

**РЕЗЮМЕТА НА ОСНОВНИ ПУБЛИКАЦИИ НА Д-Р ТАТЯНА ДЗИМБОВА**

(за участие в конкурс за редовен доцент в професионално направление 4.2 Химически науки, научна специалност Биоорганична химия, химия на природните и физиологично активни вещества (биохимия), обнародван в "Държавен вестник" бр. 57 от 14.07.2017 г)

**1. Публикации, равностойни на самостоятелен монографичен труд****(Киоторфинови аналози: синтез, биологично действие и структура – активност изследвания с помощта на докинг)**

- 1.1. Dzimbova T., Bocheva A., Pajpanova T. (2014) Kyotorphin analogues containing unnatural amino acids: synthesis, analgesic activity and computer modeling of their interactions with  $\mu$ -receptor. *Medicinal Chemistry Research*, 23(8), 3694-3704 (IF – 1.277) ISSN: 1054-2523**

**Abstract:** Kyotorphin (KTP; Tyr-Arg) an endogenous neuropeptide is potently analgesic when delivered directly to CNS. An effort to enhance the potency, enzymatic stability and improving bioavailability of KTP is the modification with unnatural amino acids. The aims of presented study were: (1) To synthesize new analogues of kyotorphin containing unnatural amino acids: norcanavaine (NCav) and norcanaline (NCan), structural analogues of arginine and ornithine, respectively; (2) To understand the influence of the arginine mimetics on the pharmacological properties of KTP analogues, through examination their effects on the paw pressure nociceptive threshold; (3) To find relationship between the structure and obtained biological effects of the all synthesized kyotorphin analogues, by molecular docking with  $\mu$ -opioid receptor. As a result of our work four new kyotorphin analogues containing NCan and NCav were obtained. A correlation between the data from the *in vivo* test and docking results was found. This allows a better elucidation of the ligand-receptor interactions, the prediction of biological activity of the newly synthesized compounds, and to generate compounds with increased biological effects.

**Keywords:** Arginine mimetics, Kyotorphin, Nociception,  $\mu$ -Opioid receptor, Docking, GOLD

В тази публикация е представен синтез на киоторфинови аналози, съдържащи неприродните аминокиселини норканаванин и норканаллин. С помощта на ноцицептивния метод Paw pressure test е изследвано влиянието на аргининовите миметици върху фармакологичните свойства на получените киоторфинови аналози. С цел изясняване на връзката структура – биологично действие бе проведен докинг на синтезираните киоторфинови аналози с  $\mu$ -опиоиден рецептор. Намерена е корелация между докинг резултатите и резултатите от биологичния тест, което дава възможност за изясняване на лиганд-рецепторните взаимодействия и може да се използва при дизайна на съединения с повишен биологичен ефект.

- 1.2. Dzimbova T., Georgiev K., Pajpanova T. (2014) Kyotorphin analogues – transport and enzymatic stability studies with computational methods. *European Journal of Biotechnology and Bioscience (EJBB) 2 (3)*, 21-26 ISSN: 2321-9122**

**Abstract:** Peptide exhibiting a biological effect once inside the body undergoes multiple biotransformations leading to their inactivation and degradation. An effective way for its use is the introduction into the body simultaneously with peptidase inhibitors. Another viable approach is the development of peptide mimetics that exhibit the same or increased biological effect, but increased stability.

Here we present the docking studies of kyotorphin analogues with already known *in vivo* biological effect regarding aminopeptidases and oligopeptide transporters. The objective was to determine whether these analogues exert their pronged effect due to their stability to the peptidases action and also whether they can be transported by the transmembrane transporters which also influence their effects.

The docking results showed that kyotorphin analogues can not be hydrolyzed by aminopeptidase N and only three of them can be transported through the cell membrane. From these studies it was concluded that the tested analogues are effective, stable, and do not affect overall metabolism, which makes them suitable for the treatment of pain.

**Keywords:** Kyotorphin, docking, aminopeptidase N, proton-dependent oligopeptide transporter.

Тази работа представя докинг изследване на киоторфинови аналози, съдържащи непротеиногенни аминокиселини. Целта на изследването е да се установи, дали тяхното продължително действие се дължи на ензимната им стабилност, а също така дали е възможен техният транспорт през трансмембранните транспортери. Резултатите показаха, че киоторфиновите аналози не могат да бъдат хидролизирани от аминокептидаза N и само три от тях могат да преминат през клетъчната мембрана. Това означава, че тестваните пептидни аналози са стабилни, ефективни, с по-голяма бионаличност, не оказват влияние върху цялостния метаболизъм на организма и биха могли да се използват при третиране на болка.

- 1.3. Dzimbova T., Milanov P., Pajpanova T. (2013) An explanation of the cytotoxic potential of arginine mimetics containing sulfo- and oxy- groups in their side chains. *Journal of Computational Methods in Molecular Design 3*, 10-18 ISSN: 2231- 3176**

**Abstract:** L-Arginine is an amino acid involved in numerous essential metabolic pathways. It is catabolized by several enzymes to some important metabolites. Arginine is very important for mammals, and to ensure their supplies, mammalian cells can synthesize this amino acid from citrulline. This study deals with a series of arginine analogues and the activity of seven different enzymes of arginine metabolic pathway (nitric oxide synthases (inducible and endothelial), arginases, arginine:glycineamidinotransferase, arginine decarboxylase, arginine

deiminase, and argininosuccinate synthase) in those analogues. The compounds were biologically tested and their *in vitro* effects are explained using docking. All investigated compounds inhibited five from the total of seven assessed enzymes, with norsulfoarginine (NsArg) and sulfoarginine (sArg) being more potent than the norcanaline (NCav) and norcanavanine (NCav) analogues due to the availability of more enzyme interactions sites in the first two compounds. Modifications with bis-(2-chloroethylhydrazine) and phenylhydrazine increased binding potential of the compounds. Computational methods can help in design of arginine mimetics, and are very useful for predicting the biological activities of newly synthesized compounds.

**Key words:** arginine mimetics, cytotoxic effects, docking, GOLD

Изследването разглежда взаимодействието на аргининовите мименици със седем различни ензима от аргининовия метаболизъм. Съединенията са биологично тествани и техните *in vitro* ефекти са обяснени с помощта на докинг изследвания. Установено е, че всички изследвани съединения инхибират пет от седем ензима. Освен това повечето съединения се свързват по-силно с ензимите, благодарение на модификациите в молекулите им, т.е. те могат да действат като инхибитори на тези ензими. Това изследване показва за пореден път, че докингът дава възможност за предсказване на биологичната активност на различни съединения, като по този начин подпомага дизайна на нови съединения с желан ефект.

**1.4. Dzimbova T., Milanov P., Pajpanova T. (2013) Long-Lasting Effects of Oxy- and Sulfoanalogues of L-Arginine on Enzyme Actions. *Journal of Amino Acids*, Volume 2013 (2013), Article ID 407616, 7 pages, <http://dx.doi.org/10.1155/2013/407616> ISSN: 2090-0112 (Online)**

**Abstract:** Arginine residues are very important for the structure of proteins and their action. Arginine is essential for many natural processes because it has unique ionizable group under physiological conditions. Numerous mimetics of arginine were synthesized and their biological effects were evaluated, but the mechanisms of actions are still unknown. The aim of this study is to see if oxy- and sulfoanalogues of arginine can be recognized by human arginyl-tRNA synthetase (HArgS)—an enzyme responsible for coupling of l-arginine with its cognate tRNA in a two-step catalytic reaction. We make use of modeling and docking studies of adenylylase kinase (ADK) to reveal the effects produced by the incorporation of the arginine mimetics on the structure of ADK and its action. Three analogues of arginine, l-canavanine (Cav), l-norcanavanine (NCav), and l-sulfoarginine (sArg), can be recognized as substrates of HArgS when incorporated in different peptide and protein sequences instead of l-arginine. Mutation in the enzyme active center by arginine mimetics leads to conformational changes, which produce a decrease in the rate of the enzyme catalyzed reaction and even a loss of enzymatic action. All these observations could explain the long-lasting nature of the effects of the arginine analogues.

Първата стъпка от представената работа е да се проучи възможността за разпознаване на окси- и сулфо- аналози на аргинина от човешката аргинил-тРНК (HArgS) с помощта на докинг. Три от изследваните аналози могат да бъдат разпознати и

следователно включени в синтеза на белтъци на мястото на аргинина. Това би довело до синтез на мутантни белтъци. Когато аргининът е в ключова позиция (напр. каталитичен център на ензим, свързващ център на рецептор и пр.) това ще доведе до драстични промени в метаболизма. Именно това е изследвано във втората част на работата – мутация на активния център на ензима, в нашия случай аденилат киназа. Тази мутация води до намаляване и дори до загуба на каталитично действие.

### 3. Участие в колективен монографичен труд

- 3.1. **Dzimbova T., Pajpanova T. (2017) Oxy- and Sulfoanalogues of l-Arginine in L-Arginine in Clinical Nutrition Vinood B. Patel, Victor R. Preedy, Rajkumar Rajendram Eds, Humana Press, Springer International Publishing Switzerland, Pages 55-70, eBook ISBN 978-3-319-26009-9, Hardcover ISBN 978-3-319-26007-5**

Като глава от книга тази работа е представена под формата на ревью. Описана е библиографска информация за окси-аналозите на аргинина, както и наши собствени изследвания. Тук са събрани данните за синтез на окси- и сулфо-аналозите на аргинина и тяхното биологично действие. Проведените докиннг изследвания са включени с цел изясняване на връзката структура – биологично действие.

### 5. Публикации в рецензирани реферирани списания у нас

#### 5.1. Публикации в български научни списания с импакт фактор

- 5.1.1. **Dzimbova T., Iliev I., Georgiev K., Detcheva R., Balacheva A., Pajpanova T. (2012) In vitro assessment of the cytotoxic effects of sulfo-arginine analogues and their hydrazide derivatives in 3T3 and HepG2 cells. *Biotechnol. & Biotechnol. Eq.* **26 SPECIAL EDITION**, 180-184 (IF – 0.760) ISSN: 1310-2818**

**Abstract:** The cytotoxic activities of sulfo-arginine analogues sArg, NsArg, and their hydrazide derivatives, sArg-CONHNH<sub>2</sub>, sArg-CONHNC<sub>6</sub>H<sub>5</sub>, sArg-CONHN(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Cl)<sub>2</sub>, NsArg-CONHNH<sub>2</sub>, NsArg-CONHNC<sub>6</sub>H<sub>5</sub>, NsArg-CONHN(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Cl)<sub>2</sub>, on 3T3 and HepG2 cells were examined. The substitution in the carboxylic group of sArg increases the cell growth inhibitory effects of the compounds, especially in the case of the bis-(2-chloroethyl)hydrazide substitute. Similar correlation was observed in the case of NsArg and its analogues, but here the most pronounced effect was observed with the analogue NsArg-CONHNH<sub>2</sub>.

Изследването е свързано с определяне на цитотоксичната активност на сулфоаргининовите аналози и техните хидразидни производни. Установено е, че промените в карбоксилната група на сурфоаргинина води до съединения, които силно

инхибира растежа на клетките, като този ефект е по-продължителен в случая на NsArg-CONHNH<sub>2</sub>.

- 5.1.2.** Pancheva S., Kalauzka R., Jovcheva E., **Dzimbova T.**, Popgeorgieva E., Pajpanova T. (2012) Novel cysteic acid S-amides substituted in the sulfonamide function. Synthesis and modifications. *Bul. Chem. Commun.* **44**, 222-227 (IF – 0.238) ISSN: 0324-1130

**Abstract:** In the present work we reported the synthesis of several analogues 5a-e of cysteic acid S-amides with substituted sulfonamide function, where fully protected D,L-cysteic acid S-chlorides were treated with the required aliphatic amines to give a series of new derivatives which could be considered as structural sulfoanalogues of leucine, isoleucine and norleucine, respectively. We presented here new method for preparation of D,L-cysteic acid S-chlorides. Various modifications with N $\alpha$ -, and C $\alpha$ - protective groups useful in peptide synthesis have been successfully achieved. These novel compounds are of potential interest in structure-activity studies, easily applied in solid phase, as well as in conventional synthesis of biologically active peptides.

**Keywords:** Amino acids, Cysteic acid S-amides, Aliphatic amines, Alkaline protease, Antimetabolites

В тази работа е представен синтезът на различни аналози на S-амидите на цистеиновата киселина със заместена сулфонамидна функция. Аналозите се получават при взаимодействие на напълно защитени D,L-цистеин сулfoxлориди с алифатни амини. Тук е представен и нов метод за синтез на сулfoxлориди. Получени са аналози с различни защитни групи, което дава възможност да бъдат използвани за синтез на биологично активни пептиди по конвенционален или твърдофазен метод.

- 5.1.3.** Chapkanov A., **Dzimbova T.**, Ivanova B. (2012) A facile synthesis and IR-LD spectral elucidation of N-acetyl amino acid derivatives. *Bul. Chem. Commun.* **44**, 228-232 (IF – 0.238) ISSN: 0324-1130

**Abstract:** The synthesis of N-acetyl derivatives of  $\alpha$ -amino acids (L-Gly, L-Val, L-Phe, L-Ile, L-Pro and L-Cys) using a simple and efficient method for preparation was carried out. The N-acetyl derivatives were obtained using acetic anhydride in basic conditions at room temperature. The methyl amides of N-acetyl amino acid were synthesized by mixed anhydride procedure using a Piv-Cl as a reagent. The conventional and IR-LD spectral analysis were applied for elucidation and characterization of typical IR-bands of the starting and intermediate compounds. Spectral investigation includes IR-characteristic bands assignment and elucidation of amino acids as zwitterions structures – L-Valine (L-Val), L-Proline (L-Pro) L-Cystein (L-Cys) and their intermediates by linear-dichroic infrared (IR-LD) spectroscopy of oriented solid sample as a nematic liquid crystal suspension. The experimental IR-characteristic bands

obtained, were accompanied with spectral elucidation and structural prediction of the investigated compounds.

**Key words:**  $\alpha$ -amino acids, N-acetyl-derivatives, IR –LD spectral analysis

Синтезирани са N-аценилни производни на L-Gly, L-Val, L-Phe, L-Ile, L-Pro and L-Cys по лесен и ефикасен метод. Проведен е конвенционален и IR-LD спектрален анализ с цел определяне на характеристичните IR-ивици. Спектралните изследвания включват определяне на характеристичните ивици на цвитер йоните на аминокиселините и техните междинни състояния с линейно-дихроична (IR-LD) спектроскопия на ориентирана твърда проба в нематичен течен кристал. Проведен е анализ на получените характеристични ивици и е предсказана структурата на изследваните съединения.

**5.1.4.** Georgiev K., **Dzimbova T.**, Iliev I., Detcheva R., Pajpanova T. (2014) Enhancing of cytotoxic effects of novel endomorphin-2 analogues using  $\mu$ -opioid antagonist naloxone. *C. R. Acad. Bulg. Sci.* **67(9)**, 1281- 1286 (IF – 0.251 (2016)) ISSN 1310–1331 (Print) ISSN 2367–5535 (Online)

**Abstract:** Endomorphin-2 (EM-2, Tyr-Pro-Phe-Phe-NH<sub>2</sub>) is a potent and selective  $\mu$ -opioid receptor agonist. It displays a strong antinociceptive effect on acute pain, similar to that of morphine. Lately, it has been reported that EM-2 exhibits cytotoxic activity against leukemia cell lines. Based on the data of literature we decided to synthesize analogues of endomorphin-2 and to evaluate cytotoxic potential of the mother compound and new analogues in cultured non-tumour BALB/c 3T3 cells and tumour cell line HepG2 by MTT assay. The new synthesized analogues have shown improved growth-inhibitory effects on both cell lines compared to the EM-2. Adding of classical  $\mu$ -opioid antagonist – naloxone (concentration 1  $\mu$ M) significantly increases cytotoxicity in some of the analogues. The mechanism of this interaction has not been fully elucidated yet.

**Key words:** peptide mimetics, endomorphin, analgesic, cytotoxic, naloxone

Тук представяме синтеза на аналози на ендоморфин-2 и техният цитотоксичен потенциал по отношение на нетуморни и туморни клетки. Новосинтезираните аналози инхибират по-силно растежа на двете клетъчни линии. В присъствие на класическия  $\mu$ -опиоиден агонист налоксон това действие се засилва. Механизмът на този ефект обаче все още не е напълно изяснен.

## **5.2. Публикации в български научни списания без импакт фактор**

**5.2.1.** **Dzimbova T.**, Pajpanova T. (2010) Synthesis of different types of PNAs, containing chiral pseudopeptide backbone. *Trakia Journal of Sciences* **8**, Suppl. 2, pp 98-101 ISSN: 1313-7050 (Indexed: EBSCO, AGRIS, CABI, Zoological Record, eLibrary.ru, DOAJ)

**Abstract:** Peptide nucleic acid (PNA) is a nucleic acid analogues with an achiral polyamide backbone consisting of N-(2-aminoethyl)glycine units. The purine or pyrimidine bases are linked to the each unit via a methylene carbonyl linker to target the complementary nucleic acid. Chiral PNAs were found to form slightly less stable PNA–DNA duplexes than their achiral analogues. By introducing positively charged Lys based monomers, more stable PNA–DNA duplexes were obtained. In this work we presented synthesis for several new PNAs, containing chiral pseudopeptide backbone.

**Key words:** unnatural amino acids, nucleic acid analogs, arginine, canavanine

Пептид нуклеиновите киселини (ПНК) са аналози на нуклеиновите киселини с ахирална пориаמידна основна верига, изградена от N-(2-аминоетил) глицинови единици. Пуриновите и пиримидиновите бази се свързват към основната верига и могат да се свързват с комплементарната нуклеинова киселина. С помощта на твърдофазен пептиден синтез са синтезирани ПНК с положително заредени лизин-съдържащи мономери, за които се очаква да се свързват по-здраво с веригата на ДНК.

**5.2.2. Рајпанова Т., Дзимбова Т. (2012) Neuropeptide mimetics for pain management. *Journal of the Bulgarian Academy of Sciences* 1, 21-25. ISSN: 0007-3989**

**Abstract:** The endogenous opioid peptides have been studied extensively since discovery aiming to develop effective drugs for the treatment of pain in humans. Opioid peptides are significantly implicated by opioid receptors, widely distributed in the CNS. They belong to the class of G-protein coupled receptors, and can be divided into three types,  $\mu$ ,  $\delta$ , and  $\kappa$ . The role of opioid peptides as endogenous analgesics suggests a possible use as pharmacological tools for pain relief, devoid of undesired secondary effects. Nevertheless, the same research has not yet replaced opioids as the gold standard of pain treatment. The prolonged use of morphine or other alkaloid analgesics induces tolerance and dependence. From the structural point of view, naturally occurring opioid peptides consist of two parts, a biologically important N-terminal tri- or tetrapeptide fragment, the message sequence, and the remaining C-terminal fragment, the address sequence, the comparison of several endogenous and synthetic opioid ligands showed that the message sequence needed strict requirements for a good interaction with opioid receptors.

Therefore, one possible avenue of drug development may shift interest from searching for receptor-selective opioids to creating an arsenal of drugs that target multiple opioid and no-opioid sites simultaneously. The search for new peptides to be used as analgesics in the place of morphine has been mainly directed to develop peptidomimetics or peptide hybrids having higher biological stability and receptor selectivity.

Статията представлява мини ревю, което разглежда използването на пептидните миметици при третиране на болката. Описва се накратко ролята на различните опиоидни рецептори. Обясняват се последните схващания за структура –действие на лигандите на рецепторите. Отбелязани са основни подходи при създаване на пептидни миметици.

- 5.2.3. Dzimbova T.,** Chapkanov A., Pajpanova T. (2015) Leu-Arg analogues: synthesis, IR characterization and docking studies. *Chemistry: Bulgarian Journal of Science Education* 24 (3), 370-379 ISSN: 0861-9255(SJR 0.192, Scopus)

**Abstract:** Leu-Arg is a kyotorphin receptor antagonist. It is very important to control antinociception and this could be achieved by modifications in agonist's or antagonist's molecules. Two analogues of Leu-Arg were synthesized, their IR- spectral characteristics were defined, and preliminary docking studies were performed. The results show that new analogues bind receptor thus they could be used for further analysis and their biological activity could be tested *in vitro* and *in vivo*.

**Keywords:** kyotorhin, IR, docking, Mu-opioid receptor, GOLD

Leu-Arg е ендогенен антагонист на киоторфиновия рецептор. Той е много важен за контрола на антиноцицептивния ефект. Синтезирани са два негови аналога и са определени техните ИЧ характеристики. Проведени са предварителни докинг изследвания, които показват, че те се свързват с рецептора. Това означава, че те ще проявяват биологичен ефект, който предстои да бъде определен с *in vitro* и *in vivo* тестове.

## 6. Публикации в рецензирани реферирани списания в чужбина

### 6.1. Публикации в чуждестранни списания с импакт фактор

- 6.1.1. Mirčeski V., Dzimbova T.,** Sefer B., Krakutovski G. (2010) Electrochemistry of coupled electron-ion transfer of a heme-like complex in an artificial organic membrane. *Bioelectrochemistry* 78, 147–154 (IF – 3.346) ISSN: 1567-5394

**Abstract:** The electrochemistry of a heme-like complex 5,10,15,20-tetraphenylporphyriniron(III) chloride (Fe(III)-TPP-Cl) embedded in a lipophilic artificial membrane is studied by means of voltammetric techniques. The experimental system used comprises of a thin organic membrane hosting the redox probe, sandwiched between edge plane pyrolytic graphite electrode and an aqueous electrolyte solution. In the course of the voltammetric experiment the redox transformation of Fe(III)-TPP-Cl at the electrode|membrane interface is accompanied by concomitant ion transfer reactions across the membrane|water interface. The overall electrochemical process proceeds as a coupled electron-ion transfer reaction providing insight into energetic and kinetic aspects of the complex membrane charge-transfer reactions. The membrane electrochemistry of Fe(III)-TPP-Cl involves two quasireversible redox transformations typical for the Fe(III)/Fe(II) couple. Both redox processes are coupled with a chemical reactions proceeding inside the membrane as well as by complex ion transfer reactions across the membrane|water interface comprising chloride expulsion from the membrane and cation ingress from the aqueous phase.

**Keywords:** Tetraphenylporphyriniron(III) chloride, Artificial membrane, Voltammetry, Ion transfer, Liquid-liquid interface



Електрохимията на хемоподобен комплекс 5,10,15,20-тетрафенилпорфирин (III) хлорид (Fe (III) -TPP-Cl), включен в липофилна изкуствена мембрана, се изследва чрез волтаметрични техники. Използваната експериментална система се състои от тънка органична мембрана, съдържаща редуционната проба, разположена върху ръба пиролитичен графитен електрод и воден електролитен разтвор. В хода на волтаметричния експеримент редуционната трансформация на Fe (III) -TPP-Cl в мембранната гранична повърхност на електрода е придружена от съпътстващи реакции на йонен пренос през гранична повърхност мембрана | вода. Цялостният електрохимичен процес протича като реакция на свързване на електрон-йон, което дава поглед върху енергийните и кинетичните аспекти на комплексните мембранни реакции на трансфер на заряд. Мембранната електрохимия на Fe (III) -TPP-Cl включва две квази обратими редуционни трансформации, характерни за Fe (III) / Fe (II) двойка. И двата редуционни процеса са съчетани с химични реакции, протичащи в мембраната, както и с комплексни йонни трансферни реакции през гранична повърхност мембрана | вода, включващи излизане на хлорид от мембраната и катионно проникване от водната фаза.

**6.1.2. Dzimbova T., Iliev I., Detcheva R., Balacheva A., Pajpanova T. (2011) In vitro Assessment of the Cytotoxic Effects of Hydrazide Derivatives of Sulfoarginines in 3T3 and HepG2 Cells. *Collection Symposium Series* **13**, 34-36. (IF – 1.137, 2013) ISSN: 0010-0765**

**Abstract:** The cytotoxic activities of sulfo-arginine analogues sArg, NsArg, and their hydrazide derivatives, sArg-CONHNH<sub>2</sub>, sArg-CONHNC<sub>6</sub>H<sub>5</sub>, sArg-CONHN(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Cl)<sub>2</sub>, NsArg-CONHNH<sub>2</sub>, NsArg-CONHNC<sub>6</sub>H<sub>5</sub>, NsArg-CONHN(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Cl)<sub>2</sub>, on 3T3 and HepG2 cells were examined. An increase of the cell growth inhibitory effects of the compounds was observed as a result of the modification in the carboxyl group.

**Keywords:** non-protein amino acids, sulfoarginine, hydrazides, cytotoxicity

Изследван е цитотоксичният ефект на сулфоаргининови аналози и техните хидразидни производни. Установен е по-силен ефект на инхибиране на клетъчния растеж при производните с модифицирана карбоксилна група.

**6.1.3. Dzimbova T., Miladinova E., Mohr S., Detcheva R., Balacheva A., Schmid M. G., Pajpanova T. (2011) Sulfo- and Oxy-analogues of Arginine: Synthesis, Analysis and Preliminary Biological Screening. *Croat. Chem. Acta* **84**, 447-453. (IF – 0.586, 2016) ISSN: 1334-417X**

**Abstract:** A novel methodology for the synthesis of sulfo- and oxy-modified amino acid analogues of arginine (Arg) has been developed using both conventional and polymer assisted synthesis from ready available amino acid precursor. Introduction of guanidine group was made also by the MWA synthesis. The *in vitro* inhibitory effect of the amino acid analogues on the growth of murine erythroleukemia cells, clone F4N in culture was also studied.

**Keywords:** canavanine, mimetics, polymer assisted synthesis, micro wave assisted synthesis, erythroleukemia cells

Разработен е нов метод за синтез на сурфо- и окси-модифицирани аминокиселини аналози на аргинина, който е подходящ както при конвенционалния, така и при твърдофазния им синтез. Въвеждането на гуанидино групата е извършено и с използването на микровълнов синтез. Проведен е *in vitro* скрининг на аналозите с използване на миши еритролевкемични клетки, клон F4N.

**6.1.4.** Tsanova A., Jordanova A., **Dzimbova T.**, Pajpanova T., Golovinsky E., Lalchev Z. (2014) Interaction of Methionine-Enkephalins with Raft Forming Lipids: Monolayers and BAM Experiments. *Amino Acids* 46(5), 1159-1168 (IF - 3.173) ISSN: 0939-4451 (Print) 1438-2199 (Online)

**Abstract:** Enkephalins (Tyr-Gly-Gly-Phe-Met/Leu) are opioid peptides with proven antinociceptive action in organism. They interact with opioid receptors belonging to G-protein coupled receptor superfamily. It is known that these receptors are located preferably in membrane rafts composed mainly of sphingomyelin (Sm), cholesterol (Cho), and phosphatidylcholine. In the present work, using Langmuir's monolayer technique in combination with Wilhelmy's method for measuring the surface pressure, the interaction of synthetic methionine- enkephalin and its amidated derivative with 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (POPC), Sm, and Cho, as well as with their double and triple mixtures, was studied. From the pressure/area isotherms measured, the compressional moduli of the lipids and lipid-peptide monolayers were determined. Our results showed that the addition of the synthetic enkephalins to the monolayers studied led to change in the lipid monolayers characteristics, which was more evident in enkephalinamide case. In addition, using Brewster angle microscopy (BAM), the surface morphology of the lipid monolayers, before and after the injection of both enkephalins, was determined. The BAM images showed an increase in surface density of the mixed surface lipids/enkephalins films, especially with double and triple component lipid mixtures. This effect was more pronounced for the enkephalinamide as well. These observations showed that there was an interaction between the peptides and the raft-forming lipids, which was stronger for the amidated peptide, suggesting a difference in folding of both enkephalins. Our research demonstrates the potential of lipid monolayers for elegant and simple membrane models to study lipid-peptide interactions at the plane of biomembranes.

**Keywords:** Methionin-enkephalins, Raft-forming, lipids, Langmuir monolayers, Compressional modulus, Brewster angle microscopy

Енкефалините (Tyr-Gly-Gly-Phe-Met / Leu) са опиоидни пептиди с доказано антиноцицептивно действие в организма. Те взаимодействат с опиоидните рецептори, принадлежащи към суперфамилията на G-протеин свързаните рецептори. Известно е, че тези рецептори са разположени в мембрани, съставени основно от сфингомиелин (Sm), холестерол (Cho) и фосфатидилхолин. В настоящата работа, използвайки метода на Langmuir за монослой в комбинация с метода на Вилхелми за измерване на повърхностното налягане, е изследвано взаимодействието на синтезирания метионин-

енкефалин и негово амидирано производно с 1-палмитоил-2-олеоил-глицеро-3-фосфохолин (ПОРС), См, и Чо, както и с техните двойни и тройни смеси. От измерените изотерми на налягане / площ се определят компресионните модули на липидите и липид-пептидните монослоеви. Нашите резултати показват, че добавянето на екефеалините към изследваните монослоеви води до промяна в характеристиките на липидните монослоеви, която е по-силна в случая с енкефалинаמיד. В допълнение, използвайки микроскопия под тъгъла на Brewster (ВАМ), беше определена повърхностната морфология на липидните монослоеви преди и след инжектирането и на двата екефафини. ВАМ изображенията показват увеличаване на плътността на повърхността на филмите със смесени повърхностни липиди / енкефалини, особено с двойни и тройни компоненти на липидни смеси. Този ефект е по-изразен и при енкефалинамида. Тези наблюдения показват, че има взаимодействие между пептидите и липидите, което е по-силно за амидирания пептид, което предполага разлика във фолдинга на двата екефафини. Нашите изследвания демонстрират потенциала на липидните монослоеви като елегантни и прости мембранни модели за изследване на липид-пептидните взаимодействия в биомембраните.

**6.1.5.** Kalauzka R., **Dzimbova T.**, Bocheva A., Pajpanova T. (2015) MIF-1 and Tyr-MIF-1 analogues containing unnatural amino acids: synthesis, biological activity and docking studies *Medicinal Chemistry Research*, 24(6), 2393-2405 (IF – 1.277) ISSN: 1054-2523

**Abstract:** Melanocyte-inhibiting factor (MIF-1) is the first hypothalamic tripeptide which has been demonstrated to act not only in the brain but also in the pituitary. Tyr-MIF-1 acts as an opiate agonist. It binds selectively and with a high affinity to the  $\mu$ -opioid receptor when compared with the  $\delta$ - and  $\kappa$ -opioid receptors. A large number of analogues of MIF-1 and Tyr-MIF-1, containing various modifiers in their structures, have been synthesized and their analgesic effect was determined by various *in vivo* tests. The aim of current study was: (1) to synthesize new MIF-1 and Tyr-MIF-1 analogues containing sulfoarginine (sArg) and norsulfoarginine (NsArg) in the second and third position, respectively; (2) with the help of docking procedures to find the relationship between structure and biological activity of MIF-1 and Tyr-MIF-1 analogues previously synthesized and biologically tested; (3) using found correlation to predict the biological effect of newly synthesized analogues. New analogues of MIF-1 and Tyr-MIF-1 were synthesized using methods of peptide synthesis in solution. Docking was performed with GOLD 5.0 and a correlation between the obtained docking data and the values from *in vivo* test was found. Some structure-activity relationships were determined. According to the correlation, we made assumptions about the biological effect of sArg and NsArg containing MIF-1 and Tyr-MIF-1. A computational approach could be very useful in the elucidation of the structure-activity relationship and in the design of new analogues with desired biological effect.

**Keywords:** Arginine mimetics, MIF-1, Tyr-MIF-1, Nociception,  $\mu$ -Opioid receptor, Docking, GOLD

В резултат от представената работа са синтезирани MIF-1 и Тур-MIF-1 аналози, съдържащи сурфоаргинин и норсулфоаргинин с използването на синтез в разтвор. С помощта на докинг бе установена връзка между биологично действие и структура, което дава възможност за предсказване на биологичния ефект на новосинтезираните аналози. Този подход може да бъде прилаган успешно при дизайна на нови аналози с желано биологично действие.

**6.1.6.** Kolev Ts., Pajpanova T., **Dzimbova T.**, Zareva S., Spitteller M. (2015) New structural motif of hydrogensquarate anions in the presence of DL-Serinium cation. Spectral and structural elucidation. *Journal of Molecular Structure* 1102, 235-241 (IF – 1.753) ISSN: 0022-2860

**Abstract:** A new crystalline complex of DL-serine and squaric acid (H<sub>2</sub>Sq) in stoichiometric ratio 1:1 (DL-Ser-HSq) was synthesized, isolated and structurally characterized by single crystal X-ray diffraction. The compound crystallizes in the monoclinic space group P21/n and its structure consists of a 3D supramolecular network of hydrogensquarate anions and serinium cations directed by intermolecular hydrogen bonding interactions. The 3D network is formed by hydrogen bonds with participation of C=O-OH, hydrogensquarate ion and NH<sub>3</sub><sup>+</sup> group, (Sq) C=O...O=C (OH) (2.525 Å), -NH<sub>3</sub><sup>+</sup>...O=C (Sq) (2.915, 2.985 and 3.016 Å), hydroxyl group CH<sub>2</sub>-OH...O=C (Sq) (2.739 Å), O...H-N<sup>+</sup> (3.016 Å) and (C-OHA...O=C (Sq) (3.242), respectively. The structural information shows a new structural motif, a non-classic α-chain of the hydrogensquarate anions with dihedral angle between neighbouring HSq anions 43.66°. The Raman and infrared spectra of the new crystal were measured in the 4000-50 cm<sup>-1</sup> and 4000-400 cm<sup>-1</sup> region frequency range respectively. The assignment of bands in infrared and Raman spectra of the crystal was performed on the basis of DFT (B3LYP) calculations, X-ray structural results and by the comparison with literature data.

**Keywords:** DL-Serine hydrogensquarate, Crystal structure, Solid-state IR and Raman spectroscopy, Vibrational assignment, DFT calculations

Беше синтезиран нов кристален комплекс от DL-серин и квадратната киселина (H<sub>2</sub>Sq) в стехиометрично съотношение 1: 1 (DL-Ser-HSq), изолиран и структурно характеризирани с рентгенова дифракция на единичен кристал. Съединението кристализира в моноклиничната пространствена група P21 / n и неговата структура се състои от 3D надмолекулна мрежа от хидрогенскуаратни аниони и серинови катиони, насочени чрез взаимодействия на междумолекулни водородни връзки. 3D мрежата се формира от водородни връзки с участието на C=O-OH, хидрогенскуаратен йон и NH<sub>3</sub><sup>+</sup> група, (Sq) C = O ... O = C (OH) (2.525 Å), -NH<sub>3</sub><sup>+</sup> Sq) (2.915, 2.985 и 3.016 Å), хидроксилна група CH<sub>2</sub>-OHгO = C (Sq) (2.739 Å), O-H + (3.016 Å) и 3.242). Структурната информация показва нов структурен мотив, неklasическа α-верига на хидрогенскуаратните аниони с диедричен ъгъл между съседни HSq аниони 43.66°. Рамановите и инфрачервените спектри на новия кристал са измерени в 4000-50 cm<sup>-1</sup> и 4000-400 cm<sup>-1</sup> честотен диапазон. Разпределянето на ивиците в инфрачервените и рамановите спектри на кристала се

извършва на базата на DFT (B3LYP) изчисления, рентгено-структурни резултати и чрез сравняване с литературата данни.

## 6.2. Публикации в чуждестранни списания без импакт фактор

- 6.2.1. Balacheva A., Iliev I., Datcheva R., **Dzimbova T.**, Pajpanova T., Golovinsky E. (2012) *In vitro* assessment of the cytotoxic effects of novel RGD analogues. *BioDiscovery* 4, 1-6. ISSN: 2050-2966 (Indexed: Google Scholar, DOAJ)

**Abstract:** The RGD sequence is present in many extracellular matrix proteins and intracellular proteins, including caspases. Synthetic RGD peptides may affect adhesion, migration and tumour metastasis, or directly induce apoptosis. Several RGD peptides were synthesized, and their anti-adhesive and cytotoxic properties were analyzed *in vitro*. Here we present the cytotoxic activities of RGD, R(NO<sub>2</sub>)GD, CavGD and RGD-OMe on non-tumour 3T3 cells and tumour cell lines HepG2 and MCF-7. The cell growth inhibitory effects of RGD-OMe are significantly higher than those of RGD on the cell lines used. Evidently the modification in the carboxylic group of RGD with simple esterification increases the cell growth inhibitory effects of the parent compound.

**Keywords:** RGD, cytotoxic activity, canavanine

Синтезирани са няколко RGD пептида и са изследвани техните анти-адхезивни и цитотоксични свойства. Очаквано модификацията на карбоксилната група дори и с проста естерификация води до повишаване на инхибиторния ефект върху клетъчния растеж на туморните клетъчни линии HepG2 и MCF-7.

- 6.2.2. Georgiev K., **Dzimbova T.**, Iliev I., Balacheva, A., Datcheva R., Pajpanova T. (2014) Growth Inhibition of HepG2 Cell Line by Canavanine, Norcanavanine and their Hydrazone Derivatives. *Der Pharma Chemica* 6(1),360-369 ISSN: 0975-413X (SJR 0.188, Scopus)

**Abstract:** A number of hydrazone derivatives of the non-protein amino acid L-canavanine (Cav) and its structural analogue L-norcanavanine (NCav), have been synthesized and their growth-inhibitory effects evaluated in cultured non-tumor 3T3 cells and tumor cell line HepG2 by the MTT assay. The Cav derivatives (Cav-CONHNHC<sub>6</sub>H<sub>5</sub>, Cav-CONHN(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Cl)<sub>2</sub>, and Cav-CONHNH<sub>2</sub>) and NCav derivatives (NCav-CONHNHC<sub>6</sub>H<sub>5</sub> and NCav-CONHN(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Cl)<sub>2</sub>) exhibited higher cell growth inhibitory effects on both cell lines compared to their parent compound. These effects were considerably higher on the tumor cells HepG2 in comparison to the non-tumor 3T3 cells. Introduction of the hydrazone group constitutes an effective structural modification, which significantly amplifies the growth inhibitory properties of the parent compound against tumor cells HepG2. These results confirm our previous conclusion that a proper hydrazone modification of the carboxylic group of Cav and its analogues may lead to a significant increase in the inhibitory effect of the compounds on the growth of tumor cells. On the other hand, NCav derivatives showed higher cytotoxicity on the HepG2 cells in comparison

with the respective canavanine analogues. Evidently the length of the carbon side chain influences the cytotoxicity of the compounds also.

**Keywords:** Cytotoxic activity, Canavanine, Norcanavanine, Hydrazide derivatives, Human tumour cell lines

Синтезирани са хидразидни аналози на непротеиногенните аминокиселини канаванин и норканаванин и е изследван техният инхибиторен ефект върху растежа на туморни и нетуморни клетки. Модификацията на карбоксилната група води до повишаване на ефекта. Норканаваниновите производни са по-цитотоксични от съответните канаванинови.

**6.2.3. Dzimbova T., Pajpanova T. (2017) Docking Studies of the New Neurotensin Analogues. *Journal of Computational Methods in Molecular Design*, 7 (1), 11-16 ISSN: 2231- 3176 (Indexed: Open J Gate, Genamics, Google Scholar, ISA ( Indian Science Abstracts ), CAS Database (Chemical Abstract Services), CABI (UK), Index Copernicus, Hinari, EBSCO etc.)**

**Abstract:** Neurotensin (NT) is a neurohormone and/or neuromodulator containing 13 amino acid residues. Neurotensin receptors (NTR) are transmembrane receptors that bind neurotensin. The active fragment of neurotensin is 8-13 (RRPYIL). The main drawback in the use of NT or any other endogenous peptide as a drug is extremely short half-life as a result of their rapid degradation by the action of peptidases. To overcome this problem, various neurotensin analogues were synthesized, which include linear peptides, cyclic peptides and nonpeptide molecules. Chemical modification of the native peptide, however, may result in a radical change in the receptor affinity and specificity. The purpose of this work is to identify interactions between newly synthesized neurotensin analogues and neurotensin receptor (NTR1) and to establish the relationship between structure and action using computational methods. All new analogues were synthesized using SPPS. The results of docking shows that the tested analogues of neurotensin bind in the active site of the receptor, but significantly weaker than NT. Replacement of arginine residue in the second position with canavanine strongly increases the total energy of the ligand-receptor complex, therefore it is more unstable than the complex NT/NTR1.

**Keywords:** Neurotensin, Neurotensin receptor, Docking, GOLD, Canavanine

Докингът на новосинтезираните аналози на невротензина показва, че всички те се свързват в активния център на невротензиновия рецептор, но значително по-слабо от самия невротензин. Замяната на аргининовия остатък във втора позиция с канаванинов силно повишава енергията на образуващия се лиганд-рецепторен комплекс, ето защо е по-нестабилен от комплекса NT/NTR1.

01.09.2017

Подпис:

Гр. Благоевград

(д-р Татяна Дзимбова)