



ПЛОВДИВСКИ УНИВЕРСИТЕТ

„ПАИСИЙ ХИЛЕНДАРСКИ”

 **Химически Факултет**

КАТЕДРА „ОРГАНИЧНА ХИМИЯ“

МИГЛЕНА ЗЛАТКОВА МИЛУШЕВА

**СИНТЕЗ НА НОВИ СПАЗМОЛИТИЦИ, ПОВЛИЯВАЩИ
ПАМЕТОВИ ФУНКЦИИ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ЖИВОТНИ**

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен
„ДОКТОР“

Област на висше образование: 4. Природни науки, математика и информатика

Професионално направление: 4.2. Химически науки

Докторска програма Органична химия

Научни ръководители:
доц. д-р Стоянка Николова Атанасова
доц. д-р Илияна Стефанова-Кънчева

Пловдив, 2025 г.

Дисертационният труд е изложен на 170 стандартни печатни страници и е онагледен с 13 схеми, 12 таблици и 32 фигури. Библиографската справка обхваща 394 литературни източника.

Основната част от изследванията по дисертационния труд, включващи синтезите и пречистването на съединенията, компютърното модулиране и определянето на *in vitro* противовъзпалителна активност, са извършени в Химическия факултет на Пловдивски университет „Паисий Хилендарски“. Експерименталното определяне на спазмолитичната активност, *ex vivo* противовъзпалителната активност и влиянието над паметови функции е осъществено в Медицински университет – Пловдив. Изследванията за антимикробно действие са проведени в Университета по хранителни технологии в Пловдив. ЯМР измерванията са направени в Софийски университет „Св. Климент Охридски“, София. HRMS-спектрите са заснети в Медицински университет – София.

Дисертационният труд е обсъден на 08.05.2025 г. на заседание на разширен Катедрен съвет на Катедра „Органична химия“ към Химически факултет на Пловдивски университет „Паисий Хилендарски“ е насрочен за защита пред **Научно жури** в състав:

1. проф. Пантелей Петров Денев, дхн (рецензент)
2. доц. Румяна Иванова Бакалска, дх (рецензент)
3. проф. Кръстена Тодорова Николова, дф
4. проф. Гинка Атанасова Антова, дх
5. доц. Йорданка Иванова Узунова, дб

Публичната защита на дисертационния труд ще се състои на 02.07.2025 г. от 14:00 ч. в 1 аудитория на Пловдивски университет „Паисий Хилендарски“.

Материалите по защитата са на разположение в Отдел „Развитие на академичния състав и докторантури“ и са публикувани на интернет страницата на Пловдивски университет „Паисий Хилендарски“ – www.uni-plovdiv.bg.

СЪДЪРЖАНИЕ

I. ВЪВЕДЕНИЕ	4
II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД	5
III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ	6
IV. СОБСТВЕНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ	8
1. <i>In silico</i> скрининг	8
2. Синтез и охарактеризиране на целевите съединения	14
3. Биологична активност на получените хибридни съединения	16
V. ИЗВОДИ	31
VI. ПРИНОСИ	32
VII. ПУБЛИКАЦИОННА АКТИВНОСТ	33
VIII. БЛАГОДАРНОСТИ	36

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

ГМ	Гладка мускулатура	ADME	Абсорбция, дистрибуция, метаболизъм и екскреция
ГМП	Гладкомускулни препарати	ASA	Ацетилсалицилова киселина
ИЧ (FT-IR)	Инфрачервен Нестероидни	BBB	Кръвно-мозъчна бариера
НСПВС	противовъзпалителни средства	CCh	карбахол
ССА	Спонтанна съкратителна активност	IBD	Възпалителна болест на дебелото черво
СЧТ	Стомашно-чревен тракт	IBS	Синдром на раздразненото дебело черво
СПВС	Стероидни противовъзпалителни средства	IL	Интерлевкин
ЦНС	Централна нервна система	LD₅₀	Летална доза, 50%
ЯМР (NMR)	Ядрен магнитен резонанс	nNOS	Невронална азотен оксид синтаза
5-HT	5-хидрокси триптамин, Серотонин	NO	Азотен оксид
ACh	Ацетилхолин	TPSA	Топологична полярна повърхностна площ

ВЪВЕДЕНИЕ

Функционалните и възпалителните нарушения на гастроинтестиналния тракт, като синдром на раздразненото черво (IBS) и възпалителна болест на червата (IBD), остават сериозно клинично предизвикателство с нарастваща социална и медицинска значимост. Те се характеризират със сложна и все още недостатъчно изяснена патофизиология, в която участват различни фактори – нарушения в чревната моторика, свръхчувствителност на висцералната инервация, нарушения в имунния отговор, нарушена чревна бариера и променена микробиота. В резултат от тази комплексност, наличните терапевтични възможности често са симптоматични, с ограничена ефективност и нежелани странични реакции при дългосрочна употреба.

В настоящата терапевтична практика спазмолитиците заемат основно място при лечението на IBS и други функционални стомашно-чревни разстройства. Техният ефект се основава на релаксация на гладката мускулатура (ГМ), модулация на калциевите канали и антихолинергична активност. Въпреки утвърдената им употреба, съществуващите молекули често не постигат желаните клинични резултати, особено при пациенти с тежки или рефрактерни форми на заболяването, и могат да предизвикат нежелани реакции като сухота в устата, замайване или нарушения в сърдечния ритъм. Това подчертава необходимостта от откриване на нови лекарствени молекули с подобрен фармакологичен профил – по-висока ефективност, по-ниска токсичност и по-широк спектър на действие.

Една от съвременните стратегии в лекарствения дизайн е разработването на **хибридни молекули**, съчетаващи фармакофорни елементи с различен механизъм на действие в рамките на една химична структура. Този подход позволява едновременно таргетиране на различни звена от патофизиологичния каскад, потенциално водещо до синергичен терапевтичен ефект и редуциране на необходимата доза и съответно на нежеланите ефекти. Като структурна основа за създаване на подобни хибриди, **антраниловата киселина** представлява особено интересен обект – тя е добре проучена, присъства в редица биоактивни съединения с противовъзпалително, аналгетично, антиалергично и спазмолитично действие и предлага множество възможности за химична модификация.

Изследването на биологичната активност на тези новосинтезирани хибридни структури се основава на съчетаване на съвременни подходи – ***in silico* моделиране** за предсказване на биологичния профил, **химичен синтез** на избрани молекули и **експериментално биологично тестване**. *Ex vivo* модели с изолирана ГМ се използват за оценка на съкратителната активност и изясняване на механизма на действие, докато *in vitro* тестовете разкриват допълнителни аспекти като противовъзпалителен и антимикробен потенциал. Проведените *in vivo* проучвания при експериментални животни дават възможност да се проследят системни ефекти, включително влияние върху когнитивни параметри – фактор с нарастващо значение при хронични заболявания, свързани със стрес и променено качество на живот. Получените резултати се сравняват с утвърдени референтни средства като мебеверин, диклофенак, ацетилсалицилова киселина и преднизолон.

Настоящият дисертационен труд представя оригинални резултати от синтеза, характеризирането и фармакологичната оценка на нови хибридни производни на антраниловата киселина като потенциални спазмолитици с допълнителен противовъзпалителен и когнитивно-модулиращ ефект. Разработените структури допринасят към разширяването на набора от достъпни структурни аналози, задълбочават разбирането за връзката структура-действие и разкриват нови възможности за терапия на комплексни състояния като IBS и IBD.

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

Основни приоритети за фармацевтичната химия остават намирането на нови терапевтични стратегии, оптимизирането на установени фармакологични агенти за постигане на по-добро свързване с прицелните рецептори или валидирането на нови агенти с различен механизъм на действие. Въз основа на фармакологичните активности на производните на антранилова киселина, е формулирана целта на дисертационния труд: **синтез на нови производни на антраниловата киселина като нови кандидати за спазмолитици и вещества, повлияващи паметови функции при експериментални животни.**

За постигане на изследователската цел са поставени следните задачи:

1. ***In silico* оценка за биологичната активност и потенциална токсичност** на нови хибридни молекули.
2. **Синтез на изходна хибридна молекула**, съчетаваща фармакофорни остатъци на антранилова киселина и заместени 2-фенилетиламини.
3. **Получаване на амиди на хибридната молекула** с цел създаване на производни с подобрена спазмолитична и противовъзпалителна активност.
4. **Пречистване и охарактеризиране** на всички синтезирани съединения с подходящи аналитични методи.
5. **Определяне на спазмолитична и противовъзпалителна активност** на получените съединения в сравнение с използвани спазмолитици като мебеверин и противовъзпалителни средства като диклофенак, ацетилсалицилова киселина и преднизолон.
6. **Оценка на антимикробната активност** на синтезираните съединения.
7. **Определяне на ефекта на веществата върху паметови функции** при експериментални животни.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

Материали:

Всички използвани реактиви и разтворители са закупени от Merck.

Използваните лекарствени препарати за сравнение са закупени от аптечната мрежа.

Метод за синтез на изходни хибридни молекули:

Смес от изатоев анхидрид (1,63 g, 10 mmol) и съответния 2-фенилетиламин (2,10 mL, 15 mmol) в дихлорометан (30 mL) се разбърква на стайна температура за 24 часа.

Полученият разтвор се филтрува през неутрален Al_2O_3 и се концентрира.

Метод за синтез на диамидни производни:

Към разтвор на 3 mmol от съответния хибрид **3**, **4** или **5** в 10 mL дихлорометан, се добавят 3,5 mmol от съответния киселинен хлорид.

След 30 минути се добавят 3,5 mmol $\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_3$ и след още 30 минути, реакционната смес се измива последователно с разредена HCl (1:4), Na_2CO_3 и H_2O .

След сушене с безводен Na_2SO_4 , разтворът се филтрува на колона с неутрален Al_2O_3 и се концентрира.

Хроматографски, спектрални и компютърни методи:

→ Тънкослойна хроматография: използвани са хроматографски плаки 0,2 mm Fluka силикагел и хроматографска система за разделяне смес от хлороформ: диетилов етер: n-хексан = 6:3:1.

→ Препаративна колонна хроматография: за филтруване и разделяне е използван неутрален Al_2O_3 .

→ ^1H -ЯМР и ^{13}C -ЯМР спектрите са записани на спектрометър Bruker Avance III HD 500 (Bruker) при 500 MHz (^1H -ЯМР) и 125 MHz (^{13}C -ЯМР) и стайна температура (295 K). Химичните отмествания са изразени в милионни части (ppm), отнесени към тетраметилсилан (TMS) ($\delta = 0,00$ ppm) като вътрешен стандарт. Константите на спин-спиново взаимодействие са посочени в Hz.

→ Инфрачервените спектри са записани с FT-IR спектрометър VERTEX 70 (Bruker Optics) и отместванията на пиковете са посочени в cm^{-1} .

→ Температурите на топене са определени с апарат Kruss M5000 (A. Krüss Optronic GmbH) и са представени в градуси по Целзий ($^{\circ}\text{C}$).

→ HRESIMS спектрите са получени в положителен режим на масспектрометър Q Exactive Plus (ThermoFisher Scientific, Inc.) с HESI-II.

→ За скрининг на биологични ефекти, фармакокинетични свойства и токсичност са използвани следните свободно достъпни софтуерни продукти: PASS Online, SwissADME, ProTox-II, OSIRIS20.

→ Статистически анализ на експерименталните данни с InStat и IBM SPSS Statistics v.26.

Методи за оценка на биологичната активност на съединенията:

→ Изометрично определяне на *ex vivo* спазмолитична активност на плъши стомашни гладкомускулни препарати в тъканна вана при инкубиране с хибридни съединения, невротрансмитери и познати спазмолитици.

→ Определяне на *in vitro* инхибиране на термично индуцираната денатурация на човешки серумен албумин.

→ Имунохистохимично определяне на промени в експресията на IL-1 β и nNOS в клетки от гладка мускулатура и миентерален плексус на плъши стомах в *ex vivo* условия.

→ Определяне на *in vitro* антимикробната активност по агар-дифузионен метод.

→ *In vivo* изследване влиянието на новосинтезирани хибридни съединения над локомоторна активност и когнитивни функции при плъхове.

Експерименталните животни са отглеждани във „Вивариум“ на МУ – Пловдив. Стриктно са спазени международно установените принципи за работа с опитни животни, регламентирани чрез директива 86/609/ЕЕС. Експериментите са извършени при строго съблюдаване на изискванията на Българската агенция за безопасност на храните (Разрешително за работа с експериментални животни № 229, валидно до 11.04.2024 г. и № 400, валидно до 06.06.2029 г.).

СОБСТВЕНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ

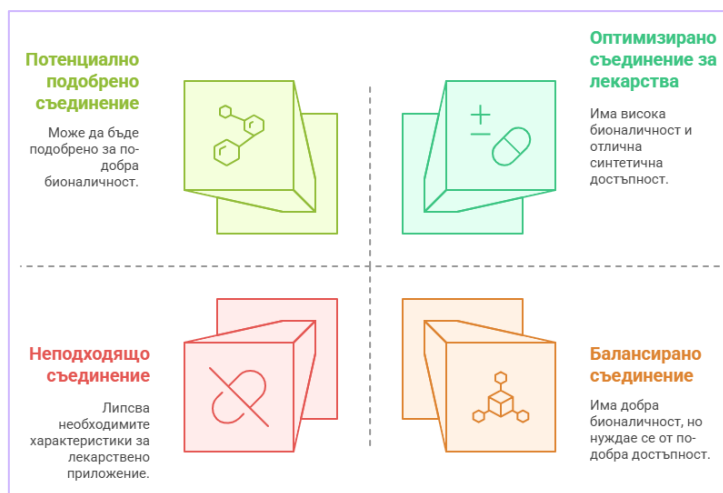
Полифармакологията не е нова концепция, но съществуват различни подходи за едновременно прилагане на две или повече лекарствени вещества. Най-често използваните стратегии включват: едновременен прием на няколко отделни лекарства, комбиниране на няколко активни вещества в една лекарствена форма, както и създаване на хибридни молекулярни структури, способни да взаимодействат с множество терапевтични мишени. Поради повишения риск от токсичност при комбинирана химиотерапия, все по-голямо внимание се обръща на разработването на единични хибридни молекули, обединяващи различни фармакофорни фрагменти (многолиганден подход). През последните десетилетия се наблюдава интензивен напредък в синтеза на такива хибриди, включващи биологично значими структурни елементи, които се изследват като потенциални фармакологично активни вещества и лекарствени средства.

Терапевтичната ефективност на дадено лекарство се определя от редица физико-химични характеристики, включително абсорбция, разпределение, метаболизъм, взаимодействие с таргетните молекули, екскреция и токсичност. Оптимизацията на тези параметри изисква целенасочен молекулярен дизайн. Поради високата стойност на структурната модификация на вече известни фармакофори, хибридните съединения, образувани чрез обединяване на структурни и функционални особености на два различни биологично активни фрагмента, представляват предпочитан клас молекули за създаване на нови лекарствени кандидати с подобрени свойства.

Изхождайки от широкото разнообразие от природни и синтетични молекулни структури с доказана биологична активност, тези хибридни съединения често демонстрират синергични или нововъзникващи фармакологични свойства.

1. *IN SILICO* СКРИНИНГ

Съществуват много фактори, които ограничават систематичното използване на експерименти в етапа на откриването на нови лекарства. Такива фактори са множеството новосинтезирани експериментални молекули, количествените ограничения на тъканните проби, както и ограничаване на опитите с животни. В този контекст е разумно да се счита, че биологичните изследвания могат да бъдат допълнени или частично заменени от компютърни модели. За тази цел решихме да включим редица софтуерни продукти в настоящото изследване на нови хибридни молекули като потенциални кандидати за лекарства. За да бъде успешно използвана като лекарство, една молекула трябва да достигне фармакологичната си цел в организма в подходяща концентрация и да остане в биоактивна форма достатъчно дълго време. Много обещаващи биологично активни вещества не успяват да се наложат като лекарства поради ниската си бионаличност и лоши фармакокинетични показатели (Фигура 1).

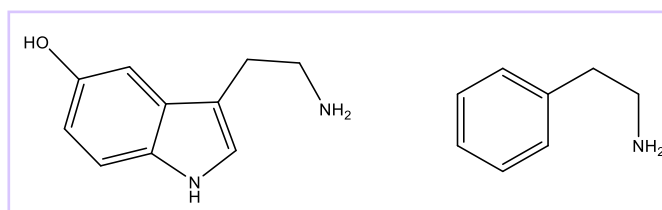


Фигура 1. Оценка на профила на бионаличността на съединения.

Във връзка с целта на дисертационния труд, създадохме целеви фармакофорен модел, който да инхибира действието на ендогенния невротрансмитер ацетилхолин (ACh). За да изберем целеви структури, които да бъдат синтезирани, използвахме метода на network фармакологията, описан от Xiao, и приложихме следните бази от данни: TTD (<http://bidd.nus.edu.sg/group/cjttd/>), DrugBank (<https://www.drugbank.ca/>), GeneCards (<https://www.genecards.org/>), DisGeNET (<https://www.disgenet.org/>), и OMIM (<https://omim.org/>). За намиране на таргетни протеини, свързани с гастроинтестинални спазми, използвахме търсене в базите данни с ключови думи “Spasm”; “Spasms”; “Muscular spasm”, “Muscle spasms”. След това ключовите таргетни гени и съединения бяха засечени в обща диаграма, която насочи фокуса към синтез на съединения, засягащи калциевите пътища (calcium signalling pathway). Литературната справка показва, че производните на антраниловата киселина имат подобно действие и са модулатори на различни йонни канали, в това число и L-тип калциевите канали. **Така за първа фармакофорна единица избрахме производните на антраниловата киселина, като основен структурен елемент, включен в синтеза на хибридни молекули като потенциални лекарствени кандидати срещу възпалителни заболявания, включително стомашно-чревни.**

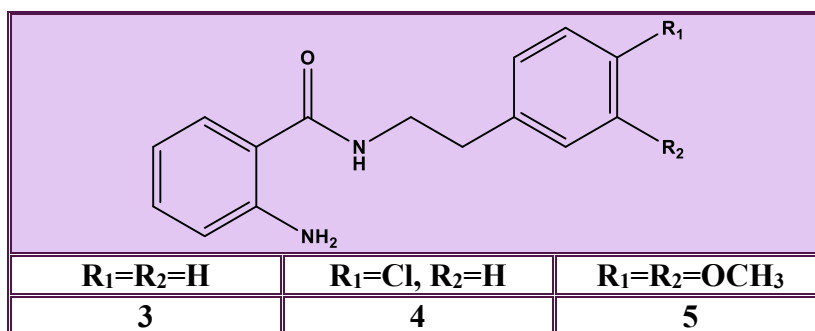
При изследване на ефектите на дадено съединение върху калциевите канали, е важно да се отчита и влиянието на фенилетиламините блокери на калциеви канали. **В този контекст, като втора фармакофорна единица в дизайна на хибридната молекула, е избрана структурата на 2-фенилетиламина.** Фенилетиламините представляват обширен клас съединения с биогенен или синтетичен произход. Сред синтетичната подгрупа амфетаминът е добре известен със своите стимулиращи ефекти. Биогенната подгрупа се състои от добре характеризирани невротрансмитери, като допамин, норепинефрин и серотонин и β -фенилетиламин. В мозъка на бозайниците β -фенилетиламинът е неравномерно разпределен, като най-високи концентрации се наблюдават в лимбичните структури. Тези области са силно инервирани от допаминергични неврони и показват висока чувствителност към амфетамин. Промени в метаболизма на β -фенилетиламините са открити при неврологични разстройства, включително шизофрения и хиперактивно разстройство с дефицит на вниманието, което

предполага участието на този амин в патофизиологията на моноаминергичните системи. Фенетиламините, триптамините и ерголините са трите категории, в които често попадат структурите на 5-HT_{2A} рецепторните агонисти, но най-много внимание е отделено на класа на фенилетиламините като селективни агонисти на 5-HT подтип (Фигура 2). Невротрансмитерът серотонин (5-HT) играе ключова роля за настроението, либидото, агресията, тревожността, познанието, съня, апетита и болката, като освен това регулира периферните дейности в кръвоносната, стомашно-чревната, ендокринната и дихателната система. Тези дейности включват регулиране на апетита, болката, съня и храненето.



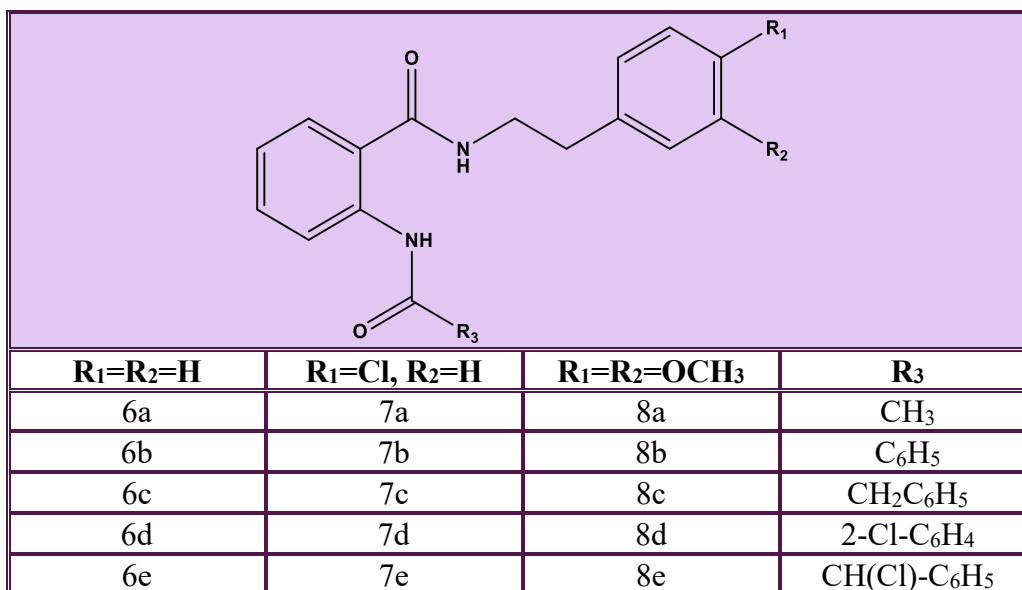
Фигура 2. Химични структури на 5-хидрокситриптамин (5-HT) и фенилетиламин.

При избора на производни на 2-фенилетиламиновия остатък се насочихме към три типа: незаместен 2-фенилетиламин, 3-хлоро-2-фенилетиламин и 3,4-диметоксифенилетиламин (Фигура 3). Целта беше да се проучи влиянието на заместителите върху спазмолитичната и противовъзпалителната активност, с оглед селектиране на най-подходящото съединение за последващи *in vivo* изследвания.



Фигура 3. Избрани 2-фенилетиламинови производни за синтез на хибридни молекули.

Планирайки получаване на по-голям брой нови биологичноактивни производни, следващ фокус бе избор на диамиди на антраниловата киселина за синтез. Амидната връзка е от основно значение в медицинската химия, поради честото ѝ участие в биологично активни молекули и широкото ѝ приложение при синтеза на пептиди, протеини и други макромолекули. Амидната връзка е характерна за множество терапевтични агенти и се открива приблизително в една четвърт от всички одобрени лекарствени продукти. При дизайна на нови лекарства е необходимо да се отчита и способността на амидите да взаимодействат с биологични мишени. От гледна точка на това, както и с цел изследване влиянието на различни заместители върху структурата и свойствата, интерес в рамките на настоящата работа представлява синтезът на производни, съдържащи алкилови и арилови остатъци. От алкиловите заместители е избран метилов, а от ариловите – фенилов, 2-хлорофенилов, бензилов и α -хлоробензилов (Фигура 4).



Фигура 4. Избрани алкилови и арилови заместители за синтез на диамиди.

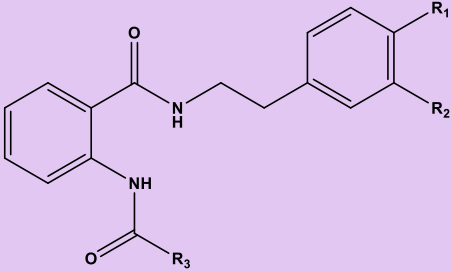
Първоначално проведохме *in silico* тестове за всяко едно от съединенията, с цел да определим техните фармакокинетични свойства. Свойствата на абсорбция, разпределение, метаболизъм и екскреция (ADME) на целевите съединения в представената дисертация са оценени *in silico* с помощта на уеб инструментите SwissADME, OSIRIS20 и ProTox-II. Тези програми дават общи стойности за оценка на съединенията, с цел значително намаляване на неуспешните клинични изпитвания. В нашите изследвания бяха оценени молекулярни дескриптори като коефициент на разпределение ($\log P_o/w$), молекулно тегло, донори и акцептори на водородни връзки, топологична полярна повърхностна площ (TPSA), нарушения на правилото на Липински и други. Очакваните биологични ефекти бяха предвидени с програмата PASS (Prediction of Activity Spectra for Substances).

При анализа на целевите хибридни съединения приложихме правилото на Липински – широко използвано в откриването на лекарства за оценка на техните свойства при перорално приложение. То определя някои ключови критерии за лекарствено подобие. Според правилото за кандидатите за лекарства трябва да бъдат изпълнени поне две от четирите основни фармакокинетични свойства ($MW \leq 500$, $XLOGP3 \leq 5$, брой донори на водородни връзки ≤ 5 и брой акцептори на водородни връзки $\leq 10,6$); липофилност ($XLOGP3$: $-0,7$ до $+5,0$), молекулна маса (MW : 150 до 500 g/mol), полярност (TPSA: 20–130 Å²), ESOL или оценена разтворимост ($\log S$: не повече от 6), насищане (Фракция C_{sp^3} или фракция на въглеродни атоми в sp^3 хибридизация: не по-малко от 0,25) и брой конформационно свободни връзки (RB: не повече от 9).

Липофилността е ключова характеристика, която играе основна роля при оценката на бионаличността. Съгласно компютърното моделиране, стойностите на $\log P$ са по-ниски от 5, което предполага добра бионаличност (Таблица 1). Изследването на ADME показва, че съединенията преминават през кръвно-мозъчната бариера (BBB) и имат висока стомашно-чревна абсорбция и могат да се разглеждат като кандидат за

лекарство. TPSA е дескриптор, който предоставя информация за транспортните свойства на лекарството, като чревна абсорбция (TPSA под 140 Å²) и проникване през ВВВ. Изчислените стойности на TPSA за съединения 3–5 са в диапазона 55,12–73,58 Å², които отговарят на критериите за ефективно чревно усвояване и преминаване през ВВВ. Броят на конформационно свободните връзки за всички съединения е по-нисък от девет, което съответства на достатъчна перорална бионаличност. Разтворимостта е друго важно свойство, което влияе върху абсорбцията. Съединения се очаква да са умерено разтворими във вода според параметъра log S. Оценката чрез радарния модел за бионаличност също потвърди, че всички планирани за синтез съединения отговарят на критериите за лекарствено подобие, с изключение на броя въглеродни атоми в sp³-хибридизация.

Таблица 1. Фармакокинетични свойства на хибридни молекули 3–5 и техните диамиди, получени след *in silico* анализ.

											
Съединение	R ₃	MW g/mol	log S ESOL	Log P _{o/w}	Log K _p cm/s	TPSA Å ²	Н-акцептор	Н-донор	RB	C sp ³	ГИА
3	–	240,30	–3,08	2,46	–5,98	55,12	1	2	5	0,13	висока
4	–	274,75	–3,98	3,06	–5,38	55,12	1	2	5	0,13	висока
5	–	300,35	–3,51	2,56	–6,02	73,58	3	2	7	0,24	висока
6a	CH ₃	282,34	–3,81	2,86	–5,47	58,20	2	2	7	0,18	Висока
7a	CH ₃	316,78	–3,96	3,23	–5,74	58,20	2	2	7	0,18	Висока
8a	CH ₃	342,39	–3,51	2,59	–6,38	76,66	4	2	9	0,26	Висока
6b	C ₆ H ₅	344,41	–4,82	3,89	–5,18	58,20	2	2	8	0,09	Висока
7b	C ₆ H ₅	378,85	–5,41	4,34	–4,94	58,20	2	2	8	0,09	Висока
8b	C ₆ H ₅	404,46	–4,95	3,82	3,82	76,66	4	2	10	0,17	Висока
6c	CH ₂ C ₆ H ₅	358,43	–4,78	3,92	–5,31	58,20	2	2	9	0,13	Висока
7c	CH ₂ C ₆ H ₅	392,88	–5,38	4,40	–5,07	58,20	2	2	9	0,13	Висока
8c	CH ₂ C ₆ H ₅	418,48	–4,92	3,86	–5,71	76,66	4	2	11	0,20	Висока
6d	2-Cl-C ₆ H ₄	378,85	–5,41	4,33	–4,94	58,20	2	2	8	0,09	Висока
7d	2-Cl-C ₆ H ₄	413,30	–6,00	4,88	–4,70	58,20	2	2	8	0,09	Висока
8d	2-Cl-C ₆ H ₄	438,90	–5,55	4,25	–5,35	76,66	4	2	10	0,17	Висока
6e	CH(Cl)C ₆ H ₅	392,88	–5,43	4,31	–5,00	58,20	2	2	9	0,13	Висока
7e	CH(Cl)C ₆ H ₅	427,32	–6,03	4,67	–4,77	58,20	2	2	9	0,13	Висока
8e	CH(Cl)C ₆ H ₅	452,93	–5,58	4,25	–5,91	76,66	4	2	11	0,20	Висока

Легенда: Съединения 6a–e – R₁=R₂=H; Съединения 7a–e – R₁=Cl, R₂=H; Съединения 8a–e – R₁=R₂=OCH₃. MW: молекулно тегло; Log P_{o/w}: коефициент на разпределение октанол/вода; TPSA: топологична полярна площ; ESOL LogS: изчислена разтворимост във вода; Фракция Csp³: съотношение на sp³ хибридизирани въглеродни атоми спрямо общия брой въглероди; RB: гъвкавост (брой конформационно свободни връзки); Н-акцептор – брой акцептори на водородни връзки; Н-донор – брой донори на водородни връзки, ГИА – гастроинтестинална абсорбция.

При *in silico* оценката за токсичност (ProTox-II), за повечето от съединенията се предвижда приблизително 70% вероятност за респираторна токсичност, както и потенциал за токсични ефекти върху ЦНС след преминаване през BBB. Подобни нежелани реакции често се наблюдават при активни вещества, предназначени за лечение на комплексни невродегенеративни заболявания. Според прогнозните данни за остра токсичност, трите хибридни съединения попадат в клас 4 ($LD_{50} = 1000 \text{ mg/kg}$), а диамидните им производни – в диапазона 1000–2025 mg/kg.

*Компютърното моделиране потвърди валидността на хипотезата, че всяко едно от съединенията 3–8 може да се приеме като потенциален терапевтичен кандидат. Това ни даде основание да синтезираме посочените съединения с цел получаване на „малка библиотека“ от хибридни молекули и определяне на тяхната спазмолитична и противовъзпалителна активност, както и идентифициране на подходящи кандидати за *in vivo* когнитивни тестове върху експериментални животни.*

2. СИНТЕЗ И ОХАРАКТЕРИЗИРАНЕ НА ЦЕЛЕВИТЕ СЪЕДИНЕНИЯ

Съществуват няколко метода за синтез на производни на антраниловата киселина. Най-широко разпространеният включва следните етапи:

- ацилиране с ацилиращ агент на анилин или заместен анилин при подходящи условия на температура и налягане за образуване на съответния ацилиран продукт;
- подлагане на ацилирания продукт в условия на халогениране в присъствието на окислител;
- подлагане на продукта в условия на карбонилиране при подходяща температура и налягане, за да се образува антранилова киселина, от която в следваща стъпка могат да се получат амидни и естерни производни.

Избраният синтетичен подход в настоящия дисертационен труд се основава на друг метод за синтез, а именно отваряне на пръстена на изотоев анхидрид при взаимодействие с 2-фенилетиламини с модификации от описания в литературата

2.1. Синтез на хибридни молекули

Проведена е реакция с 2-фенилетиламин, 2-(3-хлорофенил)етиламин и ховератриламин в дихлорометан. Ходът на взаимодействието е проследен посредством тънкослойна хроматография, като целевите продукти са изолирани с практически количествени добиви (Схема 1).

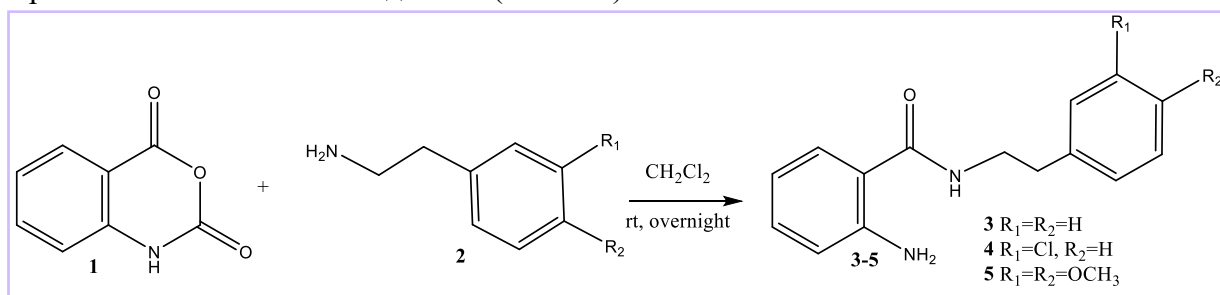


Схема 1. Синтез на амиди 3–5.

Структурата на получените съединения е потвърдена с помощта на FT-IR, NMR, HRMS-спектрални данни. В FT-IR спектрите се наблюдават ивици за аминогрупа, амидна група и заместено бензеново ядро. В ¹H-NMR спектрите и ¹³C-NMR спектрите всички сигнали бяха напълно съвместими с очакваните структури на хибридните съединения 3–5. В ¹H-NMR се наблюдават широки синглети при 5,5 ppm за NH₂ групата и 6,6 ppm за NH от амидната група в 4; 5,5 ppm за NH₂ групата и 6,2 ppm за NH от амидната група в 5; и 5,5 ppm за NH₂ групата и 6,1 ppm за NH от амидната група при съединение 3. Освен това във всеки един от спектрите се наблюдават характерните за 2-фенилетиламините триплет и квартет за за CH₂ групите и сигнали за ароматния пръстен от 2-фенилетиламина и от антраниловата киселина. В ¹³C-NMR на 4 се появява сигнал за C=O групата при 169,4 ppm, както и сигнали за ароматния пръстен и CH₂ групи при 40,6 и 35,5 ppm. FT-IR спектърът също така показва ивици за NH, NH₂ групи, амидна група и метазаместено бензеново ядро. В ¹³C-NMR на съединенията се появява сигнал за C=O групата при 169,2 ppm, както и сигнали за ароматния пръстен и CH₂ групи в областта 40,0–41,0 и 35,2–35,5 ppm. Молекулната маса на съединенията е потвърдена с HRMS.

2.2. Синтез на диамиди на хибридни молекули

С цел получаване на нови потенциално биологично активни производни, следващият етап в синтеза е получаването на диамиди на получените хибридни молекули 3–5. За изпълнението му приложихме новосинтезираните хибриди в реакции на ацилиране с набор от пет киселинни хлориди (Схема 2).

Реакцията с киселинни хлориди е ефективна и осигурява желаните диамиди 6a–e, 7a–e и 8a–e с добиви между 78–83% (Таблица 2). Функционалните групи, включително фенилови и бензилови заместители, бяха предпочитани поради предварително направения *in silico* скрининг.

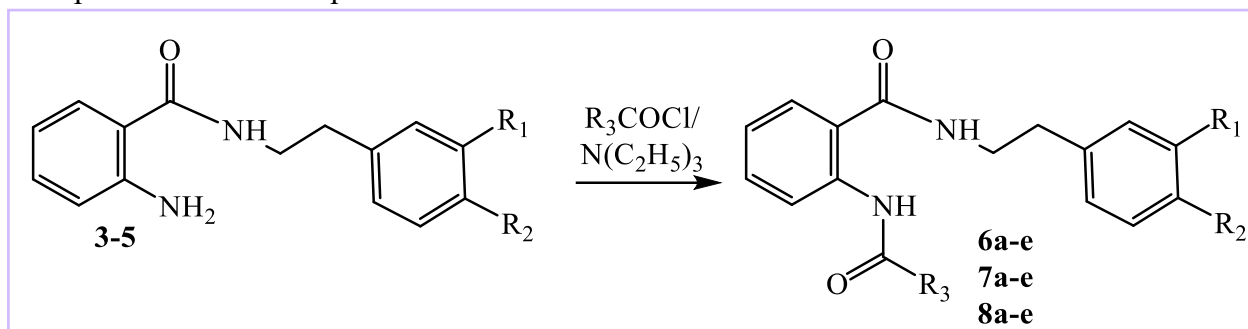


Схема 2. Синтез на диамидите 6a–e, 7a–e, 8a–e.

Таблица 2. Синтез на диамиди на антранилова киселина – добиви и температури на топене.

Съединение	R ₁	R ₂	R ₃	Добив, %	Т.т., °C
6a	H	H	CH ₃	78	90–92
6b	H	H	C ₆ H ₅	80	94–95
6c	H	H	CH ₂ -C ₆ H ₅	81	85–86
6d	H	H	2-Cl-C ₆ H ₄	80	161–164
6e	H	H	CH(Cl)C ₆ H ₅	79	76–77
7a	Cl	H	CH ₃	83	135–137
7b	Cl	H	C ₆ H ₅	79	106–108
7c	Cl	H	CH ₂ -C ₆ H ₅	79	82–83
7d	Cl	H	2-Cl-C ₆ H ₄	80	61–63
7e	Cl	H	CH(Cl)C ₆ H ₅	81	83–84
8a	OCH ₃	OCH ₃	CH ₃	80	95–97
8b	OCH ₃	OCH ₃	C ₆ H ₅	78	121–124
8c	OCH ₃	OCH ₃	CH ₂ -C ₆ H ₅	79	92–93
8d	OCH ₃	OCH ₃	2-Cl-C ₆ H ₄	81	94–95
8e	OCH ₃	OCH ₃	CH(Cl)C ₆ H ₅	82	102–103

Получените съединения бяха охарактеризирани чрез техните температури на топене, ¹H, ¹³C-ЯМР и HRESIMS спектри. Спектралните данни потвърждават структурата на всички получени съединения. В ¹H-NMR се появява широк синглет в областта 10,5–12,0 ppm за протон от новата амидна група, както и сигнал за новата карбонилна група на втория карбонилен въглероден атом в ¹³C-NMR. Във въглеродния спектър на съединението се наблюдава появата на нова карбонилна група при 168,9 ppm.

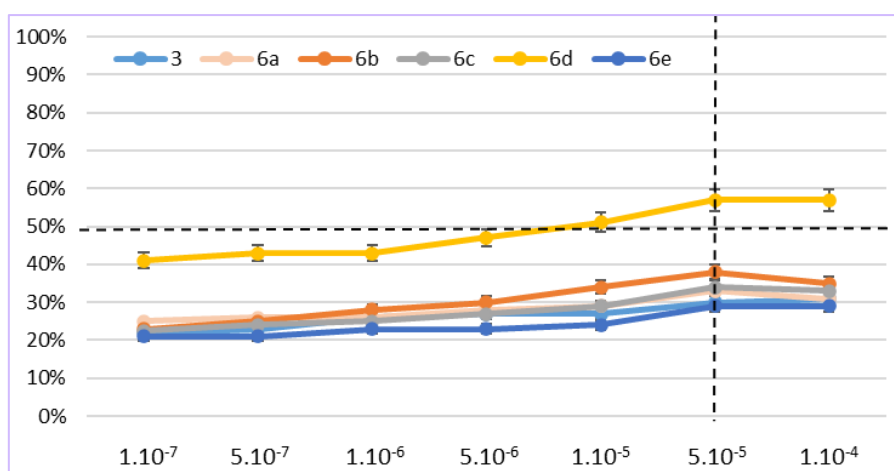
3. БИОЛОГИЧНА АКТИВНОСТ НА ПОЛУЧЕНИТЕ ХИБРИДНИ СЪЕДИНЕНИЯ

3.1. *Ex vivo* влияние на хибридни молекули върху контрактилната функция на гладки мускули

Оценката на фармакологичния профил на всички 18 хибридни съединения бе осъществена чрез *ex vivo* експерименти върху изолирани тъкани от корпусната част на стомах на плъх. Изследвани бяха промени в амплитудата, честотата и тоничната компонента на спонтанните контрактилни реакции в сравнение с тези, установени след приложение на референтния спазмолитик мебеверин, невротрансмитерите ацетилхолин (ACh) и карбахол (CCh), чрез тензометрична регистрация.

Действието на новосинтезираните молекули **3** и **6a–e** беше сравнено с тези на мебеверин при субмаксимална концентрация ($5 \cdot 10^{-5}$ mol/L) спрямо концентрационния диапазон $10^{-6} \div 10^{-4}$ mol/L. Съединение **6e** не предизвика съществена промяна в контрактилната активност. Сходно на мебеверин действие бе установено за **6c**. Най-изразен релаксационен ефект показаха диамидните производни **6b** и **6d** (Фигура 5). Съществено различие се регистрира между мебеверин и изследваните съединения при проследяване на влиянието им върху ACh-медираните ГМ контракции. Нито едно от новите съединения (**3**, **6a–e**) не повлиява значимо ACh-отговор (промени се регистрираха в интервала $0,5\% \div 1,4\%$), за разлика от мебеверин, който предизвика 99,3% инхибиране на отговора при същата концентрация. Тези резултатите са индикация за причинен нежелан ефект от мебеверина чрез блокиране на ACh – важен невротрансмитер в невромускулната комуникация. Това повдига въпроси относно безопасността на спазмолитичното лекарство при продължителна употреба и налага търсене на нови съединения с подобен релаксиращ ефект, но с по-добър профил на безопасност.

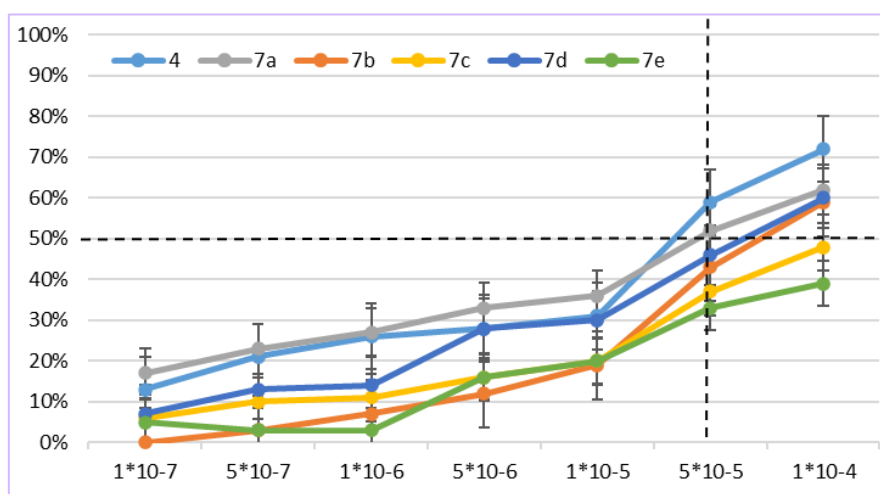
В отговор на това предизвикателство чрез лекарствен дизайн и молекулно моделиране са идентифицирани две съединения от първата група хибриди с незаместен 2-фенилетиламин (6b и 6d), които запазват целенасоченото релаксиращо действие върху ГМ, но проявяват по-малко нежелани ефекти. Смятаме, че това се дължи на присъствието на фенилов остатък в тяхната структура (6b, $R_3 = C_6H_5$; 6d, $R_3 = 2-Cl-C_6H_4$).



Фигура 5. Промени (%) в съкратителната активност на ГМП, индуцирани от **3** и **6a–e** в концентрационния диапазон от $1 \cdot 10^{-7}$ до $1 \cdot 10^{-4}$ mol/L (брой повторения $n = 8$).

Релаксиращото действие на предварително предсказани *in silico* съединения в група (4, 7a–7e), селектирана по разлика в amidната група свързана с антралиловата киселина, бе оценено чрез прилагането им върху CCh-преконтрахирана гладка мускулатура. Ефектите се изразяваха в процентно намаление на индуцираната от CCh тонична контракция (Фигура 6). Статистическият анализ на спонтанната съкратителна активност (ССА) показва, че всички изследвани съединения потискат спонтанната гладкомускулна активност в зависимост от концентрацията (0–72%), като потвърждават потенциала си като релаксанти-спазмолитици.

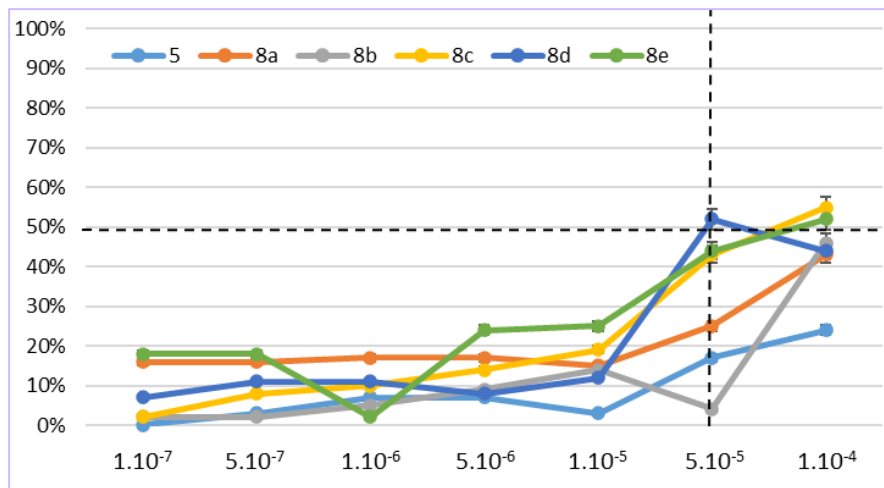
Съединение 4 демонстрира най-изразена релаксация (59% при $5 \cdot 10^{-5}$ mol/L), превъзхождайки 7a–7e. Неговата хибридна структура осигурява по-висока ефикасност в сравнение с останалите аналози, което го определя като водещ кандидат за развитие на нов терапевтичен агент при състояния, свързани с повишен мускулен тонус.



Фигура 6. Релаксационни отговори, предизвикани от съединения 4 и 7a–e в концентрационния диапазон от $1 \cdot 10^{-7}$ до $1 \cdot 10^{-4}$ mol/L, върху ГМП, предварително контрахирани с CCh. Ефектът на 10^{-7} mol/L CCh е приет за 100% и всички последващи отговори са изразени като процент от тази стойност.

При идентични условия на инкубиране на изолираните тъкани в органната вана, бяха изследвани влиянията и на химичните съединения от последната група хибриди с 3,4-диметокси-2-фенилетиламин: **5** (n = 7), **8a** (n = 8), **8b** (n = 8), **8c** (n = 7), **8d** (n = 7) и **8e** (n = 8). Най-силно изразен тоничен релаксационен ефект беше регистриран при концентрация $5 \cdot 10^{-5}$ mol/L за три от хибридните молекули от тази група вещества, съответно: **8c**—40%, **8d**—54% и **8e**—44% (Фигура 7).

От посочените три вещества, съдържащи 2-хлорофенилов, бензилов и алфа-хлоробензилов остатък, установихме че най-активни тонични релаксанти са 8d и 8e.

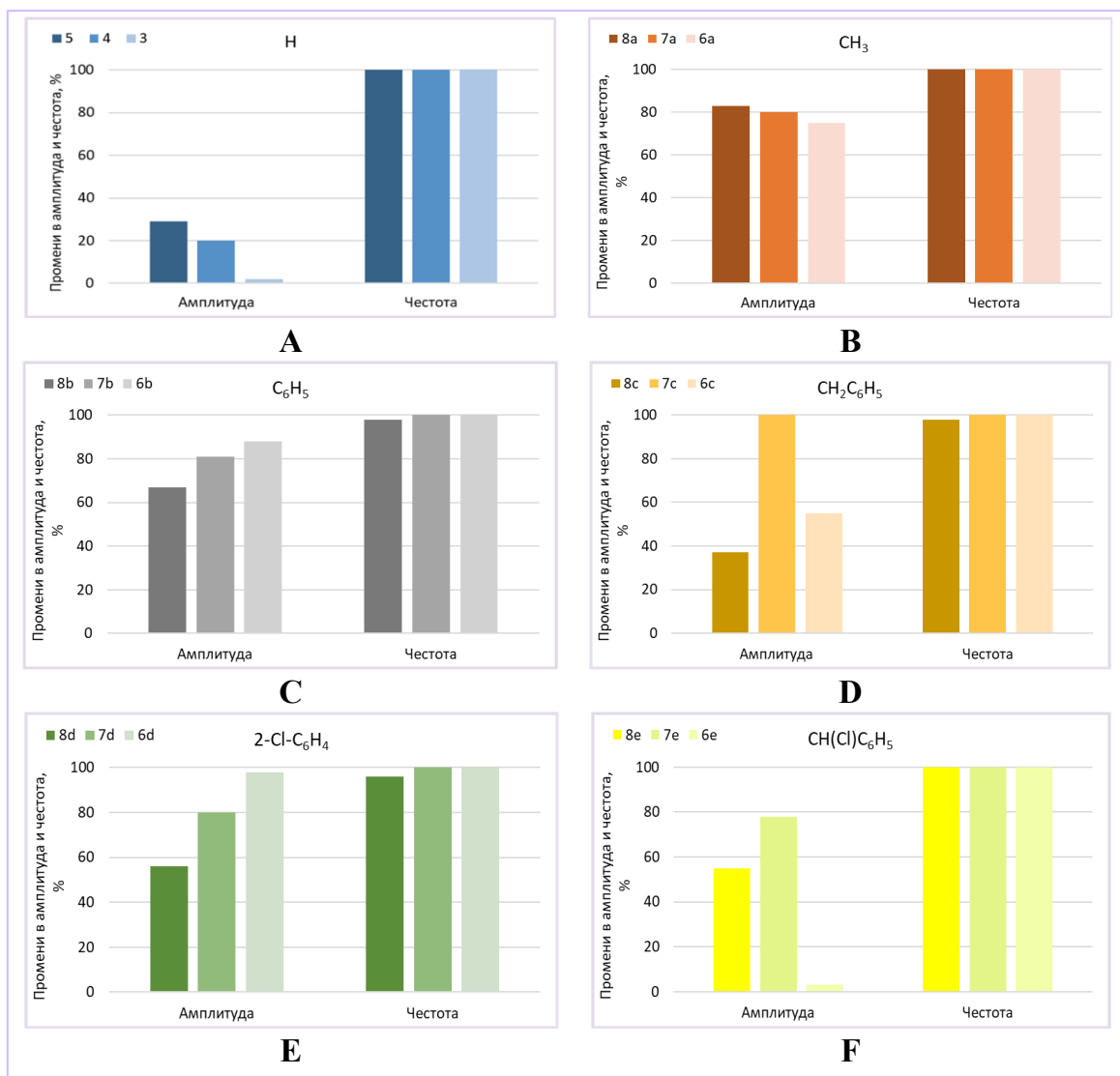


Фигура 7. Релаксационни отговори, предизвикани от съединения 5 и 8a–e в концентрационния диапазон от 1.10^{-7} to 1.10^{-4} mol/L, върху ГМП, предварително контрахирани с CCh. Ефектът на 10^{-7} mol/L CCh е приет за 100% и всички последващи отговори са изразени като процент от тази стойност.

ГМП, при които се наблюдават най-силно изразените пет релаксационни ефекта (предизвикани от съединенията **6b**, **6d**, **4**, **8d** и **8e**), показаха постепенно и устойчиво отпускане на мускулатурата – типично за тоничната релаксация на ГМ, свързана с бавна регулация на калциевата хомеостаза. При анализа на резултатите по групи, различаващи се по 2-фенилетиламиновия остатък и по ацилната компонента, установихме, че действието на тези хибриди ги определя като потенциално полезни при лечението на състояния, свързани със спазми и повишен мускулен тонус, включително многофакторните чревни заболявания и синдроми (IBD и IBS). Разликите в активността на взаимодействието с биологичните мишени и в степента на повлияване на различните компоненти на спонтанните съкращения очевидно се дължат на различната химична структура. Тези данни предполагат, че структурните вариации в молекулата могат да играят ключова роля в модификацията на фармакологичните свойства на новите терапевтични агенти като селективни агонисти или антагонисти на ГМ.

За по-пълна характеристика на всички 18 синтезирани миорелаксанта, оценихме и потенциала им за амплитудна и/или честотна релаксация – по-бърз и краткотраен ефект, резултат от рязко понижение в концентрацията на вътреклетъчния Ca^{2+} , водещ до потискане на ритмичните контракции. Групирането беше по вида на заместителя: H (A); CH_3 (B); C_6H_5 (C); $CH_2C_6H_5$ (D); 2-Cl- C_6H_4 (E); $CH(Cl)-C_6H_5$ (F) в структурата на молекулите (Фигура 8).

Установихме, че честотата на контракциите на ГМП е идентична по сила и характер и остава почти непроменена, варирайки в много тесен интервал между 96% и 100% за всички изследвани съединения, приложени в концентрация 5.10^{-5} mol/L. Това е статистически незначима разлика и индикира минимален до липсващ честотен ефект (Фигура 8). Този експериментален резултат показва, че изследваните хибридни молекули нямат съществен ефект върху честотата на фазичните контракции на ГМ при посочената концентрация и не повлияват структури и вътреклетъчни процеси, отговорни от своя страна за генерирането и регулирането на честотата на спонтанните контракции в ГМ.



Фигура 8. Промяна в амплитудата и честота на спонтанните съкращения на ГМП, предизвикани от съединения 3, 6a–e, 4, 7a–e, 5, 8a–8e в концентрация $5 \cdot 10^{-5}$ mol/L, върху ГМП, предварително контрахиран с CCh. Параметрите (амплитуда и честота) след въздействие с $1 \cdot 10^{-7}$ mol/L CCh са приети за 100% и всички последващи отговори са изразени като процент от тази стойност. Групирането е по вид на заместителя R₃: A (H); B (CH₃); C (C₆H₅); D(CH₂C₆H₅); E(2-Cl-C₆H₄); F (CH(Cl)-C₆H₅).

Анализът на амплитудните промени при спонтанните мускулни съкращения показва структурно зависими различия, добре изразени при съпоставяне на хибридните съединения според вида на втория амиден заместител (R₃). Някои молекули демонстрираха слаб ефект, докато други – значимо инхибиране. Хибридните молекули 4 и 5 показаха над 50% намаление на амплитудата, приложени в концентрация $5 \cdot 10^{-5}$ mol/L. В тази целева група най-активният амплитуден релаксант е 3 с почти 90% инхибиция. Противоположно на тях, съединения 7a и 8a (със заместител R₃ = CH₃) не повлияха значимо амплитудата.

Фаворити за лекарствени кандидати сред новосинтезираните диаמידни производни в останалите групи са съответно 8b (R₃ = C₆H₅); 6c и 8c (R₃ = CH₂C₆H₅); 8d (R₃ = 2-Cl-C₆H₄); 8e (R₃ = CH(Cl)-C₆H₅), които проявиха статистически значим

инхибиращ ефект върху амплитудата на съкращение. Според емпиричните открития, синтезираните хибридни молекули и техните диаמידни производни проявяват изразена биологична активност, като повлияват процесите на фармакомеханично свързване в типичните за стомашно-чревния тракт (СЧТ) ГМ клетки.

Групирайки съединенията по участващия 2-фенилетиламинов фармакофор, най-силен ефект открихме при съединения **6b** и **6d** от първа група (с 2-фенилетиламин), съединение **4** от втора група (с 3-хлоро-2-фенилетиламин) и съединения **8d** и **8e** от трета група (с 3,4-диметоксифенилетиламин), което може да се обясни с наличието на фенилов или бензилов остатък, свързан с антраниловия фрагмент. Останалите съединения показват релаксационно влияние върху спонтанната контрактилна активност с различна механична сила на наблюдаваните реакции, но с безспорен общ антиспазмодичен характер на ефекта. Вероятно вида на заместителите и тяхната позиция в новосинтезираните молекули са тези специфични структурни елементи, които повлияват по различен начин афинитета към множеството рецептори на ГМ и определят тяхната ефикасност като релаксанти.

В тази връзка можем да заключим, че оптимизацията на химичната структура чрез подходящ избор и разположение на заместителите може да доведе до създаването на по-мощни и селективни лекарствени кандидати за терапия на заболявания, свързани със спастични състояния.

3.2. Експериментално определяне на противовъзпалителна активност

Възпалението представлява патологичен процес, произтичащ от нормален защитен отговор на организма при тъканно увреждане, причинено от физически травми, химични вещества или микробни агенти. То е характерен симптом при множество хронични заболявания и клинично се проявява чрез зачервяване, оток, затопляне и болка. За потискане на възпалителния процес често се използват противовъзпалителни лекарствени средства от групите на стероидните и нестероидните противовъзпалителни средства (НСПВС). Механизмът на действие на НСПВС се основава на инхибиране активността на ензима циклооксигеназа, ключов за синтеза на възпалителни медиатори. Широко прилагани представители като ацетилсалицилова киселина, ибупрофен и диклофенак са ефективни, но при продължителна употреба могат да предизвикат сериозни нежелани реакции, включително гастроинтестинални увреждания, чернодробна токсичност, улцерации, кръвоизливи, чревна перфорация и обструкция. Тези ограничения подчертават необходимостта от разработване на нови съединения с по-добър профил на безопасност и повишена терапевтична ефективност.

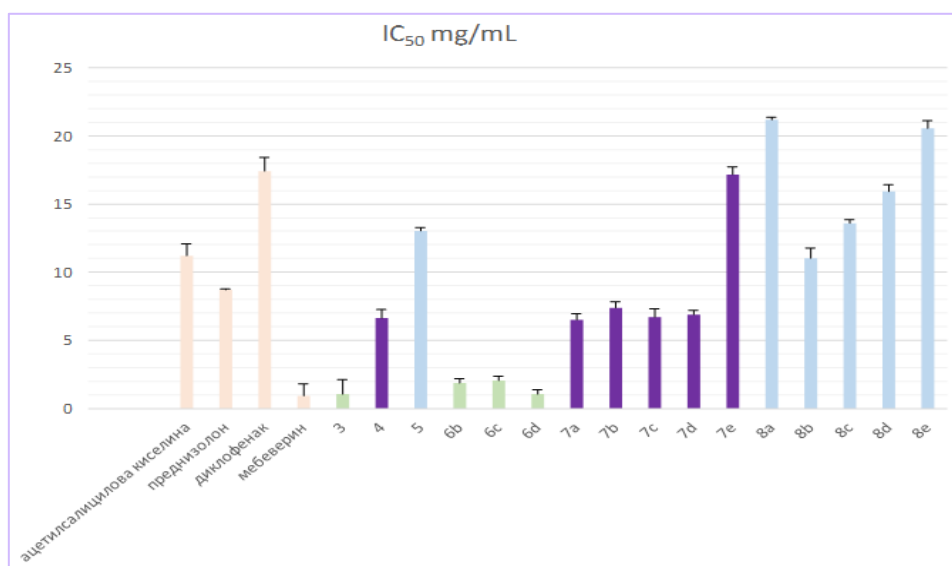
С цел определяне на противовъзпалителния потенциал на съединенията, направихме оценка на тяхната активност по два метода – *in vitro* и *ex vivo*.

3.2.1. *In vitro* определяне инхибиране денатурацията на албумин

In vitro анализът на противовъзпалителната активност беше извършен чрез оценка на инхибирането на термично индуцирана денатурация на албумин – механизъм, който се използва като модел за изследване на противовъзпалително действие. Денатурацията на протеините настъпва вследствие на промени в хидрофобните взаимодействия, дисулфидните, електростатичните и водородните връзки. Този процес води до

образуване на автоантигени, което има роля в патогенезата на различни хронични и многофакторни възпалителни заболявания, включително IBS и IBD. В такива случаи инхибирането на протеиновата денатурация се счита за важен показател за потенциална противовъзпалителна активност.

Използваният метод на инхибиране денатурацията на човешки серумен албумин при нагряване е достъпен и бърз. Чрез него са оценени *in vitro* противовъзпалителните свойства на хибридните съединения, групирани по 2-фенилетиламиновия заместител както следва: I^{ва} група (3, 6a–6e), II^{ра} група (4, 7a–7e) и III^{та} група (5, 8a–8e). На Фигура 9 резултатите са представени като половината от максималната инхибираща концентрация (IC₅₀). Като контроли са използвани две НСПВС – ASA и диклофенак, и едно СПВС – преднизолон. За сравнение е използван и мебеверин, който се използва като медикамент за облекчаване на симптомите на IBS, но нашите проучвания демонстрират и неговите *in vitro* и *ex vivo* потенциални противовъзпалителни свойства, които многократно надвишават използваните като стандарти противовъзпалителни лекарствени средства. Мебеверинът има структурни фрагменти, подобни на изследваните три групи съединения, което рационализира направата на изводи за връзка между структура и биологични свойства.



Фигура 9. Инхибиране на термичната денатурация на албумин под действие на три групи съединения: I – 3, 6b–6c, II – 4, 7a–7e и III – 5, 8a–8e. За сравнение се използват контроли ASA, диклофенак, мебеверин и преднизолон. Резултатите са изразени като IC₅₀.

В заключение можем да обобщим: Съединенията от I^{ва} група показват най-висока противовъзпалителна активност, съпоставима с тази на референтното лекарство мебеверин. Въвеждането на хлор и метокси заместители във II^{ра} и III^{та} група води до понижаване на активността спрямо I^{ва} група и мебеверин, макар че в някои случаи тя остава съизмерима или дори по-висока от тази на класически НСПВС като диклофенак. Съединенията от III^{та} група демонстрират ефект, сходен с диклофенак, но по-слаб от ASA и преднизолон. Независимо от разликите в активността, всички те проявяват обещаваща способност за защита срещу

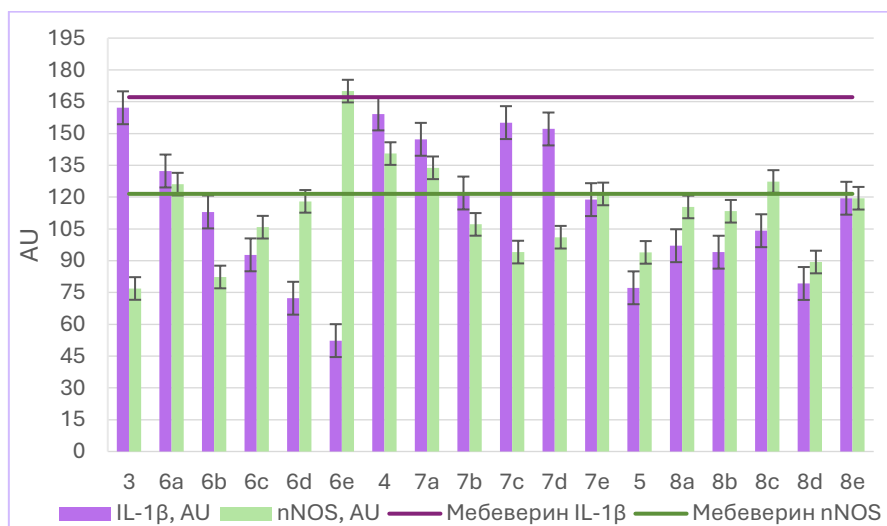
термична денатурация на албумина, което допълнително потвърждава техния терапевтичен потенциал.

3.2.2. *Ex vivo* имунохистохимична оценка на противовъзпалителната активност.

Контрактилната активност и тонусът на ГМ се модулират не само от калциево-зависими механизми, но и от провъзпалителни медиатори като интерлевкин-1 β (IL-1 β) и ензима невроналната азотен оксид синтаза (nNOS). IL-1 β , освобождаван от макрофагите, стимулира продукцията на азотен оксид (NO). Това води до повишена концентрация на NO и намален контрактилитет на ГМ. Този процес има ключово значение при възпалителни състояния, където свръхпроизводството на NO причинява хипорефлексия и функционални нарушения на органите, изградени от ГМ – стомашно-чревния тракт, кръвоносните съдове и дихателните пътища.

Имунохистохимичните и ензимно-хистохимичните методи позволяват проследяване на експресията на IL-1 β , активността на nNOS и ефектите на NO, предоставяйки ценна информация за патогенезата на състояния като сепсис, възпалителни заболявания на червата и автономни дисфункции.

За да потвърдим получените резултати от предходните изследвания, проведехме допълнителни имунохистохимични *ex vivo* тестове за оценка влиянието на хибридните молекули (3–8e) върху експресията на IL-1 β и nNOS в ГМП. Тези методи позволяват оценка на възпалителните и неврорегулаторните механизми, ключови при комплексни заболявания като сепсис, IBD, IBS и автономни дисфункции. Направеният хистологичен анализ след оцветяване за IL-1 β и nNOS на парафинови срези от стомаха на плъх показва ясно различими разлики в зависимост от приложеното вещество за инкубация. Данните от светлинно микроскопските измервания на интензивността и плътността на IL-1 β и nNOS експресията са обобщени във Фигура 10.



Фигура 10. Промени в експресията на IL-1 β и nNOS при ГМ препарати, инкубирани с хибридни съединения 3–8. За сравнение са посочени ефектите при инкубиране с мебеверин.

По отношение на експресията на IL-1 β в препаратите, инкубирани с всяко от новосинтезираните съединения се наблюдава понижаване на експресията,

съпоставимо с или по-значимо от това, предизвикано от мебеверин. При съединения 5, 6d и 6e, се наблюдава най-значително понижение на интензитета на имунореакцията. Това показва, че синтезираните хибриди потискат изявата на мощния провъзпалителен цитокин IL-1 β [358], като въздействат върху невронални и ГМ клетки.

С оглед на получените резултати от имунохистохимичното оцветяване за ензима nNOS, най-силен модулиращ ефект върху експресията му се наблюдава при препаратите, инкубирани с диамидното производно 6e, последвани от тези, инкубирани с хибрида 4 и производното му 7a. Това предполага потенциален противовъзпалителен механизъм чрез стимулиране на невронално-медираното освобождаване на NO. Експерименталните данни подчертават потенциала на хибридите съединения с 3-хлоро-2-фенилетилов заместител като кандидати за терапия на IBS, където възстановяването на нормалната NO-сигнализация е от значение. Наблюдаваната градация в активността между трите антранилови хибриди също подчертава значението на структурата на 2-фенилетиламиновия остатък за модулиране на биологичния ефект.

Експерименталните резултати подкрепят хипотезата, че хибридите съединения запазват противовъзпалителната активност, характерна за антраниловата киселина, като същевременно разкриват модифициращото влияние на допълнителните фармакофори, водещо до потенциране или потискане на ефекта.

3.3. Антимикробна активност

Пациентите, които страдат от IBS, често имат бактериален свръхрастеж в тънките черва. По литературни данни е известно, че амидите на антраниловата киселина са много добри антимикробни агенти. Относно 2-фенилетиламините, докладвани са умерена до силна антимикробна активност срещу някои Грам-положителни бактерии (*Bacillus subtilis*, *Mycobacterium smegmatis*, *Listeria monocytogenes* и *Staphylococcus aureus*) и умерена активност срещу дрождите *Candida albicans*.

Синтезираните три хибридни молекули и петнадесетте им диамидни производни бяха приложени в *in vitro* скрининг за установяване тяхната антимикробна активност срещу човешки патогенни бактериални и гъбични щамове. Използвани са шест Грам-положителни бактерии, шест Грам-отрицателни бактерии, две дрожди и пет гъби. На база диаметъра на зоните на инхибиране на бактериалния и гъбичния растеж, причинени от новите съединения, са направени изводи за чувствителността или резистентността на микроорганизмите, представени в Таблица 3. Метанолът, използван като разтворител за пробите, не показва значим антимикробен ефект. В същата изследвана концентрация като тази на новите съединения, а именно 1 mg/mL (0,1 %), спазмолитикът мебеверин не показва антимикробен ефект.

Съгласно получените експериментални резултати, едно от изследваните съединения (4) демонстрира обещаваща противогъбична активност срещу всички тествани щамове на плесени – *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Penicillium chrysogenum* и *Rhizopus* sp. Умерена антимикробна активност беше установена и срещу

други микроорганизми, включително гъбични щамове като *Mucor* sp., дрожди (*Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*), както и срещу Грам-отрицателни бактерии (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*) и Грам-положителни бактерии (*Listeria monocytogenes*, *Enterococcus faecalis*). Умерена чувствителност, характеризирана с инхибиращи зони с диаметър 12–15 mm, бе отчетена и при редица производни на съединение 4 – диамидите 7а–е.

Таблица 3. Антимикробна активност на тестваните съединения.

Инхибирана зона, mm Микро-организъм	Тествани съединения													Положителни контроли				
	3	4	5	6b	6c	6d	7a	7b	7c	7d	7e	8b	8d	K	N	A	P	F
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	R	I	–	–	R	–	R	R	R	R	R	–	R	S	NA	I	–	NA
<i>Listeria monocytogenes</i> NBIMC 8632	–	I	–	–	–	–	R	I	–	R	R	–	–	S	NA	S	I	NA
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	–	I	–	–	–	–	I	R	–	R	–	–	–	S	NA	S	–	NA
<i>Micrococcus luteus</i> 2YC-YT	–	S	R	–	–	–	R	I	I	I	R	–	I	NA	NA	–	–	NA
<i>Salmonella enteritidis</i> ATCC 13076	–	I	R	–	–	–	I	R	R	R	R	–	–	NA	NA	–	–	NA
<i>Salmonella typhimurium</i> NBIMCC 1672	–	I	R	–	–	–	R	R	–	I	–	R	R	S	NA	S	–	NA
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883	–	R	R	–	–	–	I	–	–	R	I	I	–	S	NA	S	–	NA
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	R	I	R	–	R	–	R	R	R	I	R	R	R	S	NA	I	–	NA
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	R	I	R	–	R	–	R	R	R	R	R	R	R	NA	NA	I	–	NA
<i>Candida albicans</i> NBIMCC 74	–	I	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	NA	S	NA	NA	–
<i>S. cerevisiae</i> ATCC 9763	–	I	–	–	–	–	–	–	–	R	R	–	–	NA	S	NA	NA	–
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 1015	–	S	I	–	–	–	R	R	R	R	R	R	R	NA	S	NA	NA	S
<i>Aspergillus flavus</i>	–	S	–	–	–	–	R	I	R	R	R	–	–	NA	S	NA	NA	S
<i>Penicillium chrysogenum</i>	–	S	R	R	R	R	I	I	R	I	R	R	R	NA	NA	NA	NA	I
<i>Rhizopus</i> sp.	–	S	R	–	–	–	R	R	R	R	R	–	R	NA	NA	NA	NA	–
<i>Mucor</i> sp.	–	I	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	NA	NA	NA	NA	–

Легенда: S – чувствителни микроорганизми, I – умерено чувствителни, R – резистентни, “–” – не е регистриран ефект; NA – не е приложимо; K – камистатин; N – нистатин; A – ампицилин; P – пеницилин; F – флуконазол.

Различията в антимикробната активност спрямо Грам-положителни и Грам-отрицателни бактерии вероятно се дължат на съществени структурни разлики в тяхната клетъчна стена. Грам-отрицателните бактерии притежават допълнителна външна мембрана, богата на липополизахариди, която значително ограничава проникването на хидрофобни и заредени молекули. От друга страна, клетъчната стена на Грам-

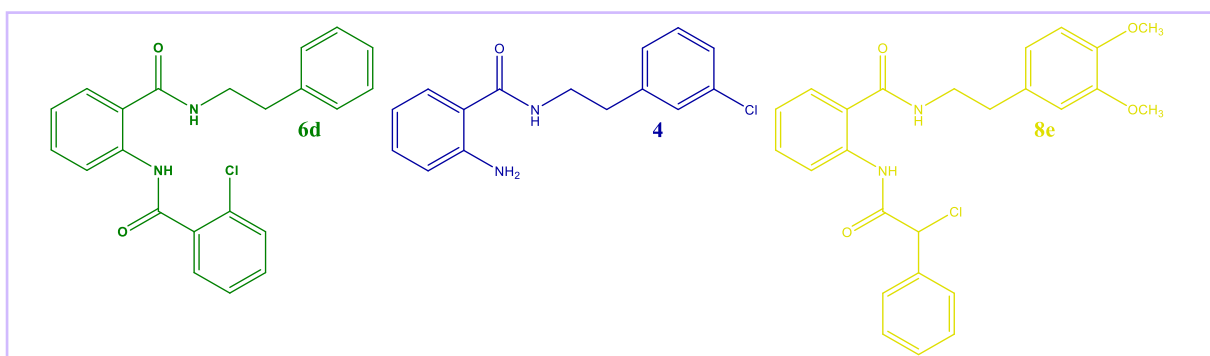
положителните бактерии е по-дебела, но лишена от външна мембрана, което обикновено улеснява достъпа на антимикробни агенти. Проникването на съединението може също да се влияе от параметри като липофилност, заряд (включително зета-потенциал) и молекулна структура на активното вещество. В случая, наличието на 2-(3-хлорофенил)етиламино фрагмент и хлорен атом в структурата на съединение **4** и неговите производни **7a–e** вероятно допринася за повишената им биологична активност чрез подобро проникване и взаимодействие с микробни мишени.

*Експерименталните резултати показват, че съединение **4** притежава най-силно изразени антимикробни и противогъбични свойства сред тестваните хибридни молекули. Тези резултати го определят като обещаваща структура за бъдещи разработки, включително в контекста на комплексни възпалителни заболявания с микробен компонент.*

3.4. *In vivo* проучване върху паметови функции при експериментални животни

Съществуват лекарствени препарати, които повлияват едновременно контракциите на ГМ и паметовите функции. Този ефект се дължи на факта, че някои невротрансмитери и рецептори участват както в регулацията на мускулния тонус, така и в когнитивните процеси. Мебеверинът е аналог на папаверин от второ поколение и спада към спазмолитиците, но има по-специфичен механизъм на действие, който го отличава от класическите фосфодиестереразни инхибитори. Мебеверин блокира натриевите канали в ГМ, с което намалява навлизането на Na^+ , което предотвратява спазмите. Индиректно инхибира калциевите канали, намалява концентрацията на вътреклетъчен Ca^{2+} , и в резултат релаксира чревните мускули. Поради действието си предимно върху СЧТ, без да засяга нормалната перисталтика, е подходящ при лечение на IBS. В същото време лекарството не прониква лесно през ВВВ и няма директен ефект върху ЦНС.

Водени от принципа за откриване на нови лекарства с по-добър профил на безопасност, по-висока селективност, по-ефективно действие, намаляване на страничните ефекти, включително когнитивни нарушения, които често съпътстват употребата на някои спазмолитици, изследвахме потенциала за повлияване на когнитивните функции при експериментални животни на три от веществата (Фигура 11), показали най-добра активност при спазмолитичната и противовъзпалителна активност.



Фигура 11. Структура на подобрите съединения **6d**, **4** и **8e** за изследване влиянието им над паметови функции при експериментални животни.

Експерименталните животни бяха разпределени в четири групи, третирани ежедневно перорално с разтвор на съответното вещество или физиологичен разтвор (Таблица 4).

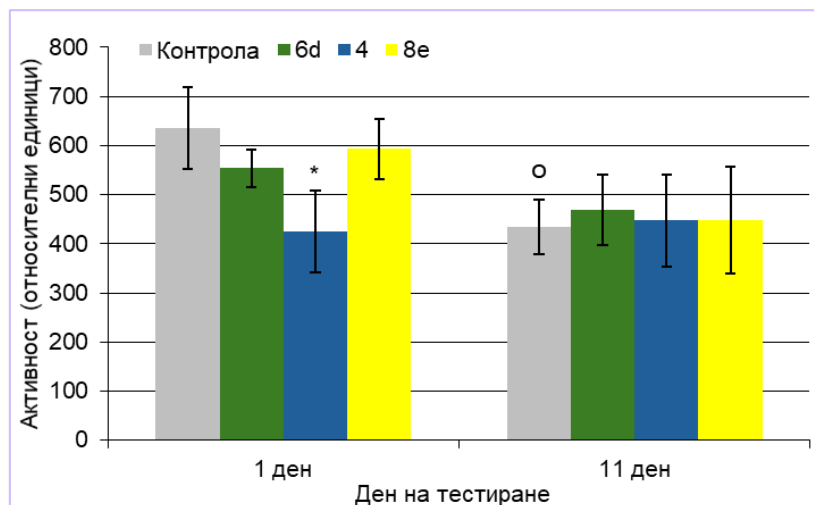
Таблица 4. Експериментални групи за изследване на двигателна активност и когнитивни способности на плъхове.

Група	Брой животни	Третирани с	Доза (на kg телесно тегло)
I	8	Физиологичен разтвор	1 mL/kg
II	8	6d	5 mg/kg
III	8	4	5 mg/kg
IV	8	8e	5 mg/kg

3.4.1. Activity cage тест

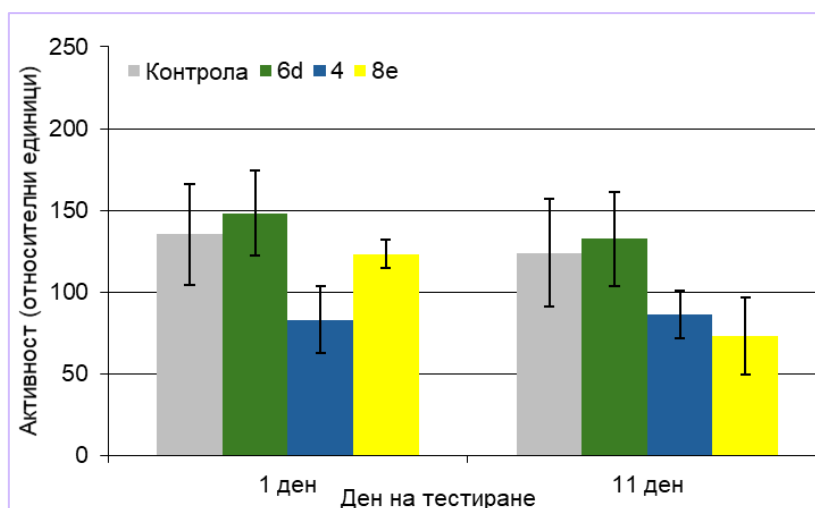
При този тест на първи ден експерименталната група плъхове, третирани със съединение 4, значимо понижи хоризонталната двигателна активност в сравнение с контролната група от същия ден (Фигура 12). Другите две групи плъхове, третирани с вещества 6d и 8e не промениха съществено броя хоризонтални движения спрямо контролната група от 1^{-ви} ден.

При ретест на 11^{-ти} ден контролната група значимо понижи броя хоризонтални движения ($p < 0,05$) спрямо първи ден на същата група. Плъховете, третирани с трите новосинтезирани съединения направиха брой хоризонтални движения близък до този на контролната група от същия ден.



Фигура 12. Хоризонтална двигателна активност – брой отчетени хоризонтални движения при тест Activity cage.

Легенда: $o = p < 0,05$ – сравнение на контролната група между първия и посочения ден на тестиране; $* = p < 0,05$ – сравнение на експерименталната група с контролната група от същия ден на тестиране.



Фигура 13. Вертикална двигателна активност – брой отчетени вертикални движения при тест Activity cage.

Групата, третирана с вещество **6d**, направи брой вертикални движения много близък до този на контролната група. Плъховете, третирани със съединения **4** и **8e**, намалиха броя вертикални движения както на 1^{-ви} ден, така и на 11^{-ти} ден спрямо контролните групи плъхове от съответните дни, но без статистическа значимост. По отношение на вертикалната двигателна активност не се отчита съществена разлика в броя на вертикалните движения при контролната група както на 1^{-ви}, така и на 11^{-ти} ден (Фигура 13).

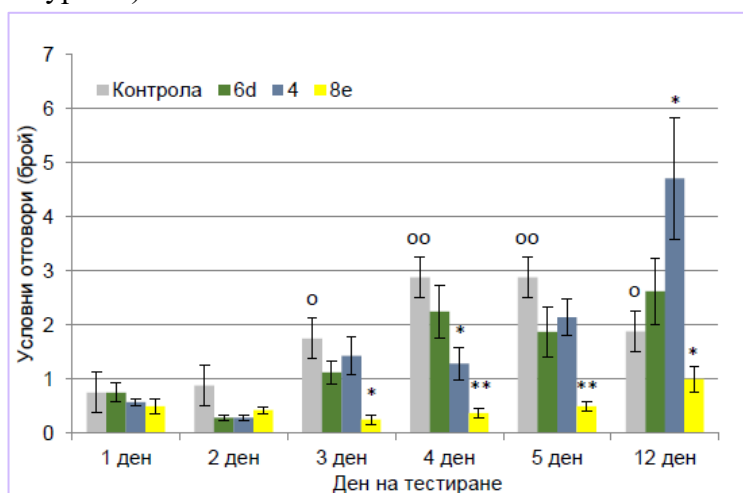
Получените резултати при този тест позволяват заключението, че новосинтезираните вещества не влошават двигателната активност на изследваните плъхове, нямат миорелаксиращо действие върху скелетната мускулатура, а също така не оказват изразен потискащ или възбуждащ ефект върху ЦНС.

3.4.2. Shuttle-box тест

При *Shuttle-box* теста за активно обучение контролната група плъхове значимо повиши броя условни отговори (авойданси) на 3^{-ти} ($p < 0,05$), 4-ти и 5^{-ти} ден обучение ($p < 0,01$), както и при теста за памет ($p < 0,05$), в сравнение с 1^{-ви} ден (Фигура 14). Плъховете, третирани с вещество **4**, намалиха броя авойданси на 4^{-ти} ден обучение ($p < 0,05$) спрямо контролната група от същия ден, но при теста за памет показаха значимо увеличение в техния брой ($p < 0,05$), в сравнение с контролната група от 12^{-ти} ден. Експерименталната група, третирана със съединение **8e** значимо намали броя условни отговори на 3^{-ти} ($p < 0,05$), 4^{-ти} и 5^{-ти} ден обучение ($p < 0,01$), както и при теста за памет на 12^{-ти} ден ($p < 0,05$), в сравнение с контролната група от същите дни.

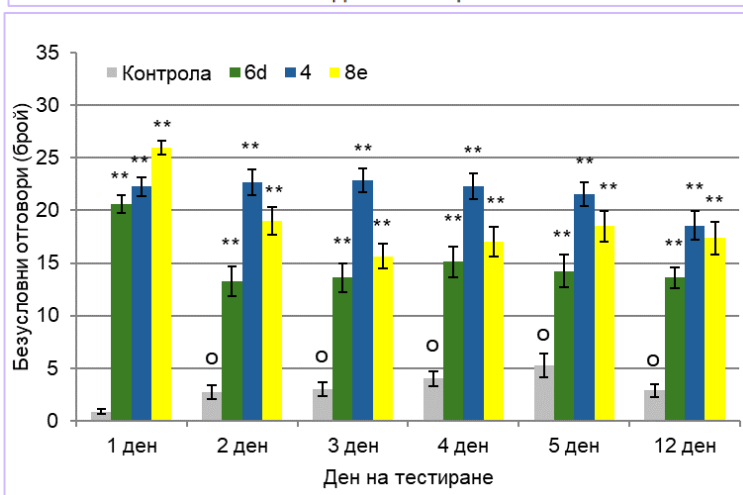
При същия тест контролната група увеличи броя безусловни отговори (ескейпи) на 2^{-ри}, 3^{-ти}, 4^{-ти} и 5^{-ти} ден обучение ($p < 0,05$), както и при теста за дълготрайна памет на 12^{-ти} ден ($p < 0,05$), в сравнение с 1^{-ви} ден на същата група (Фигура 15). Групите плъхове, третирани с трите новосинтезирани съединения значимо повишиха броя ескейпи по време на 5^{-те} дни обучение ($p < 0,01$), както и при теста за памет ($p < 0,01$), в сравнение с контролната група от съответните дни.

Трите групи плъхове, третирани с новосинтезираните съединения, значимо повишиха броя на междутренировъчните преминавания през 5^{-те} дни обучение ($p < 0,05$) и при теста за памет ($p < 0,05$), в сравнение с контролната група от съответните дни. Групата, приемала вещество **6d**, значимо увеличи ($p < 0,01$) броя междутренировъчни преминавания на 4^{-ти} ден обучение спрямо контролата от същия ден. Плъховете, третирани със съединение **4**, също значимо увеличи броя междутренировъчни преминавания на 5^{-ти} ден обучение ($p < 0,01$) спрямо контролната група на същия ден (Фигура 16).



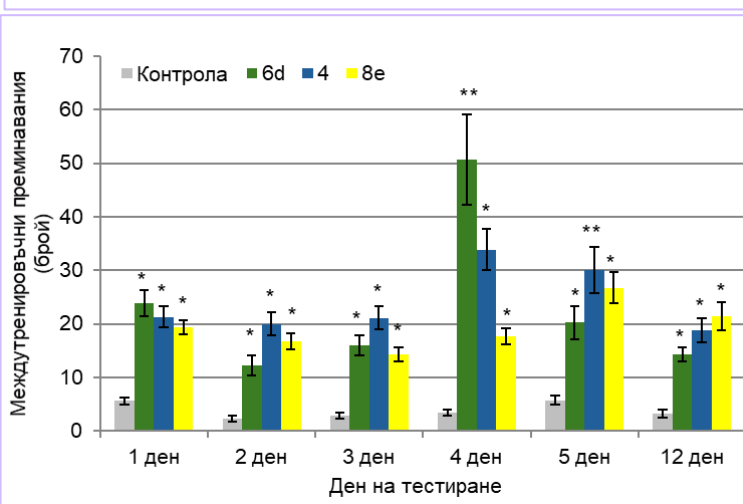
Фигура 14. Shuttle-box тест за активно обучение – брой условни отговори.

Легенда: o = $p < 0,05$ и oo = $p < 0,01$ – сравнение на контролната група между първия и посочения ден на тестиране; * = $p < 0,05$ и ** = $p < 0,01$ – сравнение на експерименталната група с контролната група от същия ден на тестиране.



Фигура 15. Shuttle-box тест за активно обучение – брой безусловни отговори.

Легенда: o = $p < 0,05$ – сравнение на контролната група между първия и посочения ден на тестиране; ** = $p < 0,01$ – сравнение на експерименталната група с контролната група от същия ден на тестиране.



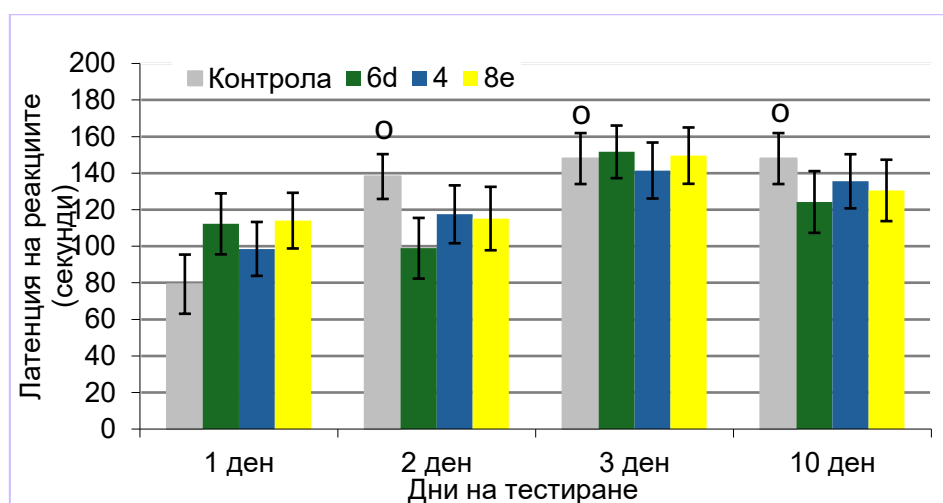
Фигура 16. Shuttle-box тест за активно обучение – брой междутренировъчни преминавания.

Легенда: * = $p < 0,05$ и ** = $p < 0,01$ – сравнение на експерименталната група с контролната група от същия ден на тестиране.

При *Shuttle-box* теста за активно обучение с наказателно подкрепление се установи, че трите съединения имат различни ефекти върху когнитивните функции обучение и памет. Съединение **8e** влошава както обучението, така и дълготрайната памет. Новосинтезираното съединение **4** не повлиява обучението, но подобрява трайно запаметяването. Веществото **6d** не повлиява съществено когнитивните функции. И трите изследвани съединения повишиха двигателната активност на животните, изразена с увеличаване брой междутренировъчни преминавания както по време на 5^{-те} дни обучение, така и при теста за памет.

3.4.3. Step-through тест

При *Step-through* теста за пасивно обучение контролната група плъхове значимо повишиха латентното време на престой в светлата част на апарата на 2^{-ри} ден обучение, както и при тестовите за краткотрайна ($p < 0,05$) и дълготрайна памет ($p < 0,05$), в сравнение с контролната група от 1^{-ви} ден (Фигура 17). Групите животни, третирани с трите изследвани съединения (**6d**, **4**, **8e**), по време на двудневната обучителна сесия и двата теста за памет направиха латенция на реакциите много близка до тази на контролната група от съответните дни. Въз основа на получените резултати от *Step-through* теста за пасивно обучение с наказателно подкрепление може да заключим, че трите изследвани съединения (**6d**, **4**, **8e**) не влошават процесите на обучение и памет на гризачи, показвайки резултати изключително близки до тези на контролната група.

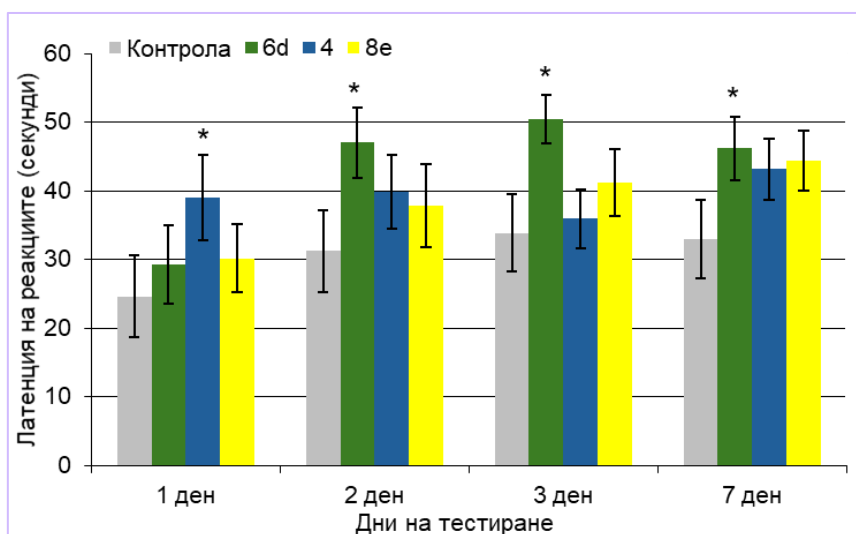


Фигура 17. *Step-through* тест за пасивно обучение с наказателно подкрепление.

Легенда: $o = p < 0,05$ – сравнение на контролната група между първия и посочения ден на тестиране.

3.4.4. Step-down тест

При този тест за пасивно обучение плъховете от контролната група повишиха леко, статистически незначимо, латентното време на престой върху вибриращата платформа на апарата по време на обучението, както и при двата теста за памет, в сравнение с първи ден (Фигура 18). Плъховете, третирани с вещество **4** значимо увеличиха латентното време на реакция на 1^{-ви} ден обучение ($p < 0,05$), спрямо контролата от същия ден. Групата, третирана със съединение **6d** увеличи значимо латенцията на реакциите на 2^{-ри} ден обучение ($p < 0,05$) и при двата теста за памет, в сравнение с контролните плъхове от същите дни. Плъховете, приемали съединение **8e**, също показаха увеличено латентно време по време на обучението и тестовете за памет, но то беше статистически незначимо.



Фигура 18. Step-down тест за пасивно обучение с наказателно подкрепление.

Легенда: * = $p < 0,01$ – сравнение на експерименталната група с контролната група от същия ден на тестиране.

При Step-down теста за пасивно обучение с наказателно подкрепление се установи, че вещество **4** подобрява само обучението, а съединението **6d** подобрява обучението, краткосрочната и дългосрочна памет. При този тест съединението **8e** не оказва съществен ефект върху когнитивните функции.

В заключение, трите изследвани съединения не влошават когнитивните функции и не потискат локомоторната активност на експериментални животни. Съединение 6d показва най-висок терапевтичен потенциал, подобрявайки както обучението, така и краткосрочната и дългосрочната памет. Тези резултати са най-добре изразени при Step-down теста, проведен последен по ред, което предполага натрупване на съединението и неговите ефекти след дългосрочно апликиране. Това обосновава необходимостта от бъдещи изследвания, включващи поне едномесечно предварително третиране със същите съединения, с цел сравнение на получените резултати с вече наличните данни.

ИЗВОДИ

1. За първи път по посочения метод с много добри добиви са получени 18 хибрида на антранилова киселина, от които 16 нови.

2. Всички синтезирани съединения са пречистени, изолирани и охарактеризирани с техните температури на топене и спектрални методи, в това число FT-IR, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, HRMS.

3. Измерена е спазмолитичната активност на всички синтезирани съединения, като за пет от тях (**6b** и **6d** от първа група, **4** от втора група, **8d** и **8e** от трета група) тази активност е по-добра в сравнение с познатия спазмолитик мебеверин.

4. Оценена е противовъзпалителната активност на всички синтезирани съединения по два метода *in vitro* и *ex vivo*. Всички изследвани съединения проявяват обещаваща защита срещу термичната денатурация на албумин, като най-силна активност демонстрират съединения **3** и **6d**. *Ex vivo* изследванията излъчват хибридите **6e**, **6d** и **5** като вещества със съществено инхибиращо действие върху синтеза на провъзпалителния цитокин IL-1 β , а хибриди **6e**, **4** и **7a** показват най-висока активност спрямо експресията на ензима nNOS.

5. Изследвана е активността на три от съединенията с много добра спазмолитична активност при повлияване паметови функции на експериментални животни, като едно от тях (**6d**) оказва значим ефект в процесите на памет и обучение.

6. Установена е много добра антимикробна активност за съединение **4** спрямо патогенните гъбички *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Penicillium chrysogenum* и *Rhizopus* sp. и умерена активност спрямо дрождите *Candida albicans* и *Saccharomyces cerevisiae*. Изследваните щамове Грам-положителни бактерии *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Micrococcus luteus* и Грам-отрицателни бактерии *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* и *Pseudomonas aeruginosa* проявяват умерена чувствителност по отношение на 3-хлорофенилетиламиновия антранилов хибрид **4** и диамидните му производни **7a–e**.

7. Установена е връзката структура–биологична активност за всяка от групите синтезирани съединения.

ПРИНОСИ

НАУЧНИ ПРИНОСИ

1. Осъществен е дизайн на малки молекули като спазмолитици и са намерени синтетични подходи за получаването им.
2. Теоретично е изследвано повлияването на спазмолитичната активност от въвеждането на различни заместители.
3. Намерени са ясни зависимости между молекулната структура и биологичната активност за синтезираните съединения, които могат да служат като основа за бъдещ рационален дизайн на биологичноактивни съединения.

НАУЧНО-ПРИЛОЖНИ ПРИНОСИ

1. За първи път, посредством предложения синтетичен метод, са получени 18 съединения, от които 16 представляват нови структури, непубликувани досега в научната литература.
2. За първи път е измерена спазмолитична активност на всички 18 синтезирани съединения и за пет от тях тази активност е по-добра в сравнение с познатия спазмолитик мебеверин.
3. Доказана е степен на биологична активност, характеризираща един от хибридите като вещество с функционални характеристики на спазмолитик с противовъзпалително действие, повлияващо паметовите функции при експериментални животни.

ПУБЛИКАЦИОННА АКТИВНОСТ

ПУБЛИКАЦИИ В РЕФЕРИРАНИ НАУЧНИ СПИСАНИЯ

1. **Milusheva M**, Gledacheva V, Stefanova I, Feizi-Dehneyebi M, Mihaylova R, Nedialkov P, Cherneva E, Tumbarski Y, Tsoneva S, Todorova M, Nikolova S et al. *Synthesis, Molecular Docking, and Biological Evaluation of Novel Anthranilic Acid Hybrid and Its Diamides as Antispasmodics*. IJMS 2023, 24, 13855. (Q1, IF 4.9) <https://doi.org/10.3390/ijms241813855>
2. **Milusheva M**, Todorova M, Gledacheva V, Stefanova I, Feizi-Dehneyebi M, Pencheva M, Nedialkov P, Tumbarski Y, Yanakieva V, Tsoneva S, Nikolova S et al. *Novel Anthranilic Acid Hybrids—An Alternative Weapon against Inflammatory Diseases*. Pharmaceuticals 2023, 16, 1660. (Q1, IF 4.3) <https://doi.org/10.3390/ph16121660> (
3. **Milusheva M**, Stoyanova M, Gledacheva, V Stefanova I, Todorova M, Pencheva M, Stojnova K, Tsoneva S, Nedialkov P, Nikolova S. *2-Amino-N-Phenethylbenzamides for Irritable Bowel Syndrome Treatment*. Molecules 2024, 29, 3375. (Q1, IF 4.2) <https://doi.org/10.3390/molecules29143375>

Получените резултати по представените научни разработки са намерили отзвук в химическата литература, като във връзка с тях са намерени **21** независими цитата (до 2025 г.) в базите данни *Scopus* и/или *Web of science*.

По данни от *Scopus* авторовият индекс на Хирш (**h-index**) е **4**.

УЧАСТИЯ В НАУЧНО-ИЗСЛЕДОВАТЕЛСКИ ПРОЕКТИ

1. Националната програма „Млади учени и постдокторанти – 2“ – модул млади учени, селекция 2022 г. от Фармацевтичен факултет, Медицински университет – Пловдив, 2022–2023 г.
2. Проект № BG-175467353-2023-13-0075-C01 от 15.12.2023 г. на тема „Дизайн, синтез и биологична активност на нови хибридни молекули за лечение на деменция“, ФНИ Конкурс за финансиране на фундаментални научни изследвания – 2023 г., с ръководител доц. д-р Стоянка Атанасова, 2023–2026 г.
3. Проект № Д23-ХФ-001 на тема „Получаване на фитоалексини и техни аналози с потенциал за приложение в растителната защита“ в рамките на проект ДУЕкоС при ПУ „Паисий Хилендарски“, с ръководител доц. д-р Стела Статкова-Абегхе, 2023–2025 г.
4. Проект № КП-06-М 63/8 от 15.12.2022 г. на тема „*Ex vivo* изследване на нови аналози на мебеверин“, ФНИ, Конкурс за финансиране на фундаментални изследвания на млади учени и постдокторанти – 2022, тематично направление „Медицински науки“, с ръководител гл. ас. д-р Мина Пенчева, 2022–2024 г.
5. Проект № МУ-ХФ-017 Националната програма „Млади учени и постдокторанти – 2“ – модул млади учени, селекция 2024 г. от Химически факултет, ПУ „Паисий Хилендарски“, 2024–2025 г.

ПРЕДСТАВЯНИЯ НА НАУЧНИ ФОРУМИ

Участия в международни конференции

- 1. Miglena Milusheva**, Mina Todorova, Stoyanka Nikolova, *Novel anthranilic acid hybrids – an alternative weapon against inflammatory pathologies*, e-poster, 9th International Electronic Conference on Medicinal Chemistry (ECMC 2023), **MDPI online, 1–30.11.2023.**
- 2. Miglena Milusheva**, Marinela Ivanova, Mina Todorova, Yulian Tumbariski, Stoyanka Nikolova, *Synthesis, In Silico, and In Vitro Evaluation of New Anthranilic Acid Hybrid with 2-(3-Chlorophenyl)ethylamine and Its Diamides*, oral presentation, IPSEC – 7th International Conference on Medical and Health Sciences, **Ordu, Turkiye, 6–8.07.2023.**
- 3. Miglena Milusheva**, Mina Todorova, Stoyanka Nikolova, *Computational methods for in silico prediction of chemical toxicity of 1,3-disubstituted 3,4-dihydroisoquinoline derivatives*, oral presentation, 4th International Black Sea Modern Scientific Research Congress, **Rize, Turkiye, 6–7.06.2023.**
- 4. Miglena Milusheva**, Snezhana Stoencheva, Mina Todorova, Mina Pencheva, Stoyanka Nikolova, *Design and synthesis of novel hybrid molecules as anticoagulants*, oral presentation, 3rd Eurasia International Scientific Research and Innovation Congress, **Ankara, Turkiye, 29–31.01.2024.**
- 5. Miglena Milusheva**, Snezhana Stoencheva, Mina Todorova, Mina Pencheva, Stoyanka Nikolova Atanasova, *Design, Synthesis, and Biological Evaluation of New Hybrid Molecules as Anticoagulants*, poster, 4th Molecules Medicinal Chemistry Symposium – Harnessing the Power of New Drug Modalities (MMCS 2024), **Barcelona, Spain, 24–26.04.2024.**
- 6. Kirila Stojnova**, Mina Todorova, Vera Gledacheva, **Miglena Milusheva**, Iliyana Stefanova, Stoyanka Nikolova Atanasova, *Synthesis and Spasmolytic Activity of 2-Amino-N-(3-Chlorophenethyl) Benzamide and Its Metal Complexes*, poster, 4th Molecules Medicinal Chemistry Symposium – Harnessing the Power of New Drug Modalities (MMCS 2024), **Barcelona, Spain, 24–26.04.2024.**
- 7. Mihaela Stoyanova**, **Miglena Milusheva**, Mina Todorova, Stoyanka Nikolova, *Synthesis, in silico, and in vitro evaluation of novel mebeverine analogs*, oral presentation, Ahi Evran 4th International Conference on Scientific Research, **Kirsehir, Turkiye, 28.04.2024.**
- 8. Vera Gledacheva**, Mihaela Stoyanova, **Miglena Milusheva**, Iliyana Stefanova, Yana Pashkulova, Mina Todorova, Kirila Stojnova, Stoyanka Nikolova, *Spasmolytic activity of novel mebeverine derivatives*, poster, Xth International Conference of Young Scientists, USB – Plovdiv, **Plovdiv, Bulgaria, 20–23.06.2024.**
- 9. Mihaela Stoyanova**, **Miglena Milusheva**, Vera Gledacheva, Mina Todorova, Iliyana Stefanova, Stoyanka Nikolova, *Synthesis and spasmolytic activity of novel mebeverine derivatives*, oral presentation, ISARC 2. International Black Sea scientific research and innovation congress, **Trabzon, Turkiye, 29-30.06.2024.**
- 10. Miglena Milusheva**, *When 2 Becomes 1: Assembling Novel Drug Molecules for IBS Treatment*, oral presentation, The 9th International USERN Congress and Prize Awarding Festival. Medical University of Plovdiv, **Bulgaria 8-10.11.2024.**

Участия в национални конференции

1. **Miglena Milusheva**, Vera Gledacheva, Spogami Khattak, Stoyanka Nikolova, *Application of computational methods for in silico prediction of chemical toxicity*, доклад, Конференция Наука и Младост 2023, МНД „Асклепий“, **Пловдив, България, 21–23.04.2023.**
2. **Miglena Milusheva**, Stoyanka Nikolova, *In silico methods for drug design and development of novel drug candidates*, доклад, 12th Chemistry Conference, **Пловдив, България, 13–14.10.2023.**
3. **Миглена Милушева**, Вера Гледачева, Илияна Стефанова, Мария Банялиева (студентка от ФФ, МУ-Пловдив), Стоянка Николова, *Синтез и спазмолитична активност на нови хибриди на антраниловата киселина и нейни диамиди като спазмолитици*, доклад, Фармация наука с бъдеще, **Пловдив, България, 17–19.11.2023.**
4. Вера Гледачева, **Миглена Милушева**, Илияна Стефанова, Мина Пенчева, Мария Банялиева, Стоянка Николова, *Новосинтезирани хибриди на антранилова киселина със спазмолитична и противовъзпалителна активност*, постер, Фармация наука с бъдеще, **Пловдив, България, 17–19.11.2023.**
5. Mihaela Stoyanova, **Miglena Milusheva**, Vera Gledacheva, Iliyana Stefanova, Mina Todorova, Kirila Stojnova, Stoyanka Nikolova, *Novel hybrid molecules as powerful spasmolytics*, постер, Инструментални техники и методи за химичен анализ – предизвикателства и нови решения, **Пловдив, България, 05.06. 2024.**
6. **Miglena Milusheva**, Mihaela Stoyanova, Vera Gledacheva, Iliyana Stefanova, Mina Todorova, Mina Pencheva, Kirila Stojnova, Slava Tsoneva, Stoyanka Nikolova, *Synthesis, spasmolytic activity and anti-inflammatory potential of some anthranilic acid hybrids*, доклад, Седма научна конференция за студенти, докторанти и млади учени „Предизвикателства в химията“, **Пловдив, България, 18–19.10.2024.**
7. Tedi Yordanova, **Miglena Milusheva**, Mihaela Stoyanova, Vera Gledacheva, Iliyana Stefanova, Mina Todorova, Mina Pencheva, Kirila Stojnova, Slava Tsoneva, Stoyanka Nikolova, *2-amino-N-phenethylbenzamides for irritable syndrome treatment*, постер, Седма научна конференция за студенти, докторанти и млади учени „Предизвикателства в химията“, **Пловдив, България, 18–19.10.2024.**
8. **Miglena Milusheva**, Mina Todorova, Kirila Stojnova, Vera Gledacheva, Mina Pencheva, Mihaela Stoyanova, Iliyana Stefanova, Stoyanka Nikolova, *Natural isoquinoline alkaloids affecting neurodegenerative diseases*, е-постер, Национална научна конференция на Института по невробиология, БАН, **София, България, 12–13.12.2024.**

БЛАГОДАРНОСТИ

Искам да изразя искрените си благодарности и уважение към моите научни ръководители за професионалната им отдаденост, менторството, подкрепата и вдъхновяващия личен пример.

Признателна съм на членовете на Научното жури за градивните критични бележки и препоръки по време на процедурата.

Изказвам благодарности на преподавателите в Химически факултет при Пловдивски университет „Паисий Хилендарски“, че отвориха вратата на науката пред мен, както и на учителите ми по природни науки и математика, които запалиха искрата на научното любопитство у мен.

Благодарна съм за възможността да започна академичната си кариера и да осъществя значителна част от биологичните експерименти на Медицински университет – Пловдив.

Благодаря на колегите си, които със своята подкрепа и съдействие допринесоха за моето професионално израстване.

Сърдечно благодаря на семейството ми за безусловната обич, търпение и вяра в мен.

Тази работа е резултат не само от усилие и познание, но и от търпение, вдъхновение и човешка подкрепа. Оттук нататък нося със себе си не само опита, но и дълбоката благодарност към хората, с които имах честта да споделя този път.

От автора