

## Хабилитационна разширена справка за научните приносите

на доц. д-р Деница Янчева Панталеева

за участие в конкурс за професор по: 4.2. Химически науки, научна специалност „Органична химия“ за нуждите на лаборатория „Структурен органичен анализ“

За участие в конкурса е приложен списък с **39** научни трудове, извън който са публикациите **(3,4,7-3-13)**, включени в дисертацията за образователната и научна степен „доктор“, и публикациите **(1,2,5,6,7,14-41)**, включени в конкурса за „доцент“. Научните трудове за конкурса (**39**) са публикувани в списания, индексирани в световните бази данни *Scopus* и *Web of Science* както следва: в списания, попадащи в категорията **Q1 (9 публ.)**; в списания, попадащи в категорията **Q2 (4 публ.)**, в списания, попадащи в категорията **Q3 (5 публ.)**; в списания, попадащи в категорията **Q4 (9 публ.)**; в списания със **SJR без IF (1 публ.)**; списания без индексация (**4 публ.**), в печатни издания от **доклади на конгреси (2 публ.)**, като **глава от книга (1 публ.)**. До юли 2019 г. са забелязани общо **152** цитата от списания, индексирани в световните бази данни *Scopus* и *Web of Science*, на **35** научни трудове, **64** от които на публикации в дисертацията за ОНС „доктор“ и представените в конкурса за „доцент“ и **88** – на публикациите, представени в настоящия конкурс за „професор“.

Всички научни трудове представени за участие в конкурса са в областта на органичната химия, и по-специално в получаването на нови органични съединения за медицински приложения, изследване на структурата, биологичната активност и свързаните с нея механизми на действие, анионни и радикал-анионни интермедиати, изследване на промените във вторичната структура на протеини при модификация с йонни течности и биоактивни молекули, идентифициране и охарактеризиране на органични и неорганични материали в художествени произведения и археологически артефакти.

Настоящата хабилитационната справка ще се спре по-обстойно на изследването на структурата и механизмите на антиоксидантно и прооксидативно действие на редица природни продукти от ванилинов тип, синтетични бензимидазолови производни,

нитроароматни съединения и съответно техни анионни и радикал-анионни интермедиати. Представянето на научните резултати ще бъде придружено от дискусия относно мястото на изследванията в съответната научна област и приноса им за изясняване на научните проблеми в нея.

## **1. Въведение**

Организмът е подложен на непрекъсната атака от свободни радикали, чиито източници могат да бъдат, както от околната среда, така и ендогенно формиращи се в резултат на нормалния клетъчен метаболизъм. Повишената продукция на реактивните кислородни радикали (ROS) води до нарушаване на съществуващото хомеостатично равновесие в клетките и невъзможност на антиоксидантния капацитет на организма да инхибира процесите, медиирани от свободните радикали, т.е. настъпва оксидативен стрес. Тези процеси включват увреждане на протеини и липиди и се свързат с редица патологични заболявания като рак, диабет, невродегенеративни нарушения, чернодробни, белодробни и сърдечно-съдови заболявания [1-6].

Смята се, че оксидативният стрес е ключов фактор в процесите на канцерогенеза, защото води до увреждания на клетъчната структура и функции, свързани с повишаване честотата на ДНК мутации, геномна нестабилност и повишена клетъчна пролиферация [7-9]. Известно е, че ROS действат в клетките като вторични прекурсори във вътреклетъчните сигнални каскади, които индуцират и поддържат онкогенния фенотип на раковите клетки, но ROS могат също така да индуцират клетъчно стареене и апоптоза и следователно да функционират като противотуморни агенти. Повишената продукция на ROS в резултат на ендогенни или екзогенни увреждания е характерна за повечето ракови клетки, при които се наблюдава променена сигнална трансдукция. Оксидативният стрес индуцира клетъчен редукционен дисбаланс, който е открит в различни ракови клетки в сравнение с нормалните клетки. Редукционният дисбаланс може да бъде свързан с онкогенна стимулация. ДНК мутацията играе ключова роля в канцерогенезата, като установяването на повишени нива на оксидативни ДНК промени (8-OH-G) са

потвърждение на тази роля. Всичко това прави антиоксидантите полезни терапевтични средства в борбата с раковите заболявания.

Занчителната чувствителност на невроклетките по отношение на оксидативния стрес се определя от различни фактори, включително по-силна зависимост от окислително фосфорилиране за набавяне на енергия, отколкото при другите клетки; излагане на високи концентрации на кислород; натрупване на метални йони в мозъка в процеса на стареене, които могат да са потенциални катализатори на образуването на окисляващи частици; също така те са богати на полиненаситени мастни киселини, които са склонни към окисление. В същото време, те съдържат относително малко количество антиоксиданти. В хода на невродегенеративните заболявания, капацитетът на клетките да поддържат окислително-редукционния баланс намалява, довеждайки до натрупване на свободни радикали, митохондриална дисфункция и неврологични увреждания [10-12].

Един от основните органи, които могат да се увредят от свободните радикали е черния дроб, който съдържа в големи количества полиненаситени мастни киселини, лесно вступащи в реакция на липидна пероксидация, която от своя страна е основна причина за възникването на оксидативен стрес. Някои от продуктите на липидната пероксидация, като малондиалдехид (MDA), могат да проявят потенциален мутагенен и канцерогенен ефекти. Счита се, че MDA може да реагира и с някои нуклеозиди, формирайки адукти с дезоксиаденозин и дезоксигуанозин и получавайки като основен продукт пиримидопуринон – пиримидо[1,2-а]пурин-10(3H)-он (M1G). Посредством този тип кондензационна реакция, M1G може да се прояви като мутаген [13]. При отсъствие на репарационни системи, MDA-ДНК адуктите могат да доведат до мутации, верижно разкъсване [13,14], блокиране на клетъчния цикъл и индукция на апоптоза [15].

Прилагането на антиоксиданти е водеща стратегия за превенция и лечение на заболявания, свързани с процесите на оксидативен стрес [1-3,7,12,16-20]. Във връзка с това са възникнали разнообразни подходи, основаващи се на прилагането на природни антиоксиданти – достъпни на човека чрез храната, получаването на техни синтетични производни или други органични съединения с антиоксидантни свойства, активиране на естествените антиоксидантни системи на организма и др.

От друга страна, химическите трансформации на лекарствата в човешкото тяло могат да доведат до образуването на опасни за здравето метаболити. Например, лекарства, съдържащи нитроароматен фрагмент като нитрофурантоин, нимезулид, нилутамид, флутамид и др., се свързват с проявата на хепатотоксичност произтичаща от биоредукцията на нитро групата [21-25]. Биоредукцията на нитроароматните съединения се състои в многоетапно превръщане в нитро анион радикал, нитрозо интермедиат, *p*-хидрокси производно и амин като краен продукт. Процесът се катализира от специфични ензими – най-често цитохром Р450 редуктаза (CYP), ксантин оксидаза, алдехид оксидаза, хинон редуктаза [25]. Цитотоксичността на тези съединения е дължи на образуващите се интермедиати в хода на биоредукцията, като например анион радикала, които могат да се свързват ковалентно с нуклеофилните центрове на протеините и ДНК. Като резултат от повтарящите се окислително-редукционни процеси оксидативният стрес се увеличава. Хепатоцитите, които са изложени на нитроароматни лекарства, като например флутамид, показват намаляване на съотношението GSH/GSSG [26] и предизвикват оксидативен стрес в клетките, както е документирано за нитрофурантоин [27]. Следователно изследването на нови нитроароматните съединения – кандидати за медицинско приложение, е важно с цел охарактеризиране на възможните редукционни продукти. Първата стъпка в механизма на действие на нитрохетероцикличните съединения като цитотоксични агенти спрямо хипоксидни клетки е редукция на нитрогрупата до съответния анион радикал [27].

## **2. Основни научни приноси**

### **2.1. Комбинирано DFT и ИЧ изследване на механизмите на действие и възможните интермедиати при антиоксидантното действие на природни антиоксиданти**

Изследвахме серия природни антиоксиданти: ванилин, неговия кетон – апоцинин [28] и сиригальдехид [29] за да хвърлим повече светлина върху механизмите им на антиоксидантно действие на молекулно ниво в полярна и неполярна среда.

Ванилинът, един от най-широко използваните ароматични компоненти проявява многофункционални ефекти като например антимуtagenен, анти-колитен, обезболяващ и др. Въпреки това, изследването на антиоксидантния му механизъм на действие продължават да поражда интерес, с цел да се изяснят съществуващите различия в някои от експерименталните резултати. Апоцининът (4-хидрокси-3-метокси-ацетофенон, ацетованилон) е биоактивна съставка на корените на хималайското растение *Picrorhiza kurroa*, и благодарение на инхибиторната си активност спрямо никотин аденин динуклеотид фосфат оксидазата (NADPH) показва силен противовъзпалителен ефект.

Окислителните процеси в биологичните системи включват множество свободни радикали, характеризиращи се с различна реактивоспособност: най-реактивоспособните хидроксилни радикали  $\cdot\text{OH}$ , които показват слаба селективност спрямо възможните места на атака; хидроксипероксилните  $\cdot\text{OOH}$ , които са по-слабо реактивоспособни, но могат да достигат отдалечени места в клетките и да инициират липидната пероксидация; липидните алкоксилни радикали  $\cdot\text{OR}$ , образуващи се от редукцията на пероксидите; и липидните пероксилни радикали  $\cdot\text{OOR}$ . Тази различна реактивоспособност на свободните радикали е свързана и с различна радикал-улавяща способност на антиоксидантите и затова в нашето изследване реактивоспособността на апоцинина и ванилина беше оценена спрямо редица свободни радикали въз основа на няколко механизма: директен пренос на водород (HAT), пренос на единичен електрон (SET-PT) и пренос на протон последван от електронен пренос (SPLET) в полярни и неполярни разтворители [28].

Изчислените енталпии на реакциите показаха, че в неполярна среда апоцининът и ванилинът реагират екзотермично с  $\cdot\text{OH}$  и алкоксилните ( $\cdot\text{OCH}_3$  и  $\cdot\text{OR}$ ) радикали по HAT механизъм в отрицателни  $\Delta\text{H}(\text{BDE})$  стойности, но не и с пероксилните ( $\cdot\text{OOH}$ ,  $\cdot\text{OOCH}_3$  и  $\cdot\text{OOR}$ ) и алкилните ( $\cdot\text{R}$ ) радикали. Беше установено също така, че апоцининът би могъл да обезврежда  $\cdot\text{OH}$  и алкоксилни ( $\cdot\text{OCH}_3$  и  $\cdot\text{OL}$ ) радикали по SPLET механизъм във вода. Според изчисленията  $\Delta\text{H}(\text{IP})$ , улавянето на  $\cdot\text{OOH}$  от апоцинин би било възможно единствено по SET механизъм във вода. Оценката на относителната активност на апоцинин и ванилин, направена въз основа на теоретично изчислените BDE стойности, е в добро съответствие с експерименталните данни от инхибирането на окислението на кроцин [30] и по метода ORAC [31]. При клетъчно-базиран антиоксидантен метод –

инхибиране на окислителна хемолиза (OxHLIA), в който окислението на еритроцитни мембрани се ААРН-инициирани хидроксипероксилни радикали, апоцининът е показал по-висока активност от ванилин, но ефектът е приписан на по-високата му липофилност и по-голямата му наличност в липофилните мембрани на еритроцитите [31].

Според теоретичните пресмятания, SPLET механизмът е предпочетен в разтворители, улесняващи йонизацията, като например вода, затова съответният оксанион на апоцинина беше генериран и охарактеризиран по-подробно чрез ИЧ и DFT методи.

Друг обект на изследванията ни беше сиригальдехидът, природен фенолен антиоксидант с антимикробно, противогъбично, противопаразитно, антидиабетно и антиоксидантно действие [29]. Способността му да обезврежда свободни радикали по НАТ, SET и SPLET механизъм беше изследвана чрез изчисляване на съответните енталпии на реакциите: енталпия на дисоциация, йонизационен потенциал и протонен афинитет на теоретично ниво DFT B3LYP/6-311++G\*\*. Пресмятанията бяха проведени в газова фаза, бензен, вода и DMSO за да бъде отчетено влиянието на средата (неполярните липидни мембрани и полярните физиологични течности), където може да протече антиоксидантното действие в живите организми, както и в различните експериментални *in vitro* условия.

Пресмятанията в газова фаза и бензен показаха, че НАТ механизъм е най-изгоден във неполярна среда. Сравнението на енталпия на дисоциация BDE на сиригальдехид с тази на ванилин посочи сиригальдехида като по-добър антиоксидант от ванилина по НАТ. Установено беше също така, сиригальдехидът би могъл ефективно да предотвратява липидната пероксидация, тъй като BDE на сиригальдехида е по-ниска от тази на метанола, използван в изследването като модел на липид. Относителната стабилност на радикалите на сиригальдехида и ванилина бяха оценени чрез разпределението на спиновата плътност, което се използва като мярка за делокализацията на несдвоен електрон по спрегната система. В бензен т.е. неполярна среда, пресмятанията показаха по-малка концентрация на спинова плътност върху феноксилния кислороден атом в радикала на сиригальдехида отколкото при на ванилина, подкрепяйки по този начин по-добрата стабилност на радикала на сиригальдехида и експериментално установения по-висок капацитет за улавяне на свободни радикали по НАТ механизъм.

Определената беше също, че сирингалдехидът се характеризира с по-ниски йонизационен потенциал IP отколкото ванилина в съответствие с експериментално установената му по-силна склонност да отдава електрон [30]. *Wright* е предложил да се IP на фенола като ефективен подход за оценяване на вероятността определено съединение да реагира по SET механизъм [32]: когато IP на антиоксиданта спадне със  $167 \text{ kJ mol}^{-1}$  под стойността на фенола, се очаква SET механизъмът да започне да протича в разтвора [32]. Все пак IP на ванилина и сирингалдехида са по-високи от този на фенола във вода, изчислени на едно и също теоретично ниво, следователно SET механизъмът трябва да се изключи като вероятен и за двете съединения.

От друга страна, протонният афинитет PA показва по-ниски енергетични изисквания за протичане на SPLET механизъм отколкото за HAT в полярна среда. Протонният афинитет на сирингалдехида слабо се различава от този на ванилина, но въз основа на изчислените енталпии за пренос на електрон ETE, феноксианионът на сирингалдехида притежава по-силна склонност да отдава електрон на свободните радикали (във втората стъпка на SPLET механизма). Това, комбинирано с по-високата стабилност на получаващия се радикал, доведе до заключението, че сирингалдехидът е по-силен антиоксидант от ванилина също и по SPLET механизъм. Същата относителна активност за ванилина, сирингалдехида и техните дендримери е определена и при изследвания по метода DPPH, при който експериментът е проведен в полярна среда от метанол и йонизацията на съединенията чрез SPLET допринася за тяхното радикал-улавящо действие [30,33,34]. Имайки предвид значението на анионната форма при SPLET механизма, изследвахме способността на сирингалдехида да образува анион в разтвор на DMSO- $d_6$  [29]. ИЧ спектралният анализ показва, че превръщането в оксанион води до силно понижаване на валентното C=O трептене и отместване на валентното Ph-O трептене към високи честоти, съпроводено с повишаване на интензивностите на алдехидната C-H ивица и на ивиците за ароматните скелетни трептения в областта  $1600\text{-}1400 \text{ cm}^{-1}$ . Въз основа на тези спектрални данни и теоретично изчислените структури параметри, беше заключено че структурата на оксаниона показва хиноно-подобна геометрия на *p*-фенилното ядро.

## **2.2. Изследване на механизма на антиоксидантно действие на синтетични антиоксиданти**

Мелатонинът (N-ацетил-5-метокситриптамин) е хормон на епифизата често прилаган при лечението на чернодробни заболявания, поради силните си директни и индиректни антиоксидантни свойства. Структурното сходство между мелатонина и бензимидазола се състои в приликата между имидазоловия и бензимидазоловия хетероцикл, както и във възможността за въвеждане на заместители в страничните вериги. Стратегията за дизайн на нови антиоксиданти като аналози на мелатонин е показала обещаващи резултати при предходни изследвания [35-38]. Установено е, че въвеждането на хидразонови групи в молекулата на мелатонина повишава антиоксидантната му активност [37]. Ефектът най-вероятно се дължи на повишаването на стабилността и на делокализацията на електроните в индоловия пръстен, което допринася за радикал-улавящите свойства чрез образуване на стабилен индолов радикал-катион.

До сега нашият екип успешно използва стратегията за разработване на бензимидазоли като структурни аналози на мелатонин. Бяха получени нови N,N'-дизаместени бензимидазол-2-тиони чрез нов синтетичен подход, използващ *aza*-присъединяване по Микаел [38]. Беше проведено пилотно проучване върху изолрани хепатоцити на плъх по начин, доставящ голямо количество живи и метаболитно-активни клетки. От изследванията бяха идентифицирани най-перспективните биологично-активни молекули с висока антиоксидантна и хепатопротективна активност, а именно 5-заместени бензимидазол-2-тиони. За да бъде оценено влиянието на структурата върху биологичните свойства, бяха използвани рентгеноструктурен анализ и DFT методи. Най-вероятните механизми на антиоксидантно действие са предложени след проведените DFT изчисления. За естерните производни на N,N'-дизаместените бензимидазол-2-тиони в неполярна среда възниква пренос на водороден атом от активираните алкилни групи в страничните вериги, намиращи се в съседство до карбонилната група. Като се вземат предвид изчисленияте BDE стойности на липидите, може да се заключи, че естерните производни ефективно улавят липидни алкоксидни радикали, но не и пероксидни. От тук следва, че протективният ефект на бензимидазол-2-тионовите естери срещу липидната пероксидация би трябвало да се изразява в улавяне на високо реакционно способните  $\text{HO}^\bullet$ , които



инициират процеса на пероксидация и формирането на алкоксидните радикали  $LO^{\bullet}$  при редукцията на липидните пероксиди. За хидразидните производни има още две възможни позиции за отцепване на водороден атом на всяка N-алкилна верига: от амидната N-H връзка и amino N-H връзките. DFT изчисленията показаха, че BDE стойността на амидната N-H връзка е по-ниска от тази на липидните пероксилни радикали и следователно хидразидните производни могат да улавят липидни пероксидни, както и алкоксилни радикали и да инхибират директно процеса на липидна пероксидация. Освен това се очаква, че от бензимидазол-2-тионите може лесно да се осъществява пренос на електрон към липидните радикали и да се образуват радикал-катиони в полярна среда. В случая с мелатонин, електронният пренос може веднага да бъде последван от пренос на протон и да се формира междинно циклично съединение, което е неутрален радикал, способен да улавя свободни радикали (образуване на адукт) и да инхибира липидната пероксидация. От друга страна, поради значителната спинова плътност върху S-атома, в радикал-катиона се предполага, че е възможен и още един начин за свързване на липидни радикали на това място и формиране на катионен адукт.

Тези изследвания бележат началото на последващото разработване на сходни съединения с потенциално приложение като инхибитори на оксидативния стрес при чернодробни заболявания. Синтезирахме серии N,N'-дизаместени бензимидазол-2-тиони като аналози на мелатонин с удължени странични вериги и изследвахме техните хепатопротективни свойства в модел на индуциран с терт-бутилхидропероксид оксидативен стрес в изолирани плъщи хепатоцити [39]. *In vitro* изследванията с Fe(II) индуцирано оксидативно увреждане показаха, че наблюдаваният хепатопротективен ефект може да се дължи на способността на изследваните съединения да защитават биологично-значими молекули. Установената връзка структура-активност даде важни сведения за последващо структурно оптимизиране и по-точно незаместеното бензимидазол-2-тионово ядро се доказва като по-благоприятстващ цитопротективната активност фрагмент в сравнение с 5-заместеното. Също така наличието на фенилхидразонова група с електрон-донорни заместители (метокси група) е по-благоприятно, отколкото с електрон-акцепторни заместители (флуорен атом).

1,3-Дизаместени бензимидазол-2-имини бяха синтезирани чрез използване на 5(6)-заместени-бензимидазолтиоли като прекурсори и тяхната антиоксидантна активност беше

изследвана спектрофотометрично за образуване на малондиалдехид (MDA), който е биомаркер за наличие на липидна пероксидация (ЛП) чрез формиране на комплекс MDA-тиобарбитурова киселина [40]. Естерът на 5-бензоилбензимидазолил производното, [3-(2-етокси-5-бензоил-2,3-дихидро-1H-бенимидазол-1-ил)]-ацетат, показва най-мощен инхибиращ липидната пероксидация ефект - 74,04% ( $IC_{50} = 141.89 \mu\text{g/mL}$ ). Изследването включваше 2-заместени тиазолобензимидазоли, както и 4-флуоробензилиден-7-(фенилкарбонил)-[1,3]тиазоло[3,2-a]бензимидазол-3(2H)-он, който се прояви като съединението с най-силна активност от групата на 2-заместените тиазолобензимидазоли с инхибиращ ефект 90,76% ( $IC_{50} = 53.70 \mu\text{g/mL}$ ). На базаата на изчислените енталпии на дисоциация на връзката се предположи, че иминобензимидазолите могат да действат като уловители на свободни радикали чрез отцепване на водороден атом от C-атом от страничните вериги, свързани към иминобензимидазоловия пръстен. Поради по-високите BDE стойности за алкилиденовите групи в бензимидазолите, HAT беше изключен като възможен механизъм на действие за тези съединения. Предположи се, че поради електроно-донорните свойства, тиазолобензимидазолоните могат да претърпят поетапно окисление чрез SET и да образуват радикал-катиони, способни да улавят липидни алкоксилни ( $LO^{\bullet}$ ), липидни пероксилни ( $LOO^{\bullet}$ ) или хидроксилни ( $^{\bullet}OH$ ) радикали и тогава да образуват междинен адукт и да прекратят процеса чрез пренос на протон.

Структурата и радикал-улавящата активност на друга група съединения, изоксазоло- и тиазолохидразинилхроман-2,4-диони беше изследвана чрез експериментални и DFT методи [42]. От изследванията на способността за улавяне на радикала на азотния оксид ( $NO^{\bullet}$ ), супероксидни анион-радикали ( $O_2^{\bullet-}$ ) и DPPH $^{\bullet}$  се установи забележително по-висока активност на съединенията с тиазолидинов пръстен за улавяне на азотен оксид ( $NO^{\bullet}$ ), в сравнение с кумарините с изоксазолидинов пръстен. Обяснението на този резултат се крие във факта, че според теоретично изчислените енталпии, за съединенията, притежаващи тиазолидинов пръстен SET механизмът се конкурира с HAT във водна среда. По този начин по-високата активност на тази група от съединения най-вероятно се дължи на способността им да обезвреждат свободните радикали едновременно по два механизма (HAT и SET) в полярна среда.

### 2.3. Изследване на прооксидантната активност на нитроароматни съединения

При изследванията за хепатотоксичност на N,N'-дизаместените бензимидазол-2-тиони, производните на 5-нитробензимидазола показаха много високия токсикологичен потенциал, установен чрез следене на клетъчната жизненост и промените в нивата на лактат дехидрогената, (LDH), редуциран глутатион (GSH) и малондиалдехид (MDA) [38,39]. Имайки предвид, че редукцията на нитро групата до нитро анион радикал може да е причина за високата хепатотоксичност, ние изследвахме възможността за формиране на нитро радикал анион на естера на 5-нитробензимидазола чрез електрохимично генериране и ИЧ изследване в разтвор на DMSO [41]. ИЧ данните и DFT изследванията показаха, че конверсията до радикал анион води до повишаване на честотата на C-NO<sub>2</sub> връзката, поради нейното скъсяване и увеличаване на порядъка ѝ, както и намаляване на честотата на N-O връзките в резултат на тяхното удължаване. Изводите бяха направени на базата на няколко характеристики, свързани с превръщането: неутралното съединение и радикал анионът имат копланарна ориентация на нитро групата спрямо ароматната система, което най-вероятно допринася за наблюдаваната токсичност; удължената спрегната електронна система има предимно спинова плътност (71 % от несдвоените електрони), локализирана върху нитро групата на радикал аниона; радикал анионът има удължено спрегната система спрямо неутралната молекула; присъствието на тионна група и N-алкилни вериги в бензимидазоловия пръстен допринасят благоприятно за намаляване на тенденцията за образуване на нитро радикал-аниони. Чрез сравняване на изчислените енергии на най-ниската незаета молекулярна орбитала (LUMO), енергетичната разлика между LUMO и НОМО, адиабатните електронни афинитети и енергетичната разлика между радикал аниона и неутралната молекула, с тези на други нитроарилни съединения, се установи, че склонността към биоредукция на нитро групата на изследваните нитробензимидазоли в биологичните системи е сравнима с тази на нитробензен и нимезулид и много по-ниска от тази на нитрофурантоин.

Електрохимичното превръщане на две нитроароматни лекарства, свързани с хепатотоксичност – нитрофурантоин [43] и нимезулид (аулин) [44] беше неотдавна проведена в разтвор на DMSO-d<sub>6</sub> и промените, произтичащи от превръщането бяха проследени чрез ИЧ-спектроскопия. В случая с нитрофурантоин, наблюдаваното честотно отместване, придружаващо превръщането в радикал анион беше по-голямо от наблюдаваното за динитробензени [45] и цианобензонитрили [46]. Значителната

локализация на несдвоен електрон при нитро групата показва висока реактивоспособност на образувания радикал-анион на нитрофурантоина и силна способност за инициране образуването на ROS чрез отдаване на електрон. Относно превръщането на нимезулид, като се вземат предвид теоретично предсказаните спектри за възможните продукти на редукцията, и по-точно (i) радикал анион в резултат от редукция с един електрон и (ii) дианион радикал в резултат от редукция с един електрон и последващо депротониране, може да се заключи, че в тези условия електрохимичната редукция на нимезулид води до формиране на радикал дианион [44].

#### **2.4. Синтез, биологична активност и връзка структура-активност на дидепсипептидни, бензимидазолови, тиенопиримидинови и 2-амино-5-алкилидентиазоло-4-онови производни**

Научните приноси в изследователската сфера се състоят не само в синтеза на нови съединения от фармакологичен интерес, но и в прилагането на спектроскопски техники, като ИЧ и ЯМР за характеризирането на нови съединения, подкрепено от детайлен теоретичен анализ на геометрията и електронната структура на молекулите. Проведени са серии от биологични изследвания за антибактериална, противоракова, антипаразитна, инхибираща активността на ксантинооксидазата и ДНаза I. Структурните характеристики, имащи влияние върху биологичната активност и взаимодействието с различни биологични мишени са щателно проучени чрез изчислителни методи и са доставили полезна информация за връзката структура-активност.. Синтезът, биологичната активност и структурното охарактеризиране на дидепсипептидните производни са обсъдени в публикации [47-51]. Публикациите [52,53] разглеждат тавтомерията и изомерията на различни групи бензимидазоли, изследването на инхибиращата активност спрямо ДНаза I и начините на взаимодействие с ензима. Публикациите [54-56] са фокусирани върху антихелминтна и противоракова активност на тиено[2,3-d]пиримидин-4-они и инхибираща активност спрямо ДНаза I, заедно с изясняване на структурните особености, повлияващи активността, възможните механизми на действие чрез взаимодействие с биологични мишени. Ксантиноксидазните инхибиращи свойства и противовъзпалителната активност на 2-амино-5-алкилидентиазол-4-они са представени в публикация [57].

Събраните данни позволяват да се избере най-обещаващия кандидат от новосинтезираните съединения за бъдещи фармакологични приложения. Освен това, установената връзка между структурата и активността на изследваните съединения може да се използва в по-нататъшния дизайн на нови производни с подобрени фармакологични свойства и по-ниска токсичност.

### **3. Перспективи за научни изследвания през следващите 5 години:**

Като отражение на настоящите ми научни интереси и придобития опит, през следващите 5 години смята да фокусирам работата си (в сътрудничество с колегите от лабораторията и учени от други научни институции) основно в следните направления:

#### **3.1. Дизайн, синтез, структурно охарактеризиране и изучаване на механизмите на биологично действие на нови бензимидазолови производни**

Потенциалът на бензимидазоловата архитектура за разработване на нови неопластични средства е добре познат. В клиничната практика като антинеопластици са намерили приложение редица бензимидазоли като Nocodazole, Bendamustine, Dovitinib, Honech 33342. 2-Аминобензимидазоловият хетероцикл, присъстващ като структурен скелет в различни биологично-активни молекули, е от решаващо значение като прекурсор за генериране на нови производни с антитуморна активност. В тази връзка, много 2-аминобензимидазоли, някои от които с хидразонові фрагменти, са били синтезирани и са показали антитуморна активност спрямо различни клетъчни линии. Въз основа на наличните литературни данни за връзка между оксидативният стрес и процесите на канцерогенеза, интерес представлява проучването на вещества с антиоксидантна активност като възможни противотуморни агенти и изясняване на вероятните механизмите, по които те проявяват тези ефекти. Като се има предвид, че всяка модификация в структурата може да доведе до промяна в активността, токсичността и селективността на определена група биоактивни съединения, интерес представлява синтезът на различни видове бензимидазолови производни: нови бензимидазоли, съдържащи арилхидразониови или тиенопиримидинови фрагменти, хидразони на 1,3,5-заместени бензимидазол-2-тиони; 1,3,5-заместени бензимидазол-2-имины и техните хидразони, hydrazones; 5(6)-заместени бензимидазол-2-хидразони, 2-заместенитиазолобензимидазолони и др.

Следващи цели на изследванията ще бъдат: изследване на антинеопластична активност на синтезираните вещества; изследване на антиоксидантната активност в

биологично релевантни системи и механизмите на антиоксидантното действие; изследване на хепатотоксичността и възможните хепатопротективни и невропротективни свойства; изследване на молекулните дескриптори и вероятните механизми на антиоксидантно действие; изследване на взаимодействията лиганд-рецептор чрез теоретични методи.

Синтезираните бензимидазоли трябва да притежават редица структурни особености - различни заместители и няколко възможни места за водородни взаимодействия, които биха могли да повлияят техните физико-химични свойства и съответно биологичната им активност и взаимодействие с биологичните мишени. Във връзка с това, дизайнът и синтезът на бензимидазоловите прекурсори чрез вариране на структурните им фрагменти са първата стъпка за постигане на целта на проекта. Промените в структурата на основните моделни съединения могат да засилят взаимодействието на новосинтезираните молекули с биологичните мишени. Като следваща стъпка, структурните особености и свързаните с тях физико-химични свойства ще бъдат охарактеризирани чрез подходящи аналитични методи. Изучаване на техните свойства и възможностите за образуване на метални комплекси също ще бъдат цел на изследванията, тъй като са важни характеристики за взаимодействието им с каталитичните активни центрове на металоензимите и свързването с ДНК.

Бензимидазолови производни като албендазол, фебендазол, мебендазол, нокодазол и др., са широкоизползвани като антипаразитни лекарства в медицината, както и за други медицински приложения, тъй като селективно могат да се свързват с бета-тубулина в паразитите, а в някои случаи - с човешки бета-тубулин. Като ключов структурен компонент на микротубулите, тубулинът се смята за подходяща и обещаваща мишена за разработване на противоракова терапия. Имайки това предвид, способността на бензимидазоловия производни да повлияват полимеризацията на тубулина ще бъде изследвана в детайли.

Като продължение на настоящите ни научни насоки, значителна част от усилията ни ще бъдат посветени на изследване на цитопротективните, по-специално хепатопротективни и невропротективни свойства на бензимидазолите.

### **3.2. ИЧ изследване на вторичната структура на протеини**

През последните години разширих своя опит в ИЧ изследванията на вторична структура на протеина, изучавайки модификацията на няколко протеини в сътрудничество с колегите от лабораторията по химия и биофизика на протеините и ензимите отнашия институт. Това доведе до успешното публикуване на поредица от публикации, обхващащи различни аспекти на модификация, стабилност, промените във вторичната структура и биологична активност на липаза, инсулин и хемоцианин [58-64]. В следващите години изследванията върху тези макромолекули ще бъдат продължени и доразвити чрез изясняване на взаимодействията на албумин с терапевтично важни съединения, нови лекарствени кандидати и др.

### **3.3. Спектроскопски изследвания на материали от културното наследство**

В световен мащаб изследването на състава на различни художествени материали и археологически артефакти е безспорно актуална тема. Богатата култура и изкуство, които се развиват хилядолетия на територията на съвременна България, са предпоставка за напредъка на националните ценности и идентичност и имат важно отражение върху растежа на редица икономически сектори. Това създава големи предизвикателства при тяхното изучаване и опазване и представлява важна отговорност за страната, културните, образователните и научните институции и обществото като цяло. Науката и технологиите играят важна роля за осъществяването на тези дейности.

През последните няколко години в лаборатория „Структурен органичен анализ” на ИОХЦФ – БАН в партньорството с катедра „Реставрация” при НХА започна системна работа по анализиране на неорганични и органични материали от културни ценности. Досега са анализирани и реставрирани картини от различни галерии и музеи и са изработени и защитени редица магистърски тези. При изпълнението на проекта ДФНИ K02-15, финансиран от ФНИ на базата на вибрационен анализ, комбиниран с данните от прахов рентгеноструктурен анализ, елементен анализ (XRD, SEM-EDS), диференциално-



сканираща калориметрия (DSC) и др. бяха изследвани произведения на изящното и приложното изкуство от различни периоди като: стенописната украса в Тракийски гробници от 4-3 в. пр.н.е.; стенописната украса на църква, датираща от 13 в., част от античен културно-комуникационния комплекс „Сердика”; стенописи в централния храм “Рождество Богородично” на Рилския манастир, изработени в различни периоди от най-добрите майстори зографи на българското Възраждане - Димитър Зограф и Захари Зограф; стенописите в храм “Св.Иван Рилски ”, Курилски манастир, изографисани през 1596 г.; полихромиран проскинитарий (поставка за икони или свети мощи) от Курилския манастир. Резултатите от работата в тази област са публикувани в поредица публикации [65-68]. Дейността в тази насока ще бъде обект на работата ми и през следващите 5 години.

#### 4. Библиография:

(\* статиите, участващи в този конкурс са означени в черен шрифт)

1. S. Reuter, S. C. Gupta, M. M. Chaturvedi, B. B. Aggarwal, Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked?, *Free Radic Biol Med.*, 2010, 49, 1603–1616.
2. J. W. Stephens, S. L. Priorm, Cardiovascular and Metabolic Disease:Scientific Discoveries and New Therapies, Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2015
3. A. C. Maritim, R. A. Sanders, J. B. Watkins III, Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review, *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 17 (2003)
4. M. Valko, C. Rhodes, J. Moncol, M. Izakovic, M. Mazur, *Chem.-Biol. Interact.* 160 (2006) 1-40.
5. B. Halliwell, *J. Neurochem.*, 97 (2006) 1634-1658
6. M. Cooke, M. Evans, M. J. Lunec, *FASEB J.* 17 (2003) 1195-1214.
7. J. Fang, Seki T, Maeda H. Therapeutic strategies by modulating oxygen stress in cancer and inflammation. *Adv Drug Deliv Rev.* 2009;61:290–302.
8. L. Khandrika, B. Kumar, S. Koul, P. Maroni, H.K. Koul, Oxidative stress in prostate cancer. *Cancer Lett.*, 2009, 282, 125-136.
9. R. Visconti, D. Grieco, New insights on oxidative stress in cancer. *Curr Opin Drug Discov Devel.*, 2009, 12, 240-245.
10. G. Perry, A. D. Cash, M. A. Smith, Alzheimer Disease and Oxidative Stress, *J. Biomed. Biotechnol.* 2002, 2, 120-123.
11. P. Jenner, Oxidative stress in Parkinson's disease, *Annals Neurol.*, 2003, 53 S26-S38.
12. A.N. Carvalho, O. Firuzi, M.J. Gama, J.V. Horssen, L. Saso, Oxidative Stress and Antioxidants in Neurological Diseases: Is There Still Hope?, *Curr. Drug Targets*, 2017, 18, 705-718.
13. L.J. Niedernhofer, J.S. Daniels, C.A. Rouzer, R.E. Green, L.J. Marnett, Malondialdehyde, a product of lipid peroxidation, is mutagenic in human cells, *J. Biol. Chem.*, 2003, 278, 31426-31433.
14. C. Ji, C.A. Rouzer, L.J. Marnett, J.A. Pietenpol, Induction of cell cycle arrest by endogenous product of lipid peroxidation, malondialdehyde. *Carcinogen.*, 1998, 19, 1275-1283.
15. M.S. Willis, L.W. Klassen, D.L. Carlson, C.F. Brouse, G.M. Thiele, Malondialdehyde-acetaldehyde haptenated protein binds macrophage scavenger receptor(s) and induces lysosomal damage, *Int. Immunopharmacol.*, 2004, 4, 885-899.
16. S. Li, H.-Y. Tan, N. Wang, Z.-J. Zhang, L. Lao, C.-W. Wong, Y. Feng, The Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Liver Diseases, *Int J Mol Sci.* 2015, 16, 26087–26124
17. J. Medina, R. Moreno-Otero, Pathophysiological basis for antioxidant therapy in chronic liver disease, *Drugs.* 2005, 65, 2445-2461.

18. B. Ngo, J.M. Van Riper, L.C. Cantley, J. Yun, Targeting cancer vulnerabilities with high-dose vitamin C, *Nat. Rev. Cancer*, 2019, 19, 271-282.
19. G. Di Bella, F. Mascia, L. Gualano, L. Di Bella, Melatonin Anticancer Effects: Review, *Int. J. Mol. Sci.*, 2013, 14, 2410-2430.
20. M. Karbownik, Potential anticarcinogenic action of melatonin and other antioxidants mediated by antioxidative mechanisms. *Neuro Endocrinol. Lett.*, 2002, 23, 39-44.
21. S.N.J. Moreno, R.P. Mason, R. Docampo, Distinct reduction of nitrofurans and metronidazole to free radical metabolites by *Tritrichomonas foetus* hydrogenosomal and cytosolic enzymes, *J. Biol. Chem.*, 1984, 259, 6298–6305.
22. P. Wardman, Some reactions and properties of nitro radical-anions important in biology and medicine, *Environ. Health Perspect.*, 1985, 64, 309–320.
23. D.N.R. Rao, R.P. Mason, Generation of Nitro Radical Anions of Some Nitrofurans, 2- and 5-Nitroimidazoles by Norepinephrine Dopamine, and Serotonin. A Possible Mechanism for Neurotoxicity caused by Nitroheterocyclic Drugs. *J. Biol. Chem.*, 1987, 262, 11731–11736.
24. D. Fau, A. Berson, D. Eugene, B. Fromenty, C. Fisch, D. Pessayre, Mechanism for the hepatotoxicity of the antiandrogen, nilutamide. Evidence suggesting that redox cycling of this nitroaromatic drug leads to oxidative stress in isolated hepatocytes, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1992, 263, 69–77.
25. U.A. Boelsterli, H.K. Ho, S. Zhou, K.Y. Leow, Bioactivation and hepatotoxicity of nitroaromatic drugs, *Curr. Drug Metab.*, 2006, 7, 715–727.
26. D. Fau, D. Eugene, A. Berson, P. Letteron, B. Fromenty, C. Fisch, D. Pessayre, Toxicity of the antiandrogen flutamide in isolated rat hepatocytes, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1994, 269, 954–962.
27. J.C. Paterna, F. Boess, A. Stäubli, U.A. Boelsterli, Antioxidant and cytoprotective properties of D-tagatose in cultured murine hepatocytes, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 1998, 148, 117–125.
28. **D. Y. Yancheva, S. S. Stoyanov, E. A. Velcheva, B. A. Stamboliyska, A. Smelcerovic, DFT study on the radical scavenging capacity of apocynin with different free radicals, *Bulg. Chem. Commun.*, 2017, 49SE-B, 137-144.**
29. **D. Yancheva, E. Velcheva, Z. Glavcheva, B. Stamboliyska, A. Smelcerovic, Insights in the radical scavenging mechanism of syringaldehyde and generation of its anion, *J. Mol. Struct.*, 2016, 1108, 552-559.**
30. R. Bortolomeazzi, N. Sebastianutto, R. Toniolo, A. Pizzariello, *Food Chem.*, 2007, 100, 1481–1489.
31. A. Tai, T. Sawano, F. Yazama, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2011, 75, 2346-2350.

32. J.S. Wright, E.R. Johnson, G.A. DiLabio, Predicting the Activity of Phenolic Antioxidants: Theoretical Method, Analysis of Substituent Effects, and Application to Major Families of Antioxidants, *J. Am. Chem. Soc.*, 2001, 123, 1173-1183.
33. S.S. Kuma, K.I. Priyadarsini, K.B. Sainis, Free radical scavenging activity of vanillin and o-vanillin using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical, *Redox Rep.*, 2002, 7, 35-40.
34. C.Y. Lee, A. Sharma, J.E. Cheong, J.L. Nelson, Synthesis and antioxidant properties of dendritic polyphenols, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2009, 19, 6326-6330.
35. H. Shirinzadeh, B. Eren, H. Gurer-Orhan, S. Suzen, S. Özden, Novel Indole-Based Analogs of Melatonin: Synthesis and in Vitro Antioxidant Activity Studies, *Molecules* 2010, 15, 2187-2202.
36. S. Suzen, Melatonin and Synthetic Analogs as Antioxidants, *Current Drug Delivery*, 2013, 10, 71-75.
37. A. D. Yilmaz, T. Coban , and S.Suzen, Synthesis and antioxidant activity evaluations of melatonin based analogue indole-hydrazide/hydrazone derivatives, *J Enzym Inhib Med Chem*, 2012, 3, 428-36.
38. **N. O. Anastassova, A. Ts. Mavrova, D. Y. Yancheva, M. S. Kondeva-Burdina, V. I. Tzankova, S. S. Stoyanov, B. L. Shivachev, R. P. Nikolova, Hepatotoxicity and antioxidant activity of some new N,N-disubstituted benzimidazole-2-thiones, radical scavenging mechanism and structure-activity relationship. *Arab. J. Chem.* (2017) doi.org/10.1016/j.arabjc.2016.12.003.**
39. **N. Anastassova, D. Yancheva, A. Mavrova, M. Kondeva-Burdina, V. Tzankova, N. Hristova-Avakumova, V. Hadjimitova, Design, synthesis, antioxidant properties and mechanism of action of new N,N'-disubstituted benzimidazole-2-thione hydrazone derivatives, *J. Mol. Struct.*, 2018, 1165, 162-176.**
40. **A. Ts. Mavrova, D. Yancheva, N. Anastassova, K. Anichina, J. Zvezdanovic, A. Djordjevic, D. Markovic, A. Smelcerovic, Synthesis, electronic properties, antioxidant and antibacterial activity of some new benzimidazoles, *Bioorg. Med. Chem.*, 2015, 23, 6317–6326.**
41. **D. Yancheva, S. Stoyanov, N. Anastassova, A. Ts. Mavrova, IR study on the electrochemical generation of a nitro radical anion by a hepatotoxic N,N-disubstituted benzimidazole-2-thione. *Vibr. Spectrosc.*, 2017, 92, 200-214.**
42. **Stamboliyska, B., Jashari, A., Yancheva, D., Mikhova, B., Batovska, D., Popovski, E., Mladenovska, K.. Structure and radical scavenging activity of isoxazolo- and thiazolohydrazinylidene-chroman-2,4-diones, *Bulg. Chem. Commun.*, 2017, 49D, 99-105.**
43. **A. Popova, S.Stoyanov, D. Yancheva, Generation and combined study on the chemicalstructure of nitrofurantoin radical anion. *Maced. Pharm. Bull.*, 2016, 62, 241-242.**
44. **S.Stoyanov, D. Yancheva, A. Kosateva, IR study on the electrochemical reduction of nimesulide. *Bulg. Chem. Commun.*, 2017, 49D, 181-188.**
45. **D. Y. Yancheva, Characterization of the structure, electronic conjugation and vibrational spectra of the radical anions of p- and m-dinitrobenzene: A quantum chemical study, *Bulg. Chem. Commun.*, 2013, 45, 24-31.**

46. I. Juchnovski, Ch. Tsvetanov, I. Panayotov, IR spectra of anion-radicals of aromatic mono-nitriles, and electron transitions between anion radicals and neutral molecules, *Monatsh. Chem.*, 1969, 100, 1980-1992.
47. Yancheva, D., Cherneva, E., Quick, M., Mikhova, B., Shivachev, B., Nikolova, R., Djordjevic, A., Untergehrer, M., Jürgenliemk, G., Kraus, B., Smelcerovic, A.. Synthesis, crystal structure and biological activity screening of novel N-( $\alpha$ -bromoacyl)- $\alpha$ -amino esters containing valyl moiety, *Acta Chim. Slov.*, 62, 2015, 689-699.
48. M. Vukelić-Nikolić, A. Kolarević, K. Tomović, D. Yancheva, E. Cherneva, S. Najman, A. Šmelcerović, Effects on MC3T3-E1 Cells and In silico Toxicological Study of Two 6-(Propan-2-yl)-4-methyl-morpholine-2,5-diones, *Nat. Prod. Commun.* 10, 1423-1426 (2015).
49. Ž. Šmelcerović, M. Rangelov, E. Cherneva, G. Kocić, S. Stojanović, T. Jevtović-Stoimenov, Ž. Petronijević, D. Yancheva, Inhibition mechanism and molecular modelling studies of interactions of 6-(propan-2-yl)-3-methyl-morpholine-2,5-dione to xanthine oxidase, *Bulg. Chem. Commun.*, 2015, 47, 783–787.
50. Ž. Šmelcerović, K. Tomović, D. Yancheva, E. Cherneva, G. Kocić, Ž. Petronijević, Xanthine oxidase inhibitory properties and in silico study of three N-( $\alpha$ -bromoacyl)- $\alpha$ -amino esters, *Acta Med. Medianae*, 2016, 55, 14-20.
51. E. Cherneva, D. Yancheva, N. Anastassova, B. Mikhova, L. Daskalova, S. Stanchev, A. Djordjevic, A. Smelcerovic, Antibacterial activity of three synthetic cyclodipeptides, *Acta Microbiol. Bulg.*, 2017, 33, 65-73.
52. Anichina, K., Mavrova, A. Ts., Yancheva, D., Tsenov, J., Dimitrov, R.. Tautomerism and isomerism in some antitrichinellosis active benzimidazoles: Morphological study in polarized light, quantum chemical computations, *J. Mol. Struct.*, 2017, 1150, 179-187.
53. A. Kolarević, B. S. Ilić, N. Anastassova, A. Ts. Mavrova, D. Yancheva, G. Kocić, A. Šmelcerović, Benzimidazoles as novel deoxyribonuclease I inhibitors, *J. Cell. Biochem.*, 2018, 119, 8937-8948.
54. Mavrova, A. Ts., Dimov, S., Vuchev, D., Anichina, K., Yancheva, D., Antihelminthic Activity of Some 2-Substituted Thieno[2,3-d]pyrimidine-4-ones, *Let. Drug Des. Disc.*, 2018, 15, 887-894.
55. A. Ts. Mavrova, S. Dimov, D. Yancheva, M. Rangelov, D. Wesselinova, J. A. Tsenov, Synthesis, anticancer activity and photostability of novel 3-ethyl-2-mercapto-thieno[2,3-d]pyrimidin-4(3H)-ones, *Eur. J. Med. Chem.*, 2016, 123, 69-79.
56. A. Ts. Mavrova, S. Dimov, D. Yancheva, A. Kolarević, B. S. Ilić, G. Kocić, A. Šmelcerović, Synthesis and DNase I inhibitory properties of some 5,6,7,8-tetrahydrobenzo[4,5]thieno[2,3-d]pyrimidines, *Bioorg. Chem.*, 2018, 80, 693-705.

57. Z. Smelcerovic, A. Veljkovic, G. Kocic, D. Yancheva, Z. Petronijevic, M. Anderluh, A. Smelcerovic, Xanthine oxidase inhibitory properties and anti-inflammatory activity of 2-amino-5-alkylidenethiazol-4-ones, *Chemico-Biol. Interact.*, 2015, 229, 73-81.
58. M. Guncheva, K. Paunova, D. Yancheva, I. Svinyarov, M. Bogdanov, Effect of two series ionic liquids based on non-nutritive sweeteners on catalytic activity and stability of the industrially important lipases from *Candida rugosa* and *Rhizopus delemar*, *J. Mol. Catal. B – Enzym.*, 117, 62-68 (2015)
59. M. Guncheva, K. Paunova, P. Ossowicz, Z. Rozwadowski, E. Janus, K. Idakieva, S. Todinova, Y. Rainova, V. Uzunova, S. Apostolova, R. Tzoneva, D. Yancheva, Modification of hemocyanin from *Rhapana thomaciana* with choline amino acid salts significantly enhances its antiproliferative activity against MCF-7 human breast cancer cells, *RSC Adv.*, 5, 63345 - 63354 (2015)
60. M. Guncheva, K. Paunova, P. Ossowicz, Z. Rozwadowski, E. Janus, K. Idakieva, S. Todinova, Y. Raynova, V. Uzunova, S. Apostolova, R. Tzoneva, D. Yancheva, *Rapana thomaciana* hemocyanin modified with ionic liquids with enhanced anti breast cancer activity, *Int. J. Biol. Macromol.*, 82, 798-805 (2016)
61. S. Todinova, M. Guncheva, D. Yancheva, Thermal and conformational stability of insulin in the presence of imidazolium-based ionic liquids, *J. Therm. Anal. Calorim.*, 123, 2591–2598 (2016)
62. M. Guncheva, D. Yancheva, P. Ossowicz, E. Janus, Structural basis for the inactivation of *Candida rugosa* lipase in the presence of amino acid ionic liquids, *Bulg. Chem. Commun.*, 49, SE-B, 132-136 (2017).
63. M. Guncheva, D. Yancheva, V. Uzunova, P. Ossowicz, K. Idakieva, Y. Raynova, E. Janus, R. Tzoneva, Structural destabilization and enhanced cytotoxicity on murine fibroblasts of *Helix pomatia*  $\beta$ -hemocyanin in presence of four cholinium amino acids, *Bulg. Chem. Commun.*, 49, SE-D, 82-86 (2017).
64. M. Guncheva, P. Ossowicz, E. Janus, S. Todinova, D. Yancheva, Elucidation of the effect of some cholinium amino acid ionic liquids on the thermal and the conformational stability of insulin, *J. Mol. Liquids*, 283, 257-262 (2019).
65. Z. Glavcheva, D. Yancheva, E. Velcheva, B. Stamboliyska, N. Petrova, G. Lalev, V. Todorov, Analytical Studies Of The Alexandrovo Thracian Tomb Wall Paintings, *Spectrochim. Acta A*, 152, 622-628 (2016).
66. E. Velcheva, S. Tapanov, D. Yancheva, S. Soyakov, B. Stamboliyska, Multi-Analytical Study on the Mural Paintings from Kurilo Monastery “St. Ivan Rilski”, Bulgaria, *Bulg. Chem. Commun.*, 49, SE-D, 289-294 (2017).
67. Г. Нехризов, Г. Авдеев, Е. Тарасова, М. Тарасов, Р. Титоренкова, Н. Петрова, Б. Стамболийска, М. Рогожеров, Д. Янчева, Р. Кукева, П. Марков, Д. Нихтянова, Ц.

**Димитров, Р. Стоянова, Сравнителен анализ на пигменти, пигментирани мазилки и строителни материали, използвани при изграждането на тракийските култови съоръжения, Сборник, 2017.**

- 68. D. Yancheva, S. Tapanov, E. Velcheva, B. Stamboliyska, Z. Glavcheva, S. Stoyanov, N. Haralampiev, D. Fischer, A. Lederer, Characterization of Zahari Zograph's Nave Wall Paintings in the Church "The Nativity of the Virgin" of Rila monastery (Bulgaria) by Vibrational Spectroscopy and SEM-EDX analysis, STAR: Science & Technology Of Archaeological Research, 3, 437–449 (2017).**