

СПРАВКА ЗА НАУЧНИТЕ ПРИНОСИ

на

доцент д-р Павлета Стоянова Шестакова

за участие в конкурс за академичната длъжност „професор“
професионално направление 4.2 Химически науки, научна специалност „Органична химия“ за
нуждите на Център по ЯМР спектроскопия, Институт по органична химия с Център по фитохимия,
БАН, обявен в Държавен Вестник бр. 79 от 07.10.2016 г.

След придобиване на академичната длъжност „доцент“ научната ми тематика и научните ми интереси са насочени към въвеждането в научните изследвания в България на съвременни ЯМР методи, които са непознати или слабо познати в научната практика в страната. Това са дифузионната ЯМР спектроскопия и ЯМР спектроскопията с въртене при магически ъгъл, за изследване на структурно и морфологично сложни системи, като колоидни разтвори на полимери и повърхностно-активни вещества (ПАВ), полимерни хидрогелове, нано-структурирани агрегати и функционализирани хибридни материали.

Научните приноси на изследванията, обект на научната ми работа имат фундаментален и приложен характер и допринасят за изясняване на факторите, които имат значение при дизайна на нови материали и за по-задълбочено разбиране на връзката между структурата и активността на изследваните вещества. Научната ми работа допринася за разширяване на научната тематика на ЯМР Центъра към ИОХЦФ, за повишаване на компетентностите и утвърждаването му като съвремен национален център за изследвания на нови материали, чрез популяризиране на възможностите и по-ефективното усвояване на съществуващата уникална за страната и региона научна апаратура. Сътрудничествата ми с колеги от страната и чужбина, допринасят за повишаване на видимостта и престижа на ЯМР Центъра в национален и в международен аспект.

Научните ми приноси могат да бъдат обобщени в следните тематични области:

I. Дифузионна ЯМР спектроскопия за изследване на процеси на молекулно агрегиране, взаимодействия и структура на многокомпонентни сложни системи в течна фаза.

II. ЯМР спектроскопията с въртене при магически ъгъл за изследване на полимери, полимерни хидрогелове, мезопорести силикати и зеолити.

III. Изследване на кинетика и термодинамика на молекулни взаимодействия и молекулна динамика чрез ЯМР спектроскопия в разтвор.

IV. Конформационен анализ и изследване на структурата на синтетични и природни продукти с потенциална биологична активност.

I. Дифузионна ЯМР спектроскопия

¹**Публикации 1, 2, 5, 6, 14, 19, 20, 21, 22, 23, 25, 26, 29, 31, 33, 34, 38, 43.**

През последното десетилетие дифузионната ЯМР спектроскопия (Diffusion Ordered NMR Spectroscopy - DOSY) успешно се наложи като мощно средство за анализ на сложни смеси, използвайки разликите в трансляционните дифузионни коефициенти, респ. размерите на отделните компоненти за тяхното спектроскопско разделяне. Едновременно с това методът позволява структурно охарактеризирането на индивидуалните компоненти на базата на специфичните химични отмествания на техните структурни фрагменти. Въпреки широкото използване на метода в литературата, неговото приложение в научната практика в България остава не много популярно. Изследванията в рамките на тази научна тематика допринасят за въвеждането, утвърждаването и популяризирането на възможностите на дифузионната ЯМР спектроскопия в България за охарактеризиране на наноструктурирани материали.

Изследванията по това направление са проведени в сътрудничество с колеги от Института по полимери, БАН и в рамките на сътрудничеството ми с проф. Рудолф Вилем от Свободен университет, Брюксел и проф. Татяна Парак-Вохт от Католически университет, Льовен, Белгия.

¹Статиите, публикувани след придобиване на академичната длъжност „доцент“ са подчертани.

1.1. Изследване на полимерни системи за доставка на лекарства (публ. 1, 21, 23, 25, 29)

В публикации **21, 23, 25** чрез ^1H и ^{31}P дифузионна ЯМР спектроскопия в комбинация с ^{195}Pt ЯМР са изследвани макромолекулни полимерни конюгати с потенциално приложение като лекарство доставящи системи на цисплатин. Резултатите доказват, успешното свързване между диядрен Pt комплекс със спермидинов мост и поли(оксиетилен Н-фосфонат) чрез фосфор-амидна връзка между Н-фосфонатните групи на полимера и междинната аминогрупа от спермидиновия комплекс (**публ. 21**). Установено е, че хидродинамичният радиус на R_h новите полимерни конюгати зависи от молекулната маса и дължината на поли(етилен гликол) (ПЕГ) фрагмента на полифосфоестерния носител. В **публ. 25 и 23** са изследвани звездовидни полимери от тип ядро-корона. Чрез DOSY са определени размерът на полимерните частици, както и промените на размера и подвижността на полимерните фрагменти при комплексиране с цисплатин. Показано е, че при по-големи степени на натоварване размерът на частиците се увеличава, поради омрежване между отделните мицели. Установено е, че това омрежване е обратимо при условията на освобождаване на лекарството. Тази стратегия за дизайн на лекарство доставящи системи е доразвита, чрез въвеждане на цисплатин като обратима връзка за ПЕГ модификация на звездовидните макромолекули, с цел да се избегне омрежването им. Чрез DOSY е доказано свързването на ПЕГ веригите към звездовидния полимер и е проследено тяхното освобождаване при физиологични условия. Резултатите показват, че ПЕГ-илирането води до редуциране на омрежването и повишаване на стабилността на наноколоидния разтвор, както и до по-добро натоварване и подобрен профил на освобождаване на лекарството. Подобен подход е използван за изследване на серия от термо-чувствителни съполимери на *n*-пропил-2-оксазолин и етиленмин в разтвор, като потенциални системи за доставка на ДНК, (**публ. 1**). Установено е, че под температурата на фазов преход (T_{cp}) се образуват малки частици с R_h , който съответства на молекулно разтворени полимерни вериги. Над T_{cp} съполимерите образуват големи агрегати (мезоглобули) с R_h от около 50 nm, както и клъстери от мезоглобули, които се характеризират с широко разпределение по размери 170 – 260 nm.

Разработена е методика на базата на DOSY за количествен анализ на липозомни суспензии стерично стабилизирани от диблокови съполимери (**публ. 29**). Тези полимери са амфифилни по природа и могат да образуват също индивидуални полимерни агрегати (мицели), които съществуват заедно с липозомите. Важна характеристика на стерично стабилизирани липозомни суспензии, за определянето на която все още няма надежден аналитичен метод, е количеството полимер включено в липозомната мембрана и в други структури извън липозомите. Разработената методика, дава възможност чрез подходящ набор от експериментални параметри и анализ на дифузионните профили в DOSY спектрите, да се определят размерите на различните структури (липозоми, мицели, унимери) и да се оцени количественото разпределение на полимера в тях. Показана е приложимостта на предложения метод за изследване на кинетиката на освобождаване на моделно лекарство лидокаин хидрохлорид от липозомите.

1.2. Приложение на дифузионна ЯМР спектроскопия в химията на полиоксометалатите (публ. 2, 5, 6, 14, 22).

Полиоксометалатите (ПОМ) представляват неорганични клъстери на метални оксиди (V, Mo, W), притежаващи разнообразни химични и физични свойства, които могат сравнително лесно да бъдат адаптирани в зависимост от желаното приложение. В резултат на това интересът към разработване на нови ПОМ подходящи за приложение в различни области като катализ, материалознанието и медицината нарастна изключително много през последните години. Чрез заместване на един или повече атоми от структурата на ПОМ със специфичен метален център, могат да бъдат получени ПОМ с целеви координативни свойства и активност.

Изследванията на ПОМ са проведени в сътрудничество с групата на проф. Татяна Парак-Вохт от Католически Университет в гр. Льовен, Белгия, чиято научна тематика е свързана с разработването на нови изкуствени катализатори на основата на метал-заместени ПОМ за хидролиза на пептидна и фосфоестерна връзка в биологични молекули. Приложенията на дифузионната ЯМР спектроскопия в химията на ПОМ са сравнително ограничени и недостатъчно развити, поради това, че много от тези неорганични клъстери не притежават подходящи чувствителни ядра. Нашите изследвания допринасят за запълване на тази празнина и показват, че

^{31}P DOSY може успешно да се използва за идентифициране на реакционните интермедиати и за изясняване на механизма на реакции на хидролиза, катализирани от метал-заместени ПОМ.

Каталитичната активност на **Zr(IV) заместен Keggin тип** ПОМ $(\text{Et}_2\text{NH}_2)_8\{\alpha\text{-PW}_{11}\text{O}_{39}\text{Zr}(\mu\text{-OH})(\text{H}_2\text{O})\}\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (ZrK 2:2) **за хидролиза на фосфоестерна връзка** в моделни ДНК субстрати е изследвана чрез комбинация от ^1H и ^{31}P DOSY, двумерна обменна спектроскопия (EXSY) и теоретични изчисления (**публ. 14 и 5**). Чрез ^{31}P DOSY при различни температури за първи път в литературата е представено експериментално доказателство за съществуването на мономерната форма (ZrK 1:1) на този ПОМ, която в разтвор е в равновесие с димерната му форма (ZrK 2:2). Доказано е, че мономерната форма е каталитично активната форма, която е отговорна за хидролизата на фосфоестерна връзка в (бис-нитрофенил фосфат, БНФФ), (**публ. 14**) и аденозин трифосфат (АТФ) (**публ. 5**). Установено е, че при хидролизата на АТФ в присъствие на ZrK 2:2, са възможни два паралелни реакционни пътя с образуване на съответно моно- и бидентатен комплекси между АТФ и ZrK 1:1. Въз основа на резултатите от ^{31}P , ^{31}P DOSY и ^{31}P EXSY ЯМР спектрите са идентифицирани междинните и крайните продукти на реакциите, определени са скоростните константи и термодинамичните параметри и са предложени детайлни механизми на реакциите.

Каталитичната активност на серия от **лантанид-заместени Keggin тип** ПОМ: $[\text{Me}_2\text{NH}_2]_{11}[\text{Ce}^{\text{III}}(\text{PW}_{11}\text{O}_{39})_2]$, $[\text{Me}_2\text{NH}_2]_{10}[\text{Ce}^{\text{IV}}(\text{PW}_{11}\text{O}_{39})_2]$ (обозначени като $(\text{Ce}^{\text{IV}}(\text{PW}_{11})_2)$ и $\text{K}_4[\text{EuPW}_{11}\text{O}_{39}]$) за хидролиза на фосфоестерна връзка в моделен ДНК субстрат 4-нитрофенил фосфат (НФФ) е изследвана чрез едномерни ^{31}P и ^{31}P DOSY ЯМР спектри, (**публ. 2**). Установено е, че най-висока хидролитична активност показва Ce^{IV} -заместения Keggin ПОМ $(\text{Ce}^{\text{IV}}(\text{PW}_{11})_2)$, поради което детайлно е изследвано неговото поведение в разтвор като функция от рD, температурата, концентрацията и йонната сила, и е анализирано влиянието на тези фактори върху скоростната константа. Въз основа на резултатите от ^{31}P DOSY е доказано присъствието на динамично равновесие между мономерната и димерна форма на ПОМ. В комбинация с DFT изчисления е показано, че субстратът образува енергетично изгоден и стабилен комплекс с мономерната форма, който включва два НФФ лиганда координирани монодентатно към Ce^{IV} центъра на $\text{Ce}^{\text{IV}}\text{PW}_{11}$. Доказано е, че мономерната форма е отговорна за хидролитичната активност на $\text{Ce}^{\text{IV}}(\text{PW}_{11})_2$ спрямо фосфомоноестери и е предложен принципен механизъм на реакцията на хидролиза на НФФ в присъствие на този ПОМ.

В **публ. 6 и 22** е изследвана каталитичната активност на **Zr(IV)-заместен Wells-Dawson ПОМ** $\text{K}_{15}\text{H}[\text{Zr}(\alpha_2\text{-P}_2\text{W}_{17}\text{O}_{61})_2]\cdot 25\text{H}_2\text{O}$ (ZrWD) **за хидролиза на пептидна връзка** в моделни олигопептиди. Чрез ^1H DOSY са идентифицирани междинните продукти при хидролиза на тетраглицин и е доказано, че механизмът на хидролиза включва предпочетено координиране между ПОМ и първата амидната група от N-края на тетраглицин (**публ. 22**). Установено е, че в хода на реакцията като междинни продукти се образуват три- и ди-глицин, както и цикличен глицилглицин, които се хидролизират до крайния продукт глицин. Независимо от значителното припокриване на сигналите на компонентите в ^1H спектъра на реакционната смес, чрез ^1H DOSY беше възможно тяхното спектроскопско разделяне и идентифициране в дифузионната размерност, което позволи да бъде изяснен механизмът на хидролиза. С цел да се проучат възможностите за използване на метал-заместени ПОМ като изкуствени протеази за мембранни протеини е изследвано взаимодействието на ZrWD с различни ПАВ, (**публ. 6**). Установено е, че катионни ПАВ (СТАВ) водят до утаяване на ПОМ, докато анионните и неутрални ПАВ не взаимодействат с ПОМ. Показано е, че цвтерийонните ПАВ (Zw3-13 и CHAPS) образуват стабилни комплекси с ZrWD. Чрез ^1H и ^{31}P DOSY са определени размерите на ПАВ/ПОМ комплексите като функция от концентрацията на ПАВ, а тяхната структура е определена чрез двумерна регистрация на Ядрен Ефект на Оверхаузер (NOESY спектри). Показано е, че в присъствие на тези ПАВ, ZrWD запазва каталитичната си активност за хидролиза на пептидна връзка в моделен дипептид глицил-L-хистидин и са определени условията, при които скоростта на хидролиза е най-голяма.

Резултатите в **публ. 2, 5, 6, 14, 22** допринасят за по-задълбочено разбиране на фосфоестеразната и пептидазна активност на метал-заместни ПОМ и за разработване на ефективни Люисови катализатори на тяхна основа за хидролиза на биомолекули, включително на металопротеази активни в разтвори на ПАВ, които се използват като модел на клетъчната мембрана. Резултатите демонстрират възможностите на дифузионната ЯМР спектроскопия за

изследване *in situ* на сложни многокомпонентни смеси и за изследване на сложни реакционни механизми и допринасят за утвърждаване на метода в нова област като химията на полиоксометалатите.

1.3. Определяне на структура, размери и динамика на надмолекулни нано-размерни агрегати в разтвори на повърхностно активни вещества и полимери (публ. 19, 20, 31, 34, 38, 43).

Амфифилните ПАВ са важен клас молекули с много разнообразни приложения. Моделирането ПАВ чрез молекулен дизайн на полярната глава и хидрофилната опашка е актуална научна област, която има за цел създаване на нови амфифилни молекули с разнообразна топология, геометрия и функционалност, чиито свойства и характеристики могат да бъдат фино настроени с оглед на конкретните им целеви приложения.

Използваният в **публ. 19** подход включва комбиниране на бифункционален органичен лиганд с полиоксометалати (ПОМ), което води до създаване на нов тип хибридни органично-неорганични амфифилни структури, комбиниращи свойства характерни за ПОМ, като редокс, каталитични, магнитни и фотофизични свойства, със само-организация типична за ПАВ. Чрез взаимодействие на 1,8 октандифосфонова киселина (ОДФ) и амониев хептамолибдат $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ (ПОМ) във воден разтвор, са синтезирани нов тип органично-неорганични хибриди с цилиндрична форма, изградени от *алтерниращи* ковалентно свързани ОДФ и ПОМ молекули, чиито брой може да бъде контролиран чрез вариране на рН и молното съотношение ОДФ: $[\text{Mo}_7\text{O}_{24}]^{6-}$. Химичната структура на тези ОДФ/ПОМ хибриди е доказана чрез ^1H , ^{31}P и ^{95}Mo ЯМР спектроскопия, а размерът и формата им като функция от ОДФ/ПОМ молното съотношение, са определени чрез комбинация от ^{31}P DOSY и молекулярна механика (ММ). Чрез ММ са определени дължината и диаметра на ОДФ/ПОМ хибриди с различен брой алтерниращи ОДФ и ПОМ единици. От тези параметри е изчислен е теоретичният дифузионен коефициент на ОДФ/ПОМ хибриди с различен размер (респ. брой ОДФ и ПОМ единици), чрез използване на теоретичен модел за трансляционен дифузионен коефициент на цилиндрични обекти. Чрез сравняване дифузионните коефициенти, определени от ^{31}P DOSY спектрите с теоретичните стойности е определен размера, респ. броят алтерниращи ОДФ и ПОМ единици при дадено ОДФ/ПОМ молно съотношение. Резултатите показват, че комбинацията от ^{31}P DOSY и ММ, която е нова аналитична стратегия в химията на полиоксометалатите, представлява мощен подход за детайлно охарактеризиране на нано-размерни органично-неорганични хибриди на базата на ПОМ.

В **публ. 20** чрез ^1H DOSY е доказано образуването на надмолекулен комплекс между поли(3-(2-етилхексил)тиофен), (P3EHT) и поли(4-винилпиридин) (P4VP) чрез фенол-пиридин водородна връзка. Определените дифузионни коефициенти са интерпретирани чрез теоретичен модел за две състояния, отчитащ равновесието между свързан с P4VP и свободен P3EHT полимер, като е определено количеството на свързан P3EHT полимер и константата на асоциация. Резултатите представляват първото експериментално доказателство в литературата за образуване на супрамолекулен конюгиран присаден полимер в разтвор на базата на Н-връзка. За конкретната изследвана система, DOSY се оказва единственият метод, подходящ за доказване на взаимодействието между двата полимера, т.к. във воден разтвор има затруднения при снемане на ИЧ спектри, които обикновено се използват за детектиране на Н-връзки, а използването на динамично лазерно светоразсейване е свързано с усложнения при системи съдържащи политиофен, т.к. те не само разсейват, но и поглъщат светлина.

Важни характеристики на разтворите на ПАВ, които определят техните свойства, стабилност и области на приложение, са критичната концентрация на мицелообразуване (ККМ), размерите и формата на мицелите, тяхната структура и относителното подреждане на молекулите на ПАВ в агрегатите. Чрез DOSY в комбинация с други ЯМР техники (NOESY) са изследвани формата и размера на индивидуални (**публ. 34**) и смесени мицели (**публ. 31**) в разтвори на следните ПАВ: Тритон X-100 (нейонно ПАВ) и SDP2S (анионно ПАВ), като функция от концентрацията на ПАВ и присъствието на електролит и триблоков съполимер от тип $\text{EO}_n\text{-PO}_m\text{-EO}_n$ (Синпероник L61, SL61). На базата на измерените дифузионни коефициенти са определени размерите и формата на мицелите като са използвани теоретични модели за сфера, облатен или пролатен елипсоид. Показано е, че в присъствие на SL61 и AlCl_3 размерът на смесените мицели не зависи от молното

съотношение TX-100:SDP2S. Чрез 2Д NOESY еднозначно е доказано, че мицелите на TX-100 имат сферична слоеста структура без отчетлива хидрофобно-хидрофилна граница. В смесените мицели се запазва слоестата структура на базата на TX-100, молекулите на SDP2S се разполагат на нивото на по-външния слой от TX-100 молекули, докато полиоксипропиленовите участъци от молекулите на SL61 са включени в сърцевината на мицелата. Чрез подобен подход на базата на 2Д NOESY спектри е предложен структурен модел на обратни мицели от ХиаминМ (ди-изобутил феноксиетил диметилбензиламониев метакрилат) (**публ. 38**), а чрез ^1H ЯМР спектроскопия е определена ККМ на мицелите. Системи от този тип могат да се използват като микроемулсионна матрица за синтез на полупроводникови нанокристали с полимерна обвивка, чрез полимеризация на периферните молекули на ПАВ.

В **публ. 43** е разработен е метод за определяне на размерите на емулсионни капки в емулсии от типа масло/вода на основата на градиентна ЯМР спектроскопия с ниска разделителна способност. Направена е оценка на точността и възможностите за приложение на метода за анализ на хранителни емулсии. Чрез сравняване на резултатите от ЯМР и оптична микроскопия е установено, че ЯМР методът се характеризира с добра точност и възпроизводимост. Методът е разработен в сътрудничество и по поръчка на компанията „Kraft Foods” Glenview, USA. Разработеният метод може да се използва в хранителната индустрия за бърз рутинен анализ на хранителни емулсии – майонеза, сирена, сосове и други продукти. Размерите на емулсионните капки са важна характеристика, която определя редица свойства на посочените хранителни продукти – трайност, вкусови качества, реологично поведение, и т.н. В сравнение с широко използваните методи за определяне на размерите на емулсионни капки, ЯМР методът има редица предимства – не изисква разреждане или предварителна обработка на пробата, анализът е бърз и икономически целесъобразен. *Работата е включена в годишния отчет на ИОХ-ЦФ като една от трите най-добрите работи за 2004 г.*

1.4. Количествена дифузионна ЯМР спектроскопия (публ. 26, 33)

Разработен е алтернативен метод за оценка на точността на математическите алгоритми за анализ на DOSY спектрите и за определяне на дифузионните коефициенти, който се основава на генерирането на електронен референтен сигнал (ERETIC \equiv Electronic REference To access In vivo Concentrations). Разработена е нова импулсна схема за регистриране на DOSY спектри, като към стандартната импулсна поредица е включен модул за генериране на ERETIC сигнал. По този начин ERETIC сигналът се генерира директно в DOSY спектрите като референтен сигнал, чиито дифузионни параметри може да се задават и симулират, така че да се моделират системи с различни предварително дефинирани дифузионни характеристики, напр. дискретни и нормално разпределени дифузионни коефициенти в моно- и двукомпонентни системи с различни молни фракции и стойности на дифузионните коефициенти. Новата ERETIC-DOSY методика е приложена за определяне на областите на приложимост и точността на различните математически алгоритми за анализ на DOSY спектрите в зависимост от свойствата на изследваната система, както и за определяне на най-подходящите експериментални условия за тяхното използване.

II. ЯМР спектроскопия с въртене при магически ъгъл за охарактеризиране на полимерни хидрогелове, мезопорести материали и зеолити.

Публикации № 8, 9, 10, 11, 13, 16, 18, 24.

ЯМР спектроскопията в твърда фаза (ТФ-ЯМР) с въртене при магически ъгъл (**Magic Angle Spinning (MAS)**) се утвърди през последните десетилетия като мощен и важен метод за структурно охарактеризиране на нови материали на атомно и молекулно ниво. Приложението на метода за получаване на ЯМР спектри на меки и микрохетерогенни материали с висока разделителна способност и чувствителност, подобни на тези в течна фаза, е известно като ЯМР спектроскопия с висока разделителна способност при въртене под магически ъгъл (**High-Resolution Magic Angle Spinning, HRMAS**). *В сътрудничество с български учени, експерти в областта на полимерната химия и мезопорестите материали, за първи път в България са използвани HRMAS и ТФ-ЯМР за изследване на полимерни хидрогелове и за охарактеризиране на лекарстводоставящи системи (ЛДС) на базата на мезопорести силикати и зеолити.*

Полимерните хидрогелове са обещаващи материали с атрактивни приложения във фармацията, в областта на тъканното инженерство и регенеративната медицина. Основен недостатък, който ограничава по-широкото им приложение е тяхната недостатъчна механична здравина. Изключения представляват двойните полимерни мрежи (ДМ), които се характеризират с изключителна механична здравина и устойчивост. Все още, обаче, причините за тези уникални свойства не са добре изяснени на молекулно ниво. В **публ. 24** чрез HRMAS ЯМР е изследвана структурата на двойни полимерни мрежи от поли(2-акриламидо-2-метил-1-пропансулфонова киселина) (PAMPS) и поли(акриламид) (PAAm), синтезирани с различни молни отношения на двата полимера, като е използван N,N'-метилен бис(акриламид) (MBAА) като омрежващ реагент. Чрез дифузионно филтрирани ^1H спектри, ^2H , ^{13}C , HSQC и ROESY е изследвано влиянието на химичния състав върху структурата и динамичните свойства на ДМ от PAMPS/PAAm. Доказано е, че забележителната здравина на ДМ се дължи на образуването на ковалентни връзки между двете мрежи чрез нереагиралите двойни връзки на MBAА, както и образуването на мрежа от здрави водородни връзки между страничните вериги на полимерите на базата на N-H групите от PAMPS като донор и C=O групите от PAAm като акцептор. Резултатите допринасят за изясняване на химическата структура и молекулната природа на взаимодействията отговорни за изключителната механична здравина на хидрогелите на ДМ и представляват *първото в литературата изследване на ДМ чрез HRMAS ЯМР спектроскопия*.

Използването на **мезопорести силикатни (МС) материали** е привлекателна съвременна стратегия за разработване на ефективни ЛДС, поради възможността за натоварване на по-големи количества лекарствено вещество (ЛВ) и неговото контролирано освобождаване в прицелните тъкани чрез насочен дизайн на носители с подходяща топология на порите, размер и морфология на частиците. В серия от публикации (**8, 10, 16, 18**) чрез ^{13}C , ^{29}Si и ^{27}Al ТФ-ЯМР спектроскопия са изследвани ЛДС на базата на мезопорести силикати SBA-16, SBA-15, MCM-41 и зеолит Бета. В **публ. 8 и 18** чрез ^{13}C и ^{29}Si са изследвани структурните промени в MCM-41 и SBA-16 в резултат на модифицирането им с органични функционални групи (NH_2 или NH_2/COOH) и след натоварване с моделното ЛВ месалазин. Чрез деконволюция на сигналите в ^{29}Si спектри са определени относителните фракции на различните структури на тетракоординирания Si център, както и степента на функционализация на МС. Доказано е, че включването на органичните групи е свързано с частично разрушаване на мезопорестата структура на MCM-41. Установено е, че при по-високо съдържание на месалазин, се благоприятства взаимодействието между молекулите на ЛВ, за сметка на взаимодействието между ЛВ и носителя. В **публ. 16** са изследвани модифицирани със сребро MCM-41 и SBA-15, като ЛДС с антибактериални свойства и подобрени характеристики за доставка на сулфадиазин и сребро. Чрез ^{13}C ТФ-ЯМР спектроскопия е изследвано взаимодействието между сребърен сулфадиазин (AgSD) и силикатния носител, както и между сулфадиазин (SD) и предварително модифициран със сребро мезопорест силикат. Доказано е, че при натоварване на AgSD върху MCM-41, молекулите на AgSD се намират както в порите на MCM-41, така и върху външната повърхност на частиците на носителя, докато при натоварване на SD в предварително модифицирания със сребро мезопорест силикат, ЛВ се включва предимно в порите му, което е условие за по-ефективно контролирано освобождаване на ЛВ.

През последните години интересът към зеолитите като ЛДС нарастна значително, поради разработването на нови синтетични подходи за дизайн на зеолити с по-големи и контролирани размери на порите, което позволява включване на ЛВ в зеолитната решетка и контролираното му освобождаване при подходящи условия. В **публ. 10** е използвана ТФ-ЯМР спектроскопия (^1H , ^{13}C , ^{29}Si , ^{27}Al и ^1H - ^{29}Si CP-NETCOR) за изследване на двукомпонентни ЛДС с антибактериални свойства на базата на зеолит Бета, съдържащи Ag, SD и AgSD. Показано е, че модификацията на изходния зеолит Бета със Ag^+ и натоварването му със SD и AgSD води до трансформиране на октаедричните дефектни решетъчни Al структури и включване на извънрешетъчния Al от изходния зеолит в решетъчни тетраедрични позиции. Въз основа на ^1H спектрите е доказано, че механизмът на трансформиране на октаедричния Al в тетраедричен решетъчен Al, включва обмен на протони между Si-OH от зеолита и H^+ или Ag^+ от SD или AgSD, съответно, които изпълняват ролята на компенсиращи заряди. Установено е, че в немодифицирания изходен зеолит лекарственото вещество (SD, AgSD) е локализирано предимно около Si(OAl) структурите (Q^4) и по-малко около Si(1OH) местата (Q^3), което показва преимущественото му включването в порите на зеолита. При

натоварване на SD върху предварително модифициран със Ag^+ зеолит, е установено че значителна част от ЛВ се намира и върху външната повърхност на частиците на зеолита. Чрез анализ на ^1H T_1 и T_2 релаксационните времена е показано, че ЛВ включено в порите на зеолита е в аморфна форма.

ЯМР изследванията проведени в **публ. 8, 10, 16 и 18**, предоставят по-детайлна информация за структурата и взаимодействията на молекулно ниво и допринасят за изясняване на резултатите получени за изследваните материали с други аналитични методи като прахова рентгенова дифракция (XRD), азотна физисорбция, трансмисионна електронна микроскопия и ИЧ спектроскопия с пълно вътрешно отражение (ATR FT-IR).

Чрез ^{119}Sn и ^{31}P ЯМР спектроскопия в твърда фаза, в комбинация с рентгенова дифракция за изследвани координационни полимери със слоеста морфология на базата на ди-органокалаени метансулфонати (**публ. 9**), фосфонати (**публ. 11, 13**) и силанфосфонати (**публ. 13**) и е доказана тяхната структура в твърда фаза. Чрез ^1H , ^{13}C , ^{119}Sn и ^{31}P ЯМР спектроскопия е получена детайлна структурна информация за поведението на изследваните съединения в разтвор. Сравнителното разглеждане на ЯМР спектрите в твърда фаза и в разтвор, показва наличието на съществени разлики в ^{119}Sn изотропните химични отмествания. Наблюдаваните разлики са интерпретирани като резултат от динамично равновесие между няколко изомерни форми (флукуационни изомери), при което преобладаващите изомери в разтвор и в твърда фаза са различни.

III. Изследване на кинетика и термодинамика на молекулни взаимодействия и молекулна динамика чрез ЯМР спектроскопия в разтвор.

Публикации № 3, 4, 7, 12, 15, 35, 45, 46.

III.1 Молекулни взаимодействия и кинетика на реакции (публ. 3, 4, 7, 12, 15)

В **публ. 3 и 7** са изследвани Pt(II) и Pd(II) координационни нанокапсули на основата на антарацен-бис-пиридилови лиганди с потенциално противотуморно действие, с цел разработване на метод за модулиране на противотуморната активност на капсулите чрез включване на целеви молекули в тях. Чрез ^1H ЯМР спектроскопия е установено е, че Pt(II) и Pd(II) капсулите са стабилни в присъствие на биологични молекули като различни аминокиселини, нуклеобазы и глутатион и не взаимодействат с тях, (**публ. 7**). Изключение е наблюдавано за Pd(II) капсулите, които в присъствие на молекули с SH групи (цистеин и глутатион), се разпадат незабавно до изходните лиганди. Чрез ^1H ЯМР спектроскопия е изследвана кинетиката на разпадане на Pd(II) координационните нанокапсули и на техни „домакин-гост“ комплекси с кафеин и пирен в присъствие на глутатион, който е основен антиоксидант с SH група, с повишени нива в туморните клетки, (**публ. 3**). Определени са времената на полу-живот на комплексите и на празните капсули. Установено е, че комплексите са по-стабилни в присъствие на глутатион, в сравнение с празните капсули. Доказано е, че празните Pt(II) и Pd(II) капсули, силно инхибират авто-окислението на глутатион, поради образуване на комплекс между цистеиновата група от глутатиона и металния йон от капсулите. Направена е корелация между наблюдаваните стабилности и противотуморната активност на Pd(II) координационните капсули, която ясно показва, че повишената стабилност на Pd(II) капсулите в присъствие на молекули-гости, води до намаляване на цитотоксичността. Показано е, че стабилността и реактивоспособността на метало-супрамолекулярните капсули, могат да бъдат модулирани чрез промяна на типа на координиращия метал или чрез включване на молекули-гости.

В **публ. 4, 12, 15** е изследвана кинетиката на хидролиза на фосфоестерни връзки в моделни ДНК/РНК субстрати в присъствие на различни Zr(IV)-заместени полиоксометалати (ПОМ). Чрез ^1H и ^{31}P ЯМР спектроскопия са определени скоростните константи, термодинамичните параметри и механизмите на хидролиза в присъствие на ПОМ. Показано е, че скоростта на хидролиза зависи от рН, температурата, йонната сила и концентрацията на ПОМ. Установено е, че концентрацията на субстрата оказва влияние върху равновесието между различните форми на изследваните ПОМ в разтвор и съответно върху тяхната активност. Установено е, че монолакунарните Wells-Dawson и Keggin ПОМ, в които липсва Zr йон не проявяват каталитична активност, което доказва ключовото значение на металния йон за каталитичната функция на ПОМ. В **публ. 4** е установено, че скоростта на хидролиза на 4-нитрофенил фосфат (НФФ) в присъствие на Zr(IV) заместен Wells-Dawson тип ПОМ ($\text{Na}_{14}[\text{Zr}_4(\text{P}_2\text{W}_{16}\text{O}_{59})_2(\mu_3\text{-O})_2(\text{OH})_2(\text{H}_2\text{O})_4]\cdot 57\text{H}_2\text{O}$) (ZrWD 4:2), е 300 пъти по-голяма от тази на

спонтанна хидролиза на НФФ. Предложен е механизъм на реакцията, който включва едновременно координиране на две молекули субстрат към два от четирите Zr атома на ZrWD 4:2, което обяснява значително по-голямата скорост на хидролиза в присъствие на този ПОМ в сравнение с ПОМ с един Zr атом. В **публ. 12 и 15** е изследвана каталитичната активност на димерен Zr(IV) заместен Keggin тип ПОМ (ZrK 2:2) за хидролиза на фосфоестерна връзка в 2-хидроксипропил-4-нитрофенил фосфат (ХПНП) и бис(4-нитрофенил) фосфат (БНФФ), съответно. Установено е, че ПОМ катализира значително реакцията, като са определени скоростни константи, които са 530 пъти и 320 пъти по-големи от скоростните константи на спонтанна хидролиза за ХПНП и БНФФ, съответно. Показано е, че скоростта на хидролиза е най-голяма, при експериментални условия, които благоприятстват образуването на по-голямо количество мономерен ПОМ в реакционната смес. Доказано е, че мономерната форма на ПОМ е отговорна за хидролитичната активност, т.к. притежава по-голям брой водни молекули координирани към металния йон, които могат да бъдат заместени от субстрата или да действат като нуклеофил при реакцията.

III.2. Изследване на обща и вътрешномолекулна динамика чрез класически Динамичен ЯМР и ЯМР релаксационни методи. (публ. 35, 45, 46).

В **публ. 46** е разработена нова експериментално-изчислителна схема за определяне на прецизен и еднозначен набор от скоростни константи и активационни параметри в сложни спиновни системи с обмен между много състояния. Тази методика е демонстрирана при изследване на затруднена вътрешна ротация на моделни съединения от типа на поляризираните (push-pull) етилени. Показано е, че предварителната обработка на 1Д ЯМР спектрите снети при различна температура чрез референтна деконволюция и линейно предвиждане, повишава значително прецизността на определените от ЯМР спектрите скоростни константи. Установено е, че комбинираното приложение на метода на Пълен Анализ на Формата на Линията (ПАФЛ), подходящ в областите на междинен и бърз обмен, с 2Д EXSY спектри, подходящи за областите на бавен обмен, води до разширяване на температурния интервал на определените скоростни константи, в резултат на което се получават по-точни термодинамични параметри ΔG^\ddagger , ΔS^\ddagger и ΔH^\ddagger за изследвания обменен процес. Този подход е приложен за изследване на статичната и динамична стереохимия на съединение от групата на „ароматните пропелери“, димезитил-2,4,6-триметоксифенилметан, в разтвор (**публ. 35**). Определени са скоростните константи, термодинамичните параметри и механизма на превръщане на двата пропелерни енантиомера. Резултатите показват, че енергетично най-изгодния механизъм на стереоизомеризация е корелираното движение на ароматните пръстени, което е важна особеност на този клас съединения. През последните години се наблюдава нарастващ интерес към системи от типа на ароматните пропелери, поради това, че те показват функционална аналогия с механични движения на макроскопско ниво и могат да се използват като модели на молекулни машини.

Показано е, че подходът на Lipari и Szabo (model free approach), разработен за определяне на корелационните времена на обща и вътрешномолекулна преориентация в големи молекули, може да бъде използван за изследване на малки молекули, в които се наблюдава относително затруднена вътрешна ротация (**публ. 45**). Чрез анализ на ЯМР релаксационните параметри (времена на релаксация и хетероядрен ефект на Оверхаузер) с подхода на Lipari и Szabo за моделното съединение цинамоилмезитилен са определени корелационните времена на обща и вътрешномолекулна преориентация и обобщения параметър за порядък, както и енергиите на активация на обща и вътрешномолекулна преориентация в това съединение.

IV. Конформационен анализ и изследване на структурата на синтетични и природни продукти с потенциална биологична активност

Публикации № 17, 27, 28, 30, 48, 32, 36, 37, 39, 32, 40, 41, 44, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55.

IV.1. Комбинирано приложение на експериментални ЯМР техники и теоретични, (ab initio) методи за структурен и конформационен анализ (публ. 40, 41, 44).

Теоретично са изчислени ^1H и ^{13}C ЯМР химичните отмествания на серия от алкани и хлорзаместени алкани като резултатите са сравнени с експерименталните данни за съответните съединения (**публ. 40**). В методологично отношение е изследвана надеждността на изчислителните процедури за оценка на ^1H и ^{13}C химичните отмествания в ЯМР спектрите на C1 –

C4 алкани и техните хлорни производни. Използвани са съвременни теоретични методи DFT (B3LYP, PBE, и PBE0) и MP2 с разширени базисни набори, съдържащи поляризационни и дифузни функции. Показано е, че отчитането на динамичната електронна корелация (с метода MP2) и релативистичните поправки имат съществен принос към ^{13}C химичните отмествания и дават много по-добро съответствие теория/експеримент. Създадени са линейни корелационни зависимости между експерименталните и теоретично изчислените химични отмествания за молекулните фрагменти с различен брой хлорни атоми. Параметрите от корелационните схеми отчитат в неявен вид всички ограничения на теоретичните модели, например непълнота на базисния набор, ефекти от електронна корелация, релативистични поправки и влияние на средата, поради което в практически аспект тези зависимости могат да се използват за надеждно предсказване на химичните отмествания на по-сложни хлорсъдържащи системи. Този подход може да се използва за да се улесни анализът и интерпретацията на сложни ЯМР спектри, напр. на поливинилхлорид (PVC). *Разработката е избрана за най-добро постижение на ЯМР лабораторията, една от най-добрите работи на ИОХ-ЦФ за 2006 г. и в обобщения отчет на ИОХ-ЦФ за петгодишния период 2004 – 2008 г.*

Чрез 1D и 2D ЯМР техники и квантово-химични изчисления на ЯМР параметри е изследвана структурата и стереохимията на серия от заместени производни на тетраизохинолин (**публ. 41**). Чрез сравняване на експерименталните и теоретично изчислени стойности на химичните отмествания и вициналните константи на спин-спиново взаимодействие ($^3J_{3,4}$) е установено наличието на бързо конформационно равновесие между *ee* и *aa* конформерите, за част от изследваните съединения в разтвор. На базата на наблюдаваните температурни промени в стойността на $^3J_{3,4}$ е доказано отместване на равновесието към по-стабилния *aa* конформер, при по-ниска температура. Чрез аналогичен подход е изследвана тавтомерията на оксазолидини, тиазолидини и селеназолидини, заместени с аминок групи, в разтворители с различна полярност (**публ. 44**), установени са предпочетените тавтомерни форми, като е показано, че мястото на равновесието и стабилността на тавтомерите зависят от разтворителя.

IV.2. Структурен анализ на синтетични вещества с доказана биологична активност (публ. 27, 32, 37, 39, 42, 47, 49, 50, 51, 52, 53, 54).

Изследванията в това направление допринасят за изясняване на структурата на биологично активни синтетични вещества и имат значение за разработването на по-ефективни подходи за дизайн и синтез на нови лекарствени вещества. Чрез комбинация от ^1H и ^{13}C и измерване на Ядрен ефект на Оверхаузер са установени структурите на серия от синтетични продукти с доказани аналгетични свойства и с антитуберкулозна активност. Доказано е положението на заместителите и стереохимията на *syn* и *anti*-изомерите на серия от нови 3,4,5-заместени-оксазолидин-2-они съдържащи пиперазин, 1-(4-хлорофенил) пиперазин, бензхидрилпиперазин, морфолин и пиперидинови пръстени, (**публ. 27**). Установена е структурата на цис и транс изомерите на производни на 5-екзо-3-бромо-5-нортрициклохексанкарбоксилна киселина получени по нова синтетична схема (**публ. 42**). Доказана е структурата на серия от 4-амино-3-формил-6-метил-2(1H)-пиридинови и 1,2-дихидро-2-имино-1,6(6H)-нафтиридин-5-они (**публ. 50**).

Чрез детайлно спектроскопско изследване на (*Z*) и (*E*) изомерите на серия от 28 съединения представляващи заместени 3-циано-2-аза-1,3-бутадииени, е установена зависимост между относителната конфигурация и характеристични спектрални параметри, които могат да се използват като критерии за стереохимично отнасяне на аналогични изомерни съединения (**публ. 53, 54**). Установено е, че в ^{13}C спектрите сигналите на въглеродните атоми от $\text{C}\equiv\text{N}$ групата в (*E*) формите са системно в по-силно поле (~ 114 ppm) от тези за (*Z*) формите (~ 116 ppm), а в (*Z*) формите $^3J(\text{C},\text{H})$ константата между олефиновия протон и въглеродния атом от $\text{C}\equiv\text{N}$ групата е по-малка (6-8 Hz), от тази в (*E*) формите (12-13 Hz). Тези характеристични разлики в ^{13}C спектрите позволяват идентифициране на съответните изомери, дори ако е налице само едната форма.

Установена е структурата на нови бис(бензимидазол-2-ил)амини и нови пиперазинови производни на 5(6)-заместена-(1H-бензимидазол-2-илтио)оцетната киселина с потенциално антибактериално и антихелминтно (антитрихелозно) действие (**публ. 37 и 39**). Установено е, че при съединенията със заместител в едно от бензимидазоловите ядра съществува динамично равновесие между поне две от общо седем възможни тавтомерни форми. Чрез анализ на

химичните отмествания в ЯМР спектрите в комбинация с теоретични изчисления с отчитане на ефекта на разтворителя е установена предпочетената тавтомерна форма. Чрез ^1H и ^{13}C ЯМР е охарактеризирана структурата на нови производни на 3,4,5-заместени 1,2,4-триазоли и 2,5-заместени 1,3,4-тиадиазоли. Биологични изследвания *in vitro* показват, че тези съединения имат добра цитотоксичност спрямо тимоцити (потенциална противотуморна активност), както и потенциален имуностимулиращ ефект (**публ. 32**).

Чрез ^1H ЯМР спектроскопия са установени структурите на серии от съединения представляващи 5'-О-глицин, 5'-О-олигопептидни и 5'-О-аминокиселинни производни на уридин. Съединенията са синтезирани като нови потенциални инхибитори на уридин-5'-дифосфоглюкорозилтрансфераза. Охарактеризирани са също и съединенията N-дифенилметилен-О-(метил(2,3,4-три-О-ацетил)- β -D-глюкорозил)-треонин бензилов естер и N-дифенилметилен-О-(метил(2,3,4-три-О-ацетил)- α/β -D-глюкорозил)-серин бензилов естер, като целта на изследването е намиране на оптимален метод и подходящи защитни групи за О-глюкоронидиране на серин и треонин. Съединенията имат значение като градивни блокове в твърдофазния пептиден синтез (**публ. 47, 49, 51, 52**).

IV.3. Структурен и количествен анализ на природни продукти с потенциална или доказана биологична активност (публ. 17, 28, 30, 36, 48, 55).

През последните години разработването на бързи, удобни и недеструктивни методи за количествен анализ на биологично активни вещества в екстракти от растения е актуална научна област поради повишения интерес към иновативни продукти на основата на лечебни и ароматични растения. В **публ. 28** е предложен метод за количествен анализ на съдържанието на сескитерпенови лактони в екстракти от *Arnica Montana L.* посредством ^1H ЯМР спектроскопия, чрез използването на 3,4-диметоксибензалдехид като вътрешен стандарт. Предимство на този метод е, че позволява да се определи общото количество лактони в сместа, без да е необходимо предварителното разделяне и идентифициране на индивидуалните компоненти. Чрез предложения метод, са идентифицирани осем основни компонента в изследваните проби, представляващи различни естери на хеленалин и 11 α ,13-дихидрохеленалин. За идентифициране на различните компоненти в изследваните сурови екстракти са използвани комбинация от 1D и 2D ЯМР техники (^{13}C , DEPT, COSY, HSQC и HMQC). Определено е общото съдържание на сескитерпенови лактони и количеството на хеленалин и 11 α ,13-дихидрохеленалиновите естери, както и индивидуалното количество на 4 от естерите в сместа. Предложеният количествен метод е валидиран чрез анализ на моделна смес с известен състав, оценени са приносите на възможните източници на грешки, като е показано, че за компонента с най-ниска концентрация грешката е под 5%. *Изследването представлява първият в литературата количествен анализ на състава и съдържанието на лактони в екстракти от Arnica Montana L. чрез ЯМР спектроскопия. Работата е включена в годишния отчет на ИОХ-ЦФ като една от трите най-добрите работи за 2011 г.*

Чрез ^1H , ^{13}C , COSY, HSQC, HMBC, TOSCY и NOESY ЯМР спектроскопия са изследвани екстракти от различни медицински и ароматични растения като е установена структурата и относителната стерохимия на редица нови съединения (**публ. 17, 30, 36, 48**). В екстракти от надземните части на *Inula aschersoniana* Janka var. *aschersoniana*, представляващ ендемичен вид за Балканския полуостров и Анатолия, са изолирани, идентифицирани и структурно охарактеризирани четири известни сескитерпенови лактони (партенолид, диепоксикостунолид, инусониолд, хрисоспленол) и 4 нови псевдогуаянолиди, (**публ. 17**). Две от новоизолираните съединенията са идентифицирани като 3 α -ангелоилокси и 3 α -сенециоилоксидамсинова киселина, докато за другите две нови съединения, наименовани ашерсониянон А и Б, е доказано наличието на циклопропенов пръстен. Установена е структурата на 5 изохинолинови алкалоида, изолирани от надземни части на диворастящия вид *Hypocoum lactiflorum* Kar. et Kir. Pazij с произход Монголия. Доказано е, че преобладаващият компонент в този вид е нов алкалоид от секоберберинов тип (-)-N-метилкоридализол, (**публ. 30**). За първи път от вида *Hypocoum lactiflorum* са изолирани и напълно охарактеризирани алкалоидите (-)-N-метилстилопин и (-)-N-метилканадин. В **публ. 48** е установена структурата на три нови пиперидинови алкалоида, изолирани от стеблата, листата и цветовете на *Lobelia laxiflora L.* и е доказана тяхната

противовъзпалителна активност. Доказана е структурата и стереохимията на седем нови сескитерпенови линейни дилактони, изолирани от цветовете на *Anthemis auriculata* Bioss (**публ. 36**). Установено е, че изследваните съединения са стереоизомери на антеиндуролид А, изолиран от *A. arvensis*. В **публ. 55** е демонстрирано приложението на набор от 1Д и 2Д ЯМР техники за структурен и конформационен анализ на малки биологично активни молекули молекули α -изоспартеин метйодид, α -ергокриптин и бромокриптин.



07/12/2016 г.

доц. д-р Павлета Шестакова