

СОФИЙСКИ УНИВЕРСИТЕТ „СВ. КЛИМЕНТ ОХРИДСКИ”

ФАКУЛТЕТ ПО ХИМИЯ И ФАРМАЦИЯ

Катедра Аналитична химия

РАДОСЛАВА ДИМИТРОВА СТАМБОЛИЙСКА

МЕДНИ(II) КОМПЛЕКСИ НА ПРИРОДНИТЕ АНТИБИОТИЦИ

МОНЕНЗИН, ЛАЗАЛОЦИД, ТИЛОЗИН И ТИЛМИКОЗИН

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

**на дисертационен труд за присъждане на
образователна и научна степен „ДОКТОР”**

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

Професионално направление: 4.2 Химически науки

Научна специалност: Аналитична химия

Научен ръководител: проф. Ивайла Панчева – Кадрева

Рецензенти:

Научно жури: проф. Ивайла Панчева – Кадрева

проф. Соня Илиева

проф. Николай Василев

проф. Ивелина Георгиева

доц. Нели Минчева

София

2022 г.

Дисертационният труд съдържа общо 98 страници, онагледен е с 47 фигури и 10 таблици, а цитираните литературни източници са 142.

Докторантът работи в Лаборатория по Биокоординационна и Биоаналитична химия в катедра „Аналитична химия“ към ФХФ при СУ „Св. Климент Охридски“.

Дисертационният труд е обсъден, приет и насочен за защита пред научно жури от разширен Катедрен съвет при катедра „Аналитична химия“ към ФХФ при СУ „Св. Климент Охридски“2022 г.

Защитата на дисертационния труд ще се състои на2022 г., от ч. в Заседателната зала на ФХФ, гр. София бул. „Джеймс Баучер“ № 1 на открито заседание на научно жури.

Материалите по защитата са на разположение в Деканата на ФХФ, СУ, бул. „Джеймс Баучер“ № 1, стая 107 и са публикувани на интернет страницата на ФХФ, СУ.

СЪДЪРЖАНИЕ

1. УВОД.....	5
2. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР	8
2.1. Характеристика на полиетерните йонофорни антибиотици	8
2.2. Характеристика на макролидните антибиотици	9
3. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ	12
4. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНА ЧАСТ	13
4.1. Материали и реактиви	13
4.2. Синтетични процедури	13
4.2.1. Монензин киселина ($\text{MonH}\times\text{H}_2\text{O}$)	13
4.2.2. Комплекс на $\text{MonH}\times\text{H}_2\text{O}$, 1	13
4.2.3. Комплекс на LasH , 2.....	13
4.2.4. Комплекси на HTyI и HTilm във водна среда, 3-4	14
4.2.5. Нитрат-съдържащи комплекси на HTyI и HTilm в неводна среда, 5-6.....	14
4.2.6. Хлорид-съдържащи комплекси на HTyI и HTilm в неводна среда, 7-8	14
4.2.7. Хлорид-съдържащи комплекси на HTyI и HTilm в неводна среда и излишък на CuCl_2 , 9-10.....	15
4.3. Използвана апаратура	15
4.4. Квантово-химични изчисления.....	16
4.5. Определяне на минималната инхибираща концентрация посредством метода „дифузия в агар“	16
5. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ	19
5.1. Комплекси на монензин и лазалоцид с йони на Cu(II)	19
5.1.1. Меден(II) монензинат, 1	19
5.1.2. Меден(II) лазалоцидат, 2	25
5.2. Комплекси на тилозин и тилмикозин с йони на Cu(II)	28
5.2.1. Моноядрени виолетови Cu(II) тилозинат и тилмикозинат, 3-4	28
5.2.2. Диядрени Cu(II) комплекси на тилозин и тилмикозин, съдържащи нитратни (сини, 5-6) или хлоридни (зелени, 7-8) аниони	37
5.2.3. Полиядрени Cu(II) комплекси на тилозин и тилмикозин, 9-10	49
5.3. Антибактериална активност на медни(II) комплекси 3-8	54
6. ИЗВОДИ.....	58
7. ПРИНОСИ.....	60
8. ПУБЛИКАЦИИ и НАУЧНИ СЪОБЩЕНИЯ	61

Списък на използваните съкращения

^{13}C -NMR – въглероден NMR

^1H -NMR – протонен NMR

CHCl_3 – хлороформ

DFT – теория на функционала на плътността

EPR – електронен парамагнитен резонанс

ESI-MS – мас-спектрометрия с електроспрей йонизация

Et_2O – диетилов етер

Et_4NOH – тетраетиламониев хидроксид

HCl – солна киселина

HTilm – тилмикозин

HTyl – тилозин

IR – инфрачервена спектроскопия

KOH – калиев основа

LasH – лазалоцид киселина

MeCN – ацетонитрил

MeOH – метанол

MIC – минимална инхибираща концентрация

MonH – монензин киселина

MonNa – монензин натрий

NBO – natural bond orbitals

NMR – ядрен магнитен резонанс

SRCD – кръгов дихроизъм със синхротронно лъчение

TGA-MS – термогравиметричен анализ с мас-спектрометрия

UV-VIS – електронна спектроскопия

X-ray – рентгеноструктурен анализ

АДФ – аденозин дифосфат

АТФ – аденозин трифосфат

КОЕ – колония-образуваща единица

1. УВОД

Антибиотиците са група лекарствени средства, които се използват за третиране (лечение) и/или профилактика на бактериални и други инфекции у животните и човека. Самата етимология на думата „антибиотик” означава буквално, от латински език, „против (срещу) живота”. През 19^{ти} век, преди въвеждането на първите антимикуробни препарати и първите антибиотици, основните причини за смъртността на населението са пневмонията, диарията и дифтеритът. Нещо повече, по време на индустриалната революция, когато популацията в градовете нараства, се увеличават и случаите на туберкулоза и сифилис. Освен това, на вътреболничните инфекции, причинени от Грам (+) бактерии се дължат до 40% от случаите на постоперативен леталитет. След първоначалното прилагане на т.нар. антимикуробна химиотерапия през 1911 г. (с откриването на арсфенамин), следва въвеждането и на пеницилин (1941 г.), стрептомицин (1943 г.) и цефалоспорин (1948 г.). Така смъртността, вследствие на вътреболнични инфекции, е сведена до 2%, а най-честите инфекциозни заболявания стават лечими.

Началото на полиетерните антибиотици е поставено през 1951 г. с изолирането на две съединения – нигерицин и лазалоцид, като от тогава са открити над 50 вида микроорганизми, които произвеждат карбоксилни йонофори. Терминът „йонофор” е въведен през 1967 г. като препратка към способността на тези съединения да свързват метални йони в мастноразтворими комплекси, които способстват техния транспорт през клетъчната мембрана, на което се дължат терапевтичните им свойства.

Полиетерните йонофорни антибиотици се прилагат под формата на техните натриеви комплекси, като свойствата им са задълбочено изучени. Известно е, че монензин се хатактеризира с афинитет към натриевите йони (натриев йонофор), салиномицин – към калиевите (калиев йонофор), а лазалоцид има склонност да димеризира и може да координира както едно-, така и двузрядни метални йони. В Лабораторията по Бионеорганична и Биокоординационна Химия (ЛББХ) при ФХФ на СУ „Св. Климент Охридски” е изследвана и способността на някои полиетерни йонофори да свързват дву- и тризрядни метални йони в неутрални комплекси, изолирани в твърда фаза. Получени са комплекси с разнообразна структура, повечето от които проявяват по-значителна цитотоксичност спрямо търговските медикаменти и киселите им форми.

Освен известните терапевтични свойства, за някои полиетерни йонофори е установено и че притежават цитотоксични такива, включително и към някои туморни линии.

Началото на макролидните антибиотици е положено през 1950 г. с изолираното от *Streptomyces* spp. съединение пикромицин, което получава наименованието си благодарение на киселия си вкус (пикро (гр.) – кисел). В следващите години биват описани още редица подобни съединения, като по този начин се формира цял клас терапевтици, сходни по своите произход, структура и показания. Терминът „макролиди“ е предложен още през 1950 г. от Уудуърд, поради наличието на макроциклен лактонов пръстен, характерен за структурата на всички известни дотогава антибиотици от този клас.

Макролидите най-често биват разделяни на три основни групи, в зависимост от големната на тилактоновия им пръстен: 14-, 15- и 16-членни. На места се среща и четвърта група – тази на 12-членните представители, които, обаче, не притежават антибиотични свойства, и поради тази причина често остават в сянка.

Макролидните терапевтици се използват както в хуманната, така и във ветеринарната медицина при терапията на пулмонални, кожни и венерически инфекции; оториноларингологични страдания (отити, фарингити, синусити), инфекции, причинени от *Helicobacter pylori* и др.

Въпреки развитието на медицината и фармацията през последните два века, човечеството е изправено пред ново предизвикателство – антибиотичната резистентност. Редица фактори способстват индуцирането на механизми у патогените, които ги предпазват от въздействието на антимикробните средства. Такива могат да бъдат прилагането на едни и същи терапевтици и честата им употреба; третирането с антибиотици на вирусни инфекции; неправилният прием и самолечението, и др. Познати са над 2,8 милиона болестотворни микроорганизми, които не реагират на конвенционална антибиотична терапия. Това налага третирането на такива инфекции с четвърто и дори пето поколение лекарствени препарати (цефалоспорини и β -лактами), които, от своя страна, могат да доведат до сериозни нежелани реакции и увреждания у пациентите. Притеснителен е и фактът, че не по-малко от 700 милиона души губят живота си всяка година, благодарение на развита антибиотична резистентност. Ето защо търсенето на съвременни лекарствени средства, които да се справят с този световен проблем, е от изключителна важност.

Комплексообразуването може да се разгледа като потенциално решение на тази поставена пред науката задача. При този метод могат да бъдат избегнати клетъчните защитни механизми, без да се налага химична модификация, като се запази нативната структура на антибиотика. Освен това, активността на терапевтика може да бъде потенцирана, благодарение на координирането на метален йон, особено в случаите, в които в структурата на съединението участва йон на някой от есенциалните биоелементи, като Cu(II), Zn(II), Mn(II), Fe(II) и др.

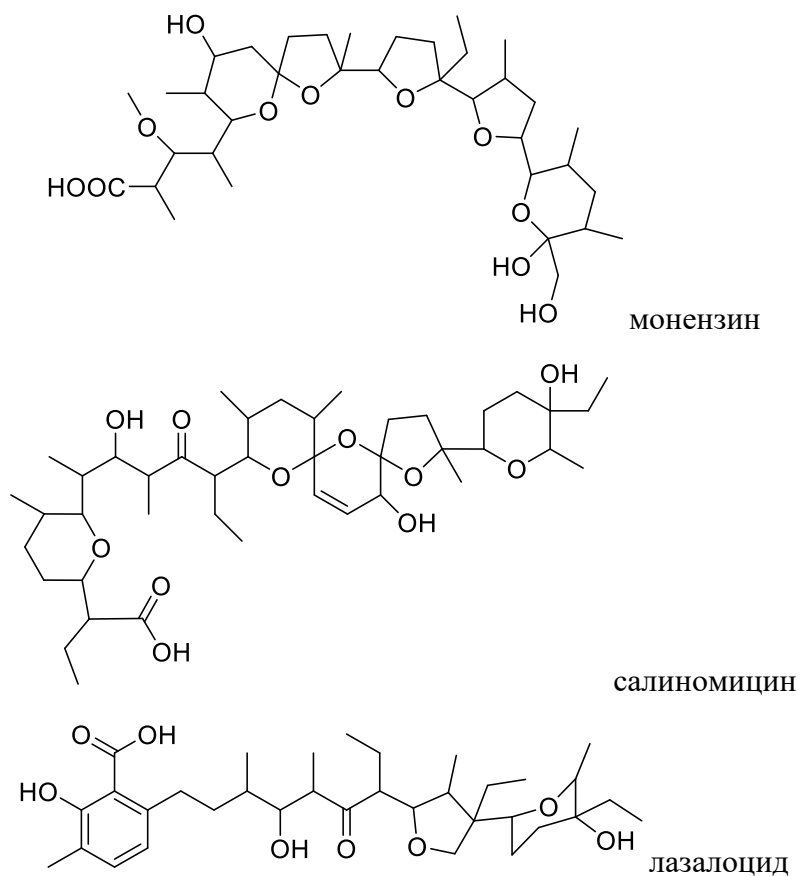
2. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР

2.1. Характеристика на полиетерните йонофорни антибиотици

Най-много представители при синтеза на природни антибиотици са микроорганизмите от род *Streptomyces*, които произвеждат над две трети от природните антибактериални, антифунгиални и антипаразитни вещества, използвани в клиничната практика, както и други биоактивни компоненти, като например имуносупресори. Именно три от представителите на род *Streptomyces* са отговорни за биосинтеза на природните полиетерни йонофорни антибиотици монензин, салиномицин и лазалоцид – *S. cinnamomensis*, *S. albus* и *S. lasalocidi*.

Един от начините на действие на полиетерните йонофори се изразява в способността им да повлияват хомеостазата на металните йони в клетката, като към тези процеси низшите организми са много по-чувствителни. Нарушаването на концентрациите на т.нар. биометали в клетката водят до дисбаланс на нейните енергийни процеси, които, от своя страна, могат да доведат до клетъчна смърт (апоптоза).

Най-общо, полиетерните йонофорни антибиотици представляват монокарбоксилни киселини, съдържащи тетрахидропиранови и тетрахидрофуранови пръстени (Фиг. 1). Карбоксилната група (глава) в единия край на молекулата и хидроксилна група (опашка) – в другия – са свързани с водородни връзки, което обуславя нагъване на молекулата и образуване на кухина. В получената псевдоциклична структура, разположените на „външната” ѝ повърхност, алифатни остатъци са отговорни за липофилния характер на йонофорите. Ориентираните към вътрешността на молекулата кислородни атоми (от етерни, карбонилни и хидроксилни групи) обуславят хидрофилния характер на кухината и способността ѝ да „приема“ молекула вода или еднозаряден метален йон. Координирането на метални йони под формата на неутрални комплекси позволява техния транспорт, благодарение на липофилността на антибиотика, осигуряваща преминаването му през фосфолипидния бислой на клетъчната мембрана.



Фиг. 1. Структура на монензин, салиномицин и лазалоцид

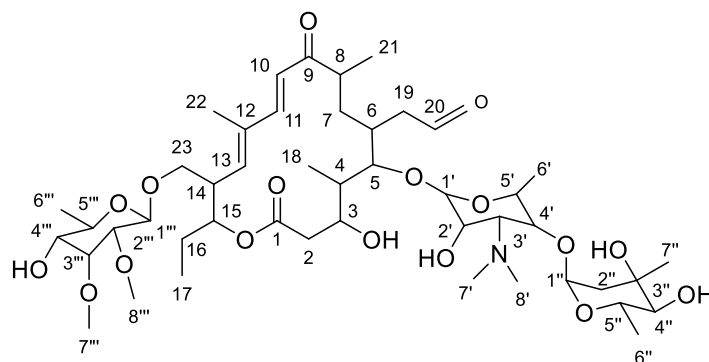
2.2. Характеристика на макролидните антибиотици

Макролидните антибиотици са широко използвани терапевтици както в хуманната, така и във ветеринарната медицина. Те се характеризират с активност не само срещу Грам(+), но и срещу някои Грам(-) микроорганизми. Началото на тази група лекарствени препарати бива поставено с изолирането на еритромицин от *Strptomyces erythreus* и представянето му през 1952 г. като единствена алтернатива на бета-лактамите при лечението на инфекции, предизвикани от *Staphylococcus* spp. и *Streptococcus* spp., включително *Streptococcus pneumonia*.

Подобно на други бактерицидни и бактериостатични средства, действието на макролидите засяга в много по-голяма степен низшия, отколкото висшия организъм и, следователно, атакува клетките на съответния патоген, без да повлиява тези на гостоприемника. Макролидните антибиотици са най-често прилаганите препарати при

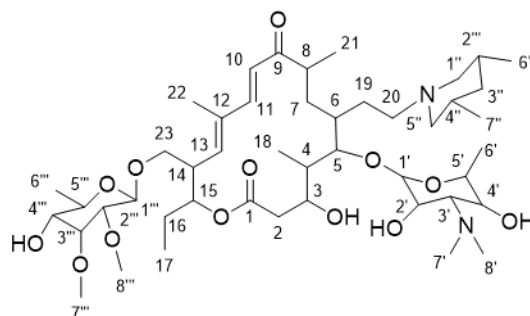
лечение на заболявания, причинени от *Pasturella* spp., *Trueperella pyogenes* и *Fusobacterium necrophorum*.

За разлика от 14- и 15-членните макролидни антибиотици, които са предназначени за лечение единствено в хуманната медицина, някои представители на 16-членните се използват само като ветеринарни терапевтици. Такъв препарат е Тилозин – природен 16-членен макролиден антибиотик, изолиран от *Streptomyces fradiae*, който представлява смес от четири сходни метаболита – А, В, С и D, като терапевтичните свойства се приписват на тилозин А, който е и доминиращият макролид в сместа, с дял от над 80 %. В структурно отношение, тилозин е изграден от 16-членен макроцикъл – т.нар. тилактонов пръстен. На 5-а позиция от лактоновия пръстен заместителят е дизахарид, съставен от β -D-микаминоза и α -L-микароза, а на 23-а позиция – мициноза (Фиг. 2).



Фиг. 2 Структура на тилозин А

Тилмикозин е полусинтетичен макролиден антибиотик, синтезиран от тилозин В. Синтезът протича в кисела среда, където микарозилният заместител се хидролизира до получаване на десмикозин. Следва аминирание на десмикозин със смес от *cis*- и *trans*-3,5-диметилпиперидин (Фиг. 3).



Фиг. 3 Структура на тилмикозин

Литературният преглед върху координационната способност на полиетерните йонофори показва образуването на разнообразни по състав и структура комплексни съединения, за повечето от които са налични и кристалографски данни.

Съществува силно ограничена информация относно афинитета на макролидните антибиотици да координират метални йони. Експериментални структурни данни са налични само за системите Zn(II)-еритромицин и Cu(II)-азитромицин.

Не е изследвана способността на полиетерните йонофори монензин / лазалоцид и 16-членните макролиди тилозин / тилозин да координират йони на есенциалния елемент мед(II).

3. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

ОСНОВНА ЦЕЛ:

Изследване способността на полиетерните йонофори монензин/лазалоцид и макролидните антибиотици тилозин/тилмикозин да взаимодействат с йони на мед(II).

За осъществяване на поставената цел, беше необходимо изпълнението на следните ЗАДАЧИ:

1. Изследване на комплексообразователната способност на антибиотиците в разтвор.
2. Оптимизиране на реакционните условия за изолиране на наблюдаваните комплексни видове в твърда фаза.
3. Структурно охарактеризиране на новополучените координационни съединения с физико-химични методи и квантово-химични изчисления.
4. Оценка на микробиологичната активност на комплексите срещу Грам-положителни аеробни микроорганизми и сравнение с тази на изходните лиганди.

4. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНА ЧАСТ

4.1. Материали и реактиви

Монензин натрий (MonNa), тилозин (HTyl, със съдържание на тилозин А > 90%) и тилмикозин (HTilm) са предоставени от „Хювефарма“ АД („Биовет“ ЕООД, гр. Пещера). Лазалоцид киселина (LasH) е любезно предоставен от Факултета по химия при Университета „Адам Мицкевич“ (гр. Познан, Полша). Et₄NOH (40% разтвор във вода) е доставен от „Fluka“. Използваните разтворители („ч.з.а“), к. HCl и KOH са закупени от „Merck“ (Германия) и „Валерус“ ЕТ.

Микробиологичните изследвания са проведени с Грам-положителните аеробни бактерии *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*), *Bacillus cereus* (*B. cereus*) и *Kocuria rhizophilla* (*K. rhizophilla*), доставени от Националната банка за промишлени микроорганизми и клетъчни култури (НБПМКК). Обикновеният агар, със съдържание 0,1% месен екстракт, 1% пептон, 0,5% NaCl и 1,5% агар, е закупен от НБПМКК.

При експериментите е използвана дейонизирана вода (18 MΩ·cm).

4.2. Синтетични процедури

4.2.1. Монензин киселина (MonH×H₂O)

Към 1,0 mmol (0,692 g) MonNa в диетилов етер се добавя излишък от воден разтвор на 0.1 M HCl. Реакционната смес се оставя на електромагнитна бъркалка за около 15 min., след което получената киселина се екстрахира с етер. След концентриране на органичната фаза до сухо остатъкът се разтваря в ацетон. Монензин киселина се изолира в твърда фаза след утаяване из вода, филтруване и сушене в ексикатор.

4.2.2. Комплекс на MonH×H₂O, 1

Монензин киселина (1,0 mmol, 0,688 g) реагира с CuCl₂×2H₂O (0,5 mmol, 0,085 g) в присъствието на Et₄NOH (40%, 370 μL). Реакционната смес (в ацетонитрил, MeCN) се оставя на електромагнитна бъркалка без нагряване за няколко минути. Образуваната електриковосиня утайка е филтрувана и изсушена в ексикатор. Елементен анализ за [Cu(C₃₆H₆₁O₁₁)₂(H₂O)₂], 1: Теор. C, 60,08; H, 8,82; Cu, 4,41%. Експ. C, 59,89; H, 9,12; Cu, 4,92%. Добив: 67%.

4.2.3. Комплекс на LasH, 2

Медният дилазалоцидат е получен по реакционната схема, описана в т. 4.3.2. В MeCN лазалоцид киселина (1,0 mmol, 0,59 g) реагира с CuClO₄×6H₂O (0,5 mmol, 0,185 g) до

получаване на тъмнозелена утайка. Реакцията протича в присъствие на Et_4NOH (1,0 mmol; 370 μL) и молно съотношение $\text{M:L} = 1:2$.

4.2.4. Комплекси на HTyI и HTilm във водна среда, 3-4

Към воден разтвор на всеки от макролидите (0,5 mmol) е добавена к. HCl до пълното им разтваряне, след което бавно, на капки, е прибавен воден разтвор на $\text{CuCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (0,25 mmol, 0,043 g). Алкализирането на получените реакционни смеси с KOH предизвиква образуването на виолетови изоструктурни комплекси със състав $[\text{CuL}_2]$ ($\text{L} = \text{TyI}^-$ (pH 13), Tilm^- (pH 11)). Получените съединения се промиват обилно с дейониизирана вода, след което се изсушават в ексикатор.

Елементен анализ за $[\text{Cu}(\text{C}_{46}\text{H}_{76}\text{NO}_{17})_2]$, **3**: Теор. С, 58,35; Н, 8,58; N, 1,48; O, 28,72; Cu, 3,36%. Експ. С, 57,71; Н, 8,58; N, 1,32; O, 28,67; Cu, 3,72 %; Добив: 59%.

Елементен анализ за $[\text{Cu}(\text{C}_{46}\text{H}_{79}\text{N}_2\text{O}_{13})_2]$, **4**: С 61,40; Н 8,85; N 3,11; O, 23,11; Cu, 3,53%. Експ. С, 61,77; Н, 9,26, N, 2,88; O, 22,62; Cu, 3,47%. Добив: 75%.

4.2.5. Нитрат-съдържащи комплекси на HTyI и HTilm в неводна среда, 5-6

Тилозин и тилмикозин (0,25 mmol) образуват спонтанно сини комплексни съединения с $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \times 3\text{H}_2\text{O}$ (0,25 mmol) в ацетонова среда. Съединенията са изолирани в твърда фаза чрез утаяване из диетилов етер или n-хексан.

Елементен анализ за $[\text{Cu}_2(\text{C}_{46}\text{H}_{76}\text{NO}_{17})_2(\text{NO}_3)_2]$, **5**: Теор. С, 53,09; Н, 7,36; N, 2,69; O, 30,75; Cu, 6,11%. Експ. С, 51,75; Н, 7,63; N, 2,29; O, 30,75; Cu, 5,52%. Добив: 89%.

Елементен анализ за $[\text{Cu}_2(\text{C}_{46}\text{H}_{79}\text{N}_2\text{O}_{13})_2(\text{NO}_3)_2]$, **6**: Теор. С, 55,6; Н, 8,01; N, 4,23; O, 25,76; Cu, 6,39 %. Експ. С, 54,73; Н, 8,66; N, 4,12; O, 26,84; Cu, 5,65%. Добив: 71%.

4.2.6. Хлорид-съдържащи комплекси на HTyI и HTilm в неводна среда, 7-8

Тилозин и тилмикозин (0,25 mmol) образуват спонтанно зелени комплексни съединения с $\text{CuCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (0,25 mmol) в ацетонова среда. Съединенията са изолирани в твърда фаза чрез утаяване из диетилов етер или n-хексан.

Елементен анализ за $[\text{Cu}_2(\text{C}_{46}\text{H}_{77}\text{NO}_{17})_2\text{Cl}_4]$, **7**: Теор. С, 52,59; Н, 7,39; N, 1,33; O, 25,89; Cl, 6,75; Cu, 6,05%. Експ. С, 52,65; Н, 7,15; N, 1,18; O, 26,28; Cl, 6,49, Cu, 6,25%. Добив: 72%.

Елементарен анализ за $[\text{Cu}_2(\text{C}_{46}\text{H}_{80}\text{NO}_{13})_2\text{Cl}_4]$, **8**: Теор. С, 55,05; Н, 8,04; N, 2,79; O, 20,72; Cl, 7,06; Cu, 6,33%. Експ. С, 54,77; Н, 7,88; N, 2,56; O, 21,00; Cl, 7,12, Cu, 6,67%. Добив: 84%.

4.2.7. Хлорид-съдържащи комплекси на НТул и НТилм в неводна среда и излишък на CuCl_2 , 9-10

В ацетонови разтвори макролидите (0,25 mmol) реагират с $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1,0 mmol, 0,17 g) до получаването на жълти комплексни съединения (**9-10**), които са изолирани в твърда фаза посредством утаяване из диетилов етер или n-хексан.

4.3. Използвана апаратура

Електронните спектри (200-900 nm) са регистрирани с T80+ UV/VIS спектрометър (PG Instruments Ltd, ФХФ-СУ). Коефициентите на моларна абсорбируемост са определени посредством метода на стандартната крива. Инфрочервените (IR) спектри са получени на Nicolet 6700 FT-IR спектрофотометър, Thermo Scientific ($4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$) под формата на пресовани таблетки в KBr или суспензия в нуйол (ФХФ-СУ). За кръговодинхрична спектроскопия със синхротронно лъчение (SRCO) е използвана установката в Университет Орхус, Дания (AU-CD beam line, ASTRID2, ISA).

Електронните парамагнитни (EPR) спектри са регистрирани на EMXplus10/12 EPR спектрометър (Bruker BioSpin) в температурния интервал 100-300 K (ИОНХ-БАН). Стойностите на изотропния фактор (g_{iso}), параметъра α^2 , който показва дали връзката има ковалентен или йонен характер, както и G-фактора, отчитащ обменни взаимодействия, са изчислени, както следва:

$$g_{\text{iso}} = \frac{g_{\parallel} + 2g_{\perp}}{3}$$
$$\alpha^2 = \frac{A_{\parallel}}{P} + (g_{\parallel} - 2.0023) + \frac{3}{7}(g_{\perp} - 2.0023) + 0.04$$
$$G = \frac{g_{\parallel} - 2}{g_{\perp} - 2}$$

където $P = 386\text{ G}$ е изчислената анизотропна константа на свръхфина структура за медни (II) йони в газова фаза.

Експерименталните NMR (ядрен магнитен резонанс) спектри в разтвор са записани на AVANCE AV600 II+ NMR спектрометър при $293\text{ K} \pm 0,1\text{ K}$ (ИОХЦФ-БАН), и в твърда фаза – на Bruker Avance III 500MHz (ФХФ-СУ).

Елементният анализ е проведен в Лабораторията „Елементен анализ” при ИОХЦФ-БАН. Термичният гравиметричен анализ (TGA) е извършен с Labsys Evo 1600 (Setaram, Франция). Скоростта на нагряване е 10 K/min при въздушен поток от 20 mL/min. Отделящите се газове с нарастване на температурата са регистрирани с мас-спектрометър OminStar, Pffiffer Vacuum GSD 301 O2 (Германия). Изследванията са проведени в ИОНХ-БАН.

Мас-спектрите (ИОХЦФ-БАН) са регистрирани на Thermo Scientific UHPLC, свързан с Q Exactive Plus Hybrid Quadrupole-Orbitrap мас-спектрометър Thermo Scientific (HESI HRMS). Данните са обработени с Xcalibur Free Style program. Течнохроматографският метод включва метанол като подвижна фаза, скорост на потока – 0,3 mL/min и обем на инжектираната проба – 2 μ L. Мас-спектралните данни са определени чрез електроспрей йонизация в положителен режим.

4.4. Квантово-химични изчисления

За установяване геометрията на комплексите е проведено квантово-химично изследване, като е използвана теория на функционала на плътността (DFT) във вакуум и в имплицитен разтворител ацетон. Геометричната оптимизация на структурите и изчислението на абсорбционните спектри са извършени с Gaussian 16. За оптимизиране на структурите са използвани базисите B3LYP/6-31G* и B3LYP/6-311G* във вакуум и в имплицитен разтворител ацетон, като е използван PCM (Polarizable Continuum Model). Минимумите са потвърдени чрез честотен анализ. Вертикалните енергии на абсорбционните преходи са получени с TDB3LYP/6-31G*/PCM(acetone), използвайки оптимизираните в ацетон структури. NBO (Natural Bond Orbital) зарядите са изчислени с NBO 3.1. Химичните отмествания в $^1\text{H-NMR}$ са изчислени посредством модифициран BLYP/6-311+G(2d,p) в имплицитен разтворител ацетон, като е използвана модификация на протоните (WP04). EPR параметрите са изчислени със софтуерния пакет ORCA, като за структурите, оптимизирани във вакуум, е използван функционал B3LYP/6-31G*/Wachters+f за мед.

4.5. Определяне на минималната инхибираща концентрация посредством метода „дифузия в агар“

Оценена е активността на новосинтезираните комплексни съединения, както и на изходните лиганди, срещу три Грам(+) аеробни бактерии – *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*),

Bacillus cereus (*B. cereus*) и *Kocuria rhizophilla* (*K. rhizophilla*). За целта е определена тяхната минимална инхибираща концентрация (МИС), т.е. най-ниската концентрация, която видимо потиска растежа на съответния микроорганизъм.

Бактериалните щамове се съхраняват при температура 4 °С в ампула или върху полегат (кос) агар. Преди започване на работа е необходимо да се осигури чиста култура (клетките да са потомство на една и съща бактериална клетка). За тази цел се провежда неколкократно, последователно пресяване върху петри със стерилен агар, като посевките се инкубират 24 часа при 30 °С. Непосредствено преди пристъпване към определянето на минималната инхибираща концентрация, бактериалните култури се подлагат на т.нар. диференциално оцветяване по Грам. При микроскоопско наблюдение Грам(+) бактерии са оцветени в синьо-лилаво, докато Грам(-) се оцветяват в червено. Диференциалното оцветяване се състои от следните стъпки:

- Върху предметно стъкло се приготвя натривка от съответната клетъчна култура, която се оставя да изсъхне и се фиксира на пламък;
- Така приготвената натривка се покрива с филтърна хартия, която се напоява с карболгенцианвиолет и се оставя за 2-3 минути;
- Филтърната хартия се отстранява внимателно и, без да се промива, върху препаратата се нанася луголов разтвор, който престоява 1-2 минути;
- След отстраняване на луголовия разтвор, всички микроорганизми се оцветяват в синьо-лилаво, тъй като багрилото прониква във вътрешността на клетъчната стена, задържано от пептидогликановия слой. Тъй като този слой при Грам(-) бактерии е по-тънък, обилното промиване с 96 % етанол в продължение на 30-40 сек., води до тяхното обезцветяване;
- Върху препаратите се нанася фуксин с цел обезцветените Грам(-) микроорганизми да се оцветят в червено.

В случай, че резултатът от диференциалното оцветяване по Грам посочи наличие на Грам(-) бактерии (червено оцветяване), се пристъпва към нова серия пресявки. При задоволителен резултат (синьо-лилаво) оцветяване, може да се премине към определяне на минималната инхибираща концентрация.

В автоклав се стерилизират агар (31 g/L) и дестилирана вода. След охлаждане агарът (по около 10 mL) се разлива в петриеве блюда и се оставя да се втвърди. Приготвя се

клетъчна суспензия – в епруветки със стерилна вода, с помощта на йозе, се добавя количество от съответната клетъчна култура и се хомогенизира така, че да не се наруши целостта на клетките. Мътността на суспензията се сравнява спектрофотометрично с тази на стандарт на McFarland 4 (0,4 mL 1% разтвор на $\text{BaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ + 9,6 mL 1% разтвор на H_2SO_4) ($\lambda = 650 \text{ nm}$ и $b = 1 \text{ cm}$), който отговаря на 10^8 – 10^9 КОЕ mL^{-1} (колонии-образуващи единици). Клетъчната суспензия се добавя към предварително стерилизиран и охладен до 40-45 °C агар, така че концентрацията на клетки да бъде 1,5% (v/v). С така „заразения“ агар в петриевите блюда се разлива втори слой, който също се оставя да се охлади до втвърдяване. В двуслойния агар се правят ямки от по 6 mm, в които се накапват по 20 μL разтвори на изследваните вещества. Разтворите се приготвят чрез последователни двойни разреждания от изходен разтвор с концентрация 1 mg/mL. Като контрола се използва чист разтворител. След дифузия на разтворите в обема на двойния слой, културите се инкубират в термостат за 24 часа при 30 °C. Диаметърът на инхибираните зони се отчита на 24-тия час. Всеки разтвор е накапван по три пъти. Всички тестове са проведени трикратно.

5. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ

Обект на настоящия дисертационен труд са природни антибиотици от класа на полиетерните йонофори и макролидите и техните модификации с йони на мед(II). Комплексообразователната способност на биологично активните лиганди и свойствата на новополучените координационни частици са изследвани чрез набор от физико-химични методи. Поради трудности при израстване на единични кристали от медните(II) комплекси, за част от тях са извършени и допълнителни квантово-химични изчисления. Способността на структурно охарактеризираните нови координационни съединения да потискат развитието на бактериални щамове е оценена по метода „дифузия в двоен слой агар“ срещу представители на Грам-положителните аеробни микроорганизми.

5.1. Комплекси на монензин и лазалоцид с йони на Cu(II)

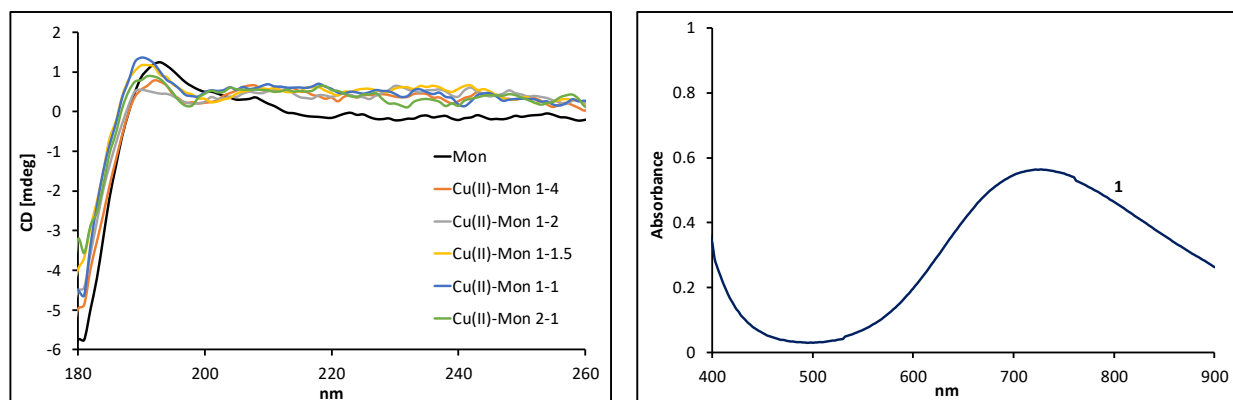
Полиетерните йонофорни антибиотици монензин киселина ($\text{MonH}\times\text{H}_2\text{O}$) и лазалоцид киселина (LasH) (Фиг. 1), в присъствие на слабата основа Et_4NOH , която осигурява депротониране на лигандите, реагират в неводна среда (MeCN) с йони на мед(II) до получаването на син монензинатен (**1**) и зелен лазалоцидатен (**2**) комплекси. След изолирането им в твърдо състояние, **1-2** притежават ограничена разтворимост в повечето от органичните разтворители и са неразтворими във вода.

5.1.1. Меден(II) монензинат, **1**

Благодарение на множеството хирални центрове в молекулата на монензин, първоначално процесът на взаимодействие с йони на мед(II) е проследен чрез метода на кръговия дихроизъм с източник на синхротронно лъчение (SRCD) в метанолови разтвори. Добавянето на металните катиони към монензинатния анион, в съотношения M:L от 1:4 до 2:1, предизвиква хипсохромно отместване на максимума в спектъра на лиганда от 192 nm (Mon^-) до 191 nm (в присъствието на Cu(II)) (Фиг. 20). Освен това, в спектрите на реакционните смеси се наблюдава положителна абсорбция в интервала от 210 nm до 300 nm за разлика от тази на депротонирания лиганд. Макар и слабо, отместването на сигнала на Cu(II)-съдържащите частици, както и различната форма на техните SRCD спектри, в сравнение с тези на некоординирания антибиотик, са показателни, че монензин търпи

конформационни изменения в процеса на комплексообразване. Експерименталните данни показват, че се образува един вид комплексни частици, за разлика от други метални(II) монензинати, при които, при същите условия, се наблюдава равновесие между $[M(\text{Mon}^-)_2]$ и $[M(\text{Mon}^-)]^+$ ($M = \text{Mg(II)}, \text{Ca(II)}, \text{Co(II)}, \text{Mn(II)}, \text{Ni(II)}, \text{Zn(II)}, \text{Cd(II)}$).

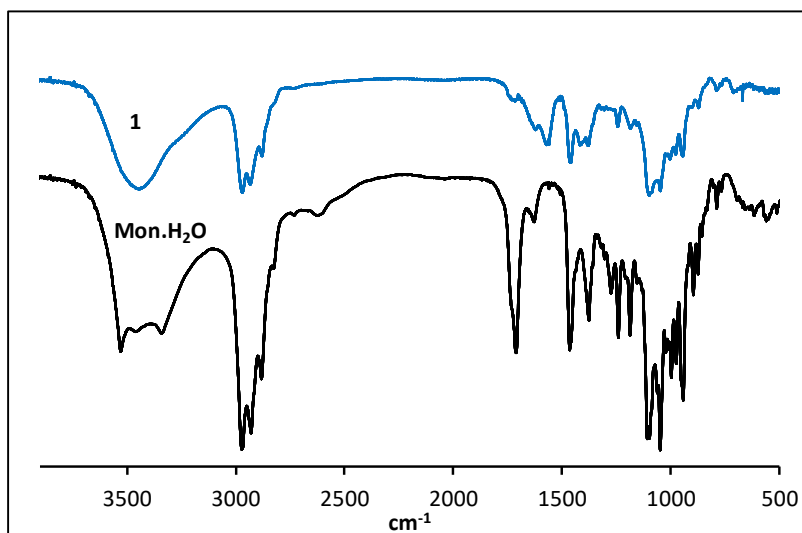
Електронният спектър на комплекс **1** в етанол съдържа уширена, слабоинтензивна, ивица с максимална абсорбция при 730 nm. Поради частичната разтворимост не бе възможно определянето на моларната абсорбируемост на комплекса, но видът и положението на ивицата (Фиг. 4) са характерни за d-d преходи в Cu(II)-съдържащи координационни съединения с кислородни донорни атоми.



Фиг. 4 SRCD спектри на монензинатния анион в присъствие на медни(II) йони (ляво) и UV-VIS спектър на комплекс 1

Изолираният меден(II) комплекс на монензин е изследван посредством инфрачервена спектроскопия (IR) в областта $4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$ (Фиг. 5). В спектъра на $\text{MonH}\times\text{H}_2\text{O}$ ивиците, наблюдавани в интервала $3600\text{--}3200\text{ cm}^{-1}$, са отнесени към валентните вибрационни трептения νOH , дължащи се на едновременното присъствие на кристализационна вода (3520 cm^{-1}) и на хидроксилни групи, участващи във водородни връзки (3320 cm^{-1}). В спектъра на **1** валентното трептене, дължащо се на OH-групите, е уширено и се наблюдава при 3440 cm^{-1} . Спектърът на монензин киселина се характеризира с ивица при 1700 cm^{-1} , отнесена към наличието на свободна карбоксилна група в лиганда. Тази ивица не се наблюдава при медния(II) монензинат, като в спектъра на комплекс **1** се появяват две нови ивици, отнесени към валентните асиметрично и симетрично трептения на карбоксилатния анион – при 1550 cm^{-1} ($\nu(\text{CO}_2)_{\text{asym}}$) и 1400 cm^{-1} ($\nu(\text{CO}_2)_{\text{sym}}$), съответно.

Разликата между двете трептения ($\Delta\nu = 150 \text{ cm}^{-1}$) е характерна за монодентатен начин на координиране на карбоксилатния анион към металния(II) център. В областта $1100\text{-}400 \text{ cm}^{-1}$ между спектрите на лиганда и комплекса не се наблюдават съществени различия.

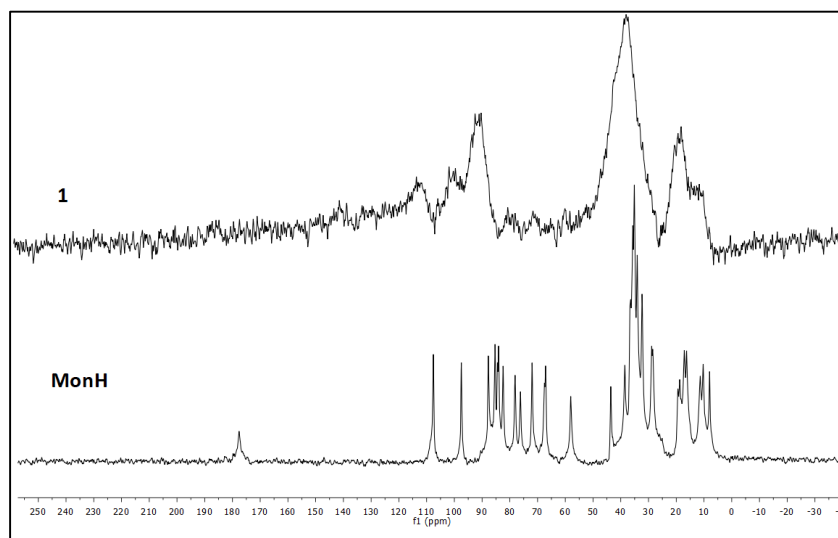


Фиг. 5 IR спектри на монензин киселина и комплекс 1 (таблетки KBr)

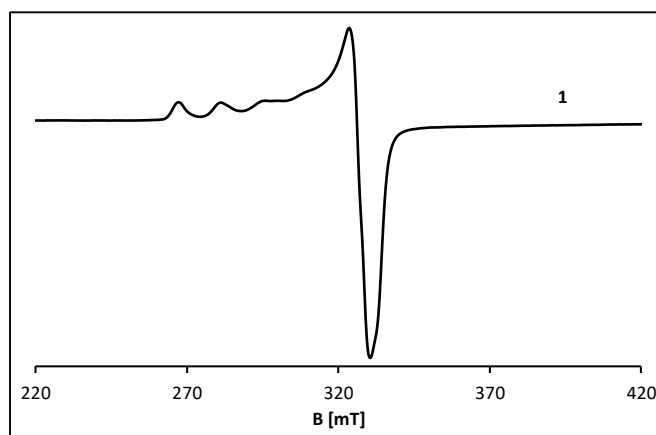
Промените в инфрачервения спектър на медния(II) монензинат, в сравнение със спектралните характеристики на свободната киселина, предполагат образуването на комплексни частици с участието на карбоксилатния анион на лиганда. Данните от NMR са в подкрепа на тази хипотеза (Фиг. 6). Сигналите във въглеродния (^{13}C) NMR спектър на **1** в твърда фаза са значително уширени поради наличието на парамагнитни метални(II) йони. Липсата на сигнал за карбоксилатен анион в спектъра на новоизолираното съединение, в сравнение със спектъра на лиганда ($177,58 \text{ ppm}$), може да бъде обяснено с наличието на близкоразположени медни(II) центрове, участващи в директно взаимодействие с кислородните атоми от депротонираната функционална група.

Аналогични изводи следват и от проведените изследвания с метода на EPR. EPR-спектърът на медния(II) монензинат под формата на прахова проба (Фиг. 7), при 100 K и 295 K, се характеризира със свръхфина структура, дължаща се на взаимодействието на несдвоен електрон на металния йон с ядрения спин на медта – $^{63,65}\text{Cu}$ ($I = 3/2$). Параметрите $g_{\parallel} = 2,34$, $A_{\parallel} = 152 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$ и $g_{\perp} = 2,06$ са типични за моноядрени медни(II) комплексни частици. Съотношението $g_{\parallel} > g_{\perp}$ показва, че свободният електрон от

парамагнитния йон заема $d_{x^2-y^2}$ орбиталата. Освен това, високата стойност на g_{\parallel} и сравнително ниската стойност на константата A_{\parallel} , са характерни за кислород-съдържащи Cu(II) комплексни видове, намиращи се в деформирано тетрагонално обкръжение. Отсъствието на обменни взаимодействия между металните центрове се потвърждава от стойността на параметъра $G = 5,56$. Параметърът на ковалентност ($\alpha^2 = 0,76$) свидетелства, че характерът на връзките между металния (II) йон и донорните атоми, е преобладаващо йонен.

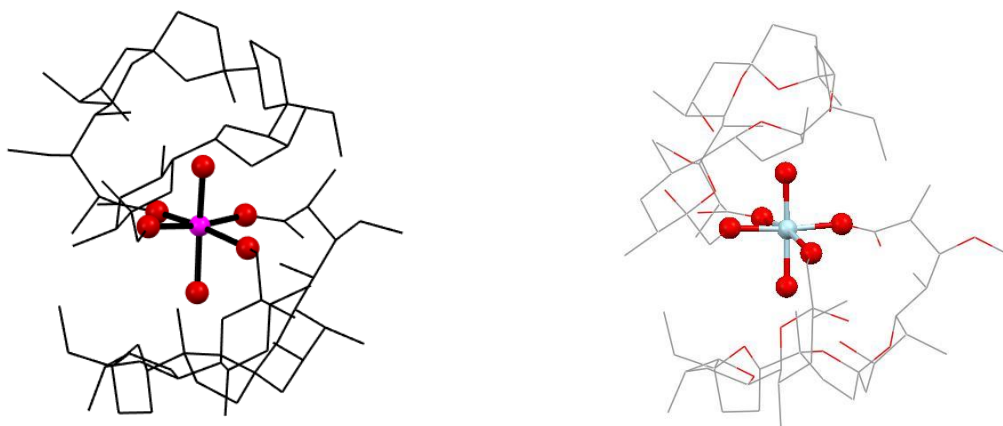


Фиг. 6 ^{13}C CP/MAS-NMR спектри на монензин киселина и комплекс 1



Фиг. 7 EPR спектър на комплекс 1, прахова проба, 100 К

Експерименталните спектрални данни за комплекс **1**, заедно с резултатите от елементния анализ, дават основание да се предположи, че изолираното координационно съединение е със състав $[\text{CuL}_2]$ и образуваните връзки на медния(II) йон са с кислородни донорни атоми. Въз основа на сходството в редица характеристики на **1** и структурно доказаните до момента метални(II) монензинати може да се заключи, че монензинатният анион образува моноядрен комплекс с медния(II) йон, със състав $[\text{Cu}(\text{Mon})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$, където хромофорната група е от вида $[\text{CuO}_6]$ (Фиг. 8).



Фиг. 8 Предполагаема (ляво) и оптимизирана (дясно) структури на комплекс **1**

Поради липсата на рентгено-структурни данни за точната координация на медния(II) йон, беше проведено допълнително изследване посредством теорията на функционала на плътността (DFT). За целта беше оптимизирана структура на медния(II) монензинат, конструирана на базата на вече известните монензинатни метални(II) комплекси, за които съществува кристалографска информация. Поради близките по размер йонни радиуси на металните(II) центрове, като моделни структури бяха подбрани координационните съединения на монензин с двузрядните йони на никела и цинка ($r_{\text{Ni}} = 0,69 \text{ \AA}$, $r_{\text{Cu}} = 0,73 \text{ \AA}$, $r_{\text{Zn}} = 0,74 \text{ \AA}$)

С цел изследване на абсорбционните и магнитните свойства на получената след оптимизацията на геометрията структура, бяха изчислени енергиите на вертикалните преходи и EPR параметрите. Получените след оптимизацията стойности за дължини на връзките с участието на медния център и валентните ъгли в хромофорната единица са представени в Табл. 1.

От получените данни става ясно, че разстоянията Cu-O варират в интервала около дължината на стандартната връзка Cu-O в медния оксид – 1,704 Å. Това може да се обясни с формирането на връзки с йонен (координационен/донорно-акцепторен) характер, което се потвърждава от експериментално получената стойност на параметъра α^2 ($\alpha^2 = 0,76$).

Таблица 1 Дължини на връзки и валентни ъгли в хромофорната единица на **1**

Дължина на връзка, (Å)		Валентен ъгъл, (°)	
Cu-O1	2,0303	O1-Cu-O3	92,61
Cu-O2	1,9606	O1-Cu-O4	83,87
Cu-O3 (H ₂ O)	1,9866	O4-Cu-O2	90,71
Cu-O4 (H ₂ O)	1,9782	O2-Cu-O3	93,12

От изчислените енергии на абсорбционните преходи във видимата област два се отличават със стойност на силата на осцилатора, различна от нула. В тях електрон от орбитали, лежащи значително под НОМО (НОМО-23, НОМО-34, НОМО-35) извършва преход към SOMO орбиталата. Енергиите на съответните преходи са 1,55 eV ($f = 0,001$) и 1,70 eV ($f = 0,0001$), като на последния може да се припише широката асиметрична ивица във видимата област на абсорбционния спектър на **1** с максимум при 1,70 eV (730 nm).

Изчислените стойности на EPR параметрите $g_{\parallel} = 2,320$ и $A_{\parallel} = 118$ G показват добро съответствие с експериментално установените $g_{\parallel} = 2,340$ и $A_{\parallel} = 132$ G. Получените от квантово-химичните изчисления данни са в подкрепа на структурата, предложена въз основа данните за комплекси на монензин с двузарядните катиони на Ni²⁺ и Zn²⁺.

От проведените изследвания, подкрепени с моделни изчисления, може да се направи изводът, че в моноядрения комплекс **1** два монензинатни аниона реагират бидентатно с металния(II) център, заемайки по този начин четири от позициите във вътрешната координационна сфера на медта. Две от позициите в екваториалната равнина на комплекса са заети от депротонирани монодентатно свързани карбоксилни групи на двата монензинатни аниона (връзки COO-Cu), а другите две – от хидроксилните групи, разположени в противоположния край на лиганда, които участват в образуването на две

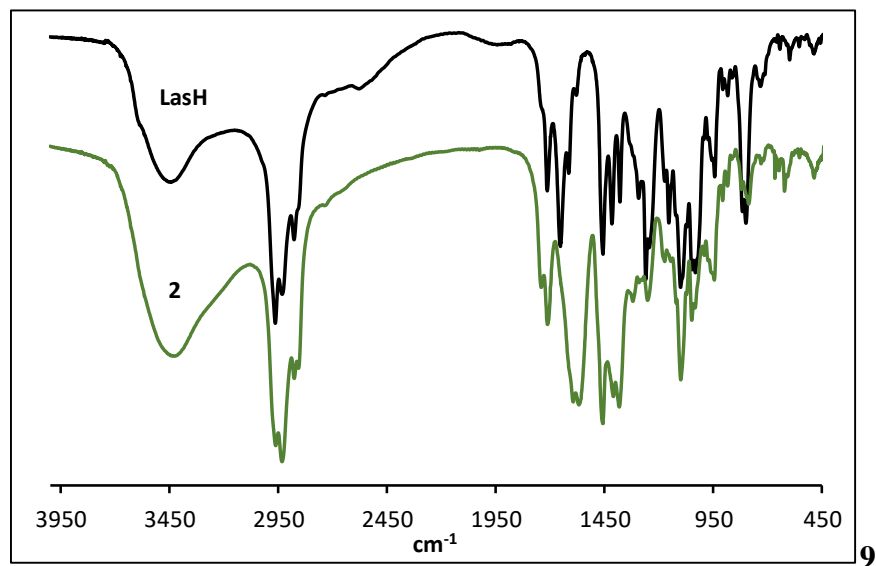
донорни връзки $\text{НО} \rightarrow \text{Cu(II)}$. Нагъването на лиганда – следствие от бидентатния начин на координиране, позволява образуването на псевдоцикъл от типа „глава – опашка“. Двете хидрофилни кухни във всеки от лигандите се заемат от по една аксиално свързана с металния център молекула вода, оформяйки октаедрично обкръжение във вътрешната координационна сфера на парамагнитния йон. Водните молекули участват както в образуването на донорно-акцепторни връзки с медния(II) катион ($\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Cu(II)}$), така и във вътрешномолекулни водородни връзки, които допълнително стабилизират структурата на комплекса.

5.1.2. Меден(II) лазалоцидат, 2

Поради спонтанното утаяване на комплекс **2** при добавяне на медни(II) йони към разтвор, съдържащ лазалоцидатни аниони, не бе възможна оценка на комплексообразователния процес чрез методите на SRCD и UV-VIS. Изолираното съединение **2** бе охарактеризирано чрез IR, NMR и EPR спектроскопия в твърдо състояние, и структурата му бе предположена въз основа на известните до момента комплекси на монензин и лазалоцид с двузрядни метални йони. Тук трябва да се отбележи, че химически чистата форма на лиганда бе любезно предоставена от колеги от Полша, но ограниченото ѝ количество, налично при разработване на настоящата дисертация, не позволи детайлно изследване на свойствата на **2** с разширен набор от спектрални методи.

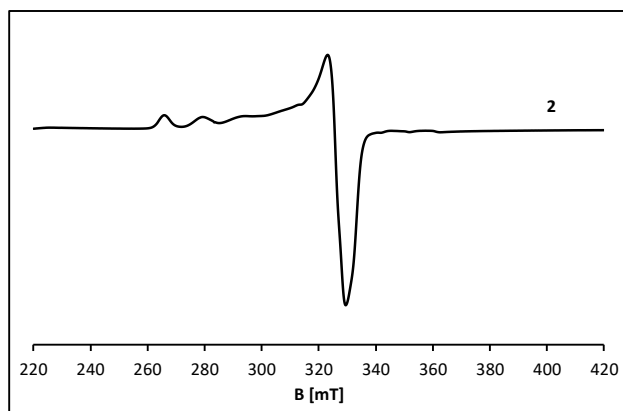
Лазалоцид киселина (LasH) притежава няколко характеристични валентни трептения в IR областта (Фиг. 9), приписани на следните функционални групи: карбонилна ($\nu_{\text{C=O}}$, 1702 cm^{-1}), карбоксилна ($\nu_{\text{C=O}}$, 1655 cm^{-1}), фенилова ($\nu_{\text{C=C}}$, 1615 cm^{-1}) и хидроксилна ($\nu_{\text{C-O}}$, 1245 cm^{-1}). Деформационното трептение за хидроксилната група (δ_{OH}) се наблюдава при 1417 cm^{-1} . Уширената ивица в интервала $3500\text{-}3300 \text{ cm}^{-1}$ (с максимум при 3440 cm^{-1}) свидетелства за наличието на хидроксилни групи в структурата на антибиотика. В спектъра на медния(II) комплекс **2**, подобно на комплекс **1**, ивица за карбоксилната група не се наблюдава, за сметка на появата на две нови, дължащи се на валентни трептения на карбоксилатния анион. Прави впечатление, че положението и формата на ивицата в интервала $3500\text{-}3300 \text{ cm}^{-1}$ остават непроменени, което предполага отсъствието на водни молекули в кухнята на лиганда. Лазалоцид е най-малкият представител на полиетерните йонофори и скъсената полиетерна верига не позволява нейното нагъване в псевдоцикъл от типа „глава-опашка“. Нещо повече, в известните до момента комплекси на този антибиотик,

не се наблюдава образуването на типичната за йонофорите хидрофилна кухина, която да координира метален йон или молекула вода.

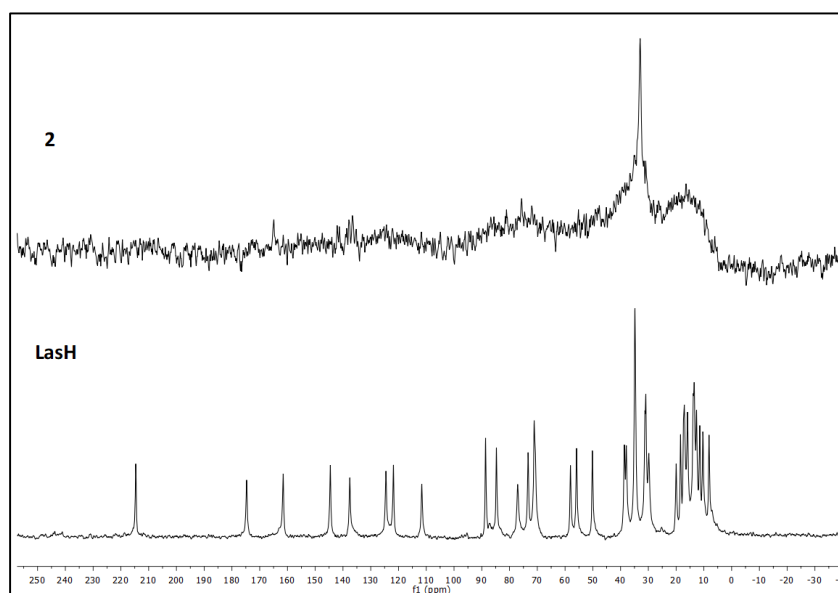


Фиг. 9 IR спектри на лазалоцид киселина и комплекс 2

На база подобните IR свойства на медния(II) лазалоцидат **2** с тези на Sr(II) и Ba(II), е предположено, че комплексът е със състав $[\text{CuLas}_2]$ и образуваният хромофор съдържа кислородни донорни атоми. Тази хипотеза е потвърдена от праховите EPR спектри на **2** в интервала 100-295 K, които, аналогично на комплекс **1**, съдържат анизотропен сигнал с успоредна и перпендикулярна компоненти (Фиг. 10). Параметрите $g_{\parallel} = 2,36$, $A_{\parallel} = 135 \text{ G}$ и $g_{\perp} = 2,06$, съотношението $g_{\parallel} > g_{\perp}$ и наблюдаваната свръхфина структура отново са типични за Cu-O-съдържащи комплексни видове. Проведеното твърдотелно NMR изследване не е информативно относно начина на координиране на лиганда в комплекса поради силното уширение на сигналите в спектъра на комплекса, но потвърждава наличието на парамагнитни центрове в състава на пробата (Фиг. 11).



Фиг. 10 EPR спектър на комплекс 2, прахова проба, 100 К



Фиг. 11 ^{13}C CP-MAS-NMR спектър на комплекс 2

Въз основа на спектралните данни и аналогията с поведението на лазалоцид в присъствие на Sr(II) / Ba(II) йони, предполагаемата структура на комплекс **2** съдържа два моноаниона лиганд, които координират полидентатно с металния(II) център, формирайки вътрешна координационна сфера с деформирано октаедрично обкръжение. Със сигурност лазалоцид взаимодейства чрез монодентатно свързана карбоксилатна група, но кои са останалите кислородни атоми, участващи в донорно-акцепторни връзки, е трудно да се предположи от наличните данни. За разлика от монензин, където е известно, че комплексите с двузрядни катиони са с к.ч. 6 и директна структурна аналогия може да бъде приписана и на медния(II) комплекс **1**, в случая на лазалоцид йоните на Sr(II) образуват структура с к.ч.

7, а тези на Ва(II) – с к.ч. 8. Във връзка с това, всякакви твърдения относно начина на свързване на антибиотика с йоните на Cu(II) биха били спекулативни, ето защо в настоящето изследване не се предлага точна структура за комплекс **2**.

5.2. Комплекси на тилозин и тилмикозин с йони на Cu(II)

В зависимост от реакционните условия, макролидните антибиотици тилозин (Фиг. 2) и тилмикозин (Фиг. 3) реагират с йони на мед(II) до изолирането на четири вида комплекси със състав $[CuL_2]$ – лилави (**3-4**), $[Cu_2L_2(NO_3)_2]$ – сини (**5-6**), $[Cu_2(HL)_2Cl_4]$ – зелени (**7-8**) и жълти (**9-10**), като за последните се предполага полиядрена структура.

Моноядрените комплекси **3-4** се получават във водна среда (рН 11-13) при излишък на лигандите спрямо медния(II) йон ($M:L =$ от 1-10 до 1-2). Диядрените координационни съединения **5-8** се образуват в неводна среда (ацетон) при молно съотношение на реагентите $M:L = 1-2$ и включват в състава си аниони, произлизащи от състава на използваната медна(II) сол – нитрати (**5-6**) или хлориди (**7-8**). Предполагемите полиядрени комплекси се наблюдават отново в неводна среда (ацетон) само в присъствието на меден(II) дихлорид, и то използван в голям излишък спрямо макролидните антибиотици ($M:L \geq 4-1$).

Въпреки многообразието от функционални групи в структурата на изследваните макролиди, наблюдаваните спектрални свойства на изолираните комплексни видове **3-8** и направените квантово-химични изчисления ще покажат, че общият и за двата макролида микаминозилен заместител е основният фрагмент от молекулата на антибиотиците, участващ в комплексообразване с металните(II) центрове.

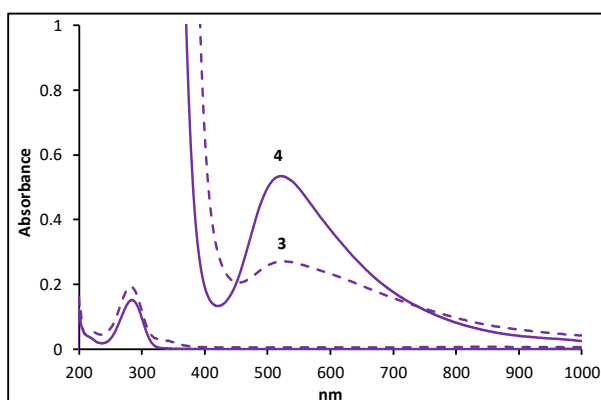
5.2.1. Моноядрени виолетови Cu(II) тилозинат и тилмикозинат, 3-4

Абсорбционните свойства на макролидите и техните комплекси **3-4** в разтвор са изследвани с електронна спектроскопия. В спектрите на тилозин и тилмикозин в етанолови разтвори се наблюдава ивица при 285 nm ($\epsilon_{285} = 18000 - 19000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), приписана на $\pi-\pi^*$ преходи, произхождащи от спрегнатата $O=C-C=C-C=C$ система в 16-членния макролиден пръстен. Тези преходи остават неповлияни от комплексообразователния процес и тяхната позиция не се променя в спектрите на медните(II) комплекси. Това е ясна индикация, че макролидният пръстен не участва в координация с металния(II) йон, което, от своя страна, предполага, че терапевтичната активност, дължаща се на макролидния фрагмент, няма да намалее вследствие на комплексообразване.

Асиметричните и уширени ивици, регистрирани в спектрите на **3-4** във видимата област на спектъра, с максимуми около 520-530 nm, са породени от d-d преходи в металния йон, повлияни от взаимодействието както с азотен, така и с кислороден донорни атоми. Подобни електронни свойства са наблюдавани и при моноядрени медни(II) комплекси, съдържащи два аминокислотни лиганди. Поради тази причина за виолетовите частици **3-4** е предположен състав $[CuL_2]$. Коефициентите на моларна абсорбируемост на металните(II) комплекси във видимата област съответстват на d-d преходи в координираните метални центрове. Наблюдава се двойно повишение на стойностите на ϵ_{max} при 285 nm, което е свързано с $\pi-\pi^*$ преходите в два лиганда според предложени състав $[CuL_2]$. Данните от електронната спектроскопия за двата антибиотика и техните моноядрени комплекси са представени в Табл. 2, а съответните спектри – на Фиг. 12.

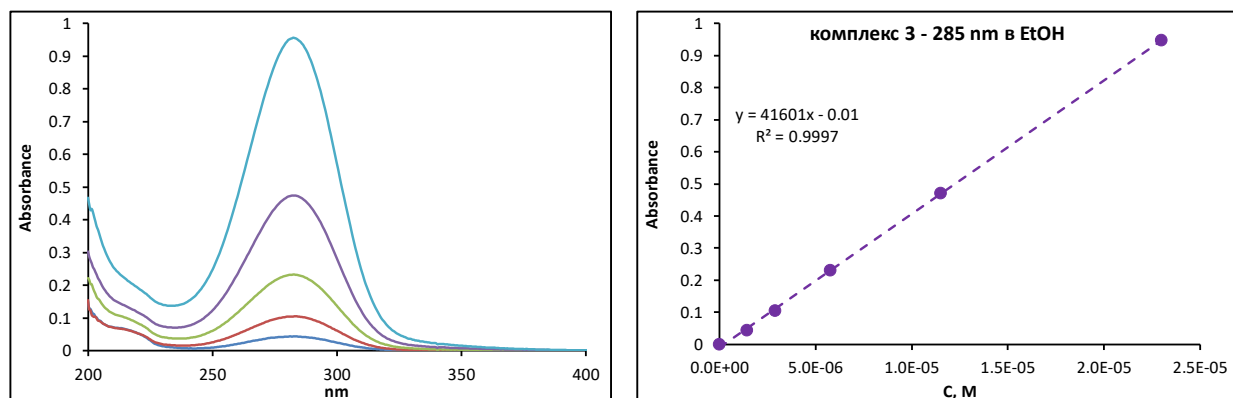
Таблица 2 Електронни свойства на тилозин, тилмикозин и комплекси 3-4 в EtOH

Съединение	Преход	λ_{max} [nm]	ϵ_{max} [$cm^{-1}.mol^{-1}.L$]
Тилозин	$\pi-\pi^*$	285	19460
[CuTyl ₂], 3	$\pi-\pi^*$	285	37720
	d-d	526	62
Тилмикозин	$\pi-\pi^*$	285	18530
[CuTilm ₂], 4	$\pi-\pi^*$	285	37380
	d-d	520	108



Фиг. 12 UV-VIS спектри на комплекси **3** и **4** в етанол при 2.10^{-5} M (UV) и 5.10^{-3} M (VIS)

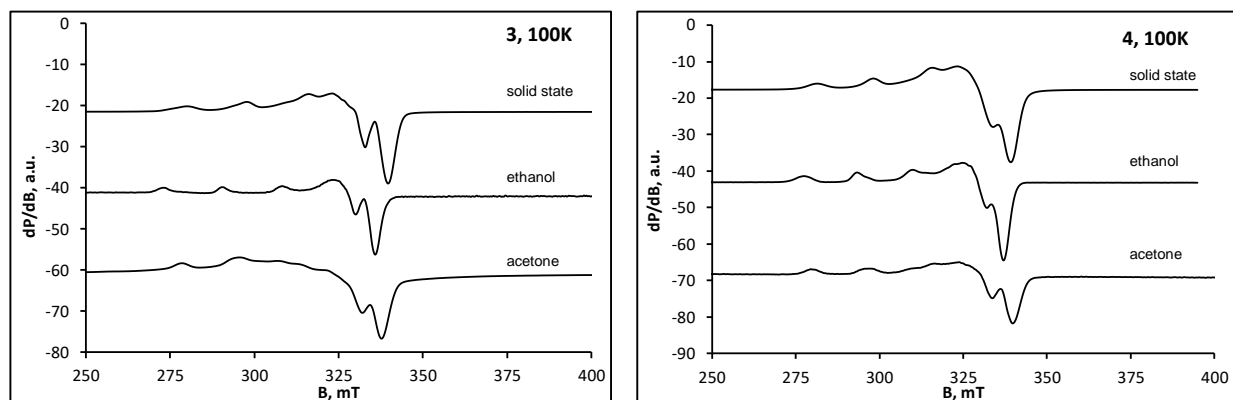
Важно е да се отбележи, че двата новоизолирани медни(II) макролидати **3-4** имат сходно поведение както в етанол, така и в ацетон, и получените параметри са съизмерими, което, от своя страна, показва, че структурата на комплексите се запазва и в двата разтворителя. При определянето на коефициентите на моларна абсорбируемост на двата макролида и на комплексите **3-4** бе приложен методът на стандартната крива. Спектри на калибрационни разтвори и калибрационна крива на комплекс **3** са представени като пример на Фиг. 13.



Фиг. 13 Електронни спектри на калибрационни разтвори на комплекс **3** в етанол (ляво, изходна концентрация $2,35 \cdot 10^{-5} \text{M}$; двойни разреждания) и калибрационна крива (дясно)

EPR анализът на прахови проби от двата новосинтезирани медни макролидати **3-4** е проведен в температурния интервал 100-295 K, а на съответните замразени етанолови и ацетонови разтвори – при 100 K. Всички спектри се състоят от анизотропен сигнал с успоредна и перпендикулярна компоненти (Фиг. 14). Успоредният компонент се характеризира с ясно изразена свръхфина структура, която се дължи на взаимодействието на несдвоения електрон от орбиталата $d_{x^2-y^2}$ с ядрения спин на $^{63,65}\text{Cu}$. Симулираните прахови EPR спектри на комплекси **3-4** показват следните параметри: $g_{\parallel} = 2,202$, $g_{\perp} \approx 2,04$ and $A_{\parallel} \approx 170-180 \text{ G}$. Тези стойности са типични за медни(II) йони, намиращи се в аксиално-деформирано кристално поле. Начинът на свързване на металния(II) център с донорните атоми на лиганда може да се предположи от стойностите на параметрите g_{\parallel} и A_{\parallel} . Екваториалното координиране на медния(II) йон с кислороден атом на лиганда се

характеризира с относително високи стойности на g_{\parallel} и ниски на A_{\parallel} , докато обратната зависимост е индикация за координиране с азотен атом. Експериментално получените данни за тези два параметъра свидетелстват, че, най-вероятно, около медните(II) йони едновременно координират както кислородни, така и азотни атоми. Този смесен тип комплексообразуване е в съответствие и с наблюдаваните електронни преходи в комплексите **3-4**. Определените параметри за замразените ацетонови и етанолови разтвори са аналогични с изчислените за праховите проби (Табл. 3).



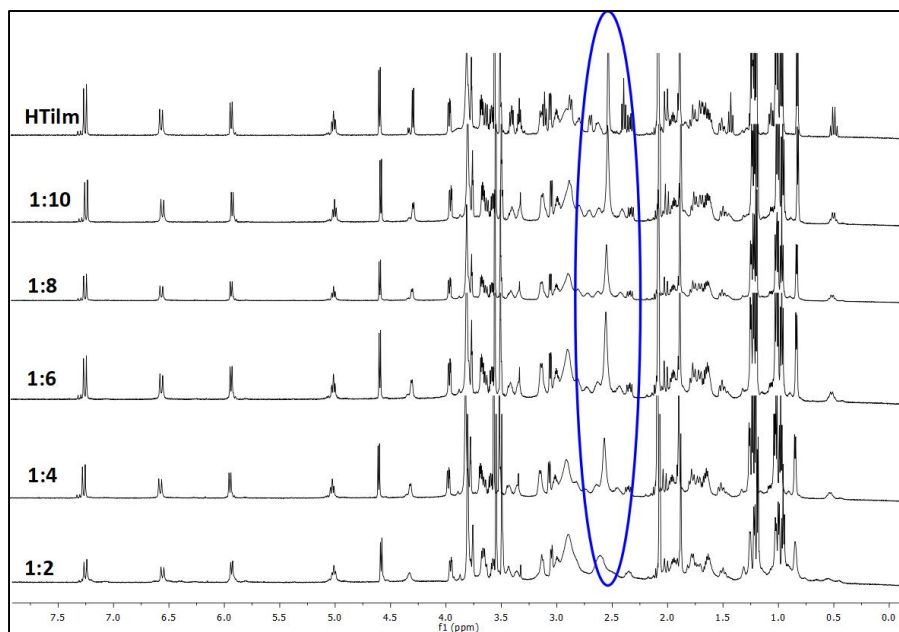
Фиг. 14 EPR спектри на прахови проби (горе), етанолови разтвори (в средата) и ацетонови разтвори (долу) на 3 (ляво) и 4 (дясно)

Таблица 3 EPR параметри на прахови проби от 3-4 при 100 K

Комплекс \ Параметър	[CuTyl ₂], 3			[CuTilm ₂], 4		
	Прах	EtOH	Ацетон	Прах	EtOH	Ацетон
B_{\parallel} [G]	3066	2995	3033	3066	3012	3042
g_{\parallel}	2,202	2,250	2,218	2,202	2,236	2,214
A_{\parallel} [G]	180	175	170	171	158	170
B_{\perp} [G]	3309	3290	3292	3316	3306	3304
g_{\perp}	2,040	2,048	2,044	2,036	2,037	2,038
g_{iso}	2,094	2,115	2,102	2,091	2,103	2,096
α^2	0,72	0,76	0,71	0,70	0,70	0,71
G	5,05	5,21	5,17	5,61	6,38	5,63

Видно от представените в Табл. 3 данни, стойностите на $\alpha^2 > 0,5$ и $G > 4$, както в твърда фаза, така и в разтвор, предполагат, от една страна, преобладаващ йонен характер на образуваните връзките, и от друга – липса на обменно взаимодействие между металните центрове. В подкрепа на последното твърдение се явява и температурната зависимост на интензитета на EPR сигналите, която следва закона на Кюри-Вайс с константи на Вайс -39 К (3) и -29 К (4). Освен това, данните от EPR потвърждават, че новосинтезираните координационни съединения запазват своята структура в етанолови и ацетонови разтвори.

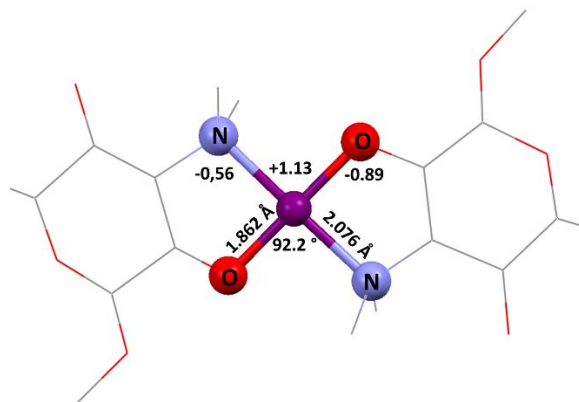
Тилозин съдържа само един захариден заместител – микаминозил, в чиято структура е включен аминокалхолен фрагмент. Структурата на тилмикозин, обаче, се характеризира както с микаминозилов остатък, така и със пиперидинилов заместител, т.е. в този случай се наблюдава наличие на допълнителен N-атом, също способен да участва в координационна връзка. Ролята на двата азотни донорни атома при образуването на комплекс 4 е оценена чрез $^1\text{H-NMR}$ -титруване в ацетон- d_6 . Добавянето на медната(II) сол към разтвор на тилмикозин база (HTilm), в молни съотношения M:L от 1:10 до 1:2, предизвиква отместване на сигнала на N,N-диметиловата група от 2,50 ppm при HTilm до 2,62 ppm в спектъра на 4. Освен това се наблюдава и значително уширяване на ивицата поради близостта на парамагнитния меден(II) катион. В същото време, останалите сигнали в спектъра на комплекса остават непроменени в сравнение с тези на свободния лиганд. Тези наблюдения са в съответствие с данните, получени от електронната спектроскопия и EPR, откъдето може да се направи изводът, че именно микаминозиловият остатък е този, който играе първостепенна роля в комплексообразуването. Промените в $^1\text{H-NMR}$ спектъра на тилмикозин [138] по време на комплексообразуването (*in situ*) с $\text{CuCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ са представени на Фиг. 31. Тук трябва да се отбележи, че IR-спектроскопията не е информативен метод относно настъпващите промени в структурата на лигандите при комплексообразуване, доколкото наблюдаваните вибрационни трептения не търпят промени в спектрите на изходните макролиди и комплекси 3-4.



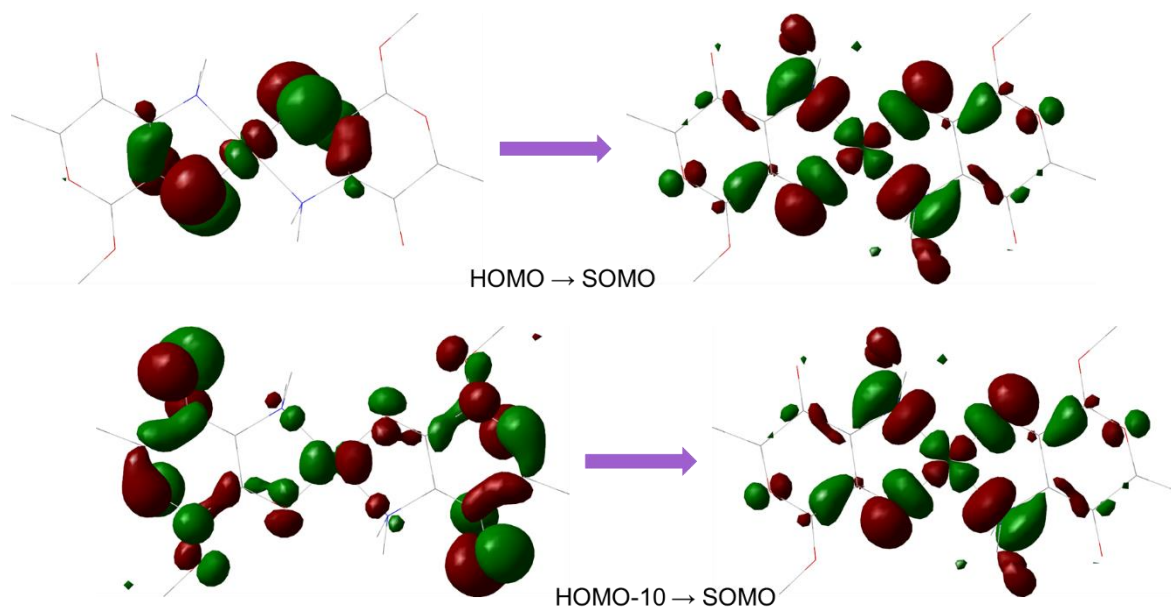
Фиг. 15 $^1\text{H-NMR}$ спектри на тилмикозин при добавянето на медни(II) йони в молни съотношения M:L = 1:10 - 1:2 (ацетон- d_6)

Всички приложени до момента аналитични техники потвърждават, че при конкретните синтетични условия, посочени в т. 4.3.4., между макролидните антибиотици тилозин и тилмикозин и двузрядни йони на медта протича комплексобразователен процес, чрез който са изолирани две нови съединения – комплекси **3** и **4**, съотв. Въз основа на получените резултати от множеството спектроскопски методи е направен изводът, че 16-членният тилактонов цикъл не играе роля в комплексобразуването, и че участъкът от молекулата на лиганда, образуваща връзки с металния център, е микаминозиловият, чрез своите третичен азотен атом и депротонирана хидроксилна група. Освен това, направената литературна справка за лиганди, включващи в структурата си аминоксололен фрагмент, обуславя допускането, че комплекси **3-4** са със състав $[\text{CuL}_2]$. Стехиометрията на комплекса е потвърдена с елементарен анализ, както и с термогравиметричен анализ-мас-спектрометрия (TGA-MS), където не се наблюдава включване на допълнителни молекули вода като лиганди в аксиална позиция. Използването на мас-спектрометрия с йонизация в електроспрей (ESI-MS, положителен режим на работа) не бе информативно относно състава на **3-4** поради факта, че в спектъра не се наблюдава наличието на молекулен йон на комплексите (вероятно поради тяхното разпадане при приложените условия на анализ), и е регистриран само молекулен йон на съответните протонирани форми на антибиотиците.

За да се бъде проверена хипотезата относно предложената структура на новосинтезираните медни(II) макролидати, бе проведено DFT изследване (теория на функционала на плътността), както във вакуум, така и в имплицитен разтворител ацетон. Като лиганд, участващ в образуването на връзки с медния(II) йон, бе използван микаминозиевият участък от молекулите на двата макролида. Оптимизираната геометрия на медния(II)-bis-микаминозат с детайлни данни за координационния център и молекулните орбитали, участващи в съответните преходи, са представени на Фиг. 32-33. Микаминозатните аниони реагират бидентатно: два лиганда са свързани в *trans*-позиция спрямо металния център, образувайки моноядрени координационни частици, съдържащи два 5-членни хелата. Геометрията на вътрешната координационна сфера на металните йони може да се опише като плоско-квадратна. Изчислените NBO (Natural Bond Orbitals) заряди на донорните O- и N- атоми и тези на Cu(II) показват йонен и координационен характер на връзките Cu–O и Cu–N, съотв. Този извод е подкрепен и от съответните дължини на връзките след оптимизиране на структурата на комплекса. Изчислените абсорбционни енергии показват, че основният принос към преходите във видимата област принадлежи на НОМО-10, НОМО и SOMO орбиталите. Прогнозираните електронни преходи се осъществяват при 446 nm (НОМО-10 → SOMO) и 639 nm (НОМО → SOMO), като атомите, които се отличават със значителен дял са тези, които участват в образуването на хромофорната единица [CuN₂O₂]. Разликата в енергиите се приписва на нееквивалентните атомни орбитали, допринасящи за формирането на съответните молекулни орбитали. За разлика от НОМО-10, където участват едновременно O- и N- донорни атоми, НОМО орбиталата се състои само от O-съдържащ фрагмент. Освен това, участието на d-атомните орбитали на Cu(II) йон във образуването на НОМО-10 и НОМО орбиталите, е различно. Всички тези данни са в съответствие с регистрираната уширена асиметрична ивица във видимия спектър на комплексите **3-4**. Експериментално наблюдаваното отместване към по-слабо поле на сигнала на N,N-диметиловата група в ¹H-NMR на комплекс **4** – 2,62 ppm в сравнение със сигнала при H₂O (2,50 ppm) е потвърдено чрез изчислените стойности на отместванията в NMR спектрите за същите функционални групи на микаминозата (2,26 ppm) и нейния меден(II) комплекс (2,50 ppm).



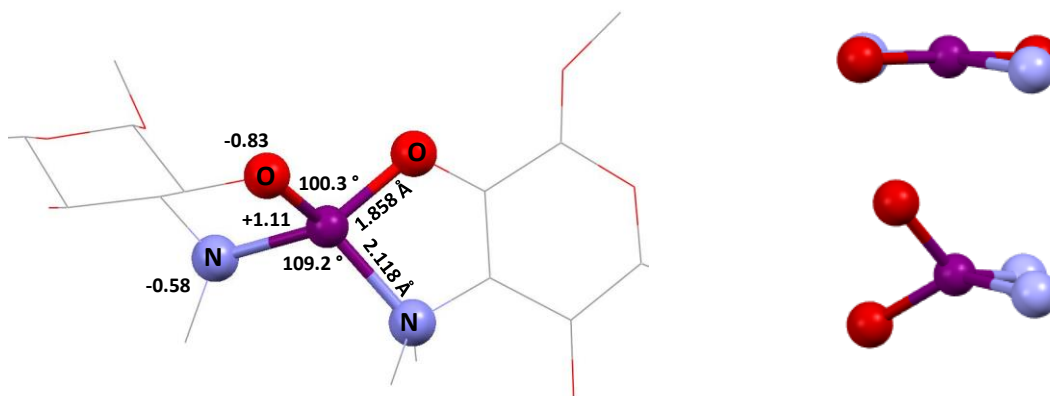
Фиг. 16 Оптимизирана структура на медния(II) микаминозат с детайлни данни за координационния център



Фиг. 17 Молекулни орбитали на медния(II)-*bis*-микаминозат, участващи в електронни преходи: НОМО, НОМО-10 и SOMO

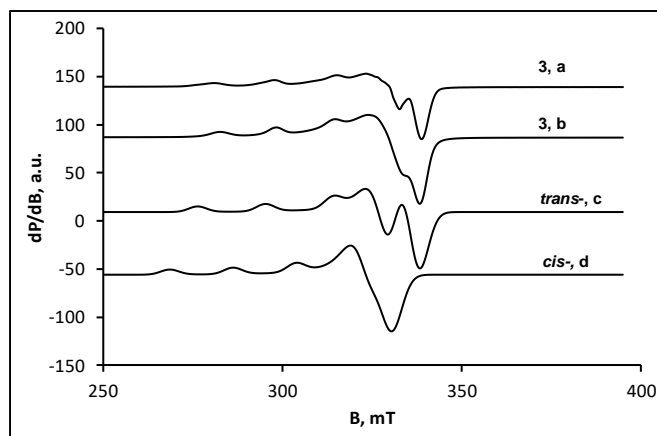
Този моделен комплекс е конструиран на базата на известните *trans*-структури на медни(II)-*bis*-аминоалкохолати/макролидати. От друга страна, *cis*-разположение на микаминозиловите лиганди не може да бъде изключено и поради тази причина съответният *cis*-изомер също бе оптимизиран във вакуум (Фиг. 18). Сравняването на двете структури (*cis-trans*) води до следните заключения:

- Стойността на разликата в свободните енергии на Гибс ($\Delta G_{trans-cis} = -73,8$ kJ/mol) е индикация, че формирането на *trans*-комплекс е по-изгодно в сравнение с образуването на *cis*-формата;
- Двата лиганда в *cis*-изомера са ориентирани почти перпендикулярно поради възникналото стерично пречене от N,N-диметилите групи, докато микаминозилатите в *trans*-позиция са разположени успоредно;
- Координационната геометрия на вътрешната координационна сфера в *cis*-формата търпи тетраедрично изкривяване в сравнение с тази на *trans*-комплекса (плосък квадрат).



Фиг. 18 Оптимизирана геометрия на *cis*-изомера на медния(II)-микаминозат (ляво) и разположение на донорните атоми в *trans*- (дясно, горе) и *cis*- (дясно, долу) формите

Наблюдаваните разлики в двете форми се отразяват най-вече на дължините на връзките Cu–N, които са по-дълги при *cis*-изомера в сравнение с *trans*-ориентирания комплекс, както и на EPR спектрите и параметрите, които при *cis*-формата не съответстват на експериментално наблюдаваните (Фиг. 19).



Фиг. 19 Експериментални EPR спектри на комплекси **3-4** и симулирани EPR спектри на меден(II) микаминозат с *trans*- и *cis*-ориентация на лигандите

Квантово-химичното изчисление на EPR параметрите на двата изомера показва следните две групи стойности: $g_z = 2,217$, $g_y = 2,064$, $g_x = 2,056$, $A_{||} = 189$ G (*trans*-) и $g_z = 2,290$, $g_y = 2,102$, $g_x = 2,085$, $A_{||} = 176$ G (*cis*-). От сравнението между експериментално определените стойности на параметрите g и A (Табл. 3) и изчислените при възможните *cis*- и *trans*-форми може да се заключи, че структурата на *trans*-комплекса е по-достоверна.

Въпреки значителното опростяване на структурата на 16-членните макролидни антибиотици, използвано в моделната система, върху която са извършени квантово-химичните изчисления, получените резултати показват добро съвпадение с експерименталните данни за комплекси **3-4**, наблюдавани както с електронна спектроскопия (UV-VIS), така и с магнитни (EPR/NMR) методи. Предсказаните параметри са в съответствие и със спектроскопските и кристалографските данни за моноядрени медни(II) комплекси на макролидния антибиотик азитромицин и класически аминокиселинни съдържащи лиганди.

5.2.2 Диядрени Cu(II) комплекси на тилозин и тилмикозин, съдържащи нитратни (сини, 5-6) или хлоридни (зелени, 7-8) аниони

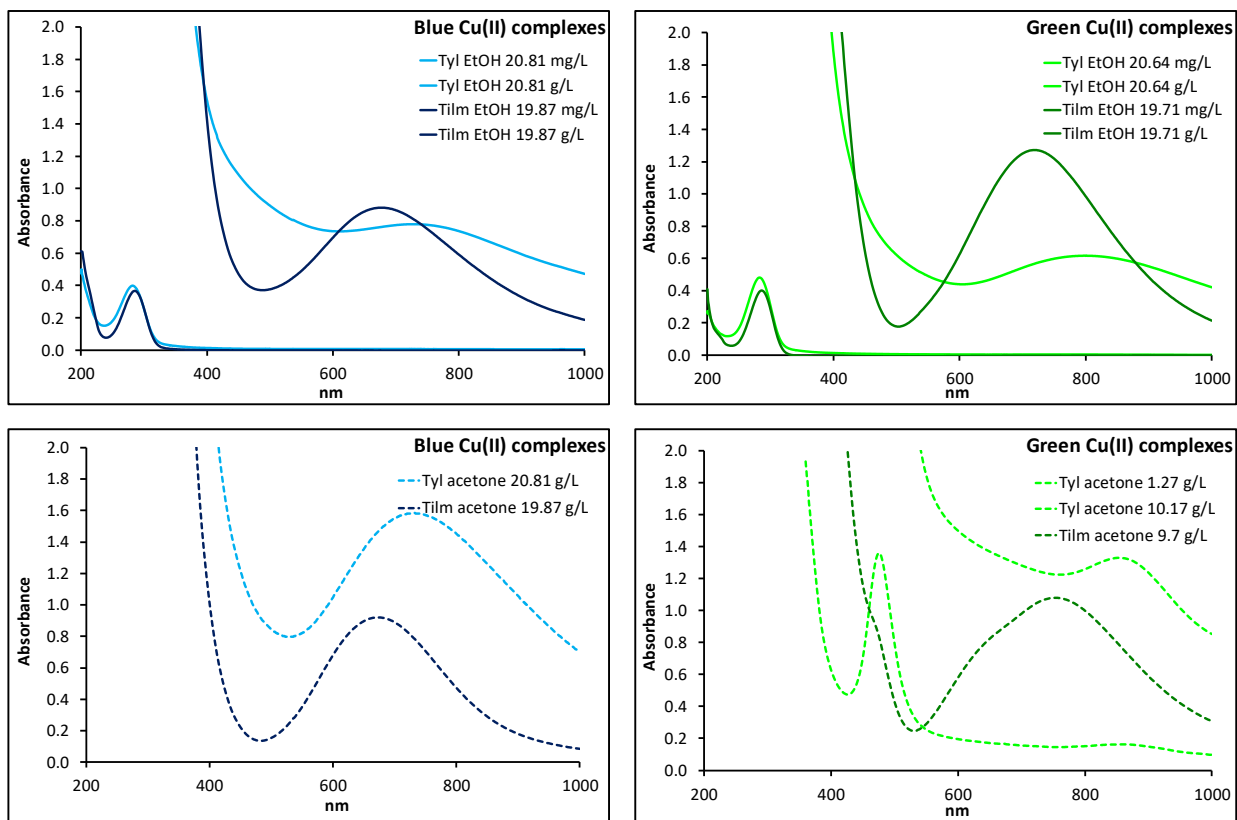
Електронните спектри на изолираните сини (**5-6**) и зелени комплекси (**7-8**) в етанолови разтвори се състоят от интензивни сигнали при 280-285 nm и слабоинтензивна, уширена ивица в интервала 650-850 nm. Както при комплекси **3-4**, така и тук, високоенергетичните абсорбционни ивици са приписани на π - π^* преходите, възникващи в тилактоновия пръстен на двата лиганда. В сравнение с UV-спектрите на некоординираните

антибиотици, позицията на сигнала остава непроменена в спектрите на медните(II) комплекси **5-8**, което предполага, че макролидният пръстен отново не взаимодейства с металните(II) катиони. Нискоенергетичните и почти симетрични ивици в спектрите на **5-6** (650-720 nm) и **7-8** (730-850 nm) са отнесени към d-d преходи в медните(II) центрове, свързани преимуществено с кислородни донорни атоми (**5-6**) или с комбинация от кислородни атоми и хлоридни йони (**7-8**).

Замяната на етанол с ацетон не повлиява значително позицията и формата на d-d ивиците при сините комплекси **5-6**, макар в случая на **5** да се наблюдава хиперхромно отместване. Използването на ацетон при зелените комплекси **7-8** предизвиква следните изменения в електронните спектри:

- Значителни бато- и хипер-хромни отмествания на d-d прехода при комплекс **7** и появата на нов, сравнително интензивен сигнал при 475 nm, както и на рамо при около 700 nm;
- Асиметрична и многокомпонентна ивица при комплекс **8** – с максимум при 755 nm и рамена при 630 nm и 480 nm.

За разлика от случаите, в които е използван етанол, в полярния апротонен разтворител могат да бъдат различени няколко d-d прехода, произхождащи от взаимодействие между металния(II) йон и различните донорни атоми в комплексите, а именно Cu-O (750-850 nm), Cu-N (635-700 nm) and Cu-Cl (преход с пренос на заряд – charge transfer (CT), 475-480 nm). От това е видно, че използването на различаващи се по своите свойства разтворители би могло да допълни данните относно възможните взаимодействия метален йон – донорен атом. Абсорбционните спектри на **5-8** в етанол и ацетон са представени на Фиг. 19. Поради неизвестния състав на съединения **5-8**, са представени техните екстинкционни коефициенти, както и тези на лигандите и използваните медни(II) соли (Табл. 4).



Фиг. 19 Електронни спектри на изолираните сини (5-6, ляво) и зелени (7-8, дясно) медни(II) комплекси в етанол (горе) и ацетон (долу)

Таблица 4 Екстинкционни коефициенти на тилозин, тилмикозин, комплекси 5-8 и изходните медни(II) соли в различни разтворители

Съединение	Разтворител	Преход	λ [nm]	a_{\max} [$L \cdot g^{-1} \cdot cm^{-1}$]
HTyl	EtOH	$\pi-\pi^*$	285	21,24
Син тилозинат, 5	EtOH	$\pi-\pi^*$	285	19,17
	acetone	d-d	735	0,0377
Зелен тилозинат, 6	EtOH	$\pi-\pi^*$	285	20,75
	EtOH	d-d	800	0,0298
	acetone	CT	475	0,9634
acetone	d-d	860	0,1307	

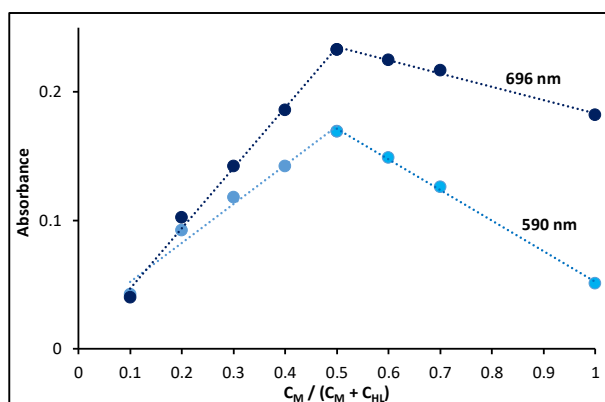
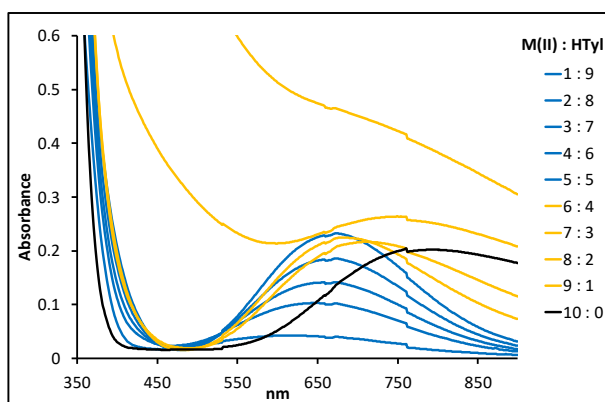
HTilm	EtOH	π - π^*	285	21,32
Син тилмикозинат, 7	EtOH	π - π^*	285	19,14
		d-d	677	0,0969
	acetone	d-d	670	0,0966
Зелен тилмикозинат, 8	EtOH	π - π^*	285	20,29
		d-d	720	0,0645
	acetone	CT	480	0,0739
		d-d	630	0,0800
		755	0,1055	
Cu(NO ₃) ₂ ×3H ₂ O	EtOH	d-d	797	0.1755
	acetone	d-d	770	4,587
CuCl ₂ ×2H ₂ O	EtOH	d-d	870	0,4224
	acetone	CT	475	11,53
		d-d	865	3,560

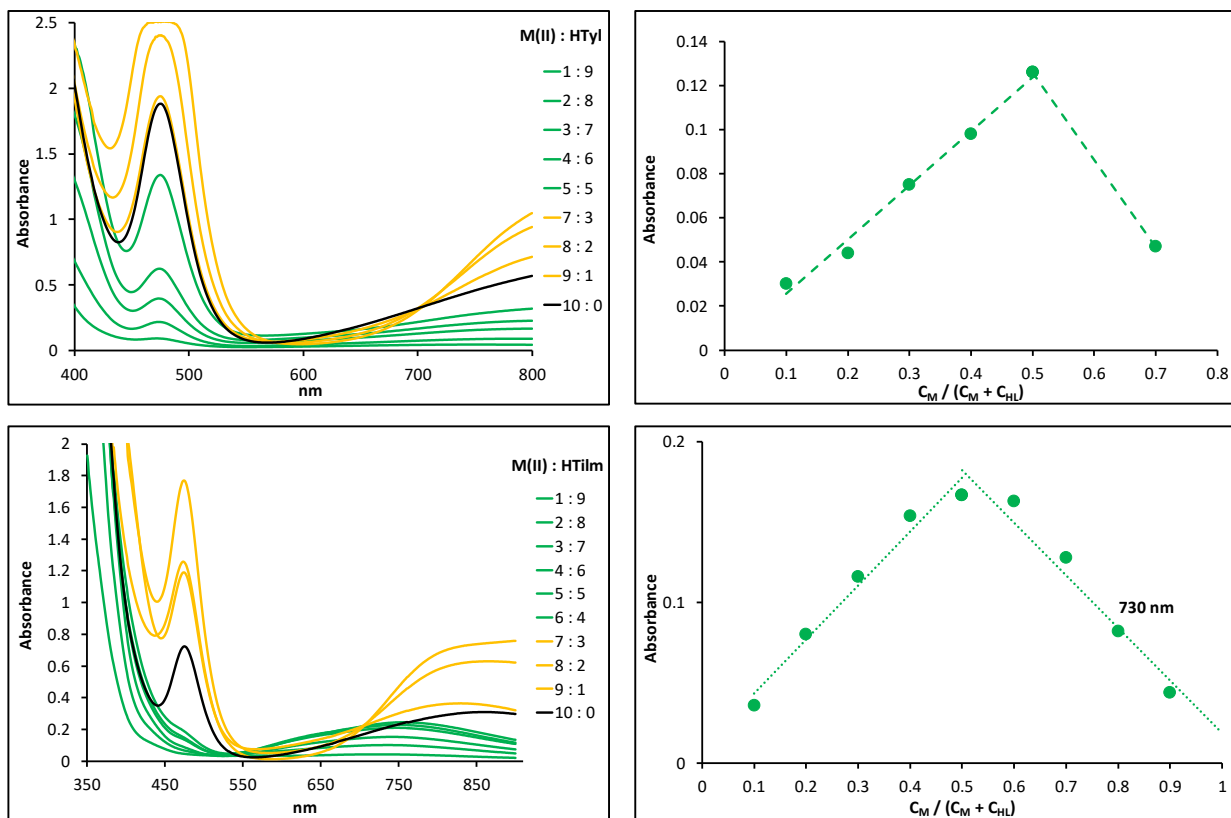
За да се получи допълнителна информация относно състава на новоизолираните комплекси **5-8**, бе използван методът на Жоб. За целта бяха приготвени реакционни смеси в ацетон, съдържащи лиганд – HTyl / HTilm и Cu(NO₃)₂×3H₂O (**5-6**, съотв.) и HTyl / HTilm и CuCl₂×2H₂O (**7-8**, съотв.) в съотношения от 1:9 до 10:0. При всяка от реакционните смеси бяха поддържани постоянни обем и сума от концентрациите на металната сол и лиганда.

Прилагането на метода на Жоб за комплекси **6-8** показва молно съотношение метален йон : лиганд = 1:1 (Фиг. 37). Този подход не може да бъде приложен за съединение **5** поради образуване на допълнителни координационни видове при излишък на металния(II) йон. Въпреки това, различното спектрално поведение на системата при излишък на лиганда, или при излишък на металната(II) сол, позволява да се направи изводът, че и в този случай молното съотношение между лиганда и медния(II) йон е 1:1. Имайки предвид тези резултати, както и данните от елементния анализ, които показват различно молно съотношение метален йон – неорганични йони, за сините комплекси **5-6** е предположен състав на новоизолираните комплекси [Cu₂L₂]²⁺, и за съединения **7-8** – [Cu₂(HL)₂]⁴⁺. Постигането на неутрален заряд е благодарение на допълнителното координиране на нитратни или хлоридни йони, произхождащи от използваните в синтезите медни(II) соли. В

случая на медния(II) тилмикозинат (**8**) са взети под внимание реакционните смеси, получени в молни съотношения M:L от 1:9 до 6:4, тъй като при излишък на металната сол $\text{CuCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ цветът на реакционните смеси се променя до жълт, което свидетелства, че се формират нов вид комплексни частици. При всички експерименти електронните спектри в съотношение метален йон : лиганд = 9:1 са съизмерими с тези на използваните в синтезите медни(II) соли.

Имайки предвид структурните особености на двата макролидни антибиотици и наличието в техния състав на микаминозиллов остатък, може, подобно на комплекси **3-4**, да се предположи, че именно този участък от молекулата на лигандите играе първостепенна роля при комплексообразуването. Поради присъствието на кислороден и азотен донорни атоми, този фрагмент може да се разглежда и като аминокалкохол. Въз основа на определеното чрез метода на Жоб съотношение M:L = 1:1 и експериментално наблюдаваните повлияни d-d преходи в електронните спектри на сините и зелени макролидати, както и резултатите от елементния анализ, може да се допусне, че новосинтезираните съединения са в състав $[\text{Cu}_2\text{L}_2(\text{NO}_3)_2]$ (**5-6**) и $[\text{Cu}_2(\text{HL})_2\text{Cl}_4]$ (**7-8**). Това предположение е изведено на база вече известни и структурно-охарактеризирани метални(II) комплекси с аминокалкохолатни лиганди. Възможността в хлорид-съдържащите макролидати (**7-8**) лигандите да не търпят депротониране е подкрепена от проведения елементен анализ.

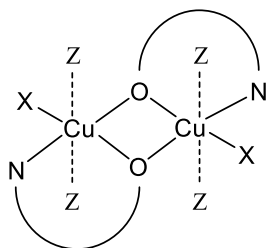




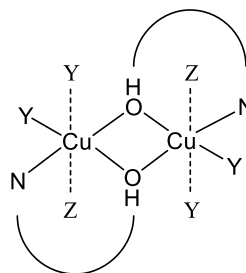
Фиг. 20 Метод на Жоб: абсорбционни спектри (ляво) и молно съотношение метален йон-лиганд (дясно) за комплекси **5** (горе), **7** (среда) и **8** (долу)

На база така предложения състав, комплекси **5-8** биха могли да се състоят от два тетракоординирани метални центрове, разположени сравнително близо един до друг, всеки от които е свързан бидентатно с (H)O,N-съдържащ аминокалкохол / аминокалкохолатен фрагмент, който, от своя страна, играе ролята на мостов лиганд чрез кислородния си донорен атом. Четвъртото място във вътрешната координационна сфера се заема от анион, произхождащ от използваната при синтеза метална(II) сол – нитратен (**5-6**) или хлориден (**7-8**). Петата и шестата позиция могат да бъдат заети от молекули разтворител (**5-6**) или комбинация от разтворител и анион (**7-8**). Освен това, евентуална геометрична изомерия не може да бъде изключена, като в този случай двата неорганични аниона свързват мостово металните центрове, докато макролидните лиганди остават терминално (крайно) свързани. Двата типа възможна геометрична изомерия на комплекси **5-8** са представени схематично на Фиг. 21.

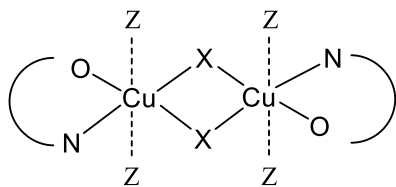
Мостов антибиотик при 5-6



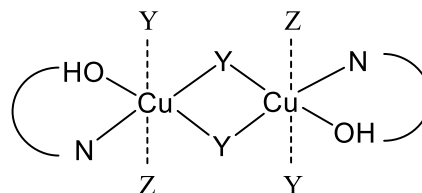
Мостов антибиотик при 7-8



Мостов неорганичен анион при 5-6



Мостов неорганичен анион при 7-8

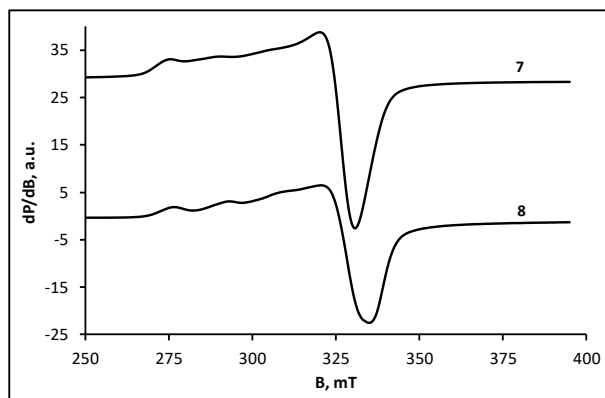
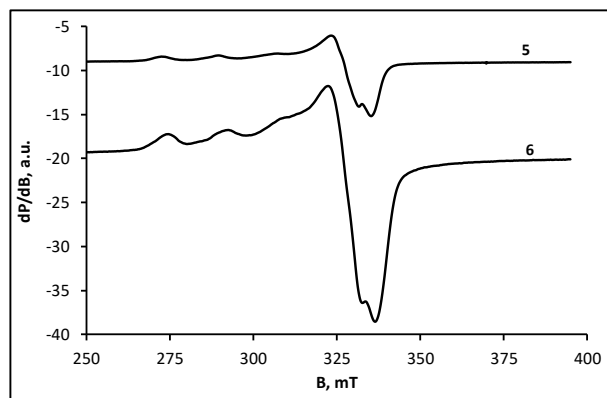


Фиг. 21 Възможни начини на координиране на макролидите и неорганичните аниони в сините 5-6 ($X = \text{NO}_3^-$, ляво) и зелените комплекси ($Y = \text{Cl}^-$, дясно);
Z – молекула разтворител

EPR спектрите на прахови проби от комплекси 5-8 показват присъствие на парамагнитни частици, характеризиращи се с анизотропен сигнал, с успоредна и перпендикулярна компоненти. Спектрите са с ясно изразена свръхфина структура в паралелно магнитно поле ($\approx 3000 \text{ G}$), която се дължи на взаимодействие между несдвоенния електрон на Cu(II) йон, заемащ $d_{x^2-y^2}$ орбиталата, с ядрения спин на медта ($^{63,65}\text{Cu}$) ($g_{\parallel} > g_{\perp}$). Регистрираните EPR параметри (Табл. 5) са характерни за медни йони, разположени в аксиално-деформирано кристално поле (Фиг. 22). Изчислените, както в твърдо състояние, така и в разтвор, стойности на параметрите $\alpha^2 > 0,5$ и $G > 4$ за комплекси 5-8 свидетелстват за йонен характер на връзката и липса на обменно взаимодействие между металните центрове.

Таблица 5 EPR параметри на комплекси 5-8 в твърдо състояние, замразени етанолови и ацетонови разтвори

Параметър Комплекс	Състояние	B_{\perp} [G]	g_{\perp}	A_{\perp} [G]	B_{\parallel} [G]	g_{\parallel}	g_{iso}	a^2	G	Cu:L
5	Прах	2961	2,27	170	3263	2,07	2,14	0,77	4,64	1:13
	EtOH	2872	2,34	140	3256	2,06	2,16	0,77	5,47	
	Ацетон	2824	2,38	137	3233	2,08	2,18	0,81	4,92	
6	Прах	3001	2,25	175	3279	2,06	2,13	0,76	4,35	1:65
	EtOH	3012	2,24	155	3290	2,05	2,11	0,69	5,21	
	Ацетон	2979	2,26	170	3280	2,05	2,12	0,76	5,02	
7	Прах	2987	2,26	146	3252	2,08	2,15	0,71	3,50	1:14
	EtOH		2,35 2,42	128 110		2,08 2,08	2,17 2,20			
	Ацетон	2879	2,34	140	3257	2,06	2,13	0,76	5,39	
8	Прах	2999	2,25	164	3301	2,05	2,11	0,73	5,82	1:22
	EtOH	2991	2,25	164	3294	2,05	2,11	0,73	5,85	
	Ацетон	2990	2,25	164	3293	2,05	2,11	0,73	5,85	
$Cu(NO_3)_2 \times 3H_2O$	EtOH		2,38 2,42	130 110		2,08 2,08	2,18 2,20			
	Ацетон		2,38	135		2,08	2,18			
$CuCl_2 \times 2H_2O$	EtOH		2,36 2,42	126 110		2,08 2,08	2,17 2,20			
	Ацетон		2,33	140		2,07	2,16			

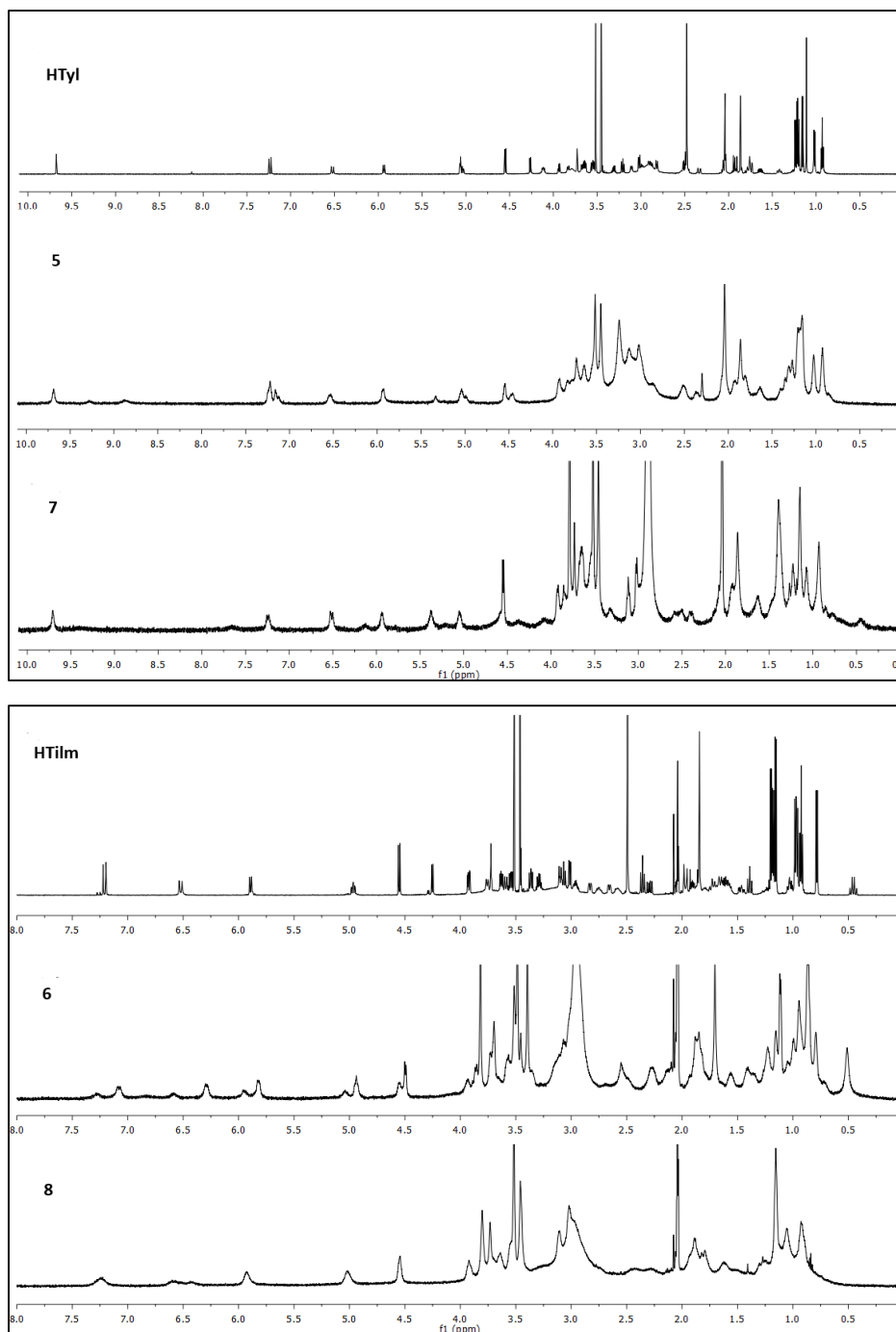


Фиг. 22 EPR спектри в твърда фаза на комплекси 5-6 (ляво) и 7-8 (дясно)

Важно е да се отбележи, че мостово свързани диядрени метални(II) комплекси биха довели до потискане на EPR сигнала поради близостта между парамагнитните центрове (~ 3Å). При такива частици се осъществява електронен обмен и те обикновено са неактивни в EPR (т.нар. „EPR-silent“). Въпреки това, наличието на EPR сигнал, макар и слабоинтензивен, може да се обясни с наличието на примес от сътаени моноядрени (мономерни) частици, произхождащи от дисоциация на диядрените комплекси. Вероятно при тези частици свързването между медния(II) йон, макролида и съответните неорганични аниони се запазва, но тъй като този процес не може да бъде контролиран, количеството моночастици не се възпроизвежда при различните синтези.

¹H-NMR сигналите на комплекси **5-8** са уширени и отместени, което се дължи на присъствието на парамагнитни медни(II) йони. Въпреки това, сигналите в областта от 2,30 до 3,10 ppm са повлияни в много по-голяма степен в сравнение с останалите (Фиг. 23), като именно в този диапазон са отнесени групите, принадлежащи на микаминозиевия участък в състава на молекулите на двата лиганда – 3'CH (2,39 ppm), 7'CH₃ / 8'CH₃ (2,52 ppm) и 4'CH (3,05 ppm). Тези спектрални промени съответстват на предположението, че медните(II) йони са разположени в близост до N,O-съдържащия фрагмент, докато пиперидиновият участък в молекулата на тилмикозин не играе роля в комплексообразуването.

Подобно на случая при моноядрените комплекси **3-4**, твърдетелните ¹³C-NMR спектри на **5-8** се състоят от твърде уширени сигнали, от които не може да бъде извлечена информация относно начина на координиране на тилозин и тилмикозин с металния(II) център. Аналогично, от IR-спектрите на комплексите също не може да се направи заключение относно начина на координиране на антибиотиците. В допълнение, TGA-MS анализът на **5-8** изключва наличието на допълнително координирани молекули разтворител, а в ESI-MS спектрите на комплексите отново се наблюдават само сигнали, отнесени към протонираните антибиотици.

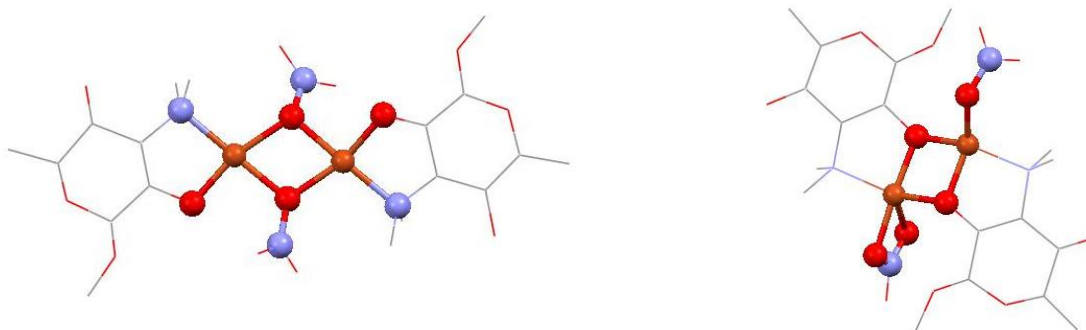


Фиг. 23 ^1H -NMR спектри на комплекси на тилозин **5**, **7** (горе) и тилмикозин **6**, **8** (долу)

За да се получи допълнителна информация относно структурата на ново-синтезираните медни(II) комплекси **5-8**, бе проведено DFT изследване във вакуум. Както при комплекси **3-4**, така и в този случай, за целите на квантово-химичните изчисления, като моделен лиганд бе използван N- и O-съдържащият микаминозилов участък на макролидите,

през който се предполага, че се осъществява комплексообразуването. Бяха оптимизирани редица диядрени структури, в които бе варирана ролята на микаминозите и неорганичните йони като мостови и терминални лиганди. За всяка структура бяха изчислени EPR-параметрите, и сравнени с експериментално наблюдаваните.

При първата предполагаема структура за сините нитратни комплекси **5-6**, два съседни медни(II) катиона са свързани мостово чрез два нитратни аниона, участващи като монодентатни лиганди. Двете депротонирани микаминози играят ролята на терминални лиганди, разположени в *trans*-позиция спрямо металните(II) центрове, участвайки във формирането на комплекса бидентатно, посредством своите третичен N-атом и депротонирана хидроксилна група (Фиг. 24, ляво). При втората възможна структура, два кислородни донорни атома от микаминозиловия йон свързват мостово двата медни(II) катиона. В този случай нитратните йони са разположени терминално в *trans*-позиция. Впечатление при този тип структура прави, че единият нитратен анион е свързан монодентатно с металния(II) център, докато другият – бидентатно, участвайки във връзка с медния център с два от кислородните си донорни атоми. Четвъртото място във вътрешната координационна сфера на всеки от металните(II) центрове се заема от азотен атом от захаридния участък (Фиг. 24, дясно). Дължините на връзките и валентните ъгли на оптимизираните структури са представени в Табл. 6.



Фиг. 24 Оптимизирани структури на **5-6** при свързване чрез мостови нитрати (ляво) и мостови микаминозати (дясно)

Таблица 6 Дължина на връзки и валентни ъгли на оптимизираните комплекси **5-6**

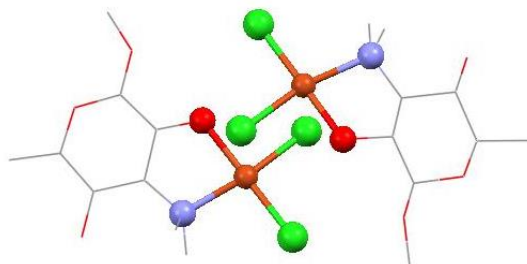
Комплекси 5-6 с нитратен мост							
Дължина на връзка, (Å)				Валентен ъгъл, (°)			
Cu1-N1	2,04	Cu2-N2	2,05	N1-Cu1-O1	89,2	N2-Cu2-O2	88,3

Cu1-O1	1,87	Cu2-O2	1,87	O ^I -Cu1-O ^{II}	72,9	O ^I -Cu2-O ^{II}	73,6
Cu1-O (NO ₃) ^I	2,00	Cu2-O (NO ₃) ^I	1,97	Cu1-N ^I - O ^I (NO ₃) ^I	120,2	Cu2-N ^I - O ^I (NO ₃) ^I	129,7
Cu1-O (NO ₃) ^{II}	2,00	Cu2-O (NO ₃) ^{II}	2,00	Cu1-N ^{II} - O ^{II} (NO ₃) ^{II}	127,8	Cu2-N ^{II} - O ^{II} (NO ₃) ^{II}	114,9
Комплекси 5-6 с микаминозатен мост							
Дължина на връзка, (Å)				Валентен ъгъл, (°)			
Cu1-N1	2,04	Cu2-N2	2,05	N1-Cu1-O1	87,6	N2-Cu2-O2	87,0
Cu1-O1	1,90	Cu2-O2	1,92	O1-Cu1-O2	81,0	O2-Cu2-O1	80,6
Cu1-O2	1,96	Cu2-O1	1,96	N1-Cu1-O(NO ₃) ^{II}	108,5	N2-Cu2-O(NO ₃) ^I	96,6
Cu1-O (NO ₃) ^I	1,91	Cu2-O (NO ₃) ^{II}	1,96	Cu1-O1-Cu2	99,4	Cu1-O2-Cu2	98,9

От получените стойности за свободната енергия на Гибс за структурите на двата комплекса **5-6** може еднозначно да се определи участието на нитратните аниони под формата на мостови лиганди като единствена заселена структура при дадените условия, с разлика от $-494,68$ kcal/mol спрямо тази с мостови микаминозинати. Това може да се обясни с наличието на значително стерично пречене при втората структура, тъй като, както анионите, така и *N,N*-диметиламино-групата се характеризират със сравнително големи размери. В полза на това твърдение може да се отбележи и фактът, че моделните комплекси използват силно опростен фрагмент от макролидните антибиотици, и стеричният фактор еднозначно би могъл да се определи като водещ при образуването на комплекси с мостов нитратен анион. Дължината на връзката Cu-Cu при този тип координиране е $3,19$ Å, което допуска осъществяването на обменно взаимодействие и обяснява липсата на EPR сигнал.

При оптимизиране на геометриите на двете възможни структури за зелените хлоридни комплекси **7-8** бе взето предвид, че микаминозата остава недисоциирана, и в състава на съединенията са включени четири хлоридни аниона. При оптимизацията на структурата с мостови захарни молекули не бе достигнат минимум в повърхнината на потенциалната енергия, и въз основа на това, бе направено заключението, че подобна геометрия не би била стабилна в твърда фаза, при апроксимация на структурата в газова фаза (вакуум) с тази в твърда. Така, единствената възможна диядрена структура е конструирана от два хлоридни йона, служещи като мостови лиганди между металните центрове. Останалите два хлорида участват като терминални лиганди. Недисоциираните микаминози са също терминално разположени (в *trans*-положение) и взаимодействат бидентатно с йоните на медта чрез N- и OH-донорните си атоми. Изчисленото разстояние

между двата медни центъра от 3,64 Å е значително по-голямо от това в диядрените сини комплекси **5-6**, но въпреки това може да се допусне осъществяване на обменни взаимодействия между несдвоените електрони на медните йони и, следователно - отсъствие на EPR сигнал. Така предложената структура е представена на Фиг. 25, а дължините на връзките и валентните ъгли на комплекси **7-8** са обобщени в Табл. 7.



Фиг. 25 Оптимизирана структура на комплекси **7-8** с терминални микаминози

Таблица 7 Дължина на връзки и валентни ъгли на оптимизираните комплекси **7-8**

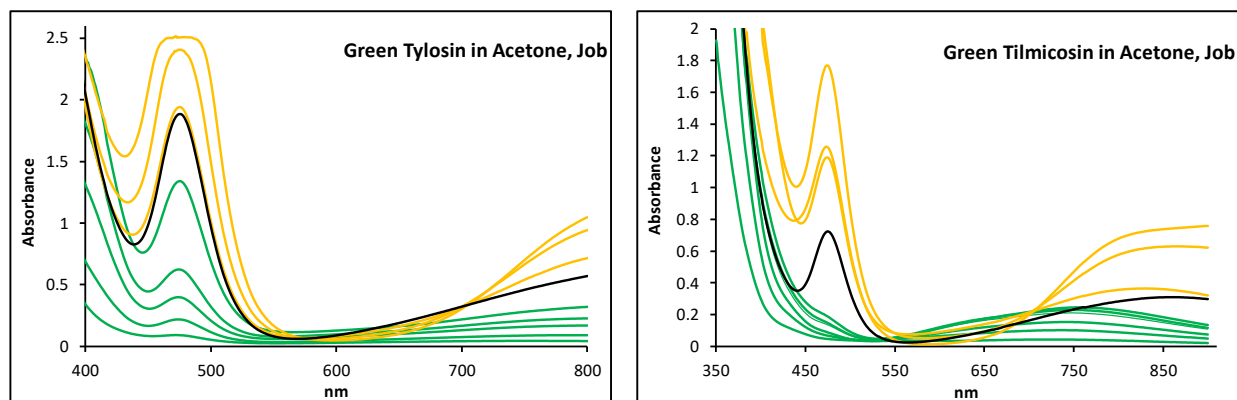
Дължина на връзка, (Å)				Валентен ъгъл, (°)			
Cu1-N1	2,09	Cu2-N2	2,12	N1-Cu1-Cl1	96,1	N2-Cu2-Cl2	99,3
Cu1-O1	2,05	Cu2-O2	1,99	N1-Cu1-Cl2	163,3	N2-Cu2-Cl3	165,3
Cu1-Cl1	2,27	Cu2-Cl3	2,24	N1-Cu1-O1	83,0	N2-Cu2-O2	81,1
Cu1-Cl2	2,28	Cu1-Cl4	2,30	O1-Cu1-Cl2	87,3	O2-Cu2-Cl4	84,9

5.2.3 Полиядрени Cu(II) комплекси на тилозин и тилмикозин, **9-10**

При изследване на способността на макролидите да взаимодействат с йони на мед(II) при различни реакционни условия, бе установено, че излишъкът на метални йони спрямо лиганда (в неводна среда, ацетон) води до образуването на нов, четвърти вид, жълти комплексни частици (**9-10**). Този тип съединения се наблюдава само при използване на меден дихлорид като източник на Cu(II). Към момента комплекси **9-10** са охарактеризирани с редица спектрални методи и в настоящия дисертационен труд са представени техните основни свойства, но на база получените данни все още не могат да бъдат предложени точни състав и структура.

Първата индикация за образуването на **9-10** бе наблюдавана при използване на метода на Жоб за определяне на състава на зелените макролидни комплекси **7-8** (Фиг. 26).

Регистрираната дълговълнова абсорбция (над 850 nm) в ацетонови разтвори, съчетана с интензивен сигнал при 480 nm, предполагат образуването на нов комплексен вид, чийто спектър е различен от този на коментираните досега комплекси **3-8** и изходната метална сол. Ивицата при 480 nm вероятно се дължи на преход с пренос на заряд от хлоридните аниони към металния йон, а тази над 800 nm – на d-d преходи, повлияни от слабото кристално поле, обусловено преимуществено от хлоридни донорни йони.



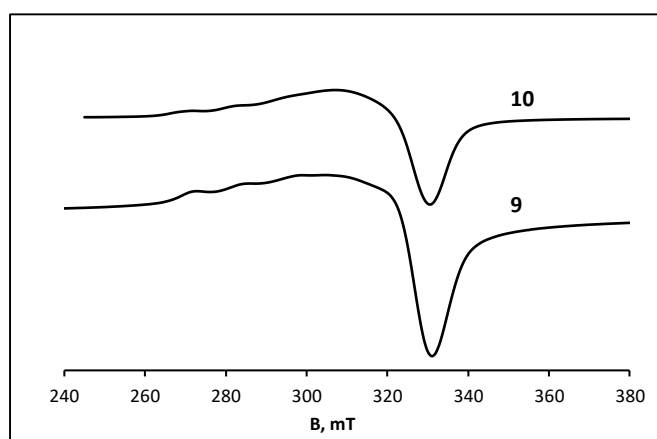
Фиг. 26 Електронни спектри на наблюдаваните по метода на Жоб комплекси **9-10** в ацетон (зелени спектри – недостиг на Cu(II) ; жълти спектри – излишък на Cu(II) , черен спектър – меден(II) дихлорид)

Участието на хлоридни йони в състава на комплексите е потвърдено директно чрез елементарен анализ, и индиректно – чрез EPR изследване на прахови проби от **9-10**. В първия случай експериментът показва значително съдържание на медни(II) йони и хлориди спрямо органичния състав на пробата (Cu , 6-7%; Cl – 13-15%), откъдето се налага предположението, че комплексите вероятно представляват полиядрени структури, в които серия метални центрове са свързани чрез мостови хлориди, и броят координирани макролиди е по-малък за сметка на неорганичния анион. Във втория – наблюдаваните EPR параметри – висока стойност на g_{\parallel} , съпроводена със сравнително ниска стойност на A_{\parallel} (Табл. 8), както и отместване на спектъра към слабо магнитно поле (Фиг. 27) предполагат, че основният принос във формирането на двете съединения се дължи на O- и Cl-донорни атоми. Аналогично на комплекси **3-8**, и тук наблюдаваният анизотропен сигнал е със слаб интензитет. Вероятно неговата регистрация отново може да се обясни с примес на мономерни (изолирани) парамагнитни частици, които, обаче, се намират в специфично

кристално поле, произхождащо от начина на координиране на макролидите и хлоридите в оригиналните (полиядрени) комплекси.

Таблица 8 EPR параметри на комплекси 9-10, прахови проби при 100 K

Параметър Комплекс	g_{\parallel}	A_{\parallel}	g_{\perp}	g_{iso}
9 (Tyl)	2,320	130 G	2,075	2,156
10 (Tilm)	2,335	130 G	2,068	2,157



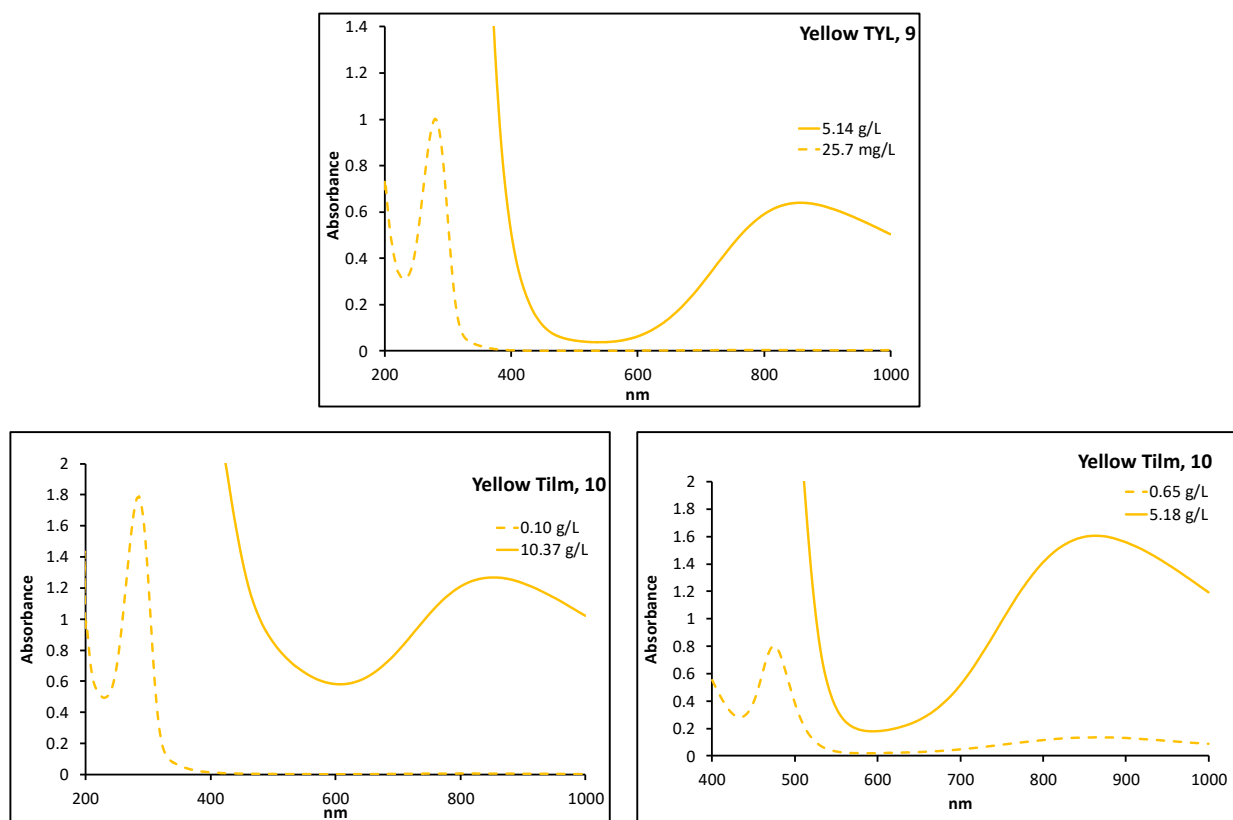
Фиг. 27 EPR спектри на комплекси 9-10, прахова проба, 100 K

Въпреки неизвестния състав и стехиометрия на комплекси **9-10**, бяха проведени редица експерименти с метода на електронна спектроскопия в етанолови и ацетонови разтвори (Табл. 9, Фиг. 28), където бе установено следното:

- Електронните спектри на изолираните жълти комплекси в етанолови разтвори се състоят от интензивни сигнали при 285 nm и слабоинтензивна, уширена ивица в интервала 800-900 nm. Високоенергетичните абсорбционни ивици са свързани с π - π^* преходи, възникващи в тилактоновия пръстен на лигандите. В сравнение с UV-спектрите на некоординираните антибиотици, в спектрите на медните(II) комплекси **9-10** позицията на сигнала остава непроменена, което предполага, че отново макролидният пръстен не взаимодейства с металните(II) катиони, подобно на наблюдаваното при комплекси **3-8**. Екстинкционният коефициент на тези преходи, обаче, е по-нисък в сравнение с регистрирания при

некоординираните лиганди, като възможната причина за този факт подлежи на допълнителни изследвания.

- Нискоенергетичните ивици в спектрите на **9-10** в етанол са отнесени към d-d преходи в медните(II) центрове, свързани преимуществено с комбинация от кислородни атоми и хлоридни йони.
- При използване на ацетон, ивицата на **10** при 860 nm запазва своята форма. В този случай, обаче, се появява нов, относително интензивен сигнал при 480 nm, който би могъл да се дължи на преход с пренос на заряд (СТ), произхождащ от взаимодействие между металния катион и хлоридни аниони.



Фиг. 28 Електронни спектри на 9-10

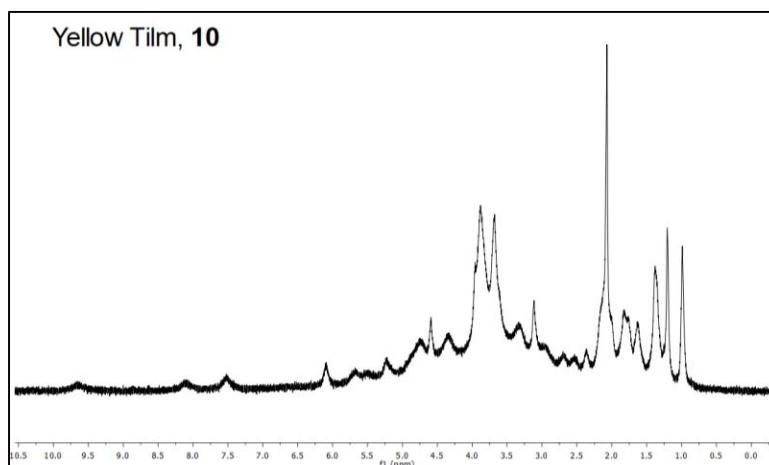
(9, EtOH, горе; 10 – долу; EtOH (ляво), ацетон (дясно))

Таблица 9 Електронни преходи в комплекси 9-10 в различни разтворители

Съединение	Разтворител	Преход	λ [nm]	a_{\max} [$L \cdot g^{-1} \cdot cm^{-1}$]
HTyl	EtOH	π - π^*	285	21,24

Жълт тилозинат, 9	EtOH	π - π^*	285	14,95
		d-d	862	0,1441
HTilm	EtOH	π - π^*	285	21,32
Жълт тилмикозинат, 10	EtOH	π - π^*	285	17,26
		d-d	853	0,1221
	acetone	d-d	865	0,3100
CT		480	1,747	

За разлика от съединения **3-8**, където бе възможно получаването на достоверна информация относно ролята на микаминозния фрагмент в комплексообразувателния процес, при жълтите комплекси **9-10** NMR-спектроскопията не е особено информативна. Причина за това е вероятният принос на голям брой парамагнитни центрове, отразяващ се на протонните сигнали на лигандите, които са силно уширени, а някои от тях – и значително отместени към слабо поле. Пример за ефекта на Cu(II) в комплекса на тилмикозин (**10**) е представен на Фиг. 29.



Фиг. 29 $^1\text{H-NMR}$ спектър на **10** в ацетон- d_6

Изследванията по структурното охарактеризиране на комплекси **9-10** продължава, като е планирано и въвеждането на опростени моделни системи (от типа на нискомолекулни аминокалкохоли), чрез които да бъдат оценени съставът и начинът на координиране на биологичноактивния компонент и неорганичните йони.

5.3 Антибактериална активност на медни(II) комплекси 3-8

В настоящия дисертационен труд са коментирани свойствата на десет нови медни(II) комплекси, за три от които е предположена достоверна структура (моноядрени комплекси на монензин (1), тилозин (3), тилмикозин (4)), за четири е изказана хипотеза (диядрени комплекси на макролидите, 5-8), и за останалите три все още не наличен еднозначен извод относно състав и координация (моноядрен комплекс на лазалоцид (2) и жълти комплекси на макролидите (9-10)). До момента са проведени тестове за антибактериална активност на съединения 1 и 3-8, като за моноядрения комплекс на монензин (1) няма достатъчно натрупани статистически данни, и той е изключен от настоящата дискусия. На практика, обект на изследване в този раздел са моно- и диядрените комплекси на макролидните антибиотици тилозин и тилмикозин.

Способността на тестваните съединения да проявяват активност срещу бактериални щамове е оценена по метода „дифузия в двоен слой агар“, като е определена тяхната минимална инхибираща концентрация (mol/L или g/L), в която те потискат видимия растеж на дадения микроорганизъм. Като тестови култури са избрани следните три Грам-положителни аеробни бактерии:

- *B. Subtilis* – пръчковиден, непатогенен щам, представител на род бацили;
- *B. Cereus* - пръчковиден, патогенен щам, представител на род бацили;
- *K. Rhizophila* – сферичен, непатогенен щам, представител на род коки.

Прицелните щамове съществуват в достъпна на кислород среда и оптимално се развиват при 30 °C. Единствено *B. Cereus* би могъл да предизвика леко неразположение (при неправилно боравене с бактериалния щам по време на експеримента), изразяващо се в стомашно-чревен дискомфорт и диария, които отшумяват в рамките на 6-8 часа. Останалите две бактерии са непатогенни и не предизвикват ефект у хората.

За целите на експеримента химически чистите форми на макролидите бяха използвани като стандарт, спрямо който бе оценен ефектът на техните метални модификации с йони на мед(II). Тук трябва да се отбележат следните особености при тълкуване на експерименталните резултати (Фиг. 30):

- Случай А – т. нар. „дифузна зона“, или просветляване (инхибиращ ефект на тестваното съединение, който с времето е потиснат от развитието на бактерията) –

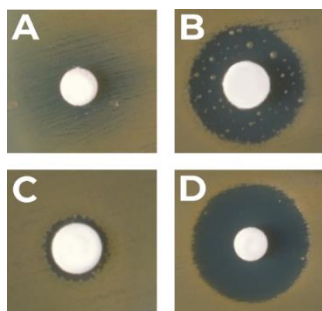
резултатът вероятно се дължи на повторно прорастване на микроорганизма, превъзмогнал активността на терапевтика. Оценка на активността при дадената концентрация на анализа – отрицателна.

- Случай В – ясно разграничена инхибирана зона, но с прораствания на единични колонии. В този пример активността на терапевтика е спорна (при конкретен вид бактерия и налага допълнителни изследвания) или част от колонии са се възстановили (аналогично на случай А). Оценка на активността при дадената концентрация на анализа – отрицателна.

- Случай С – много близък до термина „минимална инхибираща концентрация“ – т.е. относително ясно очертана зона, в която няма видимо прорастване на тестваната бактериална култура, но на външния диаметър се забелязва начало на растеж. Оценка на активността при дадената концентрация на анализа – положителна, но изискваща потвърдителен анализ.

- Случай D – ясна, чиста зона (без каквито и да е прораствания), която определено се дължи на ефекта на тествания препарат (вещество, субстанция). Оценка на активността при дадената концентрация на анализа – положителна.

Зоната, по която се определя минималната инхибираща концентрация (МИС) за дадено съединение, е необходимо да бъде чиста, ясно изразена и с минимален диаметър спрямо размера на ямката (6 mm), третирана с дадения разтворител (контрола).



**Фиг. 30 Ефекти на биологично активно вещество
върху развитието на микроорганизми в слой от агар**

Антибактериалната активност на макролидните антибиотици и техните мед(II)-съдържащи модификации **3-8** е представена в таблица 10. Ефективността на тилозин и тилмикозин е оценена в две концентрационни единици (mol/L, g/L), тази на съединения **3-4**

– в mol/L, и на модификации **5-8** – в g/L. Всички експерименти с лигандите и комплекси **3-6, 8-9** са извършени поне в три повторения с по три накапвания, за **7** са необходими допълнителни изследвания.

Таблица 10 MIC на HTyl, HTilm и комплекси 3-8

Съединение	Бактерия	<i>B. Subtilis</i>	<i>B. Cereus</i>	<i>K. Rhizophila</i>
	MIC, mmol/L			
HTyl		1,10 – 2,20	0,55 – 1,10	0,55 – 1,10
Виолетов тилозинат, 3		1,10 – 2,10	1,10 – 2,10	0,53 – 1,10
HTilm		2,30 – 9,20	1,20 – 2,30	0,29
Виолетов тилмикозинат, 4		0,56 – 1,11	0,28 – 0,56	0,16
		MIC, mg/L		
HTyl		1 – 2	0,5 – 1	0,5 – 1
Син тилозинат, 5		2 – 4	1 – 4	0,5 – 2
Зелен тилозинат, 7		< 2*	1*	0,5*
HTilm		2-8	1-2	0,25
Син тилмикозинат, 6		1 – 4	0,5 – 2	0,5 – 2
Зелен тилмикозинат, 8		2 – 4	2	0,5

* извършен еднократен експеримент

Тестовите показаха, че срещу използваните бактериални щамове тилозин е активен в относително тесни граници с MIC от 0,5 до 2 μM , докато тилмикозин проявява относително по-слаб ефект (MIC – 0,3-9 μM). Медните(II) соли не потискат развитието на Грам-положителните микроорганизми в концентрации под $3,10^3 \mu\text{M}$. Комплекс **3** запазва активността на тилозин, със стойности на MIC, близки до тези на некоординирания лиганд. Причина за това вероятно е адитивният ефект, дължащ се на включването на два мола лиганд в структурата на един мол от **3**. От друга страна, моноядреният комплекс **4** може да се третира като обещаващ терапевтик, който проявява от 2 до 8 пъти по-висока инхибираща ефективност в сравнение с тилмикозин. Въпреки предположението, че комплекси **3-4** са изоструктурни, комбинацията от медни(II) йони и тилмикозин предизвиква синергичен

отговор срещу тестваните бактерии и може да бъде използван за потенциране на антимикробната активност на изходния антибиотик.

Предполагаемите диядрени сини (5-6) и зелени (7-8) комплекси на двата макролида също проявяват ефективност срещу тестваните Грам-положителни микроорганизми. По-широкият концентрационен интервал, в който съединения 5-8 са активни, може да се обясни със съдържанието на примеси от моноядрени частици, чието количество, както беше вече упоменато, не може да бъде контролирано. Като цяло, 5-8 запазват активността на изходните съединения, но дали я потенцират, е предмет на дискусия след окончателното уточняване на състава на комплексите и натрупването на статистически достоверна информация относно тяхната активност.

6. ИЗВОДИ

Въз основа на получените резултати, могат да се направят следните изводи:

1. Полиетерните йонофорни антибиотици монензин и лазалоцид взаимодействат с йони на мед(II) до образуването на моноядрени комплекси със състав $[\text{Cu}(\text{Mon})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$, **1**, и $[\text{CuLas}_2]$, **2**. Реакциите протичат в неводна среда в присъствието на слаба основа, която осигурява депротониране на лигандите. Два полиетерни йонофорни аниона взаимодействат с един меден център, като монензин действа бидентатно, а лазалоцид – полидентатно. И в двата случая карбоксилатната група на антибиотиците участва в състава на вътрешната координационна сфера на комплексите. За разлика от лазалоцид, най-малкият представител на йонофорите, структурата на монензин се нагъва в псевдоцикъл от типа „глава-опашка“, където във формираната хидрофилна кухня се разполага молекула вода, която образува координационна връзка с медния(II) йон.

2. Макролидните антибиотици тилозин и тилмикозин притежават способността да реагират с йони на медта до получаването на серия от комплекси с разнообразен състав и структура, които зависят от реакционните условия (молно съотношение метален йон-лиганд, анион на използваната медна(II) сол и разтворител). Микаминозният фрагмент от структурата на макролидите е основният център, който участва в комплексообразувателния процес.

2.1. Моноядрените комплекси $[\text{CuTyl}_2]$, **3**, и $[\text{CuTilm}_2]$, **4**, се образуват във водна среда (pH 11-13) при излишък на лиганда спрямо медните(II) йони. Макролидите координират през третичен азотен атом и депротонирана хидроксилна група от захарния остатък, като са разположение в *trans*-положение спрямо йоните на Cu(II).

2.2. Диядрените комплекси се получават в неводна среда при съизмерими съотношения на металната сол и съответния лиганд. Медният нитрат образува съединения **5-6** със състав $[\text{Cu}_2\text{L}_2(\text{NO}_3)_2]$ (L = Tyl, **5**; Tilm, **6**), докато хлоридът – съединения **7-8** със състав $[\text{Cu}_2(\text{HL})_2\text{Cl}_4]$ (HL = HTyl, **7**; HTilm, **8**). И при двата типа координационни съединения е установено, че макролидите играят ролята на терминални лиганди, а металните центрове(II) са свързани посредством нитратен (**5-6**) или хлориден (**7-8**) мост. Подобни съединения са EPR-неактивни, но наблюдаваните сигнали за изолирани парамагнитни

центрове са обяснени с наличието на примесни мономерни частици, резултат от неконтролируема дисоциация на съединения **5-8**.

2.3. Излишъкът на меден дихлорид в неводна среда предизвиква образуването на комплекси **9** (тилозин) и **10** (тилмикозин). Тези съединения вероятно са с полиядрена структура, съдържаща серия от медни(II) центрове, свързани с хлоридни йони като мостови лиганди, за сметка на намаления брой координирани макролиди.

3. Тестовете за антимикробна активност на комплекси **3-8** показаха, че съединение **4** се отличава със завишена биологична активност спрямо изходния медикамент тилмикозин срещу Грам-положителните микроорганизми *B. Subtilis*, *B. Cereus* и *K. Rhizophila*. Този комплекс притежава потенциал да бъде приложен като заместител на конвенционалната терапия във ветеринарната медицина, както и като алтернатива в борбата с антибиотичната резистентност.

7. ПРИНОСИ

В хода на изработване на настоящия дисертационен труд, за първи път:

1. са синтезирани, изолирани и охарактеризирани серия от медни(II) комплекси на антибиотици с приложение във ветеринарната медицина, а именно – полиетерни йонофори (монензин и лазалоцид) и 16-членни макролиди (тилозин и тилмикозин). Координационните съединения (общо десет) са анализирани чрез набор от физико-химични методи.

2. е проведено задълбочено проучване върху способността на макролидите да образуват четири типа координационни съединения с йони на мед(II) в зависимост от реакционните условия. Установено е, че разнообразието от структури се дължи на комплекс от фактори, никой от които не може да бъде изключен – по-точно – комбинация от молно съотношение на реагентите, вид на медната сол и избор на разтворител.

3. е приложена теорията на функционала на плътността (DFT) за моделиране и оптимизиране на структурите, съдържащи монензин (моноядрен комплекс) и тилозин/тилмикозин (моно- и диядрени комплекси). Резултатите от квантово-химичните изчисления са в много добро съответствие с експериментално наблюдаваните данни, което потвърждава факта, че комбинацията от подобен смесен подход е с изключителен принос при определянето на структурите на съединения, за които не са налични данни от кристалографски анализ.

Фундаментален характер на изследванията: натрупани са нови знания относно способността на биологичноактивни съединения, съдържащи O- или N, O-донорни атоми да образуват комплексни съединения с йони на мед(II).

Приложен характер на изследванията: едно от охарактеризираниите нови координационни съединения (моноядрен Cu(II) комплекс на тилмикозин) притежава антибактериален потенциал, по-добър от този на некоординирания медикамент, и изследванията относно неговата ефективност биха могли да се разширят и срещу други бактериални щамове.

8. ПУБЛИКАЦИИ и НАУЧНИ СЪОБЩЕНИЯ

8.1. Публикации по темата на дисертационния труд

8.1.1. Pantcheva, I., **Stamboliyska, R.**, Dorkov, P. Spectral properties of copper(II) bis-monensinate. *Compt Rend Acad Bulg Sci* (2022) *accepted* (2021 IF 0.41; **Q2**)

8.1.2. Pantcheva, I. N., **Stamboliyska, R. D.**, Petkov, N. N., Tadjer, A. V., Simova, S. D., Stoyanova, R. K., Kukeva, R. R., Dorkov, P. D. Mononuclear copper(II) complexes of the macrolide antibiotics tylosin and tilmicosin. *Trans Metal Chem* (2022) 47, 67-76. <https://doi.org/10.1007/s11243-022-00491-x> (2020 IF 1.588; **Q3**)

8.1.3. Pantcheva, I. N., **Stamboliyska, R. D.**, Petkov, N. N., Tadjer, A. V., Simova, S. D., Stoyanova, R. K., Kukeva, R. R., Dorkov, P. D. Dinuclear vs. mononuclear copper(II) coordination species of tylosin and tilmicosin in non-aqueous solutions (2022) *under preparation*

8.2. Научни съобщения по темата на дисертационния труд

8.2.1. **Stamboliyska, R.**, Pantcheva, I., Stoykova, S., Stoyanova, R., Kukeva, R., Simova, S. Mononuclear copper(II) complex of macrolide antibiotic Tilmicosin, 13th International Symposium On Pharmaceutical Sciences (ISOPS-13), June 22-25, 2021, Ankara, Turkey (poster)

8.2.2. **Stamboliyska, R.**, Pantcheva, I., Stoykova, S., Stoyanova, R., Kukeva, R., Simova, S. Dinuclear copper(II) complexes of macrolide antibiotic Tilmicosin, 13th International Symposium On Pharmaceutical Sciences (ISOPS-13), June 22-25, 2021, Ankara, Turkey (poster)

8.2.3. **Stamboliyska, R.**, Petkov, N., Pantcheva, I. Complexation of macrolide antibiotics with copper(II) ions. EXTREME “Colloid and interface research & innovations” Workshop, 18-21 July 2021, Sts. Constantine and Helena, Bulgaria (oral presentation)

8.2.4. Pantcheva, I., **Stamboliyska, R.** Copper(II) complex of the polyether ionophorous antibiotic Monensic acid A. Virtual Conference on Chemistry and its Applications (VCCA-2021 “Chemical Sciences for New Decade”), August 9-13, 2021, Mauritius (poster)