



ХИМИКОТЕХНОЛОГИЧЕН И МЕТАЛУРГИЧЕН УНИВЕРСИТЕТ

ФАКУЛТЕТ ПО ХИМИЧНИ ТЕХНОЛОГИИ

КАТЕДРА „ОРГАНИЧЕН СИНТЕЗ И ГОРИВА”

инж. Неда Орлинова Анастасова

**Синтез и изследване на хепатотоксичност и антиоксидантна
активност на
N,N'-дизаместени бензимидазол-2-тиони**

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

на дисертация

за придобиване на образователната и научна степен „Доктор”

по научна специалност 7.3 Фармация (Фармацевтична химия)

Научни ръководители: доц. д-р. Анелия Маврова, проф. дхн Владимир Божинов

Научно жури:

1. доц. д-р Петър Тодоров – председател, рецензент
2. проф. Георги Момеков - рецензент
3. доц д-р Анелия Маврова
4. доц. д-р Елена Станоева
5. доц. д-р Бистра Стамболийска

София, 2017

Дисертационният труд е написан на 136 страници, съдържа 35 фигури, 34 схеми и 8 таблици. Цитирани са 158 източника.

Представеният дисертационен труд е обсъден и приет за защита на заседание на на разширения, специализиран научен съвет на научното звено на катедра „Органичен синтез и горива”, състояло се на 16 декември 2016 г.

Публичната защита на дисертационния труд ще се проведе на 23.03.2017 г. от 14:00 часа в зала 424, сграда „А” на ХТМУ.

Материалите са на разположение на интересувалите се на интернет страницата на ХТМУ и в отдел „Научни дейности”, стая 406, етаж 4, сграда „А” на ХТМУ.

Въведение

Бензимидазоловият хетероцикъл представлява градивен елемент в структурата на така наречените малки лекарствени молекули, притежаващи антибактериална, антивирусна, противоракова, антихелминтна, сърдечно-съдова и др. активности, поради което представлява значителен интерес за фармацевтичната химия. Модифицирането и оптимизирането на молекулната структура е довело до разработването на съединения, намиращи приложение като медикаменти в терапевтичната практика, най-известни примери за което са лекарствата Albendazole, Omeprazole, Bendamustine, Benzimidavir и др. Потенциалът на бензимидазоловия хетероцикъл съвсем не е изчерпан и през последните години силно се работи върху синтеза и изследването на нови съединения в областта на органичната и медицинската химия. Една от малкото, все още сравнително недобре проучени територии, представлява синтезът на производни на бензимидазола с антиоксидантни свойства.

Наличието на токсини в околната среда, радиацията, цигареният дим и др. действат неблагоприятно върху защитните функции на организма и подпомагат възникването на оксидативен стрес, за който е установено е, че в значителна степен допринася за развитието на редица сериозни патологични увреждания, сред които, диабет, рак и невродегенеративни заболявания. В черния дроб се съдържат в големи количества полиненаситени мастни киселини, които са уязвими и подлежат на липидна пероксидация, която се счита за главен механизъм на оксидативния стрес и нейните продукти демонстрират мутагенни и карциногенни свойства.

Структурното сходство с мелатонин е една удачна стратегия при разработването на бензимидазоли с антиоксидантни свойства чрез въвеждане на заместители в N-алкилните вериги. N,N'-дизаместените бензимидазоли се срещат в много нисък процент от научната литература, свързана с тематиката, а данни за N,N'-дизаместени бензимидазол-2-тиони почти изцяло липсват.

Получените обещаващи резултати при инхибиране на липидна пероксидация от 1,3-дизаместени иминобензимидазоли и известната ролята на серния атом за наличието на антиоксидантни свойства даде тласък за генериране и изследване на нови 1,3-

дизаместени бензимидазол-2-тионові производни. Предизвикателство представлява фактът, че до сега използваните методи за синтез на дизаместени бензимидазоли не могат да бъдат прилагани за тионните производни. Ето защо създаването и прилагането на нов метод ще улесни и стимулира по-нататъшните експерименти, както в областта на синтеза на бензимидазолови производни, така и в сферата на установяване на хитови бензимидазолови структури, съчетаващи в себе си способност да улавят свободни радикали с ниска хепатотоксичност и подходяща липофилност. Съединения с тези характеристики се очаква да бъдат полезен инструмент за оценка на потенциала на бензимидазолите като лекарство. Необходимо е да бъде изследван и установен механизмът на действие на тези молекули с цел да се проправи път на последващите усилия за откриване на антиоксиданти или цитопротектори.

Цели и задачи

Настоящият дисертационен труд е изготвен с цел синтез на N,N' -дизаместенибензимидазол-2-тиони и изследване на тяхната хепатотоксичност и антиоксидантна активност. За осъществяване на така поставената цел бяха определени следните задачи:

1. Синтез на 5(6)-заместени 1H-бензимидазол-2-тиони като прекурсори за генериране на 1,3-дизаместени съединения.
2. Синтез на 5-(не)заместени 1,3-бис-[3-(3-метокси-3-оксопропил-2,3-дихидро-1H-бензимидазол-2-тиони.
3. Синтез на 5-(не)заместени 2-тиоксо-2,3-дихидро-1H-бензимидазол-1-ил--1,3-дипропанохидразиди.
4. Синтез на 5-(не)заместени 1,3-бис- N' -заместени-3-(2-тиоксо-2,3-дихидро-1H-бензимидазол-1-ил)пропанхидразиди, съдържащи остатъци от *o*-, *m*- или *p*-метоксибензалдехид и от *o*-, *m*- или *p*-флуоробензалдехид.
5. Идентифициране структурата на синтезираните бензимидазолни производни чрез ИЧ и ЯМР-спектроскопия, както и с рентгеноструктурен анализ.
6. Изследване хепатотоксичността на синтезираните съединения
7. Скрининг за антиоксидантна активност:
 - Определяне отделянето на LDH
 - Определяне изчерпването на GSH
 - Определяне на инхибиращата активност спрямо липидна пероксидация
8. Установяване на механизма на антиоксидантно действие.
9. Квантовохимични изчисления на електронните свойства на молекулите и оптимизация на структурата им.

РЕЗУЛТАТИ И ДУСКУСИЯ

1. Синтез

5(6)-Заместените 1Н-бензимидазолтиол-2-тиони, са синтезирани по метод, при който като прекурсори се използват 4-заместени-1,2-диаминобензени, въглероден дисулфид, калиева основа и сярна киселина.

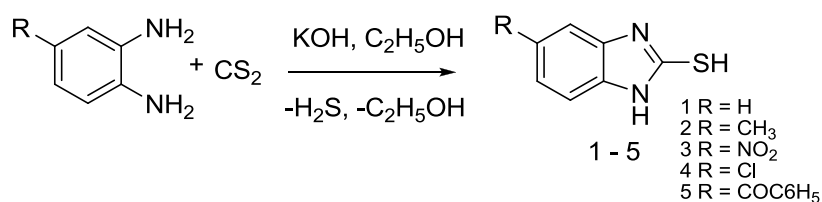


Схема 1. Синтез на 5(6)-заместени-бензимидазол-тиоли **1-5**

Като цяло в литературата не присъстват значителен брой синтезирани N,N'-дизаместени бензимидазол-2-тиони. Методът от 1982 г. на Saxena et al.⁹⁸ води до получаване на смес от моно- и дизаместено производно за 6 h в молни съотношения 1:11. Това наложи разработването на нов метод, същността на който е присъединяване по Михаел на α,β -ненасително карбонилно съединение, в частност метилакрилат.

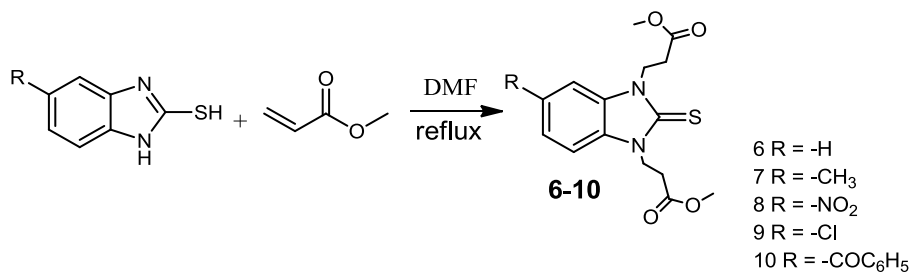


Схема 2. Синтез на 5-заместени диметил-2-тиоксо-1Н-бензимидазол-1,3-дипропаноати

Методът използва многократно по-малки молни съотношения на участващите реагенти меркаптобензимидазол и метилакрилат, които са сведени до 1:2. Също така времето за реакция е намалено от 6 h на 2 h, като в крайна сметка се получава единствено дизаместено

производно, за разлика от получаваната от Saxena et al. смес от моно- и дизаместено производно, налагаща последващо разделяне. Механизмът на реакцията може да се представи със следната схема:

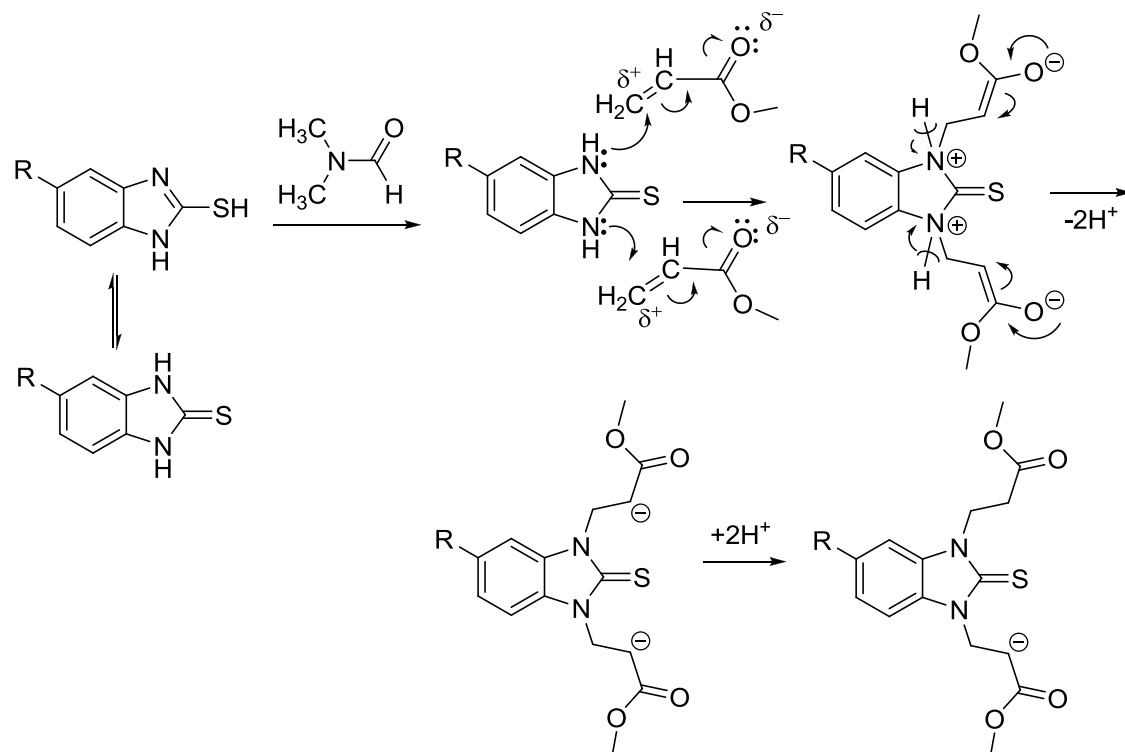


Схема 3 Механизъм на присъединяване по Михаел на метил акрилат към стабилизираната тионна тавтомерна форма и получаване на 5-(не)заместени диметил-2-тиоксо-1Н-бензимидазол-1,3-дипропаноати

Резултатите от ^1H и ^{13}C -ЯМР спектрите потвърждават, че съединенията получени по новия синтетичен метод са реагирали в тяхната тионна форма, а не в тиолната. В ЯМР спектъра особено характеристични са сигналите за $\text{N}-\underline{\text{CH}_2}\underline{\text{CH}_2}\text{CO}$ (триплети или дублети от триплети) на 1,3-дизаместените съединения, които са отместени към слабо поле, поради деекраниращия ефект на N-атомите и на карбонилните $\text{C}=\text{O}$ групи. Сигналите за $\text{N}-\underline{\text{CH}_2}$ варират от 4.42 до 4.60 ppm, докато тези за $\underline{\text{CH}_2}-\text{CO}$ са при 2.82 – 3.00 ppm в зависимост от заместителя в бензимидазоловия пръстен и разтворителя. Съединенията са допълнително охарактеризирани с DEPT, COSY и HSQC.

За синтеза на хидразидните производни **11-15** получените естери **6-10** участват в реакция на кондензация с хидразин хидрат в среда от абсолютен алкохол в молни съотношения 1:4. Аналогично на естерните производни, при хидразидните най-типични са сигналите за N-CH₂CH₂-CO групите, като за N-CH₂ варират от 4.48 до 4.43 ppm, а тези за CH₂-CO - от 2.62 до 2.50 ppm.

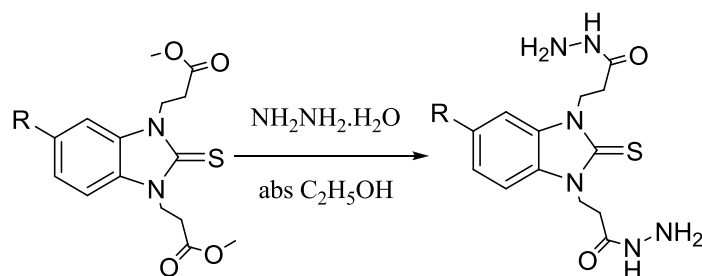


Схема 4. Синтез на 5-заместени 2-тиоксо-2,3-дихидро-1*H*-бензимидазол-1-ил-1,3-дипропанохидразида **11-15**

Синтезирани са серии от хидразони с цел изследване и сравняване на техните антиоксидантни свойства спрямо тези на хидразидите и естерите, като предходно получените хидразиди участват в реакция със съответните *o*, *m* и *p*-заместени флуорни или метокси алдехиди.

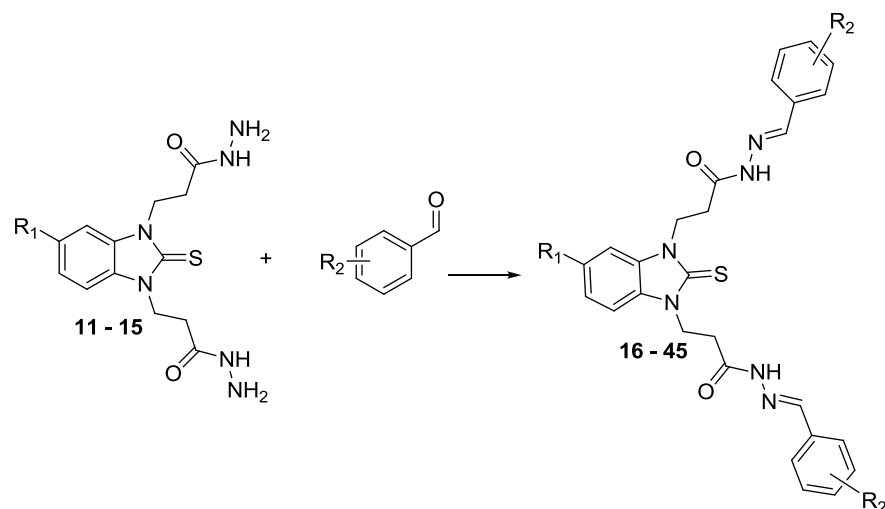
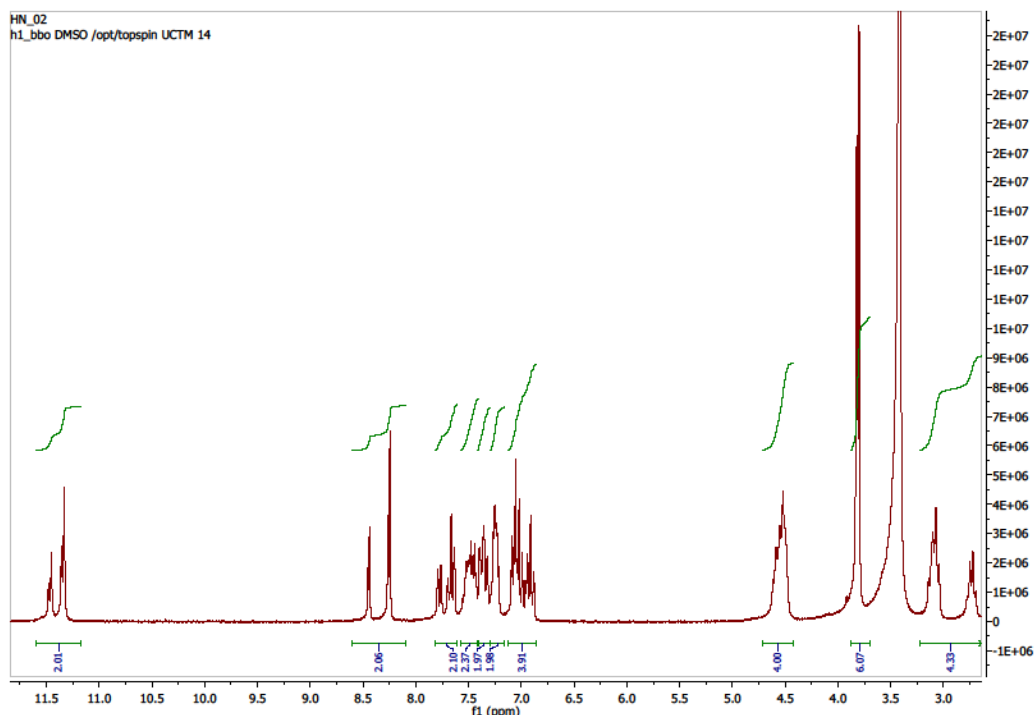


Схема 5. Синтез на хидразонните производни **16-45**

Таблица 1. Хидразони **16-45** със съответните заместители в бензимидазоловия цикъл (**R₁**) и в алдехидния остатък (**R₂**)

Съединение	R ₁	R ₂	Съединение	R ₁	R ₂
16	H	p-OCH ₃	31	NO ₂	o-F
17	H	o- OCH ₃	32	NO ₂	p-F
18	H	m- OCH ₃	33	NO ₂	m-F
19	H	o-F	34	Cl	p-OCH ₃
20	H	p-F	35	Cl	o- OCH ₃
21	H	m-F	36	Cl	m- OCH ₃
22	CH ₃	p-OCH ₃	37	Cl	o-F
23	CH ₃	o- OCH ₃	38	Cl	p-F
24	CH ₃	m- OCH ₃	39	Cl	m-F
25	CH ₃	o-F	40	C ₆ H ₅ O	p-OCH ₃
26	CH ₃	p-F	41	C ₆ H ₅ O	o- OCH ₃
27	CH ₃	m-F	42	C ₆ H ₅ O	m- OCH ₃
28	NO ₂	p-OCH ₃	43	C ₆ H ₅ O	o-F
29	NO ₂	o- OCH ₃	44	C ₆ H ₅ O	p-F
30	NO ₂	m- OCH ₃	45	C ₆ H ₅ O	m-F

Получените хидразонни показаха удвоени сигнали в ¹H ЯМР спектрите, които много отчетливо се виждат при CH₂-CO групите в областта от 2.60 to 3.10 ppm, както и за N-H в областта около 11 ppm. За новообразуваната азометинова връзка N=CH- също се наблюдават удвоени сигнали в областта от 7.75 до 8.10 ppm. Както се очаква, тук се виждат по-голям брой сигнали за фенилни ядра в областта от 6.75 до 7.70 ppm.



Фиг 1. ^1H -ЯМР спектър на 17

2. Фармакологични изследвания

2.1. Хепатотоксичност

Бензимидазол-2-тионите са изследвани върху изолирани хепатоцити от мъжки плъхове от породата Wistar чрез метод, доставящ голямо количество на метаболитно активни живи клетки. Ефектът на съединенията върху функционално-метаболитния статус на клетките е установен чрез проследяване на клетъчната жизненост и промените в лактатдехидрогеназата (LDH), глутатиона (GSH) и нивата на малондиалдехид (MDA). Всички наблюдавани ефекти са сравнени с контролна група от нетретирани хепатоцити.

2.1.1. Влияние на естерите 6-10 и хидразидите 11-15 върху функционално-метаболитния статус на изолирани хепатоцити

Изследваните съединения повлияват в различна степен функционално-метаболитния статус на изолираните хепатоцити (Таблица 2).

Таблица 2. Влияние на изследваните съединения в концентрации 250 μM върху параметрите, характеризиращи функционално-метаболитния статус на изолираните хепатоцити

Група	Клетъчна жизненост, %	LDH, $\mu\text{mol}/\text{min}/10^6$ клетка	GSH, $\text{nmol}/10^6$ клетка	MDA, $\text{nmol}/10^6$ клетка
Контролна	85 ± 1.0	0.117 ± 0.004	19 ± 1.5	0.049 ± 0.01
6	$49 \pm 3.6^{**}$	$0.366 \pm 0.03^{**}$	$11 \pm 1.2^{**}$	$0.125 \pm 0.003^*$
7	$53 \pm 3.1^{**}$	$0.338 \pm 0.02^{**}$	$12 \pm 1.5^{**}$	$0.121 \pm 0.01^*$
8	$47 \pm 2.6^{**}$	$0.452 \pm 0.01^{**}$	$11 \pm 3.1^{**}$	$0.128 \pm 0.003^*$
9	$45 \pm 1.0^{**}$	$0.507 \pm 0.01^{***}$	$9 \pm 1.5^{***}$	$0.220 \pm 0.02^{***}$
10	$63 \pm 3.1^*$	$0.225 \pm 0.01^*$	16 ± 2.1	$0.110 \pm 0.01^*$
11	$50 \pm 6.0^{**}$	$0.260 \pm 0.04^*$	$12 \pm 1.8^{**}$	$0.111 \pm 0.01^*$
12	$66 \pm 4.5^*$	$0.222 \pm 0.01^*$	$12 \pm 1.5^*$	$0.107 \pm 0.01^*$
13	$48 \pm 4.5^{**}$	$0.434 \pm 0.01^{**}$	$11 \pm 1.2^{**}$	$0.148 \pm 0.03^{**}$
14	$45 \pm 1.5^{**}$	$0.524 \pm 0.01^{***}$	$8 \pm 2.1^{***}$	$0.239 \pm 0.01^{***}$
15	$67 \pm 2.6^*$	$0.205 \pm 0.01^*$	16 ± 2.5	$0.104 \pm 0.01^*$

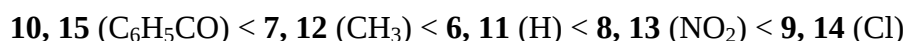
* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ спрямо контролна група (нетретираните хепатоцити)

Както се вижда естерът **10** (1,3-бис(метоксикарбонилетил)-5-бензоил-1,3-дихидро-2H-бензимидазол-2-тион) намалява клетъчната жизненост с 27% в сравнение с нетретираните хепатоцити, докато **8** и **9** проявяват много по-висока токсичност и причиняват намаляване на клетъчната жизненост с 47% и 45%, съответно. В групата на естерите, при третиране със съединение **10**, се запазва най-добре цялостта на клетъчната мембрана (статистически значимо повишата LDH отделянето с 92%), като няма ефект върху нивата на GSH и най-малко завишава образуването на MDA (124%). Хлорното производно **9** предзвиква най-силно отделяне на LDH – 334% и най-силен оксидативен стрес, свързан с образуването на MDA – 349% и намаляване на GSH с 53%.

В групата на хидразидите съединение **15** има най-ниска хепатотоксичност, докато **14** е с най-висока (Таблица 2). **15** индуцира статистически значимо намаляване на клетъчната

жизненост само с 21% и не демонстрира токсичност спрямо нивата на GSH. Трябва да се отбележи, че сред всички изследвани естерни и хидразидни производни на бензимидазол-2-тионите **15** показва най-добри резултати спрямо нивата на отделяне на LDH и образуване на MDA – 75% и 112%, респ.

Разликите в токсичността се дължат на присъствието на различни заместители в *позиция 5* на бензимидазоловия пръстен. В групата на естерите и хидразидите токсичността нараства в тази посока:



В групата на хидразоните, за разлика от останалите две групи, тази тенденция не се запазва и резултатите от изследванията са отразени в **Таблица 3**.

Таблица 3. Влияние на изследваните хидразони в концентрации 250 μM върху параметрите, характеризиращи функционално-метаболитния статус на изолираните хепатоцити

Съединение	Клетъчна жизненост, %	LDH, $\mu\text{mol}/\text{min}/10^6$	GSH, $\text{nmol}/10^6$	MDA, $\text{nmol}/10^6$
контрола	82 ± 1.5	0.112 ± 0.01	19 ± 1.2	0.052 ± 0.01
16	70 ± 2.5 *	0.220 ± 0.01 **	18 ± 2.5	0.089 ± 0.01 *
17	71 ± 2.3 *	0.225 ± 0.01 **	18 ± 2.2	0.091 ± 0.01 *
18	71 ± 2.4 *	0.231 ± 0.01 **	18 ± 2.6	0.092 ± 0.01 *
19	65 ± 2.5 *	0.300 ± 0.01 ***	16 ± 1.5	0.110 ± 0.01 *
20	65 ± 2.1 *	0.320 ± 0.01 ***	16 ± 2.5	0.122 ± 0.01 ***
21	63 ± 2.2 *	0.335 ± 0.01 ***	16 ± 2.1	0.125 ± 0.01 **
22	66 ± 1.1 ***	0.210 ± 0.02 ***	16 ± 1.7 **	0.211 ± 0.01 ***
23	67 ± 1.1 ***	0.216 ± 0.02 ***	17 ± 1.2 *	0.217 ± 0.01 ***

24	60 ± 1.6 ***	0.297 ± 0.01 ***	11 ± 1.1 ***	0.238 ± 0.02 ***
25	68 ± 1.2 ***	0.203 ± 0.01 ***	16 ± 2.5 *	0.214 ± 0.02 ***
26	61 ± 1.1 ***	0.281 ± 0.01 ***	10 ± 2.1 ***	0.238 ± 0.01 ***
27	61 ± 1.1 ***	0.300 ± 0.01 ***	9 ± 1.5 ***	0.241 ± 0.01 ***
28	56 ± 1.5 ***	0.359 ± 0.01 ***	14 ± 1.5	0.227 ± 0.01 ***
29	57 ± 2.1 ***	0.354 ± 0.01 ***	15 ± 1.2	0.227 ± 0.01 ***
30	50 ± 1.5 ***	0.456 ± 0.01 ***	10 ± 1.7 *	0.348 ± 0.01 ***
31	57 ± 2.1 ***	0.361 ± 0.01 ***	16 ± 2.5 **	0.228 ± 0.01 ***
32	53 ± 2.6 ***	0.470 ± 0.01 ***	10 ± 1.7 ***	0.332 ± 0.01 ***
33	51 ± 1.7 ***	0.469 ± 0.01 ***	9 ± 2.5 ***	0.328 ± 0.01 ***
34	53 ± 2.1 ***	0.410 ± 0.02 ***	13 ± 1.7 **	0.111 ± 0.01 **
35	51 ± 2.1 **	0.416 ± 0.02 ***	15 ± 1.2 *	0.117 ± 0.01 **
36	47 ± 2.6 ***	0.497 ± 0.01 ***	11 ± 1.1 ***	0.138 ± 0.02 *
37	51 ± 3.2 **	0.403 ± 0.01 ***	15 ± 2.5 *	0.114 ± 0.02 **
38	47 ± 2.1 **	0.481 ± 0.01 ***	10 ± 2.1 ***	0.138 ± 0.01 ***
39	46 ± 2.1 **	0.500 ± 0.01 ***	9 ± 1.5 ***	0.141 ± 0.01 ***
40	66 ± 1.5 **	0.259 ± 0.01 ***	16 ± 1.5	0.107 ± 0.01 *
41	67 ± 2.1 *	0.254 ± 0.01 ***	17 ± 1.2	0.107 ± 0.01 *
42	60 ± 1.5 ***	0.356 ± 0.01 ***	14 ± 1.7 *	0.128 ± 0.01 **
43	67 ± 2.1 *	0.261 ± 0.01 ***	18 ± 2.5	0.110 ± 0.01 **

44	$63 \pm 2.6 *$	$0.370 \pm 0.01 ***$	$13 \pm 1.7 **$	$0.132 \pm 0.01 ***$
45	$61 \pm 1.7 **$	$0.369 \pm 0.01 ***$	$14 \pm 2.5 *$	0.128

2.1.2. Влияние на незаместените в бензимидазоловия цикъл хидразони (16-21) върху функционално-метаболитния статус на третираните хепатоцити

Както се вижда, от резултатите за първата група хепатоцити, третирани с незаместени в 5-позиция хидразони, най-щадящи клетъчната жизненост са съединения **17** и **18** – за тях е отчетено намаление само с 13%, а за съединение **16** – с 15%. И трите съединения съдържат метокси група във фенилните ядра. Останалите три съединения имат малко по-токсично влияние, като **19** и **20** – я понижават с 21%, а **21** – с 23%. Това е директно свързано с повишаване нивата на LDH за **16** – 96%, за **17** – 101%, а за **18** – 106%. Другите три съединения с флуорозаместените фенилни ядра водят до покачване с 168% за **19**, 186% за **20** и 199% за **21**.

Трябва да се отбележи, че съединенията от тази група не оказват токсично влияние спрямо редуцирания глутатион. Образуването на MDA е статически значимо завишено с 71% за **16**, 25% за **17** и 77% за **18**. Най-много завишава образуването на MDA **21** – с 140%, а останалите две **19** и **20** – съответно с 112% и 135%.

2.1.3. Влияние на заместените с метилна група в бензимидазоловия цикъл хидразони (22-27) върху функционално-метаболитния статус на третираните хепатоцити

В групата на съединенията, съдържащите метилна група се наблюдават по-ниски токсични ефекти в метокси заместените **22-24** и по-високи за флуорозаместените **25-27**, като най-ниско влияние върху клетъчната жизненост има *m*-метокси заместеният хидразон, който я намалява само с 17%, следван от *o*-метокси – с 18% и *p*-метокси – с 20%. Останалите три съединения с флуорен заместител в *o*-, *m*- и *p*-позиция намаляват клетъчната жизненост с 26%. Съединение **24** повишава отделянето на LDH най-малко в тази група - 81%, *p*-заместеното с метокси група **22** – с 88%, а **23** – с 93%. В групата на съединенията, съдържащи флуорен атом LDH отделянето се повишава при **25** – с 165%, при **26** – с 151% и най-силно за **27** – с 168% в сравнение с контролната група нетретирани хепатоцити.

Най-малък спад в нивата на GSH има съединение **23** с *o*-метокси заместител – 11%, а останалите две – с 16%. Флуоросъдържащите съединения **25-27** го занижават съответно с 42%, 47% и 53%.

Относно отделянето на MDA - статистически значимо завишаване с 306% има съединение **22** и с по-силно влияние са **23** и **24**, съотв. С 317% и с 312%, докато флуорозаместени **25** и **26** го повишават с 358% и **27** – с 363% съотв., в сравнение с нетретираната контролна група.

2.1.6. Влияние на заместените с бензоилна група в бензимидазоловия цикъл хидразони (40-45) върху функционално-метаболитния статус на третираните хепатоцити

В тази група наблюдаваме слаботоксични съединения, като **40**, което води до статистически значимо понижаване на клетъчната жизненост с 20%, а **41** и **42** – с 18%. Флуорозаместените съединения и тук водят до по-силно отслабване, което за **43** е 27%, за **44** – 23 % и за **45** – 26 % в сравнение с контролната група нетретираните хепатоцити. Следва и покачването в секрецията на лактат дехидрогеназа, която е най-ниска за **41** – с 124%, следва за **40** – с 131% и за **42** – с 133%. Останалите флуорни съединения имат по-слабо завишаване, което е най-голямо за **44** – с 230%, последвано от **45** – с 229% и с най-малко за *p*-флуорозаместеното **43** – с 218%. И тук трябва да се отбележи, че метокси-заместените съединения **40-42** не проявяват токсични ефекти върху нивата на редуцирания глутатион, докато **43**, и **45** са ги понижали статистически значимо съответно с 26 % и **46** – с 32 %, в сравнение с контролната група нетретираните хепатоцити. Относно образуването на MDA, най-малко влияние имат **40** и **41**, които го повишават с 106 %, след което **42** – с 112 %, а от останалите най-токсично е **44** – с 152 %, след което се нареждат **43** и **45** с по 146 %.

Останалите две групи съединения (**28-39**), съдържащи нитро и хлорни заместители имат по-неблагоприятно влияние върху показателите.

Може да се обобщи, че при прилагане на хидразоните **16-45**, най-малък ефект върху функционално-метаболитния статус на третираните хепатоцити е отчетен при съединенията **16-21**, съдържащи незаместено ароматно ядро от бензимидазоловия цикъл, за разлика от очакваните резултати въз основа на предходните изследвания на естерите и хидразидите. От тях съединение **16-18** проявяват по-ниска цитотоксичност спрямо флуорозаместените **19-21**.

На второ място се нареждат бензоилните производни **40-45**, като при тях съединения **40, 41** и **42** също показват значително ниска цитотоксичност, а **43-45** по-висока.

На трето място се подрежда групата на съединенията, съдържащи метилна група **22-27**, проявяващи също значително ниска цитотоксичност. От тях съединения **22-24**, съдържащи метокси-група в *o*-, *m*- и *p*-позиция проявяват по-ниска цитотоксичност отколкото флуорозаместените.

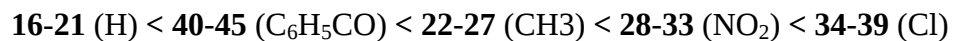
Групата на съдържащите нитро група съединенията **28-33** се отличава с по-висока хепатотоксичност, като и в тази група съединенията с метокси заместител в *o*-, *m*- и *p*-позиция показват по-високи цитотоксични ефекти.

Най-висока хепатотоксичност проявяват хлорзаместените съединения - **34-39**.

Във всички групи съединения се наблюдава, че бензимидазолови производни съдържащи метокси заместители във фенилното ядро имат по-ниска хепатотоксичност спрямо тези с флуорни заместители.

Всички групи съединенията, съдържащи *o*-метокси- групи във фенилните ядра проявяват най-ниска цитотоксичност, а съединенията съдържащи *p*-флуорозаместени фенилни ядра – най-силна. По-висока токсичност за флуорозаместените съединения, може да бъде обяснена с по-трудното метаболизиране на връзката C-F от клетъчните ензими.

Съединенията могат да бъдат подредени по нарастване на цитотоксичността, в зависимост от заместителя, който съдържат в 5-та позиция в следния ред:



Базирайки се на получените резултати може да се заключи, че групите на хидразоните оказват по-слаб ефект върху функционално-метаболитния статус на тренираните хепатоцити, отколкото съответните естери и хидразиди, съдържащи аналогични заместители в бензимидазоловия цикъл. Тази тенденция се запазва при всички изследвани съединения и въз основа на това може да се направи изводът, че удължаването на алкилните вериги чрез кондензация с ароматни алдехиди оказва благоприятно влияние.

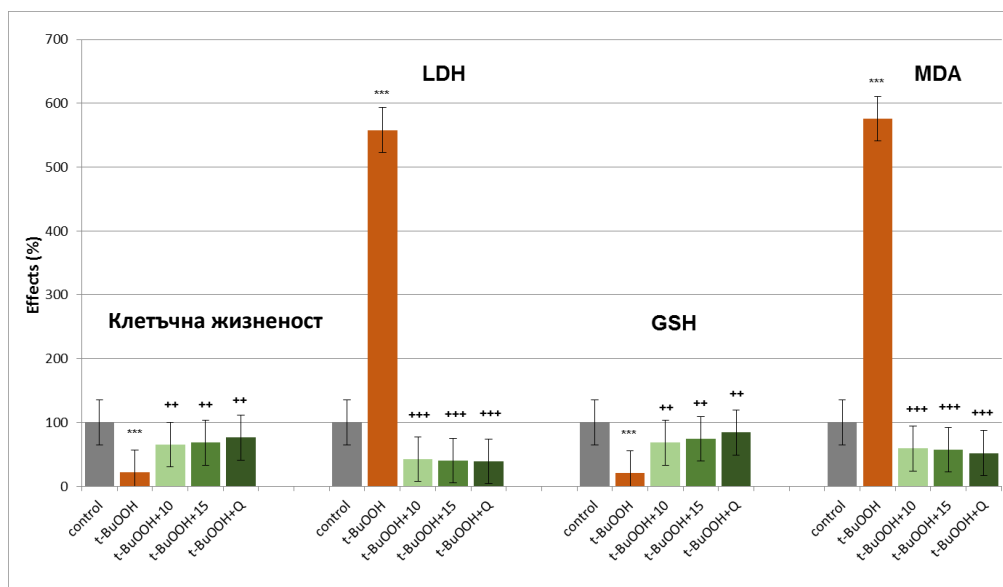
2.2. Изследване на хепатопротективната активност при *in vitro* модел на оксидативен стрес, индуциран с *терт*-бутилхидропероксид

Като се вземат предвид дискутираните резултати, получени от изследване на параметрите, характеризиращи функционално-метаболитния статус на хепатоцитите, в проучването за хепатопротекция бяха включени девет съединения с минимален собствен инхибиращ ефект върху култивираните хепатоцити, които са изследвани за вероятна антиоксидантна и цитопротективна активност при индуциран с *терт*-бутилхидропероксид оксидативен стрес. Ефектите са сравнени с тези на кверцетин, който е известен антиоксидант.

2.2.1. Изследване на антиоксидантна активност на естера 10 и хидразида 15 спрямо оксидативен стрес, индуциран от *терт*-бутилхидропероксид

Ефектите върху оксидативния стрес са представени на следващата **Фиг.14**.

Фиг.2. Ефекти от **10**, **15** и кверцетин (250 μ M) върху оксидативния стрес, причинен от *терт*-бутилхидропероксид (75 μ M) на параметри, характеризиращи функционално-метаболитния статус на изолирани хепатоцити



При самостоятелно прилагане на 75 μ M *терт*-бутилхидропероксид (*t*-BuOOH) се наблюдава статистическо значимо цитотоксично действие върху изолираните хепатоцити, което включва намаляване на клетъчната жизненост и GSH нивата със 78 % и 79 % и завишаване отделянето на LDH и образуването на MDA с 458% и 476%, респ., в сравнение с негетираниите хепатоцити.

Антиоксидантната активност на съединения **10** и **15** е определена на базата на сравнение на гореспоменатите параметри с хепатоцити, третирани с токсичния агент *t*-BuOOH в комбинация с **10** и **15**. Естерното производно запазва клетъчната жизненост и нивото на GSH с 189% и 225%, респ., докато хидразидното – с 205% и 250%. Що се отнася до LDH и MDA, **10** ги понижава с 58% и 41%, докато **15** – с 60% и 43%. Кверцетинът запазва клетъчната жизненост и GSH – с 242% и 300%, докато понижава LDH и MDA – с 61% и 48%.

От тук следва, че съединения **10** и **15** показват статистическо значимо цитопротективно и антиоксидантно действие спрямо оксидативен стрес, предизвикан от *t*-BuOOH, сходно с това на кверцетин (Фиг. 14).

Цитопротективните ефекти на съединения **10** и **15** спрямо индуцирания от *tert*-BuOOH оксидативен стрес се дължат на техните свойства да улавят ROS и да повлияват метаболизма на *tert*-BuOOH. В крайна сметка и двете съединения намаляват липидната пероксидация, подобряват GSH нивата и предпазват цялостта на клетъчната мембрана на хепатоцитите.

2.2.2. Изследване на антиоксидантна активност на хидразоните 16-18, 22-24 и 43-45 спрямо индуциран от *терт*-бутилхидропероксид оксидативен стрес

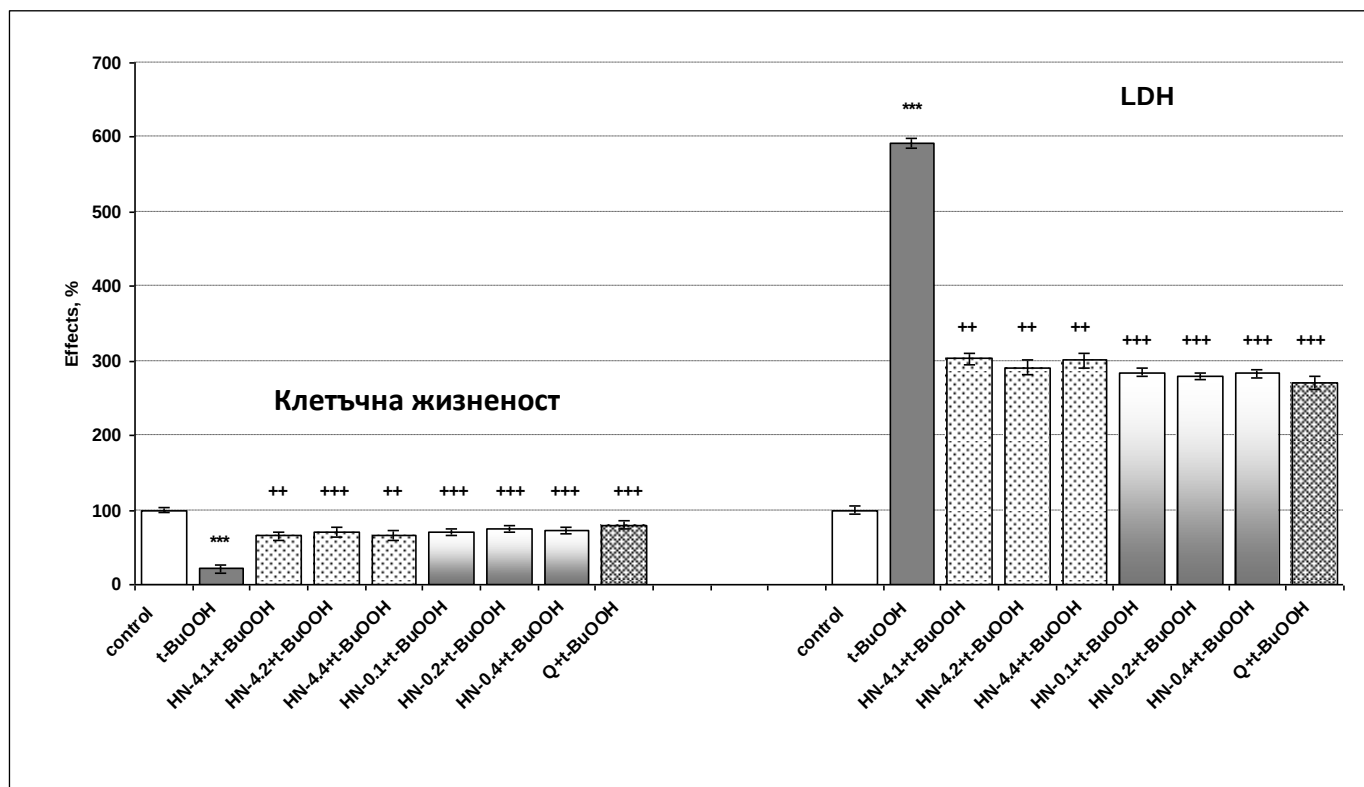
Когато хепатоцитите са третирани с комбинация от *tert*-BuOOH и съединенията от групата на хидразоните, съдържащи бензоилна група, най-високо цитопротективно влияние относно запазването на клетъчната жизненост и нивата на GSH, демонстрира съединение **41** с *o*-метокси заместител, съответно с 233 %, а GSH – с 127 %, последвано от **42** с *m*-метокси група, което запазва клетъчната жизненост с 214 %, а GSH – на 100 %, Съединение **40**, съдържащо *p*-метокси заместител, запазва клетъчната жизненост с 210%, а GSH - на 100%. Относно отделянето на LDH и образуването на MDA, в тази група отново най-ефективно се оказва **41**, което ги понижава с 51%. От останалите - **40** води до спад в отделянето на LDH с 49%, а MDA – с 40% и **42** понижава LDH с 49% и MDA с 41% спрямо токсичния агент.

В следващата група на хидразоните, съдържащи метилова група, съединение **23** с *o*-метокси заместител в хидразоновия фрагмент, при комбинирано прилагане с *tert*-BuOOH демонстрира най-благоприятен цитопротективен ефект, като запазва клетъчната жизненост

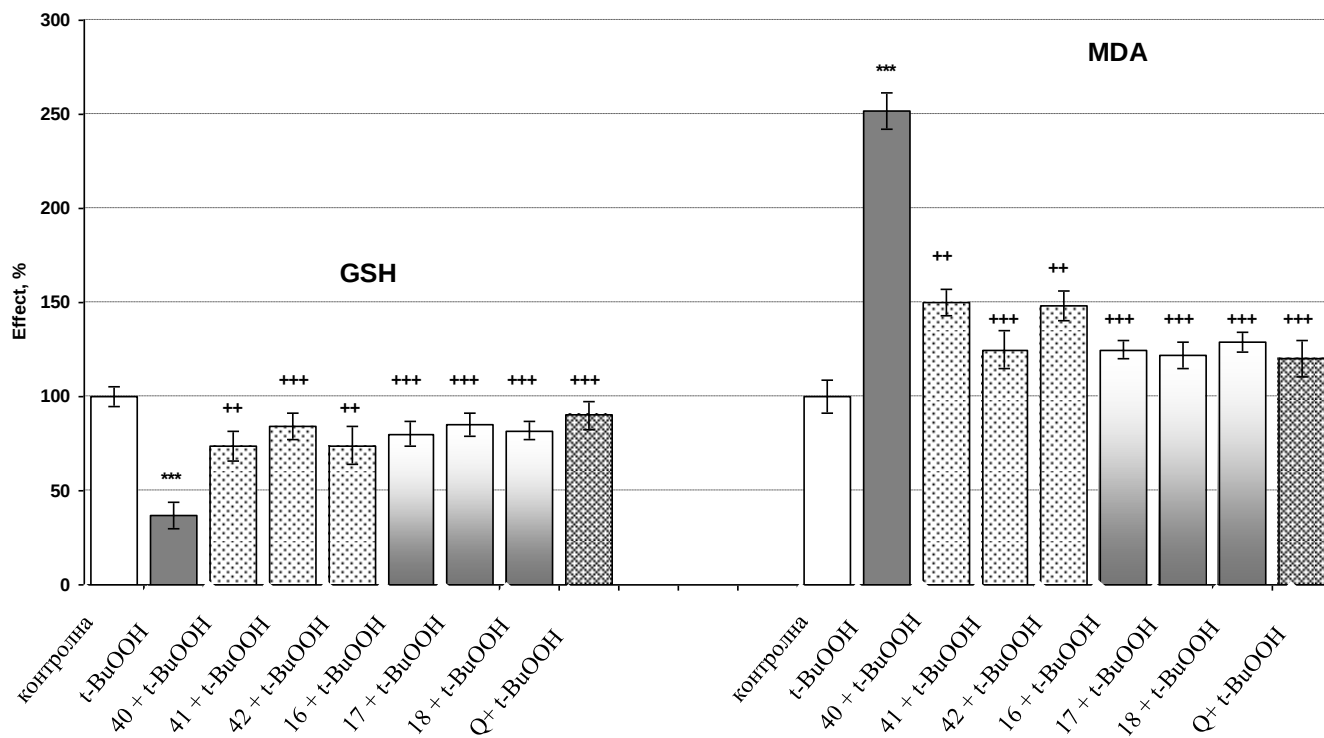
и нивата на GSH съотв. с 168% и 125%. За *p*-метокси заместеното съединение **22** тези резултати са 163% и 50%, респ, а за *m*-заместения хидразон **24** са 147% и 100%, респ. Относно ефектите върху понижаване отделянето на LDH и образуването на MDA, **22** оказва влияние с 47% и 12% съотв., а **23** с 44% и 15%, докато **24** ги намалява статистически значимо с 61% и 48%. Резултатите са сходни с тези на кверцетин.

В групата на незаместените в *позиция 5* на бензимидазоловия цикъл хидразони, при комбинирано прилагане на *tert*-BuOOH със съдържащото *p*-заметокси заместител **16**, се наблюдава запазване на клетъчната жизненост и GSH с 233% и 116%, респ. Съединението **17** с *o*-метокси заместено фенилно има най-силно изявени цитопротективни свойства, като запазва клетъчната жизненост съответно с 257% и 140%, а **18** с *m*-метокси група влияението върху клетъчната жизненост е 243 %, а върху GSH – 122%. Съединенията водят до спад в отделянето на LDH и формирането на MDA по следния начин: **16** намалява съответно с 52% и 50%, **17** отново е най-ефективно, като повлиява и двете с 53%, а **18** ги понижава с 52% и 49% респ., в сравнение с токсичния агент. Използваният за сравнение кверцетин запазва клетъчната жизненост с 281%, а GSH нивата с 143% и понижава LDH с 54% и образуването на MDA – с 52%.

Резултатите от изследванията са представени на следващите фигури.



Фиг.3. Ефекти върху клетъчната жизненост и отделянето на LDH от 250 μM 40, 41, 42, 16, 17, 18 и кверцетин при *tert*-бутилхидропероксид (75 μM)-индуциран оксидативен стрес в изолирани хепатоцити на плъх



Фиг.4. Ефекти върху нивата на GSH и MDA на съединения **16,-18, 40-42**, (250 μM) и кверцетин при индуциран оксидативен стрес в изолирани хепатоцити на плъх от *tert*-бутилхидропероксид (75 μM)

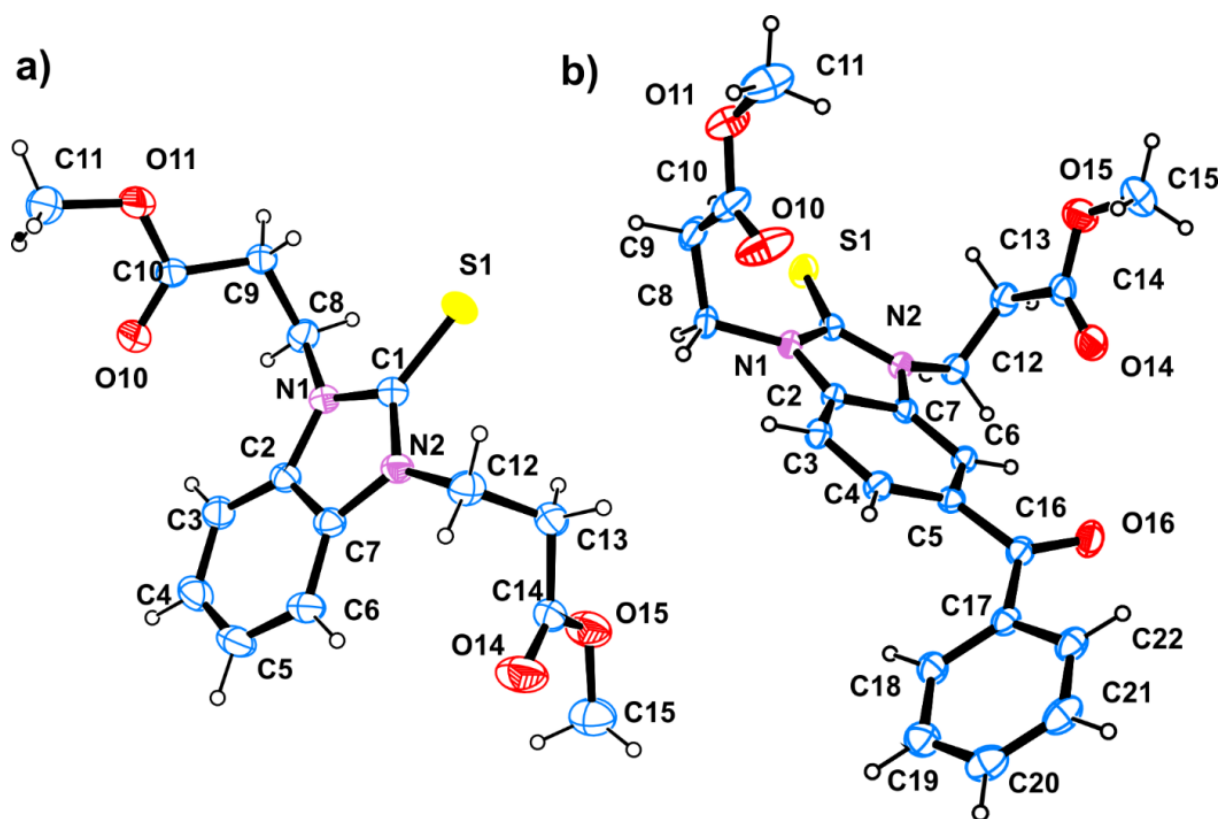
При изследването на инхибиране на оксидативен стрес, индуциран от токсичния агент *t*-BuOOH, всички от изследваните девет съединения **16-18, 22-24, 40-42** проявяват значителни антиоксидантни и цитопротективни свойства, сравними с тези на използвания като референтно съединение кверцетин. Като най-добър антиоксидант и цитопротектор се отличава съединение **17**, съдържащо незаместено ароматно ядро на бензимидазоловия пръстен и *o*-метоксифенилни ядра, проявяващо антиоксидантни свойства, най-близки с тези на кверцетин.

3. Молекулна и кристална структура

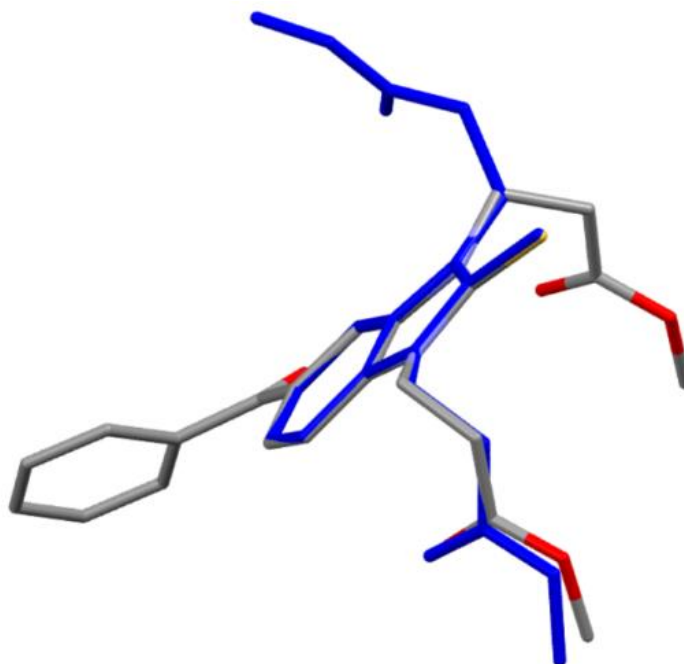
С цел получаване на информация за структурата на съединенията и по-доброто разбиране на нейното влияние върху биологичните свойства, тя е охарактеризирана чрез монокристална рентгенова дифракция и DFT методи.

3.1. Молекулна структура в кристално състояние

Кристали, подходящи за рентгеноструктурен анализ са израснати от двете естерни производни **6** и **10**. Съединение **6** кристализира в триклинална кристална система и пространствена група $P-1$, ($N^\circ 2$), докато съединение **10** кристализира в моноклинална кристална система и пространствена група $P2_1/n$ ($N^\circ 14$), като и при двете асиметрична единица съдържа една молекула от **6** или **10**.



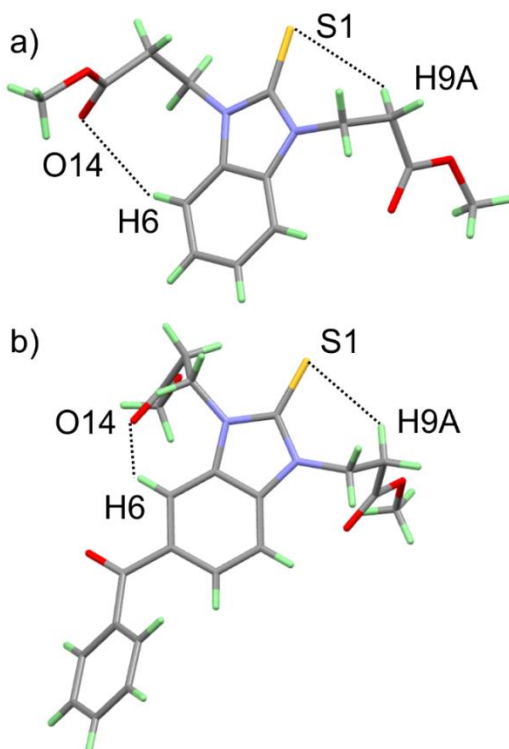
Фиг. 5. ORTEP изображение на а) **6** и б) **10** (термичните елипсоиди са представени с 50% вероятност), водородните атоми са показани като малки сфери с произволен радиус



Фиг. 6. Припокриване на молекулите на **6** (в синьо) и **10**

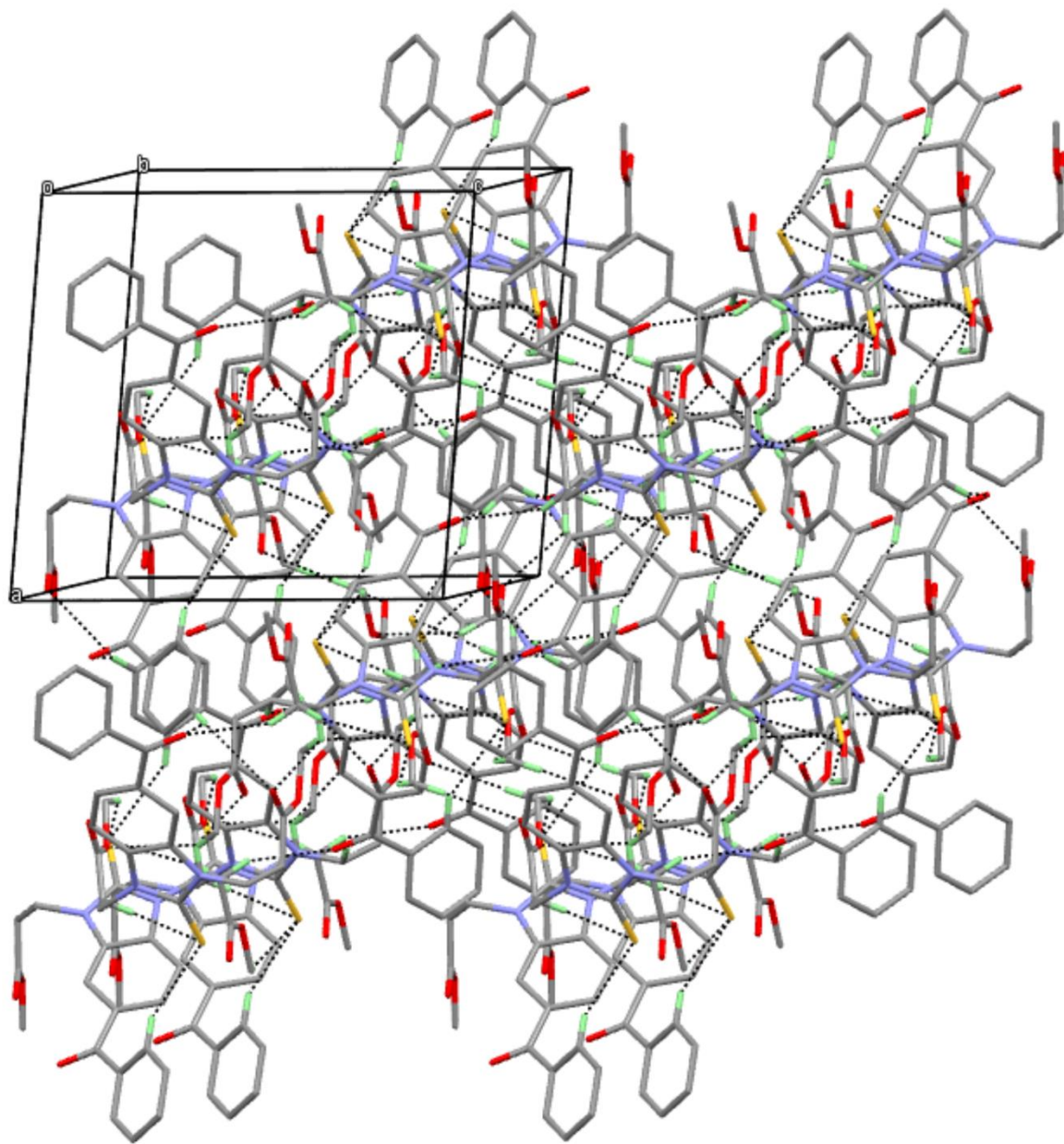
Бензимидазол-2-тионът и бензоилните пръстени са почти планарни със средно квадратично отклонение на атомите от пръстените 0.007, 0.006 и 0.004 Å в **6** и **10**, респ. Статичното отблъскване на орто-Н-атомите на бензимидазол-2-тиона и бензоилните групи в **10** водят до усукване на пръстените, както обичайно се наблюдава при бензоилно заместени ароматни съединения.¹²⁸ Ъгълът от $50.88(7)^\circ$ между равнините на двата пръстена е сходен с този наблюдаван при 4,4'-бис(диетиламино)бензофенон, 3,4-дихидроксибензофенон и 3-хидроксибензофенон.¹²⁸ Бензоилният кислород (O16) е или под, или над равнините на двете ароматни системи съответно с -0.676(4) или 0.539(3) Å.

При **6** N-алкилните вериги са в *trans* позиция, насочени към срещуположните страни на равнината, формирана от бензимидазоловия фрагмент, докато при **10** те са в *cis* конформация, позиционирани от една и съща страна на равнината. В кристалните структури на **6** и **10** не се наблюдават типични водородни връзки, но са установени многобройни слаби взаимодействия. Сред тях са две вътрешномолекулни C-H...S и C-H...O (или π ...O) (Фиг.7), които със сигурност оказват роля за стабилизирането на молекулната геометрия в крайната конформация.



Фиг.7. Наблюдавани слаби взаимодействия в **6** и **10**, стабилизиращи молекулната геометрия, S1...H9A: 2.784 Å (**6**) и 2.876 Å (**10**); O14...H6: 2.738 Å (**6**) и 2.601 Å (**10**).

От вътрешномолекулните слаби взаимодействия, допринасящи за стабилизиране на кристалната структура на **6**, трябва да се отбележи C13H13V...O10, водещо до формиране на вериги, успоредни на *c*. Веригите са свързани посредством C5H5...O11 взаимодействие и формират псевдослое, паралелни на *bc* (Фиг.7а). Тези псевдослое са подредени и свързани чрез CH...S и CH...O взаимодействия и по този начин тримерната кристална структура се стабилизира от комплексна мрежа от слаби взаимодействия (Фиг.7б). При **10** стабилизирането на кристалната структура се постига също чрез комплексна мрежа от слаби взаимодействия. За разлика от **6**, при **10** наличието на бензоилен фрагмент обуславя формирането на допълнителни CH₃...π и CH...O взаимодействия.



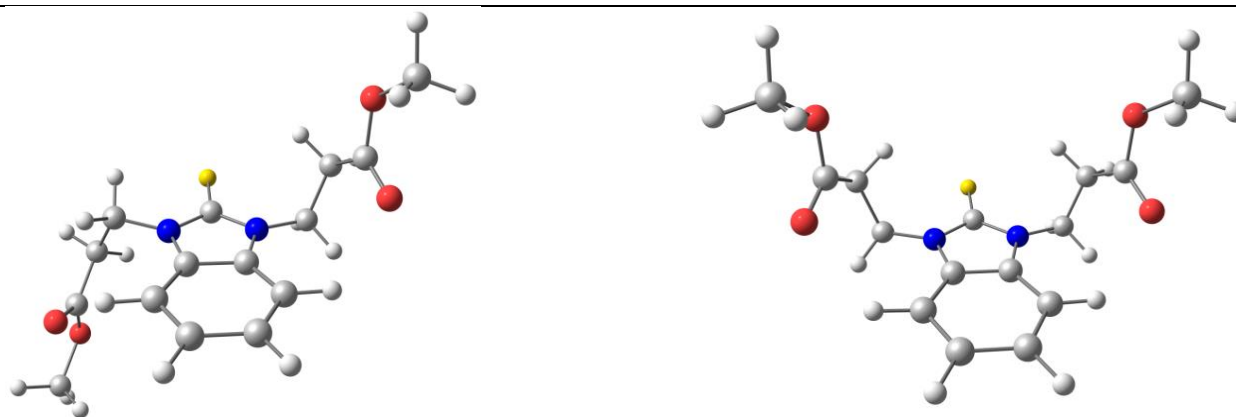
Фиг. 8. Слаби взаимодействия в кристалната структура на **10**

3.2. Молекулна структура в изолирано състояние

Рентгеноструктурният анализ показва, че 1,3-дизаместените-бензимидазол-2-тиони имат гъвкави странични вериги, които могат да заемат различни позиции в пространството. За да

се определи предпочитаната геометрия на молекулата в изолирано състояние бяха конструирани голям брой вероятни конформации и оптимизирани чрез B3LYP/6-311++G** метод, като за всяка структура са пресметнати и вибрационни честоти. Отсъствието на имагинерни честоти потвърждава, че стационарните точки отговарят на минимуми в хиперповърхнините на потенциалната енергия.

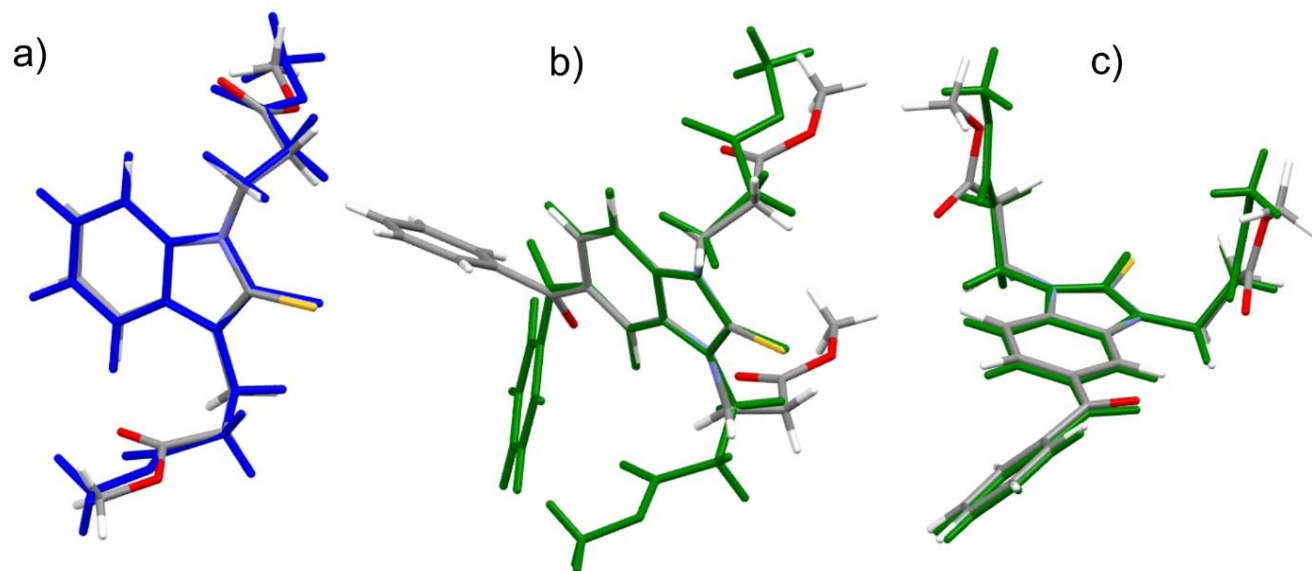
Установено е, че в изолирано състояние най-предпочитаното разположение на N-заместените алкилни вериги е това, при което те заемат наклонена конформация с карбонилните групи, насочени към бензимидазоловото ядро. За най-простия естер и за хидразид (**6** и **11**) с незаместен бензимидазолов пръстен са възможни два стереоизомера според взаимното разположение на N-алкилните вериги (Фиг. 9.).



	6 (<i>trans</i> конформация)	6 (<i>cis</i> конформация)
E_{tc}	-1391.384446 a.u.	-1391.384349 a.u.
ΔE	0.00	0.25 kJ.mol ⁻¹
μ	1.62 D	3.21 D

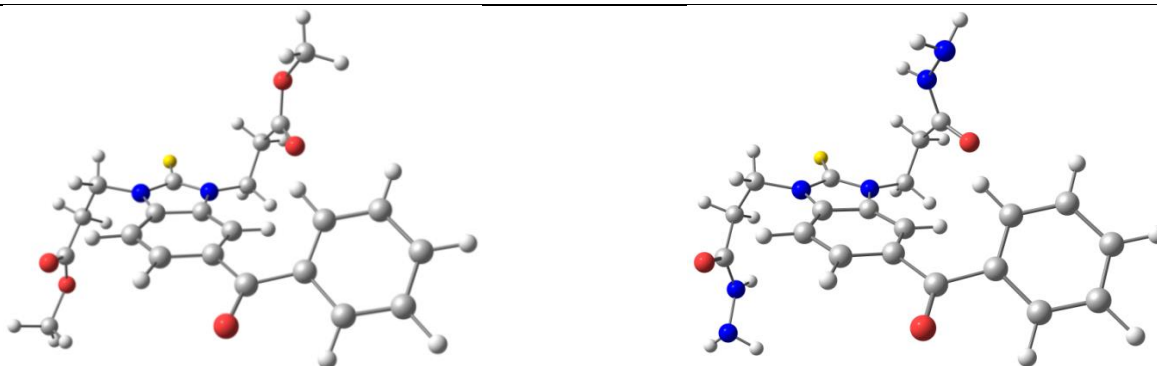
Фиг. 9. Възможни стереоизомери на **6**

Стереоизомерът с N-заместители в *trans* конформация е по-изгоден, отколкото в *cis*. Взаимното превърщане е свързано със силна промяна на диполния момент от 1.62 D за *trans* изомера до 3.21 D за *cis* изомера на съединение **6**. Предсказаната *trans* конформация на **6** в изолирано състояние е много сходна с установената в кристално състояние със средно квадратично отклонение (rmsd) 0.2427 Å.



Фиг.10. Сравняване на молекулната структурата, определена въз основа на рентгенструктурния анализ, с тази от теоретичните пресмятания: **a)** **6** и най-стабилният му конформер (в синьо) – *средно абсолютно отклонение* 0.2427 Å; **b)** **10** и енергетично най-изгодният му конформер (в зелено) и **c)** **10** и структурно най-сходният му конформер (в зелено) – *средно квадратично отклонение* 0.3731 Å

При всички останали съединения присъствието на заместител в *позиция 5* на бензимидазоловия фрагмент води до обособяване на две лица на равнината на симетрия, което е причината за четири възможни стереоизомера. В случая с бензоилните производни (естер **10** и хидразид **15**), броят на възможните стереоизомери нараства поради възможностите за въртене на бензоилната група. Установява, че *trans* конформацията е предпочетена и за двете съединения в изолирано състояние (**Фиг.26**):



Фиг. 11. Оптимизирана геометрия за най-стабилния стереоизомер на **10** (a) и **15** (b)

Ъгълът между равнините на бензимидазол-2-тионовия и бензоилния фрагмент в оптимизираните структури е съответно 50° (**10**) и 54.8° (**15**).

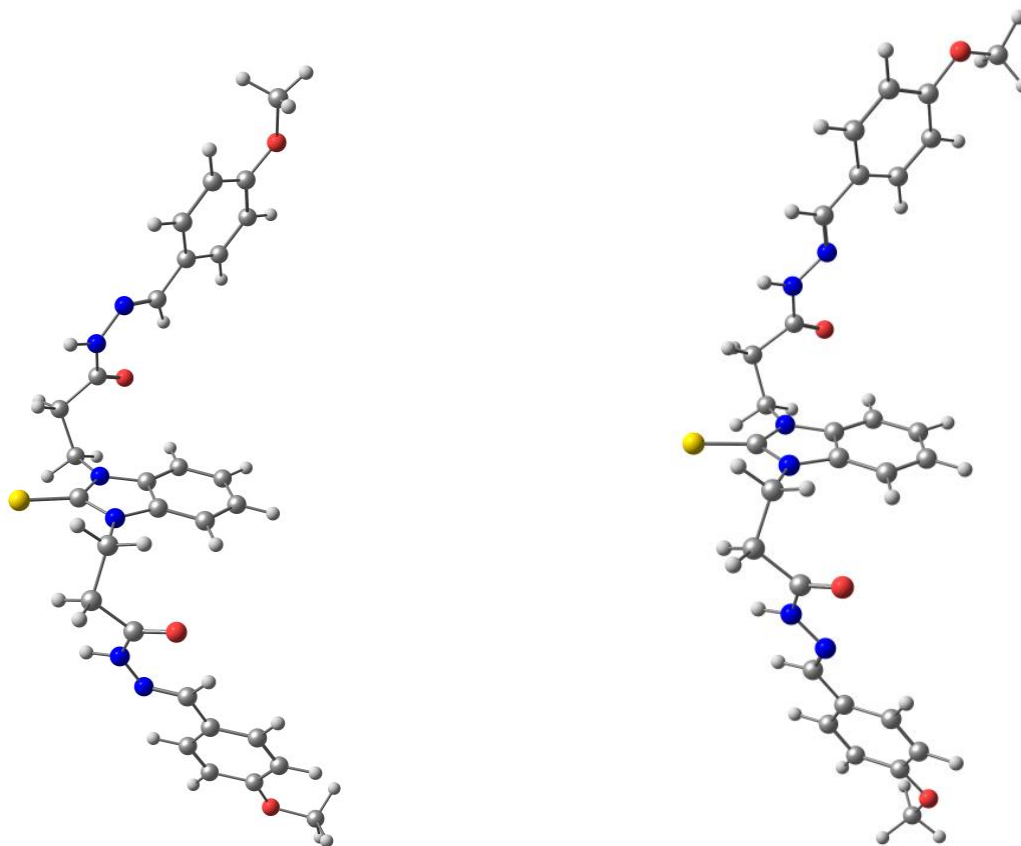
Получените резултати показват, че структурата на **10** в изолирано състояние се различава от кристалната (**Фиг. 10b**). Както е известно, подредбата в кристала се повлиява от образуването на класически и неklasически водородни връзки, $\pi \dots \pi$, $X-H \dots \pi$ взаимодействия и други междумолекулни контакти. Като се имат предвид незначителните разлики в енергията между *cis* и *trans* конформерите, ниските енергетични изисквания за ротация на бензоилната група и допълнителните фактори, влияещи на кристалната структура, не е изненадващо наличието на различни конформации в изолираното състояние и в кристала. Кристалната структура на **10** и теоретично изчислената геометрия на съответния конформер са в отлично съответствие със средно квадратичното отклонение (rmsd) 0.3731 Å (**Фиг. 10c**).

Поради големите си размери, молекулната геометрия на хидразоните е изследвана чрез метод B3LYP/6-31+G(*). И при тях образуването на вътрешномолекулни C-H...S и C-H...O водородни връзки води до стабилизиране на геометрията със сгънати N-алкилни вериги. От двете възможни сгънати конформации (*cis* и *trans*), предпочетената е *trans*. Енергетичната разлика между двете форми е 0.83 kJ/mol, което показва, че двете вериги са гъвкави и в разтвор могат да присъстват повече от една конформации.

Разгънатата конформация на N-алкилните вериг не позволява образуването на вътрешномолекулни водородни връзки и съответно двете форми са по-слабо предпочетени. И двата конформера се характеризират с по-нисък диполен момент.

Наличието на азометиновата група в страничните N-алкилни вериги обуславя възможността за образуване на вътрешномолекулна водородна връзка с участието на водородния атом от азометиновата група и кислородния атом от амидната група. Това взаимодействие също допринася за стабилизация на молекулната геометрия, както се вижда от конформерите 16S1a и 16S1b, представени на **Фиг.12**. Разликата в енергиите на двете форми е значително по-голяма - 7.80 kJ/mol.

Фиг. 12. Възможни стереоизомери на **16** като резултат от различното въртене на връзката – N-N–



	16S1a	16S1b
$E_{\text{tot}} =$	-2150.791169 a.u.	-2150.787878 a.u.
$\Delta E =$	0.0	7.80 kJ/mol
$\mu =$	3.26 D	2.06 D

3.3. Моделиране на връзката структура-активност (SAR)

Поради малките разлики между различните конформации, се предполага, че съединение **10** може лесно да се превърне в своята нискоенергетична форма в съответната течна биологична среда. При теоретичните изследвания беше използван метод UB3LYP/6-311++G**, който позволява сравнение на изчислените енталпии на реакция с тези на други известни и структурно сходни съединения, способни да улавят свободни радикали.

Тъй като структурата на изследваните бензимидазол-2-тиони частично наподобява тази на мелатонина и неговите N-заместени производни, поради присъствието на спрегнат ароматен хетероцикъл, заместен в 5-та позиция и на странични вериги с приблизително същата дължина, съдържащи естерна или амидна карбонилна група (**Схема 6**), бяха взети предвид данните, изведени от обширни предходни изследвания относно механизма на действие на мелатонин

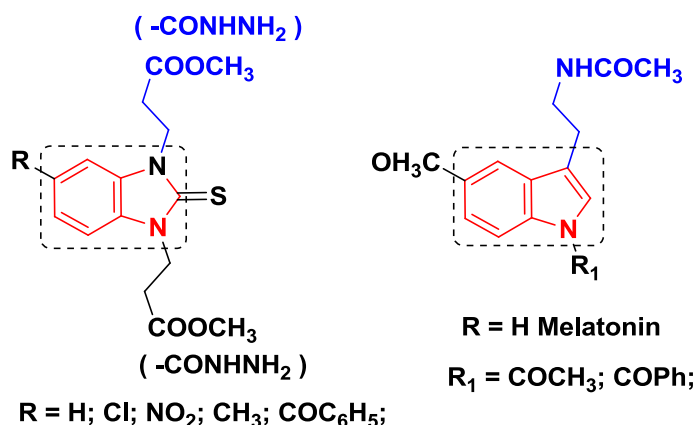


Схема 6. Химична структура на бензимидазол-2-тиони, мелатонин и неговите N-заместени производни

Главните механизми на антиоксидантно действие за мелатонина и производните му, както и на други индолни съединения (триптофан и N-метилиндол) спрямо различни свободни радикали, установени въз основата на експериментални данни, са пренос на водороден атом (HAT) и пренос на единичен електрон (SET).

Колкото по-ниска е стойността на BDE, толкова по-висок е капацитетът на антиоксиданта за обезвреждане на радикали. За коректното определяне на този капацитет чрез теоретични изчислителни методи е необходимо да се използва за сравнение липидна BDE стойност, изчислена на същия метод и базис. В настоящата работа функцията на липидните пероксидни и алкоксидни радикали се изпълнява от референтните (Z) -4-хидропероксихекс-2-ен, (Z)-4-хидрооксихекс-2-ен, метилхидропероксид и метанол в газова фаза (**Схема 7**):

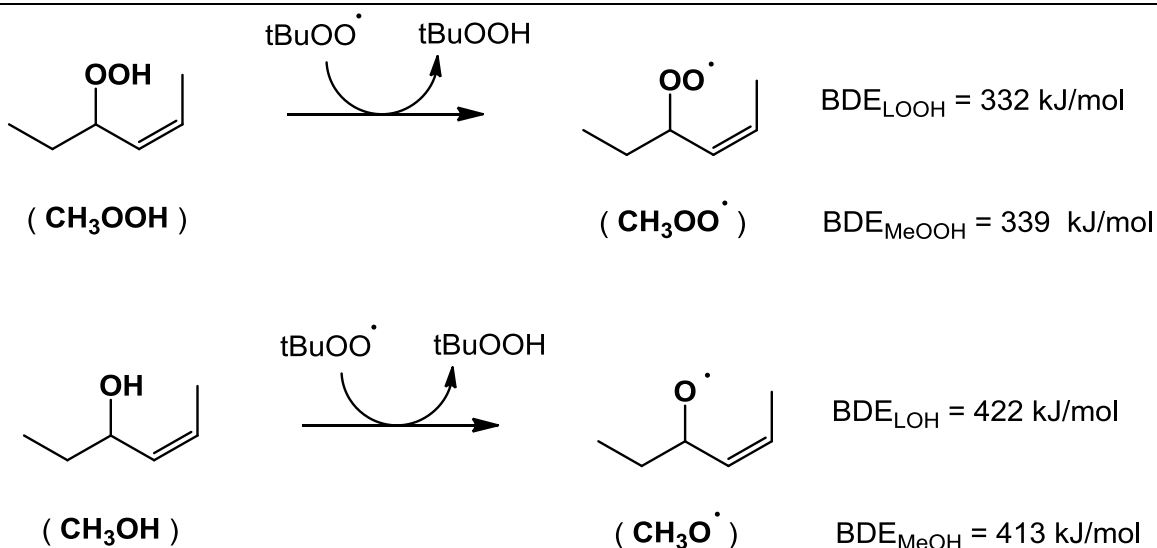
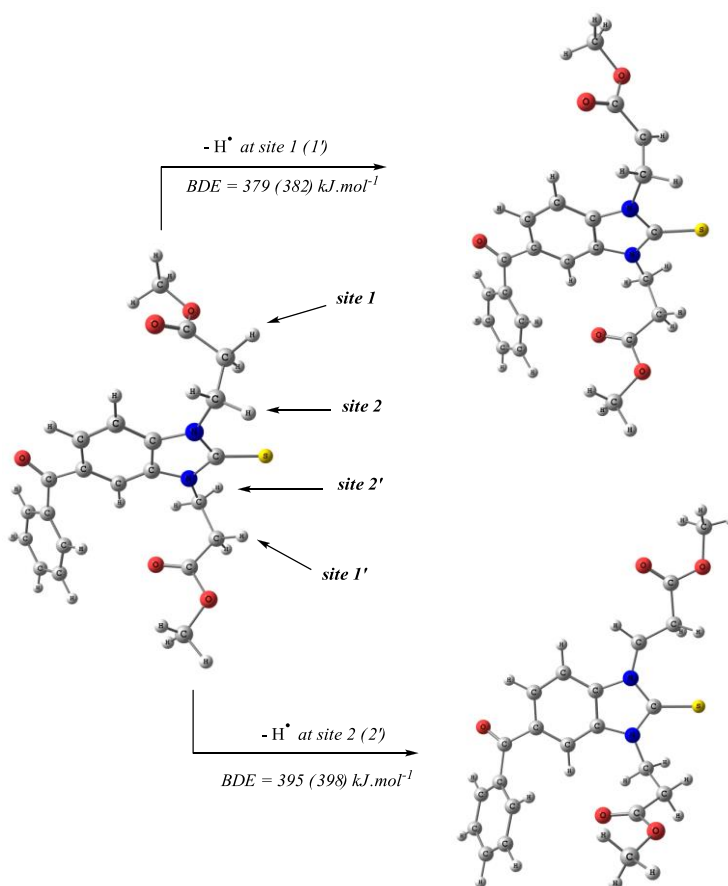


Схема 7. BDE стойности за референтни липидни радикали, изчислени чрез метода B3LYP/6-311++G**

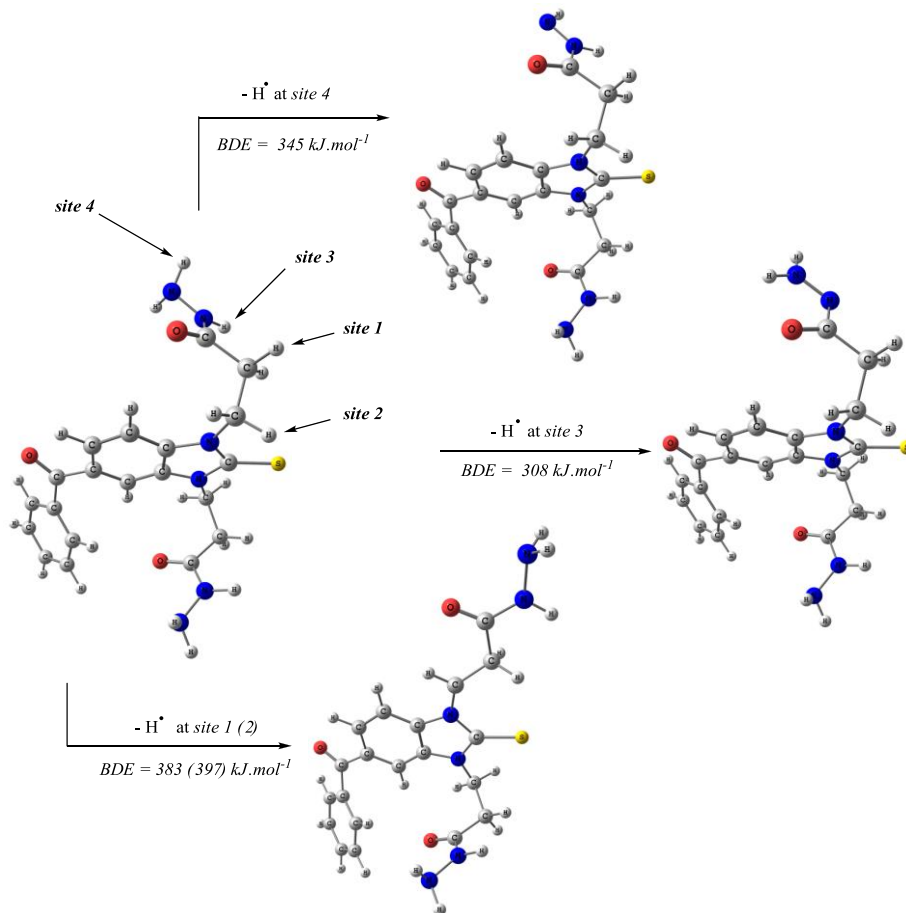
Мелатонинът може да бъде донор на водороден атом от метиленовта група до индолиловия фрагмент с BDE на връзката C-H = $319 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ и от индолиловата N-H връзка с BDE = $322 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ (изчислено при B3LYP/6-31G(d,p)). Отцепването на водороден атом от естера **10** може да се осъществи от C-H връзките на страничните вериги на бензимидазоловите N-атоми (*позиции 1, 1'*, **Фиг.13**) или C-H връзките, намиращи се до естерните карбонилни групи (*позиции 2, 2'*, **Фиг.13**). Изчислена и сравнена е BDE, отнасяща се за всяко от тези места след пълна оптимизация на молекулата на образуващите се радикали. Както може да се види от стойностите, изобразени на **Фиг.13**, липидните редикали ще атакуват с предпочитание водородния атом от C-H връзката, намираща се до карбонилната група. Очевидно съседството с карбонилната група и удължаването на C-H връзките, поради вътрешномолекулни C-H...S взаимодействия, значително улеснява отцепването.

Като се вземат предвид изчислените BDE стойности следва, че протективният ефект на бензимидазол-2-тионовите естери срещу липидната пероксидация би трябвало да се изразява в улавяне на високо реакционноспособните $\text{HO}^\bullet$, които инициират процеса на пероксидация и формирането на алкоксидните радикали $\text{LO}^\bullet$ при редукцията на липиднати пероксиди.



Фиг.13. Отцепване на водороден атом от различни позиции на **10** и съответстващите BDE стойности, изчислени чрез метода B3LYP/6-311++G** в kJ.mol^{-1}

За хидразидните производни има още две възможни позиции за отцепване на водороден атом на всяка N-алкилна верига- от амидната N-H връзка (*позиция 3*) и amino N-H връзките (*позиция 4*) (**Фиг.14**). BDE стойностите на *позиции 1* и *2* на съединение **15** са сравними с тези на **10**. Обаче, N-H връзките на **15** показват значително по-ниски BDE стойности, което го прави по-добър антиоксидант в сравнение с естера **10**, при който могат да се разкъсват само C-H връзки. Най-предпочитаното място за абстракция на водороден атом е амидната N-H връзка (*позиция 3*) с $\text{BDE} = 308 \text{ kJ.mol}^{-1}$, което е близо до BDE стойността на 4'-OH на кверцетин. Следващата най-изгодна позиция е *4* с $\text{BDE} = 345 \text{ kJ.mol}^{-1}$.



Фиг. 14. Отцепване на водороден атом от различни позиции на **15** и съответстващите BDE стойности, изчислени чрез метода B3LYP/6-311++G** в kJ.mol^{-1}

15 има способност да обезврежда липидни, пероксидни и алкоксидни радикали и директно да прекъсва процеса на липидна пероксидация, от където следва, че хидразидите на бензимидазол-2-тиона са по-ефективни антиоксиданти от естерите по НАТ механизма.

В полярна водна среда е по-вероятно да възникват йонизационни механизми на антиоксидантно действие, какъвто е SET. Колкото по-ниска е стойността на IP, толкова по-лесно е отцепването на електрон. Изследвана е възможността на съединения **10** и **15** да реагират по SET след оптимизация на молекулната геометрия на съответните катион-радикали чрез метода B3LYP/6-311++G**. В газова фаза IP стойността на **10** е 691 kJ.mol^{-1} и е сравнима с тази за кверцетин (698 kJ.mol^{-1}) спрямо същата изчислителна схема. Хидразидът **15** е с по-нисък IP – 682 kJ.mol^{-1} . Солватацията на електроните и положително заредените катион-радикали във вода понижава стойността на IP, затова IP на **10** и **15** са изчислени и

чрез отчитане на водата като разтворител чрез метода IEF-PCM B3LYP/6-311++G**. IP на естерното производно **10** във вода е съответно 329 kJ.mol^{-1} , което е по-ниско от неговата BDE (*позиция 1*) във вода – 374 kJ.mol^{-1} , както и от стойността на IP на фенола във вода – 346 kJ.mol^{-1} . Хидразидът **15** има IP във вода 328 kJ.mol^{-1} , докато BDE стойността за трансфер на водороден атом от *позиция 3* е 320 kJ.mol^{-1} . От тук следва, че SET механизмът е предпочитан за съединение **10** и конкуриращ се с HAT за **15**.

Способността на една система да бъде донор на електрони се определя също и чрез изчисляване на йонизационния потенциал на релаксация (rIP), който за съединения **10** и **15** (изчислени в газова фаза на B3LYP/6-311++G**) са 7.14 и 7.04 eV. Това предполага висок капацитет на бензимидазол-2-тионите да бъдат донори на електрони и да улавят свободни радикали по SET механизма. Става ясно, че бензимидазол-2-тионите могат лесно да отдадат електрон на липидните радикали и да образуват радикал-катиони. Когато мелатонинът отцепва електрон, той може да претърпи прегрупиране с формиране на няколко метаболита, които да улавят свободни радикали. В настоящия случай съществуват няколко пътя, за осъществяване на антиоксидантното действие (**Схема 8**).

Преносът на електрон може да бъде последван веднага от пренос на протон и да се образува циклично междинно съединение на бензимидазол-2-тиона. Последното представлява неутрален радикал способен да улавя $\text{CH}_3\text{COO}^\bullet$ и $\text{CH}_3\text{O}^\bullet$ и да инхибира липидната пероксидация. От друга страна, поради значителната локализация на електронната плътност при S-атома на радикал-катиона, друг предполагаем механизъм е свързването на липиден радикал към този атом и образуването на катионен адукт.

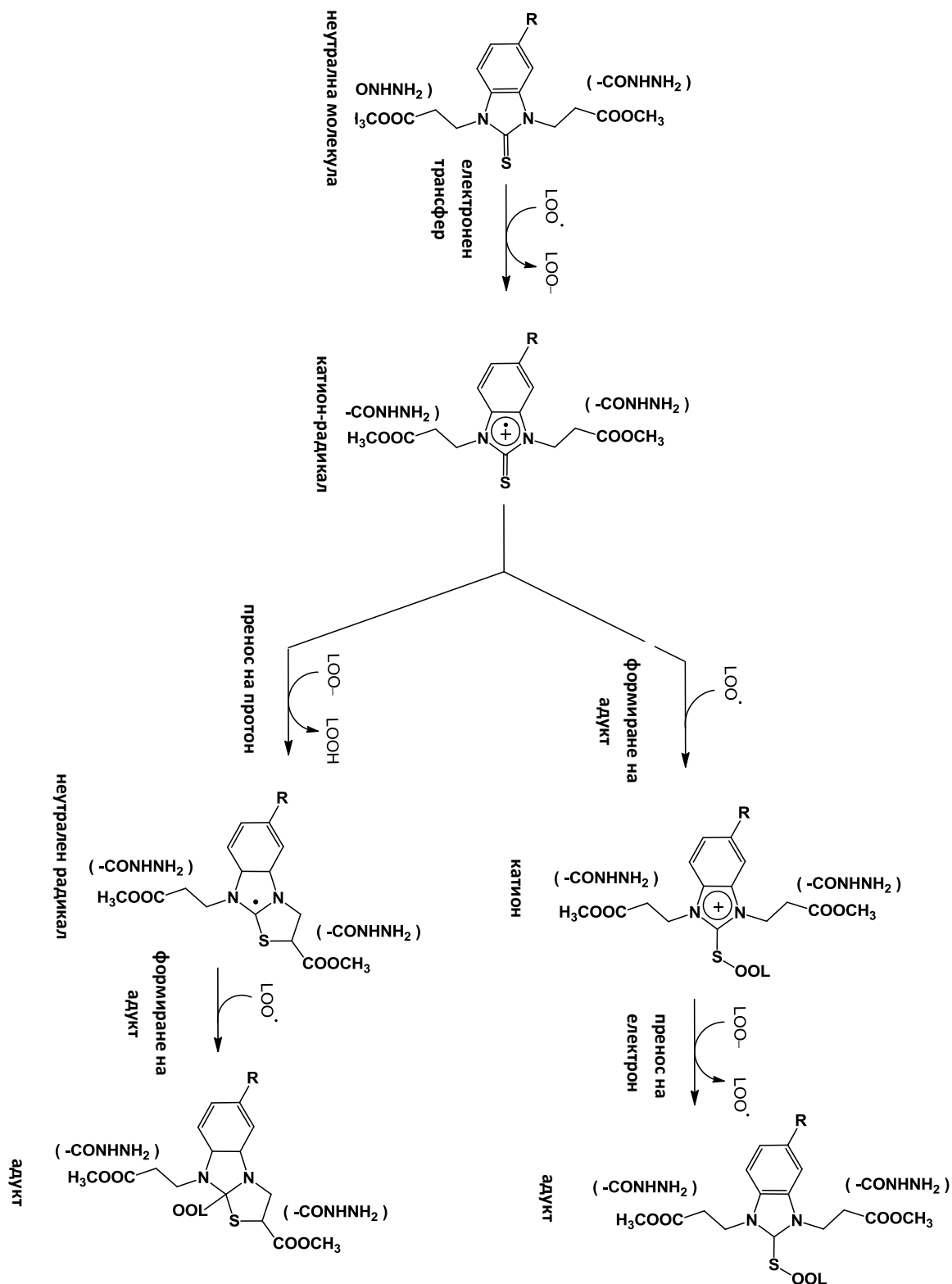
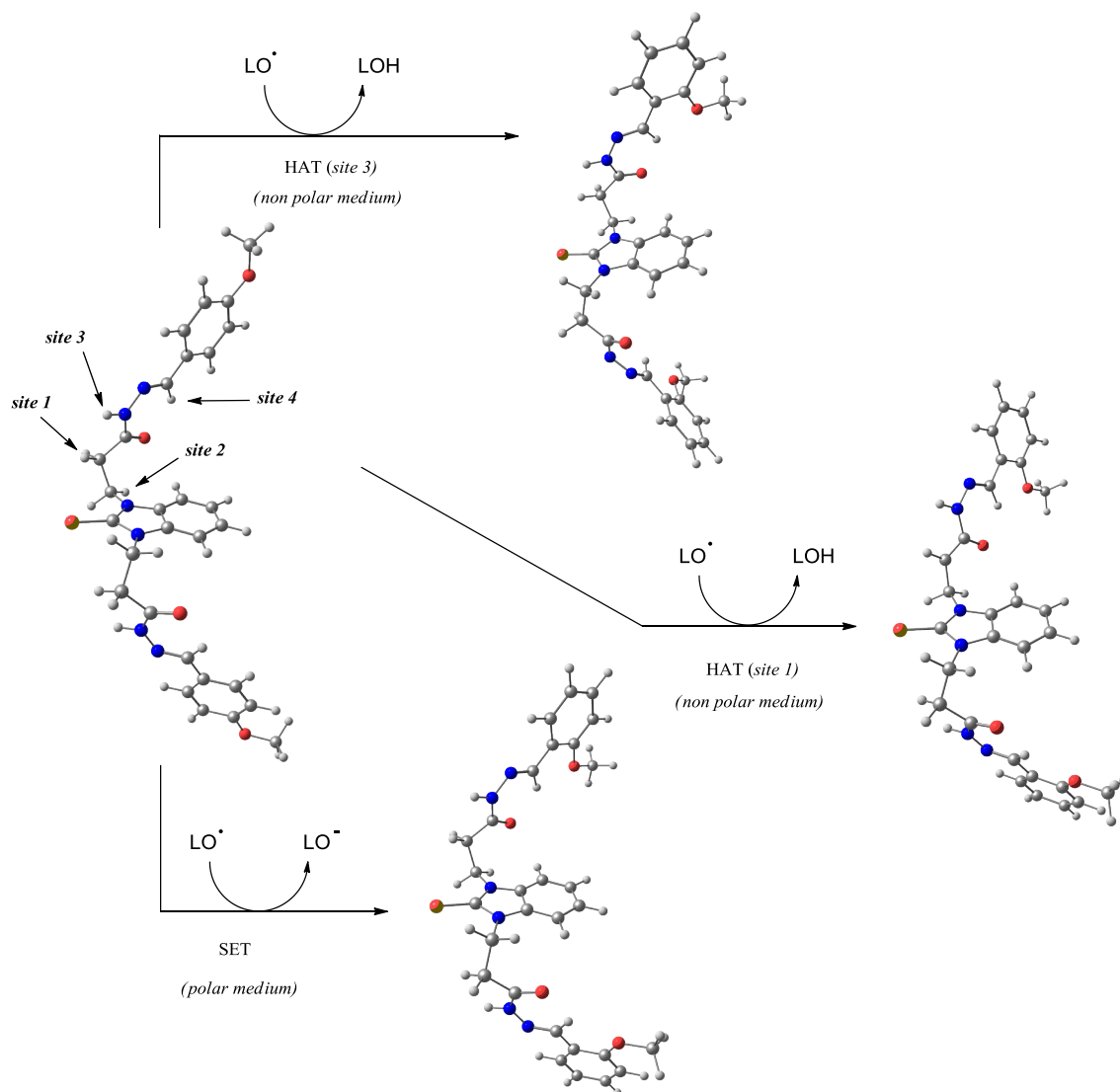


Схема 8. Хипотетичен механизъм на антокидантно действие на бензимидазол-2-тионите по SET

Описанието на капацитета на хидразоните чрез водороден (HAT) и електронен (SET) пренос е направено въз основа на енталпиите, изчислени за съединение **17**, което показва най-голяма активност при експерименталните изследвания.

Таблица 5. Енталпии за дисоциации на връзката (BDE) при различни позиции, йонизационни потенциали (IP) и йонизационни потенциали на релаксация (rIP) изчислени чрез B3LYP/6-31+G* в kJ. mol⁻¹.

Съединение	BDE		IP	rIP
	(неполярна)	(вода)	(вода)	(вода)
17	377 (<i>позиция 1</i>)		316	5.69
	398 (<i>позиция 2</i>)			
	365 (<i>позиция 3</i>)	365 (<i>позиция 3</i>)		
	409 (<i>позиция 4</i>)			
10	380 (<i>позиция 1</i>)	379 (<i>позиция 1</i>)	327	5.80
15	300 (<i>позиция 3</i>)	318 (<i>позиция 3</i>)	326	5.78
Мелатонин	346 (инд. N-H)	345 (инд. N-H)	279	5.29
MeOH	402			
LOH	406			
MeOOH	326			
LOOH	321			



Фиг. 15. Отцепване на водороден атом от *позиции* 1 и 3 на **17** и пренос на електрон по SET механизъм

Според проведените изчисления на B3LYP/6-31+G* за хидразона **17** се установи, че местата с най-ниска стойност на BDE са 1 и 3 с 377 и 365 kJ.mol⁻¹, респ, и тук, както и при хидразидните производни, амидната връзка е с най-ниска стойност на BDE. От изчислените стойности на BDE за **17**, представени в **Таблица 5** става ясно, че те ще могат да улавят алкоксидни радикали, тъй като BDE < 400 kJ.mol⁻¹. Това прави съединение **17** на второ място по активност в неполярна среда по HAT механизма след хидразидното и преди естерното производно.

Йонизационният потенциал във вода, изчислен за **17** е 316 kJ.mol^{-1} , т.е. по-нисък от BDE стойността за водороден пренос от *позиция 3*. От това следва, че механизмът SET е определено предпочитан за изява на антиоксидантна активност, което корелира и с йонизационния потенциал на релаксация, който е 5.69 eV. От представените стойности на IP се вижда, че хидразоните имат най-висок капацитет от всички изследвани съединения да бъдат донори на електрони и да улавят свободните радикали по SET механизма. Следователно хидразоните биха могли да улавят хидроксидни и алкоксидни радикали в неполярна среда и да упражняват защитно действие посредством потискане иницирането на LP.

Поради това разтворимостта на изследваните съединения в липидна и водна среда е определена чрез пресмятане на logP, обем и маса на молекулата, гъвкавост и присъствие на водороден донор и акцептори с програмата Molinspiration. Стойностите на $m\log P$ на естерите на бензимидазол-2-тиона **6-10** и хидразидите **11-15** варират между 0.27 и 2.63, като се очертават местата на вероятните биологични центрове за осъществяване на антиоксидантната активност. Липофилността на естерите **6-10** е малко по-висока и те могат да се използват срещу липидна пероксидация. Като по-хидрофилни, хидразидите **11-15**, могат да предпазват от увреждане от ROS във водна среда заедно с обичайните витамин С, липоева киселина и антиоксидантни ензими, активни във водна среда. Общо взето изчисленията TPSA, молекулно тегло, броят свободно въртящи се връзки и броят донори и акцептори на водородни връзки показват, че съединенията имат добра разтворимост и способност да навлизат в клетките. Като вземем предвид и ниската им хепатотоксичност, може да се заключи, че те притежават благоприятни свойства и висок потенциал да намерят приложение като хепатопротектори. Хидразоните притежават по-висока липофилност, в сравнение с естерите и хидразидите, което определя по-високия им афинитет към липидните мембрани. В случая това отлично би обслужвало функцията им на цитопротектори от липидна пероксидация.

4. Генериране на радикал-анион

Важно е при изследването на нови кандидати за лекарствени средства да се охарактеризира редукционният потенциал на нитроароматните съединения, тъй като е възможно да образуват

реактивни нитро анион-радикали. Беше избран естерът **8**, за да се изследва за възможността за образуване на анион-радикал като вероятна причина за проявената хепатотоксичност.¹⁴⁸

Първата стъпка в механизма е редукцията на нитро групата до съответния нитро анион-радикал.

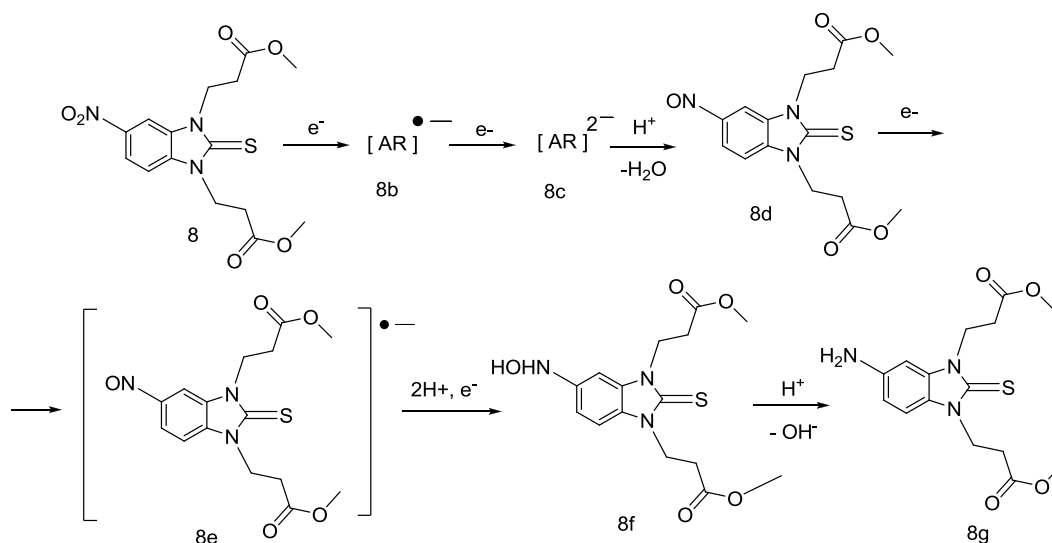
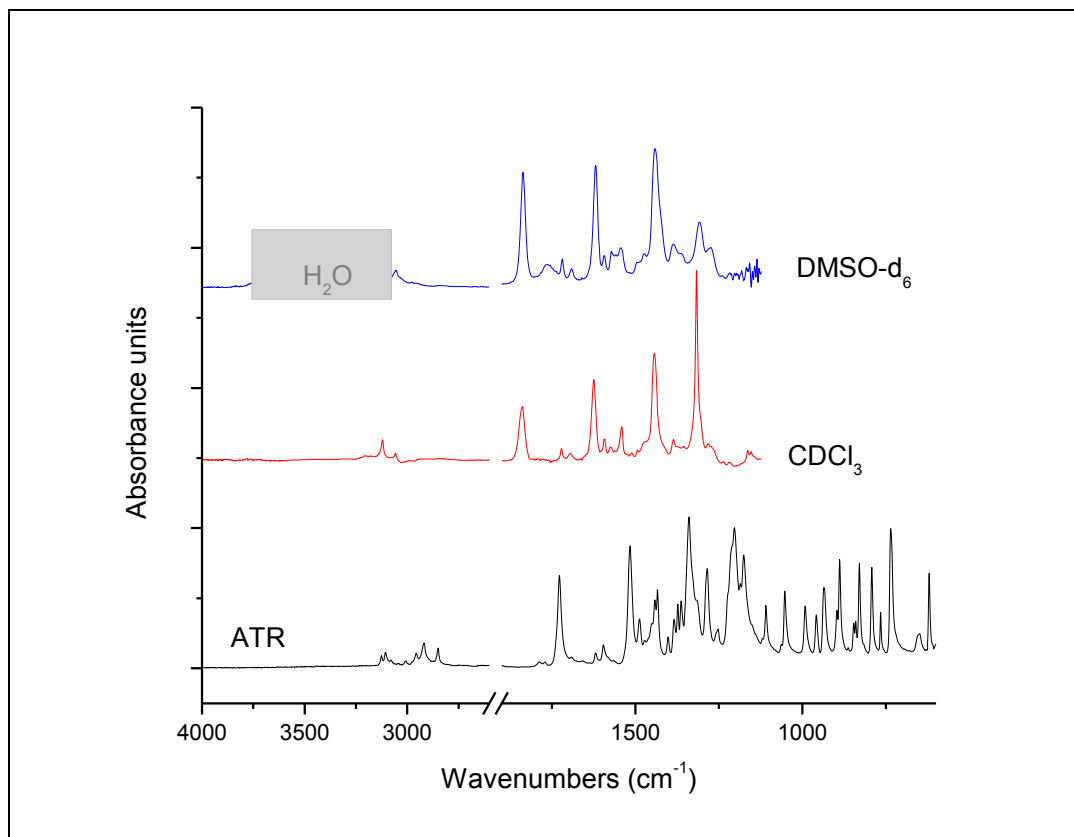


Схема 9. Хипотетични продукти на редукцията на 3,3'-(5-нитро-2-тиоксо-1H-бензо[d]имидазоле-1,3(2H)-диил)дипропаноат **8**

Беше избран подход, при който редукцията се извършва в специална електрохимична кювета и промените се проследяват чрез ИЧ спектроскопия. Изследването на структурните и спектралните промени, произтичащи от превръщането на неутралната молекула в анион-радикал са подкрепени от DFT изчисления чрез IEFPCM-B3LYP/6-311++G**. Предпочетената геометрия на **8** е установена на базата на оптимизация и анализ на енергиите на най-вероятните конформери. Теоретичното характеризиране на структурата и ИЧ спектрите на анион-радикала **8b** е извършено при използване на *trans* конформацията.

4.1. ИЧ спектрални характеристики на неутралната молекула **8**

За надеждно проследяване на промените, настъпващи при електрохимичната редукция на **8**, е необходимо предварително да бъдат изследвани вибрационните спектри на изходното неутрално съединение и наблюдаваните ИЧ честоти да бъдат отнесени към съответните молекулни трептения. За тази цел са измерени ИЧ спектрите на **8** в твърдо състояние и разтвори на CDCl₃ и DMSO-d₆ (Фиг.16).



Фиг 16. Експериментални ИЧ спектри на неутралното съединение **8** в твърдо състояние (с отражателна ATR техника; в черно), в разтвор на CDCl_3 (в червено) и DMSO-d_6 (в синьо) Избрани експериментални и теоретично изчислени вибрационни честоти са представени в **Таблица 8**.

Таблица 8. Теоретично изчислени (чрез метода IEFPCM-3LYP/6-311++G** с DMSO като разтворител) и експериментални (в разтвор на DMSO-d_6) честоти на неутралното съединение **8** и анион-радикала **8b** в cm^{-1}

Неутрално съединение 8		Анион-радикал 8b		Приблизително отнасяне ^b
ν_{calc}^a	ν_{exp}	ν_{calc}^a	ν_{exp}	
1715	1735	1713	1735	$\nu(\text{C=O})$
1609	1618	1599	1618	$\nu^{\text{Bz}}(\text{C=C})$

1608	1591	1571	1591	$\nu^{\text{Bz}}(\text{C}=\text{C})$
1503	1519	1221	1286	$\nu^{\text{as}}(\text{NO}_2)$
1299	1341	1063	не е изм. ^c	$\nu^{\text{s}}(\text{NO}_2)$
1079	не е изм. ^c	1302	1316	$\nu(\text{C}-\text{NO}_2)$

^a Скалирани със скалиращо уравнение $\nu^{\text{sc}} = 0.97327\nu^{\text{native}} + 11.8$; ^b Вибрационни трептения: ν , валентни; δ , деформационни; τ , торзионни; Bz, бензимидазолов фрагмент; ^c Ивици под 1100 cm^{-1} не са отчетени, поради припокриване с абсорбцията на кюветата от CaF_2

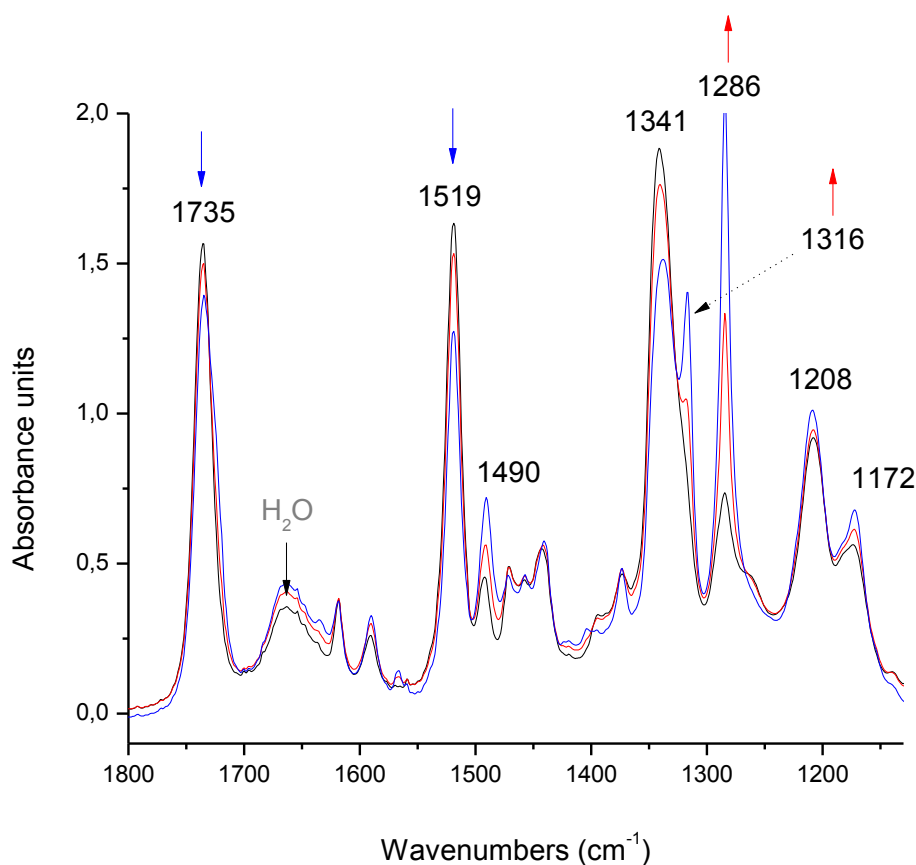
Най-силните ивици в спектъра, измерен в разтвор на DMSO-d_6 , отговарят за асиметричното и симетричното трептение на нитро групата при 1519 и 1341 cm^{-1} . Валентните трептения на двете карбонилни групи обуславят появата на една силна ивица при 1735 cm^{-1} . Според изчисленията, за честотата на валентното трептение на връзката $\text{C}-\text{NO}_2$ следва да се появи средноинтензивна ивица около 1100 cm^{-1} . В настоящия случай към $\nu(\text{C}-\text{NO}_2)$ беше отнесена средно интензивната ивица при 1109 cm^{-1} в ИЧ спектъра в твърдо състояние. Позицията на ивицата, отговаряща за валентното трептение на тиокарбонилната група, може да варира в широки граници. Честотата на $\nu(\text{C}=\text{S})$ е силно чувствителна към наличието и характера на заместителите в бензимидазоловия пръстен. N-атомите. Според теоретичния спектър на съединение **8** в DMSO , трептението е силно смесено с тези на съседните атомни групи и ивицата се очаква при 1196 cm^{-1} със среден интензитет. В спектъра на **8** в DMSO-d_6 ивицата се намира при 1185 cm^{-1} , силно припокрита със съседните интензивни ивици при 1208 и 1172 cm^{-1} .

Ивицата при 1208 cm^{-1} съответства на валентното трептение на $\text{C}-\text{N}$ връзките в бензимидазоловия цикъл, а тази при 1172 cm^{-1} – на валентното трептение на естерните $\text{C}-\text{O}$ връзки. (Таблица 9 в Приложението).

6.2. Електрохимична редукция на **8**

Електрохимичната редукция се провежда *in situ* в ИЧ кюветата при концентрация на разтвор на изходното вещество 0.1 mol.l^{-1} в DMSO-d_6 и в присъствие на тетрабутиламониев бромид като електролитна сол. Началният разтвор на неутралното вещество е жълт като

самото съединение в твърдо състояние. При прилагане на електричен ток, разтворът в катодното пространство започва да променя цвета си към зелено, което се засилва с времето. Интензитета на ивиците за валентните трептения на нитро групата на неутралното съединение започват постепенно да намаляват. В същото време се появяват нови ивици в ИЧ спектъра при 1316 и 1286 (Фиг. 17)



Фиг 17. ИЧ спектри, измерени в хода на електрохимичната редукция на **8** в разтвор на DMSO-d₆ (0.1 mol.l⁻¹): след 30 (в черно), 60 (в червено) и 100 min (в синьо)

По-продължителната електролиза (100 min) води до значително увеличаване на новите линии, придружено със спад на ивиците за нитро групата на неутралното съединение. Обръщането на поляритета на електролизната клетка води до появяване отново на жълт цвят и изчезване на ИЧ ивиците на новия продукт. Този факт недвусмислено демонстрира това, че наблюдаваните спектрални промени се дължат на редукцията на **8** до анион-радикал, а не на други химични трансформация, водещи до различни продукти. За да се потвърди това заключение, честотите на ивиците, появяващи се по време на

електрохимичната редукция, бяха сравнени с теоретично предсказаните честоти за анион-радикала на **8** (Таблица 9 в Приложението). Сравняването на експерименталните честоти с теоретично изчислените прави възможно също така надеждното отнасяне на наблюдаваните ивици към молекулните трептения на анион-радикала. Това би било значително по-трудно въз основа само на експериментални данни, тъй като в литературата като цяло са оскъдни ИЧ изследвания на силно реакционноспособните и нетрайни нитро анион-радикали.

От Таблица 8 се вижда, че превръщането на молекулата в анион-радикал се очаква да води до силно понижение на честотата за $\nu_{\text{as}}(\text{NO}_2)$ – от 1503 cm^{-1} в изходното неутрално съединение до 1221 cm^{-1} в анион-радикала. Действително в резултат на редукцията се наблюдава появата на силно интензивна ивица при 1286 cm^{-1} , която следва да се отнесе към това трептение. Така експериментално измереното понижение на $\nu_{\text{as}}(\text{NO}_2)$ е 233 cm^{-1} и е в добро съответствие с теоретично изчислената стойност – 282 cm^{-1} . Както се предполага въз основа на теоретичния спектър на **8b**, ивицата отговаряща за симетричното валентно трептение на нитро групата силно се отстранява към ниските честоти (повече от 241 cm^{-1}) и не се наблюдава, тъй като попада в областта под 1100 cm^{-1} . Теоретично предсказаното понижение на $\nu_{\text{s}}(\text{NO}_2)$ е 236 cm^{-1} .

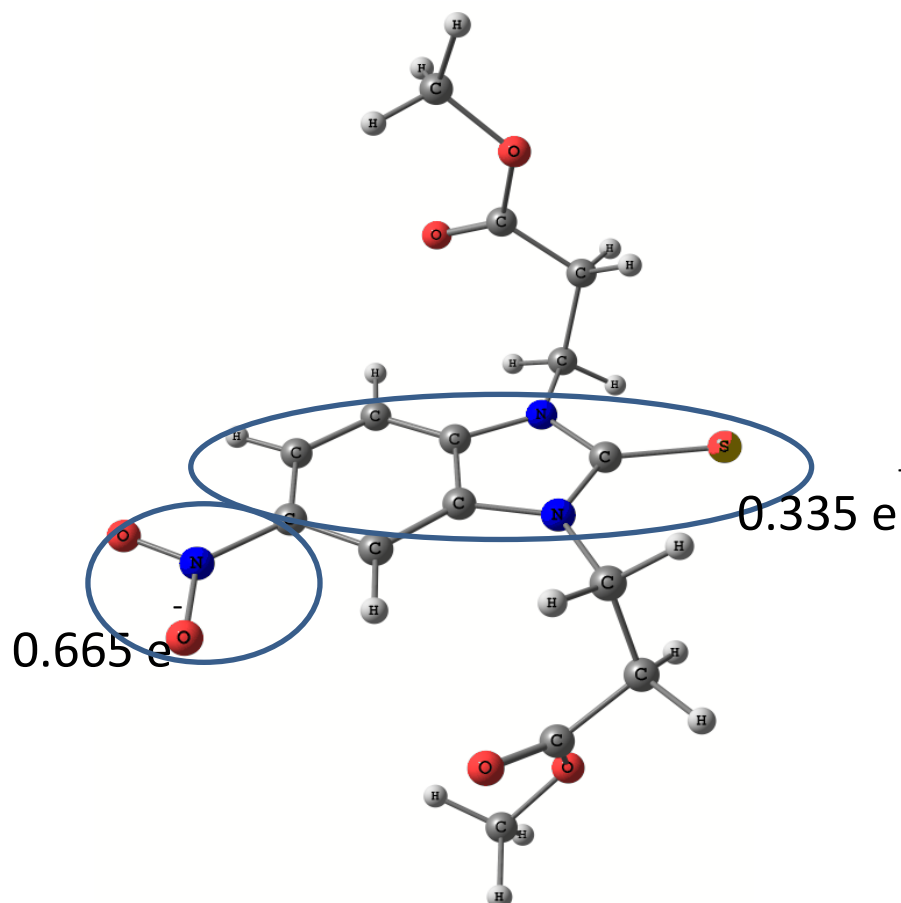
Превръщането на молекулата в анион-радикал се очаква да доведе и до повишаване на честотата на ивицата за $\nu(\text{C-NO}_2)$ с 223 cm^{-1} . Въз основа на теоретичния спектър на **8b**, тя се очаква при 1302 cm^{-1} . Това показва, че експериментално наблюдаваната ивица при 1316 cm^{-1} съответства на валентното трептение на връзката C-NO₂.

Карбонилните трептения практически не променят честотата си в спектъра на анион-радикала, а тези за валентните трептения на бензимидазоловия пръстен запазват честотите си, но увеличават интензивностите си (Таблица 9 от Приложението). Тези теоретично предсказани промени също са в добро съответствие. От Таблица 8 се вижда, че превръщането на молекулата в анион-радикал се очаква да води до силно понижение на честотата за $\nu_{\text{as}}(\text{NO}_2)$ – от 1503 cm^{-1} в изходното неутрално съединение до 1221 cm^{-1} в анион-радикала със спектъра, наблюдаван при електрохимичната редукция на **8**.

Намереното много добро съответствие (18.5 cm^{-1} средно абсолютно отклонение) между експериментално наблюдаваните честоти и теоретично изчислените за анион-радикала **8b**

потвърждава, че посредством електрохимична редукция успешно бе получен анион-радикала на **8**. Спектралните промени при превръщането на молекулата в радикал-анион дават информация и за съпътстващите структурни промени. Повишението на честотата на връзката C-NO₂ е свидетелство за нейното скъсяване и увеличение на порядъка ѝ. Обратното се наблюдава за връзките N-O – те се удължават и техният порядък намалява. Тези изводи се потвърждават и от теоретично изчислените дължини на връзките в анион-радикала **8b**. Най-общо може да се заключи, че структурните промени са най-големи в планарната част на молекулата. **8b** се характеризира с по-обширна и по-силно спрегната електронна система отколкото неутрално съединение **8** и образуването на хиноидно-подобна структура. Спектралните и структурните промени като тенденция са сходни на тези, наблюдавани при нитробензен.

Важна структурна характеристика на анион-радикала е степента на делокализация на несдвоения електрон по спрегната система. От предходни изследвания е известно, че при превръщането на ароматни съединения в анион-радикали, колкото по-висока е степента на локализация на несдвоения електрон (спиновата плътност) върху определена функционална група, толкова по-голямо е честотното понижение за валентните ѝ трептения. Като се има предвид значителното понижение на вибрационните честоти за нитрогрупата наблюдавано при редукцията на **8**, може да се предполага, че несдвоеният електрон е локализиран в значителна степен върху нитро групата. За по-точно изясняване на тази важна характеристика, беше проведен теоретичен анализ на спиновата плътност в **8b**.



IEFPCM-B3LYP/6-311++G**

Фиг. 18. Разпределение на спиновата плътност по фрагменти в анион-радикала **8b**

Теоретичният анализ показва, че 66 % от несдвоенният електрон са локализирани върху нитро групата, докато 33 % са разпределени върху бензимидазоловия фрагмент. Това доближава **8b** по електронна структура до анион-радикала на нитробензена, за който е известно сходно разпределение на спиновата плътност между нитро групата и спрегнатата система.¹⁵⁷ Наличието на друга електронакцепторна група в спрегнатата система води до намаляване на спиновата плътност върху нитро групата.

V. Изводи

1. Синтезирани са общо 45 съединения, 39 от които са нови, неописани в литературата, синтезирани по нов метод, използващ реакцията на Михаел и представляват N,N'-дизаместени бензимидазол-2-тиони, които са от интерес за фармацевтичната химия като потенциални хепатопротектори.
2. Новополучените съединения са изолирани и охарактеризирани спектрално и структурно чрез използване на разнообразни съвременни спектрални методи, сред които ИЧ спектроскопия, ^1H -ЯМР, ^{13}C -ЯМР, а на част от съединенията бяха снети и 2D хомоядрени (COSY), 2D хетероядрени (HSQC) корелации, както и DEPT-135.
3. Проведено е пилотно проучване на съединенията върху изолирани хепатоцити на плъх с цел подбор на аналози с минимален нхибиращ ефект за провеждане на тестове за хепатопротекция. В групите на естерите и хидразидите, най-ниска хепатотоксичност проявяват съединенията с бензоилен заместител в 5-та позиция на бензимидазоловия пръстен. В групите на хидразоните се намират най-нетоксичните съединения – незаместените в 5-та позиция, съдържащи *o*-, *m*- или *p*-метоксиалдехиден остатък.
4. Девет от най-малко токсичните съединения бяха изследвани като хепатопротективни средства в условията на индуциран с терт-бутилхидропероксид оксидативен стрес при култивирани хепатоцити, като всички демонстрираха значителни антиоксидантни и цитопротективни свойства. Като най-ефикасно се отличи съединение **17**, което в комбинация с ниската му собствена хепатотоксичност и висока липофилност е обещаваща предпоставка за по-нататъшно разработване на сходни съединения с потенциално приложение като инхибитори на оксидативния стрес при чернодробни заболявания.
5. С цел определяне на структурата и нейното влияние върху биологичните свойства бяха използвани DFT изчисления и монокристална рентгенова дифракция.
6. Определени са възможните конформери и механизмите на антиоксидантно действие в полярна и неполярна среда на базата на изчислените енталпии на отцепване на водороден атом (HAT) и йонизационния потенциал при пренос на единичен електрон (SET). Беше

7. установено, че хидразоните имат най-висок капацитет от изследваните съединения да бъдат донори на електрони и да улавят свободните радикали по SET механизма.
8. С цел изследване причината за токсичността на нитро съединенията е генериран анион-радикал на **8** в електрохимична клетка. Настъпващата промяна е описана въз основа на ИЧ спектралните характеристики и теоретично пресметнатата геометрия.

VI. Приноси

От резултатите, получени в настоящия дисертационен труд, могат да се констатират следните приноси от научен и научно-приложен характер:

1. Създаден е метод за синтез на 1,3-дизаместени бензимидазол-2-тиони чрез провеждане на N,N'-присъединяване по *aza*-Michael.
2. Разработени са подходящи реакционни методи за синтез, изолиране и пречистване на всяка една от новосъздадените структури.
3. Получени са перспективни биологично активни съединения, проявяващи висока антиоксидантна и хепатопротективна активност.
4. Установената биологична активност ни дава основание да разглеждаме бензоилните и незаместените в 5-та позиция на ароматното ядро производни на N,N'-дизаместените бензимидазол-2-тиони като перспективни водещи структури за лекарствен дизайн на съединения с хепатопротективен ефект по механизмите на антиоксидантно действие и инхибиране на липидната пероксидация.

Списък с участия:

Май 2013, ХТМУ X Постерна сесия, Постер: Design and Synthesis of New 2-substituted-1H-benzimidazoles Transition Metal Complexes and Their Cytotoxicity, София, България

Юли 2013, Участие в Международно лятно училище по инструментален анализ - UV-VIS Application, Center of Applied Spectroscopy, Faculty of Technology and Metallurgy, Ss. Cyril and Methodius University in Скопие, Македония

Юли 2013, Международно лятно училище по инструментален анализ – FTIR Application, Center of Applied Spectroscopy, ИОХЦФ, БАН, София, България

Септември 2013, Alumni meeting, Доклад: Synthesis of New 2-substituted-1H-benzimidazoles Metal Complexes and Their Cytotoxicity, Нови Сад, Сърбия

Май 2014, ХТМУ XI Постерна сесия, Постер: Design and Synthesis of Novel 1,3,5-substituted-1H-benzimidazole-2-thiones, Cytotoxicity and Antioxidant Activity, София, България

Май 2015 ХТМУ XII Постерна сесия, Постер: Antibacterial and Antioxidant Activity of Some 1,3-disubstituted-2-iminobenzimidazoles, София, България

Септември 2015, Slovenian Chemical Days, Постер: Neda Anastassova, Denitsa Yancheva, Simeon Stoyanov, Anelia Ts. Mavrova, FTIR and DFT Study of the Radical Anion of Dimethyl 3,3'-(5-nitro-2-thioxo-1H-benzo[d]imidazole-1,3(2H)-diyl)dipropionate, Любляна, Словения

Май 2016 ХТМУ XII Постерна сесия, Постер: Synthesis, hepatotoxicity and antioxidant activity of novel 1,3-disubstituted benzimidazole-2-thiones, София, България

Списък с публикации:

I. Mavrova A.Ts., Yancheva D., Anastassova N., Anichina K., Zvezdanovic J., Djordjevic

A., Markovic D., Smelcerovic A., Synthesis, electronic properties, antioxidant and antibacterial activity of some new benzimidazoles, *Bioorg Med Chem* 23 (2015) 6317-6326.

Забелязани цитати:

1. Arshad, T., Khan, K.M., Rasool, N., Salar, U., Hussain, S., Tahir, T., Ashraf, M. Wadood, A. Riaz, M. Perveen, S., Taha, M., Ismail, N.H. Syntheses, in vitro evaluation and molecular docking studies of 5-bromo- 2-aryl benzimidazoles as α -glucosidase inhibitors, *Med Chem Res* 25 (2016) 2058-2069.

2. Yan, Y.-M., Gao, Y., Ding, M.-W. ;New efficient synthesis of multisubstituted benzimidazoles and quinoxalin-2(1H)- ones by a Ugi 4CC/aza-Wittig sequence starting from aromatic amine precursors; *Tetrahedron* 7 (2016) 5548-5557.

3. El-Deen, E.M.M.; Synthesis and in vitro anti-breast cancer evaluation of some novel benzimidazole –pyridine conjugates, *Int J Pharm Tech* 8 (2016) 10240-10258.
4. Yan, Y.-M., Rao, Y., Ding, M.-W.; One-pot synthesis of multisubstituted benzimidazoles via sequential Ugi and catalytic aza-wittig reaction starting from 2-aminobenzoyl azides ; *J Org Chem* 81 (2016) 1263-1268.
5. Ajani, O.O, Aderohunmu, D.V., Olorunshola, S.J., Ikpo, C.O., Olanrewaju, I.O.; Facile synthesis, characterization and antimicrobial activity of 2-alkanamino benzimidazole derivatives ; *Oriental J Chem* 32 (2016) 109-120.
6. Kovvuri, J., Nagaraju, B., Kamal, A., Srivastava, A.K.; An Efficient Synthesis of 2-Substituted Benzimidazoles via Photocatalytic Condensation of o-Phenylenediamines and Aldehydes, *ACS Comb Science* 10 (2016) 644-650.
- II. Anastassova, N., Mavrova A., Yancheva D., Kondeva-Burdina, M., Tzankova, V, Stoyanov, S., Shivachev, B., Nikolova, R., Hepatotoxicity and antioxidant activity of some new N,N'-disubstituted benzimidazole-2- thiones, radical scavenging mechanism and structure-activity relationship, *Arab J Chem*, (2017),

<http://dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2016.12.003>

.