

БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ
ИНСТИТУТ ПО МИКРОБИОЛОГИЯ „СТЕФАН АНГЕЛОВ”

СИМЕОН ЕМИЛОВ ДИМИТРОВ

*Изпитване потенциала на нови производни на етамбутол и изониазид с
цел проучване на тяхната антитуберкулозна активност*

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертация

За присъждане на образователната и научна степен „ДОКТОР”

Научни ръководители: Доц. д-р Виолета Вълчева Русева

Проф. д-р Милка Милчева Милева

Научни жури: Доц. д-р Мая Захариева

Проф. д-р Стефан Панайотов, дн

Доц. д-р Нели Вилхелмова – Илиева

Доц. д-р Любомира Йочева

Доц. д-р Деница Стефанова



София, 2025

Дисертационният труд съдържа 154 страници, 40 фигури и 20 таблици. В библиографската справка са включени 346 литературни източника. Експерименталната работа е извършена в Лаборатория по молекулярна биология на микобактерии на Институт по микробиология „Стефан Ангелов“, БАН.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита на2025 г. на разширено заседание на национален семинар по Инфекциозна Микробиология“ към Институт по микробиология „Стефан Ангелов“ – БАН. Защитата на дисертационния труд ще се състои на открито заседание пред научно жури на от..... в заседателната зала на Институт по микробиология „Стефан Ангелов“ – БАН. Материалите по защитата са на разположение в кабинета на научния секретар на Институт по микробиология „Стефан Ангелов“ – БАН.

СЪДЪРЖАНИЕ

Списък на използваните съкращения	5
I. ВЪВЕДЕНИЕ	6
II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ	8
III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ	8
III.1. МАТЕРИАЛИ	8
1. Новосинтезирани съединения	8
2. Бактериални щамове	8
3. Хранителни среди	9
4. Клетъчни линии	9
5. Експериментални животни	9
III.2. МЕТОДИ	9
1. Определяне на антитуберкуозна активност	9
2. <i>In vitro</i> цитотоксичност	19
3. Молекулярен докинг	9
4. Определяне на трансмембрания пермеабилитет на активни съединения	9
5. <i>In vivo</i> определяне на остра и подостра токсичност	10
6. Патоморфологична оценка на тъканни проби	10
7. Антиоксидантна активност и редоксмодулиращ капацитет	10
7.1. Определение на общия протеин в чернодробен миши хомогенат	10
7.2. Определяне на тотален глутатион (tGSH) в чернодробен хомогенат	10
7.3. Определяне активността на глутатион пероксидаза и глутатион редуктаза	10
7.4. Определяне на малондиалдехидът (MDA)	10
7.5. Ензимна активност на супероксид дисмутаза (SOD)	10
7.6. Изследване на антиоксидантен капацитет <i>in vitro</i>	11
7.6.1. DPPH	11
7.6.2. ABTS тест	11
8. <i>In vitro</i> мутагенеза и изолиране на ДНК от резистентните мутанти	11
8.1. <i>In vitro</i> мутагенеза	11
8.2. Изолиране на хромозомна ДНК от резистентните мутанти	11
8.3. Пълно геномно секвениране и анализ на данни	11
IV. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ	11
1. Синтез на подобрени и нови химични съединения, аналози на INH и EMB	11
2. <i>In vitro</i> антимикобактериалната активност на ароилхидразони и нитрофуриламида	13
3. <i>In vitro</i> цитотоксичност на ароилхидразони и нитрофуриламида	15
4. Молекулен докинг на ароилхидразони и нитрофуриламида и определяне на трансмембрания пермеабилитет	17
5. <i>In vivo</i> определяне на остра и подостра токсичност на ароилхидразони (3a и 3d) и нитрофуриламида (DO 190 и DO209)	22
6. Патоморфологична оценка на промените в таргетни органи след приложение на ароилхидразони (3a и 3d) и нитрофуриламида (DO 190 и DO 209) спрямо контролни групи	30

6.1. Патоморфологична оценка на промените в черен дроб	30
6.2. Патоморфологична оценка на промените в бъбреците	32
6.3. Патоморфологична оценка на промените в тънките черва	33
7. Оценка маркерите на оксидативен стрес	36
7.1. Оценка маркерите на оксидативен стрес след третиране с ароилхидразони 3a и 3d	36
7.2. Оценка маркерите на оксидативен стрес след третиране с нитрофуриламида (DO 190 и DO 209)	39
8. <i>In vitro</i> мутагенеза и изолиране на резистентни мутанти на <i>M. tuberculosis H37Rv</i> с последващо пълно геномно секвениране	42
9. Заключение	44
V. ИЗВОДИ	45
VI. ПРИНОСИ	46
VII. ПУБЛИКАЦИИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИЯТА	46
VIII. ЗАБЕЛЯЗАНИ ЦИТАТИ	47
IX. УЧАСТИЕ В НАУЧНИ ФОРУМИ	48

Списък на използваните съкращения

BDQ	Бедаквилин
COVID-19	Коронавирусна болест 2019
EMB	Етамбутол
GPx	Глутатион-пероксидаза
GSH	Глутатион
i.p.	Интраперитонеално
INH	Изониазид
InhA	Енойл-редуктаза
KatG	Каталаза-пероксидаза
LJ	Löwenstein-Jensen
M7H9	Middlebrook 7H9
M7H10	Middlebrook 7H10
MDA	Малондиалдехид
MDR-TB	Мултирезистентна туберкулоза (Multidrug-Resistant Tuberculosis)
MIC	Минимална инхибиторна концентрация
НЛР	Нежелани лекарствени реакции
OC	Оксидативен стрес
p.o.	Перорално
RIF	Рифампицин
CP	Свободни радикали
SOD	Супероксид дисмутаза
ПКК	Пълна кръвна картина
СЗО	Световна здравна организация
WHO	World Health Organization
WGS	Пълно геномно секвениране

I. ВЪВЕДЕНИЕ

Туберкулозата остава сериозен здравен проблем въпреки напредъка в борбата с инфекциозните болести. Заболяването е трудно за контролиране и поставя предизвикателства пред учени и клиницисти. Въпреки наличието на лекарства, ваксини и превантивни мерки, ефективните резултати често се възпрепятстват от различни фактори. Според СЗО, пандемията от COVID-19 е влошила ситуацията, като е довела до повече недиагностицирани и нелекувани случаи, които са основен източник на зараза и с повишен риск от усложнения и смъртност.

Един от най-сериозните проблеми в контрола на туберкулозата е развитието на лекарствена резистентност, особено мултирезистентността. Тя се определя като резистентност на *Mycobacterium tuberculosis* към двата най-ефективни антитуберкулозни препарата рифампицин и изониазид едновременно. В началото на 21-ви век бяха регистрирани и първите случаи на екстензивно резистентна туберкулоза, представляваща резистентност на *Mycobacterium tuberculosis* едновременно към няколко антибиотици, характерни за регионите Африка, Азия и някои източноевропейски страни.

COVID-19, глобалният икономически срив и увеличената миграция усложняват ситуацията, като нарастването на броя мигранти, бездомни и зависими от алкохол и наркотици води до повишена заболяемост и нарастване на лекарствената резистентност при туберкулозата. Това създава благоприятни условия за селекция на спонтанни мутации, причиняващи резистентност към различни противотуберкулозни лекарства. За овладяване на глобалната туберкулозна епидемия е необходимо спешно разработване на нови антитуберкулозни агенти, които да намалят времето за лечение и да действат ефективно срещу MDR/XDR щамове при ниски дози. Последните научни данни обобщават нови синтетични съединения с висока *in vitro* активност спрямо *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, често надвишаваща тази на стандартните лекарства.

Въпреки това, много от тях се провалят в предклинични и клинични тестове поради токсичност, лоша бионаличност или фармакокинетични проблеми. Основните изисквания към новите съединения са висока антимикобактериална активност, ниска токсичност и минимален риск от нежелани реакции. Затова фокусът на настоящото изследване беше върху биологичния и фармакологичния скрининг на новосинтезираните вещества с цел оценка на тяхната ефективност и механизми на действие срещу различни щамове на *Mycobacterium tuberculosis*.

I. INTRODUCTION

Tuberculosis remains a serious public health issue despite advances in combating infectious diseases. The disease is difficult to control and poses challenges to researchers and clinicians. Although drugs, vaccines, and preventive measures are available, effective outcomes are often hindered by various factors. According to the WHO, the COVID-19 pandemic has worsened the situation, leading to an increase in undiagnosed and untreated cases, which are major sources of transmission and carry a higher risk of complications and mortality.

The most serious problems in tuberculosis control is the development of drug resistance, especially multidrug resistance. This is defined as resistance of *Mycobacterium tuberculosis* to the two most effective anti-tuberculosis drugs, rifampicin and isoniazid, simultaneously. In the early 21st century, the first cases of extensively drug-resistant tuberculosis were reported, characterized by resistance to several antibiotics, and prevalent in regions such as Africa, Asia, and some Eastern European countries.

COVID-19, the global economic downturn, and increased migration have complicated the situation, with the rise in the number of migrants, homeless people, and individuals dependent on alcohol and drugs leading to higher tuberculosis incidence and increased drug resistance. This creates favorable conditions for the selection of spontaneous mutations causing resistance to various anti-tuberculosis drugs.

To control the global tuberculosis epidemic, there is an urgent need to develop new anti-tuberculosis agents that reduce treatment time and effectively target MDR/XDR strains at low doses. Recent scientific data summarize new synthetic compounds with high *in vitro* activity against *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, often exceeding that of standard drugs.

However, many of these fail in preclinical and clinical trials due to toxicity, poor bioavailability, or pharmacokinetic issues. The main requirements for new compounds are high antimycobacterial activity, low toxicity, and minimal risk of adverse effects. Therefore, the focus of the present study was on the biological and pharmacological screening of newly synthesized substances to evaluate their efficacy and mechanisms of action against various strains of *Mycobacterium tuberculosis*.

II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Целта на настоящия дисертационен труд е да се проведе фармакологичен скрининг на предварително селектирани новосинтезирани химични съединения с оглед на тяхната антимикобактериална активност и токсичност, както и да се изяснят някои аспекти от механизма на тяхното действие срещу *Mycobacterium tuberculosis*.

Във връзка с формулираната цел, експерименталната работа беше насочена към изпълнение на следните задачи:

1. Да се установи *in vitro* антимикобактериалната активност на новосинтезирани химични съединения срещу референтни щамове *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv и *Mycobacterium smegmatis* MC2155;
2. Да се анализират енергийните взаимодействия между протеинови мишени при *in vitro* и синтезираните съединения и да се идентифицират молекули (лиганди) с висок афинитет към тези мишени чрез молекулен докинг;
3. Да се изследва трансмембранната пропускливост на подобрени съединения;
4. Да се определи *in vitro* цитотоксичност, *in vivo* остра и подостра токсичност в експериментален модел на мишки, да се проследят патоморфологичните промени и маркерите на оксидативните увреждания в таргетните органи;
5. Да се изследва редокс-модулиращият капацитет на съединенията в химични моделни системи;
6. Да се индуцира *in vitro* мутагенеза и изолиране ДНК от резистентните мутанти, с последващо пълно геномно секвениране и биоинформатичен анализ.

III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

III.1. МАТЕРИАЛИ

1. Новосинтезирани съединения

За настоящия дисертационен труд бяха избрани съединения с висока *in vitro* антитуберкуозна активност, изследвани в предишни проучвания на Лабораторията по молекулярна биология на микобактерии към Института по микробиология „Стефан Ангелов“, БАН. Те включват новосинтезирани ароилхидразони от Катедра „Химия“ на Медицинския университет – София и нитрофураниламиди от Института по органична химия с Център по фитохимия към БАН.

2. Бактериални щамове

В изследванията бяха използвани референтните щамове *Mycobacterium smegmatis* MC2 155 — бързорастящ и непатогенен модел, предоставен от Федералния

изследователски и клиничен център по физико-химична медицина в Москва и съхраняван в колекцията на Института по микробиология „Стефан Ангелов“, БАН.

За *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (ATCC 25618) съдействието беше осигурено от Изследователския институт по фтизиатриопулмонология в Санкт Петербург, Русия.

3. Хранителни среди

Използваните за култивиране на микобактерии селективни хранителни среди включват: *Löwenstein-Jensen* (LJ); агарова среда *Middlebrook 7H10* (M7H10); Бульон *Middlebrook 7H9* (M7H9).

4. Клетъчни линии

Използвани бяха няколко клетъчни линии: HEK293 (бъбречни епителни клетки от човешки ембрион) и CCL-1 (трансформирани миши фибробласти), Hela (човешки туморни клетъчни линии от маточната шийка), MIA PaCa (човешка туморна клетъчна линия от панкреас), HepG2 (чернодробни туморни клетки), WA13 (човешки фибробласти), KMST (човешки туморни клетки) и WI-38 (човешки фибробласти от бял дроб) в съответствие със стандарта ISO 10993-5:2009 за биосъвместимост.

5. Експериментални животни

В проведените експерименти са използвани мъжки и женски мишки от щам Jcl:ICR на възраст 6 седмици и с тегло между 25 и 30 g.

Всички експерименти са провеждани в съответствие с принципите на Европейската конвенция за защита на гръбначните животни, използвани за експериментални и научни цели (ETS 123), като са предприети мерки за минимизиране на страданията на животните.

III.2. ИЗПОЛЗВАНИ МЕТОДИ

1. Определяне на антитуберкуозна активност

Антитуберкуозната активност на изследваните съединения беше оценена чрез метода за определяне на минималната инхибираща концентрация (MIC), използвайки REMA, съгласно протокола, описан от Martin et al. (2012).

2. *In vitro* цитотоксичност

Цитотоксичната активност на съединенията беше оценена чрез стандартен колориметричен МТТ тест (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолиев бромид), позволяващ количествена оценка на клетъчната жизнеспособност.

3. Молекулярен докинг

За извършване на молекулен докинг анализ бе използван софтуерът Molecular Operating Environment (MOE, 2022). Изследвани бяха взаимодействията на съединенията с четири кристалографски структури на протеини от *Mycobacterium tuberculosis*: InhA с лиганди TCU (PDB: 2X22) и 641 (PDB: 4TZK), GlfT2 (PDB: 4FIY) и оксидоредуктаза (PDB: 4NXI).

4. Определяне на трансмембранен пермеабилитет

Пасивната мембранна пропускливост на активните съединения беше оценена чрез метода PAMPA (Parallel Artificial Membrane Permeability Assay). Използван беше протоколът Double-Sink™, като се прилагаха изкуствени мембрани, която симулира условията в стомашно-чревния тракт и кръвно-мозъчната бариера.

5. *In vivo* оценка на остра и подостра -токсичност

Острата и подострата токсичност бяха оценени съгласно насоките на OECD (2001) и стандартите ISO 10993-2/12. Острата токсичност бе определена чрез модифицирания метод на Lorke.

6. Патоморфологична оценка на тъканни проби

Тъканни проби от черен дроб, бъбреци и тънки черва на експерименталните животни бяха хистологично обработени по класическия метод, описан от Lillie (1964), и подложени на патоморфологична оценка.

7. Антиоксидантна активност и редокс-модулиращ капацитет

7.1. Определяне на общ белтък

Съдържанието на общ протеин в чернодробни хомогенати беше определено по Биуретов метод, използвайки готов търговски кит (Cromatest/Lineal Chemicals, REF 1153020).

7.2. Определяне на тотален глутатион (tGSH)

Количеството на тоталния глутатион бе измерено чрез метода на Rahman et al. (2005).

7.3. Активност на глутатион пероксидаза (GPx) и глутатион редуктаза (GRd)

Активността на GPx и GRd бе определена чрез спектрофотометрия с използване на търговски комплекти (REF CGP1 и GRSA).

7.4. Малондиалдехид (MDA) – маркер на липидна пероксидация

Нивата на MDA, индикатор за оксидативен стрес, бяха определени по метода на Хънтър, адаптиран от Mileva et al. (2000).

7.5. Активност на супероксид дисмутаза (SOD)

Активността на SOD беше анализирана по метода на Beauchamp и Fridovich (1971).

7.6. Изследване на антиоксидантния капацитет *in vitro*

DPPH тест: по метода на Brand-Williams (1995).

ABTS тест: по метода на Re et al. (1999), адаптиран от Erel (2005).

8. *In vitro* мутагенеза и анализ на резистентни мутанти

8.1. *In vitro* мутагенеза

Стандартизирана бактериална суспензия от *M. smegmatis* MC2155 или *M. tuberculosis* H37Rv (1 McFarland; 3.0×10^8 CFU/ml) беше инокулирана върху агарови среди с цел индуциране на мутации.

8.2. Изолиране на хромозомна ДНК

Хромозомната ДНК от резистентните мутанти беше изолирана по метода на van Embden (1993).

8.3. Пълно геномно секвениране и анализ

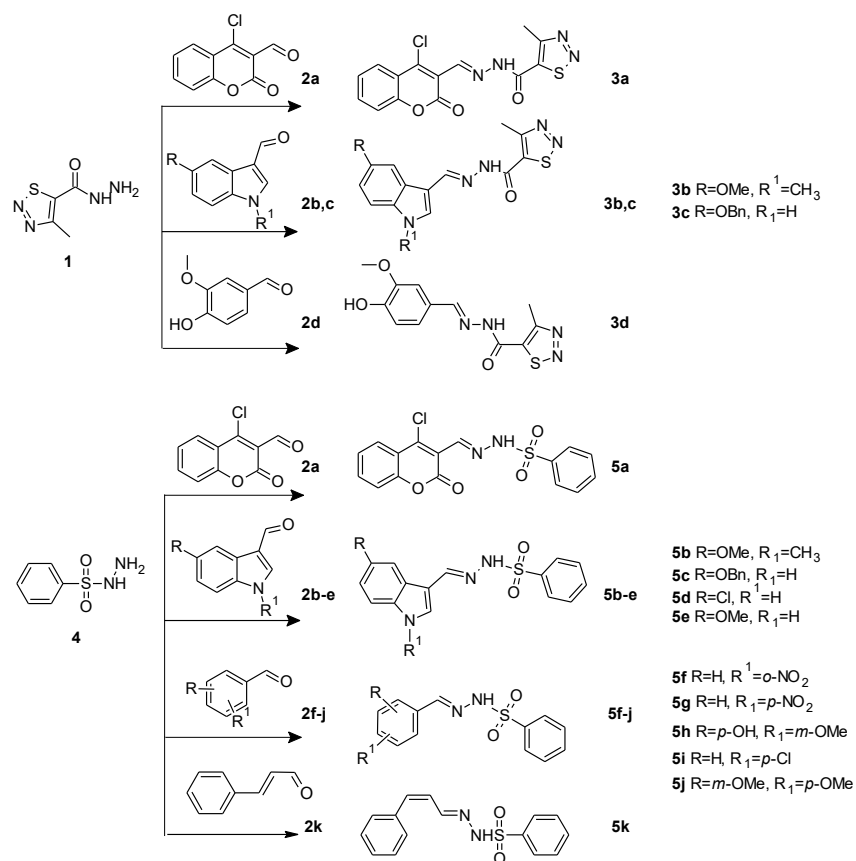
Пълното геномно секвениране бе извършено чрез Illumina HiSeq платформа. Получените данни бяха депозираны в NCBI Sequence Read Archive.

IV. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

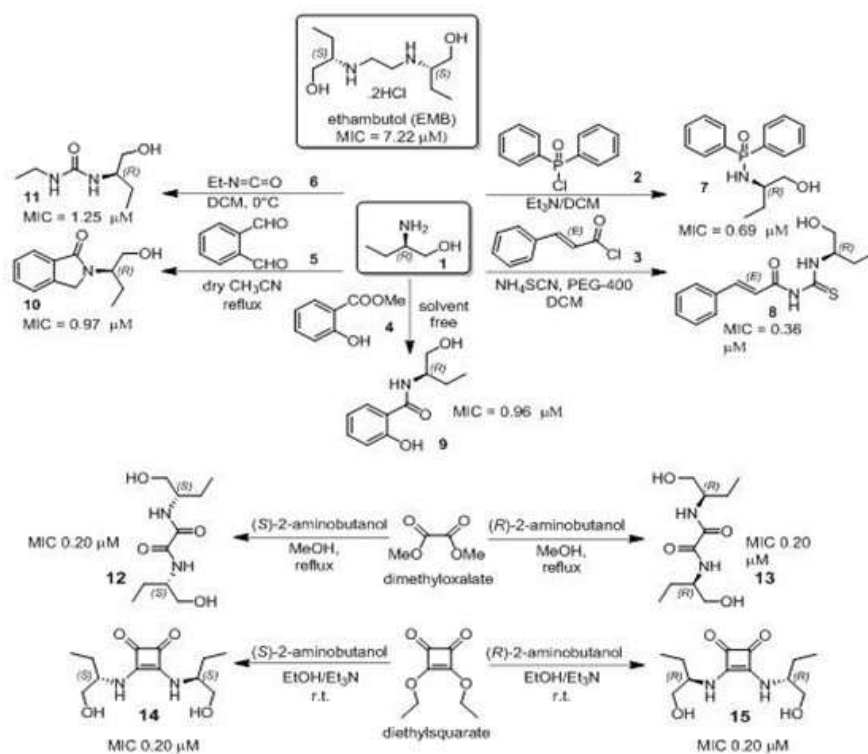
1. Синтез на подбрани и нови химични съединения, аналози на INH и EMB.

Синтезирани и пречистени бяха серии от ароилхидразоновы производни (аналози на INH) (Фигура 1) и нитрофураниламиди (производни на EMB), а структурата беше потвърдена чрез ЯМР, мас-спектрометрия и физикохимични методи (Фигура 2 и 3).

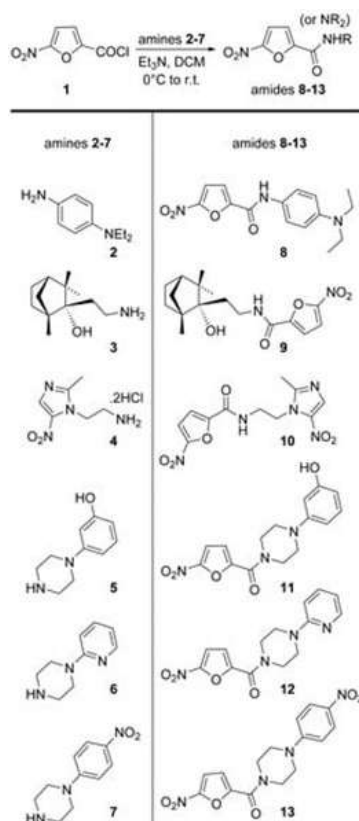
Добавянето на защитни групи към хидразид-хидразонната система се показва като ефективна стратегия срещу ензимна инактивация и токсични метаболити. Ароилхидразоните проявиха селективна антимикобактериална активност и потенциал за инхибиране на FabH, подкрепено от QSAR анализ.



Фигура 1. Синтез и химична структура на серия ароилхидразони.



Фигура 2. Синтез и химична структура на серия нитрофурилиамиди (1 – 15).



Фигура 3. Синтез и химична структура на серия нитрофурилиамиди (2-13)

Механизмът на действие на нитрофурилиамидите включва редукция на нитрогрупата от ензими, наречени нитроредуктази, локализирани в клетъчната стена на бактериите. Този процес води до образуването на свободни радикали, които увреждат клетъчни компоненти и предизвикват елиминиране на патогените (Krasavin et al., 2018). Според Wang et al., ензимът деазафлавин F420-зависима нитроредуктаза (Ddn) е основният катализатор за активацията на нитрофурана JSF-2019. Аналогично, нитрогрупата в нитроимидазолни лекарства като претоманид и деламанид преминава през вътреклетъчен метаболизъм под действието на същия ензим. При *M. tuberculosis*, Ddn изпълнява функция, аналогична на тази на NsfA/NsfB при *E. coli* (Jian, Y. et al., 2021).

2. *In vitro* антимикобактериалната активност на ароилхидразони и нитрофурилиамиди

Изследвани бяха ароилхидразони (3a–3d), сулфонилхидразони (5a–5k) и нитрофурилиамиди (8–13). Сред тях най-висока активност показва съединение 3a, със стойности под 0.08 μM . Включването на сулфонилхидразонов фрагмент (напр. в 5c) доведе до понижена активност в сравнение с техните ароилхидразонов аналози (3c). Съединение 3d, съдържащо 5-бензилоксииндол скелет, демонстрира също значителна

активност (MIC = 0.4412 μM). Това потвърждава връзката между структура и биологична активност (Viveiros, 2012; Gupta et al., 2010).

In vitro антимикобактериалната активност на нитрофураниламидите потвърди тяхната висока ефективност (Таблица 2). Резултатите от повторни експериментални изследвания чрез метода REMA потвърдиха избора на съединения 11, 12 (DO-190) и 13 (DO-209). По-специално, съединение DO-190 демонстрира изключително обещаващи резултати с MIC от 0.20 μM , съответстващи на стойностите, наблюдавани при INH.

Таблица 1. MIC стойности по метода на REMA

Вещества *	MIC (μM)
3a	0.0730
3b	0.3294
3c	0.1744
3d	0.4412
5a	0.1814
5d	0.1669
5b	0.2027
5c	0.3434
5e	0.1647
5f	0.1473
5g	0.3053
5h	0.0716
5i	0.0763
5j	0.3203
5k	0.3210
INH	0.0343

*химичните формули са представени на фиг.1

Таблица 2. MIC стойности по метода на REMA

Вещества*	MIC (μM)
8	16.48
9	29.73
10	16.2
11	0.50
12(DO190)	0.20
13(DO209)	0.36

*химичните формули са представени на фиг.2

Нитрофуриламидаите също показаха висока активност срещу *M. tuberculosis* H37Rv и *M. smegmatis*, вероятно поради ефективна редукция на нитро групата (Foo et al., 2016), без загуба на активност. Данните кореспондират с резултатите на Krasavin et al. (2019) и Jin-Bo et al. (2015), подчертаващи широкоспектрната активност на нитрофураните. Сравнението с референтния антибиотик рифампицин (RIF) показва, че някои от изследваните съединения са със сходна или дори по-висока активност, което потвърждава потенциала им като бъдещи терапевтични алтернативи (Cho et al., 2007; Nandikolla et al., 2021). Оптимизация на структурата им може допълнително да подобри фармакологичния профил.

3. *In vitro* цитотоксичност на ароилхидразони и нитрофуриламиди

In vitro цитотоксичността на новосинтезираните ароилхидразони беше оценена на върху CCL-1 и HEK293 при третиране с избрани съединения в концентрационен диапазон от 12,5 до 200 μM (Таблица 3). Ароилхидразоновите съединения 3a–d, 5g и 5k демонстрират отлична биосъвместимост и селективност с $\text{SI} > 1000$. Най-активни са 3a и 3d с MIC от 0,07 μM и ниска цитотоксичност (IC_{50} съответно 256,7 μM и 217,5 μM), като 3a превъзхожда утвърдените противотуберкулозни лекарства по токсикологичен профил. Сравнението между 3a и 3d подчертава значението на 1,2,3-тиадиазоловия фрагмент, като 3d е два пъти по-ефективен от INH и четири пъти от етамбутол. Данните доказват, че структурната модификация е ключова за повишаване на антимикобактериалната активност и селективност (Liu et al., 2024; Sruthi et al., 2022).

Според Bashir et al. (2023), специфичната структура на ароилхидразонов комплекс е отговорна за цитотоксична активност срещу A549 клетки.

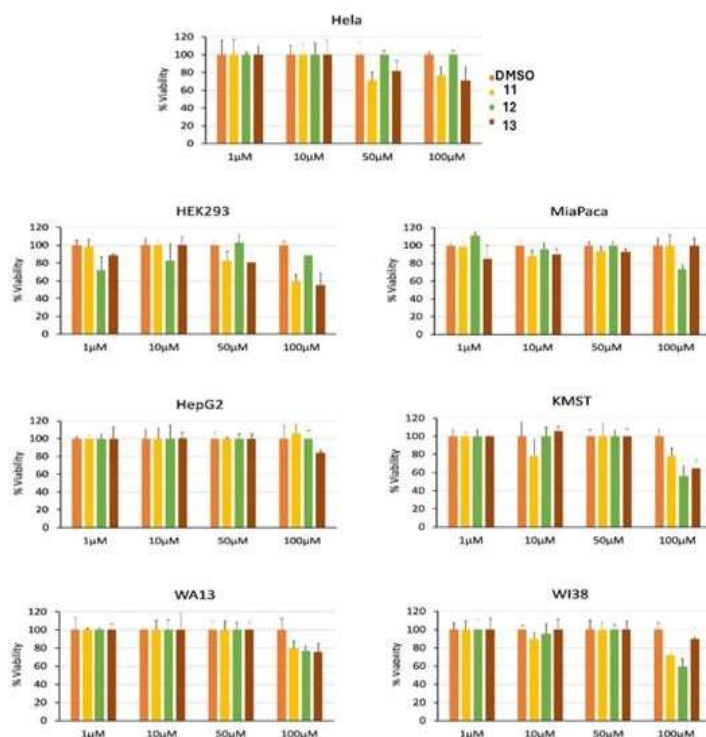
Цитотоксичността на нитрофуриламидаите 11, 12 (DO190) и 13 (DO209) беше оценена *in vitro* върху различни клетъчни линии. Клетките бяха третирани със съединенията в концентрационен диапазон от 1 до 100 μM . Резултатите показаха, че съединенията имат нисък цитотоксичен ефект, като не оказват съществено влияние върху клетъчната жизнеспособност, независимо от произхода и характеристиките на клетъчните линии (Фигура 4).

При съединения DO190 и DO209 се отчита минимална цитотоксичност при 24-часово третиране, като при по-дълга експозиция и висока концентрация (100 μM) се наблюдава леко повишение.

Таблица 3. Цитотоксичност на новосинтезираните ароилхидразони на клетъчна линия HEK-293 и CCL-1.

Вещества*	IC ₅₀ (μM)	IC ₅₀ (μM)	SI	SI
	CCL-1	HEK	CCL-1	HEK
3a	256.7 ± 13.3	217.5 ± 17.2	3516	2979
3b	818.3 ± 23.7	361 ± 11.3	2487	1244
3c	390.8 ± 12.0	713.5 ± 18.5	2242	4093
3d	279.5 ± 42.5	217.5 ± 17.2	633	620
5a	48.0 ± 5.9	83.9 ± 4.0	267	463
5d	13.8 ± 0.9	16.9 ± 3.4	11	97
5b	2.9 ± 0.3	16.2 ± 2.7	14	82
5c	321.4 ± 16.2	32.3 ± 1.5	945	95
5e	5.1 ± 1.1	15.6 ± 4.1	31	95
5f	131.4 ± 11.4	100.1 ± 9.3	892	679
5g	72.4 ± 5.8	100.1 ± 2.1	237	327
5h	240 ± 9.6	158.5 ± 11.2	3380	2216
5i	191 ± 13.2	138.3 ± 7.4	1812	1819
5j	223 ± 11.5	150.2 ± 5.1	469	696
5k	83.5 ± 7.0	47.4 ± 6.8	146	260
INH	-	-	-	-

*химичните формули са представени на фиг.2



Фигура 4. Оценка на клетъчния виталитет при третиране с нитрофуриламиди DO190 и DO209 в концентрационен диапазон 1 - 100 μM.

При съединения DO190 и DO209 се отчита минимална цитотоксичност при 24-часово третиране, като при по-дълга експозиция и висока концентрация (100 μ M) се наблюдава леко повишение.

4. Молекулен докинг на ароилхидразони и нитрофуриламиди. Определяне на трансмембрания пермеабилитет

Докинг анализите показват, че разглежданите съединения проявяват значителен афинитет към InhA, със свободни енергии на свързване в диапазона от $-12,36$ до $-10,02$ kcal/mol за структурата 2X22 и от $-14,67$ до $-11,10$ kcal/mol за 4TZK (Таблица 4). Най-активните съединения според минималната инхибиторна концентрация (MIC) – 5k, 3a и 3d – също се нареждат сред водещите в класацията по афинитет при докинг анализа с 2X22. Това предполага наличието на стабилно свързване в активния център на ензима и потенциал за разработване на нови антимикобактериални средства.

Таблица 4. Докинг резултати за синтезираните съединения в двете структури 2X22 и 4TZK

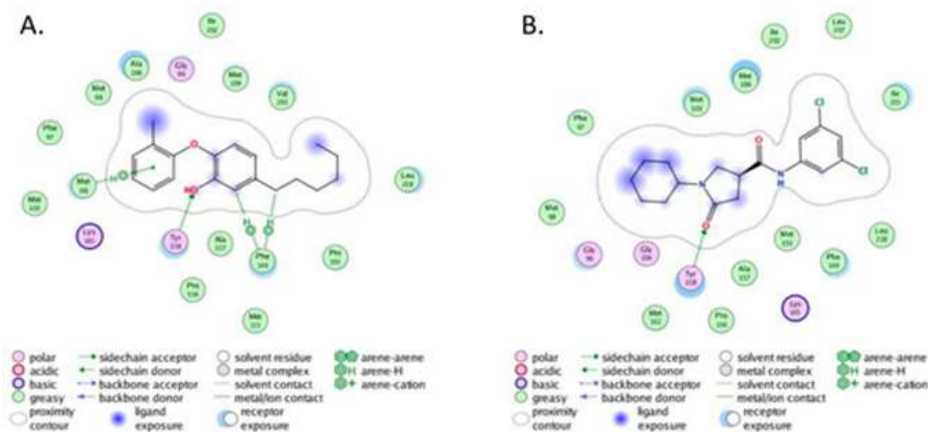
Вещества	2X22* (kcal/mol)	4TZK* (kcal/mol)
3a	-10.93 (13)	-11.56 (14)
3b	-11.02 (15)	-12.38 (15)
3c	-11.09 (9)	-11.62 (13)
3d	-10.02 (2)	-14.67 (6)
5a	-11.06 (10)	-12.15 (9)
5d	-10.99 (12)	-12.30 (7)
5b	-10.73 (14)	-12.66 (4)
5c	-11.60 (5)	-12.19 (8)
5e	-12.03 (3)	-14.67 (1)
5f	-11.29 (7)	-11.88 (10)
5g	-11.98 (4)	-12.80 (3)
5h	-11.43 (6)	-12.49 (5)
5i	-11.18 (8)	-11.87 (11)
5j	-11.06 (11)	-11.75 (12)
5k	-12.36 (1)	-12.83 (2)
INH	-9.18 (16)	-8.51 (16)

* E_{score1} – свободна енергия на свързване от първия етап на отчитане, в kcal/mol;

**химичните формули са представени на фиг.1

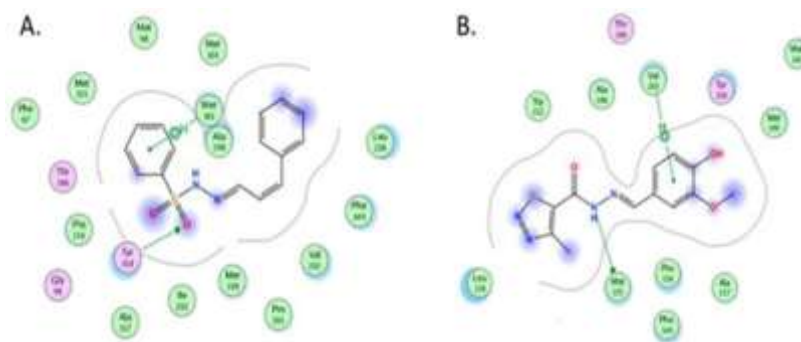
Докинг анализът към структурата 4TZK показва, че съединенията 5e и 3d имат най-висок афинитет ($-14,67$ kcal/mol), следвани от 5k и 5g (съответно $-12,83$ и $-12,80$ kcal/mol). Активното съединение 3a е с резултат $-12,38$ kcal/mol, като заема шесто място.

За сравнение, изониазид (INH) показва значително по-слаба свързваща енергия (–9,18 kcal/mol за 2X22 и –8,51 kcal/mol за 4TZK), което потвърждава по-високия инхибиторен потенциал на новите съединения спрямо ензима InhA от *M. tuberculosis* (PDB: 2X22 и 4TZK), визуализирани чрез "Ligand Interactions" в МОЕ. Показани са връзките на кокристализираните лиганди — TCU и 641 — с лиганд-свързващите домени на двата рецептора.



Фигура 5. Диаграми на взаимодействие на лиганд-свързващите домени на *M. tuberculosis InhA* с: (A) 5-хексил-2-(2-метилфенокси) фенол (TCU) (PDB ID 2X22) и (B) (3s)-1 -циклохексил-N-(3,5-дихлорофенил)-5-оксопиролдин-3-карбоксаимид (641) (PDB ID 4TZK).

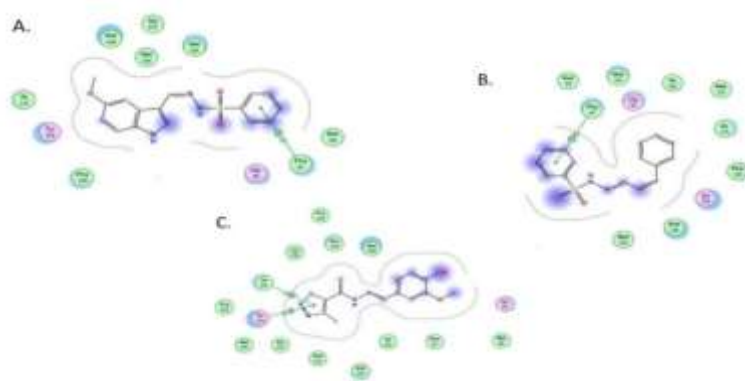
Докинг анализите на INH-производни показват, че водородните връзки с Tyr158 и Ile194 са ключови за свързване с InhA, в съответствие с литературни данни, включващи Ser94, Gly96, Lys165 и Ile194. Взаимодействията включват Phe149, Tyr158 и Met161, като Phe149 и Met161 формират π -H (арен-водородни) връзки, а Tyr158 – водородна връзка. Останалите остатъци (напр. Gly96, Met199, Leu218) са в близост до лиганда, но не участват пряко във взаимодействията (виж Фигура 5B).



Фигура 6. Диаграми на взаимодействие на лиганд-свързващия домен на *M. tuberculosis InhA* (2X22) с най-активните съединения и пози с най-висок резултат на (A) 5k и (B) 3a.

Фигура 6 показва диаграмите на взаимодействията между протеин и лиганд (PLI) за най-активните съединения 5k и 3a, които показват най-високи стойности за афинитет при докинг анализ към рецептора 2X22. Както се вижда на Фигура 6А, съединение 5k, с най-висок докинг резултат, възпроизвежда две ключови взаимодействия в активното място на InhA – с Tyr158 и Met161. Съединение 3a (Фигура 6В) също показва висока активност, но не взаимодейства с Tyr158; вместо това формира връзка с Met155 и π -H взаимодействие с Val203. Съединение 5e, въпреки добър докинг резултат, осъществява само едно π -H взаимодействие с Phe97.

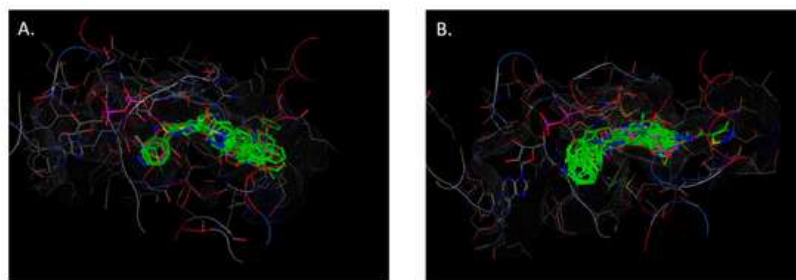
Фигура 7 обобщава профила на взаимодействията на трите най-високо класирани съединения: 5e, 5k и 3a, представени чрез PLI (protein-ligand interaction) диаграми. Тези визуализации демонстрират пространственото разположение на съединенията в активното място и съответните им контактни точки с аминокиселинните остатъци.



Фигура 7. Диаграми на взаимодействие на лиганд-свързващите домени на *M. tuberculosis* InhA (4TZK) със съединения с най-висок резултат от (А-5e);(В-5k) и (С -3a).

Молекулният докинг показва, че 5e и 5k не взаимодействат с Tyr158, което предполага алтернативен механизъм. За разлика от тях, 3a възстановява π -H взаимодействието с Tyr158 и формира връзка с Ile215, типична за класическия модел на свързване.

Всички синтезирани съединения, свързани в лиганд-свързващите домени на InhA, са представени на Фигура 8А (рецептор 2X22) и Фигура 8В (рецептор 4TZK) с използване на Connolly повърхност. Докингът на DO-190, DO-209 и EMB към четири мишени показва, че EMB заема най-благоприятна позиция в три от тях. INH и EMB са включени като референтни антитуберкулозни агенти (Таблица 5 и Таблица 6).



Фигура 8. Докинг конформации на всички синтезирани съединения (в зелено), лигандите TCU (A) (в магента) и 641 (B) (в магента) и съответната повърхност на Connolly.

Таблица 5. Докинг резултати на изследваните съединения в активните центрове на InhA (PDB ID 2X22 и 4TZK), GlfT2 (PDB ID 4FIY) и оксидоредуктаза (PDB ID 4NXI).

Вещества	2X22*	4TZK*	4FIY*	4NXI*
	(kcal/mol)	(kcal/mol)	(kcal/mol)	(kcal/mol)
DO-190	-11.65	-11.73	-9.20	-7.81
DO-209	-11.77	-11.67	-8.50	-6.73
EMB	-9.63	-10.73	-8.75	-8.45
INH	-9.69	-9.70	-7.79	-8.90

*E_{score} 1 — свободна свързваща енергия от първоначалната стъпка на преразглеждане, в kcal/mol.

Нитрофурилиамидите DO-190 и DO-209 показват по-ниски енергии на свързване от EMB в активните центрове на InhA (2X22, 4TZK). При GlfT2 (4FIY) резултатите са сравними, докато при оксидоредуктазата (4NXI) EMB превъзхожда и двете съединения. Спрямо INH, DO-190 и DO-209 демонстрират по-добър афинитет към три от четирите мишени. Извършен е и PLI анализ на взаимодействията между съединенията и целевите протеини.

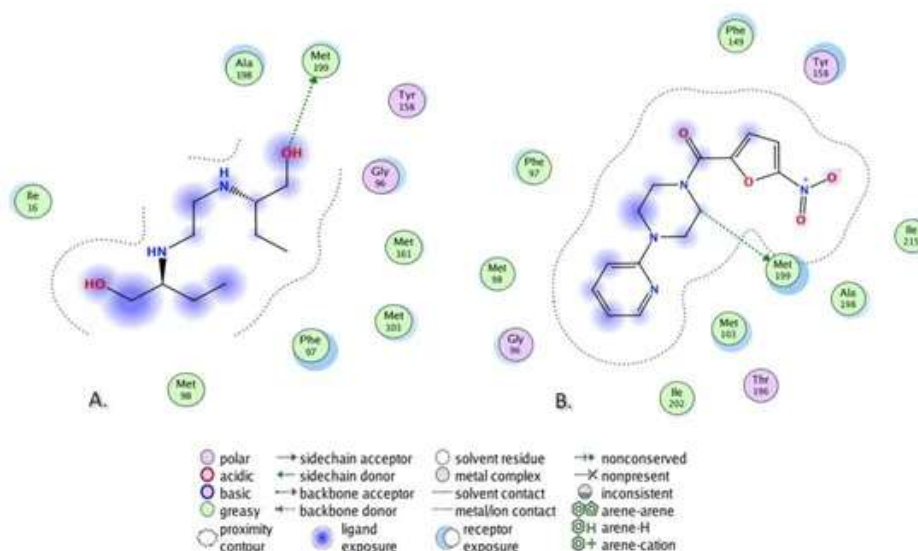
Таблица 6. Протеин-Лигандни взаимодействия (PLI).

Съединения	2X22	4TZK	4FIY	4NXI
DO-190	Phe149; Met199	Met199	Arg37	Asn41; Gly160
DO-209	Met155; Gly160	Tyr158	Glu30	Gln7; Asn41; Gly160
EMB	Tyr158; Met199; Glu30	Met199	Leu28; Glu30	Asp12

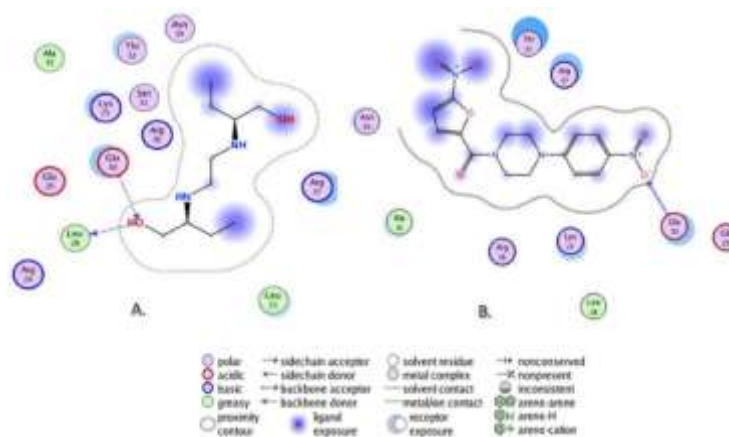
Резултатите от молекулния докинг разкриват, че DO-190 показва по-добри енергии на свързване от DO-209 в три от четири цели, с изключение на InhA (2X22). EMB демонстрира водородни връзки с Tyr158 и Met199, докато DO-190 възпроизвежда

взаимодействие с Met199 и образува ново арен-арен взаимодействие с Phe149. DO-209 повтаря водородната връзка с Tyr158 и установява нова връзка с Met155.

Кумариновата, хидразоновата и пиразол-конюгираната кумаринова структури се оказват ключови за свързването с InhA, което подчертава значението на тези фрагменти за инхибиране на бактериалната клетъчна стена. Синергията между тези групи допринася за потенциалното преодоляване на лекарствена резистентност.



Фигура 9. Докинг конформации на INH (a), DO-190 (b) и DO-209 (c) в лиганд-свързващия домен на InhA (PDB ID 4TZK).



Фигура 10. Докинг конформации на DO-190 (a) и DO-209 (b) в лиганд-свързващия домен на GlfT2 (PDB ID 4FIY).

При анализ на взаимодействията с GlfT2 (PDB ID 4FIY) не са наблюдавани протеин-лигандни взаимодействия (Фигура 20). Съединението DO-190 образува три ключови взаимодействия: арен-Н връзки с Glu30 и Arg36, както и водородна връзка с Arg37. DO-209 повтаря арен-Н взаимодействието с Glu30. При оксидоредуктазата (PDB

ID 4NXI) нито едно от съединенията не повтаря водородната връзка с Asp12, характерна за ЕМВ, но и двете разкриват нови връзки с Asn41 и Gly160, а DO-209 добавя и взаимодействие с Gly7. Asp12 е близо до лиганда, но не в обхвата на свързване. Анализът показва, че DO-190 и DO-209 повтарят част от ключовите взаимодействия на ЕМВ в три от четирите мишени.

Резултатите от РАМРА показват, че INH е непронируем при дадените експериментални условия ($-\log P_e > 6$). Новосинтезираните ароилхидразонови съединения показват значително по-ниски $-\log P_e$ стойности (1–2 порядъка) в сравнение с INH (Таблица 7), индикиращи повишена пропускливост.

Таблица 7. Стомашно-чревна пропускливост на INH (INH) и новосинтезираните му производни

Съединение	-logP _e , GIT РАМРА		
	pH=5	pH=6.2	pH=7.4
INH	6.226	6.591	6.594
3a	4.354	4.366	4.299
3d	4.158	4.137	4.150

GIT—gastrointestinal tract

Съединенията 3a и 3d са класифицирани като силно пропускливи в диапазон на рН. Данните също показват, че промените в рН не предизвикват забележими промени в пропускливостта на съединенията. Това предполага рН-независим механизъм на проникване през мембраните на GIT и е теоретично подкрепено от физикохимичните свойства на съединенията. Следователно, РАМРА представлява бърз и утвърден *in vitro* модел за оценка на пропускливостта на липофилни съединения през различни биологични бариери, като същевременно ограничава необходимостта от клетъчни тестове или използване на животински модели (Bennion et al., 2017; Dahlgren et al., 2019; Fedi et al., 2021).

5. *In vivo* определяне на остра и подостра токсичност на ароилхидразони (3a и 3d) и нитрофениламида (DO 190 и DO209)

Остра токсичност на ароилхидразоновите съединения 3a и 3d бе оценена *in vivo* при 36 женски мишки чрез перорално (p.o.) и интраперитонеално (i.p.) приложение. Диапазоните на дозиране и регистрираните клинични симптоми са обобщени в Таблицы 8 и 9.

Таблица 8. Остра интраперитонеална токсичност на 3a на женски мишки.

Доза (mg/kg)	Ефект/ Смъртност	Време на поява	Симптоми
3000	2/3 (67%)	След 20 часа	Дихателна недостатъчност с дълги паузи, атаксия, пилоерекция, гърчове, летален изход
2000	1/3 (33%)	След 24 часа	Нарушена координация, , летален изход
1500	1/3 (33%)	След 30 часа	Забавени рефлексии, сънливост, летален изход
1000	0/3	-	-
500	0/3	-	-

$LD_{50} = \sqrt{D_0 \times D_{100}} = \sqrt{1000 \times 1500} = 1224,7 \text{ mg/kg}$ за i.p. приложение. За перорално приложение на най-високата доза от 3000 mg/kg не е наблюдавана смъртност, което показва, че LD_{50} за перорално приложение е $> 2500 \text{ mg/kg}$, т.е. $LD_{50} > 2500 \text{ mg/kg}$. $IR = (LD_{50} \text{ i.p.} / LD_{50} \text{ p.o.}) \times 100 = (1225 / 2500) \times 100 \approx 49\%$. Тази стойност показва, че степента на абсорбция на съединението при перорално приложение е значително по-ниска в сравнение с интраперитонеалното приложение (Таблица 8).

Таблица 9. Остра интраперитонеална токсичност на 3d при женски мишки.

Доза mg/ kg т.т.	Ефект/ смъртност	Време на поява	Симптоми
3000	1/3	След 3 часа	Нарушена координация, учестено дишане, клоничен гърч, смърт
2000	0/3	-	-
1500	0/3	-	-
1000	0/3	-	-
500	0/3	-	-

$LD_{50} = \sqrt{D_0 \times D_{100}} = \sqrt{2000 \times 3000} = 2449.49$, $LD_{50} > 2000 \text{ mg/kg}$ при i.p. приложение. За перорално приложение на най-високата доза от 3000 mg/kg не е наблюдавана смъртност, което показва, че LD_{50} за перорално приложение е $> 2500 \text{ mg/kg}$, т.е. $LD_{50} > 2500 \text{ mg/kg}$. $IR = LD_{50} \text{ i.p.} / LD_{50} \text{ p.os.} \times 100 = 489,89 / 692,82 \times 100 \approx 70,7\%$. Дозите за подостра (14-дневна) перорална експозиция са определени на база LD_{50} стойността, като са използвани следните фракции: $1/10 LD_{50}$ (250 mg/kg) и $1/20 LD_{50}$ (125 mg/kg) (Таблица 9).

Острата токсичност на нитрофуриламидите DO-190 и DO-209 е изследвана при 48 женски мишки след перорален и интраперитонеален прием. Данните за дозиране и проявена клинична симптоматика са обобщени в Таблицы 10, 11 и 12.

Таблица 10. Остра интраперитонеална токсичност на DO 190 на женски мишки.

Доза mg/ kg т.г.	Ефект/ смъртност	Време на поява	Симптоми
3000	1/3	След 5 часа	Затруднено дишане, атаксия, забавени движения, изолация
2000	0/3	-	-
1500	0/3	-	-
1000	0/3	-	-
500	0/3	-	-

$LD_{50} = \sqrt{D_0 \times D_{100}} = \sqrt{2000 \times 3000} = 2449.49$, $LD_{50} > 2000$ mg/ kg, $LD_{50} > 2000$ mg/ kg при i.p. приложение. При перорално приложение на най-високата доза от 3000 mg/kg не се наблюдава смъртност, което означава, че LD_{50} за перорално приложение е > 2500 mg/kg. $IR = LD_{50} \text{ i.p.} / LD_{50} \text{ p.o.} \times 100 (\%) = 2450 / 3000 \times 100 \approx 81,6 \%$

При подострото 14-дневно перорално третиране са използвани дозите 1/10 от LD_{50} (250 mg/kg) и 1/20 от LD_{50} (125 mg/kg), за да се оцени дългосрочната поносимост на съединението (Таблица 10).

Таблица 11. Остра перорална токсичност на DO 190 на женски мишки.

Доза mg/ kg т.г.	Ефект/ смъртност	Време на поява	Симптоми
1000	3/3	15-30 мин.	Ускорено дишане, атаксия, пилоерекция
800	2/3	След 0,5 час	Затруднено дишане, атаксия
600	1/3	След 1 час	Затруднено дишане, атаксия
400	0/3	-	-
200	0/3	-	-

$LD_{50} = \sqrt{D_0 \times D_{100}} = \sqrt{600 \times 400} = 489,89$; $LD_{50} \approx 500$ mg/ kg за i.p. приложение, което дава стойност около 500 mg/kg. Това показва, че съединението има сравнително умерена токсичност при този начин на приложение (Таблица 11).

$LD_{50} = \sqrt{D_0 \times D_{100}} = \sqrt{800 \times 600} = 692,82$; $LD_{50} \approx 700$ mg/ kg, което дава стойност около 700 mg/kg за i.p. приложение. $IR = LD_{50} \text{ i.p.} / LD_{50} \text{ p.o.} \times 100 (\%) = 489,89 / 692,82 \times 100 \approx 70,7\%$. Това показва, че абсорбцията на веществото при интравенозно приложение е около 70,7% от абсорбцията при перорално приложение (Таблица 12).

Таблица 12. Остра интраперитонеална токсичност на DO 209 на женски мишки.

Доза mg/ kg т.г.	Ефект/ смъртност	Време на поява	Симптоми
1000	2/3	След 15-30 мин.	Учестено дишане, нарушена походка, клоничен гърч, смърт
800	1/3	След 2 часа	Затруднено дишане, атаксия, хипоактивност
600	0/3	-	-
400	0/3	-	-
200	0/3	-	-

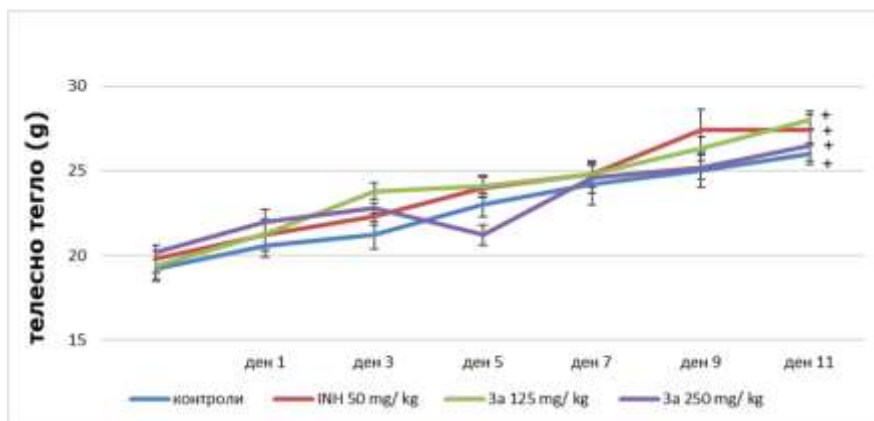
За 14-дневното подостро перорално третиране бяха използвани дози, съответстващи на 1/10 (70 mg/kg) и 1/20 (35 mg/kg) 1/10 от LD50, които позволяват да се оцени поносимостта на съединението при продължително приложение.

След тестовете за остра токсичност и 14-дневно наблюдение, съединенията 3a и 3d показват добра поносимост и липса на сериозни токсикологични ефекти. При парентерално приложение токсичността е леко повишена, но и двете попадат в категорията на леко токсични вещества според класификацията на Ходж и Сърнър, което ги прави подходящи за по-нататъшни изследвания. В сравнение, DO-190 е значително по-токсичен от DO-209, който се класифицира като по-безопасен кандидат.

През 14-дневния наблюдателен период след тестовете за остра токсичност, при оцелелите животни не бяха установени отклонения в поведението, физическото състояние или невротоксични симптоми. Приемът на храна и вода остана непроменен.

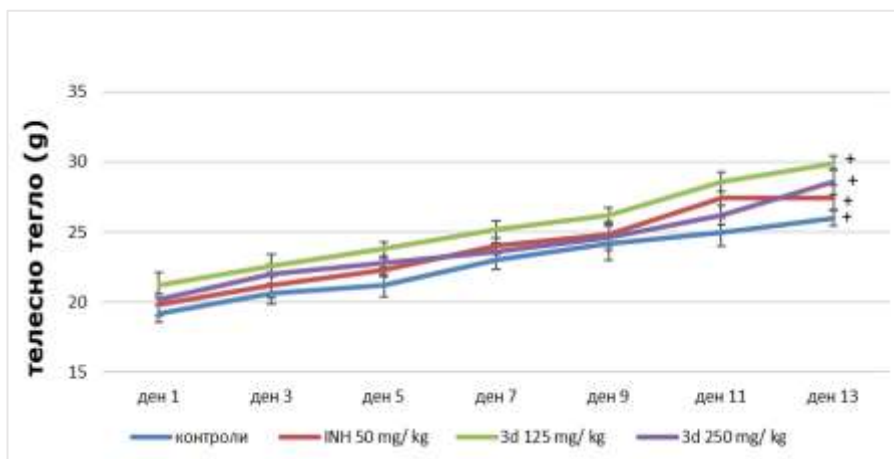
На 14-ия ден животните бяха хуманно евтаназирани съгласно етичните норми.

Подострата токсичност на дериватите 3a и 3d бе оценена при 36 мъжки мишки с 14-дневно перорално приложение. Телесното тегло беше измервано през целия период, като резултатите показаха значително увеличение при всички дози (Фигура 11 и 12).



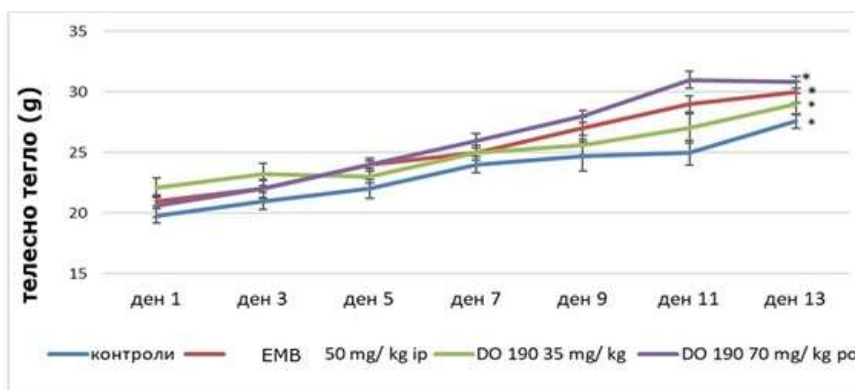
Фигура 11. Промени в телесното тегло на мъжки мишки, третирани с INH и 3a; +p < 0,05 спрямо 1-вия ден от експерименталния период.

Най-голямо увеличение бе отчетено при 125 mg/kg – 41% за 3a и 44% за 3d спрямо началните стойности, което потвърждава липса на токсичност

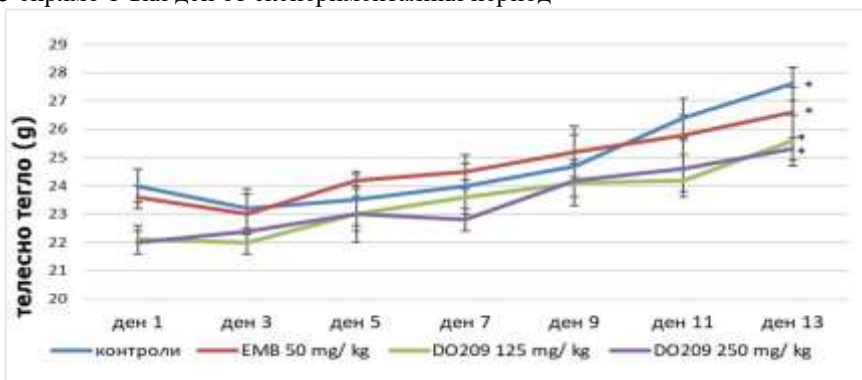


Фигура 12. Промени в телесното тегло на мъжки мишки, третирани с INH и 3d; +p < 0,05 спрямо 1-вия ден от експерименталния период.

Подостратата токсичност на съединенията DO-190 и DO-209 бе оценена след 14-дневна перорална експозиция. Телесното тегло бе измервано на същите времеви точки, а резултатите са визуализирани на Фигури 13 и 14.



Фигура 13. Промени в телесното тегло на мъжки мишки, третирани с EMB и DO-190; *p < 0,05 спрямо 1-вия ден от експерименталния период



Фигура 14. Промени в телесното тегло на мъжки мишки, третирани с EMB и DO-209; *p < 0,05 спрямо 1-вия ден от експерименталния период

На 14-ия ден от експеримента всички преживели животни бяха евтаназирани съгласно етичните протоколи. Извършено бе вземане на кръв за пълна кръвна картина (ПКК) и биохимичен анализ.

Всички експериментални групи демонстрират увеличение на телесното тегло, като най-изразено повишение е отчетено при животни, третирани с DO-190 в доза 70 mg/kg. До края на експерименталния период групата, получавала DO-190 (70 mg/kg), показва статистически значимо увеличение на телесното тегло с 49,5% спрямо изходната стойност. В групите, третирани с DO-190 в доза 35 mg/kg и с етамбутол в доза 50 mg/kg, увеличението на теглото е съответно 29% и 30%. Въпреки отчетеното повишение на телесната маса при по-високата доза на DO-190 (70 mg/kg), бяха наблюдавани повтарящи се стереотипни движения (кръгово обикаляне по решетката на клетката), което може да е индикация за потенциални неврологични ефекти. При експозиция на DO-209 се отчита по-слабо наддаване на телесно тегло (около 13–16%), което може да отразява различен токсикологичен профил и потенциално по-добра поносимост.

Резултатите от анализа на кръвната картина при експерименталния миши модел са представени в Таблица 13. Прилагането на INH води до статистически значимо намаляване на нивата на еритроцитите, хемоглобина и хематокрита – съответно с 28%, 21% и 20% в сравнение с контролната група и референтните стойности за мишки. Броят на левкоцитите (WBC) е повишен с 70% спрямо контролата, но стойностите остават в рамките на физиологичната норма. Не са наблюдавани промени в нивата на тромбоцитите след 14-дневно перорално приложение на INH. При животните, третирани с двете дози на съединението 3a, не са установени статистически значими отклонения от референтните стойности, което показва, че изпитваните съединения не водят до неблагоприятни ефекти върху хемопоезата.

Таблица 13. Хематологични параметри след 14-дневен прием на INH и ароилхидразоните 3a и 3d.

Хематологични параметри	Контроли	INH	3a	3a	3d	3d	Референтни стойности
		50 mg/kg	125 mg/kg	250 mg/kg	125 mg/kg	250 mg/kg	
WBC x 10⁹/L	5,8 ± 0,34	9.9±0.54*	6.3±0.36 ⁺	7.4±0.44* ⁺	8.2±0.28* ⁺	7.7±0.33* ⁺	2.9 – 15.3
RBC x 10¹²/L	7.39 ± 0.6	5.35±0.2*	6.84±0.3 ⁺	6.97± 0,3 ⁺	7.21±0.16 ⁺	7.62±0.24 ⁺	5.6 – 7.89
Hgb g/L	142 ± 7.6	112 ±2.2*	127 ±5.4 ⁺	129 ± 3.8 ⁺	132.2±4.2 ⁺	130.2±3.7 ⁺	120 - 150
HCT %	41.3 ± 1.8	33.3±2.1*	37.2±2.6 ⁺	38.2 ±1.8 ⁺	39.6 ± 0.8 ⁺	40,1 ± 1,2 ⁺	36 - 46
PLT 10⁹/L	886 ± 126	789 ±183	979 ±238	638 ± 181	729 ± 203	864 ± 212	100 - 1610

* p < 0,05 спрямо контролите; ⁺ p < 0,05 спрямо ЕМВ. Резултатите са изразени като средна стойност ± SD (n = 6). Значимостта на данните е оценена с помощта на непараметричния тест Mann-Whitney U. Стойности от p ≤ 0,05 се считат за статистически значими. Съкращения: WBC - бели кръвни клетки; RBC - червени кръвни клетки; PLT - тромбоцити; Hb - хемоглобин; и Ht - хематокрит.

Резултатите от биохимичния анализ на серума при експерименталния миши модел, представени в Таблица 14, разкриват статистически значимо повишение на параметри, показатели, свързани с чернодробната и бъбречната функция свързани с чернодробната и бъбречната функция, след 14-дневно перорално приложение на INH. Това увеличение включва показатели като активността на чернодробните ензими и нивата на урея и креатинин, които показват потенциално въздействие върху тези органи. Напротив, при животните, лекувани с ароилхидразоните 3a и 3d в дози от 125 и 250 mg/kg, не са наблюдавани същите ефекти. Анализът на биохимичните параметри разкриват статистически значими изменения след 14-дневно перорално приложение на INH. Трансаминазите ASAT и ALAT се увеличават съответно с 52 % и 67 % в сравнение с контролната група и референтните стойности за мишки. Нивата на общия и директния билирубин също са

Таблица 14. Биохимични параметри в серум след 14-дневно приложение на INH и ароилхидразоните 3a и 3d в дози 125 и 250 mg/kg.

Биохимични параметри	Контроли	INH	3a	3a	3d	3d	Референтни стойности
		50 mg/ kg	125mg/kg	250 mg/kg	125 mg/kg	250 mg/kg	
GLU mmol/L	6.4 ± 0.47	6.3 ± 0.36	7.1 ± 0.24	6.8 ± 0.22	7.0 ± 0.16	4.2 ± 7.5	6.4 ± 0.47
UREA mmol/L	9.1 ± 0,12	13.6 ± 0.36*	8.8 ± 0.28 ⁺	11.5 ± 0.22 ⁺	8.7 ± 0.26 ⁺	8.4 ± 0.23 ⁺	3.27 – 12.1
CREAT μmol/L	98.3 ± 2,3	126.6 ± 8.2*	95,6 ± 6.6 ⁺	86.4 ± 5.6 ⁺	88.2 ± 3.1 ⁺	92.2 ± 4.4 ⁺	35 – 120
UA μmol/L	195 ± 18,9	196 ± 20.7	163 ± 23.4	194 ± 17.7	199 ± 14.6	201.3 ± 12	0 - 300
TP g/L	58.1 ± 2.2	43.2 ± 3.1*	54.3 ± 2.6 ⁺	58.6 ± 3,6 ⁺	56.6 ± 4.2 ⁺	52.2 ± 5.1 ⁺	53 – 63
ALB g/L	27.9 ± 1.8	21.6 ± 1.7*	26,6 ± 2.2 ⁺	27.3 ± 3.1 ⁺	28.5 ± 3.3 ⁺	28.2 ± 2.8	26 - 29
ASAT U/L	83 ± 4.1	86 ± 5.4	121.2 ± 3.2 ^a _b	122.2 ± 2.1 ^{ab}	91 ± 3.8	98 ± 4.8	65 - 122
ALAT U/L	58 ± 4.2	59 ± 6.1	80.2 ± 2.2 ^{ab}	79.3 ± 1.3 ^d _b	62.2 ± 4.3	88.4 ± 3.6 ^{abc}	55 - 80
T-Bil μmol/L	5.6 ± 0.48	6.0 ± 0.28	8.2 ± 0.41 ^{ab}	8.4 ± 0.8 ^{ab}	4.4 ± 0.42	6.3 ± 0.38	3.9 - 9.6
D-Bil μmol/L	3.4 ± 0.86	3.5 ± 0.84	3.8 ± 0.31	4.1 ± 0.61	3.4 ± 0.56	4.9 ± 0.24	0 - 6.8

*p<0,05 спрямо контролите; +p<0,05 спрямо INH; Резултатите са изразени като средна стойност ± SD (n = 6). Значимостта на данните е оценена с помощта на непараметричния тест Mann-Whitney U. Стойностите на p ≤ 0,05 се считат за статистически значими. Съкращения: Glu, ниво на глюкозата; CREAT, креатинин; UA, пикочна киселина; TP, общ протеин; Alb, албумин; AST, аспартат аминотрансфераза; ALT, аланин аминотрансфераза; T-Bil, общ билирубин; и D-Bil, директен билирубин

Освен това, нивата на албумина и общия протеин значително намаляват с 23 % и 26 %, което може да е индикатор за потисната синтетична активност на черния дроб. Уреята и креатининът показват увеличение съответно с 49 % и 29 %, което предполага възможни нарушения в бъбречната функция. Въпреки тези промени, при нито една от

експерименталните групи не са наблюдавани значителни отклонения в нивата на кръвната захар.

Не са установени статистически значими отклонения в хематологичните и биохимичните параметри при животни, третирани със съединенията 3a и 3d, което показва добра поносимост на тези вещества. Увеличаването на теглото и липсата на значителни промени в хематологичните, биохимичните и патоморфологични параметри в кръвта, черния дроб, тънките черва и бъбреците показват, че съединенията 3a и 3d са добре поносими при прилагане в подходящи дози.

Таблица 15. Хематологични параметри след 14-дневен прием на EMB и нитрофуриламидите DO190 и DO209.

Хематологични параметри	Контроли	EMB	DO190	DO190	DO209	DO209	Референтни стойности
		50 mg/ kg	35mg/kg	70mg/ kg	125mg/ kg	250 mg/kg	
WBC x 10⁹/L	5.8 ± 0.34	6.4± 0,5 ^a	7.8± 0,6 ^a	7.1± 0.7	8.23±0.13 ^b	6.8± 0.6	2.9 – 15.3
RBC x 10¹²/L	7,39 ± 0,6	7.06 ±0.4	6.36± 0,8	7.03± 0.5	6.02± 0.2 ^b	7.23± 0.7	5,6 - 7,89
Hgb g/L	142 ± 7,6	142 ±7.2	142± 2.6	136± 3.2	128± 4.1	135± 2.4	120 - 150
HCT %	41,3 ± 1,8	44 ±2.4	41± 3.2	42.4± 2.2	43.2± 3.1	42.2± 3.7	36 - 46
PLT 10⁹/L	886 ± 126	789 ±96	881± 123	865± 105	932± 116	888± 121	100 - 1610

^a p < 0,05 спрямо контролите; ^b p < 0,05 спрямо EMB. Резултатите са изразени като средна стойност ± SD (n = 6). Значимостта на данните е оценена с помощта на непараметричния тест Mann-Whitney U. Стойности от p ≤ 0,05 се считат за статистически значими. Съкращения: WBC - бели кръвни клетки; RBC - червени кръвни клетки; PLT - тромбоцити; Hb - хемоглобин; и Ht - хематокрит.

Резултатите от анализа на пълната кръвна картина и биохимичните показатели при мишки, след 14-дневно многократно приложение на нитрофуриламидите DO-190 и DO-209, показват леко увеличение на броя на WBC (Таблица 15). Това увеличение е особено изразено при по-високите дози в сравнение с контролната група. Въпреки това, тези промени остават в рамките на референтните стойности за вида и не предполагат наличие на патологични промени. Не са наблюдавани значителни изменения в останалите хематологични параметри спрямо контролната група.

Резултатите от биохимичния анализ на серума при експерименталните животни са представени в Таблица 16. След 14-дневно третиране с EMB (50 mg/kg) се наблюдава статистически значимо повишаване на нивото на пикочната киселина с 63% в сравнение с контролната група, което съответства на данни, докладвани от Kehinde et al. (2015), при сходни експериментални условия. И двете дози на DO-190 предизвикват повишение на нивата на урея, пикочна киселина, ASAT, ALAT и общ билирубин в сравнение с контролните животни и групата, третирана с етамбутол. Въпреки това, тези стойности остават в рамките на референтните норми и не показват индикации за значителна

токсичност. DO-209, при приложена доза от 250 mg/kg, повишава нивото на глюкоза в кръвта с 42%, нивото на урея с 92% и активността на ALT с 52%, спрямо контролната група, като регистрираните промени също остават в рамките на физиологичните граници. В подобен контекст, изследвания на Kehinde и Adaramoye (2015) също показват повишаване на серумния билирубин и урея при лечение с INH и EMB, като не се наблюдават значителни токсични ефекти, въпреки тези биохимични промени.

Таблица 16. Биохимични показатели в серума от експериментални животни след 14 дни приложение на EMB и нитрофурилиамидите DO190 и DO209.

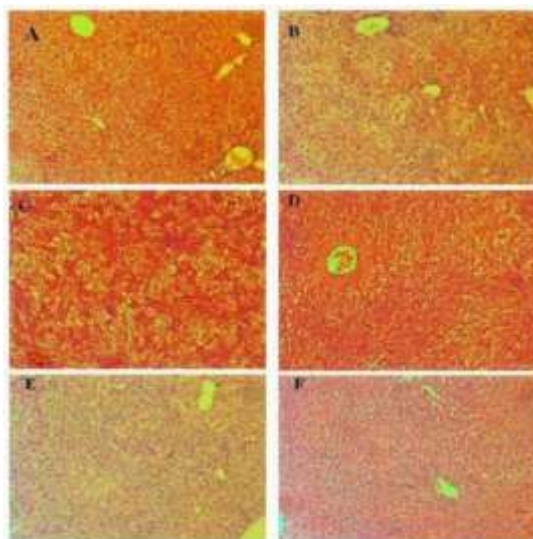
Биохимични параметри	Контроли	EMB	DO 190	DO 190	DO 209	DO 209	Референтни стойности
		50 mg/ kg	35mg/kg	70 mg/kg	125 mg/kg	250 mg/kg	
GLU mmol/L	6.2 ± 0.12	7.1± 0.4	6.3 ± 0.5	7.3± 0.32	6.5± 0.41	8.8±0.29 ^{ab}	4.2 – 7.5
UREA mmol/L	7.1 ± 0.32	8.0± 0.36	11.4±0.31 ^{ab}	12.6±0.28 ^{ab}	6.8±0.22	13.±.22 ^{ab}	3.27 – 12.1
CREAT μmol/L	88 ± 12.3	82± 12.8	92.3± 8.2	102.2± 11.6	85± 16.2	79± 12.6	35 – 120
UA μmol/L	236 ± 11.4	385±20.3d	286.3±9.1 ^{ab}	298±11.3 ^{db}	243±133	261± 12.3	0 - 300
TP g/L	58 ± 3.2	53± 4.6	55.2 ± 2.8	58.1± 3.1	54± 5.3	56± 3.3	53 – 63
ALB g/L	27 ± 1.3	28± 1.2	27.2± 0.8	26.8± 1.6	26± 2.2	27± 3.1	26 - 29
ASAT U/L	83 ± 4.1	86± 5.4	121.2±3.2 ^{ab}	122.2±2.1 ^{ab}	91± 3.8	98± 4.8	65 - 122
ALAT U/L	58 ± 4.2	59± 6.1	80.2± 2.2 ^{ab}	79.3±1.3d	62.2±4.3	88±43.6 ^{abc}	55 - 80
T-Bil μmol/L	5.6 ± 0.48	6.0± 0.28	8.2± 0.41 ^{ab}	8.4± 0.8 ^{ab}	4.4±0.42	6.3± 0.38	3.9 - 9.6
D-Bil μmol/L	3.4 ± 0.86	3.5± 0.84	3.8± 0.31	4.1± 0.61	3.4±0.56	4.9± 0.24	0 - 6.8

^a p < 0,05 спрямо контролите; ^b p < 0,05 спрямо EMB; ^c p < 0,05 спрямо референтните стойности; Резултатите са изразени като средна стойност ± SD (n = 6). Стойности от p ≤ 0,05 се считат за статистически значими. Съкращения: Glu, ниво на глюкозата; CREAT, креатинин; UA, пикочна киселина; TP, общ протеин; Alb, албумин; AST, аспартат аминотрансфераза; ALT, аланин аминотрансфераза; T-Bil, общ билирубин; и D-Bil, директен билирубин.

6. Патоморфологична оценка на промените в таргетни органи след приложение на ароилхидразони (3a и 3d) и нитрофурилиамиди (DO 190 и DO 209) спрямо контролни групи

6.1. Патоморфологична оценка на промените в черен дроб

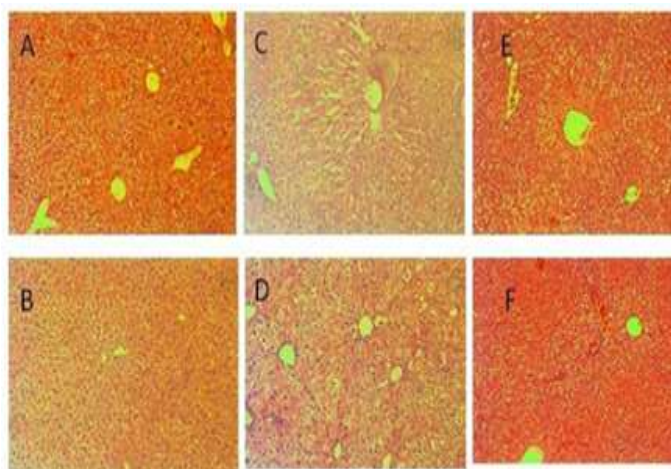
Хистологичният анализ (Фигура 15) показва, че съединенията 3a и 3d не предизвикват значителни патологични промени в черния дроб след 14-дневно приложение. При дози до 250 mg/kg лобуларната структура се запазва с минимална балонна дегенерация и ограничена холестаза. По-високи дози (3000 mg/kg) водят до слаба колагенизация без фиброза. Наблюдавана е и слаба стеатоза, потвърждаваща добрия хепатотоксикологичен профил на съединенията.



Фигура 15. Патоморфологични находки в черния дроб при мишки след перорално приложение на INH и ароилхидразоните 3a и 3d.

Легенда: (A) Контролна група-нетретирана, (B) INH, 50 mg/kg; (C) 3d (VAL-SNN), 125 mg/kg; (D) 3d (VAL-SNN) 250 mg/kg; (E) 3d, 125 mg/kg; (F) 3d (3d), 250 mg/kg; Увеличение на полето 100×.

Патоморфологичният анализ на черния дроб при мишки, третирани с нитрофираниламидите DO-190 и DO-209, не разкрива значими патологични изменения (Фигура 16).



Фигура 16. Патоморфологични находки в черния дроб при мишки след перорално приложение на INH, EMB и нитрофираниламидите DO 190 и DO 209.

Легенда: (A). Контролна група-нетретирани; (B) -EMB, 50 mg/kg; (C) — DO 190, 35 mg/kg; (D) — DO 190, 70 mg/kg; (E)-DO 190, 800 mg/kg; (F) — DO 209 3000 mg/kg, Увеличително поле x100

Хистологичният анализ на черния дроб показва запазена лобуларна архитектура с минимални промени – лека интрахепатална холестаза, пасивна венозна хиперемия и слаба дилатация на синусоидите. Не се наблюдават фиброза, възпаление или загуба на хепатоцити. Балонираща дегенерация засяга 8–18% от клетките, а стеатозата е до 3%. При 3000 mg/kg DO-209 се установяват умерени дегенеративни промени без тежка

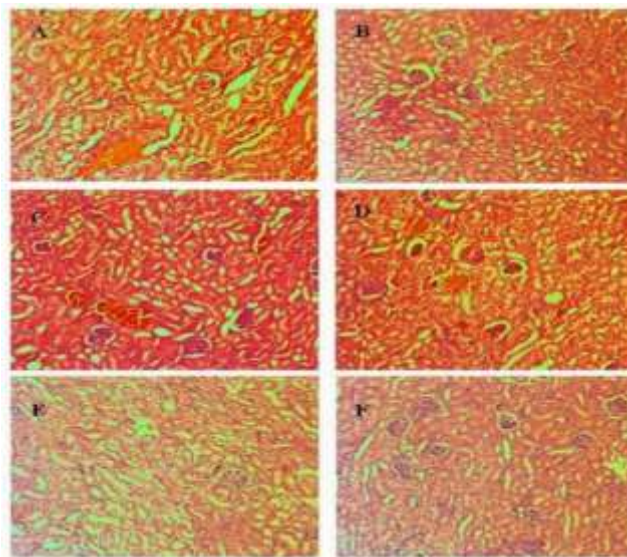
токсичност, с ограничено клетъчно увреждане, потвърдено от спорадично наличие на автофагични вакуоли.

6.2. Патоморфологична оценка на промените в бъбреците

Изследванията на бъбречната тъкан след 14-дневно приложение на ароилхидразоновите съединения (3a и 3d) показват, че няма значителни отклонения от нормалната бъбречна структура (Фигура 17).

В контролната група бъбречната структура е напълно запазена, без патологични промени. При третиране с INH (50 mg/kg) дисталните тубули също запазват структурата си, с минимални епителни изменения.

При групите с дериват 3a (125 и 250 mg/kg) се наблюдават само минимални циркулаторни лезии и оток в интерстициума, без тубулит, атрофия или гломерулит. Аналогично, групите с 3b показват незначителни вариации в бъбречната структура, без токсични ефекти. Хистологичният анализ не разкрива значими патологични изменения в проксималните и дисталните тубули, съдовете и мезангиума. Възможната съдова хиперемия не води до структурни увреждания и не засяга бъбречната функция.

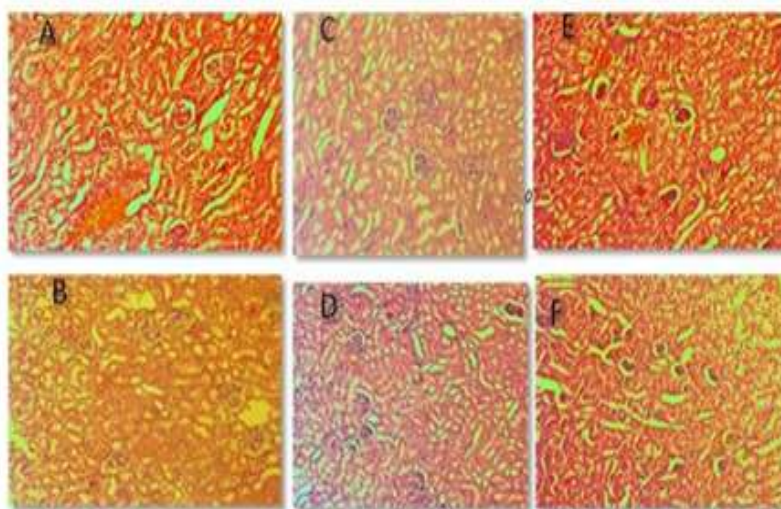


Фигура 17. Патоморфологични находки в бъбреците при мишки след перорално приложение на INH и ароилхидразоните 3a и 3d.

Легенда: (A). Контролна група – не се лекува, (B) – INH, 50 mg/kg; (C)—3a, 125 mg/kg; (D)—3a 250 mg/kg; (E)—3d, 125 mg/kg; (F)—3d, 250 mg/kg; Увеличение на полето 100×.

При високи дози се наблюдават леки адаптационни промени в медуларната област и перигломеруларния интерстициум, които не водят до трайни увреждания. Липсват патологични изменения и в събирателните каналчета. Изследванията на бъбречната

тъкан при третиране с DO-190 и DO-209 не показват значими топографски промени и потвърждават запазена бъбречна структура и функция (Фигура 18).



Фигура 18. Патоморфологични находки в бъбреците при мишки след перорално приложение на INH, EMB и нитрофуриламида DO 190 и DO 209.

Легенда: (A). Контролна група - нетретирана, (B) - EMB, 50 mg/kg; (C) DO 190, 35 mg/kg, (D) — DO 190, 70 mg/kg; (E)-DO 190, 800 mg/kg; (F)— DO 209, 3000 mg/kg; ; Увеличително поле 100×.

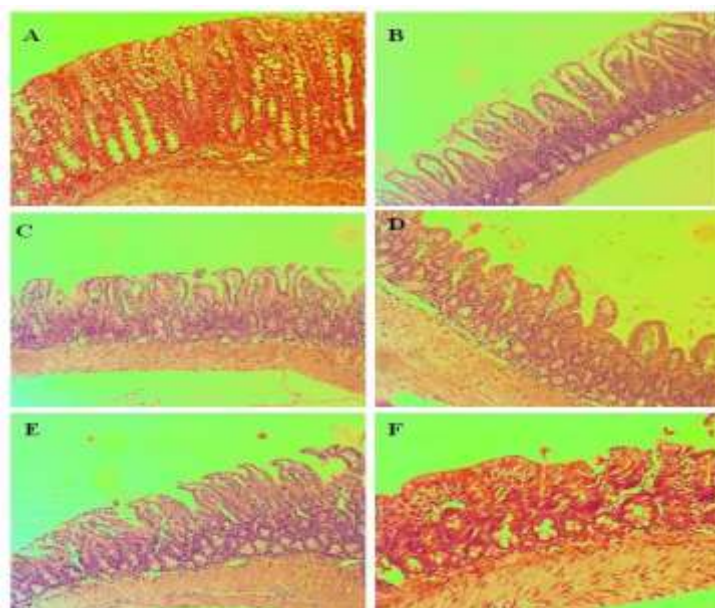
Наблюдаваните минимални отклонения – като интерстициален оток, леко понижен епител и разширени луминални сегменти – не се свързват с токсични увреждания. Липсват признаци на тубулит, атрофия или възпалителни процеси. Данните показват, че изследваните съединения не предизвикват значима нефротоксичност, дори при високи дози.

6.3 Патоморфологична оценка на промените в тънките черва

След перорално приложение на ароилхидразоновите съединения (3a и 3d) и нитрофуриламида (DO-190 и DO-209) хистологичният анализ на тънките черва при мишки показва различия в клетъчната активност и структурата на лигавицата, зависещи от дозата (Фигура 19 и 20). Възпалителните процеси са с ниска степен, с плътност на левкоцити под 10% в собствената пластинка, без значителни вариации между животните.

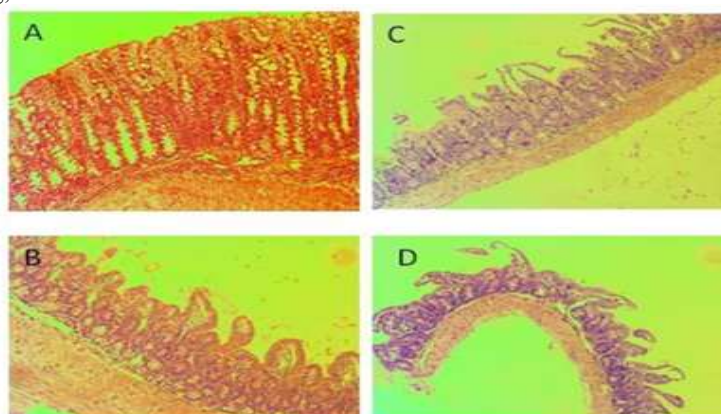
Патоморфологичният анализ на тънкочревната тъкан при всички експериментални групи не разкрива значими увреждания или възпалителни реакции. При животните, третирани с INH, 3a, 3b, EMB, DO-190 и DO-209, се наблюдават само минимални промени в крипто-вилозната архитектура без проникване на възпаление или значима

атрофия. Левкоцитната инфилтрация е ограничена, а епителът остава запазен, което показва липса на токсичен ефект върху чревната лигавица, дори при по-високи дози.



Фигура 19. Патоморфологични находки в тънките черва при мишки след перорално приложение на INH и ароилхидразоните 3a и 3d.

Легенда: А. Контролна група - нетретирана, В-INH, 50 mg/kg; С-3a, 125 mg/kg; D-3a, 250 mg/kg; E- 3d, 125 mg/kg; F-3d, 250 mg/kg; Увеличение на полето 100х



Фигура 20. Патоморфологични находки в тънките черва при мишки след перорално приложение на INH, EMB и нитрофираниламидите DO 190 и DO 209.

Легенда: (А). Контролна група-нетретирана, (В)-EMB, 50 mg/kg (С)-DO 190, 35 mg/kg; (D)- DO 190, 70 mg/kg, Увеличително поле 100х

Хистологичният анализ на тънкочревната тъкан при мишки, третирани с EMB, DO-190 и DO-209, показва минимални структурни промени без съществени възпалителни реакции. В контролната група епителът е интактен, с липса на ерозии, инфилтрация или дефекти, засягащи *lamina muscularis mucosae*.

Резултатите от тази оценка подчертават необходимостта от внимателна оптимизация на дозата. Хистопатологичните промени, наблюдавани при DO 190 и DO 209, сочат към дозозависима токсичност, като по-високите дози водят до по-изразени

чернодробни промени. За разлика от тях, ароилхидразоните (3a и 3d) демонстрират благоприятен профил на безопасност, като причиняват минимални или никакви значителни увреждания на органите. Тези открития подкрепят хипотезата, че по-ниските дози на нитрофуриламида може да бъдат по-безопасни, намалявайки риска от хепатотоксичност, като същевременно запазват терапевтичната ефективност. Това предполага, че бъдещите проучвания трябва да се съсредоточат върху определянето на оптималния терапевтичен прозорец, който балансира ефикасността с безопасността.

В настоящото изследване беше разгледана хепатотоксичността, индуцирана от INH, ароилхидразоновите съединения и нитрофуриламида в експериментални условия. Данните от хистологичните изследвания показват, че въпреки минималните патологични изменения, които се наблюдават след експозиция на INH и ароилхидразоните, няма сериозни хепатотоксични ефекти, които да водят до изразена некроза или фиброза в черния дроб на мишките, както се установява и в проучванията на Tostmann (2008).

Известно е, че хидразин, като основен токсичен метаболит на изониазид, предизвиква стеатоза, вакуолизация на хепатоцити и изчерпване на глутатиона, което води до откриването на липидни вакуоли и митохондриално подуване в перипорталните и среднозоналните хепатоцити (Tostmann et al., 2007). Въпреки тези теоретични данни, нашите резултати не отбелязват значителни морфологични изменения, които да отговарят напълно на описаните симптоми на токсичност, въпреки присъствието на минимални признаци на балонираща дегенерация в някои от експерименталните групи.

По отношение на RIF, макар че той не е включен в настоящото изследване, съществуват данни, че може да причини преходна хипербилирубинемия и чернодробни лезии, които се характеризират с хепатоцелуларни промени и централизирана некроза, свързана с холестаза (Combrink et al., 2020). Резултатите от проучванията при хора показват, че рифампицин може да доведе до сериозни чернодробни промени като лимфоцитна инфилтрация, фокална холестаза и повишена фиброза, които понякога водят до микронодуларна цироза. Макар тези ефекти да не се наблюдават при нашите модели, потенциалът за индуциране на токсични изменения с лекарства като рифампицин остава значителен и изисква внимателно наблюдение и оценка на риска при употребата им, особено в комбинация с други медикаменти.

7. Оценка маркерите на оксидативен стрес

7.1 Оценка маркерите на оксидативен стрес след третиране с ароилхидразони 3a и 3d

Резултатите от оценката на редокс-модулиращия капацитет на активните съединения са представени в Таблица 16.

Таблица 16. *In vitro* редокс-модулиращи свойства на 3a и 3d

Параметри	Fe ²⁺	DPPH	ABTS
Съединение	IC ₅₀ [mg/ml]	IC ₅₀ [mg/ml]	IC ₅₀ [mg/ml]
3a	85.14 *	18.69 *	40.35 *
3d	76.29 *	47.5 *	89.47 *
Trolox	18.2	8.92	24.8

*P<0,01 спрямо чиста контрола

Чрез DPPH тест оценихме антирадикаловата активност на веществата. Анализът се базира на способността за трансфер на водороден атом (Li, D.L. et al., 2009, а активността е свързана с наличие на полярно-свързан водород в молекулата на използвания субстрат.

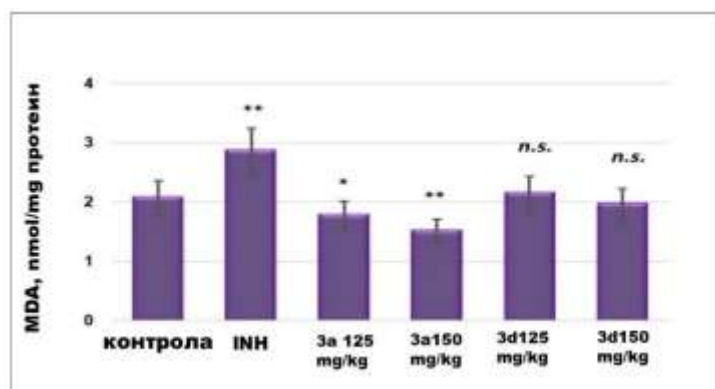
Съединенията 3a и 3d демонстрираха значима антирадикалова активност при DPPH и ABTS тестовете, като отчетените IC₅₀ стойности (mg/ml) предполагат наличие на антирадикалова активност в моделните системи, което вероятно е свързано с наблюдаваната биологична поносимост и отсъствието на токсичност *in vivo*.

Въпреки това, трябва да се има предвид, че както DPPH, така и ABTS радикалите не се срещат в природата, което поставя под въпрос пряката им роля в биологичните процеси.

Ефектът на INH върху нивото на липидната пероксидация, измерено чрез количеството на TBARS като маркер на оксидативния стрес в чернодробна хомогенат супернатантa е показан на Фигура 21.

След приложение на INH (50 mg/kg) нивото на MDA се увеличава с над 35%, докато съединение 3a в двете дози леко намалява MDA спрямо контрола. Съединение 3d не променя значително нивата на MDA. *In vivo*, 3a показва по-добър ефект срещу желязо-индуцирана липидна пероксидация в сравнение с *in vitro* моделите. Съдържанието на MDA отразява степента на липидна пероксидация и нивото на увреждане от прооксиданти (Niedernhofer, L.J. et al. 2007).

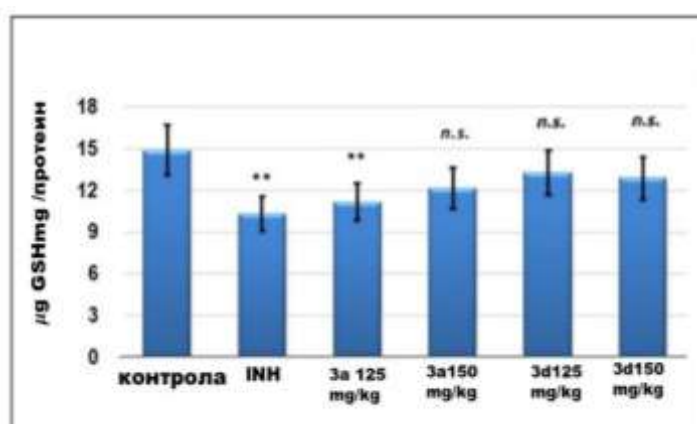
Успоредно с намаляването на MDA установихме, че INH намалява и нивото на общия GSH с около 40% (Фигура 22). Съединения 3a в двете дози показва съществени подобни стойности на GSH с тези на INH, докато 3d и в двете дозировки съдържа близко до контролните животни.



Фигура 21. Ендогенно съдържание на MDA в чернодробния хомогенат на експерименталните групи.

* $P < 0,05$ спрямо контролите; ** $P < 0,01$ спрямо контролите; n.s. - несъществено спрямо INH. Резултатите са изразени като средна стойност $\pm$ SD ($n = 6$). Значимостта на данните е оценена с помощта на непараметричния U тест на Ман-Уитни. Стойности $p \leq 0,05$ се считат за статистически значими

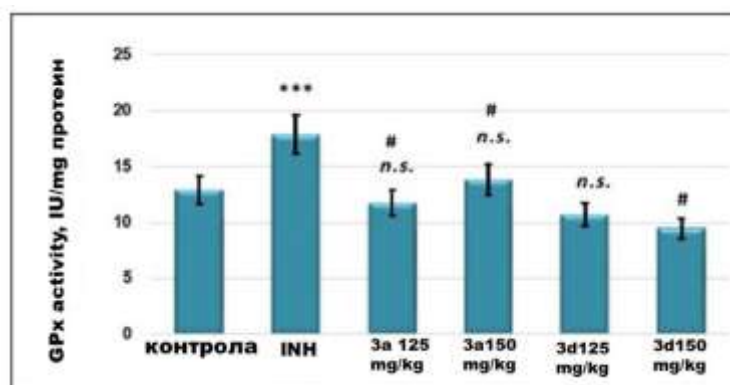
GSH е основен антиоксидант, който регулира редокс процесите и възпалението в организма. Нарушения в неговата хомеостаза са свързани с често с чернодробни дисфункции (Chen et al., 2013). GSH неутрализира реактивни кислородни видове и подпомага действието на глутатион пероксидаза, както и регенерацията на витамини С и Е. Дефицитът на GSH повишава риска от клетъчно увреждане при болни от туберкулоза, ХИВ и диабет (Nair et al., 2021).



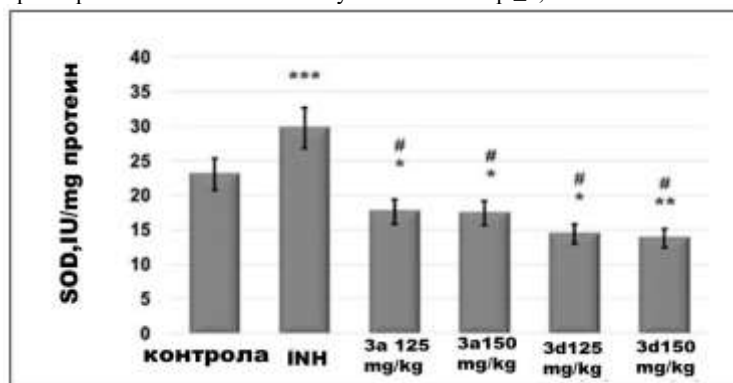
Фигура 22. Ендогенно съдържание на GSH в чернодробния хомогенат на експерименталните групи.* $p < 0,05$ спрямо контролите; ** $p < 0,01$ спрямо контролите; n.s.-незначително спрямо контролите. Резултатите са изразени като средна стойност $\pm$ SD ($n = 6$). Значимостта на данните е оценена с помощта на непараметричния тест Mann-Whitney U. Стойности от $p \leq 0,05$ се считат за статистически значими.

Резултатите от Фигура 23 показват, че INH повишава активността на GPx с около 35% и на SOD с 25% спрямо контролните проби. За разлика от него, съединенията 3a и 3d не променят статистически значимо активността на тези ензими, като 3d възстановява нивата на GPx до стойности, близки до контролните. Освен това, INH води до приблизително 30% намаление на глутатиона, докато новосинтезираните аналози запазват неговите нива.

Получените данни сочат, че съединенията 3a и 3d демонстрират стабилен редокс-модулиращ потенциал, като предизвикват компенсаторни промени в ензимните активности и стабилизиране стойностите на маркерите на оксидативен стрес. Това ги определя като потенциални терапевтични агенти за ограничаване на оксидативните увреждания, особено в контекста на туберкуозна инфекция и свързаната с нея чернодробна токсичност.



Фигура 23. Активност на глутатион пероксидазата в чернодробната супернатанта на експерименталните групи. *** $P < 0,001$ спрямо контролите; # $P < 0,01$ спрямо INH 50 mg/kg; n.s. - несъществено спрямо контролите. Резултатите са изразени като средна стойност $\pm$ SD ($n = 6$). Значимостта на данните е оценена с помощта на непараметричния тест Mann-Whitney U. Стойности $p \leq 0,05$ се считат за статистически значими

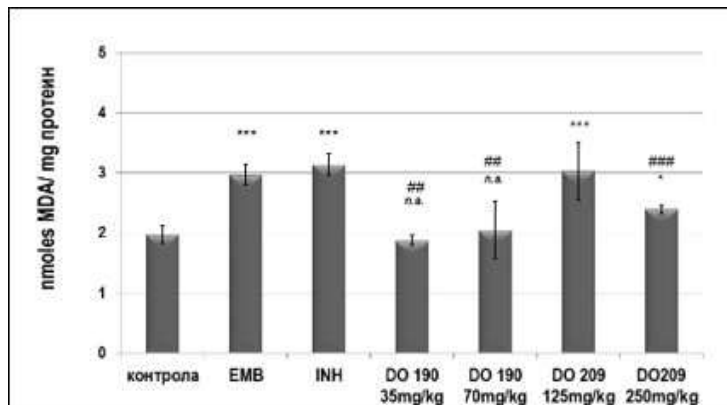


Фигура 24. Активност на SOD в чернодробната супернатанта на експерименталните групи. *** $P < 0,001$ спрямо контролите; ** $P < 0,01$ спрямо контролите; * $P < 0,05$ спрямо контролите; # $P < 0,001$ спрямо INH 50 mg/kg. Резултатите са изразени като средна стойност $\pm$ SD ($n = 6$). Значимостта на данните е оценена с помощта на непараметричния тест Mann-Whitney U.

Ензимите GPx и SOD действат синхронно, като елиминират супероксидни, и хидроксидни радикали и водороден пероксид, поддържайки равновесието на глутатион в клетките. В нашето проучване установихме, че съединенията 3a и 3d не предизвикват значителни промени в активността на тези ензими в сравнение с нетретирани контролни животни, докато INH увеличава тяхната активност. Резултатите от *in vivo* експериментите показват, че съединенията 3a и 3d имат потенциала да възстановят маркерите на оксидативния стрес и демонстрират сходен редокс-модулиращ ефект при различни дози. Затова те могат да се разглеждат като потенциални лекарствени кандидати, които контролират оксидативните увреждания, свързани с чернодробната токсикоза, особено в контекста на туберкулозната инфекция.

7.2 Оценка маркерите на оксидативен стрес след третиране с нитрофираниламида (DO 190 и DO 209)

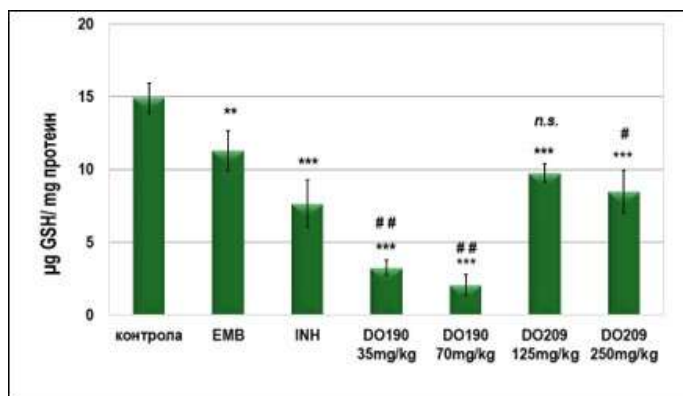
Резултатите, представени на Фигура 25, илюстрират промените в съдържанието на MDA в чернодробната тъкан под въздействието на нитрофираниламидите DO 190 и DO 209. Повишените нива на MDA са индикатор за засилено липидно окисление, което е свързано с оксидативен стрес и увреждане на клетъчните мембрани.



Фигура 25. Ендогенно съдържание на MDA в чернодробния хомогенат на експерименталните групи. * $p < 0,05$ спрямо контролите; *** $p < 0,001$ спрямо контролите; ns — незначими спрямо контроли; ## $p < 0,01$ спрямо EMB и INH; ### $p < 0,001$ спрямо EMB и INH. Резултатите са изразени като средна стойност $\pm$ SD ($n = 6$). Значимостта на данните беше оценена с помощта на непараметричния U тест на Mann-Whitney. Стойности на $p \leq 0,05$ се считат за статистически значими.

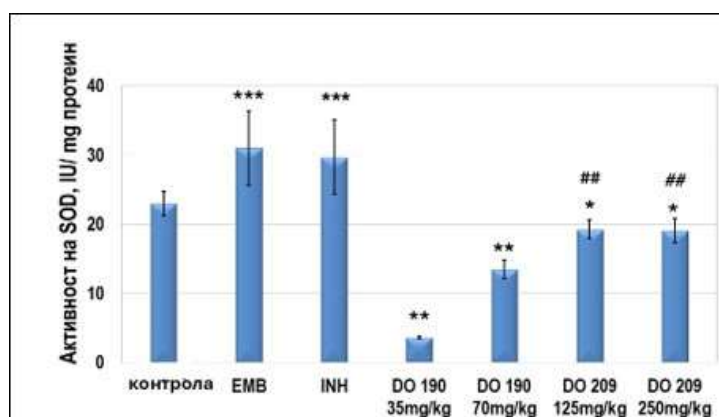
В групите, получаващи както INH, така и EMB, нивото на MDA се повишава с повече от 35%. Дози от 35 и 70 mg/kg от съединение DO-190 не предизвикват значителни отклонения в сравнение с контролните животни ($p < 0.001$). Ендогенното съдържание на MDA на съединение DO-209 при доза от 125 mg/kg показва сравнима стойност с INH и EMB контролите, но при доза от 250 mg/kg, стойността е намалена.

Резултатите на Фигура 26 показват, че в групите, третирани с DO-190 при двете дози, са наблюдавани значителни дозозависими намаления на нивото на вътреклетъчния общ глутатион.



Фигура 26. Ендогенно съдържание на GSH в чернодробния хомогенат на експерименталните групи. *** $p < 0,01$ спрямо контролите; ns — незначимо спрямо контролите; ** $p < 0,01$ спрямо контролите; # $p < 0,01$ спрямо EMB; ## $p < 0,01$ спрямо EMB и INH. Резултатите са изразени като средна стойност $\pm$ SD ($n = 6$). Значимостта на данните беше оценена с помощта на непараметричния U тест на Mann-Whitney. Стойности на $p \leq 0,05$ се считат за статистически значими.

Стойностите на общия глутатион в групите, третирани с DO-190, бяха почти 5 пъти по-ниски в сравнение с тези на нетретирани контроли ($p < 0,001$), почти 3 пъти по-ниски в сравнение с групата, третирана с EMB ($p < 0,01$) и повече от 2 пъти по-ниски в сравнение с групата, третирана с INH ($p < 0,01$). За разлика от това, DO-209 и в двете дози изчерпва повече от 25% чернодробния глутатион спрямо контролните нетретирани животни.

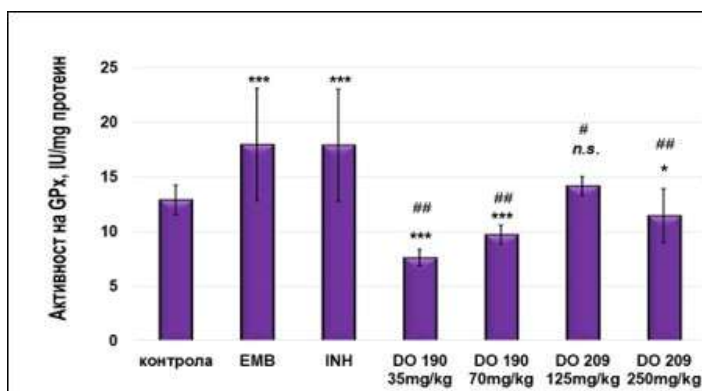


Фигура 27. Активност на SOD в чернодробния супернатант на експерименталните групи. *** $p < 0,001$ спрямо контролите; ** $p < 0,01$ спрямо контролите; * $p < 0,05$ спрямо контролите; ## $p < 0,01$ спрямо EMB и INH. Резултатите са изразени като средна стойност $\pm$ SD ($n = 6$). Значимостта на данните беше оценена с помощта на непараметричния U тест на Mann-Whitney. Стойности на $p \leq 0,05$ се считат за статистически значими.

При животните, получаващи INH и EMB, се наблюдава повишена активност на SOD, което показва ефективна защита срещу оксидативния стрес. В същото време, при

животните, третирани с DO-190, активността на SOD значително намалява при двете дози ($p < 0,001$), а при DO-209 активността е доста по-слаба в сравнение с контролите (Фигура 27). Това предполага, че DO-190 и DO-209 могат да нарушат нормалната антиоксидантна защита на клетките, което може да доведе до по-висок риск от оксидативно увреждане.

Активностите на GPx в експерименталните групи са представени на Фигура 28. INH и EMB повишават активността на GPx в сравнение с контролите, докато DO-190 Я намалява при двете дози ($p < 0,001$). Подобен ефект е наблюдаван и при прилагане на DO-209 в по-високата доза от 250 mg/kg. При мишки, получаващи 250 mg/kg, активността на GPx показва леко намаление в сравнение с контролите ($p < 0,05$) и е значително по-ниска в сравнение с групите, третирани с EMB и INH ($p < 0,01$). Тези ефекти предполагат наличие на сравнително безопасен токсикологичен профил на изследваните новосинтезирани съединения.

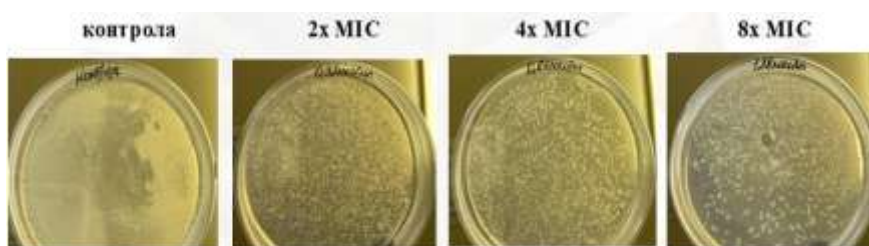


Фигура 28. Активност на глутатион пероксидазата в чернодробния супернатант на експерименталните групи. *** $p < 0,001$ спрямо контролите; * $p < 0,05$ спрямо контролите; # $p < 0,05$ спрямо INH 50 mg/kg; ## $p < 0,01$ спрямо INH 50 mg/kg; ### $p < 0,001$ спрямо INH 50 mg/kg; ns — незначимо спрямо контролите. Резултатите са изразени като средна стойност $\pm$ SD ($n = 6$). Значимостта на данните беше оценена с помощта на непараметричния U тест на Mann-Whitney. Стойности на $p \leq 0,05$ се считат за статистически значими.

Резултатите от настоящото проучване показват, че съединението DO-190, прилагано в двете тествани дози, води до понижение на вътреклетъчните нива на глутатион, което е съпроводено от компенсаторно повишение в активността на антиоксидантните ензими SOD и GPx. Тези адаптивни промени вероятно са ограничили увреждането на клетъчните мембрани, причинено от липидна пероксидация, и са възпрепятствали натрупването на високи нива на MDA.

8. *In vitro* мутагенеза и изолиране на резистентни мутанти на *M. tuberculosis* H37Rv с последващо пълно геномно секвениране

След подбор на активни съединения чрез предварителни тестове, беше проведен *in vitro* мутагенезен тест с *M. tuberculosis* H37Rv. Последва селекция на резистентни мутанти и изолиране на ДНК от получените клоно. Използван беше класически експериментален подход, при който всеки клон се рекултивира върху среда с 2×, 4× и 8× MIC спрямо съответното съединение. След това се извършва поотделно екстракция на ДНК и пълно геномно секвениране (Фигура 29).



Фигура 29. *In vitro* мутагенеза на щам *M. tuberculosis* H37Rv със съединенията в концентрации 2 ×, 4 × и 8 × MIC.

Данните от пълно геномно секвениране бяха подложени на сравнителен SNP анализ с цел откриване на мутации, свързани с устойчивост към ароилхидразона MLT_FUR (Таблица 17). Анализът на клон на *M. tuberculosis*, отглеждан при повишени концентрации на съединението, разкри мутации в гените Rv2702, Rv0506 и Rv3755c. Това отразява адаптивния отговор на бактериите към лекарствен натиск. Идентифицираните гени участват в ключови клетъчни процеси като метаболизъм, окислително-редукционен баланс и регулация на генната експресия (Таблица 18).

Таблица 17. Списък на ДНК мутации, открити в изолираните мутанти на *M. tuberculosis* H37Rv след култивиране с новосинтезираните съединения.

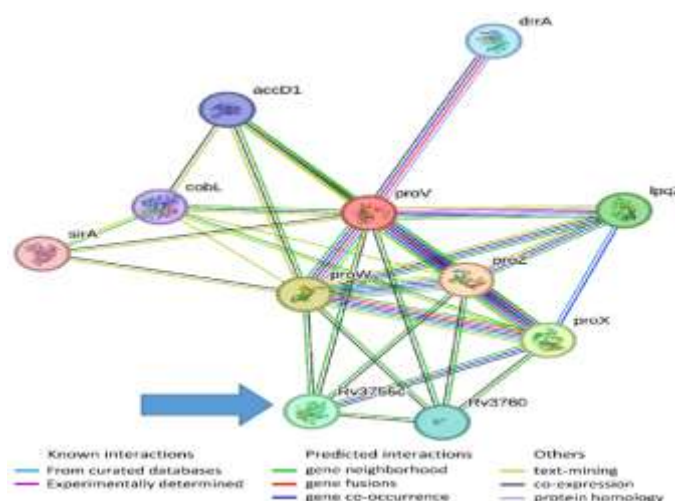
Съединение и концентрация	Позиция и мутация	ген	Позиция и мутация	Промяна на кодона, нуклеотида и аминокиселината	РА М1	SIFT	мутантни четения, %	Позиция и мутация
MLT_FUR 0.28 µg/ml (4x MIC)	4201587 T>C	Rv3755c	302 A>G	101 CAC-CGC H>R	10	>0.05	94	Несинонимна
MLT_FUR 0.28 µg/ml (4x MIC)	3017408 del_C	Rv2702 / Ppgk	551 del_C	184 -	-	-	94	frameshift
MLT_FUR 0.56 µg/ml (8x MIC)	597110 A>G	Rv0506 / mmpS2	352 A>G	118 AGC-GGC S-G	21	>0.05	100	Несинонимни

Мутацията в гена Rv2702 (ppgK) засяга метаболитни пътища, свързани с липидния синтез и лекарствената толерантност на *M. tuberculosis*. Тя води до изместване на рамката при кодон 184, което вероятно предизвиква инактивация на гена чрез съкращаване на протеина с около 30%. ppgK е есенциален ген, необходим за бактериален растеж *in vivo* и е свързан с индуцирана лекарствена толерантност, особено при условия на хранителен дефицит, когато продукцията на PDIM липиди е ключова (Marrero et al., 2013; Block et al., 2023). Rv0506 (mmpS2) участва в ефлуксни системи и е свързан с активен транспорт на лекарства извън клетката – добре познат механизъм на резистентност. При резистентния клон към MLT_FUR е открита несинонимна SNP мутация в Rv3755c (101H>R). Въпреки че функционалната роля на гена е неизвестна, *in silico* анализите сочат, че мутацията е толерантна (PAM1 = 10; SIFT – толерантна).

Таблица 18. Идентифицирани мутации открити в изолираните мутанти на *M. tuberculosis* H37Rv след култивиране с новосинтезираните съединения

Ген	Име на протеина	Функция на протеина	Категория на гена
Rv2702 / Ppgk	Полифосфатна глюкокиназа Ppgk	Катализира фосфорилирането на глюкоза с полифосфат или АТФ като донори	Междинен метаболизъм и дишане
Rv0506/mmpS2	Мембранен протеин MmpS2	Неизвестна	Клетъчна стена и клетъчни процеси
Rv3755c	Rv3755c	Хипотетичен протеин	Запазени хипотетични гени

Генната мрежа около Rv3755c включва гени, кодиращи ABC транспортни системи (Фигура 30), което предполага роля в транспорта и евентуално в лекарствената устойчивост. ABC транспортерите участват в преноса на различни молекули, включително антибиотици, извън клетката (Cassio Barreto de Oliveira et al., 2020).



Фигура 30. Ген-ген мрежово взаимодействие, включваща ген Rv3755c; p-стойност: 1.52e-07. Стрелка показва гена Rv3755c.

Мутацията в Rv3755c (идентифицирана в 94% от четенията) може да допринася за адаптацията на *M. tuberculosis* към MLT_FUR чрез увеличен ефлукс. Според Mucobrowser, генът не е есенциален *in vitro*, но свързан със забавен растеж при мутагенеза, което насочва към неспецифичен механизъм на толерантност (DeJesus MA et al., 2017; Minato Y et al., 2019; Sassetti CM et al., 2003).

9. Заключение

В заключение, резултатите от проведеното изследване на новосинтезирани съединения ароилхидразони 3a и 3d и нитрофуриламида DO190 и DO209 проявиха активност срещу *M. tuberculosis* и *M. smegmatis*. Те демонстрират по-добра мембранна пропускливост и стабилно свързване с целевите ензими, което ги прави обещаващи антимикобактериални кандидати. Патоморфологичните и биохимичните изследвания в таргетни органи показват, че тези съединения предизвикват слаби промени в тях и вероятен минимален риск от медикаментозно увреждане. Геномното секвениране разкрива мутации, свързани с бързата адаптация на микобактерията към селективното действие на подбраните от нас съединения. Това предполага неспецифичен механизъм на толерантност към тях и подчертава значимостта на бъдещи проучвания за изясняване на вероятните механизми на лекарствена резистентност, както и тяхното преодоляване. Получените резултати отварят нови перспективи за последващи изследвания, насочени към търсене на нови доказателства за тяхната ефективност срещу туберкулозата.

Взети заедно, тези факти определят голямото предимство на изследваните от нас лекарствени кандидати в клиничната практика, особено при пациенти с увредена чернодробна функция, или при необходимост от прилагане на дългосрочна терапия.

V. ИЗВОДИ

1. Доказана е *in vitro* антимикобактериалната активност срещу *M. smegmatis* и *M. tuberculosis H37Rv* на новосинтезирани ароилхидразони и нитрофураниламиди, като сред тях са селектирани два ароилхидразона (3a и 3d) и два нитрофураниламида (DO190 и DO209) с най-висока антимикобактериална активност.
2. Установено е, че два ароилхидразона (3a и 3d) и два нитрофураниламида (DO190 и DO209) показват ниска цитотоксичност, като най-силен ефект има DO209 върху туморни клетки.
3. Установени са енергийните взаимодействия между InhA и ароилхидразоните 3a и 3d, както и нитрофураниламидите DO-190 и DO-209. Ароилхидразоните 3a и 3d показват по-ниски енергии на свързване от INH в двата лигнд-свързващи домена (2X22 и 4TZK), което означава по-стабилно ковалентно свързване с ензимите. Нитрофураниламидите DO-190 и DO-209 демонстрират по-ниски енергии на свързване от INH в трите лигнд-свързващи домена (2X22, 4TZK и 4FIY).
4. От *in vivo* острата токсичност при мишки е установено, че съединенията 3a и 3d демонстрират добра поносимост и липса на сериозни токсични ефекти. DO-190 и DO-209 показват значителни различия в токсичността, като DO-190 проявява слабо повишен токсичен ефект в сравнение с DO-209.
5. Съединенията 3a и 3d не повлияват значимо телесното тегло на мишки, третирани интраперитонеално в рамките на 14-дневно изследване на подостра токсичност и не предизвикват забележими токсични ефекти. Съединението DO-209 също демонстрира по-добра поносимост, за разлика от DO-190.
6. Хистологичните изследвания при мишки, третирани с ароилхидразоните (3a и 3d) и нитрофураниламидите (DO-190 и DO-209), предизвикват минимални отклонения в цитоархитектониката на черния дроб, бъбреци и тънки черва.
7. Промените в биохимичните маркери на оксидативния стрес в черен дроб показваха, че ароилхидразони 3a и 3d потискат липидната пероксидация, възстановяват съдържанието на нискомолекулярния ендегенен антиоксидант глутатион, водят до компенсаторни промени в активностите на антиоксидантните ензими, свързани с чернодробната токсичност, проявяват по-добра антирадикалова активност в моделни химични системи, в сравнение с INH.

8. Установено е, че DO-190 предизвиква дозозависимо понижаване на нивата на малонов диалдехид, изчерпване на вътреклетъчния глутатион и промени в активността на антиоксидантните ензими.
9. Установено е, че DO-209 при по-висока доза подобрява чернодробната редокс-хомеостаза в сравнение с референтните антибиотици INH и EMB.
10. Пълното геномно секвениране разкри мутация в ген *Rv3755c*, която принадлежи към мрежа, включваща няколко ABC транспортни гена. Тези ABC гени участват както в транспорта и усвояването на хранителни вещества в клетката, така и действат като системи за ефлукс на лекарства. Това вероятно е свързано с бързата адаптация на микобактерията към селективното действие на ароилхидразона 3d и отразява неспецифичен механизъм на толерантност към него.

VI. ПРИНОСИ

1. За първи път в България е проведен фармакологичен скрининг на селектирани производни на EMB и INH. Установени са „*lead compounds*”- две ароилхидразонови и две нитрофураниламидни химични съединения с най-висока *in vitro* антимикобактериална активност
2. Взаимодействията на ароилхидразона 3d с NAD⁺ и Tyr158 доказват, че 3d може да бъде инхибитор, който се свързва директно с InhA, без да изисква активиране от KatG, което го прави ефективен срещу MDR-TB.
3. Двете ароилхидразонови съединения (3a и 3d) и двете нитрофураниламидни съединения (DO190 и DO209) проявяват ниска цитотоксичност и добро вътреклетъчно натрупване в нормални и туморни клетъчни линии, което ги прави подходящи лекарствени кандидати за последващи предклинични изследвания.
4. За първи път в България, чрез метода на индуцирана *in vitro* мутагенеза, са получени мутантни клонове на референтните щамове *M. smegmatis* и *M. tuberculosis H37Rv*, устойчиви на нарастващи концентрации над установената минимална инхибираща концентрация на избраното съединение. Установената мутация в ген *Rv3755c* е свързана с медирана лекарствена резистентност и лекарствена толерантност.

VII. ПУБЛИКАЦИИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИЯТА

1. Valcheva, V., Simeonova, R., Mileva, M., Philipov, S., Petrova, R., **Dimitrov, S.**, Georgieva, A., Tsvetanova, E., Teneva, Y. и Angelova, V.T. (2022). *In Vivo* Toxicity,

Redox-Modulating Capacity and Intestinal Permeability of Novel Aroylhydrazone Derivatives as Anti-Tuberculosis Agents. *Pharmaceutics*, 15(1), 79.IF: 5,500,Q1

2. **Dimitrov, S.**, Slavchev, I., Simeonova, R., Mileva, M., Pencheva, T., Philipov, S., Georgieva, A., Tsvetanova, E., Teneva, Y., Rimpova, N. and Dobrikov, G., **(2023)**. Evaluation of Acute and Sub-Acute Toxicity, Oxidative Stress and Molecular Docking of Two Nitrofuranyl Amides as Promising Anti-Tuberculosis Agents. *Biomolecules*, 13(8), 1174, IF: 6.525, Q1
3. Мокроусов И.В., Ангелова В., **Димитров С.**, Чекрыгин С.А., Вылчева В., **(2025)** Адаптация *Mycobacterium tuberculosis* к новому производному ароилгидразона *in vitro* и возможная роль гена Rv3755с. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, Том 179, № 4; IF: 0.9; Q3

VIII. ЗАБЕЛЯЗАНИ ЦИТИРАНИЯ

Статия: Valcheva, V., Simeonova, R., Mileva, M., Philipov, S., Petrova, R., **Dimitrov, S.**, Georgieva, A., Tsvetanova, E., Teneva, Y. и Angelova, V.T. **(2022)**. *In Vivo* Toxicity, Redox-Modulating Capacity and Intestinal Permeability of Novel Aroylhydrazone Derivatives as Anti-Tuberculosis Agents. *Pharmaceutics*, 15(1), 79.IF: 5,500,Q1

Цитира се в:

1.Tafere, D.A., Gebrezgiabher, M., Elemo, F., Atisme, T.B., Ashebr, T.G. and Ahmed, I.N., 2025. Hydrazones, hydrazones-based coinage metal complexes, and their biological applications. *RSC advances*, 15(8), pp.6191-6207.

Статия: **Dimitrov, S.**, Slavchev, I., Simeonova, R., Mileva, M., Pencheva, T., Philipov, S., Georgieva, A., Tsvetanova, E., Teneva, Y., Rimpova, N. and Dobrikov, G., **(2023)**. Evaluation of Acute and Sub-Acute Toxicity, Oxidative Stress and Molecular Docking of Two Nitrofuranyl Amides as Promising Anti-Tuberculosis Agents. *Biomolecules*, 13(8), 1174, IF: 6.525, Q1

Цитира се в:

1. Berisio, R. and Ruggiero, A., 2023. Virulence Factors in *Mycobacterium tuberculosis* Infection: Structural and Functional Studies. *Biomolecules*, 13(8), p.1201.

2. Gawad, J., Bonde, C., Bonde, S., Sharma, M., Suthar, D., Palkar, M. and Raghuwanshi, V., 2025. Investigating the Impact of Acute and 28-days Oral Exposure to Decaprenyl phosphoryl- β -D-ribose 2'-epimerase (DprE1) Inhibitors on Vital Organ Function in Swiss Albino Mice. *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*, 59(1s), s151-s158.
3. Nazeer, M., Shah, N., Ullah, S., Ikram, M., Amirzada, M.I., Alamoudi, A.J., Alshamrani, M. and Shah, A.J., 2025. Toxicological profiling and diuretic potential of arbutin via aldosterone synthase gene inhibition. *Life Sciences*, p.123661.
4. Lafdil, Fatima Zahra, Ghizlane Nouioura, Mohamed El Fadili, Hicham Lafdil, Hassane Mekhfi, Raffaele Conte, Hatem A. Abuelizz, and Fahd Kandsi. "LC-MS/MS Profiling and Toxicological Evaluation of Argania spinosa Extract: Acute and Subacute Studies in Swiss Albino Mice with *In Vivo* and *In Silico* Approaches." *Journal of Ethnopharmacology* (2025): 120009.
5. da Silveira Gomes, R.N., da Conceição Veríssimo, J.D.F., dos Santos, I.P., da Rocha, M.H., Fontes, T.A., de Oliveira Dias, T. and dos Anjos, J.S.P., 2025. Estratégias adjuvantes no tratamento da tuberculose: redução do estresse oxidativo e neurotoxicidade induzida por fármacos. *Journal of Media Critiques*, 11(27), pp.e282-e282.

IX. УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ

Изнесени доклади:

1. **Димитров С.**, Вълчева В. Широкообхвaten биологичен скрининг на нови химични съединения като ефективни антитуберкулозни лекарствени кандидат, Трети интердисциплинарен докторантски форум, Кюстендил, 6-7 юни 2022г.
2. **Dimitrov, S.**; Slavchev, I.; Simeonova, R.; Mileva, M.; Pencheva, T.; Philipov, S.; Georgieva, A.; Tsvetanova, E.; Teneva, Y.; Rimpova, N.; Valcheva, V. and Dobrikov, G. Screening of novel nitrofuranyl amides for their *in vitro* antimycobacterial activity and *in vivo* evaluation of their pharmacological potential- Четвърти интердисциплинарен докторантски форум, 16-19 май 2023г., Сандански
3. Evaluation of acute and sub-acute toxicity, oxidative stress and molecular docking of two nitrofuranyl amides as promising antituberculosis agents-. Valcheva, V., Slavchev I., **Dimitrov S.**, Simeonova R., Mileva M., Georgieva A., Tzvetanova E., Pencheva T.,

Dobrikov G. 16.11.2023 - 19.11.2023- 27th Congress of the AsianPacific Society of Respirology (APSR 2023), 16 - 19 November 2023, Suntec City, Singapore.

4. Valcheva V., **Dimitrov S.**, Angelova V., Mokrousov I. *Molecular insights into Mycobacterium tuberculosis resistance to novel aroylhydrazones revealed through in vitro mutagenesis and whole-genome sequencing*. Presented at the World Conference on Lung Health, 12–16 November 2024, Bali, Indonesia.

Представени постерни съобщения:

1. **Dimitrov S.**, Simeonova R., Mileva M., Philipov S., Valkova I., Georgieva A., Tzvetanova E., Petrova R., Angelova V. Valcheva V. *In vivo* toxicity, redox-modulating capacity and intestinal permeability of novel aroylhydrazone derivatives with high *in vitro* antimycobacterial activity. MMCS2022 – Shaping Medicinal Chemistry for the New Decade, Rome , Italy 25-30.07.2022г.
2. **Dimitrov S.**, Simeonova R., Mileva M., Philipov S., Valkova I., Georgieva A., Tzvetanova E., Petrova R., Angelova V., Valcheva V. *In vitro* and *in vivo* antimycobacterial activities of novel aroylhydrazone derivatives. EMBO, Tuberculosis 2022: From innovation to intervention, Paris, France, 12-16.09.2022.
3. **Dimitrov S.**, Angelova V., Mokrousov I., Valcheva V. Spontaneous mutations conferring antibiotic resistance to new aroylhydrazones at a range of concentrations in *Mycobacterium tuberculosis*, ECMID 2024 (34th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases), 27-30 April 2024, Barcelona, Spain.