форма) са съответно: *E, s-trans* → *E, s-cis* ( $\Delta G$  0.98-37.13 kJ.mol<sup>-1</sup>) → *Z, s-trans* ( $\Delta G$  0.52-12.25 kJ.mol<sup>-1</sup>).

Изчислените Гибсови енергии показват, че за съединения **5.29** и **5.32-5.37** предпочетена е 6-та позиция на метилната група, докато за хидразони **5.28**; **5.30-5.31** и **5.38-5.40** по-изгодна е 5-та позиция на метилната група, като не се наблюдава закономерност между структурата на изследваните производни и позиционната изомерия на метилната група. Енергитичната разлика, на база на Гибсовата енергия, варира в границите 0.20-3.87 kJ.mol<sup>-1</sup>.

В допълнение, на Фигура 4 са представени изчислените дължини на връзки за съединение **5.31**, като стойностите са идентични с предходните данни за хидразон **5.19** от серия Б. Също така получените резултати са в отлично съответствие с публикуваните от Первова и колектив.

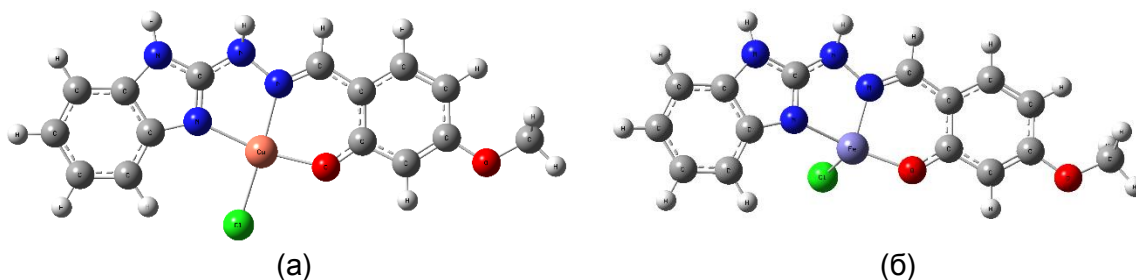


Фигура 4. Избрани дължини на връзки при най-стабилния изомер на съединение 5.31 (а) и бензимидазол-2-хидразон на пиридин-2-карбалдехид (б)

### 2.3. Молекулна структура на метални комплекси 6.1-6.4

Анализът на молекулната геометрия и електронната структура на синтезираните метални комплекси е обогатен и чрез DFT квантово-химични пресмятания. Оптимизацията е проведена чрез прилагането на функционал B3LYP и базисен набор LANL2DZ или 6-311++G(d,p). Бяха взети предвид два варианта за координация за всеки комплекс. Според литературни данни е възможна бидентатна координация с една молекула лиганд или тридентатна координация с две молекули лиганд – посредством азотния атом от двойната азометинова връзка, азотния атом от бензимидазоловия фрагмент и депротонирания кислороден атом от хидроксилната група на *орто*-позиция. За целите на настоящия дисертационен труд бяха оптимизирани различни възможни форми на комплексите като е взета предвид координацията на металния атом както с един, така и с два лиганда.

В съгласие със спектралните изследвания и елементния анализ, получените теоретични данни сочат, че най-стабилните структури на комплексите отговарят на координацията на една молекула бензимидазол-2-хидразон с един меден или железен атом (Фигура 5). При това, молекулата е планарна и се наблюдава координация между медта (желязото) с азотния атом на 3-позиция в бензимидазоловия фрагмент, азотния атом от азометиновата връзка и хидроксилната група в *орто*-положение на ароматното ядро. В структурата на комплекса присъства и по един атом хлор, свързан с металния атом.



Фигура 5. Оптимизирана молекулна структура на металните комплекси, синтезирани от хидразон 5.26: комплекс 6.3 с меден атом (а) и комплекс 6.4 с железен атом (б), получени на ниво B3LYP/311++G(d,p) в газова фаза

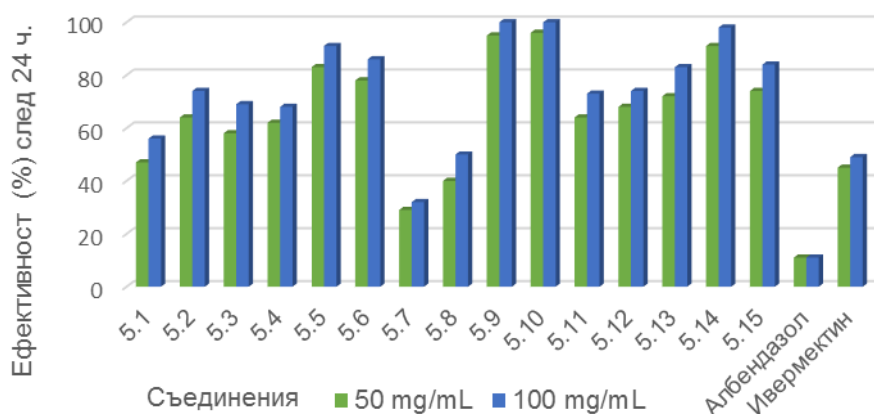
## 3. Изучаване на фармакологичните активности и механизма на действие

### 3.1. *Ин витро* изследване на антитрихинелозната и антинеопластичната активност на 1*H*-бензимидазол-2-ил хидразоните от серия А

Поради предполагаемия общ механизъм на действие (модулиране на полимеризацията на тубулин), беше проследена паралелно *ин витро* антипаразитната и антинеопластичната активност на новополучените 1*H*-бензимидазол-2-ил хидразони.

Антипаразитната активност на новополучените 1*H*-бензимидазол-2-ил хидразони от серия А беше изследвана *ин витро* върху декапсулирани мускулни ларви на *Trichinella spiralis* ML. Съединенията бяха изследвани в концентрации 12.5, 25, 50 и 100  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Противопаразитните лекарства албендазол (бензимидазолово производно) и ивермектин бяха използвани като сравнителни стандарти. Контрола, съдържаща само паразитите във физиологичен разтвор, също беше включена в анализа. Пробите бяха инкубирани при 37°C във влажна камера с термостат. Микроскопските наблюдения върху жизнеността на мускулните ларви на *T. spiralis* бяха

извършени съответно след 24 часа и 48 часа. Хидразоните от серия А показаха мощен ларвициден ефект върху ларвите на *T. spiralis*, превъзхождащ този на утвърдените лекарствени препарати албендазол и ивермектин. Експерименталните резултати, представени на Фигура 6, показват, че съединения **5.9.** и **5.10.** проявяват най-изявен ларвициден ефект. При тях се наблюдава 100 % ефективност след 24 часа инкубиране с концентрация от 100  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ , съответстваща на 0.376  $\mu\text{M}$  за **5.10.** и 0.396  $\mu\text{M}$  за **5.9.** Производните **5.14.** и **5.5.** демонстрират съответно 98.10 % и 91.23 % ефективност при концентрация от 100  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  за същия период на инкубиране (24 ч).



Фигура 6. Ин витро активност на 1Н-бензимидазол-2-ил хидразони от серия А спрямо ларви на *T. spiralis* след 24 ч. инкубационен период

Най-добри резултати при съединенията от серия А бяха получени при наличието на заместител метилова група на 5(6)-позиция в бензимидазоловия пръстен, което е подкрепено и от данните от докинг изследването (виж глава 3.5). Съединение **5.10.** се отличава с 82.70 % ефективност при концентрация от 12.5  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  (0.047  $\mu\text{M}$ ), докато производно **5.9.**, което не съдържа метилова група на 5(6)-позиция в бензимидазоловия скелет, проявява 79.23 % активност при концентрация 12.5  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ , сходно на резултата при концентрация 50  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  за 24 часа. Тази тенденция се наблюдава и при по-малко активните аналози **5.14.** и **5.13.**, както и при **5.5.** и **5.2.** Въз основа на тези резултати, заместители като метилната група на 5(6)-позиция в бензимидазолов хетероцикъл и хидроксилната група на *мета*-позиция във фенилното ядро се оказват най-благоприятни за проявяване на висока антитрихинелозна активност. Въвеждането на ОН група като заместител, последвано от  $\text{OCH}_3$  група или F атом на *мета*-позиция във фенилния фрагмент на молекулата, допринася за получаването на по-активни аналози в сравнение със съединенията, съдържащи заместители на 4- или 2-позиция. Редът, в който се наблюдава намаляване на антихелминтната активност според позицията и естеството на заместителя в ариловия фрагмент е както следва: 3-ОН > 3- $\text{OCH}_3$ , 4-ОН > 3-F > 4-ОН > 4-F > 2-F. Ларвицидният ефект на тестваните съединения зависи от дозата и времето на инкубиране. За всички тествани концентрации степента на жизнеспособност на ларвите на *T. spiralis* намалява при по-продължителна експозиция.

Бензимидазол-2-хидразоните **5.7.** и **5.8.**, съдържащи остатък от 1,3-бензодиоксол-5-карбоксалдехид, показват по-слабо изразна ефективност срещу паразитите (по-малко от 50%), спрямо тази на ивермектин, след 24 часа инкубиране в изследваните концентрации. В контролните проби (с физиологичен разтвор) ларвите на *T. spiralis* остават със спираловидна форма, т.е. жизнени.

Избрани представители от новосинтезираните 1*H*-бензимидазол-2-ил хидразони от серия А бяха проучени за антинеопластична активност при туморна клетъчна линия *MCF-7*, с произход от хормоночувствителен рак на млечната жлеза. В допълнение, цитотоксичността на съединенията беше тествана и спрямо нетуморна клетъчна линия *3T3* (фибробласти от миши ембриони). Антипролиферативната активност на синтезираните 1*H*-бензимидазол-2-ил хидразони беше изследвана *in vitro* чрез колориметричен МТТ тест. Цитотоксичността, съответстваща на клетъчната жизнестойност след инкубиране с изследваните хидразони, е определена като процент спрямо клетъчната жизнестойност на контролната проба – нетретирани клетки.

1*H*-бензимидазол-2-ил хидразоните от серия А проявяват нисък до умерен цитотоксичен концентрационно-зависим ефект с  $IC_{50}$  стойности в диапазона 16.54-95.54  $\mu\text{g/mL}$  (Таблица 1).

Таблица 1. Антипролиферативна активност на изследвани 1*H*-бензимидазол-2-ил хидразони от серия А и референтното лекарство нокодазол спрямо клетъчните линии *MCF-7* и *3T3* след 24 часа инкубиране

Съединение	Заместители	$IC_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	
		<i>MCF-7</i>	<i>3T3</i>
<b>5.6.</b>	$R_1=5(6)\text{-CH}_3$ ; $R_2=4\text{-F}$	34.60	24.7
<b>5.9.</b>	$R_1=\text{H}$ ; $R_2=3\text{-OH}$	23.52	21.4
<b>5.10.</b>	$R_1=5(6)\text{-CH}_3$ ; $R_2=3\text{-OH}$	16.54	19.4
<b>5.12.</b>	$R_1=\text{H}$ ; $R_2=3\text{-OCH}_3$	91.42	-
<b>5.13.</b>	$R_1=\text{H}$ ; $R_2=3\text{-OCH}_3\text{-4-OH}$	95.54	-
<b>5.14.</b>	$R_1=5(6)\text{-CH}_3$ ; $R_2=3\text{-OCH}_3\text{-4-OH}$	17.40	16.7
<b>5.15.</b>	$R_1=\text{H}$ ; $R_2=3,5\text{-diOCH}_3\text{-4-OH}$	21.54	-
Нокодазол		1.54	-

Хидразони **5.10.**, **5.14.** и **5.15.** инхибират растежа на клетъчната линия *MCF-7* със сравнително ниски микромолярни стойности на  $IC_{50}$  ( $< 25 \mu\text{g/mL}$ ). Въвеждането на следните заместители – хидроксилна група на 3-та позиция във фенилния пръстен и метилова група на 5(6)-та позиция в бензимидазоловото ядро (съединение **5.10.**), допринася за повишаване на активността спрямо *MCF-7* ( $IC_{50} = 16.54 \mu\text{g/mL}$ ), следвано от 4-хидрокси-3-метокси хидразона **5.14.** ( $IC_{50} = 17.40 \mu\text{g/mL}$ ). Може да се предположи, че повишаването на цитотоксичността на бензимидазоловите производни **5.10.** и **5.14.** спрямо тази на **5.9.** и **5.13.**, е свързано с въвеждането на метилова група на 5(6)-позиция в бензимидазоловия хетероцикъл. При хидразон **5.15.**, който съдържа във фенилната част 4-хидрокси-3,5-диметокси заместители се наблюдава значително повишаване на цитотоксичността спрямо хидразона, който съдържа ванилинов остатък **5.13.** От друга страна, някои от съединенията като колхицин и комбретастин имат общ 3,4,5-триметоксифенилов фрагмент в молекулната си структура, за който се предполага, че е от решаващо значение за повлияване на полимеризацията на тубулина. В случая - най-близката до тях структура е тази на хидразон **5.15.**

Установените стойности на  $IC_{50}$  показват, че цитотоксичността на тестваните съединения спрямо клетъчната линия *MCF-7*, е много по-ниска от тази на лекарствения препарат нокодазол (*MCF-7*,  $IC_{50} = 5.12 \pm 0.07 \mu\text{M}$ , съотв.  $1.54 \mu\text{g/mL}$ ). Цитотоксичността на съединенията спрямо нормалните клетки *3T3* е в същия диапазон, както спрямо *MCF-7* (Таблица 1) т.е. съединенията не показват селективност към туморната клетъчна линия.

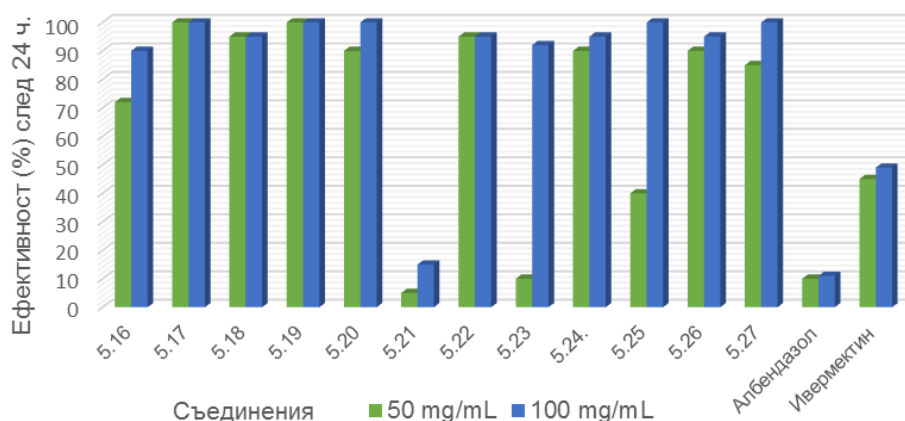


Въз основа на изведените връзки между структурата и активността на съединенията от серия А, беше заключено, че разширяването на набора от 1*H*-бензимидазол-2-ил хидразони чрез включване на метокси- и хидрокси-заместени фенолни фрагменти в структурата им е обещаваща стратегия за получаване на нови представители с подобрена антихелминтна и антинеопластична активност.

### 3.2. *Ин витро* изследване на антитрихинелозната и антинеопластичната активност на 1*H*-бензимидазол-2-ил хидразоните от серия Б

Антихелминтното действие на 1*H*-бензимидазол-2-ил хидразоните от серия Б беше тествано *ин витро* върху ларви на *T. spiralis* ML при инкубиране при 37°C за 24 часа и 48 часа, за концентрации от 100 и 50 µg.ml<sup>-1</sup>. Резултатите от изследването са представени на фигура 7 и показват, че всички хидразони, в изследваните концентрации, са по-активни от клинично използваните антихелминтни лекарства албендазол и ивермектин.

Изследването на антихелминтните свойства на бензимидазоловите хидразоните от серия Б показва, че производните, съдържащи хидроксилни групи във фенолния остатък (съединения **5.16-5.20**), проявяват забележителна активност. Съединение **5.16**, което съдържа хидроксилна група на 2-позиция във фенолния пръстен, проявява 90% ларвициден ефект при концентрация 100 µg.ml<sup>-1</sup> след 24 часа. Въвеждането на втора хидроксилна група на 4-та позиция, както е при хидразон **5.18**, води до повишаване на активността с 5% спрямо **5.16**.



Фигура 7. *Ин витро* активност на 1*H*-бензимидазол-2-ил хидразони от серия Б спрямо мускулни ларви на *T. spiralis* след 24 ч. инкубационен период

В случая на хидразон **5.17**, при който ОН групата е на 3-позиция, се наблюдава допълнително повишаване на активността (100% ефективност при концентрация от 50 µg.ml<sup>-1</sup>). В съответствие с тези и по-горе представените резултати за хидразоните от серия А, може да се предположи, че присъствието на ОН група на 3-та позиция във фенолното ядро на молекулата е ключово за проявяване на по-висока антихелминтна активност. Бензимидазол-2-ил хидразоните на 2,3-дихидроксибензалдехида (**5.17**) и на 3,4-дихидроксибензалдехида (**5.19**), съответно проявяват 100 % ефективност след 24 ч. инкубиране при 37°C и концентрация 50 µg.ml<sup>-1</sup>.

Сравняването на наблюдавания антипаразитен ефект разкрива, че наличието на две или три хидроксилни групи във фенолния фрагмент (съединения **5.17**; **5.18**; **5.19** и **5.20**) води до проявяване на по-висока антихелминтната активност срещу *T. spiralis* в сравнение с тази на стилбеноидния полифенол – ресвератрол, чиято активност се

проявява при много по-високи концентрации (440 и 880  $\mu\text{M}$ ) за 72 часа. За редица природни фенолни съединения (включително флавоноиди), притежаващи изразен антихелминтен ефект срещу паразитни нематоди различни от *T. spiralis*, също е установено, че активността им се увеличава с нарастване на броя на хидроксилните групи.

От друга страна, наличието на хидроксилна група на 3-та позиция в комбинация с метокси група на 4-та позиция (съединение **5.27**) води до леко намаляване на активността (85% ларвициден ефект след 24 часа при концентрация от 50  $\mu\text{g.ml}^{-1}$ ) в сравнение с хидразон **5.19**. Метокси-аналозите (**5.21** и **5.23**) показват по-слабо изразена активност срещу паразитите, сравнима с тази на лекарството албендазол, след 24 часа инкубиране при концентрация от 50  $\mu\text{g.ml}^{-1}$ . Ларвицидният ефект на тестваните съединения (с изключение на **5.21**; **5.23**; **5.25** и **5.27**) е концентрационно-независим, т.е. жизнеспособността на ларвите на *T. spiralis* е почти непроменена при двукратно увеличаване на дозата (100  $\mu\text{g.ml}^{-1}$ ).

Въз основа на успешните и обещаващи *in vitro* изследвания на антихелминтната активност срещу *T. Spiralis* на бензимидазоллил хидразоните **5.16-5.27** от серия Б, както и хидразоните **5.1-5.15** от серия А, може да се заключи, че комбинацията от бензимидазолов фрагмент, хидразонова верига и хидрокси- и метокси-заместители във фенолния остатък, благоприятстват антипаразитната активност. Новополучените хидразони от серия Б показват забележителен ларвициден ефект, превъзхождащ този на синтезираните производни от серия А, както и други по-рано синтезирани производни на бензимидазола.

Цитотоксичността на синтезираните 1*H*-бензимидазол-2-ил хидразони беше изследвана *in vitro* чрез колориметричен МТТ тест спрямо две човешки туморни клетъчни линии с различен хистологичен произход, а именно *MCF-7* (ER-положителен аденокарцином на гърдата) и *AR-230* (BCR-ABL положителна хронична миелоидна левкемия). Като референтно лекарство беше използван подофилотоксин, който е известен инхибитор на тубулина. Въз основа на получената зависимост между концентрацията и ефекта на изследваните съединения (“dose-response” relationships), бяха изчислени инхибиращите концентрации  $\text{IC}_{50}$  след 72 часа (Таблица 2). В допълнение, цитотоксичността на хидразоните беше изследвана спрямо нетуморните клетъчни линии *CCL-1* и *3T3* (миши фибробласти) и бяха изчислени индексите на селективност спрямо *MCF-7* и *AR-230* (CSI).

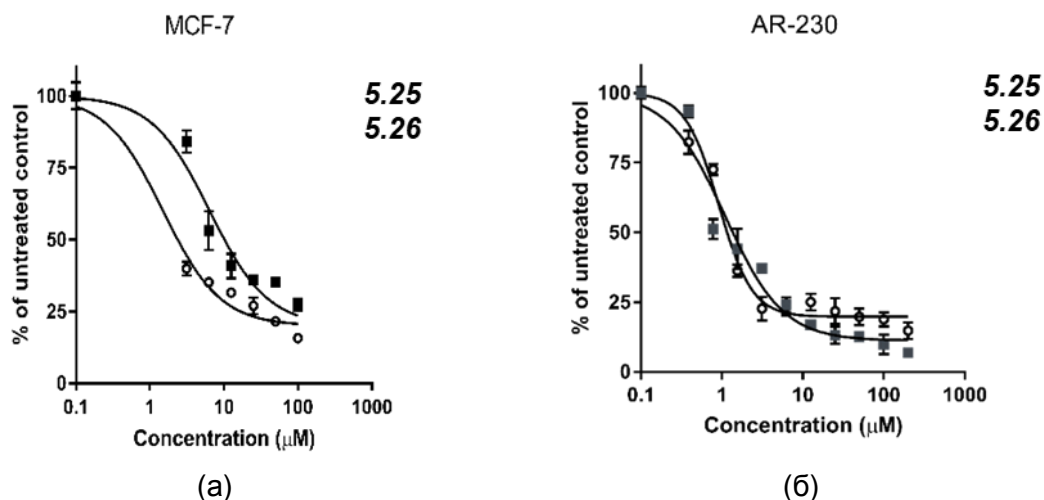
Таблица 2. Цитотоксичен ефект на тестваните хидразони от серия Б и референтния цитостатик подофилотоксин след 72 ч. инкубиране

Съед.	Заместители	$\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )			CSI	
		<i>MCF-7</i>	<i>AR-230</i>	<i>3T3/CCL-1</i>	$\text{CSI}_{\text{MCF-7}}$	$\text{CSI}_{\text{AR230}}$
<b>5.16.</b>	$\text{R}_1=\text{H}; \text{R}_2=2\text{-OH}$	$18.7 \pm 1.1$	$21.2 \pm 2.3$	$204 \pm 5.1$	$\approx 11$	$\approx 9.6$
<b>5.17.</b>	$\text{R}_1=\text{H}; \text{R}_2=2,3\text{-diOH}$	$64.5 \pm 6.2$	<b><math>3.3 \pm 0.3</math></b>	$61.1 \pm 1.8$	$\approx 1$	$\approx 18.4$
<b>5.19.</b>	$\text{R}_1=\text{H}; \text{R}_2=3,4\text{-diOH}$	-	$61.8 \pm 5.7$	$112.8 \pm 9.1$	$\approx$	$\approx 1.8$
<b>5.21.</b>	$\text{R}_1=\text{H}; \text{R}_2=4\text{-OCH}_3$	$11.2 \pm 1.3$	$19.4 \pm 2.2$	$355 \pm 5.3$	$\approx 31.6$	$\approx 18.2$
<b>5.22.</b>	$\text{R}_1=\text{H}; \text{R}_2=2,6\text{-diOCH}_3$	$7.9 \pm 2.1$	$11.5 \pm 1.0$	$261 \pm 4.7$	$\approx 33$	$\approx 22.6$
<b>5.23.</b>	$\text{R}_1=\text{H}; \text{R}_2=3,5\text{-diOCH}_3$	$4.6 \pm 0.7$	$5.9 \pm 0.9$	$335 \pm 7.0$	$\approx 72.8$	$\approx 56.7$
<b>5.24.</b>	$\text{R}_1=\text{H}; \text{R}_2=3,4,5\text{-triOCH}_3$	<b><math>1.2 \pm 0.2</math></b>	<b><math>1.7 \pm 0.3</math></b>	$71 \pm 2.4$	$\approx 59.1$	$\approx 41.7$
<b>5.25.</b>	$\text{R}_1=\text{H}; \text{R}_2=2\text{-OH-3-OCH}_3$	$6.4 \pm 1.2$	<b><math>1.1 \pm 0.2</math></b>	$> 400$	$\approx 62.5$	$\approx 363.6$
<b>5.26.</b>	$\text{R}_1=\text{H}; \text{R}_2=2\text{-OH-4-OCH}_3$	<b><math>1.5 \pm 0.3</math></b>	<b><math>0.9 \pm 0.1</math></b>	$101.8 \pm 7.3$	$\approx 67.8$	$\approx 113$
<b>5.27.</b>	$\text{R}_1=\text{H}; \text{R}_2=3\text{-OH-4-OCH}_3$	$27.6 \pm 3.5$	$16.8 \pm 3.4$	$134.7 \pm 1.3$	$\approx 4.8$	$\approx 8$
	Подофилотоксин	$0.3 \pm 0.06$	$0.47 \pm 0.09$	2.7	$\approx 9$	$\approx 5.7$



Изследваните 1*H*-бензимидазол-2-ил хидразони от серия Б проявяват умерен до отличен цитотоксичен ефект и за двете клетъчни линии, а стойностите за IC<sub>50</sub> варират в интервала 116.9-1.2 μM (Таблица 2). Хидразоните с най-изявен цитотоксичен ефект са **5.24**, съдържащ в структурата си 3,4,5-триметоксифенилов фрагмент (IC<sub>50</sub> = 1.2 μM спрямо MCF-7 и IC<sub>50</sub> = 1.7 μM спрямо AR-230), последван от позиционните изомери **5.25** и **5.26**, чиито заместители във фенилния пръстен са хидрокси и метокси групи. Стойностите на IC<sub>50</sub> за тези три хидразона, спрямо двете ракови клетъчни линии, са сходни със стойностите на референтното лекарство подофилотоксин, но новополучените бензимидазолови производни се отличават с по-висока селективност по отношение на нормалните клетъчни линии 3T3/CCL-1. Изчислените стойности на индексите на селективност са по-високи от 50 и за двете туморни линии, като резултатът за хидразон **5.25** е CSI ≈ 363 спрямо AR-230. Данните за цитотоксичността за два от най-изявените представителя от серия Б **5.25** и **5.26** съответстват на резултатите от *in vitro* изследването върху полимеризацията на тубулин (виж раздел 3.5) като времето на задържане за двата хидразона е повече от 20 минути. От друга страна, хидрокси заместените хидразони **5.17** и **5.19**, които инхибират в най-висока степен полимеризацията на тубулин (време на задържане около 1400 секунди), проявяват ниска цитотоксичност спрямо MCF-7 (**5.17**), съответно AR-230 (**5.19**) и ниска селективност спрямо клетъчните линии. Въз основа на тези резултати, може да се заключи, че е възможно да се наблюдават допълнителни механизми на противораковото действие за изследваните съединения.

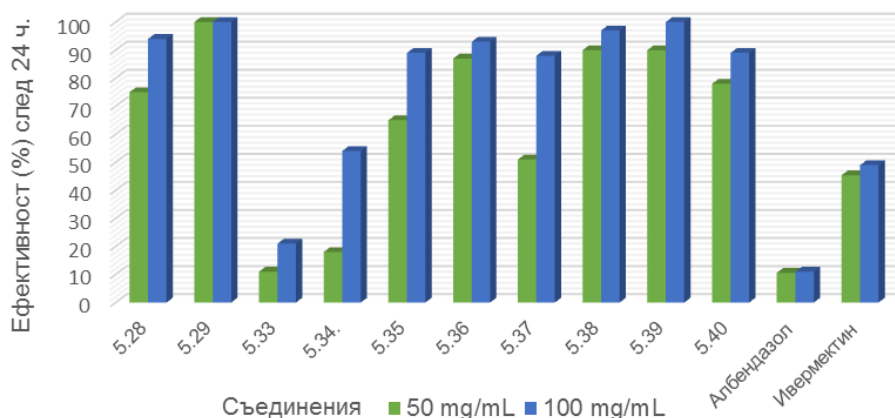
На база на получените резултати, може да се обобщи, че е намерена връзка между структурата на хидразоните и проявената от тях противоракова активност. Цитотоксичността намалява в следния ред: **5.25**, **5.26** (*орто/мета*-заместени хидразони с -ОН и -ОСН<sub>3</sub> групи във фенилното ядро) > **5.22**, **5.23** (дизаместени аналози с две метокси групи във фенилната част) > **5.16**, **5.21** (монозаместени съединения с хидроксилна или метоксилна група) > **5.17**, **5.19** (дихидрокси заместени хидразони). Селективността на изследваните съединения, по отношение на клетъчните линии, следва реципрочен модел. От тези данни следва, че заместителите -ОН и -ОСН<sub>3</sub> са ключови фармакофори и присъствието им в структурата на хидразоните, води до синергично подобряване на антитуморната активност и селективността спрямо раковите линии. Представителни криви концентрация-ефект, демонстриращи изразената, концентрационно-зависима цитотоксична активност на хидразони **5.25** и **5.26** спрямо клетъчни линии MCF-7 и AR-230 са показани на Фигура 8.



Фигура 8. Представителни криви концентрация-ефект на хидразони **5.25** и **5.26** спрямо клетъчни линии MCF-7 (а) и AR-230 (б)

### 3.3. Ин витро изследване на антитрихинелозната и антинеопластичната активност на 1H-бензимидазол-2-ил хидразоните от серия В

Резултатите от *ин витро* изследването на антихелминтното действие на 1H-бензимидазол-2-ил хидразоните от серия В върху *T. spiralis* ML при инкубиране при 37°C за 24 часа и 48 часа, с концентрации от 100 и 50  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ , са представени на Фигура 9. Като сравнителни съединения са използвани албендазол и ивермектин.



Фигура 9. *Ин витро* активност на 1H-бензимидазол-2-ил хидразони от серия В спрямо мускулни ларви на *T. spiralis* след 24 ч. инкубационен период

Хидразоните, които съдържат във фенилното си ядро хидроксилни групи (**5.28** и **5.29**) проявяват от 75 % до 100 % активност срещу ларвите на *T. Spiralis* след 24 и 48 часа инкубационен период и за двете изследвани концентрации. Съединение **5.29**, чийто заместители във ароматния фрагмент са хидроксилни групи на *орто*- и *мета*-позиция проявява най-висока активност от цялата серия В (100% ефективност при концентрации 50 и 100  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ), както след 24 часа, така и след 48 часа инкубиране. Производните със заместители хирокси и метокси групи във фенилното ядро също показват висока ефективност, като хидразон **5.39** има 100 % активност след 48 часа инкубиране и при двете тествани концентрации. Според резултатите, наличието на хидроксилна група на 3-та позиция във фенилния остатък (хидразони **5.29** и **5.39**) е предпоставка за по-силен антихелминтен ефект, което е в съответствие с наблюдаваната активност при аналозите от серия Б.

Метокси аналозите **5.33-5.35** проявяват по-слабо изразено действие, особено при по-ниската тествана концентрация 50  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Съединение **5.33** има най-ниска ефективност, едва 11%, след 24 часа инкубиране при концентрация 50  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Хидразонът, който съдържа три метокси групи във фенилното ядро – **5.36**, се отличава сред метокси заместените производни като най-ефективен, като при концентрация 100  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  след 24 часа инкубиране проявява ефективност 93 %, а след 48 часа се повишава до 100 %.

Наличието на метилна група в бензимидазоловия фрагмент не влияе съществено върху проявяването на антихелминтното действие. Може да се заключи, че от по-съществено значение за активността е присъствието на две хидроксилни групи във фенилния фрагмент или комбинация от ОН и метокси група. В допълнение,

всички изследвани хидразони от серия В проявяват по-изявено действие от това на противопаразитните лекарства албендазол и ивермектин.

Цитотоксичността на новополучените бензимидазоллил хидразони от серия В бе изследвана *in vitro* спрямо раковите клетъчни линии *MCF-7* и *AR-230*, както и спрямо нормалната линия *3T3*. Данните са обобщени в Таблица 3.

Таблица 3. Цитотоксичен ефект на тестваните съединения от серия В и референтния цитостатик подофилотоксин след 72 ч. инкубиране

Съединения	Заместители	IC <sub>50</sub> (µM)		
		MCF-7	AR-230	3T3
<b>5.28.</b>	R <sub>1</sub> =CH <sub>3</sub> ; R <sub>2</sub> = 2-OH	<b>6.9 ± 0.3</b>	<b>2.2 ± 0.5</b>	80.6
<b>5.29.</b>	R <sub>1</sub> =CH <sub>3</sub> ; R <sub>2</sub> = 2,3-diOH	<b>3.4 ± 0.5</b>	<b>1.9 ± 0.4</b>	235
<b>5.33.</b>	R <sub>1</sub> = CH <sub>3</sub> ; R <sub>2</sub> = 4-OCH <sub>3</sub>	31.4 ± 3.4	20.1 ± 4.2	257
<b>5.34.</b>	R <sub>1</sub> = CH <sub>3</sub> ; R <sub>2</sub> = 2,6-diOCH <sub>3</sub>	15.7 ± 2.1	18.7 ± 3.7	84.3
<b>5.35</b>	R <sub>1</sub> =CH <sub>3</sub> ; R <sub>2</sub> = 3,5-diOCH <sub>3</sub>	67.2 ± 3.8	116.9 ± 10.9	240
<b>5.36.</b>	R <sub>1</sub> =CH <sub>3</sub> ; R <sub>2</sub> = 3,4,5-triOCH <sub>3</sub>	51.2 ± 4.7	<b>3.0 ± 0.6</b>	509
<b>5.37.</b>	R <sub>1</sub> = CH <sub>3</sub> ; R <sub>2</sub> = 2-OH-3-OCH <sub>3</sub>	<b>6.4 ± 1.2</b>	<b>3.0 ± 0.1</b>	-
<b>5.38.</b>	R <sub>1</sub> = CH <sub>3</sub> ; R <sub>2</sub> = 2-OH-4-OCH <sub>3</sub>	<b>1.5 ± 0.3</b>	<b>2.3 ± 0.6</b>	-
<b>5.39</b>	R <sub>1</sub> = CH <sub>3</sub> ; R <sub>2</sub> = 3-OH-4-OCH <sub>3</sub>	103.0 ± 8.2	51.2 ± 6.8	-
<b>5.40.</b>	R <sub>1</sub> = CH <sub>3</sub> ; R <sub>2</sub> = 3,5-diOCH <sub>3</sub> -4-OH	> 200	12.4 ± 2.3	-
Подофилотоксин		0.3 ± 0.06	0.47 ± 0.09	

Стойностите на IC<sub>50</sub> спрямо двете клетъчни линии за 1*H*-бензимидазол-2-ил хидразоните от серия В варират в интервала: 1.5-116.9 µM, като съединение **5.38.** показва най-ниската IC<sub>50</sub> стойност спрямо клетъчната линия *MCF-7*: 1.5 µM. При сравняване на аналозите **5.16.** от серия Б и **5.28.** от серия В, които съдържат хидроксилна група на *орто*-позиция във фенолната част (различават се по метилната група в бензимидазоловия хетероцикъл), чийто стойности на IC<sub>50</sub> са съответно 18.7 µM (*MCF-7*) и 21.2 µM (*AR-230*) за **5.16.**, и 6.9 µM (*MCF-7*) и 2.2 µM (*AR-230*) за **5.28.**, прави впечатление, че въвеждането за заместител метилна група в бензимидазоловия цикъл благоприятства проявяването на по-висока цитотоксичност. Същата закономерност се наблюдава и за съединения **5.29.** (3.4 µM (*MCF-7*) и 1.9 µM (*AR-230*)) и **5.17.** (64.5 µM (*MCF-7*) и 3.3 µM (*AR-230*)). За бензимидазоллил хидразоните от серия В, които съдържат една или повече метокси групи във фенолния фрагмент (**5.33.-5.36.**), може да се обобщи, че проявяват по-ниска цитотоксичност спрямо двете изследвани клетъчни линии в сравнение с аналозите им от серия Б, чийто бензимидазолов хетероцикъл е незаместен. Изключение прави само активността на хидразон **5.36.** спрямо линия *AR-230*, за която той показва съответно IC<sub>50</sub> = 3.0 µM.

При хидразоните със заместители хидрокси- и метокси-групи на 3- и 4-позиция във фенолния остатък от серия В (**5.27.** с IC<sub>50</sub> = 27.6 µM спрямо *MCF-7* и 16.8 µM спрямо *AR-230*; **5.39.** с IC<sub>50</sub> = 103.0 µM спрямо *MCF-7* и 51.2 µM спрямо *AR-230*), въвеждането на метилна група в бензимидазоловия фрагмент води до слабо понижаване на цитотоксичността в сравнение с аналозите им от серия Б. От друга страна, съединение **5.38.** от серия В, което също съдържа хидрокси- и метокси-групи във фенолното ядро, но на *орто*- и *пара*-позиция, проявява най-висока цитотоксичност за серия В спрямо двете тествани клетъчни линии *MCF-7* (1.5 µM) и *AR-230* (2.3 µM). В допълнение според експерименталните данни, хидразонът на 2-хидрокси-3-метокси-

бензалдехида (**5.37.**) от серия В също притежава изявен цитотоксичен ефект спрямо AR-230 (3.0  $\mu\text{M}$ ).

Може да се заключи, че влиянието на метилната група на 5(6)-позиция в бензимидазоловия фрагмент е благоприятно за антинеопластичното действие спрямо двете тествани клетъчни линии за хидразоните от серия В, съдържащи една или две хидрокси-групи. За аналозите, които съдържат комбинация от хидрокси- и метокси-групи във фенилното ядро, и при въвеждане на метилна група в бензимидазоловия фрагмент, се запазва високата цитотоксичност.

#### 3.4. *Ин витро* изследване на антинеопластичната активност на метални комплекси на 1*H*-бензимидазол-2-ил хидразоните

Цитотоксичността на металните комплекси **6.1.** и **6.3.** беше изследвана *ин витро* спрямо туморните клетъчни линии MCF-7 и AR-230 и нетуморната клетъчна линия CCL-1. Резултатите са представени в Таблица 4.

Таблица 4. Цитотоксичен ефект на изследваните метални комплекси и подофилотоксин след 72 ч. инкубиране

Съединения	IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{M}$ )		
	MCF-7	AR-230	CCL-1
<b>6.1.</b>	2.3 $\pm$ 0.2	8.6 $\pm$ 0.4	4.4 $\pm$ 1.0
<b>6.3.</b>	1.8 $\pm$ 1.0	n.d. (>400)	10.5 $\pm$ 0.3
Подофилотоксин	0.3 $\pm$ 0.06	0.47 $\pm$ 0.09	

Изследваните метални комплекси **6.1.** и **6.3.** показват изразен концентрационно зависим ефект между растежа на клетките и инхибиращото действие за двете човешки туморни клетъчни линии. Наблюдават се значителни разлики в цитотоксичността между лигандите **5.16.** и **5.26.** и медните комплекси **6.1.** и **6.3.** спрямо нормалната клетъчна линия CCL-1. Лигандите демонстрират незначителна антипролиферативна активност спрямо клетките CCL-1, което показва известна степен на селективност към раковите заболявания с изчислени индекси на селективност >100. От друга страна, техните метални аналози (**6.1.** и **6.3.**) не успяват да покажат подобен модел на селективност, вероятно поради фактори на кинетична стабилност.

Цитотоксичната активност на комплекси **6.1.** и **6.3.** е в ниския микромоларен концентрационен диапазон и при двата модела туморни клетки MCF-7 и AR-230. Изключение от тази обща тенденция се наблюдава само за комплекс **6.3.** спрямо AR-230 с изчислена стойност на IC<sub>50</sub> > 400. В допълнение се наблюдава повишаване на активността на комплекс **6.1.** спрямо MCF-7 (IC<sub>50</sub>=2.3  $\pm$  0.2  $\mu\text{M}$ ) в сравнение с лиганда **5.16.**, от който е получен (IC<sub>50</sub>=18.7  $\pm$  1.1  $\mu\text{M}$ ).

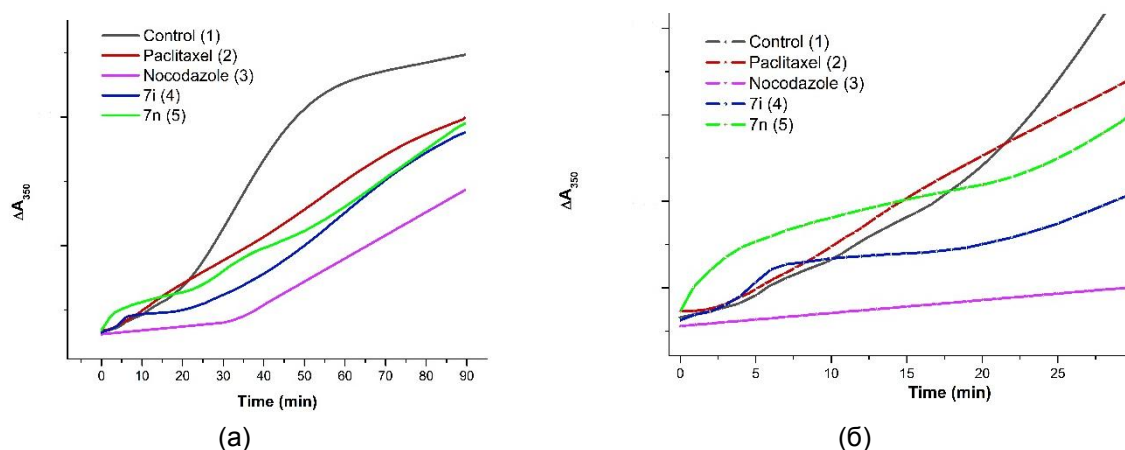
#### 3.5. *Ин витро* изследване на ефекта на бензимидазоловите производни върху полимеризацията на тубулин и изясняване на взаимодействията на лигандите с тубулина чрез молекулен докинг

Известно е, че редица бензимидазолови производни са способни да инхибират полимеризацията на микротубулите на паразитите, свързвайки се селективно с паразитния бета-тубулин, като в същото време проявяват значително по-слаб ефект върху тубулиновата полимеризация в приемния организъм. От друга страна съединения от бензимидазолов тип, като например нокодазолът, проявяват

противораково действие благодарение на инхибиращата си активност спрямо полимеризацията на човешкия бета-тубулин.

Ефектът на бензимидазоловите производни върху полимеризацията на тубулин беше изследвана *in vitro* в температурно контролирани условия при 37°C за 90 min, чрез спектрофотометрично измерване при 350 nm на всеки 30 сек. Като сравнителни стандарти бяха използвани два известни модулятора на полимеризация на тубулин – лекарствата нокодазол и паклитаксел. За паклитаксел (Taxol) е показано, че стабилизира микротубулите, за разлика от нокодазола, който има отрицателен ефект върху микротубулите чрез дестабилизиране на образуването им.

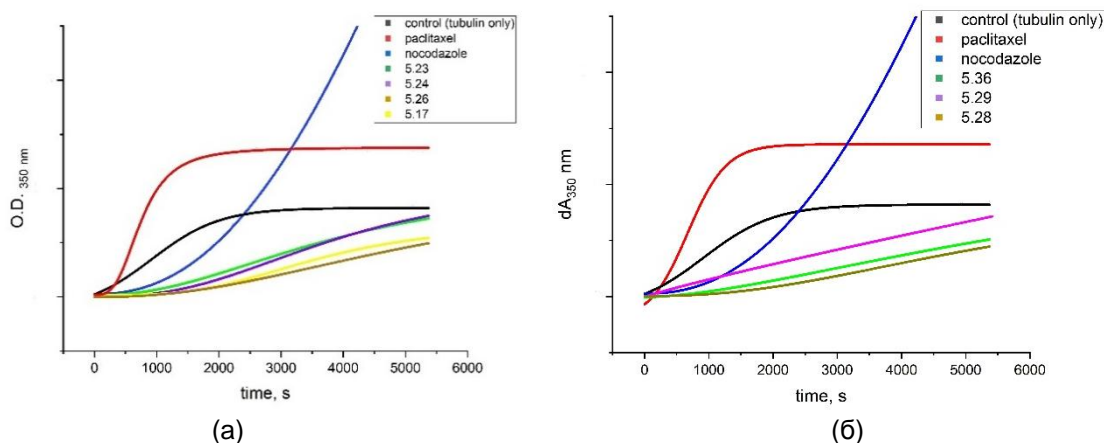
Проучено беше влиянието на част от синтезираните бензимидазоллил хидразони от серия А върху полимеризацията на тубулина. В хода на изследването бяха определени кинетичните параметри, степен на полимеризация и време на задържане („lag-time“). Кинетичните криви за полимеризацията на тубулин в присъствието на два от получените хидразони (**5.9** и **5.14**), както и кривите за сравнителните стандарти паклитаксел и нокодазол, са изобразени на Фигура 10.



Фигура 10. Тубулин ( $54 \mu\text{M}$ ) в присъствие на буфер PB-GTP (1),  $10 \mu\text{M}$  паклитаксел (2),  $10 \mu\text{M}$  нокодазол (3),  $10 \mu\text{M}$  **5.9** (4), and  $10 \mu\text{M}$  **5.14** (5): (a) – кинетична крива в целия диапазон; (б) – разширен изглед от първата фаза на полимеризацията.

В хода на полимеризацията на тубулин (крива 1) са ясно видими трите основни фази на полимеризация: нуклеация, полимеризация и стабилно равновесие. За лекарственото средство паклитаксел, както се очаква, кинетичната крива показва липса на време на задържане. От друга страна, в присъствието на съединения **5.9**, **5.14** и нокодазол се наблюдава намаляване на скоростта на полимеризация на тубулин. Двете тествани съединения имат способността да удължават времето на задържане на полимеризацията на тубулина, подобно на нокодазола.

Кинетичните криви за полимеризацията на тубулин в присъствието на някои от изследваните 1*H*-бензимидазол-2-ил хидразоните от серия Б и В са представени на Фигура 11.



Фигура 11. Тубулин ( $54 \mu\text{M}$ ) в присъствие на РВ-GTP буфер,  $10 \mu\text{M}$  паклитаксел,  $10 \mu\text{M}$  нокодазол и  $10 \mu\text{M}$  от изследваните съединения: (а) **5.23**; **5.24**; **5.26** и **5.17** от серия Б и (б) **5.36**; **5.29** и **5.28** от серия В.

Установено беше, че съединенията **5.16-5.27** от серия Б оказват модулиращ ефект върху полимеризацията на тубулина в различна степен, в зависимост от молекулната си структура. Повечето новополучени бензимидазол-2-ил хидразони от серия Б, с изключение на съединение **5.27**, удължават фазата на нуклеация и забавят полимеризацията на тубулин в по-голяма степен от нокодазол.

В зависимост от получените резултати за времето на задържане (време на нуклеация) и началните скорости на фазата на полимеризация, изследваните съединения в серията могат да бъдат разделени на три подгрупи. Първата група обхваща производните, съдържащи хидроксилни заместители във фениловия пръстен **5.16-5.20**: те удължават фазата на нуклеация до 1000-1461 sec и забавят полимеризацията до  $4.9-13.4 \text{ a.u. sec}^{-1} \cdot 10^{-6}$ . За сравнение, спонтанната полимеризация на тубулина протича с начална скорост  $75.3 \text{ a.u. sec}^{-1} \cdot 10^{-6}$ , а модулиращият ефект на нокодазола е свързан с понижаване на началната скорост до  $52 \text{ a.u. sec}^{-1} \cdot 10^{-6}$ . Втората подгрупа сред изследваните хидразони - тези, които съдържат само метокси групи във фениловия фрагмент **5.21-5.24**, показват по-кратко време на задържане (807-1090 sec) и малко по-висока начална скорост на полимеризация ( $10.7-23,1 \text{ a.u. sec}^{-1} \cdot 10^{-6}$ ). Последната, трета група от хидразони, са представители, чиито заместители във фенилното ядро са хидрокси- и метокси групи **5.25-5.27** показват време на задържане от 1200 до 1295 секунди и начална скорост на полимеризация  $9.7-16.9 \text{ a.u. sec}^{-1} \cdot 10^{-6}$ . За хидразон **5.27** не се наблюдава фаза на задържане.

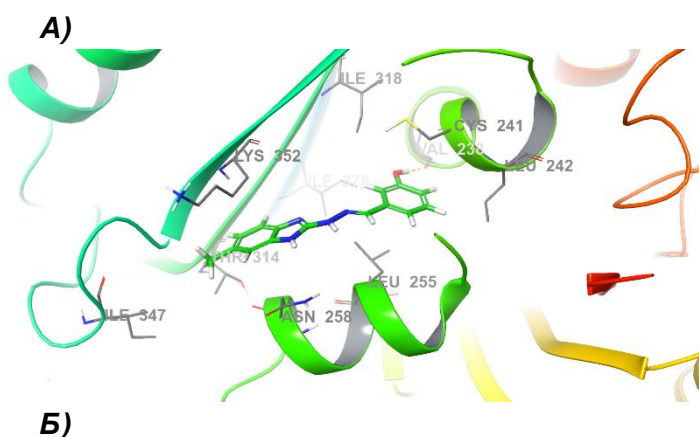
Кинетичните криви за полимеризацията на тубулина в присъствие на някои хидразоните от серия В, показващи най-дълго време на задържане, и референтните лекарства паклитаксел и нокодазол са представени на Фигура 11б.

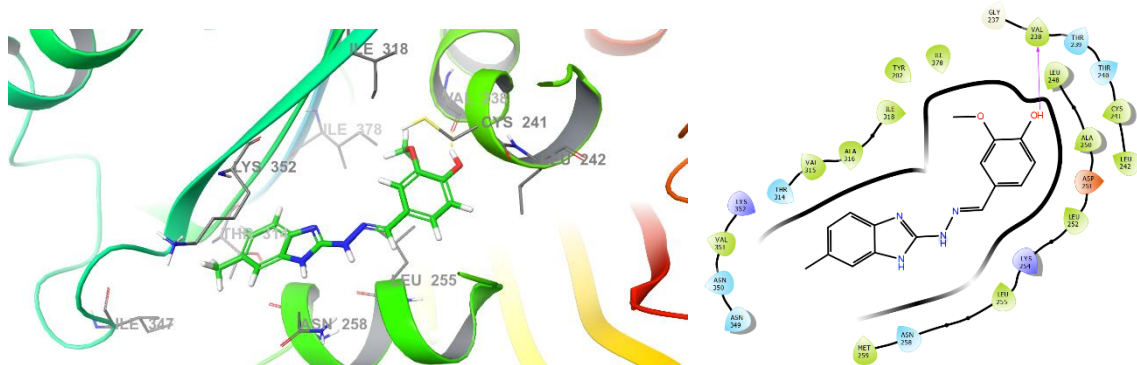
Установено беше, че съединенията от серия В проявяват отчетлив модулиращ ефект върху полимеризацията на тубулина, като при по-голямата част от изследваните съединения липсва време на задържане, но скоростта на полимеризацията е значително намалена за дълъг интервал от време, както се вижда от Фигура 11б. В тази група попадат две производни, съдържащи хидроксилни заместители във фениловия пръстен – **5.28**. и **5.29**., и две от метоксизаместените съединения - **5.33**. и **5.34**. Те забавят полимеризацията до  $3-27 \text{ a.u. sec}^{-1} \cdot 10^{-6}$ . Останалите две метоксизаместени съединения - **5.35**. и **5.35**., показват време на задържане от 600-845 sec, придружено от ниска начална скорост на полимеризация ( $12.9-23.6 \text{ a.u. sec}^{-1} \cdot 10^{-6}$ ).



За да се обясни по-пълно връзката между структурата на изследваните хидразони и механизма на взаимодействие с лекарствената мишена – тубулина, беше проведен молекулен докинг. Въз основа на предходни проучвания, които са показали, че набор от структурно сходни бензимидазолони производни имат способността да инхибират полимеризацията на тубулин и да се свързват към активния център на колхицина в структурата на тубулина, беше изследвана възможността за свързване на настоящите лиганди от серия А към същия активен център. Изследванията бяха проведени чрез програмния пакет Schrödinger.

Резултатите от докинга показаха, че въвеждането на метилна група в бензимидазоловия фрагмент, както е в случая на хидразон **5.10**, води до по-силно стабилизиране на лиганда чрез хидрофобни взаимодействия с аминокиселините Thr314 и Ile347 (Фигура 12а). От своя страна, ОН група има възможност за образуване на водородна връзка с аминокиселината Val238, което е важно за допълнителното стабилизиране на молекулата на лиганда и проявяването на противоракова/антипаразитната активност. Въвеждането на метокси група като заместител на 5-позиция във фенилния остатък, както е в случая на хидразон **5.15**, води до нарушаване на споменатата водородна връзка и намаляване на активността, поради близкото разположение на аминокиселината Leu242. Заместването на хидроксилна група във фенилното ядро с флуорен атом също води до намаляване на фармакологичната активност според данните от докинга. От друга страна, наличието на заместители на 3-позиция във фенилното ядро биха били от решаващо значение поради възможността за образуване на хидрофобни взаимодействия с аминокиселините Ile318 и Ile378 (Фигура 12). Тези изводи са потвърдени и при изследването на лигандите **5.10** и **5.14**. Изчислените афинитети на свързване (binding affinities) на изследваните хидразони са в рамките на  $6.5 \text{ kcal.mol}^{-1}$ , което е в съответствие с наблюдаваните стойности за инхибиращата концентрация ( $IC_{50}$ ) и проявената антитрихинелозна активност, и потвърждава връзката между взаимодействията лиганд-тубулин и фармакологичната активност. Получените резултати от докинг изследването предоставят обяснение за структурните характеристики на лигандите, които обуславят разликите в наблюдаваната фармакологична активност.

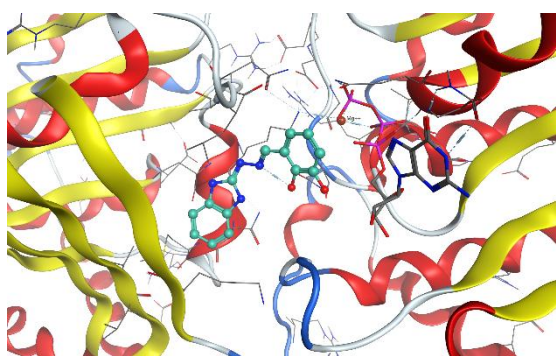




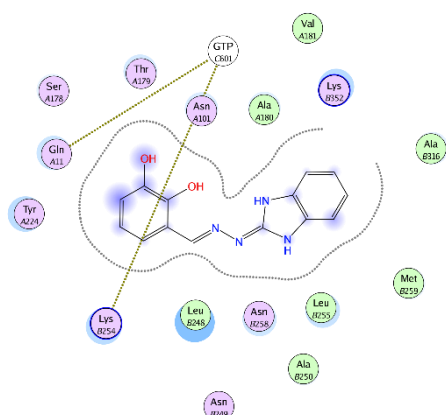
Фигура 12. Взаимодействия между лигандите и тубулина: (А) 5.10 и (Б) 5.14

Начините на свързване на синтезираните 1*H*-бензимидазол-2-ил хидразони от серия Б и В с тубулина също бяха изследвани чрез молекулен докинг в активния център на колхицин. Изследванията бяха извършени с помощта на програмния пакет Molecular Operating Environment (MOE).

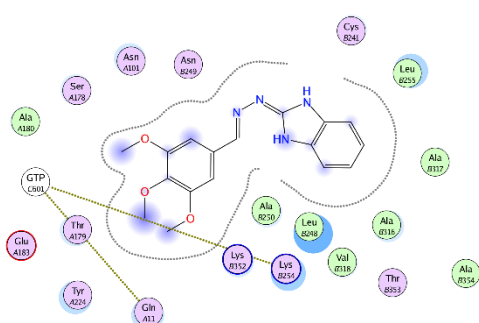
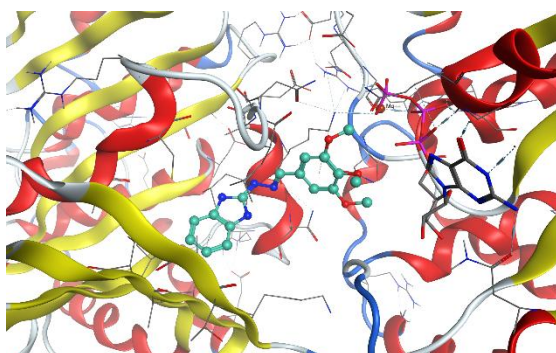
Взаимодействията на съединенията 5.17 и 5.24 с тубулиновия димер са илюстрирани на Фигура 13. Позицията на лигандите в активния джоб на колхицина е показана в лявата част на фигурата, където структурата на хидразона е изобразена с топки и пръчици, а гуанозинтрифосфат (GTP) е изобразен с пръчици. Картите на взаимодействие са показани в дясната част на Фигура 13. За представяне на различните компоненти в картите на взаимодействията са използвани следните означения: контур на джоба - изобразен с черна пунктирна линия, полярни аминокиселини - в розов цвят, липофилни аминокиселини - в зелен цвят, основни аминокиселини - в син цвят, киселинни аминокиселини - в червен цвят; взаимодействия с водородни връзки - изобразени с пунктирна стрелка, липофилни взаимодействия - зелени пунктирани линии.



(а)



(б)





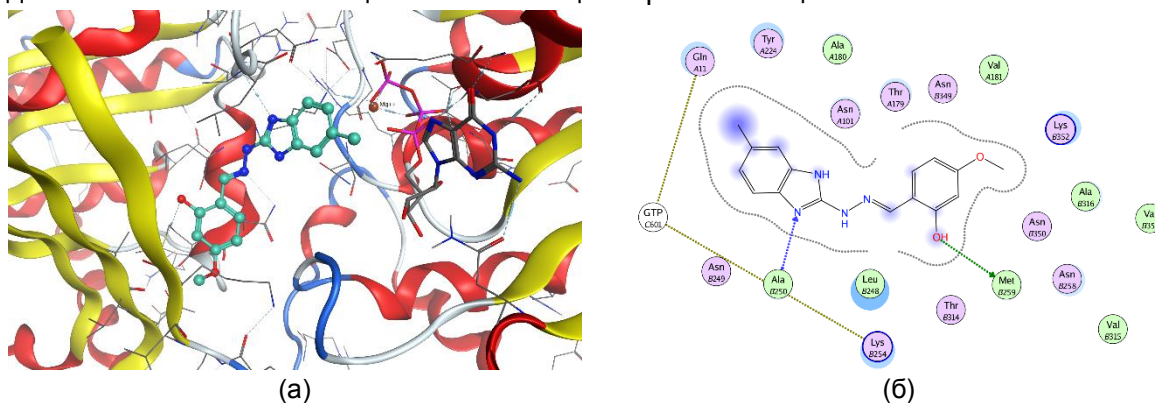
(в)

(г)

Фигура 13. Триизмерно (3D) представяне на взаимодействията на лигандите **5.17** (а) и **5.24** (в) в активния център на колхицин в тубулиновия димер и карти на взаимодействията на **5.17** (б) и **5.24** (г);

Илюстрираните съединения от серия Б – **5.17** и **5.24** са разположени в джоба на активния център на колхицина с бензимидазоловия пръстен, ориентиран към хидрофобните аминокиселинни остатъци Leu248, Ala250, Leu255, Met259, Ala316 и Ala318 на  $\beta$ -тубулина. От друга страна, полярните аминокиселинни остатъци, част от  $\alpha$ -тубулина, Asn 101, Asn249, Ser178, Thr179, Gln 11 и Tyr 224 са разположени в близост до заместеното ароматно ядро. Също така, фенилния пръстен в хидразони **5.17** и **5.24** се намира в близост до GTP и би могъл да участва във взаимодействие с близко разположените полярни аминокиселинни остатъци Thr179, Gln11 от  $\alpha$ -тубулиновата Т5 извивка и Lys254 от  $\beta$ -тубулиновата Т7 извивка. Свързването и стабилизирането на съединенията **5.17** и **5.24** в активния център на колхицина в тубулина се осъществява чрез Вандерваалсови взаимодействия.

Резултатите от молекулния докинг на хидразон **5.38** от серия В в активния център на колхицина са илюстрирани на Фигура 14. За повечето хидразони от тази серия се наблюдава тенденция, при която полярните аминокиселинни остатъци Gln11, Tyr224 и Asn101 от  $\alpha$ -тубулина, са разположени в близост до метилно заместения бензимидазолов фрагмент, а липофилните остатъци Met259, Ala316, Val351 и Val315 от  $\beta$ -тубулина – около фенилния цикъл. Има възможност за образуване на водородна връзка между азотния атом на 3-та позиция в бензимидазоловото ядро на **5.38** и аминокиселината Ala250 от  $\beta$ -тубулина, което стабилизира молекулата в джоба. В допълнение се образува водородна връзка и между ОН групата на *орто*-положение във фенилния фрагмент и аминокиселината Met259 от  $\beta$ -тубулина, което води до допълнителна стабилизация в активния център на колхицина.



Фигура 14. Триизмерно (3D) представяне на взаимодействията на лиганда **5.38** в активния център на колхицин в тубулиновия димер (а) и карта на взаимодействията (б);

### 3.6. Изследване на антиоксидантната и радикал улавяща активност

#### 3.6.1. Спектрофотометрично определяне на радикал-улавящи свойства в системи съдържащи стабилни свободни радикали

Радикал-улавящата активност на новите 1*H*-бензимидазол-2-ил хидразони от серия Б беше изследвана *in vitro* въз основа на способността им да намаляват концентрацията на стабилните свободни радикали ABTS и DPPH (Фигура 15А и Б). Проведеният анализ показва, че стойностите на абсорбцията на разтворите на двата

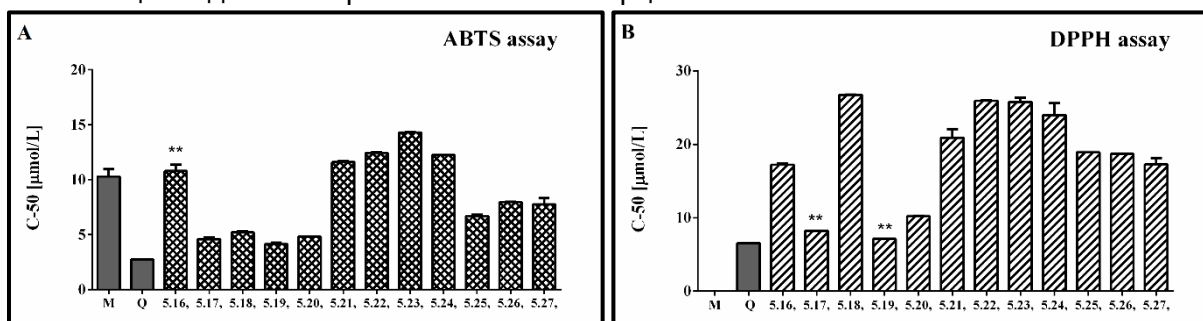
радикала намалява с увеличаване на концентрацията на тестваните хидразони. Кривите за връзката между концентрацията и радикал-улавящата активност са с добре изразени линейни зависимости ( $R^2 < 0.95$ ). Те бяха използвани за оценка на стойностите на С-50 на съединенията и за сравняване на тяхната радикал-улавящата активност.

Два добре познати антиоксиданта – кверцетин и мелатонин, бяха използвани като референтни съединения, за да се направи успешно сравнение между тяхната активност и тази на тестваните хидразони. Мелатонинът съдържа в молекулата си индолилов хетероцикъл, структурно близък до този на бензимидазола, докато кверцетинът е флавоноидно съединение, включващо в структурата си катехолов фрагмент, който също е структурна единица, близка до тази на новосинтезираните и изследвани хидразони в хода на тази дисертация.

Резултатите, получени за *in-vitro* изследването върху моделна система ABTS, показват, че стойности за С-50 за изследваните 1*H*-бензимидазол-2-ил хидразони (**5.16-5.27.** от серия Б) са близки (като в някои случаи могат и да надвишават) или по-ниски по стойност от тези на референтното съединение мелатонин. Хидразоните, които съдържат само метокси- групи във фенилния остатък (моно-, ди- и три-метокси заместени хидразони), имат по-високи стойности на С-50 в сравнение с тези на референтните съединения, което предполага необходимостта от по-голямо количество от синтезираните хидразони в сравнение с мелатонина и кверцетина, за да е успешно постигането на 50 % радикал-улавяща активност. Като част от тази група съединение **5.23.** е най-малко активно, т.е. с най-висока наблюдавана стойност на С-50 –  $14.30 \mu\text{mol.l}^{-1}$ . **5.21.**, **5.22.** и **5.24.** имат статистически идентични стойности на С-50 като са по-ниски в сравнение с тези на хидразон **5.23.**, което предполага по-добра активност. **5.21.** проявява сходна радикал-улавяща способност, като С-50 стойността е подобна на тази на моно-хидроксифенил хидразона **5.16.**

Наличието, както на метокси-, така и на хидрокси-групи във фенилния остатък на тестваните 1*H*-бензимидазол-2-ил хидразони, води до значително намаляване на стойностите на С-50 в сравнение с тези на хидразони **5.21.** и **5.16.** Стойностите на С-50 на тази подгрупа, включваща производни **5.25-5.27.** са по-ниски от  $8 \mu\text{mol.l}^{-1}$ . За тези съединения е необходима по-ниска концентрация, за да се постигне 50% радикал-улавяща активност в сравнение с мелатонина, но не достигат стойността на С-50 на кверцетина.

Хидразоните със заместители две или повече хидроксилни групи в ароматния пръстен **5.17-5.20.** демонстрират най-изявена активност за цялата серия Б. Те имат много сходни и в някои случаи дори идентични стойности на С-50, вариращи от  $4.15$  до  $5.20 \mu\text{mol.l}^{-1}$ . Наблюдаваната активност е много по-висока в сравнение с мелатонина, но все още не достига ефективността на кверцетина.



**Фигура 15. Радикал-улавяща активност на 1H-бензимидазол-2-ил хидразони 5.16-5.27. от серия В, изследвана *in vitro* въз основа на редукция на стабилните свободни радикали ABTS (А) и DPPH (В)**

Сходно с данните от системата ABTS и в този случай представителите, съдържащи две или повече хидроксилни групи във фенолното ядро притежават най-изявена радикал-улавяща способност. Стойността за С-50 за съединение **5.20.** е малко по-висока от тази на кверцетин (със статистически значима разлика). **5.17.** и **5.19.** също проявяват сходна активност с тази на гореспоменатото референтно съединение. Хидразонът **5.16.**, с моно-хидроксифенилова част, и хидразоните със метокси и хидрокси групи, т.е. **5.25-5.27,** показват еквивалентни стойности на С-50. Съединенията с ди- и три-метокси групи проявяват най-високи стойности на С-50, както и ди-хидрокси заместеният хидразон **5.18.**

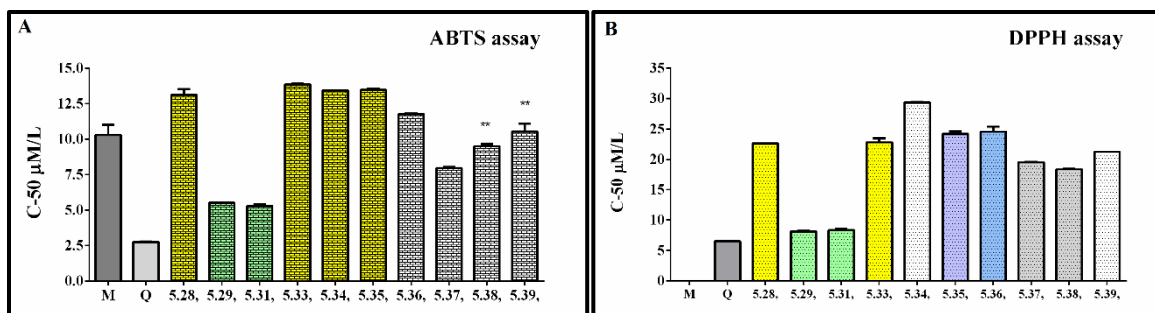
Радикал-улавяща активност 1H-бензимидазол-2-ил хидразоните от серия В също беше изследвана *in vitro* при редукция на стабилните свободни радикали ABTS и DPPH (Фигура 16А и Б). Наблюдаваната обща тенденция в радикал улавящата способност на съединенията е сходна на намерената при съединенията от серия Б. Като референтни антиоксиданти и в този случай са използвани съединенията мелатонин и кверцетин.

Проведените изследвания в системите, базирани на редукцията на стабилните свободни радикали ABTS и DPPH, показват, че стойностите на абсорбция на разтворите на двата радикала намаляват с увеличаване на концентрацията на изследваните хидразони, което предполага способността на хидразоните да елиминират и двата радикала.

Получените данни от моделната система, съдържаща ABTS, показват, че стойностите за С-50 на изследваните бензимидазолпил хидразони са близки (като отново в някои случаи могат и да надвишават) или по-ниски от тези на референтния антиоксидант мелатонин, т.е. успешно обезвреждат радикала, като активността на някои хидразони е по-добра и от тази на мелатонина. От друга страна, радикал-улавящата способност на синтезираните хидразони от серия В в аналогичната система, е значително по-ниска в сравнение с втория референтен антиоксидант кверцетин. Моно-, ди- и три метокси-заместените бензимидазоли **5.33.-5.36.** имат по-високи стойности на С-50 в сравнение с референтните съединения, което предполага необходимостта от по-високи концентрации на тези съединения, за да се постигне 50% RSA% в сравнение с мелатонин и кверцетин. Съединение **5.33.** проявява най-ниска активност, макар статистически погледнато да е сравнима с тази на съединения **5.28., 5.35.** и **5.34..**

Въвеждането на хидроксилни и метоксилни заместители във фенолната част (**5.37.-5.39.**), води до подобряване на активността спрямо метокси аналозите (**5.33-5.36.**), като радикал-улавящата способност е сходна или по-добра от тази на мелатонина.

Хидразонът на 2,3-дихидрокси бензалдехида (**5.29.**) притежава най-изявена способност да елиминира радикала ABTS от цялата серия В, като стойността на С-50 е  $5.52 \mu\text{mol.l}^{-1}$ .



Фигура 16. Радикал-улавяща активност на 1Н-бензимидазол-2-ил хидразони 5.28-5.39. от серия В, изследвана ин-витро въз основа на редукция на стабилните свободни радикали ABTS (А) и DPPH (В)

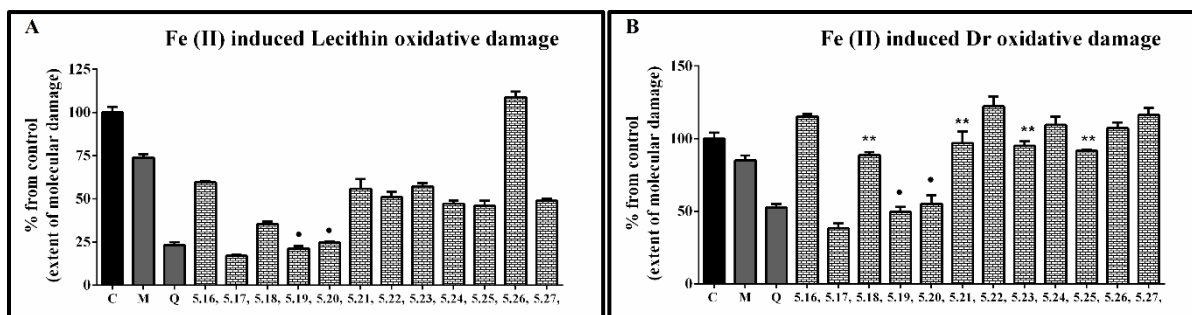
В моделната система, съдържаща радикал DPPH, мелатонинът не проявява способност да намали стойността на абсорбцията на разтвора. Наличието на една или повече метокси групи в структурата на хидразона (5.33.-5.36.) се асоциира с понижена радикал-улавящата активност.

Хидразони, както с метокси-, така и хидроксилни групи във фенилния остатък (5.37-5.39.), водят до умерено, но статистически значимо намаляване на стойностите на C-50 в сравнение с моно-, ди- и три метокси-заместените бензимидазоли в дадената система.

На базата на наблюдаваното намаляване на абсорбцията на получените разтвори на радикалите ABTS или DPPH и възможните взаимодействия с новополучените съединения, беше направена оценка и заключение относно способността на потенциалните антиоксиданти да елиминират и двата радикала.

### 3.6.2. Спектрофотометрично определяне на нивото на желязо индуцирана пероксидация в биологично значими системи

Влиянието на новосинтезираните 1Н-бензимидазол-2-ил хидразони от серия Б върху моделна система, основана на оксидативно увреждане на биологично значима молекула лецитин е представено на Фигура 17А. В пробите, съдържащи референтните съединения, както и всички хидразони, с изключение на 5.26., при концентрация 90 μmol.l<sup>-1</sup>, стойностите на абсорбция при 532 nm са по-ниски в сравнение с тези на контролата. Това насочва вниманието към намаляване на степента на молекулното увреждане и добре изразен протективен ефект срещу индуцираната от желязо липидна пероксидация. Изчислената степен на молекулно увреждане в присъствие на кверцетин е около 20%. За моно-, ди- и три-метоксифенил заместените хидразони наблюдаваната степен на молекулно увреждане е по-висока от 45%. Протективният ефектът на моно-метокси хидразонът 5.21. е статистически сходен с този на ди-метокси заместените производни 5.22. и 5.23. Модулиращият ефект на производно 5.21. също е сравним с този на хидразона с моно- хидроксифенилова част 5.16.. Представителят, съдържащ три метоксилни групи във фенилната част 5.24., проявява по-изявен ефект в сравнение с хидразон 5.21., но все пак еквивалентен резултат на хидразони 5.22., 5.25. и 5.27. Ди- и три-хидрокси заместените хидразони 5.17., 5.19. и 5.20. показват отличен протективен ефект в системата с лецитин като за производни 5.19. и 5.20. активността е сходна с тази на антиоксиданта кверцетин.



Фигура 17. Радикал-улавяща активност на 1*H*-бензимидазол-2-ил хидразони **5.16-5.27** от серия Б, изследвана *in vitro* в моделни системи оксидативно увреждане на лецитин (A) и дезоксирибоза (B)

Способността на съединенията да проявяват протективен ефект в моделна система, основана на оксидативно увреждане на биологично значима молекула дезоксирибоза е представена на Фигура 17Б. В тази система тестваните бензимидазолови производни от серия Б проявяват, както прооксидантен, така и антиоксидантен ефект в зависимост от молекулната структура на съединението. Степента на наблюдавания прооксидантен ефект е незначителна до слаба. Моно-, ди- и три-метокси заместените хидразони или повишават стойностите на абсорбцията в сравнение с контролите, или не оказват никакъв модулиращ ефект. При хидразони **5.16**, **5.22** и **5.27** се наблюдава по-съществено оксидативно увреждане на дезоксирибозата. За всички тези проби изчисленият параметър е над 115%.

Подобно на системата, съдържаща лецитин, и в този случай производните, които имат заместители хидроксилни групи в съседни позиции във фенилния пръстен, притежават по-изявени протективни свойства в условията на желязо индуцирана липидна пероксидация. Съединения **5.19** и **5.20** имат сходен ефект на референтния антиоксидант кверцетин. Най-силна протекция се наблюдава при хидразон **5.17**., при който степента на молекулно увреждане е под 40% – значително по-добър протективен ефект в сравнение с двата референтни антиоксиданта.

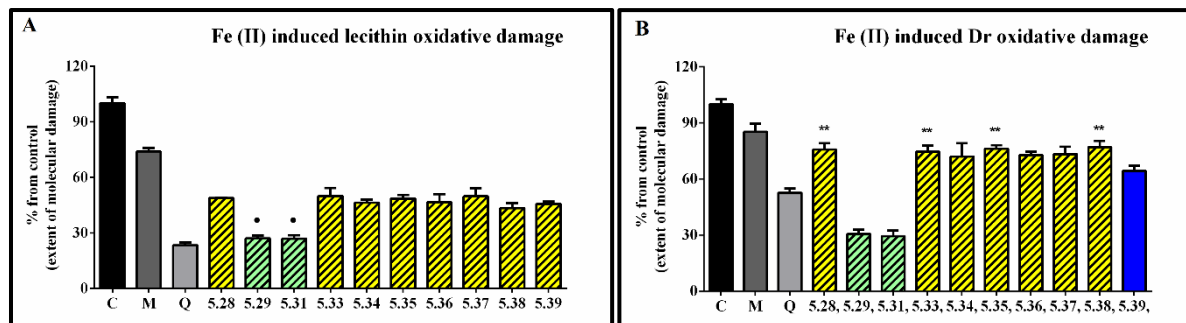
Проведените *in vitro* изследвания показват по-висока радикал-улавяща способност на новополучените хидрокси- заместени 1*H*-бензимидазол-2-ил хидразони от серия Б в сравнение с други по-рано изследвани бензимидазолови производни, като например бензимидазоли, съдържащи N-метил-1,3,4-тиадиазол-2-амин и 4- метил-2*H*-1,2,4-триазол-3(4*H*)-тионови, 2-амино- и 5-арил-1,3,4-оксадиазолови заместители и N,N-дизаместени бензимидазол-2-тион хидразини. От друга страна, като се вземе предвид сравнението с референтните съединения, използвани при измерванията, може да се заключи, че изявената активност на хидрокси-заместените 1*H*-бензимидазол-2-ил хидразони е близка до тази на катехините и флавоноловите съединения и превъзхожда активността на следните производни на мелатонина.

В хода на изследванията, основани на оксидативно увреждане на биологично значими молекули, референтните съединения и повечето бензимидазол-ил хидразоните показват стойности на абсорбция при 532 nm по-ниски в сравнение с контролните проби. Наблюдава се намаляване на степента на молекулно увреждане и протективен ефект срещу желязо индуцираната пероксидация.

В системата, която съдържа лецитин, при сравняване на получените стойности, прави впечатление, че група от осем хидразона (**5.28**, **5.33-5.39**) от серия Б, проявяват, статистически погледнато, идентичен протективен ефект (Фигура 18А). Наличието на една и повече от една метокси група във фениловия фрагмент води до умерен и добър



ефект, по-изявен от мелатонина, но въвеждането на допълнителна хидроксилна група във ядрото, не води до подобряване на протективния ефект. Хидразоните, които съдържат две хидроксилни групи (на *орто*- и *мета/пара*-позиция) имат най-добра способност да защитят клетката от индуцираната липидна пероксидация.



Фигура 18. Радикал-улавяща активност на 1*H*-бензимидазол-2-ил хидразони **5.28-5.39** от серия *B*, изследвана *ин витро* в моделни системи оксидативно увреждане на лецитин (А) и дезоксирибоза (Б)

Според резултатите, получени за системата, съдържаща дезоксирибоза, седем съединения (**5.28**, **5.33-5.38**) притежават идентичен протективен ефект, сравним или по-добър от този на мелатонина (Фигура 18Б). Сходни на представените дотук данни за използваните методи, и в този случай хидразони **5.28** и **5.29** проявява най-изразен протективен ефект в дадената система, по-добър от този на референтните кверцетин и мелатонин.

Сравнявайки структурите на синтезираните бензимидазолил хидразони и проявеният модулиращ ефект от тях може да се заключи, че наличието на повече от една хидроксилна група във фенолната част е решаващ фактор, влияещ върху способността на тестваните хидразони да обезвреждат стабилните свободни радикали и защитават биологично важни молекули. Техният ефект е близък до този на референтния кверцетин.

#### 4. Изследване на вероятните механизми на радикал-улавящо действие

Различни вероятни механизми на радикал-улавящо действие като директен пренос на водород (HAT), пренос на единичен електрон (SET-PT) и пренос на протон, последван от електронен пренос (SPLET) бяха изследвани чрез пресмятане на енталпиите на съответните реакции с използване на DFT. Способността за обезвреждане на свободните радикали чрез HAT механизъм се описва от стойностите на BDE (енталпия на дисоциация на връзката). Йонизационните потенциали (IP) се използват за характеризирание способността на съединенията за пренос на единичен електрон по SET-PT механизъм, докато протонните афинитети (PA) се използват за оценка на способността за пренос на протон по SPLET механизъм. За по-пълно описание на условията в биологичните системи, съответните енталпии на изследваните съединения бяха изчислени в полярна и неполярна среда. Четвърти възможен начин за обезвреждане на свободните радикали е образуването на радикалов адукт (RAF механизъм), при който антиоксидантът ковалентно се свързва със свободния радикал. Реактивоспособността спрямо различни свободни радикали беше оценена чрез анализ на термодинамичните данни за реакциите с хидроксилни, хидроксипероксилни, алкоксилни и алкоксипероксилни радикали. Получените данни помогнаха за намиране на връзката между структурата и антиоксидантната активност

на съединенията и ще дадат насоки за бъдещо разработване на нови фармакологично активни агенти с повишена ефективност и подобрен токсикологичен профил.

Възможните механизми за обезвреждане на свободните радикали – HAT, SET-PT, SPLET и RAF, при 1*H*-бензимидазол-2-ил хидразоните **5.16-5.27**. от серия Б са обобщени на Схема 6:

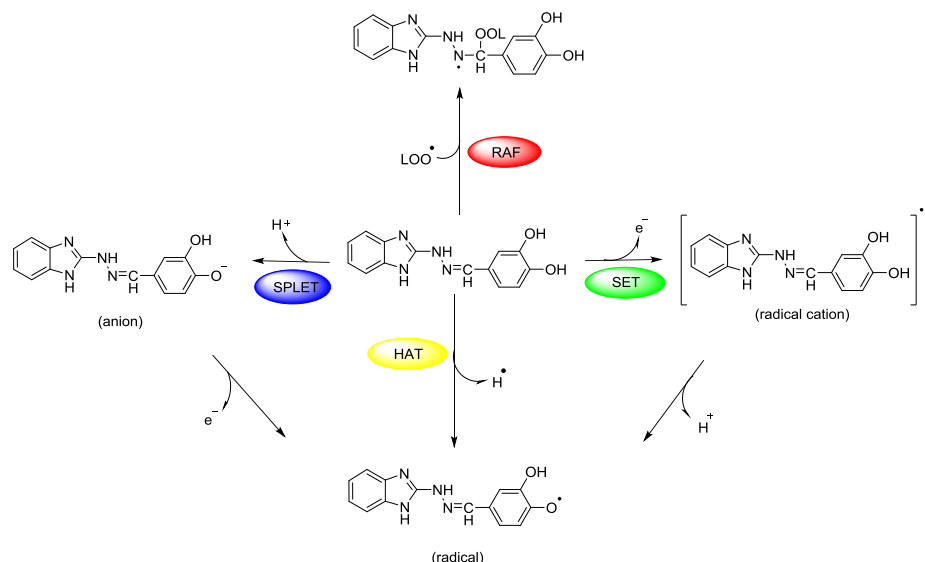


Схема 6. Възможни механизми за обезвреждане на свободни радикали за 1*H*-бензимидазол-2-ил хидразони (съединение **5.19**)

В молекулата на изследваните 1*H*-бензимидазол-2-ил хидразони има няколко възможни позиции за пренос на водороден атом, депротониране или образуване на радикален адукт. Например, при съединение **5.19** има вероятност за разкъсване на връзките N5-H10, N11-H24, O20-H22, O21-H23 и C13-H25 (за номериране вж. Схема 7), за да се осъществи пренос на водороден атом или протон, както е показано със син цвят на Схема 7. За да се образува радикалов адукт атаката на свободните радикали може да бъде осъществена също на няколко позиции в молекулата на избрания представител: C1, C2, C4, C6 и т.н. (показани в червен цвят на Схема 7). Реактивоспособността по HAT механизъм за гореспоменатите позиции в съединение **5.19** беше определена чрез изчисляване на енталпията на дисоциация на връзката (BDE), свързана с образуване на радикали R1-R5 (Схема 7). Най-реактивоспособното място е това, което има най-ниска стойност на енталпията. В по-ранни изследвания е установено, че прилагането на теорията на функционала на плътността (DFT) и в частност B3LYP функционала, са отличен избор за оценка на енталпиите на реакцията, тъй като осигуряват точни резултати за сравнение на изчислените стойности и наличните експериментални данни, а също така и възможност за надеждно описание на връзката структура-активност на антиоксиданти с различни химически структури за разумно изчислително време. От друга страна, е препоръчително използването на базисни набори от вида двуекспоненциални (“double zeta”) или триекспоненциални (“triple zeta”) базисни функции с допълнително добавени поляризационни и дифузни функции, следователно комбинацията B3LYP/6-311++G(d,p) беше избрана за настоящите изчисления. Резултатите, получени на споменатото изчислително ниво, позволяват точно сравнение с други антиоксиданти теоретично изследвани по-рано.

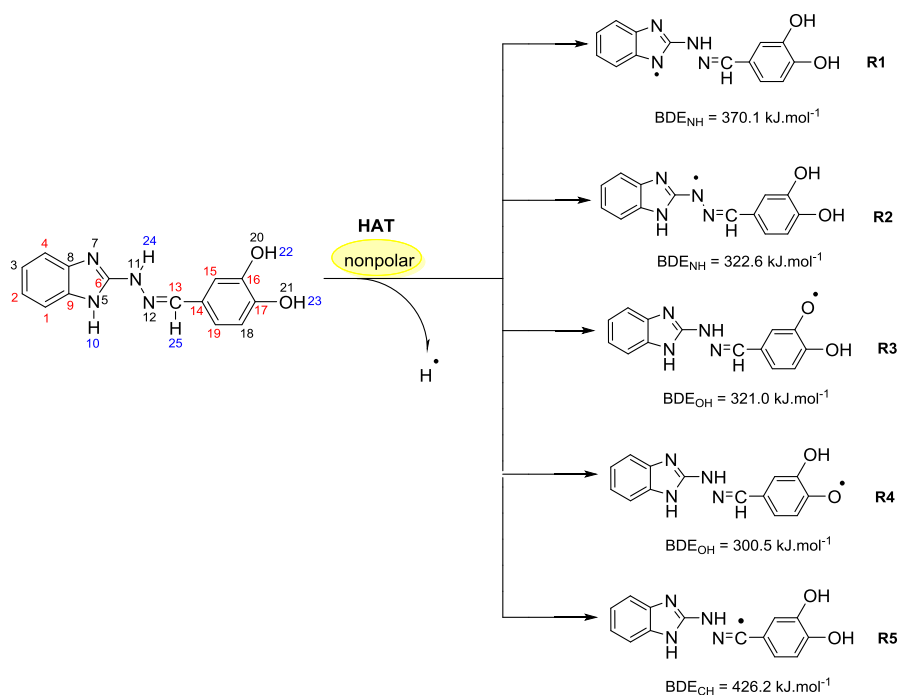


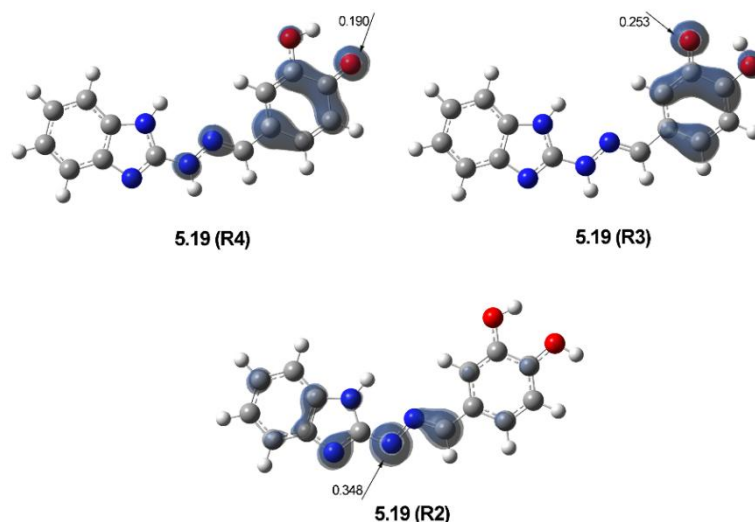
Схема 7. Възможни позиции в молекулата на съединение **5.19** за директен пренос на водород по HAT механизъм (в син цвят), за образуване на радикалов адукт по RAF механизъм (в червено) и BDE, изчислени на ниво B3LYP/6-311++G(d,p) в бензен

Получените резултати за изчисленията, проведени в газова фаза и бензен потвържават, че преносът на водороден атом по HAT механизъм е най-вероятен при хидроксилната група на *пара*-позиция във фенилния пръстен (BDE в бензен 300.5 kJ.mol<sup>-1</sup>; BDE в газова фаза 293.2 kJ.mol<sup>-1</sup>), последвана от хидроксилната група на *мета*-позиция във фенилния пръстен (BDE в бензен 321.0 kJ.mol<sup>-1</sup>; BDE в газова фаза 313.4 kJ.mol<sup>-1</sup>) и amino групата от хидразонова верига (BDE в бензен 322.6 kJ.mol<sup>-1</sup>; BDE в газова фаза 316.5 kJ.mol<sup>-1</sup>). Освен това, изчислените стойности на BDE са близки до тези на известни природни фенолни антиоксиданти като  $\alpha$ -токоферол (BDE в газова фаза: 297 kJ.mol<sup>-1</sup>, изчислен на същото ниво на теория и кверцетин (с най-ниска стойност на BDE за хидроксилната група: BDE= 305 kJ.mol<sup>-1</sup> на същото ниво на теория.

Аmino групата в бензимидазоловия фрагмент и C-H връзката от азометиновата група на съединение **5.19** се характеризират с много по-ниска реактивоспособност (със стойности на BDE 370.1 (BDE в газова фаза 366.7 kJ.mol<sup>-1</sup>) и 426.2 kJ.mol<sup>-1</sup> (BDE в газова фаза 418.7 kJ.mol<sup>-1</sup>), следователно не се очаква да допринесат значително за радикал-улавящите свойства на съединението. За сравнение, BDE за разкъсване на индолиловата N-H връзка и метиленовата група в съседство до индолиловия фрагмент в структурата на мелатонина също бяха изчислени. Първата стойност е 355 kJ.mol<sup>-1</sup>, а втората - съответно 428 kJ.mol<sup>-1</sup>.

Способността за обезвреждане на свободните радикали и проявяване на висока антиоксидантна активност е свързано със стабилността на образуваните радикали, която от своя страна се влияе от делокализацията на несдвоенния електрон върху съответната спрегната система. За да се оцени стабилността на радикалите R4, R3 и R2 на съединение **5.19**, разпределението на спиновата плътност беше определено чрез NBO изчисления и сравнено (Фигура 19).





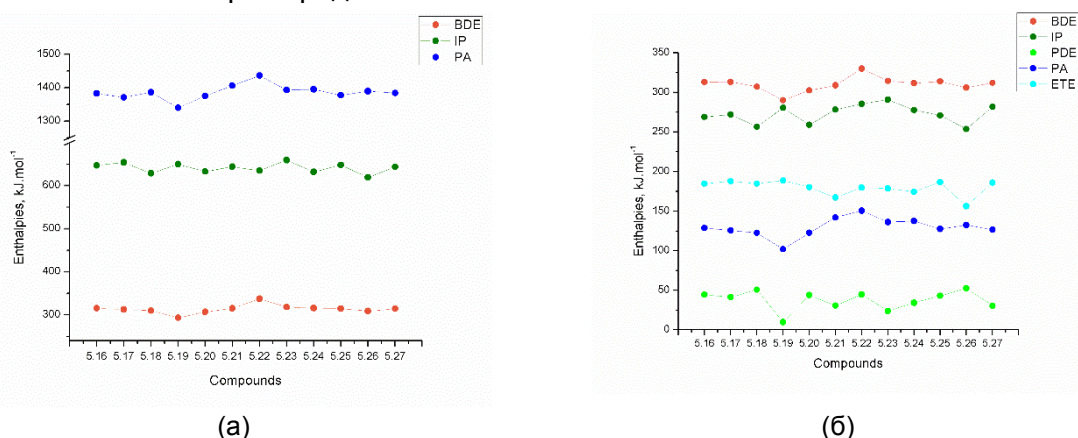
Фигура 19. Разпределение на спиновата плътност на трите най-стабилни радикала R4, R3 и R2 на хидразон **5.19**, изчислено на ниво B3LYP/6-311++G(d,p) в бензен.

За радикала **R4** е характерна висока делокализация на спиновата плътност като 0.176 от несдвоения електрон се намират при O21 (кислорода от хидроксилната група на *пара*-позиция), докато по-голямата част от него е делокализирана върху фенолния фрагмент и хидразоновата верига. При радикал **R3** спиновата плътност е преразпределена предимно върху фенолния пръстен, с 0.231 е- локализирана върху кислородния атом O20 (кислорода от хидроксилната група на *мета*-позиция), докато при радикал **R2** спиновата плътност е ограничена върху хидразоновата верига и част от бензимидазоловия хетероцикъл, с 0.311 е- локализирана върху N11. Тези данни показват, че **R4** е най-стабилният радикал, следван от **R3** и **R2**. Редът на стабилност на радикалите **R4**, **R3** и **R2** е сравним с реда на реактивоспособност на позициите за НАТ механизъм въз основа на изчислените стойности на енталпите (BDE). Подобна корелация между двата параметъра е била открита и в по-ранни публикации за други фенолни антиоксиданти.

Енталпите за механизмите НАТ, SET-PT и SPLET за всички хидразони **5.16-5.27**. от серия Б бяха изчислени в газова фаза и вода. Въз основа на сравнението на стойностите на енталпите BDE с IP и PA, е възможно да се направи оценка по кой механизъм се очаква антиоксидантът да прояви действието си. Колкото по-ниска е енталпията на реакцията, толкова по-лесно би протекла възможната реакция. От друга страна, сравнението на енталпите за различните съединения може да изясни връзката между молекулната структура и експерименталните данни от радикалулавящата активност. За всяко съединение енталпите за тези три механизма бяха моделирани като се взеха предвид всички възможни позиции за реакция. Фигура 20 илюстрира най-ниските стойности на BDE, IP и PA, изчислени за всички съединения в газова фаза. Както може да се види, стойностите за IP и PA са далеч над съответните стойности за BDE за всички изследвани хидразони (Фигура 20a), което показва, че механизмите SET-PT и SPLET изискват значително повече енергия от НАТ и следователно е малко вероятно да протекат в неполярна фаза.

Установено беше, че за съединения **5.19**. и **5.27**., които съдържат като заместители две хидроксилни групи на 3 и 4 позиция във фенолното ядро, най-ниската стойност за BDE съответства на разкъсването на една от O-H връзките и е съответно

293.21 и 314.49 kJ.mol<sup>-1</sup>. За съединения **5.21-5.24.**, при които във фенолния остатък присъстват само метокси групи, най-ниските стойности за BDE са свързани с разцепването на връзката N5-H10 от бензимидазоловия фрагмент. Тези стойности са по-високи от BDE за хидроксилните групи на хидразони **5.18-5.20.** и варират от 315.24 до 373.81 kJ.mol<sup>-1</sup>. За всички производни, съдържащи хидроксилни групи на 2-позиция на фенолния пръстен, най-ниското BDE отговаря на разцепване на връзката N5-H10, подобно на хидразони **5.21-5.24.** Трябва да се отбележи, че съединенията със заместители вицинални хидроксилни групи, т.е. хидразони **5.17-5.20**, притежават най-ниски стойности на BDE за цялата изследвана серия, а 3,4-дихидрокси производно **5.19.** е най-реактивоспособно с BDE от 293.21 kJ.mol<sup>-1</sup>. Въз основа на това се очаква именно това съединение да бъде най-активно, като действието му протича по НАТ механизъм в неполярна среда.



Фигура 20. Енталпии BDE, IP, PDE, PA и ETE за съединения **5.16-5.27** от серия Б в газова фаза (а) и вода (б), изчислени на ниво B3LYP/6-311++G\*\*

Стойностите за BDE за изследваните съединения от серия Б **5.16-5.27** във водна среда са по-ниски в сравнение с тези в газова фаза (варират в диапазона 291.75-330.01 kJ.mol<sup>-1</sup>), но следват същата тенденция (Фигура 20б). От друга страна, данните за изчислените протонни афинитети (PA) във вода за O-H и NH групите за съединения **5.16-5.27.** са много по-ниски от съответните BDE, което показва, че в полярна среда първата стъпка (депротониране) по SPLET механизъм е предпочитана пред НАТ механизъм. PA са свързани със същите функционални групи, както по НАТ механизъм. PA варират в интервала 108.30 и 150.47 kJ.mol<sup>-1</sup> – отново съединенията, които имат вицинални хидроксилни групи **5.17-5.20.** и особено 3,4-дихидрокси производното **5.19.**, имат най-ниски стойности. Втората стъпка (пренос на електрони) по SPLET механизма, която се характеризира чрез енталпията за пренос на електрона (ETE), също изисква по-ниска енергия от хомолитичното разкъсване на O-H или N-H връзката за всички изследвани съединения. Йонизационните потенциали (IP) за производни **5.16-5.27.** във вода са по-ниски от стойностите за BDE, но по-високи от стойностите за PA, което показва, че в полярна среда (вода) механизмът SET-PT е по-малко вероятен от SPLET. Обобщавайки данните за полярната среда, може да се заключи, че в този случай SPLET механизъм се разглежда като най-вероятният механизъм на антиоксидантно действие и се очаква производните с вицинални хидроксилни групи да проявят най-висока активност. Тези резултати са в съответствие с експерименталните данни за радикал-улавящата способност по методите DPPH и ABTS, както и протективния ефект върху моделните системи, съдържащи лецитин и дезоксирибоза, където хидрокси заместените бензимидазолпил хидразони

демонстрират най-изявена активност. Наличието на фенолов фрагмент с вицинални хидроксилни групи се свързва с висока радикал-улавяща способност поради възможността за превръщането му в *орто*-хинонови междинни продукти.

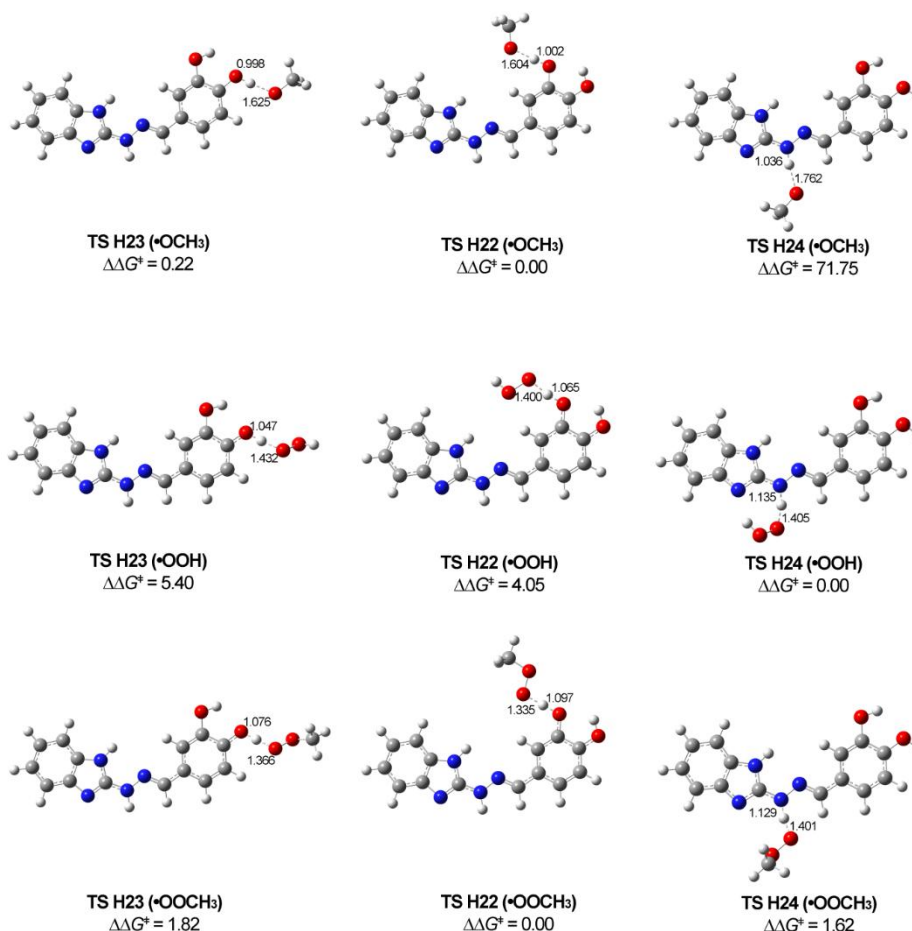
Способността на изследваните съединения да деактивират набор от свободни радикали беше изучено чрез моделиране на редица преходни състояния, включващи атака от радикалите  $\cdot\text{OCH}_3$ ,  $\cdot\text{OON}$  и  $\cdot\text{OOCCH}_3$  на всички възможни позиции. Изчисленията бяха проведени за съединение **5.19** на ниво (SP) (U)M06-2X/6-311++G\*\*/(U)B3LYP/6-311++G\*\*. Функционалите M06-2X и B3LYP с базисен набор 6-311++G\*\* бяха избрани за провеждане на текущите изчисленията, поради надеждността им за изследване на преходни състояния. Активиращите енергии ( $\Delta G^\ddagger$ ) за всички изследвани преходни състояния на съединение **5.19** с трите атакуващи радикала в газова фаза и разтворител (вода и бензен) са представени в Таблица 5.

Таблица 5. Гибсови активиращи енергии ( $\Delta G^\ddagger$ ) за образуване на преходни състояния (TSs) за хидразон **5.19** с набор от свободни радикали по НАТ механизъм, за 25°C, в  $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$

TSs	$\Delta G^\ddagger$ ((U)M06-2X/6-311++G**/(U)B3LYP/6-311++G**)								
	$\cdot\text{OCH}_3$			$\cdot\text{OON}$			$\cdot\text{OOCCH}_3$		
	Газова фаза	Вода	Бензен	Газова фаза	Вода	Бензен	Газова фаза	Вода	Бензен
TS H10	67.64	69.23	77.44	90.83	81.24	90.59	95.07	86.47	97.32
TS H24	33.15	89.83	-	64.81	77.91	74.32	74.46	82.93	84.91
TS H22	-	18.08	-	75.71	81.95	86.09	80.93	81.31	90.32
TS H23	-	18.30	-	68.97	83.31	74.56	71.73	83.13	67.47
TS H25	71.01	83.94	79.93	115.15	125.92	122.74	119.82	132.74	128.83

Най-стабилните преходни състояния TS H24, TS H22 и TS H23 съответстват на образуването на най-стабилните радикали R2, R3 и R4 за всички атакуващи радикали. Моделирането показва, че не е възможно да се локализира преходните състояния между хидразон **5.19** и радикал  $\cdot\text{OCH}_3$  за позиция H24 в бензен, както и H22 и H23 в газова фаза и бензен. Проведените сканирания  $(\mathbf{5.19})\text{-O}\cdots\text{H}\cdots\text{O-CH}_3$  за TS H22 и TS H23 и  $(\mathbf{5.19})\text{-N}\cdots\text{H}\cdots\text{O-CH}_3$  за TS H24 не показват максимуми в енергиите, съответстващи на преходно състояние. Имайки предвид активиращите енергии за TS H22 ( $\cdot\text{OCH}_3$ ) и TS H23 ( $\cdot\text{OCH}_3$ ) във вода (около  $18 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) и активиращите енергии за преходните състояния с другите атакуващи радикали (със стойности в газова фаза и бензен – по-ниски отколкото във вода), може да се заключи, че неоткритите преходни състояния трябва да имат значително по-ниска активираща енергия близка до дифузионния лимит.

Оптимизираните структури на най-стабилните преходни състояния (Фигура 21) насочват вниманието към сходство по отношение на разстоянията на връзките (в Å) за разкъсване на връзките  $\text{O}\cdots\text{H}$  и  $\text{N}\cdots\text{H}$  и образуване на нови  $\text{H}\cdots\text{O}$  връзки с различни свободни радикали. Разстоянията в преходно състояние TS H24 са по-дълги в сравнение с другите две преходни състояния (TS H23 и TS H22) за същия атакуващ свободен радикал.



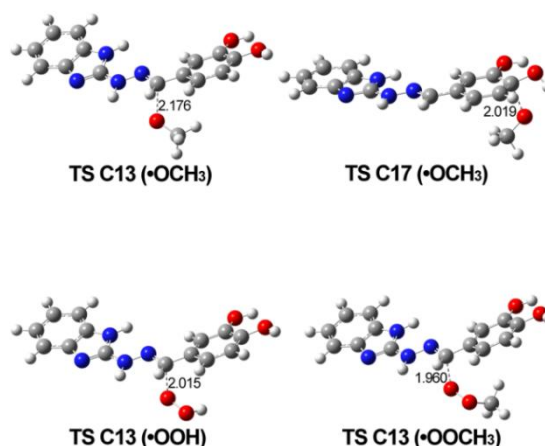
Фигура 21. Оптимизираните структури на преходните състояния за най-стабилните радикали **R2**, **R3** и **R4** за хидразон **5.19** по НАТ механизъм. Стойностите на  $\Delta\Delta G^\ddagger$  показват разликата в активиращите енергии между преходните състояния за всеки радикал. Изчисленията са проведени на ниво *SP M06-2X/6-311++G\*\** във вода.

Според теоретичните данни улавянето на свободните радикали може да протича и по RAF механизъм. Най-стабилните преходни състояния на хидразон **5.19** с изследваните радикали се образуват с участие на позиция C13 (Таблица 6).

Таблица 6. Гибсови активиращи енергии ( $\Delta G^\ddagger$ ) за образуване на преходни състояния (TSs) за хидразон **5.19** с набор от свободни радикали по RAF механизъм, за 25°C, в  $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$

TSs	$\Delta G^\ddagger((U)M06-2X/6-311++G**//((U)B3LYP/6-311++G**)$								
	•OCH <sub>3</sub>			•OOH			•OOCH <sub>3</sub>		
	Газова фаза	Вода	Бензен	Газова фаза	Вода	Бензен	Газова фаза	Вода	Бензен
<b>TS C1</b>	68.15	74.93	75.89	102.16	104.87	107.80	115.53	119.58	122.07
<b>TS C2</b>	70.23	72.73	74.54	101.96	100.35	107.29	115.26	114.57	119.53
<b>TS C4</b>	72.23	71.69	75.85	102.99	100.31	107.88	117.04	116.04	121.04
<b>TS C6</b>	83.64	92.37	91.53	101.62	109.66	109.84	107.90	118.34	116.40
<b>TS C9</b>	73.18	78.53	80.13	107.77	107.56	112.57	121.37	121.36	126.40
<b>TS C13</b>	52.87	60.20	59.55	73.13	82.25	80.70	80.72	91.13	88.93
<b>TS C14</b>	82.30	83.24	87.81	113.28	114.10	117.98	125.51	127.23	130.16
<b>TS C15</b>	70.08	70.10	76.12	102.25	101.91	107.36	112.21	113.95	117.81
<b>TS C16</b>	70.29	72.34	82.25	107.55	101.44	108.84	117.23	115.83	121.77
<b>TS C17</b>	47.72	61.16	57.31	83.81	91.66	91.33	95.10	104.29	102.26
<b>TS C19</b>	65.02	70.42	71.00	94.11	97.89	98.95	106.31	112.12	112.56

Оптимизираните геометрии на възможните преходни състояния, включени в RAF механизма, са илюстрирани на Фигура 22. Най-важният параметър е разстоянието C...O, съответстващо на образуваната нова връзка и е около 2 Å за всички изчислени преходни състояния.



Фигура 22. Оптимизирани структури на най-стабилните преходни състояния за хидразон **5.19** по RAF механизъм за всеки радикал. Изчисленията са проведени във вода.

Стойностите на Гибсовите енергии на реакцията ( $\Delta G_{\text{reaction}}$ ) в Таблица 7 за този механизъм показват, че по отношение на радикала  $\bullet\text{OCH}_3$ , реакцията може да протече на позиция C13 и C17 в структурата на съединение **5.19** във вода и бензен; когато радикалът е  $\bullet\text{OOH}$ , реакцията също е възможна на позиция C13 (вода и бензен), докато когато атакуващият радикал е  $\bullet\text{OOCH}_3$ , реакцията би протекла със затруднения по RAF механизъм. Хипотетично, по механизъмът RAF може да се образува адукт и на позиция N12 (Схема 7), но всеки опит за моделиране и изчисление на съответните продукти и преходни състояния, е неуспешен.

Таблица 7. Гибсови енергии на реакцията ( $\Delta G_{\text{reaction}}$ ) за HAT и RAF механизми за съединение **5.19** с набор от свободни радикали, за 25°C, в kJ.mol<sup>-1</sup>.

Позиция за атака	$\Delta G_{\text{reaction}}((\text{U})\text{M06-2X/6-311++G**}/(\text{U})\text{B3LYP/6-311++G**})$								
	Газова фаза	$\bullet\text{OCH}_3$		Газова фаза	$\bullet\text{OOH}$		Газова фаза	$\bullet\text{OOCH}_3$	
		Вода	Бензен		Вода	Бензен		Вода	Бензен
<b>HAT</b>									
<b>H10</b>	-36.36	-46.88	-37.65	34.50	23.15	32.96	40.00	30.75	39.62
<b>H24</b>	-84.27	-87.42	-82.32	-13.41	-17.39	-11.71	-7.91	-9.79	-5.05
<b>H22</b>	-84.32	-84.46	-83.50	-13.46	-14.43	-12.89	-7.96	-6.83	-6.23
<b>H23</b>	-99.63	-99.29	-98.46	-28.77	-29.26	-27.85	-23.27	-21.66	-21.20
<b>H25</b>	3.36	2.21	5.44	74.22	72.24	76.05	79.71	79.84	82.70
<b>RAF</b>									
<b>C13</b>	-72.93	-59.30	-63.33	-12.69	2.89	-1.05	-1.74	14.23	7.63
<b>C17</b>	-33.50	-20.52	-24.00	33.22	43.65	41.08	43.15	54.25	51.38
<b>C19</b>	-7.15	3.53	0.05	49.64	57.48	56.23	61.73	69.46	67.33
<b>C6</b>	-7.44	6.19	2.97	46.14	59.22	55.08	59.45	73.11	69.60
<b>C15</b>	-0.32	6.64	6.26	55.90	61.67	62.62	66.13	71.97	72.00
<b>C1</b>	5.92	16.26	13.97	63.08	70.87	70.68	76.25	84.87	83.93
<b>C2</b>	12.27	20.53	19.17	67.01	70.94	72.33	80.20	85.44	87.28
<b>C4</b>	3.91	10.93	11.13	61.61	63.63	66.99	72.86	75.68	79.21
<b>C9</b>	32.02	42.70	40.60	91.60	96.73	98.32	106.09	110.98	112.45
<b>C14</b>	31.47	37.22	37.58	87.01	92.49	91.45	98.65	103.71	106.64
<b>C16</b>	4.70	8.28	11.17	68.99	69.92	73.65	80.22	81.57	86.95

Като се имат предвид стойностите на  $\Delta G_{\text{reaction}}$  и  $\Delta G^\ddagger$  за преходните състояния по механизмите HAT и RAF, реакцията между радикала  $\bullet\text{OCH}_3$  и хидразон **5.19** би могла да протече предимно по HAT механизъм на позиции H23, H22 и H24.

Когато атакуващ радикал е  $\bullet\text{OON}$  и двата механизма (HAT и RAF) могат да протекат: HAT – при H23, H22 и H24, и RAF – в позиция C13. Най-стабилните преходни състояния за HAT и RAF механизъм имат сходни стойности на  $\Delta G^\ddagger$  (HAT: H24 – 77.91 (вода) и 74.32 (бензен)  $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  и RAF: C13 – 82.25 (вода) и 80.70 (бензен)  $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ).

Радикалът  $\bullet\text{OCH}_3$  може да бъде обезвреден само по HAT механизъм. Изчисленията показват по-ниска реактивоспособност на радикала в сравнение с другите два изследвани радикала. Според  $\Delta G_{\text{reaction}}$ , реакциите са слабо екзотермични, като активиращите енергии  $\Delta G^\ddagger$  на най-стабилните преходни състояния са по-високи от активиращите енергии  $\Delta G^\ddagger$  на другите два радикала на съответните позиции.

Всички изчислителни данни показват, че новосинтезираните 1H-бензимидазол-2-ил хидразони притежават изявена радикал-улавяща способност, характеризираща се с няколко реакционни позиции, относително ниски енталпии и възможност да действат едновременно чрез няколко механизма. Установено е също, че данните от изчисленията биха могли да дадат надеждни отговори на въпросите относно механизмите на антиоксидантно действие.

Освен за хидразоните от серия Б, антиоксидантните механизми бяха изследвани и за синтезираните хидразони от серия В.

Подобно на съединенията от серия Б, и при хидразоните от серия В би могъл да се осъществи директен пренос на водороден атом или депротониране на няколко места от молекулите по разгледаните по-горе механизми. Съответните позиции ще бъдат онагледени чрез хидразон **5.31.**, при който има вероятност за хомолитично разкъсване на следните връзки: N5-H10, N11-H24, O20-H22, O21-H23 и C13-H25 (Схема 8 за **5.31**). HAT механизъмът беше изучен с помощта на енталпията на дисоциация на връзката BDE за радикалите R1-R5, преставени на Схема 8.

Данните от изследванията, проведени в газова фаза и бензен, подкрепят установената тенденция за аналога от серия Б, че най-вероятно е хомолитичното разкъсване на връзката O21-H23, т.е. директният пренос на водород по HAT механизъм ще протече при хидроксилната група в *пара*-положение. Радикалът R4 има най-ниска стойност на BDE (BDE в бензен  $299.3 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ; BDE в газова фаза  $292.3 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ). Следващите два най-вероятни за образуване радикали са R2 (BDE в бензен  $319.7 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ; BDE в газова фаза  $314.6 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) и R3 (BDE в бензен  $319.9 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ; BDE в газова фаза  $312.8 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ). От друга страна, връзките N5-H10 и C13-H25, съответстващи на amino групата от бензимидазоловия хетероцикъл и C-H връзката от азометиновата верига, притежават най-ниска активност със дадените стойности на BDE: N5-H10 - BDE в бензен  $363.1 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ; BDE в газова фаза  $360.7 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  и за връзката C13-H25 - BDE в бензен  $425.6 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ; BDE в газова фаза  $418.7 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ .



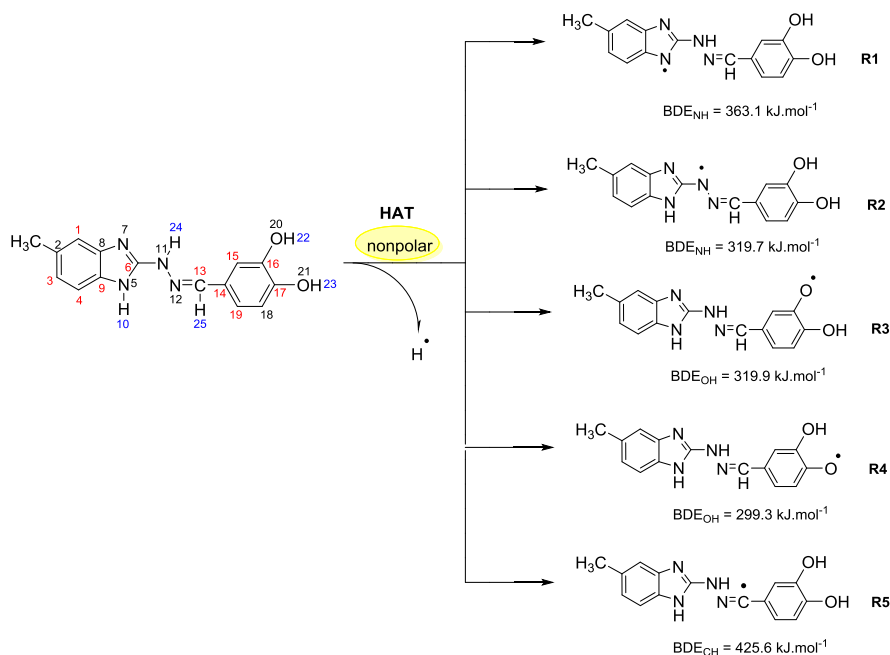
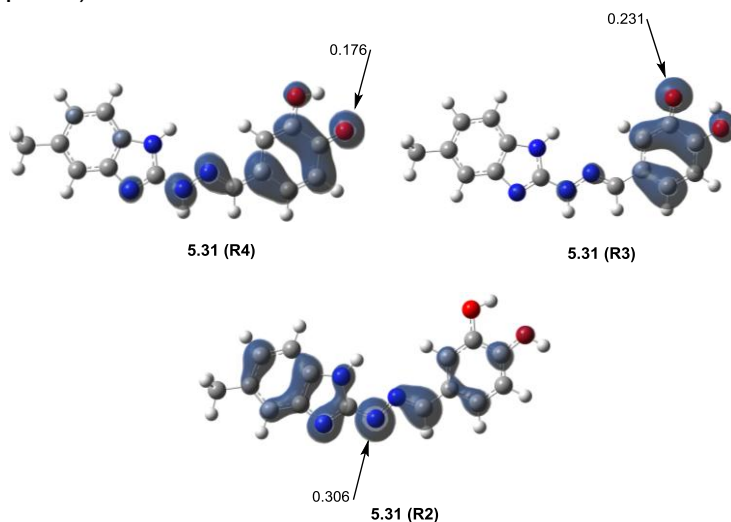


Схема 8. Възможни позиции в молекулата на съединение **5.31**, за директен пренос на водород по HAT механизъм (в син цвят) и за формиране на радикалов адукт по RAF механизъм (в червено), както и изчислените енталпии BDE на ниво B3LYP/6-311++G(d,p) в бензен

В допълнение бе изследвана и делокализацията на несдвоен електрон в структурата на радикали R4, R3 и R2 на хидразон **5.31**., което обуславя тяхната стабилност (Фигура 23).



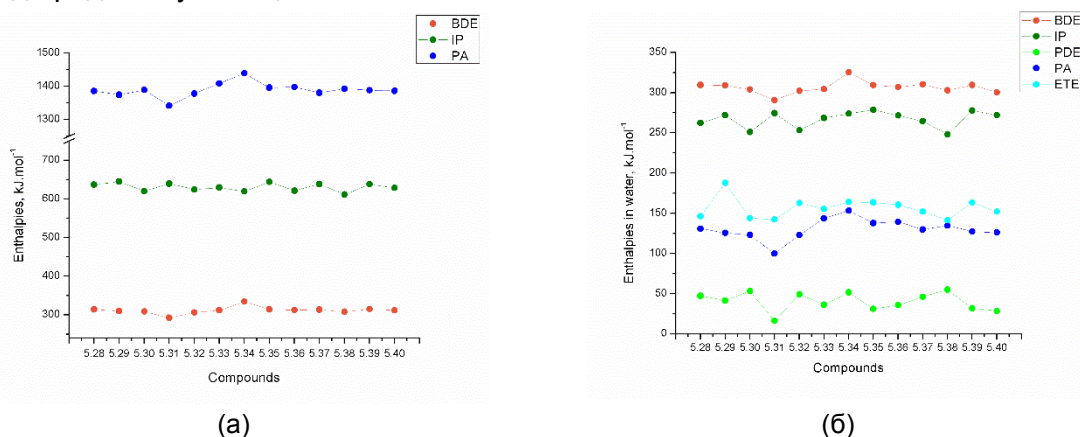
Фигура 23. Разпределение на спиновата плътност в трите най-стабилни адикала R4, R3 и R2 на хидразон **5.31**., изчислено на ниво B3LYP/6-311++G(d,p) в бензен

Радикалът **R4** се характеризира със значителна делокализация на несдвоен електрон, като голяма част от спиновата плътност е разпределена върху фенолния фрагмент и по-малка – върху хидразоновата верига. Върху кислородния атом O21 се намират 0.176 e<sup>-</sup>. При радикал **R3** върху O20 (хидроксилната група на 3-та позиция) са локализирани 0.231 e<sup>-</sup>. В този случай спиновата плътност е разпределена само върху фенолния остатък. За радикал **R2** може да се обобщи, че по-голямата част от спиновата плътност се намира върху бензимидазоловия хетероцикъл и хидразоновата

верига с 0.306 e<sup>-</sup> върху N11 от amino групата. Наблюдава се и малка част от спиновата плътност локализирана върху фенилното ядро, което се различава с резултатите за аналогичния радикал от серия Б. Сходно с направените заключения за серия Б, и в този случай радикал **R4** е най-стабилен, следван от **R3** и **R2**.

За да се направи успешна оценка на антиоксидантните механизми, енталпиите за всички представители от серия В, бяха изчислени в газова фаза и вода.

Сравнението на BDE, IP и PA в газова фаза (Фигура 24а) показва, че HAT механизъмът е предпочетен в неполярна среда, тъй като стойностите за IP и PA са по-високи в сравнение с тези за BDE. От фигурата се вижда, че съединения **5.31**, **5.39** и **5.40**, които съдържат хидроксилни групи на *мета* и *пара*-позиция във фенилното ядро имат най-ниски стойности на BDE – съответно 292.37 kJ.mol<sup>-1</sup>, 315.21 kJ.mol<sup>-1</sup> и 311.94 kJ.mol<sup>-1</sup> (за хомолитичното разкъсване на една от връзките O20-H22 или O21-H23). За метокси представителите **5.33-5.36**, най-ниската стойност на BDE отговаря на пренос на водород от amino групата от бензимидазоловия хетероцикъл и варира в интервала 311.69-334.17 kJ.mol<sup>-1</sup>. За бензимидазоллил хидразоните с *орто*-хидроксилни групи в ароматния остатък (**5.28-5.30**; **5.32**; **5.37-5.38**), най-ниската енталпия BDE е получена при разкъсване на amino групата от бензимидазоловия фрагмент. Съединение **5.31** притежава най-ниско BDE, тоест според теоретичните изчисления този хидразон има най-изявена радикал-улавяща активност по HAT механизъм в неполярна среда. Не се наблюдава съществено изменение на стойностите на BDE, както и направените заключения за активностите на изследваните бензимидазоллил хидразони от серия В в сравнение с резултатите от серия Б. Наличието на метилна група на 5(6)-позиция във бензимидазоловия фрагмент не повлиява изследваната чрез квантово-химични методи радикал-улавяща активност.



Фигура 24. Енталпии BDE, IP, PDE, PA и ETE за съединения **5.28-5.40** от серия В в газова фаза (а) и вода (б), изчислени на ниво B3LYP/6-311++G\*\*

От друга страна в полярна среда (вода) стойностите на BDE за всички бензимидазоллил хидразони от серия В са по-високи от останалите енталпии (варират в интервала 290.61-325.32 kJ.mol<sup>-1</sup>), което доказва, че във вода не е предпочетен HAT механизъм (Фигура 24б). Съответно протонните афините (PA) и енталпиите за пренос на електрона (ETE), характеризиращи SPLET механизма, са с по-ниски стойности от BDE, т.е. може да се заключи, че депротонирането е предпочетената реакция във водна среда. Получените енталпии PA, относно набора от функционални групи във фенилното ядро, следват вече направените заключения за BDE по HAT механизма, като варират в интервала 99.90-139.43 kJ.mol<sup>-1</sup> за всички изследвани хидразони от серия В. Хидразон **5.31** има най-ниска стойност на PA – 99.90 kJ.mol<sup>-1</sup>. IP,



характеризиращи SET-PT механизма, са по-високи от съответните PA (варират от 248.21 до 277.89 kJ.mol<sup>-1</sup>), което показва, че SPLET е предпочетеният механизъм в полярна среда.

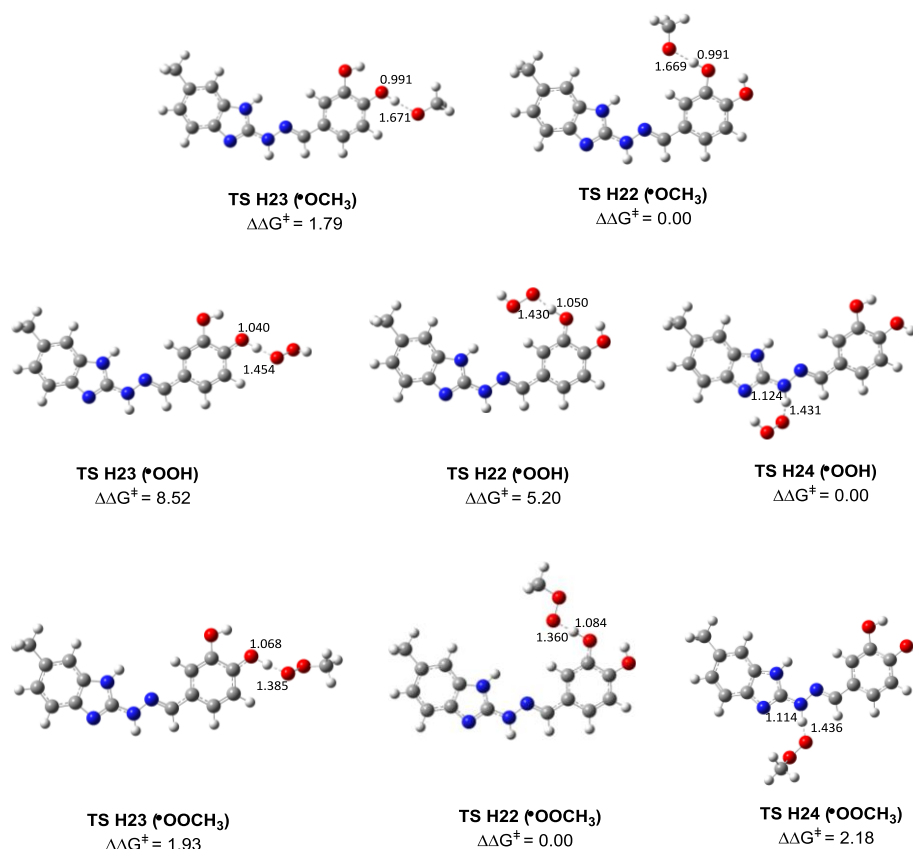
Беше изследвана способността на новосинтезираните съединения от серия В да деактивират свободните радикали •OCH<sub>3</sub>, •OOH и •OOCH<sub>3</sub> на всички възможни позиции чрез прилагане на ниво на теория (SP) (U)M06-2X/6-311++G\*\*//((U)B3LYP/6-311++G\*\*). Активиращите енергии ( $\Delta G^\ddagger$ ) за всички изследвани преходни състояния в газова фаза и разтворител (вода и бензен) за трите атакуващи радикала са представени в Таблица 8.

Таблица 8. Гибсови активиращи енергии ( $\Delta G^\ddagger$ ) за образуване на преходни състояния (TSs) за хидразон **5.31**. с набор от свободни радикали по НАТ механизъм, за 25°C, в kJ.mol<sup>-1</sup>

TSs	$\Delta G^\ddagger$ ((U)M06-2X/6-311++G**//((U)B3LYP/6-311++G**)								
	•OCH <sub>3</sub>			•OOH			•OOCH <sub>3</sub>		
	Газова фаза	Вода	Бензен	Газова фаза	Вода	Бензен	Газова фаза	Вода	Бензен
<b>H10</b>	66.26	68.85	72.82	86.70	77.28	81.94	90.84	83.22	89.12
<b>H24</b>	-	-	-	62.64	75.59	67.98	72.63	82.24	78.87
<b>H22</b>	-	16.74	-	75.54	80.80	82.33	80.49	80.06	87.88
<b>H23</b>	-	18.53	-	91.11	84.11	92.21	71.26	81.99	70.68
<b>H25</b>	71.77	85.46	76.53	115.26	126.67	118.51	119.51	133.59	125.12

Преходните състояния за позиции H24 (всички разтворители), H22 (газова фаза и бензен) и H23 (газова фаза и бензен) между хидразон **5.31**. и атакуващ радикал •OCH<sub>3</sub>, не бяха локализирани, вероятно отново поради поради ниската им енергия. Сходно на изследванията за аналога от серия Б, и в този случай най-стабилните преходни състояния са TS H24, TS H22 и TS H23 и съответстват на най-стабилните радикали **R2**, **R3** и **R4**, образувани по НАТ механизъм (Фигура 25) за трите атакуващи радикала. Оптимизираните структури на преходните състояния и разстоянията на връзките (в Å) са илюстрирани на Фигура 25.

Резултатите от изчислените активиращи енергии за RAF механизъм за съединение **5.31** са представени на Таблица 9. Според теоретичното изследване предимно на позиция C13 (въглеродния атом от двойната азометинова връзка) от структурата на хидразона може да се образуват най-стабилните преходни състояния и за трите радикали. Стойностите на активиращата енергия за тази позиция варират в интервала 52.45-91.18 kJ.mol<sup>-1</sup>. От друга страна, в газова фаза и вода най-стабилните преходни състояния между радикал •OCH<sub>3</sub> и хидразон **5.31**. са на позиция C17 (въглеродния атом фенилното ядро при OH група на пара-положение) със стойности 46.56 (газова фаза) и 52.48 (бензен)(Таблица 9).

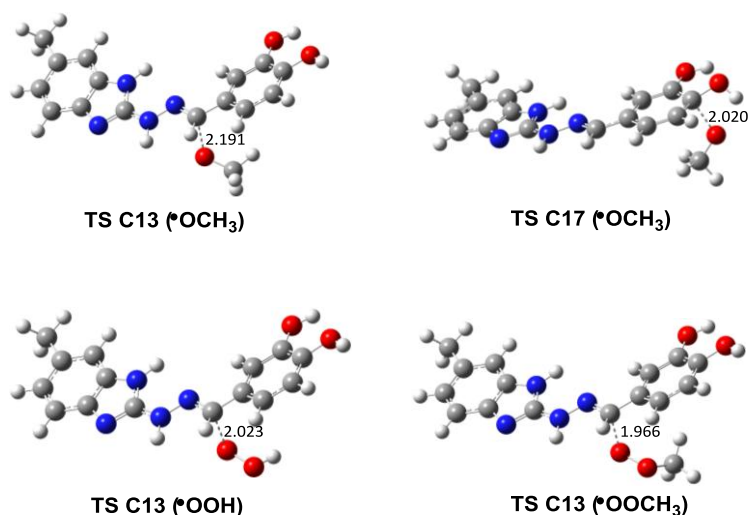


Фигура 25. Оптимизирани структури на преходните състояния за най-стабилните радикали **R2**, **R3** и **R4** за хидразон **5.31**, по НАТ механизъм. Стойностите на  $\Delta\Delta G^\ddagger$  показват разликата в активиращите енергии между преходните състояния за всеки изучен радикал. Изчисленията са проведени на ниво *SP M06-2X/6-311++G\*\** във водна среда.

Таблица 9. Гибсови активиращи енергии ( $\Delta G^\ddagger$ ) за образуване на преходни състояния (TSs) за хидразон **5.31**, с набор от свободни радикали по RAF механизъм, за 25°C, в  $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$

TSs	$\Delta G^\ddagger((\text{U})\text{M06-2X/6-311++G**}/(\text{U})\text{B3LYP/6-311++G**})$								
	$\dot{\text{OCH}}_3$			$\dot{\text{OOH}}$			$\dot{\text{OOC}}_3$		
	Газова фаза	Вода	Бензен	Газова фаза	Вода	Бензен	Газова фаза	Вода	Бензен
<b>TS C1</b>	62.03	69.43	63.70	96.43	100.20	97.36	109.08	113.78	111.41
<b>TS C2</b>	64.73	70.61	67.68	95.85	94.59	95.74	109.32	107.29	108.68
<b>TS C4</b>	72.35	72.15	71.41	103.23	100.21	103.63	116.10	115.76	116.23
<b>TS C6</b>	80.52	88.89	84.02	97.33	105.82	100.49	103.60	114.01	108.68
<b>TS C9</b>	72.12	77.83	75.14	106.84	106.39	107.46	119.55	119.96	120.47
<b>TS C13</b>	52.45	60.29	54.32	72.32	81.96	75.14	79.93	91.18	84.18
<b>TS C14</b>	81.35	82.58	84.25	113.33	112.64	113.33	125.83	125.32	126.64
<b>TS C15</b>	70.59	71.60	71.37	101.99	101.92	102.29	111.71	112.59	112.21
<b>TS C16</b>	69.54	69.51	71.43	107.07	103.00	104.46	116.53	114.38	115.33
<b>TS C17</b>	46.56	60.43	52.48	82.80	91.67	86.84	94.31	103.99	97.17
<b>TS C19</b>	64.28	68.85	66.10	93.12	96.62	94.16	105.51	111.95	108.05

Оптимизираните геометрии на възможните преходни състояния за RAF механизма, са илюстрирани на Фигура 26.



Фигура 26. Оптимизирани структури на най-стабилните преходни състояния за хидразон **5.31**, по RAF механизъм за всеки радикал. Изчисленията са проведени във водна среда.

Изчислените стойности на Гибсовите енергии на реакцията ( $\Delta G_{\text{reaction}}$ ) са обобщени в Таблица 10. По отношение на  $\cdot\text{OCH}_3$ , реакцията може да протече на позиция C13 и C17 във вода и бензен. По отношение на радикала  $\cdot\text{OOH}$ , реакцията е възможна на позиция C13 (газова фаза и бензен), а ако атакуващият радикал е  $\cdot\text{OOCH}_3$ , то реакцията е значително по-затруднена.

Таблица 10. Гибсови енергии на реакцията ( $\Delta G_{\text{reaction}}$ ) за HAT и RAF механизми за съединение **5.31**, с набор от свободни радикали, за 25°C, в  $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ .

Позиция за атака	$\Delta G_{\text{reaction}}((\text{U})\text{M06-2X/6-311++G**}/(\text{U})\text{B3LYP/6-311++G**})$								
	$\cdot\text{OCH}_3$			$\cdot\text{OOH}$			$\cdot\text{OOCH}_3$		
	Газова фаза	Вода	Бензен	Газова фаза	Вода	Бензен	Газова фаза	Вода	Бензен
	<b>HAT</b>								
<b>H10</b>	-41.67	-52.25	-47.12	29.19	17.77	23.49	34.69	25.38	30.15
<b>H24</b>	-87.48	-91.32	-90.03	-16.63	-21.29	-19.42	-11.13	-13.69	-12.76
<b>H22</b>	-86.14	-85.42	-88.10	-15.28	-15.39	-17.49	-9.78	-7.79	-10.83
<b>H23</b>	-100.31	-98.86	-100.57	-29.45	-28.83	-29.96	-23.96	-21.23	-23.30
<b>H25</b>	2.86	3.47	1.93	73.72	73.50	72.54	79.21	81.10	79.19
	<b>RAF</b>								
<b>C1</b>	-0.39	10.10	3.25	57.84	64.73	61.74	70.42	77.78	73.38
<b>C2</b>	5.60	15.19	8.90	59.56	65.30	61.95	72.85	79.82	76.64
<b>C4</b>	2.87	10.48	6.11	59.67	61.84	60.79	71.29	74.88	73.98
<b>C6</b>	-13.05	1.17	-6.80	40.30	53.68	44.95	53.20	67.15	58.64
<b>C9</b>	29.84	41.12	34.41	89.09	94.56	91.75	103.36	108.46	105.86
<b>C13</b>	-73.12	-59.15	-67.72	-13.17	2.30	-4.85	-2.26	14.72	3.77
<b>C14</b>	30.82	36.61	32.84	86.04	90.52	87.44	97.43	106.14	102.17
<b>C15</b>	-0.68	6.24	1.22	55.68	60.85	57.13	65.60	69.44	66.64
<b>C16</b>	5.04	10.19	7.73	69.68	70.04	70.36	78.90	82.59	82.68
<b>C17</b>	-34.47	-21.75	-28.95	31.88	42.81	35.84	41.25	53.22	45.93
<b>C19</b>	-8.69	2.40	-4.56	48.48	57.27	50.40	61.28	70.03	62.60

На база на изчислените стойности на Гибсовите енергии за реакцията  $\Delta G_{\text{reaction}}$  и активиращите енергии  $\Delta G^\ddagger$  за преходните състояния, получени между радикала  $\cdot\text{OCH}_3$  и хидразон **5.31**., реакцията би протекла и по двата механизма HAT и RAF на позиции H23, H22, H24 и C13, макар по-вероятен да е HAT механизмът.

Хидразон **5.31**. може да прояви радикал-улавящата си способност и по двата механизма (HAT и RAF), когато атакуващ радикал е  $\bullet\text{OON}$ . Реакцията може да протече по HAT на позиции H23, H22 и H24 и по RAF – на позиция C13. Най-стабилните преходни състояния за двата механизма имат стойности на  $\Delta G^\ddagger$  за HAT: H24 – 75.59 (вода) и 67.98 (бензен)  $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  и за RAF: C13 – 81.96 (вода) и 75.14 (бензен)  $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ .

При атакуващ радикал  $\bullet\text{OONH}_3$  реакцията би протекла само по HAT механизъм, отново на позиции H23, H22 и H24. Изчисленията показват, че хидразон **5.31**. има най-ниска радикал-улавяща способност към този радикал, в сравнение с другите два.

### **5. Оценка на лекарственото подобие и токсикологичния потенциал на 1H-бензимидазол-2ил хидразоните чрез компютърни методи**

За да упражняват терапевтичното си действие, молекулите трябва да могат да преодоляват физиологични бариери, да бъдат транспортирани в клетките, да достигат терапевтичната си мишена, т.е да притежават благоприятни физико-химични свойства. Тъй като конвенционалните *in vitro* и *in vivo* изследвания на токсичността са трудоемки, отнемат много време, скъпи са и застрашават хуманното отношение към животните, са разработени и изчислителни методи за прогнозиране на токсичността на лекарствата, които макар и да предлагат ниска точност в сравнение с квантово-химичните пресмятания са полезни в ранните етапи на разработване на лекарствата. Различни молекулни характеристики като липофилност, обем, гъвкавост, наличие на донори и акцептори на водородни връзки и др. бяха оценени с помощта на софтуерите Molinspiration, Osiris и SwissADME.

Липински и съавтори са създали ефективна методология, известна като "Правило на петте", за оценка на лекарственото подобие на предложените лиганди. LogP (коефициент на разпределение октанол-вода) е показател за хидрофобността на молекулата. Хидрофобността на молекулата, от своя страна, е от значение за абсорбцията, бионаличността, натрупването в организма, взаимодействието с рецепторите и цитотоксичността. Общата полярна повърхност (TPSA) е друг важен физико-химичен параметър, характеризиращ добрата бионаличност и представлява сумата от полярните повърхности (повърхностите на O- и N-атомите) в молекулата. Стойности на TPSA под  $140 \text{ \AA}^2$  предполагат добра чревна абсорбция, а стойности под  $60 \text{ \AA}^2$  показват възможност за преминаване през кръвно-мозъчната бариера. От съществено значение за добрата оралната бионаличност, както и ефективното взаимодействие с биологични рецептори и каналите, е броят на въртящите се връзки ( $N_{\text{rotb}}$ ) – мярка за гъвкавостта на молекулата. Приема се, че молекулите с по-малко от 10 въртящи се връзки проявяват достатъчна перорална бионаличност. Възможността за образуване на водородни връзки в молекулите на изследваните хидразони е описана чрез броя на донорните и акцепторните водородни връзки.

Резултатите от проведено изследване върху хидразоните от серия А показват, че получените съединения се подчиняват на правилото на Липински. На база на получените данни може да се обопи, че logP за всички синтезирани съединения от серия А е под 4, следователно се очаква добра абсорбция и бионаличност в човешкия организъм. Синтезираните хидразони **5.1-5.15** проявяват добра чревна абсорбция, а съединения от **5.1** до **5.6** покриват критерия и за преминаване през кръвно-мозъчната бариера. Повечето хидразони показват по-малко от 5 на брой въртящи се връзки, с изключение на съединение **5.15**. Според резултатите изследваните съединения имат 4-7 на брой акцептора на H-връзки и 2 или 3 броя донора на H-връзки. Хидразони **5.6**, **5.9**, **5.10** и **5.14** показват най-добър капацитет за образуване на водородни връзки,

което е от значение за ефективното свързване на лигандите към активния център на биологичната мишена и съответно проявяване на биологичната активност.

Токсикологичните свойства на бензимидазоловите хидразони бяха изследвани чрез софтуера OSIRIS Property explorer. Програмата оценява мутагенния, дразнещия, туморогенния и репродуктивния риск при прилагане на дадено съединение като лекарствен продукт. От данните прави впечатление, че всички хидразони биха проявили нисък мутагенен и дразнещ риск. По-голяма част от съединенията биха имали нисък туморогенен риск, с изключение на хидразони **5.13** и **5.14**, за които се очаква среден туморогенен риск. В допълнение, производните, които съдържат в молекулата си метилно заместен бензимидазолов фрагмент (**5.4**, **5.5**, **5.6**, **5.8**, **5.10** и **5.14**), проявяват по-висок репродуктивен риск. Отсъствието на метилната група като заместител в бензимидазола води до нисък репродуктивен риск, както се вижда от резултатите за хидразон **5.13**.

Всички синтезирани хидразони от серия Б удовлетворяват правилото на Липински. Стойностите на  $\log P$  за изследваните хидразони серия Б е под 4, а тези на TPSA-под  $140 \text{ \AA}^2$ , като лиганда **5.21** има стойност  $62 \text{ \AA}^2$ , което предполага способност за преминаване на кръвно-мозъчната бариера. Голяма част от изследваните хидразони притежават по-малко от 5 въртящи се връзки – с изключение на съединение **5.24**, което има 6 въртящи се връзки. Може да се обобщи, че хидразоните имат 5-7 на брой акцептора на Н-връзки и 2-5 броя донора на Н-връзки.

Според токсикологичния потенциал всички синтезирани хидразони от серия Б имат нисък туморогенен риск. Прави впечатление, че повечето съединения биха проявили ниска мутагенност, с изключение на хидразони **5.17** и **5.25**, чиито предсказан висок риск се дължи на присъствието на хидроксилна група на 3-та позиция, както и метокси група на 3-позиция. Същият представител **5.25** би имал и среден риск за дразнение според програмата Osiris. Всички хидразони, без **5.26**, който съдържа хидрокси група на *орто*-позиция и метокси-група на *пара*-позиция, проявяват нисък репродуктивен риск.

Според резултатите от Molinspiration, няма хидразони от серия В, които да нарушават правилото на Липински. Липофилният показател  $\log P$  за хидразоните от серия В е под 4, което предполага оптимална бионаличност. Според параметъра TPSA, съединенията имат отлична чревна абсорбция, а хидразонът **5.33**, който съдържа метокси група на *пара*-позиция, би имал способността да преминава кръвно-мозъчната бариера със стойност на TPSA  $62 \text{ \AA}^2$ . Още един показател за очакваната им добра бионаличност е броят на въртящите се връзки – за повечето производни по-малък от 5. Броят на донори и акцептори на водородни връзки за хидразоните за серия В са съответно 5-7 и 2-5.

Сходно с изследваните хидразони от серия Б и производните от серия В имат нисък туморогенен риск. Съединения **5.29** и **5.37** проявяват висок мутагенен риск, а хидразон **5.37** и среден риск за дразнения, което се дължи на същите структурни модификации, както и при съединенията от серия Б. За тази серия, поради наличието на метилна група в бензимидазоловия хетероцикъл, всички синтезирани производни проявяват повишен репродуктивен риск.

За оценка на способността на изследваните съединения да преминават през кръвно-мозъчната бариера (КМБ), гастроинтестиналната абсорбция (ГА) и лекарственото им подобие бяха използвани и програмата SwissADME и метода Brain Or Intestinal EstimateD (BOILED-Egg). Важно е да се изучи поведението на изследваните съединения спрямо определени фармакокинетични протеини като P-

гликопротеин (P-gr) и цитохроми P450 (CYP), които предпазват централната нервна система от ксенобиотици и са ключов участник в елиминирването на лекарствата чрез метаболитна биотрансформация. Коефициентът на пропускливост през кожата ( $\log K_p$ ) представлява линейна корелационна зависимост между размера на молекулата и липофилността. Колкото е по-отрицателна стойността на  $\log K_p$  (с  $K_p$  в  $\text{cm}^2/\text{s}$ ), толкова по-слабо прониква молекулата през кожата.

Всички синтезирани хидразони от серия А имат отлична гастроинтестинална абсорбция и не са субстрати на P-гликопротеина. Повечето съединения имат способността да преминават кръвно-мозъчната бариера. Радарът за бионаличност показва, че хидразоните от серия А биха имали добра орална бионаличност и не покриват единствено изискването за наситеност. Хидразоните от серия А се очаква да инхибират изоезнима CYP1A2 и P-гликопротеина, а съединения **5.4**, **5.7**, **5.9**, **5.13-5.15** – да инхибират ензимите CYP2C19, CYP2D6 и CYP3A4. Лигандът с най-слабо проникване през кожата е **5.15** със стойност -6.06, а за останалите съединения коефициентът варира от -5.17 до -6.06. Разтворимостта във вода, която е изследвана по няколко метода, има стойности от -3.59 до -4.32, т.е. хидразоните притежават умерена разтворимост.

Според получените данни, съединения **5.16** и **5.21-5.23** успешно преминават през кръвно-мозъчната бариера и всички хидразони от серия Б имат добра чревна абсорбция. В допълнение, P-гликопротеинът не е в състояние да елиминира нито едно от новополучените съединения от ЦНС. Резултатите от програмата SwissADME са в много добра корелация с данните от програмата Molinspiration, касаещи параметъра TPSA. Прави впечатление, че всички хидразони от серия Б изпълняват описаните по-горе свойства за бионаличност, освен наситеността на въглеродородни атоми в  $sp^3$ -хибридизация. Повечето лиганди биха инхибирали само ензима CYP1A2 и не се очаква да са субстрати на протеина P-gr. Съединения **5.21-5.25** и **5.27** са инхибитори и на ензимите CYP2C19 и CYP2D6. Стойностите за коефициента на преминаване през кожата ( $\log K_p$ ) варират в интервала от -5.50 до -6.35, като **5.17-5.19** имат стойност -6.00, а хидразон **5.20** – съответно -6.35, т.е. съединение **5.20** е най-слабо проникващо през кожата. Всички производни от серия Б са разтворими във вода, със стойности от -3.43 до -4.04.

Синтезираните хидразони от серия В имат висока степен на чревна абсорбция, а съединения **5.28** и **5.33-5.35**, според метода BOILED-Egg, преминават и кръвно-мозъчната бариера. Също така P-гликопротеинът няма да елиминира нито един от новополучените хидразони. Радарът за бионаличност показва, че всички хидразони от серия В са лекарственоподобни като покриват оптималните свойства – липофилност, полярност, разтворимост и др. Повечето производни не изпълняват параметъра за наситеност, освен хидразони **5.34-5.36**, които според радара са най-подходящите лекарствени кандидати. Според резултатите за хидразоните от серия В за инхибиращата им способност спрямо P-gr и изоензимите от вида цитохроми P450 (CYP), може да се обопи, че хидразони **5.34-5.36** инхибират всички ензими, включени в програмата (CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6, CYP3A4). В съответствие с данните от серия Б, метокси заместените хидразони проявяват най-силна инхибираща активност. Най-ниската стойност на коефициента за преминаване през кожата ( $\log K_p$ ) е -6.17 за хидразона **5.32**, който съдържа три хирокси групи на 2-, 3- и 4-позиция във фенилното ядро, в съответствие с аналога от серия Б. Разтворимостта на новосинтезираните бензимидазолил хидразони от серия В варира в интервала от -3.72 до -4.34, което показва, че са разтворими във вода.



#### IV. Изводи

1. Оптимизирана е методология за синтез на 1*H*-бензимидазол-2-ил хидразони, позволяваща въвеждане на разнообразни заместители в бензимидазоловия цикъл и фенилния фрагмент. Методологията не изисква специфични реагенти или катализатори и води до получаването на съединенията с добри добиви. В резултат са синтезирани 40 1*H*-бензимидазол-2-ил хидразона, от които 37 са нови, неописани до момента в литературата.
2. Според пресметнатите Гибсови енергии за 1*H*-бензимидазол-2-ил хидразоните, съдържащи хидроксилна група на *орто*-позиция във фенилното ядро, е предпочетена имино формата, докато при останалите хидразони – съответно amino формата. И в двата случая най-стабилни са конформерите с *E* конфигурация на двойната азометинова връзка и *s-trans* конформация на простата N-N връзка.
3. Получени са 4 комплекса на 1*H*-бензимидазол-2-ил хидразони, съдържащи хидрокси групи на *орто*-позиция във фенилното ядро, с Cu(II) и Fe(II), от които 2 са нови, неописани до момента в литературата. Проведеният анализ сочи, че комплексите са образувани чрез координация на една молекула бензимидазолпил хидразон с един метален атом.
4. Хидразоните показват забележителен ларвициден ефект върху мускулните ларви на *T. spiralis*, превъзхождащ този на утвърдените лекарствени препарати албендазол и ивермектин, което ги прави обещаващи кандидати за по-нататъчни изследвания. Най-изявен ларвициден ефект притежават хидразоните, съдържащи една или повече хидроксилни групи във фенилния остатък, а присъствието на OH група на 3-та позиция в фениловия остатък на молекулата е ключово за проявяване на по-висока антихелминтна активност. Наличието на метилна група в бензимидазоловия фрагмент не влияе съществено върху антихелминтното действие.
5. Повечето от проучените 1*H*-бензимидазол-2-ил хидразони проявяват изразена концентрационно-зависима цитотоксична активност по отношение на клетъчни линии с произход от рак на млечната жлеза *MCF-7* и хронична миелоидна левкемия *AR-230* при ниски микромолярни концентрации ( $IC_{50}$ ), придружена от значително пониска цитотоксичност спрямо нормални клетки миши фибробласти *3T3/CCL-1*. Наличието на хидроксилна група на *орто*-позиция във фенилното ядро, придружена от хидроксилна или метокси група на друга позиция, както и наличието на три метокси групи във фенилното ядро, водят до проявяване на изявен антипролиферативен ефект. Въвеждането на метилната група на 5(6)-позиция в бензимидазоловия фрагмент води до повишаване на антипролиферативния ефект при хидразоните, съдържащи една или две хидрокси-групи. За аналозите, които съдържат комбинация от хидрокси- и метокси-групи във фенилното ядро, при въвеждане на метилна група в бензимидазоловия фрагмент се запазва високата цитотоксичност. Цитотоксичната активност на изследваните комплекси е в ниския микромолярен концентрационен диапазон и при двата модела туморни клетки, като в допълнение се наблюдава повишаване на активността на комплекс **6.1**. спрямо лиганд **5.16.**, от който е получен.
6. 1*H*-Бензимидазол-2-ил хидразоните модулират *in vitro* полимеризацията на тубулин в различна степен, в зависимост от молекулната си структура. Повечето съединения удължават фазата на нуклеация и забавят полимеризацията на тубулина в по-голяма степен от нокодазол. Взаимодействията на изследваните съединения с тубулин бяха изяснени с помощта на молекулен докинг.

7. Хидроксигзаместените 1*H*-бензимидазол-2-ил хидразони демонстрират добра радикал-улавяща способност в *in vitro* системи съдържащи стабилни свободни радикали DPPH и ABTS, както и при желязо индуцирана пероксидация на лецитин и дезоксирибоза. Радикал-улавящото им действие е подобро в сравнение с други бензимидазолови производни, като например бензимидазоли, съдържащи *N*-метил-1,3,4-тиадиазол-2-амин и 4-метил-2*H*-1,2,4-триазол-3(4*H*)-тионови, 2-амино- и 5-арил-1,3,4-оксадиазолови заместители и *N,N*-дизаместени бензимидазол-2-тион хидразини. Сравнението с референтните съединения кверцетин и мелатонин показва, че активността на хидроксигзаместените 1*H*-бензимидазол-2-ил хидразони е близка до тази на катехините и флавоноловите съединения и превъзхожда активността на следните производни на мелатонина.
8. 1*H*-бензимидазол-2-ил хидразоните могат да проявяват многостранно антиоксидантно действие – способни са да обезвреждат редица свободни радикали – •OCH<sub>3</sub>, •OON и •OOCH<sub>3</sub> паралелно по няколко механизма (HAT, SPLET и RAF) в полярна и неполярна среда. Молекулната структура на съединенията позволява участието на няколко функционални групи в преноса на водороден атом или протон (хидроксилните групи във фенилното ядро, аминок групата от хидразоновия фрагмент) и образуване на радикалови адукти при различни въглеродни атоми.

## **V. Приноси**

Разработен е нов клас бензимидазолови производни - 1*H*-бензимидазол-2-ил хидразони, съдържащи фенилни фрагменти с халогенни атоми, хидроксиг и метоски групи, които проявяват комбинирано антиоксидантно, антинеопластично и/или антихелминтно действие. Сред тях са селектирани представители, потискащи туморно-клетъчната пролиферация при много ниски микромолярни концентрации, както и проявяващи забележителен ларвициден ефект. Посредством *in vitro* експерименти е демонстриран предполагаемият общ механизъм на антинеопластично и антихелминтно действие – модулиране на полимеризацията на тубулин. С помощта на теоретични методи са изяснени важни молекулни характеристики, свързани с механизмите на антиоксидантно действие, взаимодействието с тубулина, лекарственото подобие, очакваната бионаличност, способност за преминаване през физиологичните бариери и токсичност.

### Списък на публикации по темата на дисертацията:

- 1 Anichina, K., Argirova, M., Tzoneva, R., Uzunova, V., Mavrova, A., Vuchev, D., Popova-Daskalova, G., Fratev, F., Guncheva, M., Yancheva, D. 1*H*-Benzimidazole-2-yl Hydrazones as Tubulin-targeting Agents: Synthesis, Structural Characterization, Anthelmintic activity and Antiproliferative activity against MCF-7 breast carcinoma cells and Molecular docking studies. *Chemico-biological interactions*, 345, Elsevier, 2021, DOI:10.1016/j.cbi.2021.109540, 109540. SJR (Scopus):0.943, JCR-IF (Web of Science):5.194; Q1, не оглавява ранглистата (Web of Science).
- 2 Argirova, M., Georgieva, M., Hristova-Avakumova, N., Vuchev, D., Popova-Daskalova, G., Anichina, K., Yancheva, D.. New 1*H*-benzimidazole-2-yl hydrazones with combined antiparasitic and antioxidant activity. *RSC Advances*, 11, Royal Society of Chemistry, 2021, DOI:10.1039/D1RA07419A, 39848-39868. SJR (Scopus):0.75, JCR-IF (Web of Science):3.361; Q1, не оглавява ранглистата (Scopus).

### В литературата са забелязани 5 цитата на публикация 1:

1. Laxmikeshav, K., Sharma, P., Palepu, M., Sharma, P., Mahale, A., George, J., Phanindranath, R., Dandekar, M.P., Kulkarni, O. P., Nagesh, N., Shankaraiah, N. "Benzimidazole based bis-carboxamide derivatives as promising cytotoxic agents: Design, synthesis, in silico and tubulin polymerization inhibition" *Journal of Molecular Structure*, 2023, 1271, 134078.
2. Bukhari S. N. A. , Ejaz, H. , Elsherif M.A. , Junaid K., Zaki I. , Masoud R.E. "Design and Synthesis of Some New Furan-Based Derivatives and Evaluation of In Vitro Cytotoxic Activity", *Molecules*, 2022, 27(8), 2606.
3. Celik, I. , Ayhan-Kılıçgil, G. , Karayel, A. , Guven, B. , Onay-Besikci, A. "Synthesis, molecular docking, in silico ADME, and EGFR kinase inhibitor activity studies of some new benzimidazole derivatives bearing thiosemicarbazide, triazole, and thiadiazole", *Journal of Heterocyclic Chemistry*, 2022, 59(2) 371-387.
4. Putterill, B., Rono, C., Makhubela, B., Meyer, D., Gama, N. "Triazolyl Ru(II), Os(II), and Ir(III) complexes as potential HIV-1 inhibitors", *BioMetals*, 2022, 35(4), 771-784.
5. Nagesh, K.M.J., Prashanth, T., Khamees, H.A., Khanum, S.A. "Synthesis, analgesic, anti-inflammatory, COX/5-LOX inhibition, ulcerogenic evaluation, and docking study of benzimidazole bearing indole and benzophenone analogs", *Journal of Molecular Structure*, 2022, 1259, 132741.

### Научни съобщения във връзка с дисертационния труд:

- Участие с постери в научни мероприятия в страната или в научни мероприятия в чужбина
1. „Synthesis, characterization and evaluation of the biological activity of new benzimidazole derivatives“ (Maria Argirova) - *European School of Medicinal Chemistry ESMEC*, гр. Урбино, Италия, 30 юни – 4 юли 2019 г.
  2. „In vitro evaluation of the effect of new 1*H*-benzimidazolyl hydrazones derivatives on tubulin polymerization“ (Argirova M., Guncheva M., Yancheva D., Anichina K.) - *EFMC International Symposium on Advances in Synthetic and Medicinal Chemistry*, гр. Атина, Гърция, 01 – 05 септември 2019 г.
  3. „Radical-scavenging activity of new benzimidazolyl hydrazones towards stable free radicals“ (Maria Argirova, Nadya Hristova-Avakumova, Denitsa Yancheva, Vera Hadjimitova) - *Third International Conference on Bio-antioxidants*, гр. Несебър, България, 17-21 септември 2019 г.
  4. „Combined in vitro evaluation of antiparasitic and protective effect towards biologically important molecules of new 1*H*-benzimidazol-2-yl hydrazones“ (Maria Argirova, Dimitar Vuchev, Nadya Hristova-Avakumova, Kameliya Anichina, Miglena Georgieva, Denitsa Yancheva) - *Eighth international conference on radiation in various fields of research (2020)*, виртуална конференция, 20-24 юли 2020 г.
  5. „Novel 2-amino-benzimidazole hydrazones as promising antiproliferative agents“ (Maria Argirova, Georgi Momekov, Maya Guncheva, Emiliya Cherneva, Kamelya Anichina, Denitsa Yancheva) - *EFMC-International symposium of medicinal chemistry and EFMC-Young medicinal chemistry symposium (2020)*, виртуална конференция, 9 септември 2020 г.
  6. „New 2-amino benzimidazolyl hydrazone complexes: synthesis, spectroscopic and DFT investigation“ (Maria Argirova, Emiliya Cherneva, Denitsa Yancheva) - *Research Infrastructure in support of Science, Technology and Culture - Inframat*, София, 29-30 септември 2020 г.

7. „Combined evaluation of the antioxidant and anthelmintic activity of new 2-amino benzimidazolyl hydrazones“ (Maria Argirova, Petko Denev, Dimitar Vuchev, Kameliya Anichina, Denitsa Yancheva) - *European School of Medicinal Chemistry ESMEC*, виртуална конференция, 28 юни-1 юли 2021 г.
8. „Synthesis of novel 5(6)-methyl-2-amino-benzimidazolyl hydrazones as promising anticancer agents“ (Maria Argirova, Georgi Momekov, Maya Guncheva, Emiliya Чернева, Kamelya Anichina, Denitsa Yancheva) - *8th edition of the EFMC Young Medicinal Chemists' Symposium (EFMC-YMCS)*, виртуална конференция, 9-10 септември 2021 г.
9. „Synthesis and characterization of new benzimidazole-based complexes“ (M. Argirova, S. Koleva, D. Yancheva, E. Чернева, K. Anichina)- *XIX Научна постерна сесия за млади учени, докторанти и студенти – ХТМУ*, София, 17 юни 2022 г.
10. „New 5(6)-methyl-1H-benzimidazol-2-yl hydrazones: synthesis, combined evaluation of the anthelmintic and antioxidant activity and performed quantum-chemical calculations“ (M. Argirova, M. Georgieva, N.Hristova-Avakumova, D. Vuchev, K. Anichina, D. Yancheva) - *8<sup>th</sup>EuChemS Chemistry Congress (ECC8)*, Лисабон, 27 август - 01 септември 2022 г.

➤ Участие с доклади в научни мероприятия в страната или в научни мероприятия в чужбина

11. „Синтез и структурно охарактеризиране на нови 1H-бензимидазол-2-ил- хидразони“ (Мария Аргирова, Деница Янчева, Камелия Аничина) - *Дванадесети пролетен семинар „Интердисциплинарна химия, Творчески дом – БАН, Златните мостове, София, 19 – 21 април 2019 г.*
12. „Изследване на тавтомерни превръщания на 1H-бензимидазол-2-ил хидразони чрез ИЧ спектроскопия и DFT пресмятания“ (Мария Аргирова, Деница Янчева, Камелия Аничина) - *XVIII Национална конференция по химия за студенти и докторанти 2019 – Софийски университет, София, 15 - 17 май 2019 г.*
13. „New benzimidazolyl hydrazones - synthesis and combination study of the radical-scavenging activity“ (Maria Argirova) - *Global Women's Breakfast*, София, 12 февруари 2020 г.
14. „Експериментални и теоретични изследвания на радикал-улавящата способност на 2-амино бензимидазол хидразони“ (Мария Аргирова, Миглена Георгиева, Надя Христова-Авакумова, Камелия Аничина) - *Тринадесети пролетен семинар-уебинар „Интердисциплинарна химия“*, виртуална зала Moodle/Big Blue Button, 22–26 юни 2020 г.
15. „Нови 1H-бензимидазол-2-ил-хидразони с антирадикалова, антипролиферативна активност и модулиращ ефект върху полимеризацията на тубулин“ (Мария Аргирова, Георги Момеков, Надя Христова-Авакумова, Мая Гунчева, Емилия Чернева, Камелия Аничина, Деница Янчева) - *XIX Национална конференция по химия за студенти и докторанти 2021*, София, 2-4 юни 2021 г.
16. „Newly synthesized 5(6)-methyl-1H-benzimidazolyl hydrazones as promising antioxidant and anticancer agents“ (M. Argirova, N. Hristova-Avakumova, E. Чернева, G. Momekov, D. Yancheva) - *XLV "A. Corbella" International Summer School on Organic Synthesis – ISOS 2021*, виртуална конференция, 14-17 юни 2021 г.
17. „New benzimidazole-based drug candidates with antineoplastic and antiparasitic activity“ (M. Argirova, G. Momekov, D. Vuchev, E. Чернева, K. Anichina, D. Yancheva) - *Трети интердисциплинарен докторантски форум*, Кюстендил, 05-08 юни 2022 г.

**Благодарности:**

**Изследванията са осъществени с финансовата подкрепа на Фонд „Научни изследвания“, проект КП-06-Н39/4.**