

Хабилитационна справка на научните трудове
на гл. ас. д-р Неда Орлинова Анастасова
за участие в конкурс за „доцент“ по: 4.2. Химически науки, научна
специалност „Органична химия“
за нуждите на лаборатория „Структурен органичен анализ“

Научните трудове, представени в хабилитационната справка, са в областта на органичната и фармацевтичната химия, и по-специално в разработването на нови потенциални мултитаргетни средства за лечение на невродегенеративни заболявания. Основните научни приноси са резултат от интердисциплинарни изследвания, които могат да бъдат обобщени в следните тематични направления:

1. Дизайн, синтез, спектрални и структурни изследвания на бензимидазолови и индолови хибриди
2. Изследване на фармакологичната активност на съединенията в различни *in vitro* модели
3. Изследване на радикал-улавящите свойства на съединенията в различни *in vitro* модели
4. Провеждане на *in vivo* изследване в модел на деменция в плъхове
5. Квантовохимични изчисления за изясняване на механизма на действие

Въведение

Невродегенеративните заболявания представляват хетерогенна група от прогресивни нарушения на централната нервна система, сред които най-разпространени са болестта на Алцхаймер (АБ) и болестта на Паркинсон (ПБ). Те засягат над 60 милиона души в световен мащаб, включително над 115 000 в България. С оглед застаряващото население и нарастващата продължителност на живота, се прогнозира броят на засегнатите да се удвои до 2050 г., което подчертава необходимостта от разработване на нови по-ефективни терапевтични средства, които да могат да отговорят на нарастващото предизвикателство [1].

ПБ е хронично, прогресивно и все още нелечимо заболяване, характеризиращо се с дегенерация на допаминергични неврони в *substantia nigra pars compacta* и свързания с това допаминов дефицит в стриатума [2,3]. Освен класическите моторни симптоми (тремор, брадикинезия, ригидност, постурална нестабилност), болестта включва широк спектър от немоторни симптоми, като когнитивни нарушения, тревожност, депресия, нарушения на съня и автономна дисфункция, значително влошаващи качеството на живот на пациентите.

Сегашните терапии, включително леводопа и нейните адюванти, допаминови агонисти, МАОВ и СОМТ инхибитори, осигуряват временно симптоматично облекчение, но не въздействат върху подлежащите патогенетични механизми и не забавят прогресията на заболяването. Ефективността им намалява с времето, а хроничната употреба води до сериозни странични ефекти, което налага преосмисляне на терапевтичния подход.

Патогенезата на ПБ е силно мултифакторна, включваща α -синуклеинова патология, оксидативен стрес, митохондриална дисфункция, невровъзпаление и дисрегулация на биометали. Макар и основната причина за възникване на болестта да остава загадка, оксидативният стрес е идентифициран като критичен предшестваш фактор в дегенеративната каскада [4]. Повишената експресия на моноаминооксидаза-В (МАОВ) и акумулацията на свободни радикали водят до увреждане на липиди, протеини и ДНК, усилват α -синуклеиновата агрегация и отключват невровъзпалителни процеси [5]. Железните йони допълнително засилват тези ефекти чрез реакция Фентън и индуцират фероптоза. Допаминергичните неврони разчитат критично на митохондриалната функция, поради високите си енергийни нужди, които са от съществено значение за невротрансмисията и пластичността. Митохондриалното увреждане е признато за основен невропатогенен механизъм при БП [6]. В този контекст идеалният терапевтичен кандидат трябва да притежава мултимодално действие — да инхибира МАО-В, да има невропротективни и антиоксидантни свойства, както и да модулира митохондриалните и възпалителните процеси. Традиционният „един-таргет“ подход е неадекватен спрямо сложността на заболяването, поради което нараства интересът към мулти-таргетни терапевтични стратегии [7].

Представените публикации в настоящата хабилизационна справка са фокусирани върху дизайна, синтеза и биологичната оценка на нови мулти-таргетни съединения, създадени чрез

молекулна хибридизация на фармакофори с доказана активност. Тези съединения са насочени към ключови патогенетични механизми, с потенциал за постигане на невропротективен и модифициращ болестта ефект.

I. Синтез на индолови и бензимидазолови арилхидразони

Публикациите B1–B5 обхващат синтеза и изследванията на пет серии от общо 40 нови арилхидразонов производни: Серия I (BIM1): 1,3-дизаместен бензимидазол-2-тион, Серия II (BIM2): 1-заместени бензимидазол, Серия III (IPA): производни на индол-3-пропионова киселина, Серия IV (5MICA): 5-метоксииндол-2-карбоксилна киселина и Серия V (IAA): индол-3-оцетна киселина (Фиг. 1). Тези производни съдържат разнообразни комбинации от хидроксилни и метоксилни заместители в арилхидразоновия фрагмент и бяха изследвани като потенциални мултицел таргетни съединения за лечение на болестта на Паркинсон, а представител от 5MICA-серията, съдържащ 3,4-дихидроксид заместител, показал най-обещаващи свойства във всички *in vitro* изследванията, беше изследван за *in vivo* модели на деменция от тип болест на Алцхаймер в плъхове, отразено в публикация B3.

Приносният характер на публикацията, свързана със Серия I се състои основно в генериране на по-голям набор производни с вариране на хидроксид и метоксид заместителите в арилхидразоновата част, което позволи провеждане на сравнителен анализ и селектиране на водещи фармакофорни фрагменти, които впоследствие бяха използвани като основа за дизайн на съединенията от Серии II–V.

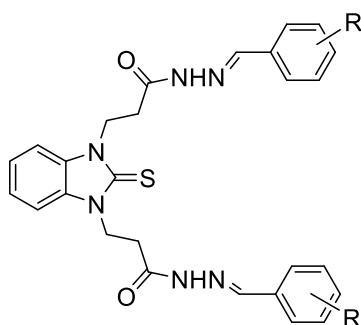
Синтезът на съединенията от Серия I бе осъществен по предходно разработена и оптимизирана методика, включваща реакция на Микаел за получаване на дизаместен естер на 2-бензимидазол-2-тион [8], последвана от хидразинолиза и кондензация с разнообразно заместени хидроксид- и метоксибензалдехиди. Останалите Серии II–V бяха получени по аналогичен начин, като основната разлика се състои в началната стъпка за получаване на естерния прекурсор. Получени са данни от структурното охарактеризиране на съединенията, извършено посредством инфрачервена (ИЧ) спектроскопия и ядрено-магнитен резонанс (^1H и ^{13}C ЯМР), маспектрометрия с висока резолюция (HRMS), а на две 5MICA производни е направен рентгеноструктурен анализ [Г5]. В допълнение, на част от съединенията бяха проведени квантовохимични изчисления за определяне на най-вероятната молекулната геометрия и най-вероятните механизми на радикал-улавяне. Също така чрез DFT методи бяха обяснени наблюдаваните дублирани сигнали на някои съединения в ^1H и ^{13}C ЯМР спектрите, предполагащи наличие на конформери. Проведените интердисциплинарни изследвания позволиха да бъде направена по-обстойна фармакологична оценка на синтезираните арилхидразони. Генерираните експериментални данни се отнасят до тяхната цитотоксичност, невропротективна и антиоксидантна активност и способност за инхибиране на МАОВ. При съединенията от Серии III и IV е изследвана потенциалната пропускливост през кръвно-мозъчната бариера (КМБ), което беше от съществено значение за лекарствени

кандидати, насочени към невродегенеративни нарушения. В резултат от тази оценка, от Серия IV беше идентифицирана водеща структура с висок мултитаргетен потенциал, която премина към *in vivo* изследвания [B3].

С оглед интердисциплинарния характер на изследванията и стремежа към по-ясна систематизация, представянето на резултатите от публикациите, обект на настоящата хабилитационна справка, е организирано тематично - според изследваните биологични активности - с цел проследяване на фармакологичния потенциал на всяка серия в контекста на конкретния модел.

a) [B4]

BIM1

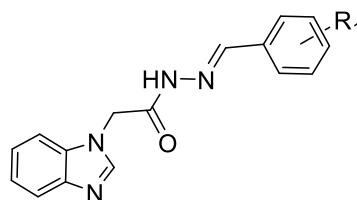


- 1a. R = H
1b. R = 2-OH
1c. R = 4-OH
1d. R = 3-OH
1e. R = 3,4-diOH
1f. R = 2,5-diOH
1g. R = 2,4-diOH
1h. R = 2,3-diOH
1i. R = 2,4,6-triOH

- 1j. R = 2,3,4-triOH
1k. R = 2,3,4-triOH
1l. R = 2-OH-4OMe
1m. R = 2-OH-6OMe
1n. R = 4-OH-2OMe
1o. R = 3-OH-4OMe
1p. R = 2-OH-3OMe
1q. R = 3,4-diOH-5OMe

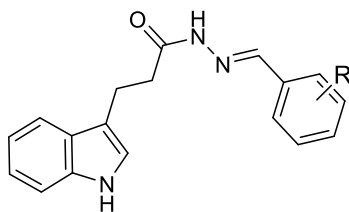
b) [B5]

BIM2



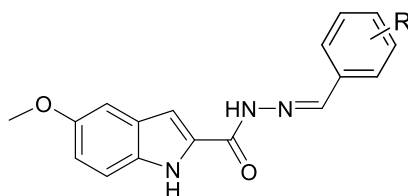
- 2a. R = 2,3-diOH
2b. R = 2,4-diOH
2c. R = 3,4-diOH
2d. R = 4-OH-3-OMe
2e. R = 2-OH-4-OMe
2f. R = 3,5-diOMe-4-OH

c) [B3] IPA



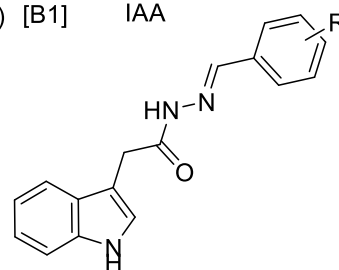
- 3a. R = 2,3-diOH
3b. R = 3,4-diOH
3c. R = 2,4-diOH
3d. R = 4-OH-3-OMe
3e. R = 2-OH-4-OMe
3f. R = 3,5-diOMe-4-OH

d) [B3, B2] 5MICA



- 4a. R = 2,3-diOH
4b. R = 3,4-diOH
4c. R = 2,4-diOH
4d. R = 4-OH-3-OMe
4e. R = 2-OH-4-OMe
4f. R = 3,5-diOMe-4-OH

e) [B1] IAA



- 5a. R = 2,3-diOH
5b. R = 2,4-diOH
5c. R = 4-OH-3-OMe
5d. R = 2-OH-4-OMe
5e. R = 3,5-diOMe-4-OH

Фиг. 1. Структури на изследваните съединения, обект на хабилитационния труд, както следва: а) Серия I (BIM1) – N,N'-дизаместени бензимидазол-2-тион арилхидразони – публикация В4; б) Серия II (BIM2) – N-заместени бензимидазол арилхидразони – публикация В5; в) Серия III (IPA) – арилхидразони на индол-3-пропионовата киселина – публикация В3; д) Серия IV (5MICA) – арилхидразони на 5-метоксииндол карбоксилна киселина – публикации В3, В4; е) Серия V (IAA) арилхидразони на индол-3-оцетната киселина – публикация В1

II. Изследвания за установяване на профил на безопасност

Като ключова стъпка в разработването на нови фармакологично активни съединения, първоначално беше направена оценката на техния профил на безопасност. Токсикологична оценка включваше изследвания върху невробластомната клетъчна линия SH-SY5Y, като един добре утвърден клетъчен модел в невронауката [9]. SH-SY5Y са с човешки произход и притежават относително хомогенна невробластоподобна морфология. Клетките експресират ензимна активност на допамин- β -хидроксилаза и тирозин хидроксилаза, както и специфични човешки протеини и техни изоформи. Потенциалните невротоксични ефекти на изследваните съединения бяха оценени чрез тест за клетъчна жизнеспособност (МТТ-тест), като стойностите на IC_{50} бяха използвани като параметър за сравнение. За разширена токсикологична оценка, експерименталната работа беше надградена чрез допълнителен *in vitro* модел, използващ прясно изолирани мозъчни синаптозоми от плъх. Моделът беше счетен за подходящ, тъй като синаптозомната фракция съдържа синаптични везикули, мембрани и невротрансмитери, както и част от постсинаптичната мембрана и двете ензимни форми на моноаминоксидазата (МАОА и МАОВ) [10]. Функционално-метаболитният статус на синаптозомите беше оценен чрез измерване на тяхната жизнеспособност (МТТ тест) и нивата на редуциран глутатион (GSH).

- Беше установено, че при серията дизаместени бензимидазоли (BIM1) цитотоксичността спрямо SH-SY5Y клетки варира в широк диапазон ($IC_{50} = 65,30\text{--}301,10\ \mu\text{M}$), като значителна част от съединенията демонстрираха благоприятен профил на безопасност. Бяха отличени осем съединения с най-ниска токсичност ($IC_{50} > 200\text{--}250\ \mu\text{M}$), определени като перспективни за последващо биологично охарактеризиране, а именно: **1d** (3,5-диметокси-4-хидрокси), **1h** (2,3-дихидрокси), **1i** (2,4-дихидрокси), **1n** (2-хидрокси-6-метокси), **1p** (4-хидрокси-2-метокси), **1e** (о-хидрокси), **1l** (2-хидрокси-3-метокси) и **1m** (2-хидрокси-4-метокси). От друга страна, бяха идентифицирани заместителите, водещи до по-висока цитотоксичност ($IC_{50} = 65,30\text{--}77,79\ \mu\text{M}$), като съединенията **1f** (m-метокси), **1g** (p-хидрокси), **1k** (2,3,4-трихидрокси), **1o** (3-хидрокси-4-метокси) и **1q** (3,4-дихидрокси-5-метокси). В изолирани синаптозоми от плъх съединенията **1e**, **1h**, **1i** и **1m**, при концентрации до $250\ \mu\text{M}$,

не проявиха значителна токсичност и не понижиха нивата на GSH, като техният ефект беше съпоставим с този на референтното съединение мелатонин.

- При серията от монозаместени бензимидазолови хидразонові производни (BIM2) изчислените стойности на IC_{50} спрямо SH-SY5Y клетки бяха също в широк диапазон (89,23–311,43 μM), което показва значими вариации в цитотоксичността според вида на заместителите. Съединенията **2d** (ванилиново производно), **2e** (2-хидрокси-4-метокси) и **2f** (производно на сиригальдехид) демонстрираха най-ниска обща токсичност ($IC_{50} > 228 \mu M$) и се отличиха с благоприятен профил на безопасност, потвърден и в модела с изолирани синаптозоми. Наблюдаваното запазване на синаптозомалната жизнест и нивата на GSH при концентрации до 100 μM при тези съединения потвърди ниския им токсикологичен потенциал. При 50 μM те не индуцираха значими промени и по двата анализирани параметъра. Съединенията **2d** и **2e** бяха отличени като представители с най-добър профил на безопасност в рамките на тази серия и съответно като приоритетни кандидати за последваща биологична оценка.
- За оценка на биосъвместимостта на индоловите съединенията от сериите IPA и 5MICA беше използван още един модел – тест за хемолиза, основаващ се на освобождаването на хемоглобин от еритроцити като маркер за клетъчен лизис. При всички изследвани концентрации, включително и най-високата (200 μM), съединенията не предизвикаха съществен хемолитичен ефект ($< 5\%$). Оценката на цитотоксичността с клетъчния модел SH-SY5Y показва, че производните на индол-3-пропионовата киселина **3e** и **3f** се отличават с много ниска токсичност ($IC_{50} > 500 \mu M$). Известна, но все още ниска токсичност беше установена при съединенията **3b** (265.3 μM), **3c** (275.2 μM) и **4f** (286.9 μM), докато **4a**, **4c** и **4d** показваха по-изразена цитотоксичност с IC_{50} стойности под 100 μM . В синаптозомния модел се наблюдаваше по-малко изразено намаление на клетъчната жизнест при съединенията от серия **4a–f** (25–30%) в сравнение с производните на IPA, където ефектът беше около 40%. При повечето съединения спадът в нивата на GSH беше в границите на 20–25%.
- Производните от серията IAA също показваха благоприятен профил. Най-ниска цитотоксичност беше отчетена за **5a**, **5b** и **5e** ($IC_{50} > 140 \mu M$). При прилагане в концентрация 100 μM всички съединения от серията предизвикаха умерено понижаване в жизнестта на синаптозоми (30–35%) и в нивата на GSH (15–20%) спрямо нетретирана контрола.

С оглед на ключовата роля на митохондриалната функция за преживяемостта на допаминергичните неврони и нейното участие в патогенезата на болестта на Паркинсон, беше извършена оценка на ефектите на избрани съединения от серията IAA върху митохондрии, изолирани от мозък на плъх. При прилагане концентрация от 100 μM се наблюдаваха статистически значими, но сравнително слаби изменения на нивата на малондиалдехид (MDA), който е маркер за липидна пероксидация и GSH. Най-

съществени промени бяха отчетени за съединенията **5a** и **5d**, при които се регистрира повишение на MDA с 30–32% и понижение на GSH с около 15%. При останалите съединения (**3b**, **3c** и **3e**) повишението на MDA беше между 36% и 39%, а понижението на GSH между 10% и 15% спрямо нетретирана контрола. Данните свидетелстваха за наличие на известно прооксидантно действие, но не изключиха тяхната потенциална приложимост.

Допълнително, беше извършена и *in vitro* оценка на съединенията от тази серия в модел с изолирани мозъчни микрозомни, отново чрез измерване на нивата на MDA. При концентрация от 100 μ M се наблюдаваше умерено повишение на MDA в интервала 18–26% спрямо контролата, като най-ниска прооксидантна активност се установи за 2,3-дихидроксилното производно **5a**. Съединенията от тази серия проявиха ниска до умерена токсичност, като **5a** и **5d** демонстрираха по-благоприятен профил в сравнение с **5c** и **5e**. Съединението с 2,3-дихидрокси заместители **5a** се отличи с най-слаб прооксидантен ефект.

Въпреки установените ефекти, беше заключено, че съединенията притежават нисък токсикологичен потенциал и установените ефекти не компрометират значително терапевтичния потенциал на индолите производни, особено имайки предвид отчетливата им невропротективна и антиоксидантна активност, оценена в следващите експериментални модели.

Като основен принос може да се посочи, че е извършена токсикологична оценка на нови синтезирани съединения от пет серии арилхидразони, използвайки няколко *in vitro* модела. Определени са съединения с най-благоприятен профил на безопасност и ниска цитотоксичност, които са избрани като приоритетни кандидати за последваща биологична оценка.

III. Изследвания върху невропротективната активност

III.1. Модел на H_2O_2 -индуциран оксидативен стрес в SH-SY5Y клетки: С цел изясняване на потенциала на изследваните съединения като невропротективни агенти беше използван утвърден клетъчен модел на индуциран оксидативен стрес с водороден пероксид върху човешка невробластомна клетъчна линия SH-SY5Y. H_2O_2 е нискомолекулен оксидант, който лесно преминава през клетъчната мембрана и в присъствие на двувалентни метали генерира реактивни форми на кислорода (ROS), включително хидроксилни и пероксилни радикали, които увреждат клетъчни компоненти като ДНК, протеини и липиди, водейки до клетъчна дисфункция и смърт. Моделът позволява оценка на способността на съединенията да предотвратят индуцирана оксидативна увреда, като клетъчната жизнеспособност се измерва с МТТ. SH-SY5Y клетки бяха предварително третирани с различни концентрации, след което беше индуциран оксидативен стрес с H_2O_2 .

- От дизаместените бензимидазоли от Серия I бяха изследвани селектирани съединения с установена ниска токсичност (**1d**, **1e**, **1h**, **1i**, **1m**, **1n** и **1p**). Клетките бяха предварително инкубирани с концентрации 1, 10 и 50 μM , след което бяха третирани с H_2O_2 (1 mM). Получените данни показаха, че всички изследвани съединения проявяват различна степен на защитен ефект. Като референтни съединения бяха използвани мелатонин и разагилин, съединения с известни невропротективни свойства. При третиране с мелатонин в концентрации 1, 10 и 50 μM се установи повишаване на клетъчната жизнеспособност съответно с 20%, 29% и 52%, докато за разагилин бяха отчетени 10%, 20% и 39%. Сред дизаместените бензимидазоли **1h** (2,3-дихидроксид) и **1i** (2,4-дихидроксид) демонстрираха най-силно изразени невропротективни ефекти, като при концентрация 50 μM , те повишиха клетъчната жизнеспособност съответно до 79% и 80%. Тези стойности надвишават значително ефекта на референтните съединения при същата доза, което подкрепя ролята на фенолните групи в механизма на действие, вероятно чрез директна елиминация на ROS и стабилизиране на вътреклетъчната редокс хомеостаза. Получените резултати показаха, че част от дизаместените бензимидазолови производни проявяват значим невропротективен потенциал в клетъчния модел.
- При монозаместените бензимидазолови производни от Серия II, единствено предварителното третиране със съединение **2e** (2-хидроксид-4-метоксид) доведе до значимо понижение на индуцираното от H_2O_2 клетъчно увреждане. Установен е статистически значим невропротективен ефект в зависимост от концентрацията, като клетъчната жизнеспособност се повиши съответно с 18%, 71% и 60% при концентрации 1, 10 и 25 μM спрямо H_2O_2 -контролната група. Невропротективното действие на съединението беше потвърдено и чрез микроскопско изследване, при които се установи запазена клетъчна морфология в сравнение с изразените увреждания при клетките третирани само с H_2O_2 .

Следователно, съединение **2e** демонстрира по-висока ефективност във всички тествани концентрации в сравнение с референтните невропротективни съединения мелатонин и разагилин, което подчерта неговия потенциал като водеща структура за по-нататъшни фармакологични изследвания.

- Всички съединения от IPA и 5MICA сериите проявиха силна невропротективна активност при ниски концентрации (1 и 10 μM), като в някои случаи възстановиха клетъчната жизнеспособност до 80%, значително надвишавайки активността на референтните съединения мелатонин и разагилин, което свидетелства за високия защитен потенциал на синтезираните производни. Най-силният ефект беше наблюдаван при съединенията, съдържащи катехолни групи, както и венилоидни фрагменти. Сходна тенденция се установи и при съединенията от серия IAA, при които производното с 2,3-дихидроксид заместител **5a** демонстрира най-силна защита (68% жизнеспособност на клетките), надвишаваща тази на останалите съединения от серията и на референтите.

Любопитно наблюдение представляваше фактът, че докато катехолната група (2,3-дихидрокси) се явява водещ структурен фрагмент за проявата на невропротективна активност при дизаместените бензимидазол арилхидразони и при индолите съединенията от сериите IPA и IAA, то при монозаместените бензимидазоли най-изразена активност показва съединението **2e**, съдържащо 2-хидрокси-4-метокси група. На това отклонение от общата тенденция на връзката структура-активност беше посветена отделна публикация [Г2], в която с помощта на обстойни квантовохимични изчисления е направен опит за обяснение на установената активност. (Вж. т.V).

Обобщено, получените резултати демонстрираха ясно изразена връзка между структурата на синтезираните молекули и тяхната биологична активност. Част от изследваните съединения бяха определени като по-обещаващи кандидати за по-нататъшни изследвания като невропротективни агенти с оглед на тяхната ефективност в условия на индуциран оксидативен стрес като ключов патогенен механизъм при невродегенеративни заболявания.

III.2. Модел на 6-OHDA-индуцирана с невротоксичност в синаптозоми, изолирани от мозък на плъх:

Невропротективният потенциал на съединенията беше допълнително оценен в модел на индуцирана невротоксичност с 6-хидроксидопамин (6-OHDA) в изолирани синаптозоми от мозък на плъх. Благодарение на селективния си афинитет към допаминовия транспортер, 6-OHDA прониква в допаминергичните неврони, където претърпява автоокисление и метаболизиране от MAO-B до реактивни интермедиати, включително p-хинон. Това води до интензивно формиране на ROS, митохондриална дисфункция и изчерпване на вътреклетъчния GSH. Приложението на 6-OHDA в концентрация 150 μ M доведе до очаквано понижение на клетъчната жизнеспособност и нивата на GSH с около 50% спрямо контролната група.

- При дизаместени бензимидазоли (Серия I) бяха проведени изследвания с 4 от съединенията - **1e** (o-OH), **1h** (2,3-дихидрокси), **1i** (2,4-дихидрокси), **1m** (2-OH-4-OMe), които при концентрация от 10 μ M демонстрираха различна степен на защита, като най-изразен ефект бе отчетен при съединение **1h**, възстановяващо жизнеспособността и GSH нивата съответно до 71% и 62%. Този ефект беше сравним с референтните съединения мелатонин и разагилин. Останалите производни също показаха статистически значима, но по-ниска невропротективна активност.
- В серията N-алкилирани бензимидазоли, съединение **2e** (10 μ M) демонстрира отчетлива невропротективна активност в модела с 6-OHDA, изразена чрез възстановяване на жизнеспособността на синаптозомите с 35% и повишаване на нивата на GSH с 55% спрямо контролата. Тези стойности бяха по-висока от ефекта на разагилин и бяха сходни с резултатите, получени при третиране с мелатонин, което и при този тест подчерта потенциала на съединение **2e** като ефективен антиоксидант и невропротективен агент.

- Изследваните индолкови производни от сериите IPA и 5MICA, приложени в концентрация 10 μ M, също показаха статистически значим ефект. Сред тях, съединения **3a**, **3f**, **4b**, **4c** и **4d** възстановиха жизнеспособността на синаптозомите приблизително с 44%, докато **3b–3e** – с около 33%. По отношение на GSH, защитният ефект при повечето съединения е съпоставим с този на референта индол-3-пропионова киселина. Най-висока степен на протекция върху функционално-метаболитния статус на синаптозомите беше отчетена при съединения **4a** (2,3-дихидроксид), **4e** (2-хидроксид-4-метоксид) и **4f** (3,5-диметоксид-4-хидроксид), които възстановиха жизнеспособността до 56%.
- Що се отнася до IAA серията, най-изразена невропротекция демонстрираха съединенията **5b** (2,4-дихидроксид) и **5c** (ванилиново производно), които запазиха както жизнеспособността на синаптозомите, така и нивата на GSH съответно с 36% и 80% в сравнение с 6-OHDA. Сходни, макар и по-слабо изразени ефекти, се наблюдаваха при съединенията **5a** (2,3-дихидроксид) и **5e** (3,5-диметоксид-4-хидроксид), при които се отчетоха съответно 33% и 50%. Съединение **5d** (2-хидроксид-4-метоксид) също показва умерена протективна активност.

Получените данни подкрепиха резултатите от клетъчния модел с H_2O_2 и разшириха невропротективния профил на изследваните съединения.

III.3. Невропротективна активност в изолирани митохондрии и микрозомни [B1]:

Профилът на съединенията от IAA серията беше допълнен и с изследване на невропротекция при модел на индуциран с t-BuOOH оксидативен стрес в изолирани митохондрии от мозък на плъх. t-BuOOH предизвиква значима невротоксичност, изразена чрез понижаване на нивата на GSH и повишаване на MDA. Най-изразена активност беше отчетена отново за съединение **5a**, което демонстрира най-силна невропротективна активност, като запази до 80% нивата на GSH и понижи концентрацията на MDA с 37% спрямо групата, третирана с t-BuOOH. Останалите съединения от серията също показаха защитен ефект, като поддържаха нивата на GSH в граници от 50–60% и редуцираха продукцията на MDA между 13–24%.

Също така съединенията от тази серия бяха изследвани и в модел на оксидативен стрес в изолирани микрозомни, при който липидната пероксидация беше индуцирана чрез комбинация от желязо и аскорбинова киселина, предизвикваща реакция на Фентън и генериране на хидроксилни радикали ($\bullet OH$). В резултат се наблюдава увеличение на продукцията на MDA със 139% спрямо контролната група. Съединение **5a** отново се открие с най-силна антиоксидантна активност, като редуцира нивата на MDA с 46% спрямо токсичния агент. Останалите съединения показаха защитен ефект в диапазона от 23 до 34% редукция на MDA.

Получените данни подкрепиха значителния антиоксидантен и невропротективен потенциал на 2,3-дихидроксилното производно **5a**, установен в различните субклетъчни фракции.

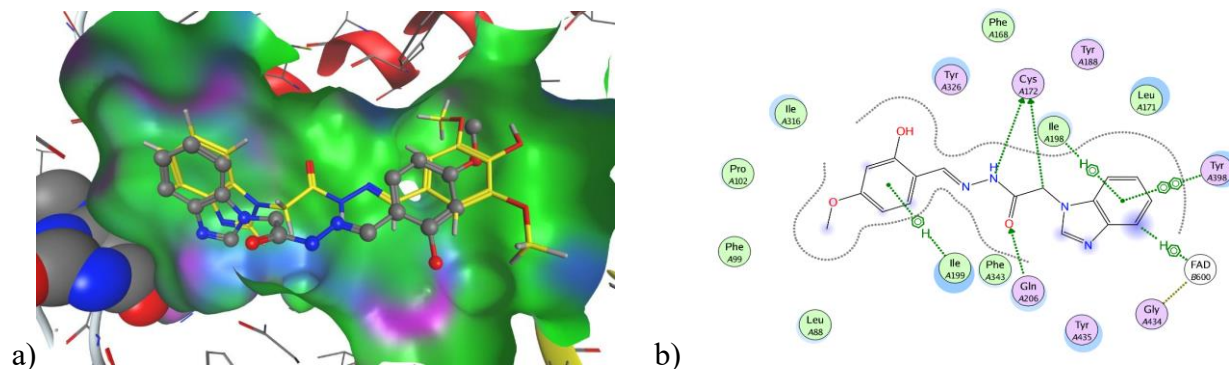
Основните приноси от изследванията за невропротективната активност се състоят в изясняване на структура-активност за проява на невропротективен ефект и идентифициране на водещи структури, превъзхождащи ефекта на референтните съединения.

III.4. Изследване на инхибиторната активност спрямо МАОВ:

Инхибиторният потенциал на изследваните съединения беше определен спрямо човешки рекомбинантен ензим hMAO-B чрез флуорометричен метод с използване на багрилото Amplex UltraRed.

- Избрани дизаместени бензимидазоли с установен добър профил на безопасност и изразени невропротективни свойства (**1d**, **1e**, **1h**, **1i**, **1m**, **1n**, **1p**) бяха изследвани при концентрация 1 μ M и сравнени с клинично прилаганите МАОВ инхибитори селегилин и разагилин. Всички съединения показаха статистически значима инхибиторна активност, като съединение **1h**, съдържащо катехолна група, демонстрира най-силен ефект, сравним с този на референтите. Резултатите от молекулния докинг потвърдиха експерименталните наблюдения, като показаха, че хидразоновите вериги, прикрепени към N-атомите на бензимидазоловото ядро допринасят за по-доброто напасване на лигандите в тясната, силно липофилна кухня на активния център на МАО-B и способстват за образуването на по-силни взаимодействия с ключови аминокиселинни остатъци. Гъвкавостта на лигандите позволява на структурите да заемат подходяща конформация за по-ефективно взаимодействие с активния център.
- От монозаместените бензимидазоли от Серия II, всички изследвани съединения показаха статистически значима инхибиторна активност, като съединение **2e** демонстрира забележителен ефект – намаление на активността на hMAO-B с 65%, съпоставимо с класическите инхибитори селегилин и разагилин. Този резултат, в съчетание с ниската токсичност и висока невропротективна активност, позиционира съединение **2e** като перспективен кандидат за мултитаргетна терапия за ПБ. В подкрепа на експерименталните данни, молекулният докинг показва, че за разлика от останалите съединения, **2e** е способно да достигне в непосредствена близост до коензима FAD, благодарение на благоприятна геометрия, позволяваща по-дълбоко навлизане в кухнята на активния център. Беше установено образуване на стабилизиращи водородни връзки с остатъка Tyr326, който е ключов в полярния участък между входната кухня и кухнята на активния център. Също така **2e** образува най-силни водородни връзки с Cys172. Останалите съединения не успяват да се позиционират толкова благоприятно поради липофилния характер на кухнята на активния център, водещ до отблъскване на ОН- и ОMe-групи. От друга страна, взаимодействието е възпрепятствано стерично при входната кухня поради нежелани

взаимодействия с по-обемните заместители. Тези наблюдения кореспондират с експериментално установената висока инхибиторна активност на съединение **2e** и потвърдиха неговия афинитет към МАО-В (Фиг.2).



Фиг. 2. а) Съединение **2e** (изобразено със сиви въглеродни атоми) в сравнение с **2f** (изобразено с жълти въглеродни атоми) в кухината на активния център на МАО-В. Отдалечената част на кухината е представена чрез радиусите на ван дер Ваалс (vdW); липофилните участъци са оцветени в зелено, а полярните – в розово и синьо. Най-близката част на флавиновия кофактор се вижда вляво, като атомите са изобразени като ван дер Ваалсови сфери. б) Схематично представяне **2e** в кухината на МАОВ

- Всички изследвани съединения от IPA и 5MICA сериите (1 μM) показаха статистически значима инхибираща активност спрямо hMAOB. Представителите от 5MICA намалиха ензимната активност с около 35–40%, докато IPA групата – с около 20%. Молекулният докинг показва, че всички съединения притежават планарни конформации, които се разполагат добре в хидрофобния активен център на ензима.
- По отношение на IAA серията беше установено, че всички съединения инхибират МАОВ в субмикромоларен диапазон ($\text{IC}_{50} = 0.130\text{--}0.493 \mu\text{M}$), като три от тях **5d**, **5e** и **5a** проявиха селективност към МАОВ спрямо МАОА. Чрез молекулен докинг беше изследвано взаимодействието на синтезираните лиганди с двете изоформи МАОВ и МАОА. Получените резултати показаха, че всички изследвани съединения проявяват по-добра енергия на свързване с МАОВ, което го определя като предпочетена мишена. Най-ниска (т.е. най-добра) енергия на взаимодействие беше установена при съединение **5e**, докато останалите съединения показаха близки стойности и плавен спад на енергията. Поради удължената линейна структура на съединенията, те се напасват добре в тесния и продълговат активен център на МАОВ, без съществено стерично запречване. Всички лиганди заемат едновременно входния канал и субстратната кухня на активния център на МАО-В и се разполагат в плоския хидрофобен регион, характерен за този ензим. От анализът на най-добрите 10 пози при МАО-В се установи, че всички лиганди взаимодействат с Tyr398 и

Tyr435, известни като т.нар. „ароматна клетка“ (aromatic cage), както и с Leu171 чрез ван дер Ваалсови взаимодействия. Установи се, че взаимодействието с остатъците Phe343, Ile316 и Tyr60 се реализира чрез ван дер Ваалсови взаимодействия, докато с Ile199 и Gln206 се формират и водородни връзки, съответно чрез амидната група (Ile199) и страничната верига (Gln206).

Селективността към МАОВ е от ключово значение при разработката на инхибитори, предназначени за терапия на невродегенеративни заболявания като болестта на Паркинсон и Алцхаймер. Липсата на инхибиране на МАОА намалява риска от странични ефекти, свързани с повишените нива на серотонин и норадреналин. В този контекст, установяването на три селективни инхибитора на МАОВ (**5a**, **5d** и **5e**) представляваше съществен принос, като демонстрира потенциала хидразоновите производни на индол-3-пропионовата киселина за разработване на нови невропротективни съединения.

В публикация В3 беше изследвано потенциалното влияние на съединенията от сериите IPA и 5MICA върху кръвно-мозъчната бариера, чрез използване на статичен модел с ендотелна клетъчна линия bEnd3. Клетките bEnd3 са свързани със специфични протеини (ZO-1, claudin-5), които образуват плътни междуклетъчни контакти. Съединенията **3d**, **3e** и **3f** повишиха пропускливостта при концентрация от 10 μ M без да нарушават целостта на междуклетъчните връзки. Съединение **4e** увеличи значително пропускливостта, но наруши междуклетъчните контакти и беше изключено от по-нататъшни изследвания. От друга страна двете дихидроксилни производни **4a** и **4b** показаха благоприятни свойства като повишиха пермеабилитета, без да увреждат ендотелните клетки.

На база на резултатите от комбинираните *in vitro* оценки, съединение **4b** беше селектирано за *in vivo* охарактеризиране, обект на публикация В2.

IV. Изследвания върху радикал-улавящите свойства *in vitro*

Нервната тъкан се характеризира с висока консумация на кислород и наличие на полиненаситени мастни киселини, които са силно податливи на оксидативно увреждане. Натрупването на маркери за липидна пероксидация, като малондиалдехид и липидни хидропероксиди при пациенти в ранен стадий на ПБ показва необходимостта от терапевтични стратегии, насочени не само към допаминергичния дефицит, но и към възстановяването на редокс хомеостазата [10]. В този контекст бяха изследвани радикал-улавящите свойства на бензимидазоловите и индолите хибриди чрез различни *in vitro* модели, като резултатите показва отчетливо влияние на структурата върху активността.

IV.1. Изследване на инхибиране на Fe (II)-индуцирано увреждане на лецитин и дезоксирибоза:

- Сред дизаместените бензимидазоли най-силно антиоксидантно действие проявиха съединенията **1d** (сирингалдехид), **1h** и **1j** (катехолни производни) и **1q** (3,4-дихидрокси-5-метокси), при които абсорбцията е около 40% от контролата, което свидетелства за висока ефективност за потискане на липидната пероксидация. В модела с дезоксирибоза **1h** (2,3-дихидрокси) също показва силни протективни свойства, надвишаващи тези на мелатонин и сравними с Trolox.
- При N-алкилираните бензимидазоли от Серия II, всички изследвани съединения показваха способност за потискане на липидната пероксидация. Сред изследваните производни, съединения **2b**, **2d**, **2e** и **2f** показваха сходен защитен ефект със стойности между 63–65%, докато съединения **2a** и **2c** демонстрираха най-силна защита, със стойности съответно 38.88% и 47.52%, което ги нареди сред най-ефективните инхибитори на окислителното разграждане на лецитин в модела.
- В моделна система, съдържаща лецитин, всички изследвани индолнови производни от сериите IPA (**3a–f**) и 5MICA (**4a–f**) потиснаха желязо-индуцирана липидна пероксидация, като показваха антиоксидантна активност с абсорбционен коефициент в диапазона 30–75% спрямо контрола. Най-ефективни бяха двете 2,3-дихидроксилни производни **3a** и **4a** (~30%), с ефективност, сходна с тази на референтния антиоксидант Trolox. Подобно, в IAA сериата най-изразен ефект имаше 2,3-дихидроксиленото производно **5a** (54%) което затвърди водещата роля на катехолните фрагменти. В модела за оценка на защитата срещу желязо-индуцирано окислително увреждане на дезоксирибоза, повечето съединения показваха антиоксидантен ефект. Съединенията **3b**, **3f**, **4b** и **4f** показваха ефективност, статистически идентична с тази на Trolox, а **4a** – сравнима с кверцетин (~50%). Най-висока антиоксидантна активност от IPA сериата показва съединение **3a**, надвишаваща тази на кверцетин.
- И при това изследване се установи, че съединение **5a** от сериата IAA демонстрира най-висока антиоксидантна активност сред изследваните производни (53,6%), надвишавайки ефекта на Trolox, което допълнително потвърждава потенциала му като антиоксидант.

IV.2. Изследване на способността за улавяне на супероксидни радикали и хипохлоритни аниони

Изследванията за радикал-улавяща активност спрямо супероксидния анион радикал и хипохлоритния анион се обосновават с ключовата им роля в оксидативния стрес, невровъзпалението и увреждането на неврони при невродегенеративни заболявания. Те участват в автоокислението на допамин и образуването на токсични хинони, които водят до изчерпване на клетъчния NADPH и клетъчна смърт [11,12].

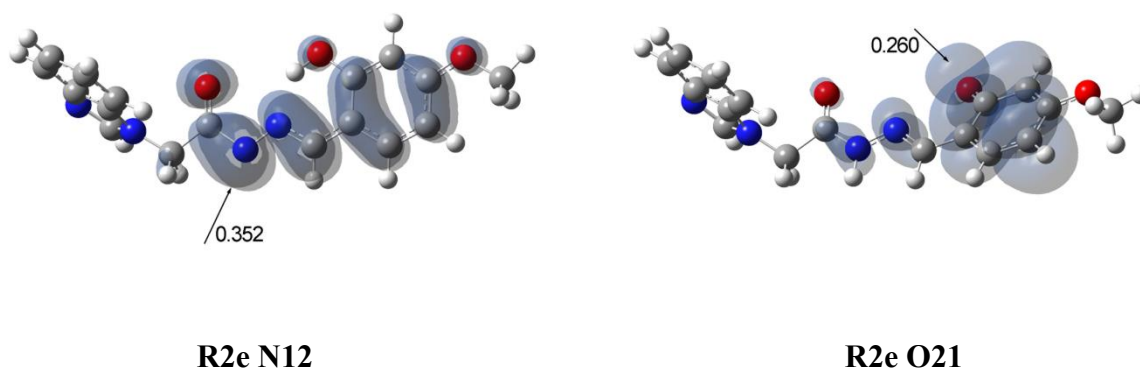
Способността на съединенията да улавят супероксидни радикали беше изследвана чрез ензимната система ксантин/ксантин оксидаза. Повечето от съединенията показваха слабо понижаване на абсорбцията спрямо контролата, съответстващо на слабо инхибиране на генерираните супероксидни радикали. Наличието на две хидроксилни групи се оказва благоприятно за радикал-улавящата способност в тази система.

- При дизаместените бензимидазоли салициловото производно **1e** и 2-хидрокси-4-метоксиси производното **1m** не предизвикаха статистически значим ефект в целия тестван концентрационен диапазон, за разлика от **1h** (2,3-дихидрокси), което демонстрира най-силно изразен ефект, като намали абсорбцията до 64 % спрямо контролата. Съединение **3i** предизвика умерен ефект (15%).
- При индолите серии 5MICA и IPA, най-висока активност беше отчетена за двете 3,4-дихидроксилни производни. В присъствието на **3b** (100 μ M) понижението на абсорбцията беше повече от 40%, а **4b** показва по-висока активност, редуцирайки сигнала до 20% при 10 пъти по-ниска концентрация.
- В IAA серията 2,3-дихидрокси производното **5a** показва изразена радикал-улавяща активност спрямо супероксидните анион радикали, нарастваща с концентрацията, като при 10 μ M достигна до 87 %. За разлика от него, съединенията **5c** и **5d** не показаха активност при нито една от тестваните концентрации. За 2,4-дихидрокси производното **3b** беше отчетено по-слабо, но статистически значимо понижаване на абсорбцията само при най-високата концентрация (25 μ M).
- Способността за обезвреждане на хипохлоритни аниони, беше изследвана за съединенията от IAA серията. Всички съединения, с изключение на 2-хидрокси-4-метокси деривата (**5d**), проявиха концентрационно-зависима активност, като нарастването на концентрацията на съединенията беше свързано с усилване на улавящия ефект. Линейна зависимост между концентрация и антирадикална активност се наблюдава за две от дихидрокси производните – **5a** и **5b**, както и за съединението със сингалдехиден остатък (**5e**). При ванилиновото производно **5c** се установи изчерпване на радикал-улавящия капацитет при концентрации над 40 μ M, като бяха отчетени слаби, но статистически значими промени в измервания параметър. Най-активното съединение – **5a** (2,3-дихидрокси дериват) – показва над 50% улавяне на ClO^- при максимално изследваната концентрация от 25 μ M.

IV.3. Изследване на редуцираща способност спрямо Fe(III): С оглед ролята на желязо-индуцираната липидна пероксидация в невродегенеративни състояния, особено в патофизиологията на *substantia nigra* при ПБ, беше оценена антиоксидантната активност на хидразоновите производни от IAA серията. Балансът между Fe(III)/Fe(II) е критичен за ограничаване на оксидативни увреждания, включително иницирането на реакции а Фентън и последващото генериране на високо реактивоспособни хидроксилни радикали. Повечето от изследваните съединения показаха статистически значим ефект, като още при най-ниската тествана концентрация (2.5 μ M) беше отчетен ефект със стойности около 20%, като при максималната концентрация от 20 μ M активността достигна до 80%, което показва силна редуцираща активност.

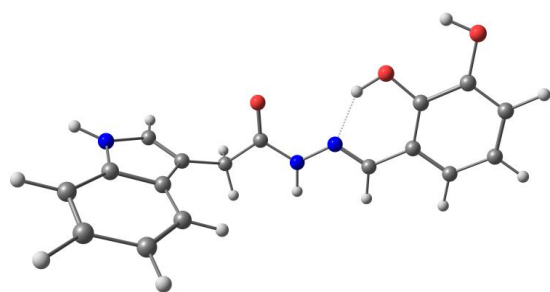
V. Квантовохимични изчисления

NBO анализите показаха, че спиновата плътност на радикалите на съединенията, образувани след абстракцията на водороден атом от амидната група, се делокализира върху ароматния пръстен и хидразоновата верига. По-високата степен на делокализация, наблюдавана при радикала на съединение **2e** (R2eN12), е в съответствие с неговата теоретично предсказана по-добра радикал-улавяща активност, както и с експериментално установената по-висока невропротективна активност [Фиг. 4].



Фиг. 4. Разпределение на електронната плътност на двата най-стабилни радикала на **2e**, пресметнати на ниво на теория (U)M06-2X/6-311++G** в бензен.

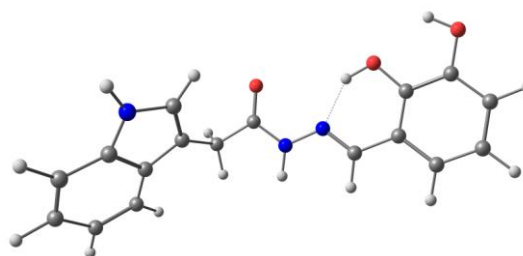
В ЯМР спектрите на N,N'-дизаместените арилхидразонові производни на бензимидазол-2-тиона, описани в публикация В4, се наблюдава дублиране на някои сигнали (включително на метиленовите групи, на азометиновия протон и NH групата), което е индикация за наличие на конформери в разтвора. Предходни наши изследвания показаха, че са възможни няколко конформера поради ротационна гъвкавост на N–N връзката, както и съществуването на E/Z изомери около азометиновата връзка [14]. Подобно дублиране на сигнали беше наблюдавано и при съединенията от IAA серията [В1], като съотношението на интегралните площи беше приблизително 3:1. За да бъде доказано наличието на стабилни конформери в конкретния случай, бяха проведени DFT изчисления в DMSO (ниво на теория B3LYP/6-311++G**). Оптимизираната геометрия показва, че индоловият фрагмент е планарен, ориентиран под ъгъл от 85° спрямо арилхидразонова верига, а амидната група и азометиновата връзка са стабилизирани в транс конфигурация. Двата основни конформера възникват в резултат на ротация около C–C връзката между пироловия пръстен и C-атома на метиленовата група с ΔG в интервала 1,64-3,49 kJ mol⁻¹. Допълнително, ротацията около N–N връзката води до образуването на s-cis и s-trans конформери, като последният е значително по-стабилен (ΔG 7-11 kJ mol⁻¹), което се обуславя от вътрешномолекулна водородна между свободната електронна двойка на азометиновия N-атом и хидроксилната група в орто-позиция на фенилното ядро. Болцмановото разпределение, изчислено въз основа на енергетичните разлики между конформерите, потвърди, че преобладаващото съотношение, наблюдавано в ЯМР спектрите съответства на E, s-trans конформацията [Фиг. 5]. Допълнителни доказателства за наличието на конформери бяха получени чрез провеждане на ¹H ЯМР при 80 °C, където се установи коалесценция на дублираните сигнали, която се обяснява с превръщане между конформерите в разтвора.



Конформер 1:

$$\Delta G = 0 \text{ kJ.mol}^{-1}$$

Болцманово разпределение = 75.54 %



Конформер 2:

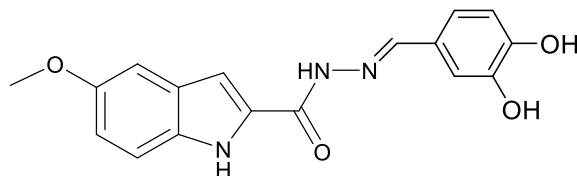
$$\Delta G = 3.10 \text{ kJ.mol}^{-1}$$

Болцманово разпределение = 21.22 %

Фиг. 5. Оптимизирана геометрия на двата най-стабилни конформера на **5a** в DMSO, енергии на Гибс и Болцманови разпределения.

VI. In vivo изследвания в модел на индуцирана със скополамин деменция от тип Алцхаймер при плъхове

В публикация В2 бяха използвани поведенчески и биохимични методи за оценка на ефектите върху паметта на 3,4-дихидроксилното производно от серия 5MICA (**4b**) [Фиг. 6] в модел на деменция, индуцирана чрез скополамин при плъхове. Допълнително бяха изследвани механизмите на действие, както и токсичността на **4b**. Като положителна контрола беше използван ривастигмин - обратим инхибитор на ацетилхолинестеразата, който се прилага клинично за лечение на когнитивни нарушения и болест на Алцхаймер, както и при различни форми на деменция, включително свързана с болестта на Паркинсон.. Като отрицателна контрола беше използван скополамин – неселективен антагонист на мускариновите холинергични рецептори, за който е известно, че предизвиква нарушения в паметта и познавателните функции, засилен оксидативен стрес, невровъзпаление, неблагоприятни промени в моноаминергичните невротрансмитерни системи, митохондриални нарушения, апоптоза и нарушена BDNF сигнализация – патологични промени, съпътстващи болестта на Алцхаймер. Поради това скополаминовият модел беше счетен за подходящ за оценка на **4b** като възможен кандидат за лечение на деменция и болест на Алцхаймер.



Фиг. 6. Молекулна структура на целевото съединение N'-(3,4-дихидроксibenзилиден)-5-метокси-1H-индол-2-карбохидразид (**4b**)

V.1. Изследване чрез поведенчески методи на ефектите на 4b върху процесите на учене и памет при плъхове

За да се оцени способността на съединение **4b** да противодейства на неблагоприятните ефекти на скополамин върху ученето и паметта, бяха използвани поведенчески тестове – тест за пасивно избягване и лабиринт на Барнс. Тестът за пасивно избягване (step-through inhibitory avoidance) е един от най-широко използваните поведенчески методи за изследване на учене и памет при гризачи. Задачата ангажира както емоционални аспекти, свързани с избягване на неприятен стимул, така и пространствени компоненти на паметта. Успешното ѝ изпълнение зависи в голяма степен от функционалната активност на холинергичната система – включително освобождаването на ацетилхолин от холинергичните неврони и взаимодействието му с мускариновите ацетилхолинови рецептори, особено в области като хипокампа и префронталната кора. Лабиринтът на Барнс (Barnes maze) е класически метод за оценка на пространственото учене и памет, зависещ от интактната функция на хипокампа, правилното функциониране на холинергичната система и в значителна степен от активирането на мускариновите M1 холинергични рецептори в хипокампа. Като антагонист на тези рецептори, скополаминът води до влошено изпълнение и на двете задачи в сравнение с контролните животни. В проведените експерименти скополаминът понижи латентното време за преминаване (STL) на 24-ия час в теста за пасивно избягване и увеличи броя на проучвателните движения (head dips) в лабиринта на Барнс. Съединение **4b** напълно възстанови стойностите на STL при скополамин-третираните животни до нивата на контролната група и демонстрира сходна ефективност и в лабиринта на Барнс, като намали броя на проучвателните движения до контролни стойности, показвайки по-добри резултати от ривастигмин.

VI.2. Биохимична оценка на ефектите на 4b

С цел изясняване на механизмите, чрез които **4b** оказва положителни ефекти върху паметта, бяха изследвани ефектите му върху холинергичната система чрез определяне на нивата на ацетилхолин (ACh) и активността на ацетилхолинестеразата (AChE), както и върху параметрите на оксидативния стрес чрез оценка на липидната пероксидация и активността на супероксиддисмутаза (SOD), каталаза (CAT) и глутатионпероксидаза (GPx) в мозъчната кора и хипокампа.

ACh има ключова роля във формирането на паметта и когнитивните функции, докато AChE разгражда ACh и е от съществено значение за правилната холинергична трансмисия. Добре известно е, че инхибирането на ензима подобрява паметта и забавя когнитивния упадък при пациенти с различни видове деменция. В съответствие с очакваното, скополаминът понижи нивата на ACh и увеличи активността на AChE в мозъчната кора и хипокампа. Прилагането

на **4b** доведе до двустранен благоприятен ефект върху холинергичната система, като едновременно повиши нивата на ACh и понижи активността на AChE в хипокампа, възстановявайки ги до нивата на контролата.

С оглед на добре установената връзка между оксидативния стрес и развитието на невродегенеративни заболявания, както и въз основа на резултатите от проведените *in vitro* изследвания за антиоксидантна активност, беше целесъобразно да се проучи и способността на съединението **4b** да модулира нивата на оксидативен стрес *in vivo* като възможен допринасящ фактор за положителните му ефекти върху паметта. Особено изразен ефект се наблюдаваше върху нивата на малондиалдехид и каталазата. Скополаминът повиши нивата на MDA и понижи активността на каталазата, като тези промени бяха значително ограничени при третиране с изследваното съединение. **4b** успя да понижи нивата на MDA до стойностите на контролата в хипокампа, а в мозъчната кора ефектът беше още по-силно изразен, като нивата на MDA напълно се възстановиха. За сравнение, ривастигмин не оказва ефект върху MDA и резултатите бяха идентични с тези при скополамин.

По отношение на каталазата, **4b** отново показва по-добри резултати от ривастигмин, изразяващи се в значимо повишаване на каталазната активност в хипокампа, докато в групата с ривастигмин такова повишение не беше установено. Тъй като каталазата катализира разграждането на H_2O_2 до вода и кислород, наблюдаваното *in vivo* възстановяване на скополамин-потиснатата каталазна активност от **4b** е в съответствие с предходно установените му невропротективни свойства в клетъчните и субклетъчните модели. Тези резултати бяха подкрепени и от ефектите на **4b** върху активността на GPx, чиято функция е да редуцира H_2O_2 до вода. При комбинирано приложение на **4b** и скополамин, активността на GPx в хипокампа не се различаваше съществено от контролната, докато при третиране с ривастигмин и скополамин тя беше значително понижена. Въпреки че в предишните ни *in vitro* изследвания **4b** показва най-силна активност при улавяне на супероксидни радикали, *in vivo* не успя да възстанови понижената от скополамин SOD-активност в кората и хипокампа. Ривастигмин също прояви слаба ефективност в този аспект, като в хипокампа стойностите дори бяха по-ниски от тези, наблюдавани при **4b**.

Мозъчният невротрофичен фактор (BDNF) е ключов невротрофин, който, освен че поддържа жизнеспособността, растежа и диференциацията на невроните, играе съществена роля в синаптичната пластичност – процес, тясно свързан с ученето и паметта. Данни от различни изследвания сочат, че нивата на BDNF са понижени в серума и цереброспиналната течност при пациенти с АБ [15]. Обратно, по-високи серумни нива на BDNF при здрави възрастни индивиди корелират с понижен риск от развитие на деменция. Установено е също, че BDNF и активирането на сигналния път BDNF/TrkB могат да насочат протеолизата на амилоидния прекурсорен протеин към неамилоидогенен път чрез стимулиране на α -секретазната активност, което води до ограничаване на образуването на амилоид- β [16]. Освен това BDNF оказва модулиращо влияние върху хиперфосфорилирането на тау-протеина. Повишаването на BDNF в хипокампа се свързва с облекчаване на когнитивните нарушения и забавяне на

невродегенеративните процеси. В този контекст беше изследван ефектът на съединение **4b** върху нивата на BDNF. Прилагането на **4b** доведе до възстановяване на нивата на BDNF след индуцираното от скополамин понижение, доближавайки ги до стойностите на контролната група. Това действие вероятно допринася за наблюдавания положителен ефект на **4b** върху консолидацията на паметта при поведенческите тестове за пасивно избягване и лабиринта на Барнс, чието успешно изпълнение зависи от активирането на сигналния път BDNF/TrkB.

В допълнение към изследването на ефектите на **4b** върху ученето и различните видове памет и техните механизми, беше изследвана неговата токсичност чрез определяне на биохимичните параметри на кръвта, като ALAT, ASAT, креатинин, урея, албумин, глобулин и общ протеин. Данните показаха липса на странични ефекти върху чернодробната и бъбречната функция и допълниха профила на безопасност на **4b**.

Следователно, комплексният фармакологичен профил на **4b**, в съчетание с добрата му поносимост и способността да преминава кръвно-мозъчната бариера, предполага терапевтични предимства, които имат потенциал да надхвърлят симптоматичното облекчаване. Съединението се очерта като обещаващ кандидат за по-задълбочени бъдещи изследвания като мулти-таргетно средство за лечение на невродегенеративни заболявания.

Перспективи за бъдещи научни изследвания

Предстоящата научна работа ще бъде фокусирана върху по-задълбочено проучване и оптимизация на вече идентифицираните структури с доказан невропротективен и антиоксидантен потенциал.

Планира се синтез на нови потенциални мултитаргетни съединения чрез рационален дизайн, включващ комбиниране на вече доказани фармакофорни фрагменти с нови перспективни фармакофори, насочени към едновременно повлияване на няколко ключови патологични механизми при невродегенеративни заболявания.

Селектирани молекули ще бъдат имобилизирани върху функционализирани наночастици с цел изследване на синергични ефекти.

Ще бъдат разширени *in vitro* изследванията върху нови клетъчни модели за оценка на ефективността и механизма на действие, както на вече утвърдени структури, така и на нови.

Предстоят нови *in vivo* експерименти с избрани съединения и наночастици в модели на болест на Паркинсон и Алцхаймер с цел проследяване на ефектите върху поведението и оксидативния статус.

Паралелно ще продължат и изследванията за разработване на нови антитуморни средства, включително хибридни молекули и наночастици с потенциално синергично действие.

Списък на публикации, участващи в конкурса за придобиване на академичната длъжност „доцент“ по показател „В”

B1. Anastassova, N. ; Kondeva-Burdina, M. ; Hristova-Avakumova, N. ; Stefanova, D. ; Rangelov, M. ; Todorova, N. ; Yancheva, D. Exploring the Potential of Indole-3-acetic Acid Arylhydrazone Hybrids for Parkinson's Disease Treatment: A Comprehensive Evaluation of Neuroprotective, MAOB Inhibitory, and Antioxidant Properties, ACS Chem. Neurosci. 2025, available online. DOI: 10.1021/acchemneuro.4c00838

B2. Petkova-Kirova, P. ; Anastassova, N. ; Minchev, B. ; Uzunova, D. ; Grigorova, V. ; Tsvetanova, E. ; Georgieva, A. ; Alexandrova, A. ; Stefanova, M. ; Yancheva, D. ; Kalfin, R. ; Tancheva, L. Behavioral and Biochemical Effects of an Arylhydrazone Derivative of 5-Methoxyindole-2-Carboxylic Acid in a Scopolamine-Induced Model of Alzheimer's Type Dementia in Rats. Molecules 2024, 29, 5711. DOI: 10.3390/molecules29235711

B3. Anastassova, N. ; Stefanova, D. ; Hristova-Avakumova, N. ; Georgieva, I. ; Kondeva-Burdina, M. ; Rangelov, M. ; Todorova, N. ; Tzoneva, R. ; Yancheva, D. New indole-3-propionic acid and 5-methoxy-indole carboxylic acid derived hydrazone hybrids as multifunctional neuroprotectors, Antioxidants 2023, 12(4), 977. DOI: 10.3390/antiox12040977

B4. Anastassova, N.; Aluani, D.; Hristova-Avakumova, N.; Rangelov, M.; Todorova, N.; Kondeva-Burdina, M.; Tzankova, V.; Yancheva, D. 1,3-disubstituted benzimidazole arylhydrazones as new multi-target drug ligands for the treatment of Parkinson's disease with antioxidant action, Antioxidants 2022, 11, 884. DOI: 10.3390/antiox11050884

B5. Anastassova, N.; Aluani, D.; Kostadinov, A.; Rangelov, M.; Todorova, N.; Hristova-Avakumova, N.; Argirova, M.; Lumov, N.; Kondeva-Burdina, M. ; Tzankova, V. ; Yancheva, D. Evaluation of the combined activity of benzimidazole arylhydrazones as new anti-Parkinsonian agents: monoamine oxidase-B inhibition, neuroprotection and oxidative stress modulation, Neural Regen Res 2021, 16(11), 2299. DOI: 10.4103/1673-5374.309843

Използвана литература:

1. Dorsey, E. R., Sherer, T., Okun, M. S., & Bloem, B. R. (2018). The emerging evidence of the Parkinson pandemic. *Journal of Parkinson's Disease*, 8(s1), S3–S8. <https://doi.org/10.3233/JPD-181474>
2. Kouli, A., Torsney, K. M., & Kuan, W. L. (2018). Parkinson's disease: Etiology, neuropathology, and pathogenesis. In Stoker, T. B., & Greenland, J. C. (Eds.), *Parkinson's Disease: Pathogenesis and Clinical Aspects* [Internet]. Brisbane (AU): Codon Publications. Chapter 1.
3. Terao, Y., Fukuda, H., Ugawa, Y., & Hikosaka, O. (2013). New perspectives on the pathophysiology of Parkinson's disease as assessed by saccade performance: A clinical review. *Clinical Neurophysiology*, 124(8), 1491–1506. <https://doi.org/10.1016/j.clinph.2013.01.021>
4. Blesa, J., Trigo-Damas, I., Quiroga-Varela, A., & Jackson-Lewis, V. R. (2015). Oxidative stress and Parkinson's disease. *Frontiers in Neuroanatomy*, 9, 91. <https://doi.org/10.3389/fnana.2015.00091>
5. Tong, J., Rathitharan, G., Meyer, J. H., Furukawa, Y., Ang, L. C., Boileau, I., Guttman, M., Hornykiewicz, O., & Kish, S. J. (2017). Brain monoamine oxidase B and A in human parkinsonian dopamine deficiency disorders. *Brain*, 140(9), 2460–2474. <https://doi.org/10.1093/brain/awx172>
6. Imbriani, P., Martella, G., Bonsi, P., & Pisani, A. (2022). Oxidative stress and synaptic dysfunction in rodent models of Parkinson's disease. *Neurobiology of Disease*, 173, 105851. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2022.105851>
7. Makhoba, X. H., Viegas Jr, C., Mosa, R. A., Viegas, F. P. D., & Poee, O. J. (2020). Potential impact of the multi-target drug approach in the treatment of some complex diseases. *Drug Design, Development and Therapy*, 14, 3235–3249. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S257494>
8. Anastassova, N., Mavrova, A. Ts., Yancheva, D., Kondeva-Burdina, M., Tzankova, V., Stoyanov, S., Shivachev, B., & Nikolova, R. (2018). Hepatotoxicity and antioxidant activity of some new N,N'-disubstituted benzimidazole-2-thiones, radical scavenging mechanism and structure-activity relationship. *Arabian Journal of Chemistry*, 11, 353–369.
9. Kitamura, Y., Kosaka, T., Kakimura, J. I., Matsuoka, Y., Kohno, Y., Nomura, Y., & Taniguchi, T. (1988). Protective effects of the antiparkinsonian drugs talipexole and pramipexole against 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced apoptotic death in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Molecular Pharmacology*, 54, 1046–1054.
10. Student, A. K., & Edwards, D. J. (1977). Subcellular localization of types A and B monooxidase in rat brain. *Biochemical Pharmacology*, 26, 2337–2342.
11. Sanyal, J., Bandyopadhyay, S. K., Banerjee, T. K., Mukherjee, S. C., Chakraborty, D. P., Ray, B. C., & Rao, V. R. (2009). Plasma levels of lipid peroxides in patients with Parkinson's disease. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 13(2), 129–132.

12. De Lazzari, F., Bubacco, L., Whitworth, A. J., & Bisaglia, M. (2018). Superoxide radical dismutation as new therapeutic strategy in Parkinson's disease. *Aging and Disease*, 9(4), 716–728.
13. Mehta, N. J., Asmaro, K., Hermiz, D. J., Njus, M. M., Saleh, A. H., Beningo, K. A., & Njus, D. (2016). Hypochlorite converts cysteinyl-dopamine into a cytotoxic product: A possible factor in Parkinson's disease. *Free Radical Biology and Medicine*, 101, 44–52.
14. Anastassova, N. O., Yancheva, D. Y., Mavrova, A. T., Kondeva-Burdina, M. S., Tzankova, V. I., Hristova-Avakumova, N. G., & Hadjimitova, V. A. (2018). Design, synthesis, antioxidant properties and mechanism of action of new N,N'-disubstituted benzimidazole-2-thione hydrazone derivatives. *Journal of Molecular Structure*, 1165, 162–176.
15. Ng, T. K. S., Ho, C. S. H., Tam, W. W. S., Kua, E. H., & Ho, R. C. (2019). Decreased serum brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels in patients with Alzheimer's disease (AD): A systematic review and meta-analysis. *International Journal of Molecular Sciences*, 20, 257. <https://doi.org/10.3390/ijms20020257>
16. Nigam, S. M., Xu, S., Kritikou, J. S., Marosi, K., Brodin, L., & Mattson, M. P. (2017). Exercise and BDNF reduce A β production by enhancing α -secretase processing of APP. *Journal of Neurochemistry*, 142, 286–296. <https://doi.org/10.1111/jnc.14094>