

**ОТЧЕТ ПО ПРОЕКТ ЗА НАУЧНО И КАРИЕРНО РАЗВИТИЕ**  
**НАЦИОНАЛНА ПРОГРАМА „МЛАДИ УЧЕНИ И ПОСТДОКТОРАНТИ“ II ЕТАП**

**Тема: Синтез и изследване на 2-иминобензимидазоли и тиазолобензимидазолонови производни с антиоксидантно действие като потенциални антинеопластични средства**

**Участник:** гл. ас. д-р Неда Анастасова

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

София, Февруари, 2021 г.

**Въведение (включва анотация на представения проект, цели, работна програма, предвидени дейности - до 2 стр.)**

Високата концентрация на активни форми на кислорода (ROS) нарушава съществуващото хомеостатично равновесие в клетките и води до **оксидативен стрес**, който инициира липидна пероксидация и образуване на съединения с **мутагенни и канцерогенни свойства**. Прилагането на антиоксиданти е водеща стратегия за превенция и лечение на заболявания, свързани с процесите на оксидативен стрес. От друга страна, антитубулиновите лекарства са показали значителни ползи за онкоболните. **Мултифункционални лекарства**, които едновременно атакуват различни сигнални пътища на раковите клетки биха имали по-висока ефективност. Понастоящем преимуществено се използва нов подход за лекарствен дизайн, комбиниращ два или повече различни активни фрагменти в една молекула. При тази стратегия, всяка част на лиганда е проектирана така, че да се свързва самостоятелно с две различни биологични мишени. Разработването на хитови архитектури с многостранно проявяваща се фармакологична активност, чиято мишена са само бързо и неконтролно делящите се клетки и които същевременно проявяват антиоксидантни свойства би предпазило тъканите от развитие на мутационни процеси в местата на хронично възпаление представлява изключителен интерес. Молекулни фрагменти като бензимидазоловия и индоловия хетероцикли, както и хидразонова група участват в структурата на редица съединения, притежаващи антитуморна и антиоксидантна активност. Следователно тяхното съчетание би могло да доведе до потенциални мулти-таргет лекарства с по-висока активност. Изясняването на механизмите на действие е съществено за по-доброто разбиране на проявените терапевтични ефекти на молекулно ниво и установяването на връзката структура-активност.

Освен това фактът, че туморите се характеризират с хипоксични условия, предоставя добра възможност за насочена терапия чрез разработване на предлекарства (prodrugs), които да се метаболизират в цитотоксични съединения само в хипоксидните клетки. Нитробензимидазоловите производни притежават обещаващ потенциал за разработване на търпящи биоредукция противоракови лекарствени средства. Това ни мотивира да получим серия нитробензимидазолови производни с потенциално приложение в противораковата терапия и да изследваме молекулната им структура, превръщането им в йонни и радикал анионни продукти с експериментални спектроскопски и квантово-химични методи.

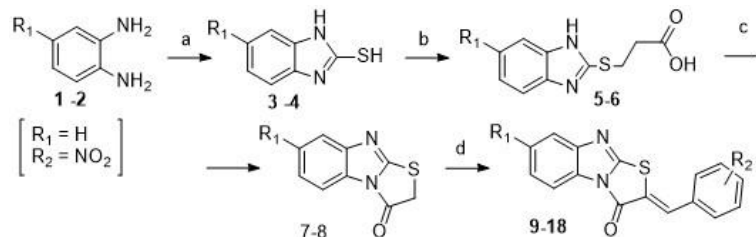
Може да се обобщи, че проектът беше насочен към синтез на незаместени и нитрозаместени производни на бензимидазолтиазолона, както и серия от няколко индолови производни, съдържащи хидразонови фрагменти като потенциални биологично активни съединения и тяхното охарактеризиране с електрохимични, спектрални, както и квантово-химични методи. За осъществяване на проекта бяха формулирани следните **цели и задачи**:

1. Синтез на серия нитрозаместени и незаместени бензимидазолтиазолонови производни
2. Синтез на серия индолови производни, съдържащи хидразонови фрагменти.
3. Охарактеризиране на структурата на новите съединения с ИЧ и ЯМР-спектроскопия
4. Електрохимично генериране на анион радикал *in situ* на нитро производните в специална ИЧ кювета и спектроскопско изследване на продуктите от редукцията.

5. Квантово-химични изчисления за установяване на молекулната геометрия и най-вероятните механизми на радикал-улавяне.

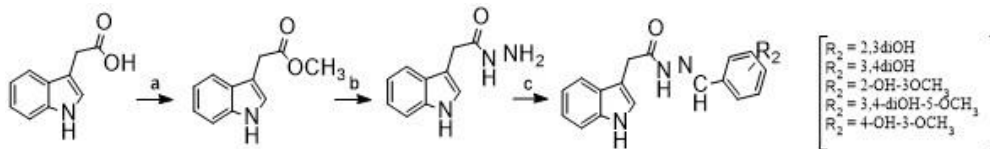
#### Работна програма и предвидени дейности:

##### 1. Синтез на серия нитрозаместени и незаместени бензимидазолтиазолонови производни.



**Схема 1.** Синтез на тиазолобензимидазолони. Реагенти и условия на реакция: а) EtOH, KOH, CS<sub>2</sub>, кипене; б) хлороцетна к-на, EtOH, кипене; с) оцетен анхидрид, сух пиридин, кипене д) пиперидин, хидроксиди и метокси заместени бензалдехида, абс EtOH

##### 2. Синтез на серия индолови производни, съдържащи хидразонови фрагменти.



**Схема 2.** Синтез на индолови хидразони. Реагенти и условия на реакция: а) тионил хлорид, метанол; б) хидразин хидрат, EtOH, кипене; с) хидроксиди и метокси заместени бензалдехида, абс EtOH

##### 3. Охарактеризиране на структурата на новите съединения с ИЧ и ЯМР-спектроскопия

Новополучените съединения да бъдат изолирани, пречиствани чрез подходящи методи (прекрystalлизация, колонна хроматография) и идентифицирани с помощта на ИЧ, <sup>1</sup>H- и <sup>13</sup>C-ЯМР спектрални методи, елементарен анализ или маспектрометрия.

##### 4. Електрохимично генериране на анион радикал *in situ* на нитро производните в специална ИЧ кювета и спектроскопско изследване на продуктите от редукцията.

Електрохимичната редукция да се проведе *in situ* в ИЧ кюветата в разтворител деутериран диметилсулфоксид, в присъствие на тетрабутиламониев бромид като електролитна сол. В хода на експеримента, редукцията на съединенията да се проследява при прилагане на електричен ток и измерване на ИЧ спектри през определени интервали от време. Обратимостта на редукцията да бъде охарактеризирана чрез обръщане на поляритета на електродите и измерване на нова серия от ИЧ спектри.

##### 5. Квантово-химични изчисления за установяване на молекулната геометрия.

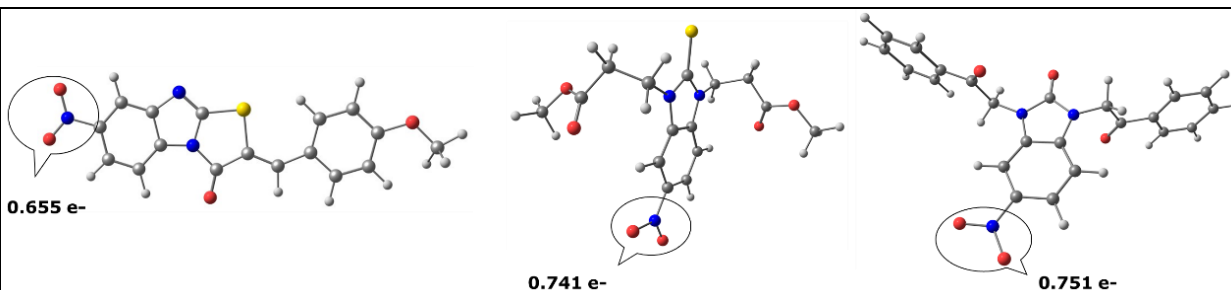
Предпочетената конформация, дължини на връзки, възможни стереоизомери, таутомерни и анионни форми, разпределение на зарядите, спиновата плътност по молекулни фрагменти и други електронни характеристики, показващи склонността за приемане на електрон и превръщане в радикал-аниони, реактивоспособността и стабилността на съответните радикал-аниони ще бъдат изследвани чрез теоретични пресмятания. Ще бъдат определени също така молекулни дескриптори като липофилност, молекулен обем, гъвкавост на молекулите и др., въз основа на които може да се направи предварителна оценка на бионаличността и лекарственото подобие на новосинтезираните съединения.

### **Резултати и обсъждане (до 10 стр.)**

Във втория етап на проекта, в съответствие с плана за изпълнения на поставените цели и задачи, бяха синтезирани планираните тиазолобензимидазолони производни чрез многоетапен синтез. Първоначално беше синтезиран (5-нитро-)2-меркаптобензимидазол при реакция на *o*-фенилендиамин и калиев ксантогенат, получен *in situ* в реакционната смес. Полученият меркаптобензимидазол беше вложен в следващия етап на взаимодействие с хлороцетна киселина за получаването на бензимидазоллил тiaoцента киселина. При кипене с оцетен анхидрид в среда от сух пиридин беше проведена циклизацията до тиазолобензимидазол, който участва в кондензация по Кновенагел със серия хидрокси и метокси съдържащи бензалдехиди. По тази синтетична схема са получени общо 10 съединения, половината от които незаместени бензимидазоли, а другата половина, съдържащи нитро група в 5-та позиция на бензимидазоловия хетероцикл.

Работата по втората целева серия съединения, производни на индола, започна с естерифициране на индол-3-оцетна к-на с тионилхлорид и метанол. На следващ етап съединението беше подложено на хидразинолиза с хидразин хидрат до получаване на хидразида, който на свой ред реагира със същата серия от хидокси и метокси бензалдехиди в абсолютен Етанол до получаване на крайните хидразонови производни. Серията беше разширена и вместо планираните пет крайни продукта, бяха синтезирани осем.

Имайки предвид възможността за активация на нитротиазолобензимидазоловото ядро чрез биоредукция, интерес представляваше получаването и изследването на радикал-анионни продукти. Детайлното им охарактеризиране може да осигури ценна информация и да допринесе за по-доброто разбиране на връзката между структурата и активността на този клас съединения. Образуването на радикал-анионни продукти на част от нитрозаместените тиазолобензимидазолони беше проследено чрез ИЧ спектроскопия при електрохимична редукция в апротен разтворител ДМСО (безкислородна среда). Промените в структурата, произтичащи от тези превръщания, бяха охарактеризирани въз основа на наблюдаваните ИЧ спектрални промени и квантово-химични пресмятания. Беше установено, че превръщането им е свързано със значителни спектрални и структурни промени, засягащи както нитро, така и карбонилната група. Съединения се характеризират с плоска структура в неутрално и йонизирано състояние и копланарната ориентация на нитро групата спрямо ароматната система. При изследваните нитротиазолобензимидазолони в следствие на електронното спрежение с допълнителното фенилно ядро, спиновата плътност, съсредоточена в нитрогрупата е по-ниска отколкото при дизаместените производни на нитробензимидазолтиона и нитробензимидазона.

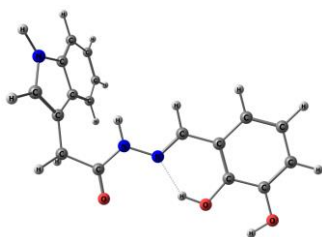


**Схема 3.** Структура и спинова плътност (по Мъликен), съсредоточена върху нитро групата при нитротиазолобензимидазолони и дизаместени производни на нитробензимидазолтиона и нитробензимидазолоната.

За по-добро изследване на структурата и нейното влияние върху биологичната активност бяха оптимизирани молекулните геометрии на избрани съединения, използвайки квантови-химични пресмятания по теорията на функционала на плътността (DFT), заложи в програмния пакет Gaussian 09/03.

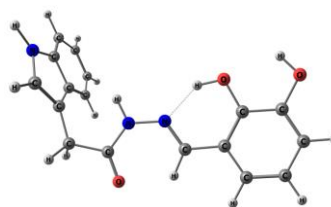
За да се определи най-предпочетената молекулна геометрия, вероятните конформери в изолирана среда (газова фаза) са оптимизирани, използвайки функционал B3LYP и базисен набор 6-311++G\*\*. Индоловият фрагмент се характеризира с планарна структура и гъвкава алкилна верига, което способства за образуване на набор от изомери. Въз основа на направените изчисления при най-подходящата геометрия страничните алкилни вериги са в транс положение спрямо равнината на индоловия хетероцикл, а карбонилната група е разположена срещу индоловото ядро. Амидната група и азометиновата връзка се стабилизират чрез *trans* конфигурацията. Може да съществуват два изомера, които се различават по завъртането около простата N-N връзка: *s-cis* или *s-trans*. Въпреки това, *s-trans* изомерът преобладава, като енергийната разлика между двата е около 2.5 kJ/mol. Формирането на взаимодействия между C-H...O има важна роля при стабилизирането на молекулната геометрия, което се допълва и от образуването на вътрешномолекулна водородна връзка между водородният атом от азометиновата двойна връзка (C=N) и карбонилната група.

**Конформер А**

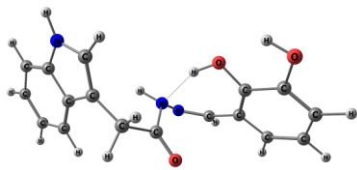
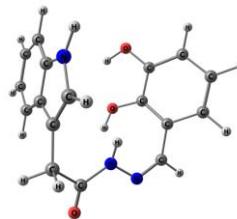
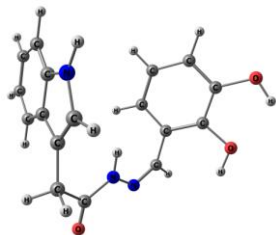
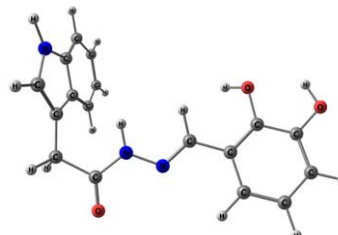


Най-стабилен

**Конформер В**



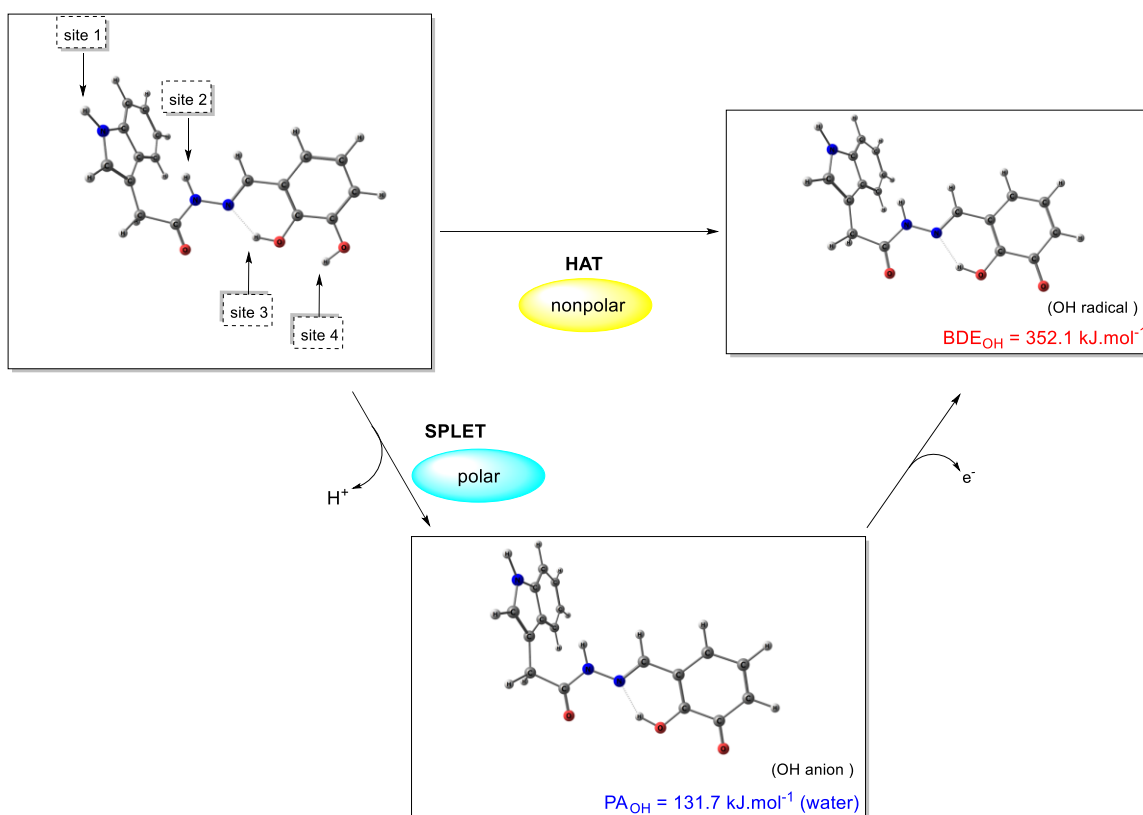
$\Delta G_{\text{TOT}} : 2.49 \text{ kJ/mol}$

**Конформер С** $\Delta G_{\text{TOT}} : 57.61 \text{ kJ/mol}$ **Конформер D** $\Delta G_{\text{TOT}} : 55.33 \text{ kJ/mol}$ **Конформер E** $\Delta G_{\text{TOT}} : 55.05 \text{ kJ/mol}$ **Конформер F** $\Delta G_{\text{TOT}} : 44.19 \text{ kJ/mol}$ 

Направената литературна справка върху предишни проучвания относно структурното сходство между изследваните индолови съединения и мелатонин ни насърчи да изследваме няколко възможни механизма на радикал-улавяща способност. Въз основа на известните възможни механизми за обезвреждане на свободните радикали HAT (Hydrogen Atom Transfer, директен пренос на водород), SET-PT (Single-Electron Transfer followed by Proton Transfer, пренос на единичен електрон последван от протонен пренос) и SPLET (Sequential Proton Loss Electron Transfer, пренос на протон последван от електронен пренос) бяха направени изследвания в полярна (вода) и неполярна (газова фаза) среда, използвайки метод B3LYP и базисен набор 6-31+G(d). Всеки един от механизмите се характеризира с определена константа BDE (енталпията на дисоциация на връзката) за HAT, PA (протонен афинитет) за SPLET и IP (йонизационен потенциал) за SET-PT.

Въз основа на получените резултати за индоловите хидразони са възможни 3 позиции за отцепване на водороден атом. Едната от тях е от амидната връзка (N-H), а другите две от хидроксилните групи от фенилното ядро. Позиция 1 е с най-ниска стойност на BDE (321.1 kJ/mol) и е най-подходяща за депротониране в неполярна среда. Колкото по-ниска е стойността на BDE, толкова е по-добра радикал-улавящата способност на антиоксиданта. Тези твърдения доказват, че в неполярна среда предпочетен е HAT механизма. От друга страна в полярна среда (вода) PA (126.4 kJ/mol) има по-ниска стойност от BDE (322.5 kJ/mol) и IP (311.3 kJ/mol), което предполага, че се наблюдава SPLET механизъм.

Стойностите на BDE в неполярна среда са най-ниски, което показват, че в неполярна среда (газова фаза) предпочетен е HAT механизмът. От друга страна в полярна среда (вода) PA има по-ниска стойност от BDE и IP, което предполага, че се наблюдава SPLET механизъм.



**Схема 4.** Възможни механизми на радикал-улавящо действие

### ***Изводи/Обобщение***

1. Синтезирани са 10 нови съединения от първата серия – производни на тиазолобензимидазолонa с потенциална антинеопластична и антиоксидантна активност
2. Синтезирани са 8 нови съединения от втората серия – хидразонови производни на индола като потенциални мултифункционални лекарствени средства с антинеопластична и антиоксидантна активност.
3. Промените в структурата, произтичащи от образуването на радикал-анионни продукти бяха проследено чрез ИЧ спектроскопия при електрохимична редукция
4. Уточнени са най-стабилните конформери на избрани представители от синтезираните съединения и най-вероятните механизми на радикал-улавяне.

**Публикации (излезли или подадени за печат публикации, в които изрично е изказана благодарност към Програмата) и участия на научни форуми**

**Публикации:**

1. **N. Anastassova**, S. Stoyanov, A. Mavrova, D. Yancheva, Spectroscopic and in silico study on the conversion of N,N'-disubstituted hydrazone derivatives of 5-nitrobenzimidazole-2-thione into anion and radical anion products: implications in hepatotoxicity, Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2020. [IF: 2.931] Q1

**Участия на научни форуми:**

1. Eighth International Conference on Radiation in Various Fields of Research (**RAD 2020** Conference) – Virtual Session. **Neda Anastassova**, Simeon Stoyanov, Maria Argirova, Anelia Ts. Mavrova, Denitsa Yancheva, DFT and IR spectroscopic study on the conversion of 2-[2-imino-5-nitro-3-(2-oxo-2-phenylethyl)-2,3-dihydro-1H-benzimidazol-1-yl]-1-phenylethanone into radical and anionic products, юли, 2020.

2. Research Infrastructure In Support Of Science, Technology And Culture (INFRAMAT) Scientific Conference. **N. Anastassova**, N. Hristova-Avakumova, K. Radev, D. Yancheva, New Indole Arylhydrazones and Study of their Protective Properties on Iron Induced Oxidative Damage of Biologically Important Molecules, септември 2020, София.

Дата: 04.02.2021.

Изготвил:



[гл. ас. д-р Неда Анастасова]