



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ

Невена Љ. Стевановић

**СТРУКТУРА И БИОЛОШКА АКТИВНОСТ
КОМПЛЕКСА БАКРА(II), СРЕБРА(I) И
ЗЛАТА(III) СА АЗОЛИМА КАО
АНТИФУНГАЛНИМ АГЕНСИМА**

Докторска дисертација

Крагујевац, 2025



UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC
FACULTY OF SCIENCE

Nevena Lj. Stevanović

**SYNTHESIS AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF
COPPER(II), SILVER(I) AND GOLD(III)
COMPLEXES WITH AZOLES AS
ANTIFUNGAL AGENTS**

Doctoral dissertation

Kragujevac, 2025

Идентификациона страница докторске дисертације

Аутор
Име и презиме: Невена Љ. Стевановић
Датум и место рођења: 24. децембар 1993. године, Јагодина
Садашње запослење: истраживач сарадник на Природно-математичком факултету Универзитета у Крагујевцу
Докторска дисертација
Наслов: Структура и биолошка активност комплекса бакра(II), сребра(I) и злата(III) са азолима као антифунгалним агенсима
Број страница: 141
Број слика: 90
Број библиографских података: 274
Установа и место где је рад израђен: Природно-математички факултет, Универзитет у Крагујевцу
Научна област (УДК): Хемија (54)
Ментор: титула, име и презиме, звање, назив факултета/института и универзитета Др Биљана Ђ. Глишић , ванредни професор, Природно-математички факултет, Универзитет у Крагујевцу Др Јакоб Кљун , доцент, Факултет за хемију и хемијску технологију, Универзитет у Љубљани, Словенија
Број и датум одлуке Већа универзитета о прихватању теме докторске дисертације: IV-01-562/19, 14. јул 2021. године

Посвећено мами

Захвалница

Ова докторска дисертација је рађена на Институту за хемију, Природно-математичког факултета, Универзитета у Крагујевцу, под коменторством др Биљане Ђ. Глишић, ванредног професора, и на Факултету за хемију и хемијску технологију Универзитета у Љубљани у Словенији под коменторством др Јакоба Кљуна, доцента.

Најискреније се захваљујем свом коментору др Биљани Ђ. Глишић на разумевању, подрици, сугестијама, корисним саветима, несебичној помоћи, посвећености и стрпљењу у свим фазама израде ове докторске дисертације. Дугујем јој неизмерну захвалност на указаном поверењу и позиву да се придружим њеној истраживачкој групи. Надам се да ћемо још дуго радити заједно.

Велику захвалност дугујем и коментору др Јакобу Кљуну на помоћи у експерименталном раду током боравка у Словенији и дивној сарадњи у свим аспектима ове докторске дисертације.

Нарочито се захваљујем професору др Милошу И. Ђурану, председнику комисије за оцену и одбрану ове докторске дисертације, који је читањем рукописа овог рада својим саветима помогао да рад добије на стручности, јасноћи и квалитету. Неизмерну захвалност дугујем професору Ђурану на пренесеном знању, свим корисним саветима и сугестијама.

Искрено се захваљујем др Истоку Турелу, редовном професору на Факултету за хемију и хемијску технологију, Универзитета у Љубљани, др Јасмини Никодиновић-Рунић, научном саветнику Института за молекуларну генетику и генетичко инжењерство, Универзитета у Београду и др Сањи Шкаро Богојевић, научном сараднику Института за молекуларну генетику и генетичко инжењерство, Универзитета у Београду, на корисним саветима и сугестијама током израде ове докторске дисертације.

Велику захвалност дугујем колегиници др Јернеји Кладник која ми је много помогла приликом експерименталног рада у лабораторији током боравка у Словенији.

Искрено се захваљујем својим колегама Тини, Бојани, Соњи, Ивани, Миш, Јелени и Дарку на помоћи, подрици, разумевању и увек веселој атмосфери у лабораторији.

Захваљујем се својим пријатељима, нарочитио Милицу М., Слађи, Маји, Милицу С. и својој куми Јовани, који су ми били велика подршка током свих ових година.

Огромну захвалност дугујем деди, баби, оцу, мајци, брату Стевану, снајки и братаници Калини на великој подрици, која ми је много значила. Истакла бих да највећу захвалност дугујем својој мајци, без чије помоћи све ово не би било могуће.

Неизмерну захвалност дугујем свом супругу Александру и нашој деци, сину Страхињи и ћерки Ђурђи за безрезервну подршку и љубав.

Невена Љ. Стевановић

Апстракт

У оквиру ове докторске дисертације, синтетисани су комплекси бакра(II), сребра(I) и злата(III) са азолима који се клинички користе као антифунгални агенси. У првом делу докторске дисертације описани су антифунгални агенси који се користе у медицини за лечење гљивичних инфекција. Поред тога, дат је преглед комплекса метала са азолима као потенцијалним терапеутским агенсима. У другом делу дисертације, описани су поступци за синтезу комплекса бакра(II), сребра(I) и злата(III) са азолима (имидазол, 1-изопропилимидазол, 1-фенилимидазол, флуконазол, итраконазол, миконазол, клотримазол, еконазол, тиоконазол и вориконазол) и методе за њихову карактеризацију и биолошко испитивање. У делу дисертације који се односи на Дискусију резултата, детаљно су приказани резултати спектроскопске и кристалографске карактеризације синтетисаних комплекса, резултати добијени испитивањем њихове биолошке активности (антимикробне, антитуберкулозне и антипролиферативне), као и *in vivo* ембриотоксичност ових комплекса на моделу зебра рибица *Danio rerio*. Синтетисани комплекси су окарактерисани применом спектроскопских (NMR, IR, и UV-Vis), електрохемијских (циклична волтаметрија) и кристалографских метода (дифракција X-зрака са монокристала), као и применом масене спектрометрије и мерењем моларне проводљивости. Антимикробна и антитуберкулозна активност синтетисаних комплекса је поређена са њиховом цитотоксичношћу на здравој ћелијској линији фибробласта плућа (MRC-5). Како би се објаснила структура комплекса у раствору, коришћени су DFT прорачуни. Поред тога, у циљу дефинисања механизма антимикробног деловања комплекса, испитиване су њихове интеракције са ct-DNA и BSA у одсуству и присуству маркера.

Кључне речи

- Комплекси бакра(II)
- Комплекси сребра(I)
- Комплекси злата(III)
- Азоли
- Спектроскопска карактеризација
- DFT прорачуни
- Антимикробна активност
- Цитотоксичност
- Ембриотоксичност
- Интеракције са биомолекулима

Abstract

In this doctoral dissertation, copper(II), silver(I) and gold(III) complexes with antifungal azoles were synthesized. In the first part of this thesis, antifungal agents used in medicine for the treatment of fungal infections are described. In addition, metal complexes with azoles as potential therapeutic agents are reviewed. In the second part, procedures for the synthesis of copper(II), silver(I) and gold(III) complexes with azoles (imidazole, 1-isopropylimidazole, 1-phenylimidazole, fluconazole, itraconazole, miconazole, clotrimazole, econazole, tioconazole and voriconazole) and methods for their structural characterization and biological evaluation are given. In the part of the dissertation related to the Discussion of the obtained results, the spectroscopic and crystallographic characteristics of the synthesized complexes and the results obtained by evaluation of their biological activity (antimicrobial, antitubercular and antiproliferative) are presented in detail, as well as their embryotoxicity in the zebrafish model *Danio rerio*. The synthesized complexes with different azoles were structurally characterized by spectroscopic (NMR, IR, UV-Vis), electrochemical (cyclic voltammetry) and crystallographic methods (single-crystal X-ray diffraction analysis), mass spectrometry and molar conductivity measurements. The antimicrobial and antitubercular activities of the synthesized complexes were investigated and compared with their cytotoxicity on the healthy human lung fibroblast cell line (MRC-5). DFT calculations were used to explain the structure of the synthesized complexes in solution. To define the mechanism of antimicrobial action of the complexes, their interactions with ct-DNA and BSA in the absence and presence of site markers were studied.

Keywords

- Silver(I) complexes
- Copper(II) complexes
- Gold(III) complexes
- Azoles
- Spectroscopic characterization
- DFT calculations
- Antimicrobial activity
- Cytotoxicity
- Embryotoxicity
- Interactions with biomolecules

САДРЖАЈ

1. ОПШТИ ДЕО	1
1.1. Гљивичне инфекције	2
1.2. Антифунгални агенси	5
1.2.1. Полиени	5
1.2.2. Ехинокандини	6
1.2.3. Аналоги пиримидина	6
1.2.4. Алиламини	7
1.2.5. Азоли	7
<i>Азоли прве генерације</i>	<i>10</i>
<i>Миконазол</i>	<i>10</i>
<i>Еконазол</i>	<i>11</i>
<i>Тиоконазол</i>	<i>12</i>
<i>Клотримазол</i>	<i>12</i>
<i>Азоли друге генерације</i>	<i>13</i>
<i>Итраконазол</i>	<i>15</i>
<i>Флуконазол</i>	<i>15</i>
<i>Азоли треће генерације</i>	<i>16</i>
<i>Вориконазол</i>	<i>17</i>
1.2. Комплекси метала са азолима као потенцијални терапеутски агенси	17
2. ПРЕДМЕТ ИСТРАЖИВАЊА	32
3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО	35
3.1. Хемикалије и реагенси	36
3.2. Синтезе комплекса Cu1 , Ag1 , Ag2 и Au1 – Au8	36
3.2.1. Добијање $\{[CuCl_2(fcz)_2] \cdot 5H_2O\}_n$ (Cu1) комплекса	36
3.2.2. Добијање $[Ag(icz)_2]NO_3 \cdot H_2O$ (Ag1) и $[Ag(NO_3)(mcz)_2]$ (Ag2) комплекса	36
3.2.3. Добијање $[AuCl_3(im)]$ (Au1), $[AuCl_3(ipim)]$ (Au2), $[AuCl_3(phim)]$ (Au3), $[AuCl_3(ctz)]$ (Au4), $[AuCl_3(ecz)]$ (Au5), $[AuCl_3(tcز)]$ (Au6), $[AuCl_3(vcz)]$ (Au7) и $[AuCl_3(mcz)]$ (Au8) комплекса	37
3.3. Карактеризација азола	39
3.4. Експериментална мерења	41
3.4.1. Кристалографски подаци и рендгенска структурна анализа за комплексе Cu1 , Ag1 , Ag2 , Au3 – Au5 и Au7	41

3.4.2. Елементална микроанализа	46
3.4.3. Масени спектри	46
3.4.4. IR спектри	46
3.4.5. UV-Vis спектри	46
3.4.6. ^1H NMR спектри	46
3.4.7. Моларна проводљивост	46
3.4.8. Волтаметријска мерења	47
3.5. Биолошка испитивања	47
3.5.1. Припрема хранљивих подлога за биолошка испитивања	47
Припрема Luria Bertani подлоге (LB-течна подлога)	47
Припрема Sabouraud dextrose подлоге (SAB)	47
Припрема RPMI подлоге	47
Припрема Spider подлоге	47
3.5.2. In vitro антимикробна активност	47
3.5.3. Цитотоксичност	48
3.5.4. Дејство комплекса на формирање хифа код <i>C. albicans</i>	48
3.5.5. Дејство комплекса на формирање и разарање претходно формираног биофилма код <i>C. albicans</i>	49
3.5.6. Адхезиони тест код <i>C. albicans</i>	49
3.5.7. Стварање реактивних кисеоничних врста (ROS) код <i>C. albicans</i>	49
3.5.8. Одређивање количине ергостерола код <i>C. albicans</i>	49
3.5.9. Анти-QS (quorum sensing) активност	50
3.5.10. Антитуберкулозна активност	50
3.5.11. Статистичка анализа	51
3.6. In vivo испитивање токсичности	51
3.6.1. Инфекција зебра рибица <i>C. albicans</i> сојем	51
3.6.2. Припрема за микроинјектирање	51
3.6.3. Инфекција ембриона зебра рибица	52
3.7. Интеракције са биомолекулима	52
3.8. Квантно-механички прорачуни	53
Молекулски докинг	53
4. ДИСКУСИЈА РЕЗУЛТАТА	54
4.1. Синтеза, карактеризација и антимикробна активност комплекса бакра(II) са флуконазолом	55
4.1.1. Опис кристалне структуре	56

4.1.2. Спектроскопска карактеризација Cu1 комплекса	57
4.1.3. Биолошка активност Cu1 комплекса	58
Антимикробна активност.....	58
Инхибиција филаментног раста и формирања биофилма <i>C. albicans</i> соја	59
Адхезиони тест.....	61
Биосинтеза ергостерола код <i>C. albicans</i> соја.....	61
4.1.4. Молекулски докинг.....	62
4.1.5. Интеракције Cu1 комплекса са биомолекулима	63
Интеракција са BSA	63
Интеракција са ct-DNA.....	64
4.2. Синтеза, карактеризација и антимикробна активност комплекса сребра(I) са итраконазолом.....	65
4.2.1. Опис кристалне структуре комплекса Ag1	65
4.2.2. Спектроскопска карактеризација	66
4.2.3. In vitro испитивање антифунгалне активности Ag1 комплекса	68
4.2.4. In vivo испитивање антифунгалне активности Ag1 комплекса	69
4.2.8. Интеракције Ag1 комплекса са BSA.....	70
4.3. Синтеза, карактеризација и антимикробна активност комплекса сребра(I) са миконазолом.....	71
4.3.1. Опис кристалне структуре.....	72
4.3.2. Спектроскопска карактеризација Ag2 комплекса	73
4.3.3. DFT прорачуни.....	75
4.3.4. Антимикробна активност Ag2 комплекса	77
4.3.5. Антитуберкулозна активност Ag2 комплекса	78
4.4. Синтеза, карактеризација и антимикробна активност комплекса злата(III) са различитим азолима.....	78
4.4.1. Опис кристалних структура комплекса Au3 – Au5 и Au7	79
4.4.2. Спектроскопска карактеризација Au1 – Au7 комплекса	80
4.4.3. Антифунгална активност Au1 – Au7 комплекса	82
4.4.4. Утицај Au1 – Au3 комплекса на биосинтезу ергостерола код <i>C. albicans</i> соја.....	84
4.4.5. Антибактеријска активност Au1 – Au7 комплекса	85
Испитивање анти-QS активности	87
4.4.6. Интеракције Au4 – Au7 са биомолекулима	88
4.5. Синтеза, карактеризација и антимикробна активност комплекса злата(III) комплекса са миконазолом	92

4.5.1. Спектроскопска карактеризација Au8 комплекса	92
4.5.2. DFT прорачуни	93
4.5.3. Антимикробна активност Au8 комплекса	95
Испитивање анти-QS активности	96
4.5.4 Антитуберкуозна активност Au8 комплекса	96
4.5.5. Интеракције Au8 комплекса са биомолекулима	97
Интеракције са BSA	97
Интеракције са DNA	97
5. ЗАКЉУЧАК	99
6. ЛИТЕРАТУРА	102
7. ПРИЛОГ	113
ЛИСТА СКРАЋЕНИЦА КОРИШЋЕНИХ У ДИСЕРТАЦИЈИ	132
СПИСАК СЛИКА	134
СПИСАК ТАБЕЛА	139
Биографија са подацима о досадашњем раду	141

1. ОПШТИ ДЕО

1.1. Гљивичне инфекције

Гљивичне инфекције представљају сталну и озбиљну претњу за човека, његово здравље и живот.¹ Познато је да, од 1,5 милиона врсти гљивица, око 400 врста изазива болест код људи.^{2,3} Процењује се да је ова група микроорганизама одговорна за приближно милијарду инфекција и више од 1,7 милиона смртних случајева годишње.⁴ Епидемиолошки извештаји који су објављени у последње три деценије наглашавају појаву гљивичних инфекција код људи, како површинских, оралних, вагиналних, тако и инвазивних.⁵ Површинске гљивичне инфекције се манифестују на кожи, коси и ноктима и узрокују их дерматофите, као што су *Microsporum*, *Epidermophyton* и *Trichophyton*.⁶ Постоје сојеви гљивица, као што су *Rhodotorula*, *Saccharomyces* и *Candida*, који су присутни у људском организму или које уносимо храном, а да притом не изазивају гљивичне инфекције опасне по организам (опортунистички сојеви).^{7,8} Међутим, услед ослабљеног имуног система, ове врсте гљивица могу да изазову различите гљивичне инфекције. Гљивичним инфекцијама су посебно подложне имунокомпромитоване особе, пацијенти оболели од карцинома и дијабетеса, пацијенти инфицирани вирусом хумане имунодефицијенције (*human immunodeficiency virus*, HIV), пацијенти са неуродегенеративним обољењима, особе са имплантатима, катетерима и трансплантираним органима и сл.⁶

Постоје различите врсте гљивица из рода *Candida*, али само неколико њих узрокују површинске и инвазивне инфекције широм света. Гљивична инфекција изазвана врстама *Candida*, позната као кандидијаза, манифестује се на површини коже, слузокоже, репродуктивним органима, гастроинтестиналном тракту и сл. Међутим, уколико инфекција доспе у крвоток и друге органе, укључујући очи, срце, мозак и бубреге, може изазвати дисеминовану и инвазивну гљивичну инфекцију (IFI, *invasive fungal infection*), односно инвазивну кандидијазу. Врсте гљивица из рода *Candida* су присутне у чак 400 000 системских гљивичних обољења.⁹⁻¹¹ Од свих *Candida* врста, *C. albicans* је узрочник око 70% гљивичних инфекција широм света и најчешће изазива инфекције слузокоже, системских и инвазивних инфекција.¹² Иако је *C. albicans* најчешћи по живот опасни патоген од 20 различитих *Candida* врста за које је познато да изазивају бројне инфекције, недавна испитивања су показала да се глобална епидемиологија кандидијазе тренутно мења ка другим врстама, као што су *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* и *C. krusei*.^{13,14} Истраживања су показала да се инвазивна кандидијаза коју узрокују *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* и *C. krusei* налази на четвртном месту инфекција крвотока широм света, са око 750 000 оболелих пацијената годишње.¹⁵ Између осталог, пацијенти са карциномом и дијабетесом, пацијенти са трансплантираним органима, као и они на одељењима интензивне неге, су најподложнији инвазивним гљивичним инфекцијама.¹⁶ Ограничен број антимикотика представља велики проблем у лечењу IFI, што доводи до високе стопе морбидитета и морталитета.^{17,18} Стопа смртности услед ових инфекција је преко 40% упркос примењеној терапији.⁹ Код пацијената са хематолошким и другим малигнитетима, код новорођенчади и код пацијената на одељењима интензивне неге пронађене су *C. tropicalis* и *C. glabrata*, док инфекције изазване *C. parapsilosis* и *C. krusei* врстама представљају посебан ризик код пацијената са хематолошким малигнитетима и пацијената који су на терапији кортикостероидима.¹⁹ Поред ових *Candida* врста, и друге врсте гљивица које припадају родовима као *Aspergillus*, *Cryptococcus*, *Fusarium* и *Pneumocystis* изазивају различита гљивична обољења, инфекције, алергије и тровање.²⁰

Поред тога што узрокују различите врсте инфекција, неки микроорганизми узрокују и одређене тропске болести, што може имати великих последица за човека и животну

средину. Тропске болести представљају групу болести које се јављају, пре свега, у земљама са ниским животним стандардом, лошим хигијенским условима и неадекватном здравственом заштитом. Процењује се да постоји око 20 врста ових болести од којих су најпознатије трипанзонијаза, лајшманиоза и маларија. Од ових болести оболи око 1,7 милијарди људи годишње, при чему долази до 200 000 смртних случајева.²¹

Трипанзонијаза је паразитска болест узрокована паразитом из рода *Trypanosoma*. Постоје две врсте ове болести, америчка и афричка трипанзонијаза. Америчка трипанзонијаза је позната и као Шагасова болест и изазива је паразит *Trypanosoma cruzi*, а преносе је тропске стенице.²² Поред тога, ова болест се може пренети и путем трансфузије крви, услед трансплантације органа и конзумирањем хране контаминираних паразитима и карактеристична је за земље Латинске Америке.^{22,23} Афричка трипанзонијаза или болест спавања је паразитско обољење које изазива паразит *Trypanosoma brucei* и коју преноси инфицирана „цеце” мува. Ова болест је карактеристична за рурална подручја, пре свега за земље Источне и Западне Африке. Јавља се у две фазе, при чему у првој фази долази до грознице, главобоље и бола у зглобовима, а у другој фази, која почиње после неколико недеља, долази до конфузије, укочености и проблема са спавањем. Ова болест често има смртни исход.²⁴⁻²⁶

Лајшманиоза је паразитска болест коју узрокује паразит из рода *Leishmania*, и коју преносе пешчане мушице. Постоје три различите клиничке манифестације болести: кожна, кожно-слузокожна и висцеларна лајшманиоза (кала-азар).^{27,28} Манифестује се појавом чирева на кожи, односно чирева у устима и носу, док се код кала-азара, поред чирева, уочава увећање јетре и слезине, као и смањен број црвених крвних зрнаца. Ова болест је карактеристична за Јужну и Централну Америку, Блиски исток и Централну Азију.^{27,28}

Маларију узрокује паразит из рода *Plasmodium*, који се састоји од неколико врста (*Plasmodium malariae*, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale* и *Plasmodium knowlesi*). Неке од *Plasmodium* врста изазивају болест код људи. Женка комарца из рода *Anopheles*, преносилац је овог паразита. Након уједа женке комарца, овај паразит улази у крвоток човека, доводећи до инфекције. Различита испитивања су показала да се учесталост инфекције паразитима маларије повећала од 2015. године. На пример, 2017. године је од маларије оболело 219 милиона људи, узрокујући 435 000 смртних случајева. Ова болест је најзаступљенија у тропским крајевима и у Африци.²⁹

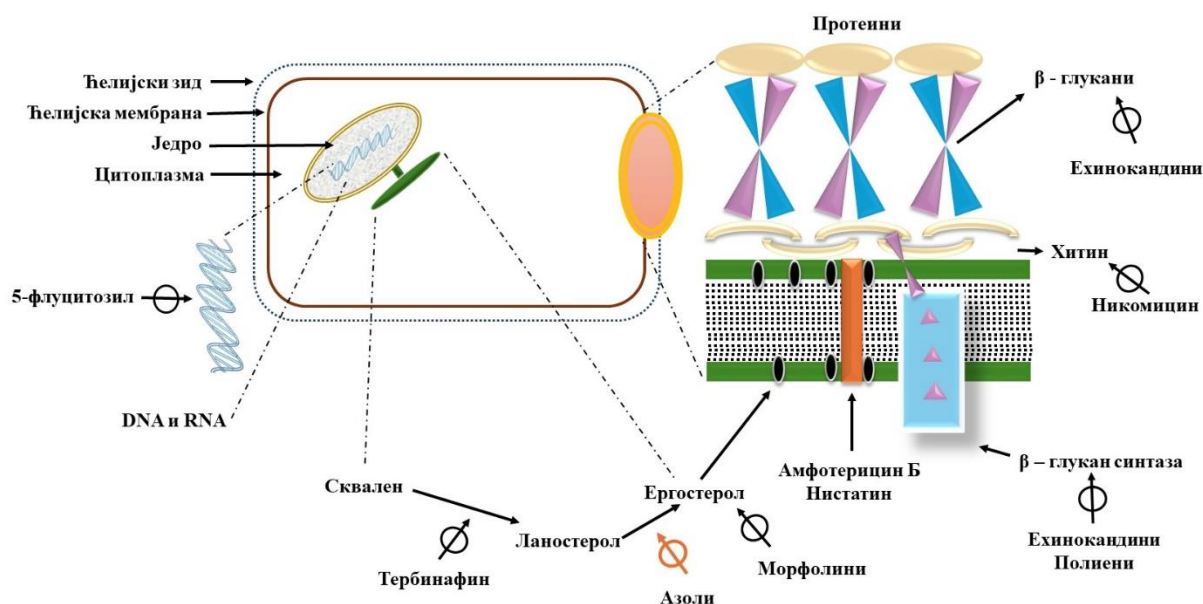
Гљивице и други микроорганизми попут бактерија, паразита и вируса, изазивају велики број инфекција за чије лечење се користе антимикиробни лекови. Међутим, велики проблем у лечењу ових инфекција представља појава резистентности микроорганизма на лекове који се користе у терапији што доводи до 1,27 милиона смртних случајева годишње.³⁰ Антимикиробна резистентност (*antimicrobial resistance*, AMR) настаје током времена, услед чега долази до генетске промене патогена који развијају резистентност на једињења која улазе у састав антимикиробних лекова.³⁰ Пораст антимикиробне резистентности се сматра озбиљном претњом по здравље људи, животиња и биљака, за безбедност хране и економски развој. Истраживања су показала да је највећи број смртних случајева забележен у Африци и Јужној Америци, односно у земљама са ниским стандардом и лошим хигијенским условима.³⁰ Светска здравствена организација (*World Health Organization*, WHO) сматра да антимикиробна резистентност представља озбиљну претњу за глобално здравље, при чему може узроковати 10 милиона смртних исхода годишње до 2050. године, с тим да би у Африци и Азији број умрлих био већи од 8,8 милиона.^{30,31} С обзиром на појаву резистентности микроорганизма на деловање постојећих антимикиробних агенаса, неопходно је синтетисати нове врсте лекова који ће се користити у лечењу инфекција изазваних микроорганизмима.³⁰

Бактерије и вируси представљају велики проблем јавног здравља, док се гљивицама и даље не посвећује значајна пажња у смислу дизајна нових лекова.³² Како гљивице доводе до компликација и представљају један од главних узрочника смрти пацијената оболелих од канцера,^{33,34} онда је од изузетне важности податак да се предвиђа пораст стопе смртности од туморских обољења са 18,1 милиона случајева из 2018. године на 29,4 милиона у 2040,^{21,35} што указује на неопходност развоја нових антифунгалних агенаса.

Важно је напоменути да се ћелије гљивица по грађи разликују од ћелија бактерија. За разлику од бактерија које имају проокариотски тип ћелија, ћелије гљивица су еукариотског типа и могу бити једноћелијски (квасци и буђи) и вишећелијски организми. Приликом деловања антифунгалног агенса, велики проблем представља сличност између ћелија гљивица са хуманим и анималним ћелијама. С обзиром на ову чињеницу, веома је тешко дизајнирати нове лекове који ће бити ефикасни у третману гљивичних инфекција, а да истовремено не испољавају токсично дејство на људски организам.

Док се за лечење бактеријских инфекција користи око 20 различитих класа антибиотика, за лечење гљивичних инфекција у употреби је само пет класа антимицотика и то су: 1) полиени, 2) азоли, 3) ехинокандини, 4) алиламини и 5) аналози пириимидина.^{36,37} Антифунгални лекови могу деловати на различите начине (Слика 1):

1. повећање пропустљивости ћелијске мембране, доводећи до нарушавања њеног интегритета;
2. инхибиција синтезе ћелијског зида;
3. инхибиција синтезе нуклеинских киселина;
4. инхибиција митозе.



Слика 1. Шематски приказ антифунгалног деловања различитих антимицотика

Нажалост, сви клинички коришћени антифунгални лекови имају значајна ограничења, од озбиљне системске токсичности, токсичности специфичне за поједине органе (нефротоксичност и хепатотоксичност) до ограничене примене. Међутим, тренутно највећу забринутост изазива појава резистенције *Candida* врсти на све класе антифунгалних

лекова, посебно на азоле, и све већи број клинички изолованих сојева који су резистентни на две или чак три класе антимикотика (мултирезистентни сојеви).

1.2. Антифунгални агенси

1.2.1. Полиени

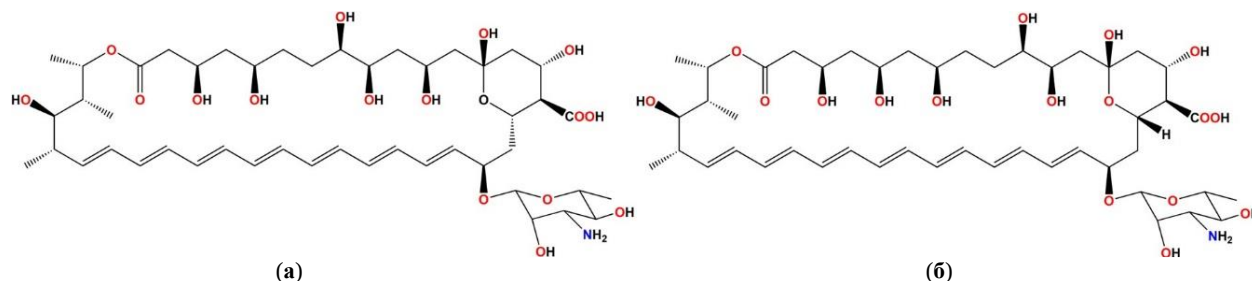
Полиени представљају класу антифунгалних агенаса и производе их одређене врсте Грам-позитивних бактерија. Делују тако што се везују за ергостерол, компоненту гљивичне мембране, при чему долази до промене у њеној пермеабилности. Најпознатији полиен је амфотерицин Б (Слика 2а) који је откривен педесетих година прошлог века и представља први агенс који је примењен у лечењу гљивичних инфекција.^{38,39} Представља производ метаболизма Грам-позитивне бактерије *Streptomyces nodosus*. Утврђена су два механизма деловања амфотерицина Б:

1. Инкорпорација у липидни двослој гљивица, уз везивање за ергостерол, при чему долази до нарушавања интегритета ћелије. На тај начин долази до формирања пора и отпуштања K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} и Cl^- јона и глукозе. Услед брзог отпуштања ових јона и молекула глукозе, долази до смрти ћелије гљивица.

2. Индуција акумулације реактивних кисеоничних врста (*reactive oxygen species*, ROS), које доводе до оштећења деоксирибонуклеинске киселине (DNA), протеина, митохондрија и ћелијске мембране.^{39,40}

Амфотерицин Б има широк спектар деловања и користи се за лечење инфекција које изазивају *Candida*, *Aspergillus* и *Cryptococcus* врстама. Поред тога, користи се за лечење многих инфективних болести. Услед коришћења овог полиена, ретко долази до појаве резистентности, која се, ипак, може јавити код неких *Candida* врста, као што су *C. glabrata* и *C. krusei*.³⁸⁻⁴⁰ У формулацији лека, због своје слабе растворљивости, амфотерицин Б се везује за натријум-деоксихолат, при чему се након интравенозне примене, ослобађа од деоксихолата и везује за липопротеине у плазми и акумулира у слезини и јетри. Не разлажу га цитохром Р450 ензими, док се непромењен излучује урином (33%) и фецесом (43%).³⁸⁻⁴⁰ Приликом примене амфотерицина Б, долази до појаве нежељених ефеката, као што су нефротоксичност, анемија, поремећаји функције јетре и тромбоцитопенија. Како би се смањила токсичност, примењује се липидна формулација амфотерицина Б. Поред те формулације, комерцијално су доступне и липозомална формулација и колоидна дисперзија амфотерицина Б.³⁸⁻⁴⁰

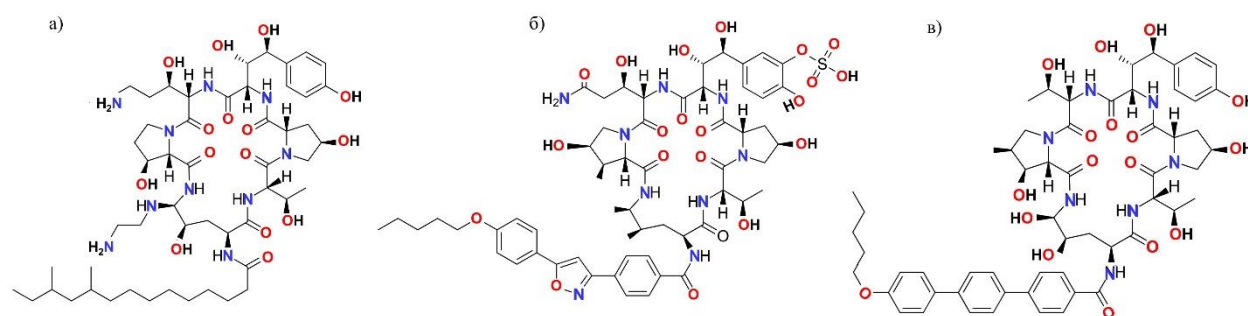
Нистатин је полиен који је по структури и механизму деловања сличан амфотерицину Б (Слика 2б). Користи се за лечење оралне и вагиналне кандидијазе као и у терапији гљивичних инфекција коже.⁴¹



Слика 2. Структурне формуле амфотерицина Б (а) и нистатина (б)

1.2.2. Ехинокандини

Ехинокандини представљају класу антифунгалних агенаса, која је откривена седамдесетих година прошлог века. То су циклични хексапептиди са бочним липидним ланцем који настају као производи ферментације неких врста гљивица, као што су *Aspergillus rugulovalvus*, *Zalerion arboricola* и *Papularia sphaerosperma*.^{42,43} Модификацијом бочног ланца ехинокандина долази до повећања њихове активности према *Candida* врстама. Представници ове класе антифунгалних агенаса су каспофунгин, микафунгин и анидулафунгин (Слика 3). Ова класа антифунгалних агенаса делује тако што инхибира синтезу (1,3)- β -D-глюкана, глюкозног полимера, који је саставни део ћелијског зида многих патогених гљивица, укључујући *Candida* и *Aspergillus* врсте. Инхибиција (1,3)- β -D-глюкан синтазе доводи до дестабилизације ћелијског зида и до цурења интрацелуларних течности, што доводи до осмотске нестабилности и смрти ћелије. Ехинокандини се слабо апсорбују у гастроинтестиналном тракту због своје велике молекулске масе и стога се користе интравенозно. Каспофунгин (Слика 3а) се користи за лечење инвазивне кандидидијазе и као алтернативна терапија за лечење инвазивне аспергилозе. Микафунгин (Слика 3б) користи се за лечење кандидије и за лечење инфекција код пацијената са трансплантацијом коштане сржи, док се анидулафунгин (Слика 3в) користи за лечење пацијената са инсуфицијенцијом јетре или бубрега. Показују незнатну токсичност.^{42,43}

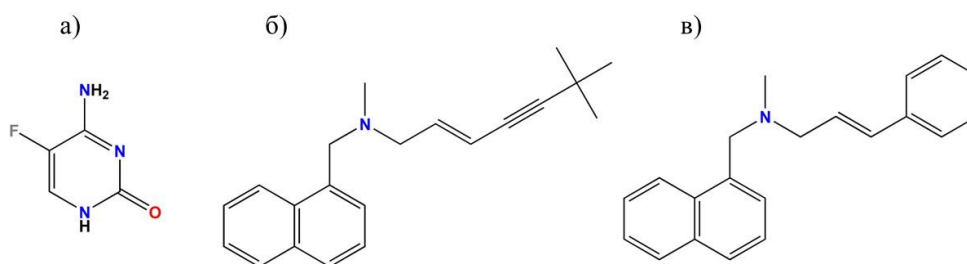


Слика 3. Структурне формуле каспофунгина (а), микафунгина (б) и анидулафунгина (в)

1.2.3. Аналоги пиримидина

5-Флуцитозин (Слика 4) представља дериват цитозина који је синтетисан 1957. године. Делује тако што изазива инхибицију синтезе нуклеинских киселина. Након транспорта до ћелије гљивица помоћу цитозин пермеазе, конвертује се у активну форму 5-флуороурацил, који даље прелази у 5-флуороурацил монофосфат помоћу уридин

фосфорибозилтрансферазе. 5-Флуороурацил монофосфат се затим може претворити у 5-флуороурацил трифосфат, који се уграђује у рибонуклеинску киселину (RNA) чиме инхибира синтезу протеина гљивице, односно у 5-флуородеоксиуридин монофосфат, који инхибира кључни ензим синтезе деоксирибонуклеинске киселине (DNA), тимидилат синтетазу.⁴³ Показује активност према *Candida* врстама, *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* и *C. tropicalis*. Због појаве резистентности, ретко се користи као појединачни агенс у терапији, већ се примењује у комбинацији са другим антимицотицима. Примера ради, у комбинацији са амфотерицином Б, користи се у лечењу криптококног менингитиса. Услед коришћења 5-флуцитозина, јављају се нежељени ефекти, као што су токсичност и оштећење коштане сржи.⁴³⁻⁴⁵



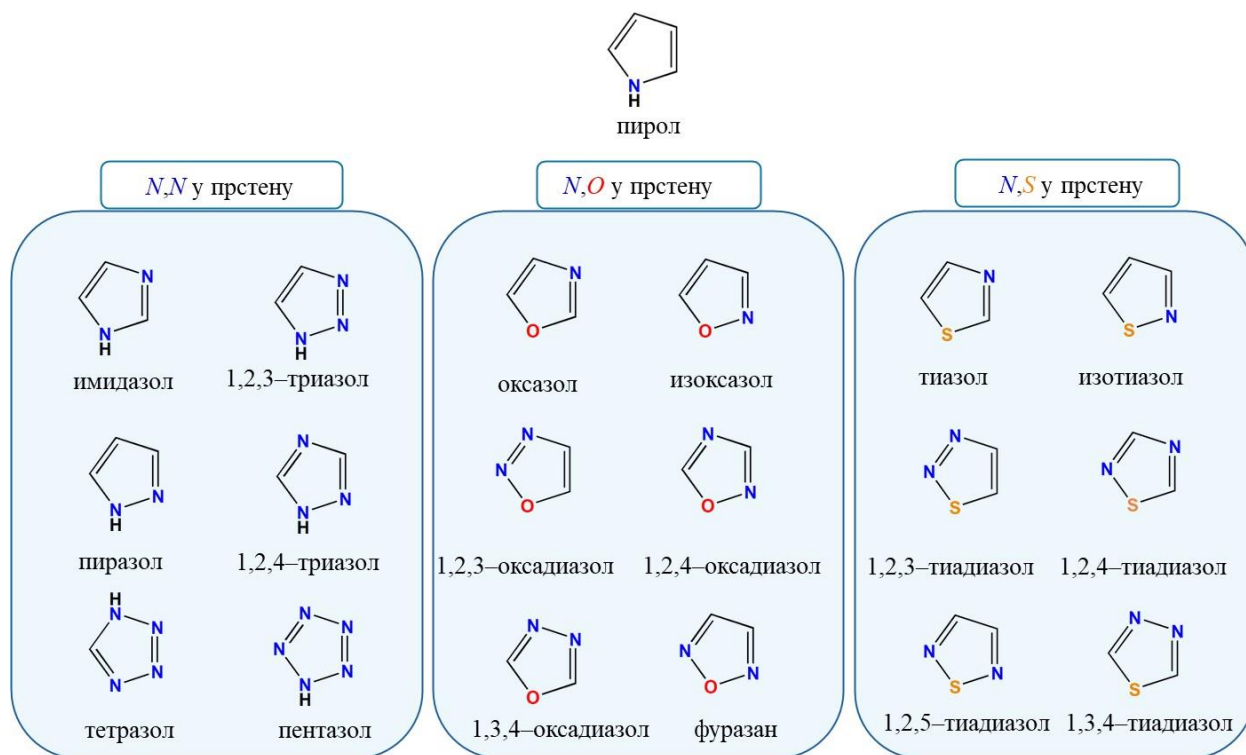
Слика 4. Структурне формуле 5-флуцитозина (а), тербинафина (б) и нафтифина (в)

1.2.4. Алиламини

Алиламини су класа антифунгалних агенаса која у структури садржи терцијарне алиламинске групе. Представници ове класе агенаса су тербинафин и нафтифин (Слика 4б и в).^{46,47} Делују тако што инхибирају ензим сквален епоксидазу, који је неопходан за синтезу ергостерола из сквалена. Инхибицијом овог ензима долази до нагомилавања сквалена, који је токсичан за ћелију гљивице. Тербинафин се користи у лечењу гљивичних инфекција коже, косе и ноктију, а такође показује и синергистичко деловање са другим антимицотицима. У лечењу орофарингеалне кандидијазе, показује значајну ефикасност у комбинацији са флуконазолом. Поред тога, истраживања су показала да тербинафин показује антифунгалну активност према гљивицама које су резистентне на итраконазол.^{46,47}

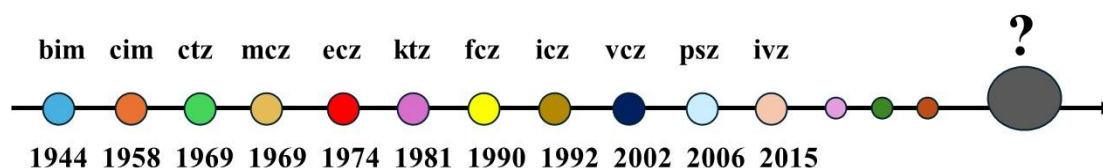
1.2.5. Азоли

Азоли су једињења која имају широку примену у лечењу гљивичних инфекција, због широког спектра антифунгалне активности, боље ефикасности и прихватљивог профила токсичности.⁴⁸ Овој групи антифунгалних агенаса припадају петочлана хетероциклична ароматична једињења која садрже најмање један атом азота у прстену и две двоструке везе.⁴⁹ Поред атома азота, у прстену се може наћи и неки други атом, као што је атом кисеоника, односно атом сумпора.^{49,50} У зависности од природе другог хетероатома, азоли су класификовани као имидазоли, оксазоли и тиазоли (Слика 5).⁵¹ Пирол представља најједноставнији азол.⁵⁰ У зависности од броја атома азота у прстену, азоли се могу су поделити на диазоле, триазоле и тетразоле.⁴⁹



Слика 5. Структурне формуле најједноставнијих азола

Први азол који је синтетисан четрдесетих година прошлог века био је бензимидазол (**bim**).⁵² Након тога, 1958. године синтетисан је хлоримидазол (**cim**), за кога је утврђено да показује значајну антифунгалну активност.⁴⁹ Према томе, хлоримидазол представља први дериват азола који је развијен и пласиран на тржиште као антифунгални лек.⁵³ Након овог открића, све више истраживачких група је радило на синтези ове класе једињења у циљу проналазке нових антифунгалних лекова (Слика 6).⁴⁹

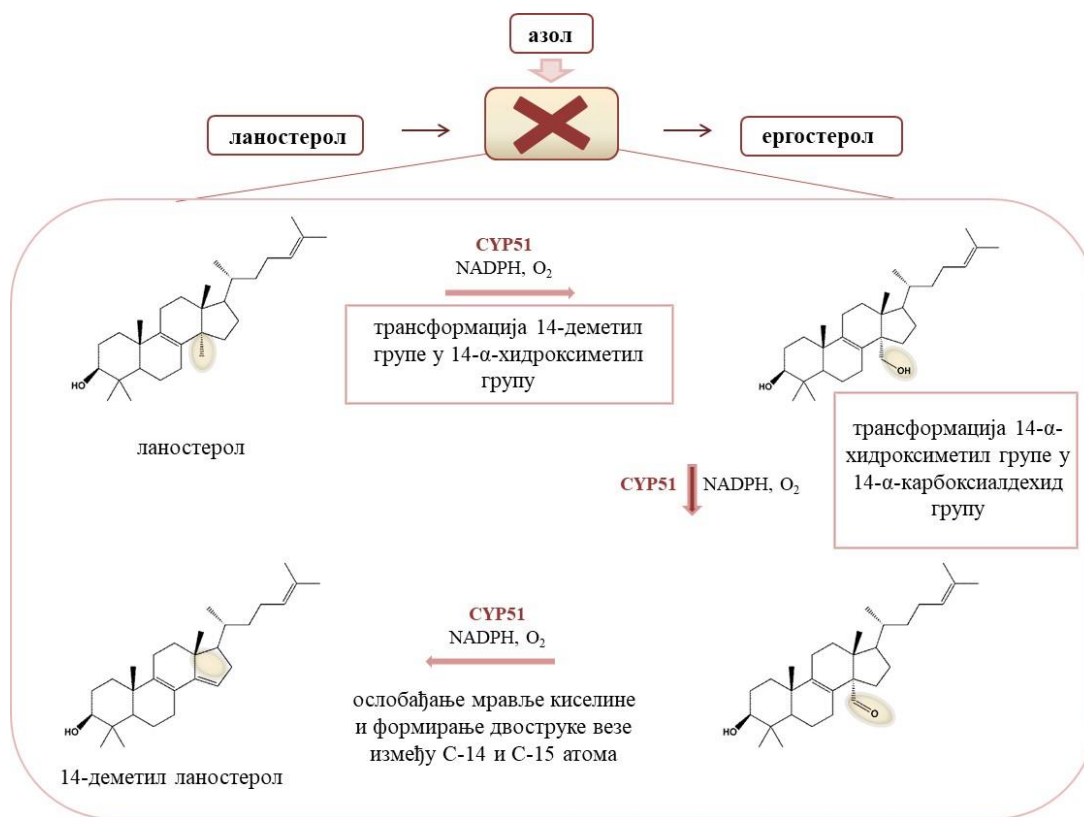


Слика 6. Године открића неких азола (**bim** = бензимидазол, **cim** = хлоримидазол, **ctz** = клотримазол, **mcz** = миконазол, **ecz** = еконазол, **ktz** = кетоконазол, **fcz** = флуконазол, **icz** = итраконазол, **vcz** = вориконазол, **psz** = посаконазол, **ivz** = изавуконазол)

Ова класа антифунгалних агенаса инхибира цитохром P450 ензиме укључене у синтезу ергостерола, који је основна компонента ћелијске мембране гљивица. Ергостерол представља дериват холестерола присутног код сисара.^{49,54,55} Делује као стимулатор раста и пролиферације у гљивичним ћелијама, због своје улоге сличне хормону. Ова функција може бити нарушена, ако се смањи концентрација ергостерола.^{53,54} Механизам деловања азола се заснива на инхибицији ланостерол-14 α -деметилазе (CYP51), једног од ензима из групе

цитохрома P450. Овај ензим је одговоран за конверзију ланостерола у 14-деметил ланостерол приликом биосинтезе ергостерола. CYP51 катализује конверзију 14- α -метил групе на ланостеролу у 14- α -хидроксиметил и 14- α -карбоксиалдехид, услед чега долази до ослобађања мравље киселине и формирања двоструке везе између C-14 и C-15 атома (Слика 7). Инхибицијом овог ензима повећава се концентрација ланостерола и 14- α -метилстерола, а смањује се концентрација ергостерола, што доводи до нагомилавања токсичних интермедијерних производа, односно долази до промене у пермеабилности и флуидности ћелијске мембране, доводећи до инхибиције раста, односно смрти ћелија.⁴⁹

Ензим CYP51 представља протопорфирински комплекс гвожђа(III) за који се везују електронски парови атома азота из имидазола, односно триазола, инхибирајући оксидацију стероидних супстрата ензима. Долази и до других интеракција са циљним молекулом у зависности од преостале структуре азола. Највећу активност показују азоли са два односно три ароматична прстена од којих најмање један као супституент садржи неки халоген, при чему највећој активности доприноси флуор. Азоли имају и неполарни део молекула у својој структури, што доприноси његовом липофилном карактеру. За већину азола је карактеристично да су нерастворни у води, а растворни су у већини органских растварача.^{49,54,55}



Слика 7. Механизам антифунгалног деловања азола

На основу сличних физичко-хемијских особина и структуре, азоли се могу поделити на азоле прве, друге, треће и четврте генерације.^{53,56}

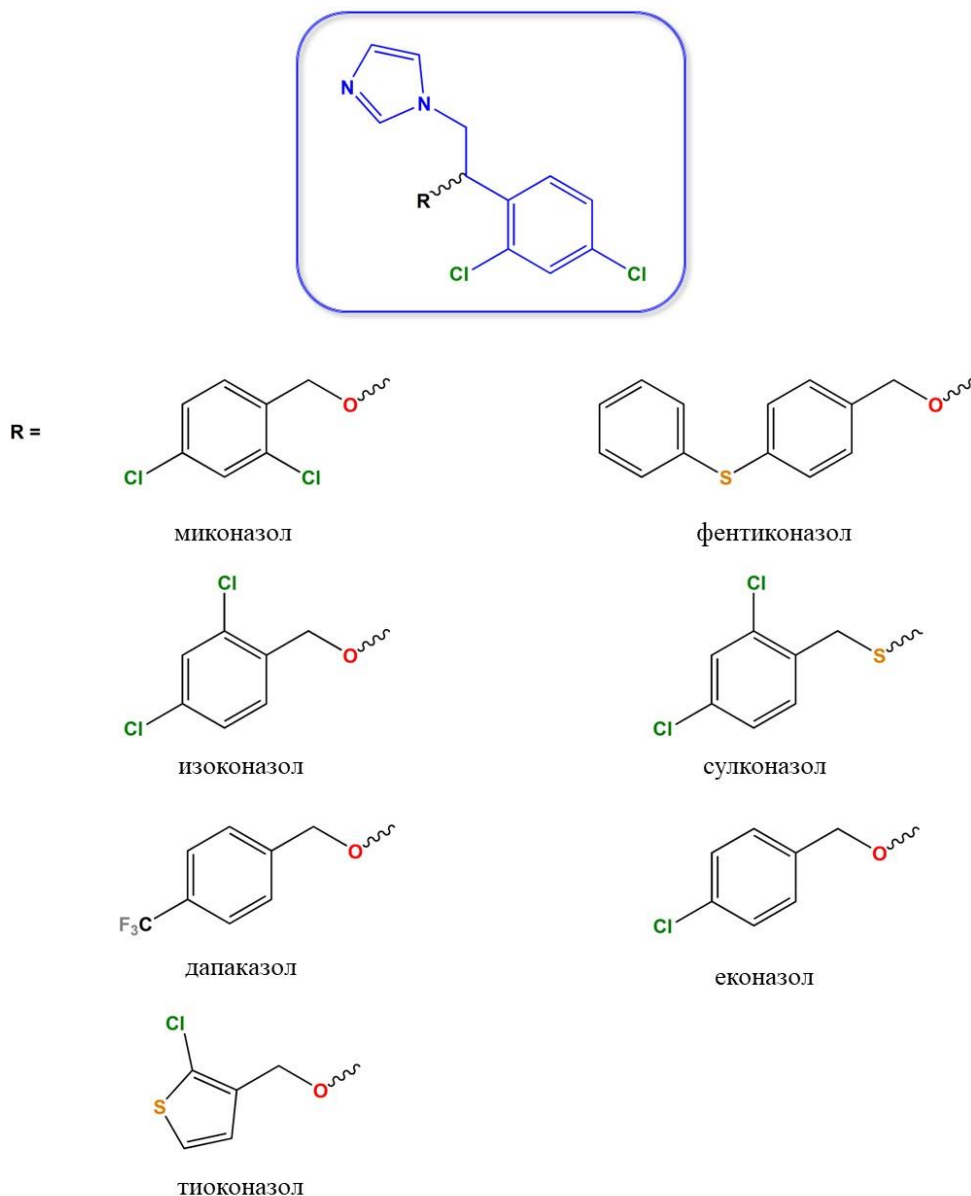
Азоли прве генерације

Најпознатији антимиотици из групе азола прве генерације су клотримазол, миконазол и еконазол. Ова три азола су међу првим синтетисаним азолима који су примењени као антифунгални агенси.⁵³ Након ових азола, синтетисана су нова аналогна једињења, која се због сличних физичко-хемијских особина, сврставају у азоле прве генерације. Ова група азола се користи у лечењу површинских гљивичних инфекција, као што су дерматомикозе и у лечењу кожных и вагиналних кандидијаза. Азоли прве генерације се могу класификовати у три групе у зависности од тога да ли имају структуру сличну миконазолу, клотримазолу или дериватима винил-имидазола.⁵³ Структуру сличну миконазолу (Слика 8) имају еконазол, дапаконазол, изоконазол, тиоконазол, фентиконазол, сертаконазол, оксиконазол, сулконазол, бутконазол, циноконазол и сл. Структуру сличну клотримазолу (Слика 9) имају бифоназол, еберконазол, бекликоназол и флутримазол, док структуру сличну винил-имидазолу имају нетиконазол, луликоназол, кроконазол и омоконазол.⁵³

Миконазол

Миконазол (**mcz**) представља један од најраније синтетисаних азола који су примењивани у антифунгалној терапији. Показује широк спектар антифунгалне активности према различитим *Candida* врстама (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. pseudotropicalis*, *C. parapsilosis* и *C. tropicalis*).^{57–60} Поред тога, овај антифунгални агенс показује *in vitro* антибактеријску активност према неким Грам-позитивним бактеријама, као што су *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* и *Erysipelothrix insidiosa*, док су Грам-негативне бактерије релативно резистентне.⁵⁹ Миконазол показује активност према патогеним квасцима, диморфним и филаментозним гљивицама, као што су *Aspergillus* врсте, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum* и *Pseudallescheria boydii*.^{57–60} Користи се за лечење атлетског стопала (*tinea pedis*), гљивичних инфекција ингвиналног предела (*tinea cruris*) и гљивичног обољења коже (*tinea corporis*) које су узроковане дерматофитама (*Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes* и *Epidermophyton floccosum*) при концентрацији од 1 µg/mL. Користи се за лечење орофарингеалне, вулвовагиналне и мукозне кандидијазе. Показује фунгицидни ефекат при ниским концентрацијама од 0,01 µg/mL.⁶⁰ Антимикробно деловање миконазола се односи на његову способност да изазива директно оштећење ћелијске мембране, чиме инхибира биосинтезу ергостерола, али може негативно утицати и на остале физиолошке параметре патогена.^{58,61,62} Примера ради, може утицати на производњу реактивних кисеоничних врста (ROS), које даље оштећују ћелију, доводећи до њене некрозе.⁶²

Након уношења у организам, миконазол се складишти у телесним течностима, док се делимично излучује путем гастроинтестиналног тракта. Токсични ефекти примене овог агенса укључују проблеме гастроинтестиналног тракта (мучнина, повраћање и дијареја), осип, грозницу, главобољу и хипонатријемију.⁶³ Иако је резистенција гљивица на миконазол у почетку била ретка, појавом HIV инфекције, постала је чест проблем.^{64–66}



Слика 8. Структурне формуле азола прве генерације који су слични миконазолу

Еконазол

Еконазол (**ecz**; Слика 8) представља дериват миконазола, при чему у структури има један атом хлора мање од миконазола.⁶⁰ Користи се за лечење кожных инфекција узрокованим дерматофитама као што су површинске микозе, гљивичне инфекције ингвиналног предела (*tinea cruris*), гљивична обољења коже на стомаку (*tinea corporis*), у лечењу дерматофитоза и вагиналних кандидијаза.⁶⁰ У потпуности инхибира раст дерматофита *Microsporium* врста (*Microsporium gypseum* и *Microsporium audouini*) (MIC = 0,1 – 1,0 µg/mL; MIC је минимална концентрација инхибитора која у потпуности зауставља раст ћелија микроорганизама) као и *Trichophyton* врста (*Trichophyton tonsurans*, *Trichophyton rubrum* и *Trichophyton mentagrophytes*) (MIC = 0,01 – 1,0 µg/mL).⁶⁰ Ове врсте дерматофита узрокују обољење коже стопала између прстију, познатије као атлетско стопало (*tinea*

pedis).⁶⁰ Еконазол показује сличну *in vitro* антифунгалну активност као миконазол према различитим *Candida* врстама (MIC = 0,25 – 32,0 µg/mL).⁶⁰ Поред тога, показује антифунгалну активност према *Aspergillus niger*, *Madurella grisea*, *Madurella mycetomatis*, *Sporothrix schenckii*, *Blastomyces dermatitidis* и *Histoplasma capsulatum*.^{60,67} Слично миконазолу, овај антифунгални агенс показује *in vitro* антибактеријску активност према неким Грам-позитивним бактеријама.⁶⁰

Еконазол, као и други азоли, инхибира биосинтезу ергостерола. Поред тога, стимулише ослобађање калцијума у ендоплазматичном ретикулуму, док истовремено блокира прилив нових количина калцијума у ћелију.⁶⁸ На овај начин еконазол троши залихе калцијума у ћелији, доводећи до инхибиције у синтези протеина и смрти ћелије.⁶⁸ Како су ћелије тумора осетљиве на овај механизам, испитивана је цитотоксичност еконазола према ћелијским линијама тумора дојке, остеосаркома, простате, дебелог црева и леукемије.^{68–73} Поред тога, прелиминарни резултати *in vivo* испитивања су показали да еконазол инхибира раст тумора код мишева. Међутим, због слабе растворљивости у води и реактивности према протеинима, његова примена је ограничена. Примењује се у различитим формулацијама, укључујући масти, креме, растворе и гелове. Фунгицидна активност еконазола зависи од концентрације и времена изложености, при чему место инфекције треба константно бити изложено овом агенсу.⁶⁷ Поред тога, нежељени ефекти након примене еконазола укључују иритацију, црвенило, пецкање и свраб.⁷⁴

Тиоконазол

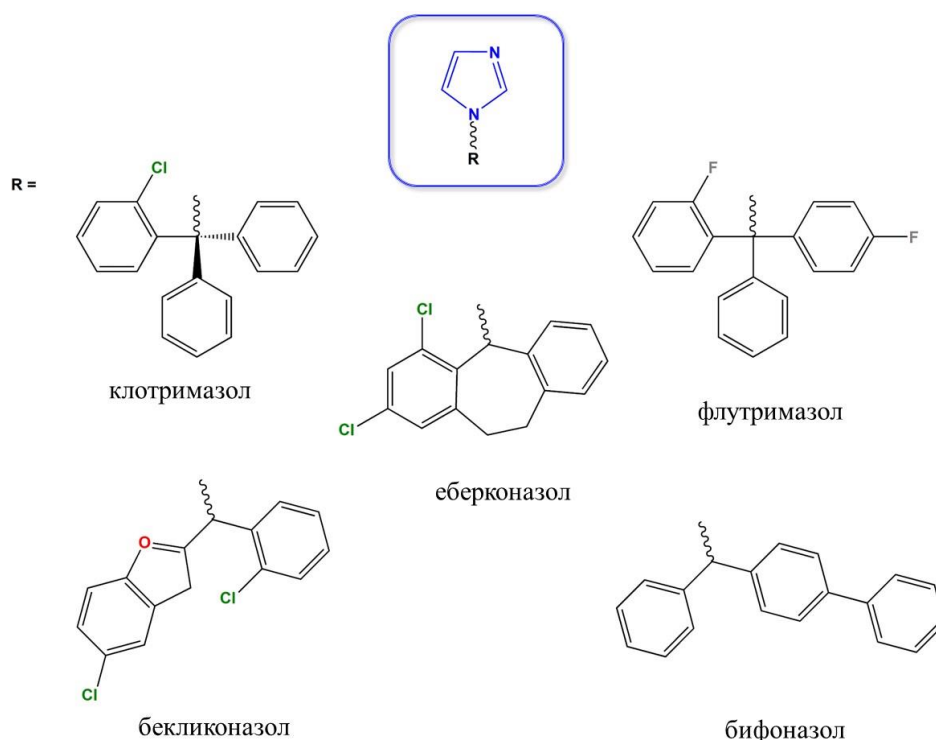
Слично другим азолима, тиоконазол (**tcz**; Слика 8) показује антифунгалну активност према различитим *Candida* врстама (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. pseudotropicalis* и *C. tropicalis*), *Cryptococcus neoformans* и *Torulopsis glabrata* са MIC вредностима од 0,05 до 12,5 µg/mL.⁶⁰ Поред тога, инхибира раст квасаца, плесни и многих дерматофита (*M. canis*, *M. gypseum*, *T. rubrum* и *T. mentagrophytes*) са MIC вредностима од 0,08 до 0,5 µg/mL.⁶⁰ Инхибира раст *Aspergillus* врста, као што је *Aspergillus fumigatus* која изазива болест код особа са имунодефицијенцијом (MIC = 3,1 – 9,4 µg/mL). Тиоконазол делује и на паразите као што је *Trichomonas vaginalis*, који је узочник вагиналне трихомонијазе. Овај антифунгални агенс показује *in vitro* антибактеријску активност према неким Грам-позитивним бактеријама, као што су: *Gardnerella vaginalis*, *Corynebacterium minutissimum* и *Staphylococcus epidermidis*.^{75–77} Тиоконазол показује бољу антифунгалну активност од клотримазола, еконазола, кетоконазола и миконазола према *Candida* врстама.⁷⁵ Користи се за лечење површинских микоза, посебно оних које су последица гљивичних инфекција коже и ноктију,⁷⁵ као и за лечење вагиналне кандидијазе.^{76,77} Примењује се у виду топикалног раствора у концентрацијама од 28% за лечење онихомикозе (гљивична инфекција ноктију), услед чега се могу јавити нежељени ефекти, као што су контактна алергија, свраб и иритација.^{75,77} У клиничким испитивањима пацијената са дерматофитозом, високе стопе излечења (85 – 95%) су постигнуте након третмана кремом која садржи 1% тиоконазола.^{60,78}

Клотримазол

Клотримазол (**ctz**; Слика 9) представља један од најчешће коришћених антифунгалних агенаса. Састоји се од четири ароматична прстена везана за тетраедарски (sp³ хибридизовани) атом угљеника, због чега је овај атом стерно заклоњен. Један од тих

прстенова је имидазолов прстен који има улогу у преносу електрона у биолошким системима.⁷⁹ Преостали ароматични прстенови чине трифенилметил систем, који формира и стабилизује радикалске интермедијере.⁷⁹⁻⁸¹ Поред тога, један од тих прстенова садржи хлор као супституент на С2 положају. Иако је клотримазол ахиралан молекул, његова два фенил прстена су енантиотропна, при чему један има R, а други S конфигурацију.^{79,82}

Поред еконазола и миконазола, клотримазол се користи као антимикотик у лечењу инфекција које су узроковане изолатима *T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, *E. floccosum* и *M. canis*, као што су атлетско стопало (*tinea pedis*), гљивичне инфекције ингвиналног предела (*tinea cruris*) и гљивично обољење коже на стомаку (*tinea corporis*).^{79,82} Користи се и за лечење вулвовагиналне и орофарингеалне кандидијазе.⁷⁹ Клотримазол инхибира раст многих *Candida* врста, укључујући *C. albicans*. Показује *in vitro* антибактеријску активност према неким Грам-позитивним бактеријама, као што су *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* и *Corynebacterium minutissimum*.^{82,83} Клотримазол је први пут регистрован као канестен (Canesten®) 1973. године. Недостатак клотримазола је недовољна орална биорасположивост. Креме, лосиони, спрејеви или раствори који се користе за лечење гљивичних инфекција коже садрже 1% клотримазола. Услед њихове примене, могу се јавити црвенило, пецкање, осип, перутање коже и свраб.⁷⁹⁻⁸³

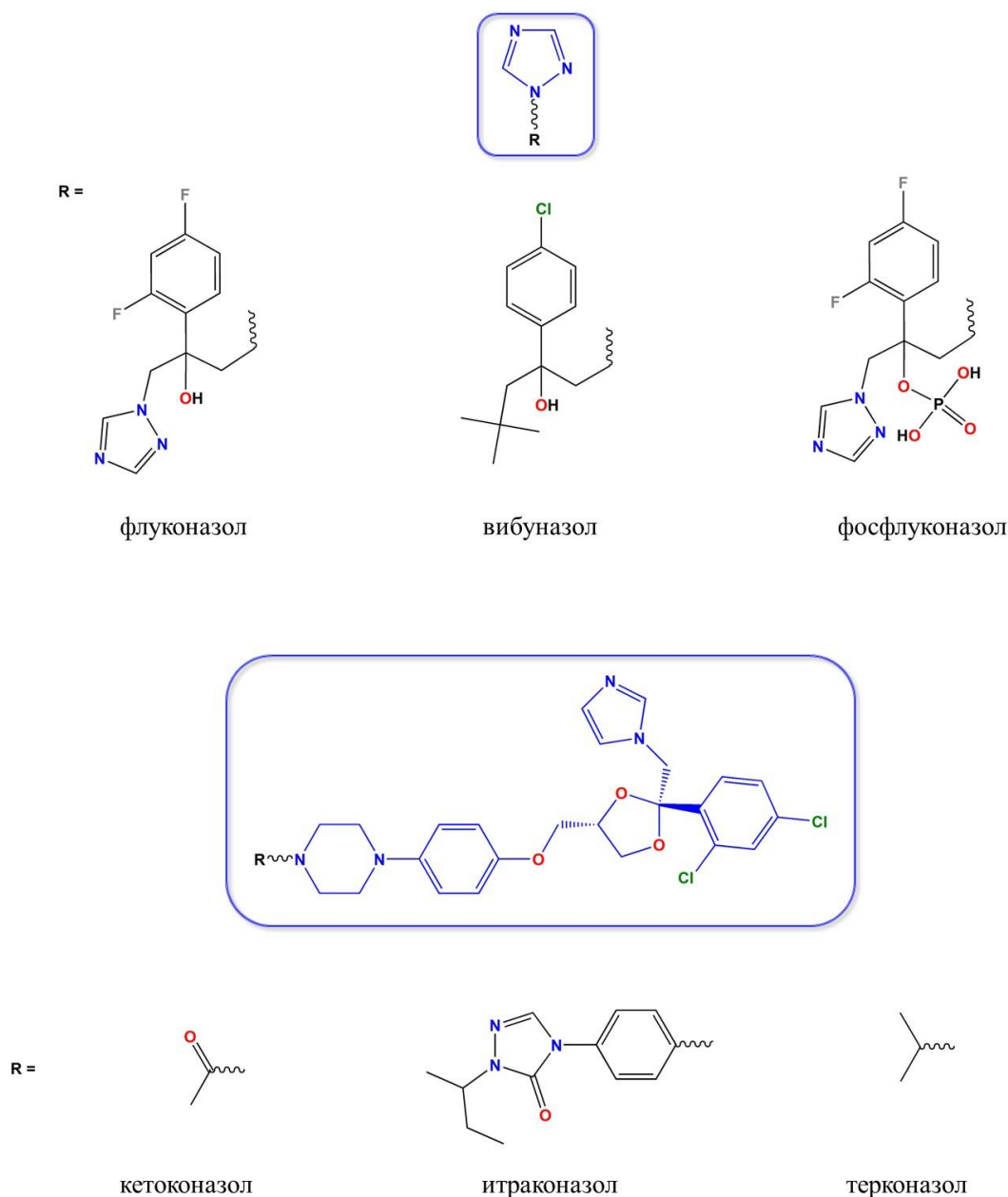


Слика 9. Структурне формуле азола прве генерације сличних клотримазолу

Азоли друге генерације

Узимајући у обзир пораст инвазивних гљивичних инфекција и резистентност на постојеће азоле, синтетисани су азоли друге генерације који имају бољи спектар деловања, боље фармакокинетичке особине и мању токсичност у односу на азоле прве генерације.⁵³

Сходно томе, азоли друге генерације се могу поделити у две групе у зависности да ли садрже имидазолов односно триазолов прстен. Азоли који садрже триазолов прстен имају модификовану структуру флуконазола (Слика 10). Предности ових азола јесу побољшана биорасположивост, селективност и мања токсичност.⁵³ С друге стране, азоли који садрже имидазолов прстен имају структуру сличну кетоконазолу, азолу који садржи функционалну групу хетероцикличног диоксана, замењујући кетон новом структуром дугог репа, док је имидазолни део сличан азолима прве генерације. Најпознатији представници друге генерације азола који садрже триазолов прстен су: флуконазол, вибуназол, фосфлуконазол итд, док су најпознатији представници друге генерације азола који садрже имидазолов прстен кетоконазол, итраконазол, терконазол итд (Слика 10).



Слика 10. Структурне формуле азола друге генерације

Итраконазол

Итраконазол (**icz**; Слика 10) представља триазол широког спектра деловања. Користи се као антифунгални агенс за превенцију и лечење инвазивних и површинских инфекција, укључујући оралну и вагиналну кандидијазу, менингеалну криптококозу, аспергилозу, онихомикозу и дерматофитозу.⁸⁴ Метаболише се у јетри, дајући преко 30 различитих метаболита. Широки спектар деловања овог терапеутика се може приписати његовом главном метаболиту *in vivo*, хидроксид-итраконазолу, који показује значајну антифунгалну активност.^{85,86} С обзиром на чињеницу да је итраконазол слаба база, ресорпцију његове оралне формулације (таблете и капсуле) помажу кисели напици. Након интензивних истраживања у циљу побољшања апсорпције и биодоступности итраконазола, развијене су две нове формулације: орални раствор и интравенозна формулација које се комбинују са хидроксипропил- β -циклодекстрином, који доприноси повећању апсорпције.⁸⁷ Итраконазол је липофилан молекул, а ткива као што су плућа, бубрези, јетра, кости, стомак и слезина акумулирају велике концентрације итраконазола.⁸⁵ Такође се акумулира у ткивима која су склона гљивичним инфекцијама, као што су кожа, нокти и женски генитални тракт.⁸⁸ Везује се за протеине при чему омогућује да концентрација лека на месту инфекције остане већа од одговарајућих концентрација у плазми. Након што се успостави равнотежа између ткива и плазме, што може потрајати и неколико дана, итраконазол се елиминише из ткива у складу са уобичајеним временом полураспада.⁸⁷⁻⁸⁹ Међутим, откако је итраконазол уведен у клиничку употребу раних деведесетих година прошлог века, примећена је резистентност међу клиничким изолатима, посебно код *Candida* врста. Поред тога, применом итраконазола се могу јавити нежељени ефекти, као што су бол у стомаку, мучнина, повраћање, дијареја, кардиотоксичност, хепатотоксичност, срчана инсуфицијенција и сл, што ограничава његову дуготрајну примену.⁹⁰

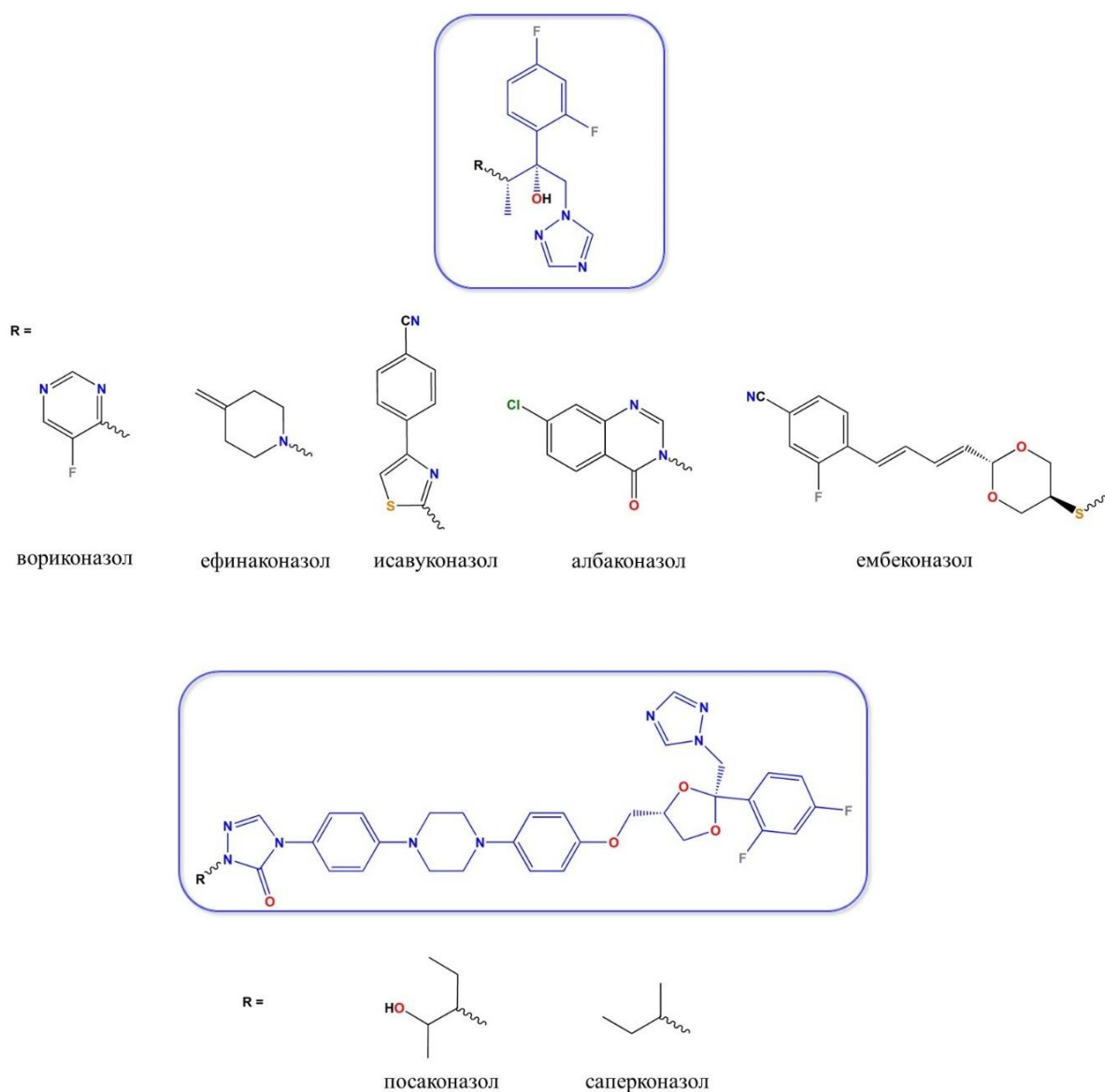
Флуконазол

Флуконазол (**fcz**; Слика 10) представља триазол широког спектра деловања и користи се за лечење гљивичних инфекција које су узроковане *Candida* врстама, као што су *C. albicans*, *C. tropicalis* и *C. parapsilosis*.⁹¹ Показује активност и према изолатима *C. neoformans*, као и према ендемским гљивицама, *Coccidioides immitis*, *Blastomyces dermatitidis*, *Paracoccidioides brasiliensis* и *Histoplasma capsulatu*. С друге стране, *C. krusei* и *Aspergillus* врсте су показале резистентност на овај антимикробни агенс, док према *C. glabrata* флуконазол показује умерену активност.^{91,92} Овај антифунгални агенс се користити за лечење различитих гљивичних инфекција, укључујући вагиналну, дисеминовану, езофагеалну и орофарингеалну кандидијазу и за лечење микотичних инфекција које доводе до хистоплазмоза, кокцидиомикоза, параккокцидиомикоза и споротрихоза.⁹³ Истраживања која су спроведена у 28 европских земаља од 2008. до 2018. године су показала је да је флуконазол заједно са итраконазолом и тербинафином међу најчешће коришћеним антифунгалним агенасима.⁹⁴ Флуконазол се може примењивати орално или интравенозно. Добро се апсорбује орално са великом биодоступношћу, а излучује се непромењен урином. Уобичајене нежељене реакције укључују поремећаје у функцији јетре, холестазу, осип, главобољу, гастроинтестиналне проблеме и кардиотоксичност. У клиничкој употреби, сматра се да ће флуконазол повољно реаговати са анидулафунгином, каспофунгином, амфотерицином Б или 5-флуцитозином.⁹⁵

Истраживања указују на растућу резистентност *C. albicans* на флуконазол код пацијената који су подвргнути лечењу овим агенсом и која је резултат промена на нивоу ERG11 гена.⁹⁶ Ове промене су окарактерисане као мутације које су смањиле афинитет флуконазола према ланостерол 14 α -деметилази или као мутације које су изазвале прекомерну експресију гена. Поред тога, повећање ергостерола у ћелијском зиду чини *C. albicans* резистентним на деловање флуконазола.^{97,98}

Азоли треће генерације

Азоли треће генерације (Слика 11) представљају модификоване структуре флуконазола и итраконазола, на основу чега се могу поделити у две групе.⁵³ Обе групе азола треће генерације имају побољшана фармакокинетичка својства и терапеутски профил, као и шири спектар деловања према различитим микроорганизмима.



Слика 11. Структурне формуле азола треће генерације

Вориконазол

Вориконазол (**vcz**; Слика 11) представља антифунгални агенс који је синтетисан крајем осамдесетих година прошлог века модификацијом структуре флуконазола.⁹⁹ Најчешће се користи за лечење инвазивних гљивичних инфекција.⁹⁹ Показује активност према свим *Candida* врстама, укључујући *C. krusei* и *C. glabrata* које показују резистентност на флуконазол, као и *C. albicans* врсте које показују резистентност према флуконазолу.^{99–103} Вориконазол показује добру *in vitro* активност према квасцима, *C. neoformans*, *Trichosporon beigelii* и *Saccharomyces cerevisiae*,¹⁰¹ као и према многим *Aspergillus* врстама, укључујући *Aspergillus terreus*, који показује резистентност на амфотерицин Б.^{101,104} Користи се у лечењу инфекција изазваних плеснима као што су *Fusarium* и *Scedosporium apiospermum*, док не показује активност према *S. proliferans*.^{105–107}

Вориконазол има малу растворљивост у води и значајну пермеабилност.⁹⁶ Комерцијално је доступан у облику таблета, оралне суспензије и интравенозних раствора.¹⁰⁹ Главно ограничење у лечењу вориконазолом је интер-индивидуална варијабилност његових концентрација у плазми. Наиме, концентрацију вориконазола у плазми је тешко предвидети јер може варирати у зависности од начина примене, услед полиморфизма цитохром Р450 изоензима, нарочито изоформе СYP2C19, услед интеракција са лековима који се истовремено примењују или дисфункције јетре.^{109–111} Ови фактори указују на потребу праћења концентрације вориконазола у плазми током антифунгалне терапије. Поред тога, уколико се примењује у дозама већим од 5,5 µg/mL долази до појаве нежељених ефеката, који укључују халуцинације, хипонатријемiju, поремећај вида, фотосензитивност, осип и сл.^{109–111} Вориконазол се, у великој мери, метаболише у јетри цитохром Р450 ензимима, СYP2C19, СYP3A4 и СYP2C9. Генетски полиморфизми у ензиму СYP2C19 представљају један од кључних фактора који доводе до интер-индивидуалне варијабилности вориконазола.^{112–115} Према томе, СYP2C19 представља главни ензим који метаболише вориконазол у његов неактивни метаболит, **vcz**-N-оксид.^{111,116,117} Код пацијената са продуженом терапијом вориконазолом могу се јавити хепатотоксичност и неуротоксичност.¹¹⁸

1.3. Комплекси метала са азолима као потенцијални терапеутски агенси

Терапеутски потенцијал лекова на бази метала и њихових комплекса је познат од давнина¹¹⁹. Добро је познато да је присуство јона метала неопходно за многе биолошке процесе у живим организмима, као што су метаболички процеси, фотосинтеза, раст и размножавање, процеси дисања, контракција мишића, нервне трансмисије, фиксација азота и сл.^{120,121} Поред тога што јони метала имају значајну улогу у многим биолошким процесима, комплекси метала који садрже јоне као што су платина(II), сребро(I), бизмут(III), гвожђе(III) и злато(I) се користе за лечење широког спектра болести, укључујући неке фундаменталне медицинске проблеме, као што су тумор, кардиоваскуларне болести, реуматоидни артритис и инфекције које узрокују микроорганизми.^{119–129}

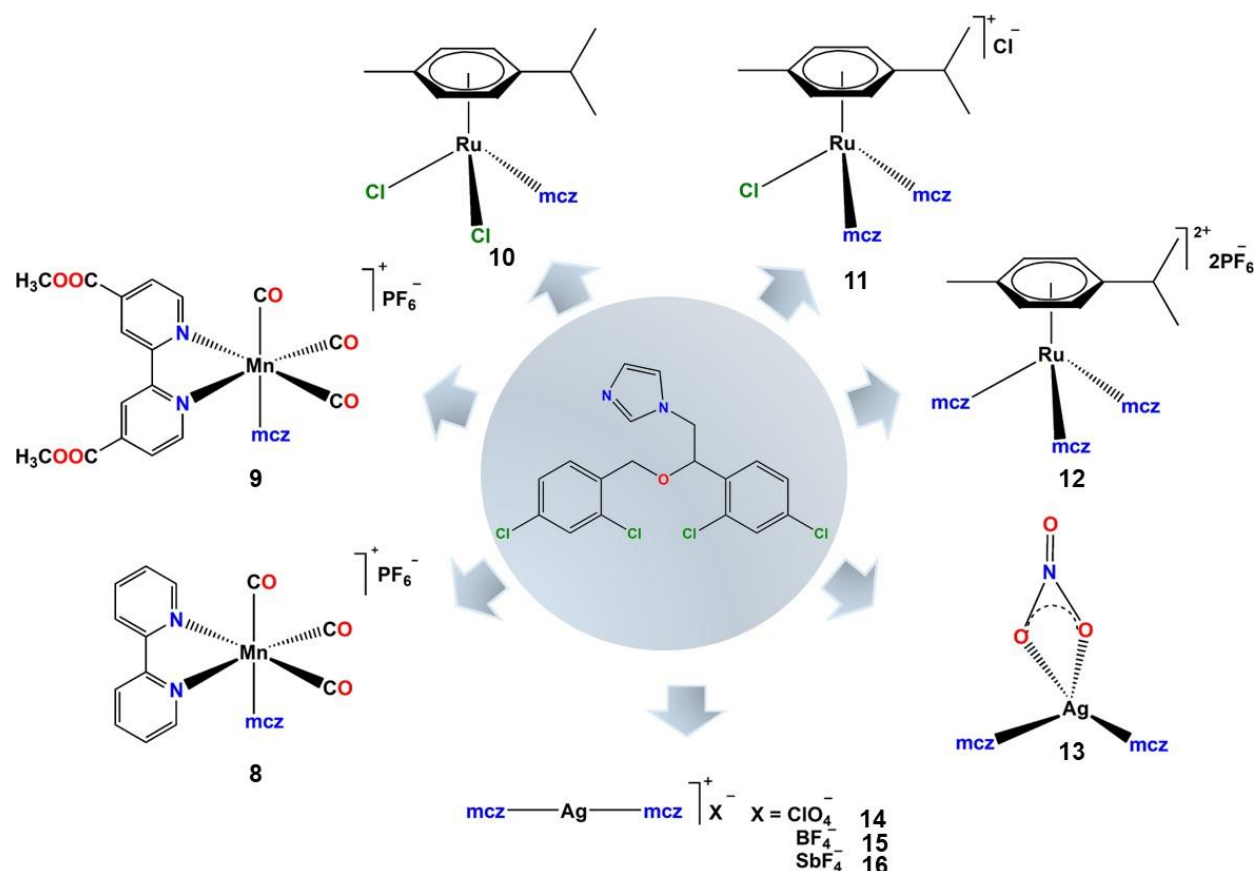
Истраживања су показала да комплексна једињења показују значајну ефикасност у поређењу са лековима на бази органских једињења. Предност медицинске примене комплекса метала у односу на органска једињења је различит механизам деловања, који може укључивати супституцију или отпуштање координованог лиганда, интеракцију са протеинима, пептидима и аминокиселинама и формирање токсичних врста, као што су реактивне кисеоничне врсте.¹³¹ Поред тога, комплекси метала могу имати различиту

геометрију као и тродимензионални распоред атома у простору који има значајан допринос њиховој биолошкој активности. Координацијом органског лиганда за јон метала долази до смањења његове поларности, промена у електронској густини, односно повећања липофилности, чиме је олакшана дифузија комплексног једињења кроз ћелијску мембрану.¹³¹

Иако су многа комплексна једињења испитивана као антибактеријски, антифунгални, антивирусни, антитуморски и антипаразитски агенси, само неколико њих је прошло све фазе преклиничких и клиничких испитивања. С обзиром на појаву антимикробне резистентности, неопходно је синтетисати нове агенсе за лечење инфекција које узрокују микроорганизми. Сходно томе, азоли који се користе као клинички агенси за лечење инвазивних гљивичних инфекција могу се користити као лиганди за координацију различитих јона метала у циљу проналажења нових антифунгалних агенаса.

Синтетисани су комплекси различитих јона метала са миконазолом опште формуле, $[MCl_2(mcz)_2(H_2O)_2] \cdot nH_2O$, где је $M = Mn(II)$, $n = 1$ (**1**); $M = Co(II)$, $n = 2$ (**2**); $M = Ni(II)$, $n = 3$ (**3**); $M = Cu(II)$, $n = 2$ (**4**); $M = Zn(II)$, $n = 3$ (**5**) и комплекси опште формуле $[MCl_2(mcz)_2(H_2O)_2]Cl \cdot 3H_2O$ где је $M = Cr(III)$ (**6**) и $M = Fe(III)$ (**7**).¹³² Антимикробна активност синтетисаних комплекса и миконазола је испитивана на две Грам-позитивне (*Bacillus subtilis* и *S. aureus*) и две Грам-негативне бактерије (*P. aeruginosa* и *E. coli*) и четири врста гљивица (*A. fumigatus*, *C. albicans*, *Penicillium italicum* и *Syncephalastrum racemosum*).¹³² Најбољу инхибиторну активност при концентрацији од 2,5 $\mu g/mL$ према *C. albicans* показују комплекси **2** и **5** са зоном инхибиције у пречнику од 0,6 – 1,0 mm. Умерену активност показују комплекси **1**, **4** и **6** са зоном инхибиције у пречнику од 0,1 – 0,5 mm. Комплекс **1** при концентрацији од 5 $\mu g/mL$ инхибира раст *A. fumigatus* и *P. italicum* са зоном инхибиције у пречнику од 0,1 – 0,5 mm. Комплекси **1** – **7** инхибирају раст *S. aureus*, док инхибицију раста према *E. coli* показују комплекси **5** и **7** са зоном инхибиције 0,1 – 0,5 mm. Према *B. subtilis*, најбољу инхибиторну активност показују комплекси **3** и **5**.¹³²

Поред тога, испитивана је антимикробна активност два комплекса мангана(II) са миконазолом (**mcz**), $[Mn(bpy)(CO)_3(mcz)]PF_6$ (**8**) и $[Mn(bpy^{4-CO_2CH_3,4'-CO_2CH_3})(CO)_3(mcz)]PF_6$ (**9**), (bpy = биридиин, AcO је ацетатни ањон; Слика 12) на четири Грам-позитивне (*S. aureus*, *S. epidermidis*, *Enterococcus faecalis* и *E. faecium*), четири Грам-негативне бактерије (*E. coli*, *P. aeruginosa*, *Yersinia pseudotuberculosis* и *Y. pestis*) и два паразита, *L. major* (узрочник лајшманиозе) и *T. brucei* (узрочник трипанозомијазе).¹³³ Комплекс **8** је показао добру антибактеријску активност према Грам-позитивним бактеријама (*S. aureus*, *S. epidermidis* и *E. faecium*) са МИС од 1,25 μM , односно, у случају *E. faecalis*, МИС од 2,5 μM . У зависности од врсте Грам-позитивне бактерије, овај комплекс има од 2 до 8 пута бољу активност у односу на миконазол. Комплекс **9** је показао антибактеријску активност са МИС вредностима у опсегу од 2,5 до 10 μM према испитиваним Грам-позитивним бактеријама. С друге стране, комплекс **8** је показао осредњу антибактеријску активност према Грам-негативним бактеријама (МИС = 10 – 40 μM у зависности од врсте), док комплекс **9** и миконазол нису показали активност према овим врстама. Поред тога, IC_{50} вредности (половина максималне инхибиторске концентрације) комплекса **8** према паразитима *L. major* и *T. brucei* износе 1,8 и 0,4 μM . Ипак, поређење тих вредности са вредностима његове токсичности према хуманим ћелијама није указало на значајну селективност.¹³³



Слика 12. Структурне формуле комплекса мангана(I), рутенијума(II) и сребра(I) са миконазолом^{133–136}

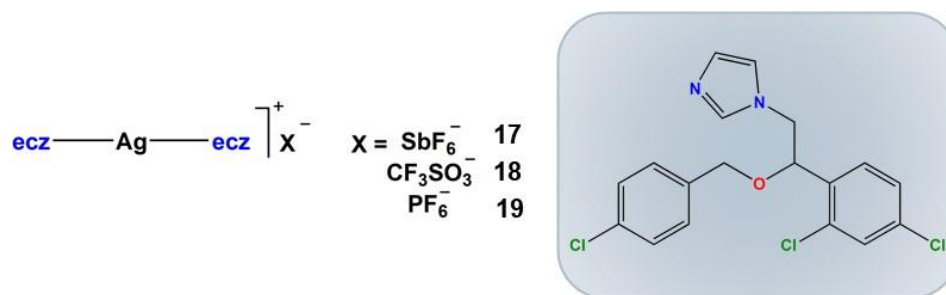
У циљу проналажења новог антимикробног агенса, синтетисана су три комплекса рутенијума(II) са миконазолом (Слика 12), $[(\eta^6\text{-}p\text{-цимен})\text{RuCl}_2(\text{mcz})]$ (**10**), $[(\eta^6\text{-}p\text{-цимен})\text{RuCl}(\text{mcz})_2]\text{Cl}$ (**11**) и $[(\eta^6\text{-}p\text{-цимен})\text{Ru}(\text{mcz})_3](\text{PF}_6)_2$ (**12**).¹³⁴ Испитивана је антимикробна активност ових комплекса према гљивици *Curvularia lunata*, узрочнику многих болести (алергијски синуситис, кератитис и алергијска бронхопулмована аспергилоса) и према паразиту *Schistosoma mansoni*, узрочнику тропске болести шистозомијазе.¹³⁴ На основу добијених резултата, може се закључити да антифунгална активност синтетисаних комплекса опада са повећањем броја молекула миконазола у координационој сфери (**10** > **11** > **12**). Наиме, комплекс **10** смањује инхибицију раста ћелија *C. lunata* при концентрацији од 0,01 mM, док у случају комплекса **11** и **12**, долази до смањења инхибиције раста при концентрацији од 0,5 mM. Ови комплекси показују активност према паразиту *S. mansoni* при концентрацији од 10 до 100 $\mu\text{g/mL}$.¹³⁴

С обзиром на чињеницу да комплекси сребра(I) са различитим типом лиганда показују значајну биолошку активност, синтетисана су и испитивана четири комплекса сребра(I) са миконазолом, $[\text{Ag}(\text{NO}_3)(\text{mcz})_2]$ (**13**), $[\text{Ag}(\text{mcz})_2]\text{ClO}_4$ (**14**), $[\text{Ag}(\text{mcz})_2]\text{BF}_4$ (**15**) и $[\text{Ag}(\text{mcz})_2]\text{SbF}_6$ (**16**).^{135,136} Цитотоксични потенцијал комплекса **13** и **14**, соли сребра(I) (AgNO_3 и AgClO_4) и миконазола је испитиван према ћелијама хуманог хепатоцелуларног карцинома HepG2 и здравој ћелијској линији фибробласта мишева Balb/c 3T3 (IC_{50} ; IC_{20}

вредности (20% максималне инхибиторске концентрације).¹³⁵ Поред тога, антимикробна активност комплекса **13** – **16** је испитана на шест Грам-позитивним (*S. aureus*, *S. epidermidis*, *Micrococcus luteus*, *B. subtilis*, *B. cereus* и *E. faecalis*), пет Грам-негативним бактеријама (*Salmonella typhimurium*, *E. coli*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae* и *P. aeruginosa*) и три врста гљивица (*C. glabrata*, *C. albicans* и *C. parapsilosis*).¹³⁶ Комплекси **13** – **16** су показали значајно већу активност према Грам-позитивним бактеријама у односу на AgX соли ($X = NO_3^-$, ClO_4^- , BF_4^- и SbF_6^-) и на сребро(I)-сулфадиазин (AgSD) који се користи као антимикробни агенс у лечењу тешких опекотина. Показују МИС вредности до 23 пута мање у односу на AgSD и одговарајуће сребро(I) соли. Најбоља антифунгална активност је уочена за комплекс **13** (MIC = 0,49 μM) према Грам-позитивној бактерији *M. luteus* (MIC = 10,92 μM за AgSD; MIC = 11,40 μM за $AgNO_3$), док је миконазол инхибирао раст бактерије при MIC = 1,18 μM . Комплекс **15** показује добру активност према *S. aureus* и *S. epidermidis* (MIC = 1,90 μM), при чему је 11,5 пута активнији у односу на AgSD (MIC = 21,85 μM) према *S. aureus*, односно 23 пута према *S. epidermidis* (MIC = 43,70 μM). С друге стране, миконазол показује инхибицију раста ових бактерија при MIC = 1,18 μM . Испитивани комплекси су показали умерену активност према тестираним Грам-негативним бактеријама. Комплекси **13** – **15** су инхибирали раст *E. coli* са MIC вредностима од 31,24, 60,21 и 121,83 μM , док је AgSD инхибирао раст ове бактерије при MIC = 43,70 μM . Насупрот томе, миконазол није инхибирао раст испитиваних Грам-негативних бактерија. Комплекси **13** – **16** су показали добру активност према *Candida* врстама. Наиме, при MIC 0,10 – 0,12 μM инхибирали су раст *C. parapsilosis*, док су при MIC 0,83 – 1,95 инхибирали раст *C. glabrata* и *C. albicans*, док су MIC вредности AgSD комплекса у области 5,46 – 10,92 μM , у зависности од врсте гљивица. Испитиване соли сребра(I) су показале мању антифунгалну активност у односу на комплексе **13** – **16**, док је миконазол у највећој мери инхибирао раст *C. parapsilosis* (MIC = 0,07 μM).¹³⁶ Поред тога, IC₂₀ вредности за комплексе **13** (IC₂₀ = 0,08 μM) и **14** (IC₂₀ = 0,09 μM) према ћелијама НерG2 су два пута мање у поређењу са вредностима добијеним за исте комплексе (IC₂₀ = 0,18 μM за **13** и 0,22 μM за **14**) према здравој ћелијској линији фибробласта мишева Balb/c 3T3.¹³⁶

Недавно су синтетисана три комплекса сребра(I) са еконазолом (Слика 13), $[Ag(ecz)_2]X$ ($X = SbF_6^-$ (**17**), $CF_3SO_3^-$ (**18**) и PF_6^- (**19**)).^{137,138} Резултати рендгенске структурне анализе су показали да су ови комплекси мононуклеарни и да имају линеарну геометрију. У свим случајевима, два молекула еконазола су монодентатно координована за Ag(I) јон преко атома азота имидазоловог прстена, формирајући $[Ag(ecz)_2]^+$ катјон. Комплексни катјон је неутрализован хексафлуороантимонатним, трифлатним односно хексафлуорофосфатним контра-анјоном. Испитивана је антибактеријска активност комплекса **17** – **19**, одговарајућих сребро(I) соли ($AgSbF_6$, $AgCF_3SO_3$ и $AgPF_6$) и еконазола према Грам-позитивним (*L. monocytogenes* и *S. aureus*) и Грам-негативним бактеријским врстама (*E. coli* и *P. aeruginosa*), као и њихова антифунгална активност према четири *Candida* врсте (*C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* и *C. glabrata*).^{137,138} Антимикробна активност комплекса **17** – **19** је упоређивана са њиховом антипролиферативном активношћу према здравој ћелијској линији фибробласта плућа (MRC-5; IC₅₀). Најбоља антибактеријска активност је уочена за комплексе **17** – **19** према *S. aureus* (MIC = 2,71, 3,98 и 3,07 μM), док је еконазол инхибирао раст ћелија ове бактерије при 225 μM . Највећа антифунгална активност је утврђена за комплексе **17** и **19** према *C. albicans* (MIC = 2,25 и 3,84 μM) и *C. parapsilosis* (MIC = 2,25 μM (**17**), 1,67 μM (**18**) и 0,61 μM (**19**)). Комплекси **18** и **19** су значајно смањили концентрацију ергостерола при $0,5 \times MIC$, што сугерише да је део механизма деловања ових комплекса

сребра(I) повезан са инхибицијом биосинтезе ергостерола или интеракцијом са самим стеролом.^{137,138}



Слика 13. Структурне формуле комплекса сребра(I) са еконазолом^{137,138}

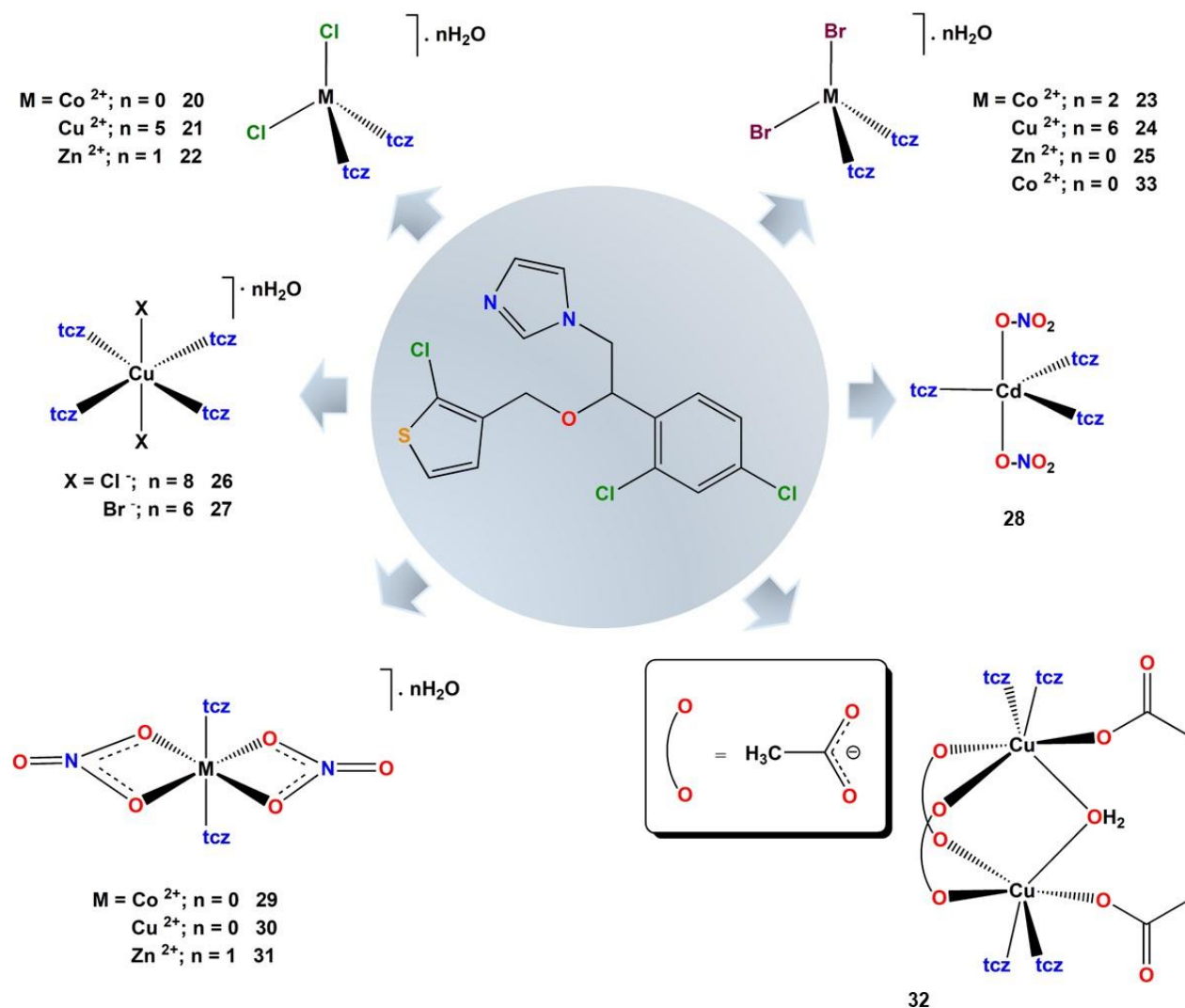
Синтетисани су комплекси кобалта(II), бакра(II) и цинка(II) са тиоконазолом (**tcz**) у молском односу 1 : 2, (Слика 14), опште формуле $[\text{MX}_2(\text{tcz})_2] \cdot n\text{H}_2\text{O}$, где је $\text{M} = \text{Co}$, $\text{X} = \text{Cl}$, $n = 0$ (**20**), $\text{M} = \text{Cu}$, $\text{X} = \text{Cl}$, $n = 5$ (**21**), $\text{M} = \text{Zn}$, $\text{X} = \text{Cl}$, $n = 1$ (**22**), $\text{M} = \text{Co}$, $\text{X} = \text{Br}$, $n = 2$ (**23**), $\text{M} = \text{Cu(II)}$, $\text{X} = \text{Br}$, $n = 6$ (**24**), $\text{M} = \text{Zn}$, $\text{X} = \text{Br}$, $n = 0$ (**25**), као и два комплекса бакра(II) са **tcz** у молском односу 1 : 4, опште формуле $[\text{CuX}_2(\text{tcz})_4] \cdot n\text{H}_2\text{O}$, где је $\text{X} = \text{Cl}$, $n = 8$ (**26**) и $\text{X} = \text{Br}$, $n = 6$ (**27**). Комплекси **21** – **25** имају тетраедарску геометрију. Кристалне структуре комплекса **22** и **25** – **27** су одређене применом рендгенске структурне анализе. Комплекси **22** и **25** су изоструктурни, при чему су два молекула тиоконазола монодентатно координована преко атома азота имидазоловог прстена за Zn(II) јон, док преостала два координациона места заузимају хлоридо, односно бромидо лиганди. У структури комплекса **26** и **27**, четири молекула тиоконазола који се налазе у екваторијалном положају су монодентатно координована за Cu(II) јон, док су два халогенидо лиганда аксијално везана за централни јон метала, при чему је геометрија *trans*-октаедарска.¹³⁹

Синтетисан је комплекс $[\text{Cd}(\text{NO}_3)_2(\text{tcz})_3]$ (**28**), као и комплекси кобалта(II), бакра(II) и цинка(II) са тиоконазолом (**tcz**) у молском односу 1 : 2, опште формуле $[\text{M}(\text{NO}_3)_2(\text{tcz})_2] \cdot n\text{H}_2\text{O}$ где је $\text{M} = \text{Co}$, $n = 0$ (**29**), $\text{M} = \text{Cu}$, $n = 0$ (**30**) и $\text{M} = \text{Cu(II)}$, $n = 1$ (**31**), при чему имају дисторговано октаедарску геометрију, као и динуклеарни комплекс бакра(II) $[\text{Cu}_2(\mu\text{-OAc})_2(\text{OAc})_2(\mu\text{-H}_2\text{O})(\text{tcz})_4]$ (**32**) и тетраедарски комплекс кадмијума(II) $[\text{CdBr}_2(\text{tcz})_2]$ (**33**).¹³⁹

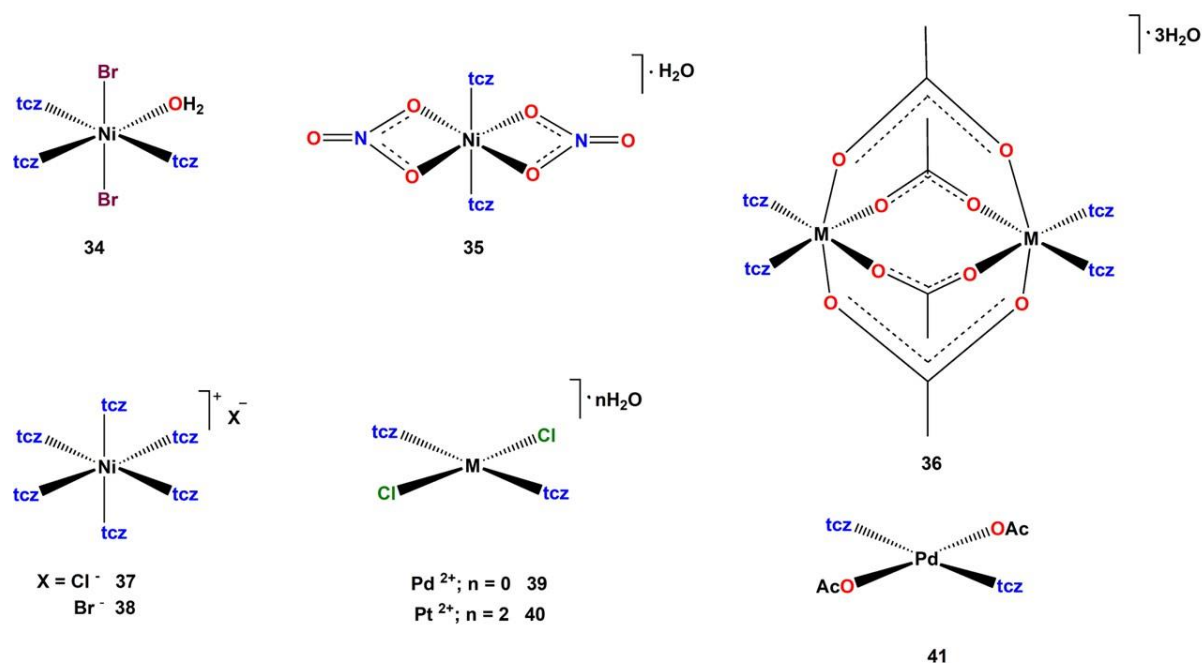
In vitro цитотоксична активност комплекса **20** – **33** је испитивана на ћелијским линијама канцера дојке (MCF-7), канцера дебелог црева (HCT-15) и канцера грлића материце (HeLa).¹³⁹ Ови комплекси, тиоконазол и различите соли метала нису показале активност на ћелијским линијама канцера дојке MCF-7. Комплекси **21**, **30** и **31** су показали умерену активност на HCT-15 ћелијама (8,49, 9,54 и 9,59 mg/mL), док је **26** показао значајну цитотоксичну активност на овој ћелијској линији (3,10 µg/mL) сличну активности цисплатине (3,15 µg/mL). С друге стране, највећу цитотоксичну активност на HeLa ћелијама је показао комплекс **25** ($\text{IC}_{50} = 13,54 \text{ µg/mL}$), док је IC_{50} вредност за цисплатину износила 60,45 µg/mL.¹³⁹

Поред наведених комплекса метала са тиоконазолом, синтетисани су и комплекси никла(II), паладијума(II) и платине(II), $[\text{NiBr}_2(\text{tcz})_3(\text{H}_2\text{O})]$ (**34**), $[\text{Ni}(\text{NO}_3)_2(\text{tcz})_2] \cdot \text{H}_2\text{O}$ (**35**), $[\text{Ni}(\text{OAc})_2(\text{tcz})_2] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (**36**), $[\text{Ni}(\text{tcz})_6]\text{Cl}_2$ (**37**), $[\text{Ni}(\text{tcz})_6]\text{Br}_2$ (**38**), $[\text{PdCl}_2(\text{tcz})_2]$ (**39**), $[\text{PtCl}_2(\text{tcz})_2] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (**40**) и $[\text{Pd}(\text{OAc})_2(\text{tcz})_2]$ (**41**) (Слика 15).¹⁴⁰ Кристалне структуре комплекса **37** и **38** комплекса су одређене применом рендгенске структурне анализе. Координациону сферу Ni(II) јона чине шест монодентатно координованих молекула тиоконазола преко атома азота имидазоловог прстена. Комплекси **37** и **38** су изоструктурни и имају правилну

октаедарску геометрију. Испитивана је *in vitro* цитотоксична активност синтетисаних комплекса на ћелијским линијама канцера дојке (MCF-7), дебелог црева (HCT-15), грлића материце (HeLa) и простате (PC-3) и упоређивана са резултатима добијеним за цисплатину, која је коришћена као позитивна контрола.¹⁴⁰ Комплекс **37** је показао умерену активност на HCT-15, HeLa и PC-3 ћелијским линијама (IC_{50} = 14,02, 12,33 и 11,67 $\mu\text{g/mL}$), која је мања од одговарајуће активности цисплатине (IC_{50} = 8,25, 5,55 и 3,83 $\mu\text{g/mL}$). Добру активност је показао комплекс **35** на HeLa ћелијској линији (IC_{50} = 7,39 $\mu\text{g/mL}$), док је комплекс **34** показао умерену активност на PC-3 ћелијској линији (IC_{50} = 11,43 $\mu\text{g/mL}$). Комплексна једињења паладијума(II) и платине(II) нису показала значајну активност на испитиваним туморским ћелијама.¹⁴⁰

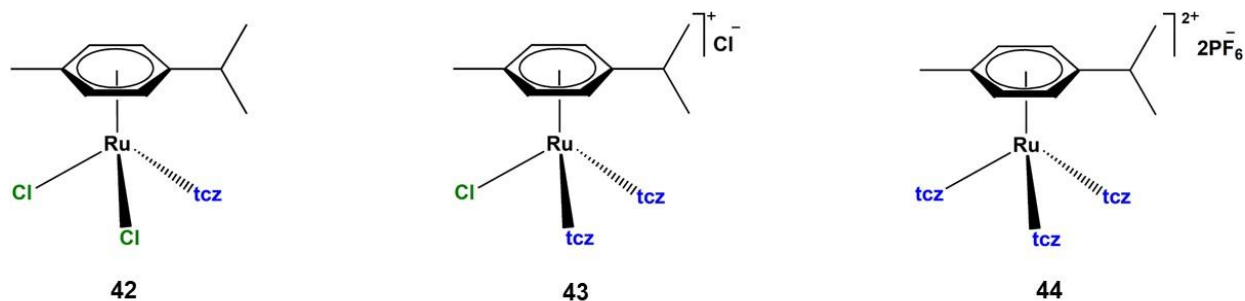


Слика 14. Структурне формуле комплекса кобалта(II), бакра(II), цинка(II) и кадмијума(II) са тиоконазолом (tcz)¹³⁹



Слика 15. Структурне формуле комплекса никла(II), паладијума(II) и платине(II) са тиоконазолом (tcz)¹⁴⁰

Синтетисани су и комплекси рутенијума(II) са тиоконазолом (Слика 16), $[(\eta^6-p\text{-цимен})\text{RuCl}_2(\text{tcz})]$ (**42**), $[(\eta^6-p\text{-цимен})\text{RuCl}(\text{tcz})_2]\text{Cl}$ (**43**) и $[(\eta^6-p\text{-цимен})\text{Ru}(\text{tcz})_3](\text{PF}_6)_2$ (**44**).¹³⁴ Структура комплекса **42** је одређена применом рендгенске структурне анализе. Геометрија је псеудооктаедарска при чему је за Ru(II) јон координован *p*-цимен, два хлоридо лиганда и тиоконазол. Испитивана је антимикробна активност комплекса **42** – **44** на гљивици *C. lunata*. Као и у случају одговарајућих комплекса са миконазолом, антифунгална активност комплекса **42** – **44** је опадала са повећањем броја молекула тиоконазола.¹³⁴



Слика 16. Структурне формуле комплекса рутенијума(II) са тиоконазолом (tcz)¹³⁴

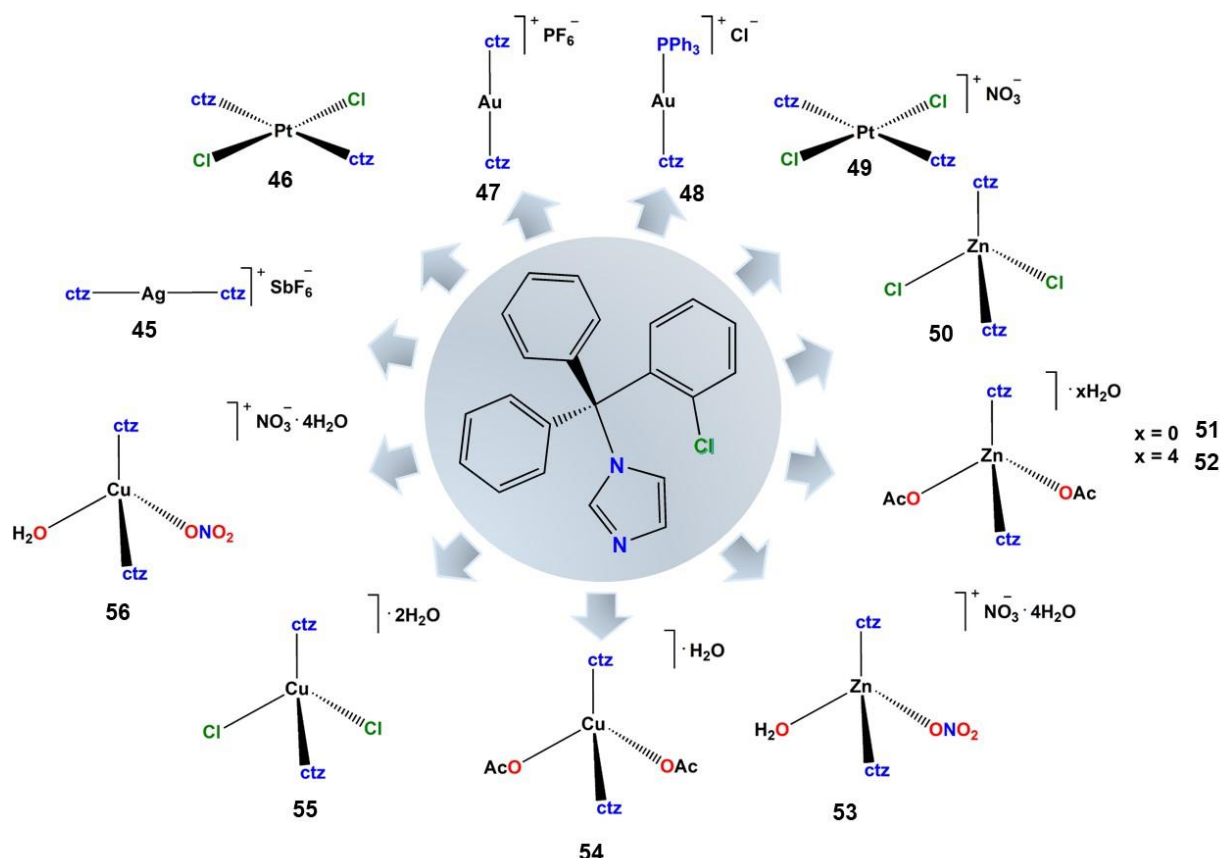
Синтетисан је комплекс сребра(I) са клотримазолом (ctz) (Слика 17), $[\text{Ag}(\text{ctz})_2]\text{SbF}_6$ (**45**).¹³⁷ Кристална структура овог комплекса је одређена применом рендгенске структурне анализе, при чему је утврђено да су два молекула клотримазола монодентатно координована за Ag(I) јон преко атома азота имидазоловог прстена, формирајући $[\text{Ag}(\text{ctz})_2]^+$ катјон, који је неутралисан хексафлуороантимонатним анијоном. Испитивана је антибактеријска активност

комплекса **45**, AgSbF_6 соли и клотримазола према Грам-позитивним (*L. monocytogenes* и *S. aureus*) и Грам-негативним бактеријским врстама (*E. coli* и *P. aeruginosa*), као и антифунгална активност према четири *Candida* врсте (*C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* и *C. glabrata*).¹³⁷ Антимикробна активност комплекса **45** је упоређивана са његовом цитотоксичном активношћу према здравој ћелијској линији фибробласта плућа. Најбоља антибактеријска активност за комплекс **45** је уочена према *S. aureus* ($\text{MIC} = 2,61 \mu\text{M}$), док је клотримазол инхибирао раст ћелија ове бактерије при $290 \mu\text{M}$. Поред тога, уочена је добра антифунгална активност комплекса **45** према *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* и *C. glabrata* при $\text{MIC} = 0,12, 0,01, 0,03$ и $0,97 \mu\text{M}$. Поред тога, овај комплекс ($\text{IC}_{50} = 16 \mu\text{M}$) показује 1,8 пута мању токсичност према MRC-5 ћелијској линији у односу на клотримазол ($\text{IC}_{50} = 8,7 \mu\text{M}$).¹³⁷

У циљу проналажења новог антифунгалног агенса за лечење споротрихозе, синтетисана су и биолошки испитивана различита комплексна једињења са клотримазолом (Слика 17), $[\text{PtCl}_2(\text{ctz})_2]$ (**46**), $[\text{Au}(\text{PPh}_3)(\text{ctz})]\text{PF}_6$ (**47**), $[\text{Au}(\text{ctz})_2]\text{Cl}$ (**48**) и $[\text{Cu}(\text{PPh}_3)_2(\text{ctz})_2]\text{NO}_3$ (**49**).¹⁴¹ Испитивана је њихова антифунгална активност према изолатима гљивица из рода *Sporotrichosis*, *S. schenckii* (**46 – 49**), *S. brasiliensis* и *S. globosa* (**47 – 49**). Комплекси **47 – 49** су 100% инхибирали популацију гљивица у концентрацијама мањим од 40 nM .¹⁴¹ Комплекси **47** и **49** који садрже трифенилфосфин у структури показују антифунгалну активност са MIC од 1 и 2 nM према *S. schenckii*. Према истом соју, комплекс **48** показује антифунгалну активност при MIC од 3 nM , док најмању антифунгалну активност показује комплекс **46** ($\text{MIC} > 10 \text{ nM}$).¹⁴¹

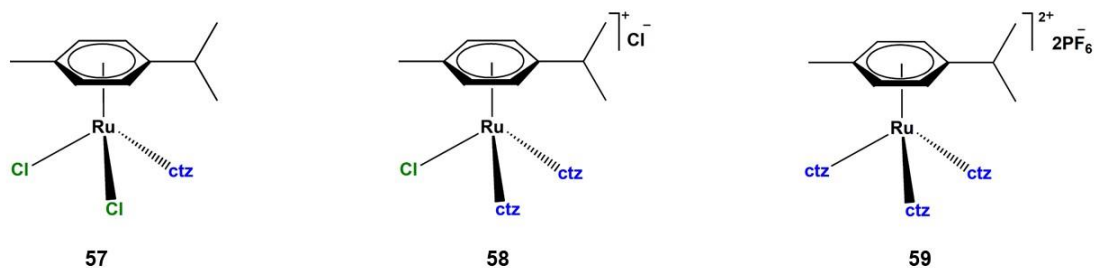
Испитивана је антипаразитска активност комплекса цинка(II) са клотримазолом (Слика 17), $[\text{ZnCl}_2(\text{ctz})_2]$ (**50**) и $[\text{Zn}(\text{AcO})_2(\text{ctz})_2]$ (**51**) према паразиту *Trichomonas vaginalis*, узрочнику трихомонијазе.¹⁴² Комплекси **50** и **51** су показали добру активност према паразиту *T. vaginalis* ($\text{IC}_{50} = 10,5$ и $4,9 \mu\text{M}$), при чему у већем степену инхибирају раст паразита у односу на клотримазол ($\text{IC}_{50} = 17,2 \mu\text{M}$). Комплекс **51** узрокује промене у структури паразита, при чему долази до промена у ћелији, хидрогеносомима, ендоплазматичном ретикулуму и Голџијевом апарату.¹⁴²

Испитивана је антифунгална активност комплекса цинка(II) и бакра(II), $[\text{ZnCl}_2(\text{ctz})_2]$ (**50**) $[\text{Zn}(\text{AcO})_2(\text{ctz})_2] \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (**52**), $[\text{Zn}(\text{NO}_3)_2(\text{ctz})_2(\text{H}_2\text{O})]\text{NO}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (**53**), $[\text{Cu}(\text{AcO})_2(\text{ctz})_2] \cdot \text{H}_2\text{O}$ (**54**), $[\text{CuCl}_2(\text{ctz})_2] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (**55**) и $[\text{Cu}(\text{NO}_3)_2(\text{ctz})_2(\text{H}_2\text{O})]\text{NO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (**56**) према гљивицама, *C. albicans*, *C. neoformans* и *S. brasiliensis* (Слика 17).¹⁴³ Кристалне структуре комплекса **52** и **54** су одређене применом рендгенске структурне анализе. У кристалним структурама комплекса **52** и **54**, два молекула клотримазола су монодентатно координована за Zn(II) односно Cu(II) јон преко атома азота имидазоловог прстена, док преостала два, односно четири координациона места заузимају атоми кисеоника из две ацетатне групе. Комплекс **52** има дисторговану тетраедарску, док комплекс **54** има дисторговану октаедарску геометрију. Комплекси **50**, **52 – 56** показују добру антифунгалну активност (MIC од $0,03$ до $0,5 \mu\text{M}$, у зависности од врсте гљивица). Највећа антифунгална активност је утврђена за комплекс **50** према *C. albicans* ($\text{MIC} = 0,06 \mu\text{M}$) и комплексе **52** и **53** према *S. brasiliensis* ($\text{MIC} = 0,03 \mu\text{M}$).¹⁴³



Слика 17. Структурне формуле комплекса сребра(I), злата(I), цинка(II), бакра(II) и платине(II) са клотримазолом (ctz)^{137,141–143}

С обзиром на све већи значај комплексних једињења рутенијума у медицинској хемији, синтетисан је и тестиран на антимикробну активност велики број комплексних једињења рутенијума(II) са клотримазолом.^{134,144–147} Синтетисани су комплекси рутенијума(II) (Слика 18), $[(\eta^6\text{-}p\text{-цимен})\text{RuCl}_2(\text{ctz})]$ (**57**), $[(\eta^6\text{-}p\text{-цимен})\text{RuCl}(\text{ctz})_2]\text{Cl}$ (**58**) и $[(\eta^6\text{-}p\text{-цимен})\text{Ru}(\text{ctz})_3](\text{PF}_6)_2$ (**59**). Структура комплекса **58** је одређена применом рендгенске структурне анализе. За Ru(II) јон координован је *p*-цимен, хлоридо лиганд и два молекула клотримазола преко атома азота имидазоловог прстена. Испитивана је антимикробна активност комплекса **57** – **59** на гљивици *C. lunata*. Као и у случају одговарајућих комплекса претходно поменутих јона метала са миконазолом и тиоконазолом, антифунгална активност комплекса **57** – **59** је опадала са повећањем броја молекула клотримазола у њиховој структури.¹³⁴

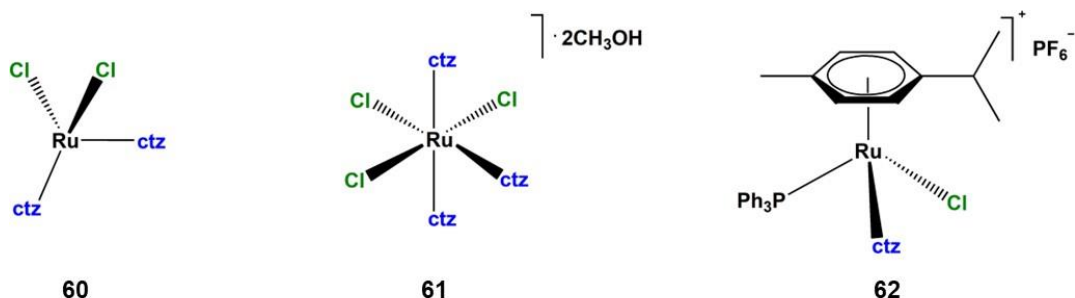


Слика 18. Структурне формуле комплекса рутенијума(II) са клотримазолом¹³⁴

Синтетисан је комплекс рутенијума(II) $[\text{RuCl}_2(\text{ctz})_2]$ (**60**) чија је претпостављена структура приказана на слици 19, и испитана је његова антипаразитска активност према *T. cruzi*.¹⁴⁴ Комплекс **60** је показао приближно 10 пута бољу активност према епимастиготатама *T. cruzi* у односу на лиганд ($\text{EC}_{50} = 0,1 \mu\text{M}$; EC_{50} је ефективна концентрација која инхибира раст 50% паразита). Поред тога, испитивана је активност овог комплекса приликом узгајања *T. cruzi* паразита на VERO ћелијској линији, при чему је комплекс показао мању токсичност у односу на клотримазол.¹⁴⁴

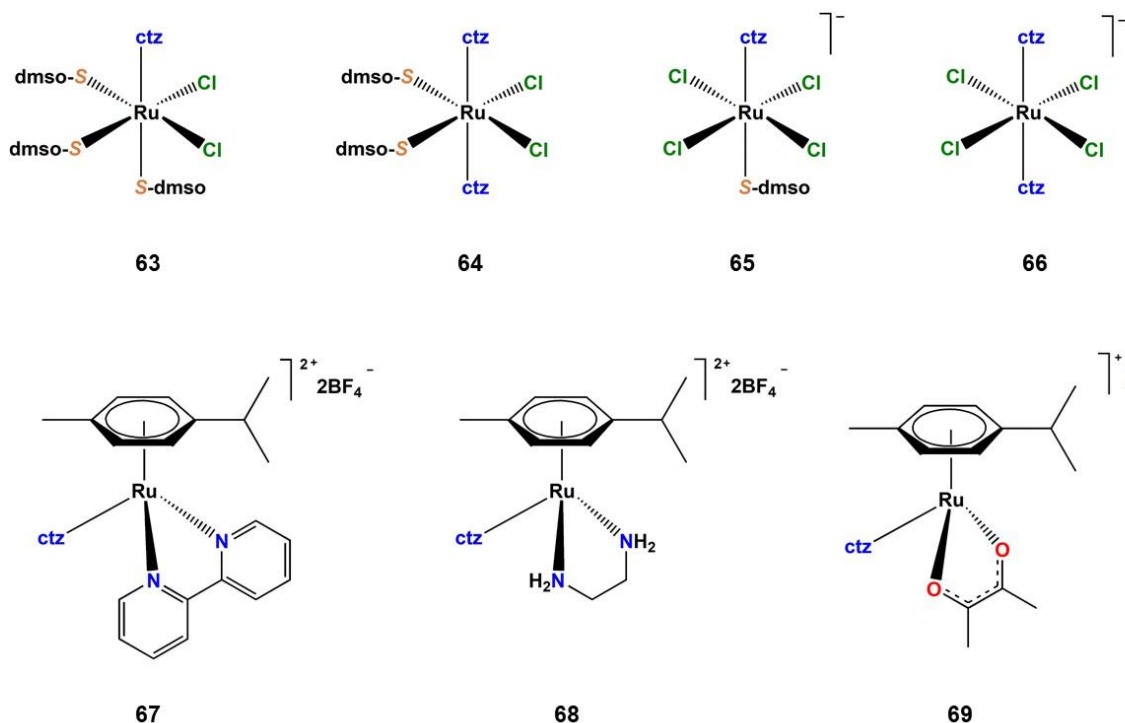
Испитивана је антипаразитска активност комплекса рутенијума(III) (Слика 19) $[\text{RuCl}_3(\text{ctz})_3] \cdot 2\text{CH}_3\text{OH}$ (**61**) према *T. cruzi* и упоређена са активношћу комплекса аналогног комплекса рутенијума(II) (**60**).¹⁴⁵ При концентрацији од $1 \mu\text{M}$, комплекс **60** инхибира раст паразита за 82,4%, док проценат инхибиције раста у присуству комплекса **61** износи 65,9%.¹⁴⁵

Синтетисан је комплекс рутенијума(II) (Слика 19), $[(\eta^6\text{-}p\text{-цимен})\text{RuCl}(\text{ctz})(\text{PPh}_3)]\text{PF}_6$ (**62**) и испитана је његова цитотоксична активност на ћелијским линијама канцера плућа (A549), дојке (MDA-MB-231) и простате (DU-145), као и према здравим MRC-5 и L929 ћелијама.¹⁴⁶ Комплекс **62** је показао добру активност на A549 и MDA-MB-231 ћелијским линијама ($\text{IC}_{50} = 0,61$ и $0,63 \mu\text{M}$), док је његова активност према DU-145 ћелијској линији умерена ($\text{IC}_{50} = 5,13 \mu\text{M}$). Ипак, комплекс показује и значајну цитотоксичност према здравим ћелијским линијама MRC-5 и L929 ($\text{IC}_{50} = 1,16$ и $1,15 \mu\text{M}$).¹⁴⁶



Слика 19. Структурне формуле комплекса рутенијума(II/III) са клотримазолом^{144–146}

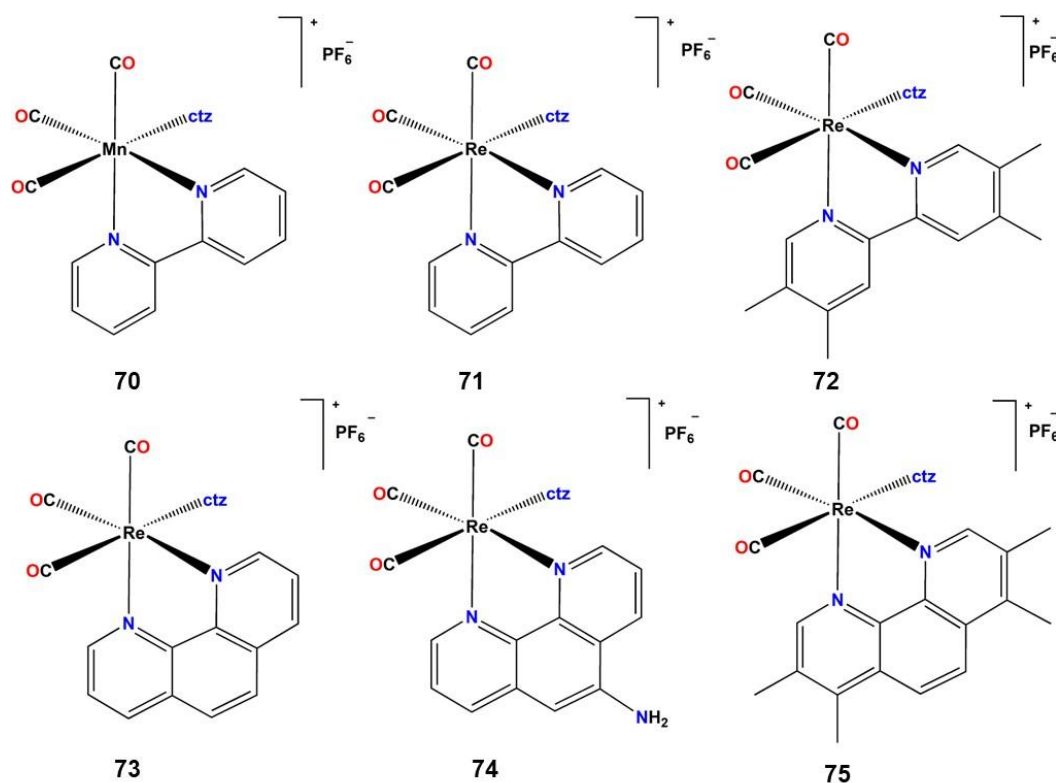
Синтетисана су комплексна једињења рутенијума(II/III) са клотримазолом (Слика 20), *cis, fac*- $[\text{RuCl}_2(\text{dmso})_3(\text{ctz})]$ (**63**), *cis, cis, trans*- $[\text{RuCl}_2(\text{dmso})_2(\text{ctz})_2]$ (**64**), $\text{Na}[\text{RuCl}_4(\text{dmso})(\text{ctz})]$ (**65**), $\text{Na}[\text{trans-RuCl}_4(\text{ctz})_2]$ (**66**), $[(\eta^6\text{-}p\text{-цимен})\text{Ru}(\text{bpy})(\text{ctz})](\text{BF}_4)_2$ (**67**), $[(\eta^6\text{-}p\text{-цимен})\text{Ru}(\text{en})(\text{ctz})](\text{BF}_4)_2$ (**68**) и $[(\eta^6\text{-}p\text{-цимен})\text{Ru}(\text{acac})(\text{ctz})]\text{BF}_4$ (**69**), (bpy = бипиридин; en = етилендиамин; acac = ацетилацетонат).¹⁴⁷ Кристалне структуре комплекса **66** – **69** су одређене применом рендгенске структурне анализе, при чему је утврђена њихова псеудооктаедарска геометрија. Испитивана је антипаразитска активност синтетисаних комплекса према паразитима *L. major* и *T. cruzi*. Нађено је да ови комплекси имају добру антипаразитску активност ($\text{LD}_{50} = 0,015$ – $7,5 \mu\text{M}$ према промастиготатама *L. major* и $0,1$ – $7,7 \mu\text{M}$ према епимастиготатама *T. cruzi*; LD_{50} је средња летална доза).¹⁴⁷



Слика 20. Структурне формуле комплекса рутенијума(II/III) са клотримазолом који показују антипаразитску активност¹⁴⁷

Испитивана је антимикробна активност комплекса мангана(I) са клотримазолом [Mn(bpy)(CO)₃(ctz)]PF₆ (**70**) (bpy = бипиридин; Слика 21) на четири Грам-позитивне (*S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. faecalis* и *E. faecium*), четири Грам-негативне бактерије (*E. coli*, *P. aeruginosa*, *Y. pseudotuberculosis* и *Y. pestis*) и два паразита, *L. major* и *T. brucei*. Комплекс **70** је показао добру антибактеријску активност према Грам-позитивним бактеријама (*S. aureus* и *S. epidermidis* са MIC од 0,625 μM, односно, у случају *E. faecium* и *E. faecalis*, MIC од 2,5 μM). С друге стране, овај комплекс није показао добру активност према Грам-негативним бактеријама (MIC ≥ 40 μM у зависности од врсте бактерије). Поред тога, IC₅₀ вредности комплекса **70** према паразитима *L. major* и *T. brucei* износе 2,2 и 0,5 μM. Ипак, поређење тих вредности са вредностима његове токсичности према ћелијама сисара није указало на значајну селективност.¹³³

Синтетисано је и структурно окарактерисано пет комплекса ренијума(I) (Слика 21), *fac*-[Re(CO)₃(bpy)(ctz)](PF₆) (**71**), *fac*-[Re(CO)₃(dmb)(ctz)](PF₆) (**72**), *fac*-[Re(CO)₃(phen)(ctz)](PF₆) (**73**), *fac*-[Re(CO)₃(aminophen)(ctz)](PF₆) (**74**) и *fac*-[Re(CO)₃(tmp)(ctz)](PF₆) (**75**) (aminophen је 5-амино-1,10-фенантролин, tmp је 3,4,7,8-тетраметил-1,10-фенантролин и dmb је 4,4'-диметил-2,2'-бипиридин).¹⁴⁸ Резултати рендгенске структурне анализе су показали да комплекс **73** има октаедарску геометрију. Комплекси **71** – **75** су показали антипаразитску активност према епимастиготатама *T. cruzi* (IC₅₀ = 3,48 – 9,42 μM) и трипомастиготатама (IC₅₀ = 0,61 – 2,79 μM). Утврђено је да су IC₅₀ вредности ових комплекса према трипомастиготатама *T. cruzi* приближно десет пута мање од одговарајућих вредности за клинички коришћени агенс нифуртимокс. Комплекс **75** показује најбољу активност према трипомастиготатама *T. cruzi* са IC₅₀ 0,61 μM.¹⁴⁸ Поред тога, испитивана је цитотоксична активност на VERO ћелијској линији сисара, при чему комплекси показују умерену токсичност (IC₅₀ = 3,2 – 14 μM).¹⁴⁸



Слика 21. Структурне формуле комплекса мангана(I) и ренијума(I) са клотримазолом^{133,148}

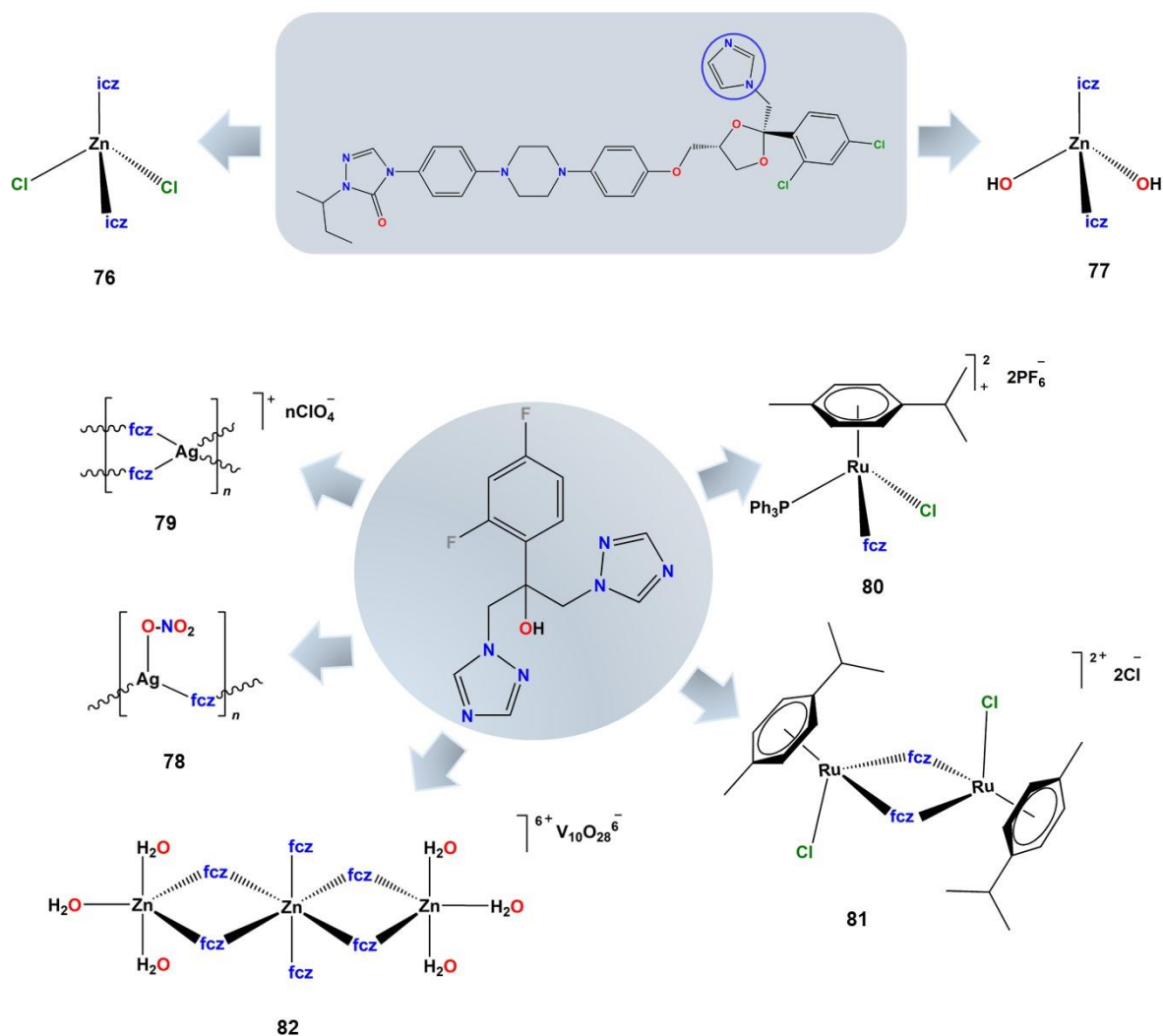
Синтетисана су два комплекса цинка(II) са итраконазолом (icz; Слика 22), [ZnCl₂(icz)₂] (**76**) и [Zn(OH)₂(icz)₂] (**77**).¹⁴⁹ Комплекси су окарактерисани спектроскопским методама, док је њихова биолошка активност теститана на три протозое (*Leishmania amazonensis*, *T. cruzi* и *Toxoplasma gondii*) и две врсте гљивица (*S. brasiliensis* и *S. schenckii*). Комплекси **76** и **77** су показали добру антипаразитску и антифунгалну активност при ниским концентрацијама. Комплекси су показали бољу активност према *S. brasiliensis* и *S. schenckii* у односу на некоординовани итраконазол. Антимикробна активност ових комплекса је упоређивана са њиховом антипролиферативном активношћу према здравим ћелијским линијама, при чему комплекси показују значајан индекс селективности (SI).¹⁴⁹

Синтетисана су два комплекса сребра(I) са флуконазолом (fcz) (Слика 22), [Ag(fcz)(NO₃)]_n (**78**) и {[Ag(fcz)₂](ClO₄)}_n (**79**).¹⁵⁰ Резултати X-гау анализе су показали да су синтетисани комплекси полинуклеарни. У асиметричној јединици комплекса **78** за Ag(I) јон координована су два атома азота из триазоловог прстена два молекула флуконазола и атом кисеоника нитратног јона, при чему комплекс има дисторговану тригоналну геометрију. У асиметричној јединици {[Ag(fcz)₂](ClO₄)}_n комплекса, за сваки Ag(I) јон су координована четири атома азота из четири молекула флуконазола, док се у спољашњој координационој сфери налази ClO₄⁻ јон. Комплекс има дисторговану тетраедарску геометрију. Антифунгална активност комплекса **78** и **79** и флуконазола је испитивана на шест врста гљивица (*C. albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Mucor mucedo*, *Rhizopus tolonifer*, *Penicillium uniculosum* и *A. niger*).¹⁵⁰ Комплекси **78** и **79** су показали добру антифунгалну активност према тестираним врстама гљивица. Комплекс **78** (MIC₈₀ = 5 µg/mL) показао је незнатно бољу активност у односу на комплекс **79** према гљивици *A. niger* (MIC₈₀ = 10 µg/mL), при чему је комплекс **78** 128 пута активнији од флуконазола. Поред тога, комплекси **78** и **79** (MIC₈₀ = 10 µg/mL)

показују 6,4 пута већу активност према *P. uniculosum* у односу на флуконазол ($\text{MIC}_{80} = 64 \mu\text{g/mL}$). Комплекси **78** и **79** и флуконазол показују највећу активност према *C. albicans* ($\text{MIC}_{80} = 0,25 \mu\text{g/mL}$).¹⁵⁰

Синтетисани су комплекси рутенијума(II) (Слика 22), $[(\eta^6-p\text{-цимен})\text{RuCl}(\text{fcz})(\text{PPh}_3)]\text{PF}_6$ (**80**) и $[(\eta^6-p\text{-цимен})\text{RuCl}(\text{fcz})_2]\text{Cl}_2$ (**81**).¹⁴⁶ Испитивана је њихова цитотоксична активност на туморским ћелијским линијама канцера A549, MDA-MB-231 и DU-145, као и према здравим MRC-5 и L929 ћелијама. Комплекс **81** и флуконазол не показују цитотоксичну активност према испитиваним ћелијским линијама, док је комплекс **80** показао добру цитотоксичну активност према A549, DU-145 и MDA-MB-231 ћелијским линијама ($\text{IC}_{50} = 2,94, 3,9$ и $2,35 \mu\text{M}$). Ипак, овај комплекс је токсичан према здравим ћелијама MRC-5 и L929 ($\text{IC}_{50} = 2,02$ и $2,00 \mu\text{M}$).¹⁴⁶

Синтетисан је комплекс цинка(II) са флуконазолом који садржи полиоксованадатни анјон (Слика 22), $[\text{Zn}_3(\text{fcz})_6]\text{V}_{10}\text{O}_{28} \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ (**82**).¹⁵¹ Испитивана је антифунгална активност према деветнаест *Candida* врста. Комплекс **82** је показао добру до умерену антифунгалну активност према испитиваним *Candida* врстама са $\text{MIC}_{50} = 0,5 - 64 \mu\text{g/mL}$.¹⁵¹

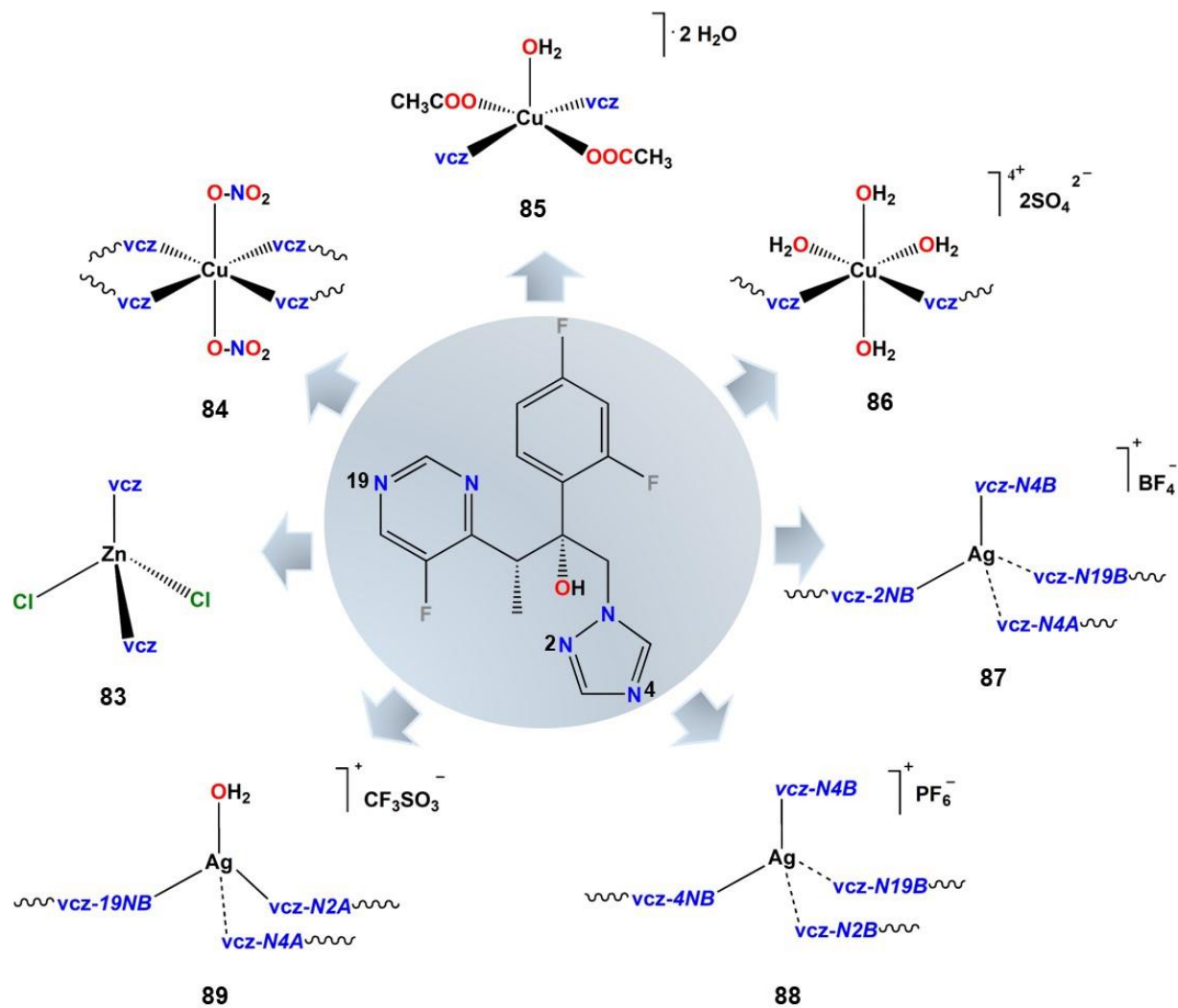


Слика 22. Структурне формуле комплекса цинка(II) са итраконазолом¹⁴⁹ и сребра(I), рутенијума(II) и цинка(II) са флуконазолом^{146,150,151}

Синтетисан је комплекс цинка(II) са вориконазолом (**vcz**), $[\text{ZnCl}_2(\text{vcz})_2]$ (Слика 23) (**83**), чија је структура одређена применом рендгенске структурне анализе.¹⁵² У овом комплексу, за Zn(II) јон су координована два молекула вориконазола преко азота триазоловог прстена, док преостала два места заузимају хлоридо лиганди. Комплекс има дисторговану тетраедарску геометрију. Испитивана је антифунгална активност комплекса **83** према гљивицама из рода *Candida*, *Cryptococcus* и *Aspergillus*, при чему је нађено да овај комплекс показује најбољу антифунгалну активност према *A. niger* и *A. flavus* са MIC вредностима од 0,05 $\mu\text{g/mL}$.¹⁵²

Поред тога, са истим азолом су синтетисана три комплекса бакра(II) (Слика 23), $[\text{Cu}(\text{AcO})_2(\text{vcz})_2(\text{H}_2\text{O})] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (**84**), $[\text{Cu}(\text{NO}_3)_2(\text{vcz})_2]$ (**85**) и $[\text{Cu}_2(\text{vcz})_2(\text{H}_2\text{O})_8](\text{SO}_4)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (**86**).¹⁵³ Испитивана је антифунгална активност ових комплекса према *Candida* врстама (*C. albicans*, *C. krusei* и *C. glabrata*), *C. neoformans* и *Aspergillus* врстама (*A. terreus*, *A. fumigatus*, *A. niger* и *Aspergillus flavus*). Комплекси **84** – **86** показују инхибиторну активност са MIC вредностима од 0,05 до 0,4 $\mu\text{g/mL}$. Најбоља инхибиторна активност је уочена за комплекс **84** који је у свим случајевима активнији од вориконазола. Најбољу антифунгалну активност овај комплекс је показао мнајбољу антифунгалну активност према *C. neoformans*, *A. niger* и *A. flavus* (MIC = 0,05 $\mu\text{g/mL}$).¹⁵³

Синтетисана су три комплекса Ag(I) са вориконазолом (Слика 23), $\{[\text{Ag}(\text{vcz})(\text{H}_2\text{O})]\text{CH}_3\text{SO}_3\}_n$ (**87**), $\{[\text{Ag}(\text{vcz})_2]\text{BF}_4\}_n$ (**88**) и $\{[\text{Ag}(\text{vcz})_2]\text{PF}_6\}_n$ (**89**). Испитивана је антифунгална активност према *Candida* врстама (*C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* и *C. glabrata*) и упоређивана са њиховом антипролиферативном активношћу према здравој ћелијској линији фибробласта плућа (MRC-5; IC₅₀). Комплекси су показали добру антифунгалну активност према испитиваним гљивицама са MIC вредностима од 0,02 до 1,05 μM . Комплекси **87** и **88** инхибирају раст *C. glabrata* (MIC = 0,05 и 0,06 μM), при чему комплекс **87** има 11440, односно комплекс **88** 9533 пута бољу активност у односу на вориконазол. Поред тога, комплекси **87** – **89** инхибирају раст *C. albicans* (MIC = 0,14, 0,18 и 0,34 μM), показујући 256, 199 и 105 пута бољу инхибиторну активност у односу на вориконазол. Комплекси показују умерену цитотоксичност према MRC-5 ћелијама.¹⁵⁴



Слика 23. Структурне формуле комплекса сребра(I), цинка(II) и бакра(II) са вориконазолом^{152–154}

2. ПРЕДМЕТ ИСТРАЖИВАЊА

Услед прекомерне примене антифунгалних агенаса, значајно се повећао број фунгалних сојева који су постали резистентни на азоле. С обзиром на ту чињеницу, неопходно је синтетисати и испитивати нова једињења у циљу проналажења активнијих антифунгалних агенаса. Један од веома атрактивних приступа у савременој медицинској хемији јесте координација клинички коришћеног органског једињења за јон метала, при чему настаје нови комплекс метала са потенцијално другачијим механизмом деловања у односу на полазно органско једињење.

Биолошка активност бакар(II) комплекса зависи од врсте лиганда и његовог начина координације, геометрије и електрохемијског понашања комплекса.^{119,120} Комплекси бакра(II) показују антифунгалну, антибактеријску, антиоксидативну и антитуморску активност. Поред тога, комплекси бакра(II) се испитују као агенси за лечење неких запаљенских процеса.^{119,120} Сребро и његова једињења су добили посебну пажњу у дизајну нових антимикробних агенаса на бази јона метала. Познат је полинуклеарни комплекс сребра(I) са сулфадиазином који се примењује у медицини као антимикробни агенс за лечење бактеријских инфекција код тежих опекотина.¹²¹ Захваљујући различитим механизмима деловања Ag(I) јона који отежавају развој антимикробне резистентности, могућа је примена његових једињења у терапеутске сврхе. Према томе, различите класе комплекса сребра(I) су испитиване као потенцијални антимикробни агенси, нарочито комплекси сребра(I) са *N*-хетероцикличним карбенима.¹¹⁹ Механизам деловања сребро(I) јона је веома сложен и без обзира на чињеницу што у потпуности није разјашњен, претпоставља се да се заснива на оштећењима ћелије микроорганизама од стране Ag(I) јона.¹²¹ Поред тога, комплекси злата(III) због чињенице да су изоструктурни и изоелектронски са комплексима платине(II), испитују се као потенцијални антитуморски агенси, а у последњим деценијама све више и као антимикробни и антипаразитски агенси.¹²¹ Комплекс злата(III) са хлорокином показује антипаразитску активност према паразиту из рода *Plasmodium*, узрочнику маларије, док комплекс злата(III) са 2,5-bis(2-пиридил)пиразином показује активност према паразиту из рода *Leishmania*, узрочнику лајшманиозе. Комплекси злата(III) са 2-пиридилфенил и 2-(диметиламинометил)фенил лигандима су показали значајну антимикробну активност, док се комплекси злата(III) са различитим лигандима који садрже азот, као што су полиамини, порфирины, фенантролини, деривати фенантролина, бипиридина и терпиридина, испитују као потенцијални антитуморски агенси.^{124,129}

На основу наведених чињеница, у оквиру ове докторске дисертације, синтетисани су комплекси бакра(II), сребра(I) и злата(III) са имидазолима (имидазол, 1-изопропилимидазол и 1-фенилимидазол) и азолима који се користе као антифунгални агенси (итраконазол, миконазол, еконазол, клотримазол, тиоконазол и вориконазол). Сви синтетисани комплекси су окарактерисани применом спектроскопских (¹H NMR, IR и UV-Vis) и електрохемијских (циклична волтаметрија) метода и масене спектрометрије, док су њихове структуре одређене применом рендгенске структурне анализе. Стабилност синтетисаних комплекса у раствору испитивана је мерењем моларне проводљивости, као и применом UV-Vis и NMR спектроскопије и цикличне волтаметрије. DFT прорачуни су коришћени за дефинисање структуре синтетисаних комплекса у раствору. Поред тога, испитивана је антипролиферативна, антимикробна и антитуберкулозна активност синтетисаних комплекса, као и *in vivo* ембриотоксичност на моделу зебра рибица *Danio rerio*. Испитиван је и утицај комплекса на формирање хифа и биофилма код *C. albicans*, као и на биосинтезу ергостерола код овог соја. У циљу дефинисања афинитета синтетисаних комплекса према биолошки значајним молекулима, испитиване су њихове интеракције са ct-DNA и говеђим

серум албумином (BSA) у одсуству и присуству маркера, еозина Y, ибупрофена и дигитоксина.

Резултати добијени у оквиру ове докторске дисертације доприносе бољем разумевању хемијских и биолошких особина комплекса бакра(II), сребра(I) и злата(III) са азот-донорским лигандима и могу допринети синтези нових комплекса метала као потенцијалних агенаса у лечењу различитих инфективних болести узрокованих бактеријским и гљивичним сојевима.

3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО

3.1. Хемикалије и реагенси

Хемикалије и реагенси, бакар(II)-хлорид дихидрат ($\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), сребро(I)-нитрат (AgNO_3), калијум-тетрахлоридоаурат(III) ($\text{K}[\text{AuCl}_4]$), имидазол (**im**), 1-изопропилимидазол (**ipim**), 1-фенилимидазол (**phim**), флуконазол (**fcz**), итраконазол (**icz**), миконазол (**mcz**), клотримазол (**ctz**), еконазол (**ecz**), тиоконазол (**tcz**), вориконазол (**vcz**), етанол, ацетонитрил, ацетон, хлороформ, диметилформамид (**dmf**), диметилсулфоксид (**dms**), деутеро диметилсулфоксид ($\text{dms}-d_6$), деутеро хлороформ (CDCl_3), фосфатни пуфер (PBS), албумин говеђег серума (BSA), DNA изолован из тимуса телета (ct-DNA), етидијум-бромид (EthBr), дигитоксин (**dig**), еозин (eos Y) и ибупрофен (**ibu**) набављени су од произвођача Sigma-Aldrich Chemical Co, Acros Organics и Euroisotop. Све хемикалије употребљене у овој дисертацији су аналитичког степена чистоће и нису даље пречишћаване.

3.2. Синтезе комплекса Cu1, Ag1, Ag2 и Au1 – Au8

3.2.1. Добијање $\{[\text{CuCl}_2(\text{fcz})_2] \cdot 5\text{H}_2\text{O}\}_n$ (Cu1) комплекса

У 5,0 mL етанола растворити 1,0 mmol $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (170,5 mg) и у овај раствор додавати у капима раствор добијен растварањем 2,0 mmol флуконазола (612,5 mg) у 10,0 mL етанола. Суд са реакционом смешом оставити на собној температури уз мешање 3 – 4 h. Талог плаве боје који се формирао у реакцији $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ и флуконазола одвојити цеђењем и прекристалисати у смеси ацетонитрил/вода (v/v 1:1) циљу добијања кристала погодних за рендгенску структурну анализу. Кристале комплекса **Cu1** плаве боје који су се издвојили након упаравања добијеног раствора на собној температури након 3 – 5 дана, одвојити цеђењем и сушити на собној температури. Принос је 67,2% (562,5 mg).

Израчунато за **Cu1** = $\text{C}_{26}\text{H}_{34}\text{Cl}_2\text{CuF}_4\text{N}_{12}\text{O}_7$; $M_r = 837,09$: C, 37,31; H, 4,09; N, 20,08. Нађено: C, 37,52; H, 4,01; N, 20,21%. ESI-HRMS (CH_3CN): m/z израчунато за $[\text{Cu}(\text{fcz})_2]^{2+}$: 675,1377; нађено: 675,1372. IR (ATR, ν , cm^{-1}): ~3300br ($\nu(\text{O}-\text{H})$), 3143w, ~3000w ($\nu(\text{C}_{\text{триазол}}-\text{H})$ и $\nu(\text{C}_{\text{ар}}-\text{H})$), ~2950w ($\nu(\text{C}-\text{H})$), 1614m, 1523w, 1500m, 1414m, 1371m ($\nu(\text{C}_{\text{ар}}=\text{C}_{\text{ар}})$ и $\nu(\text{C}_{\text{ар}}=\text{N})$), 1439w ($\delta(\text{CH}_2)$), 1271m ($\delta(\text{O}-\text{H})$), 1231, 1217m, 1204m ($\beta(\text{C}_{\text{ар}}-\text{H})$ и $\beta(\text{C}_{\text{триазол}}-\text{H})$), 1144m ($\nu(\text{C}-\text{N})$), 1119vs ($\nu(\text{C}-\text{F})$), 1084m ($\nu(\text{C}-\text{O})$), 1018m ($\beta(\text{C}_{\text{ар}}-\text{H})$), 968m ($\beta(\text{C}_{\text{триазол}}-\text{H})$), 916m ($\delta(\text{C}-\text{N})$), 869m, 826w ($\gamma(\text{C}_{\text{ар}}-\text{H})$), 789w ($\gamma(\text{C}_{\text{триазол}}-\text{H})$), 680s ($\gamma(\text{C}_{\text{ар}}-\text{H})$), 647s (деформације триазоловог прстена), 579m ($\beta(\text{C}_{\text{ар}}-\text{F})$), 527s (деформације прстена). UV-Vis (**dms**, λ_{max} , nm): 879 ($\epsilon = 99,96 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). A_M (**dms**): $7,4 \Omega^{-1} \text{ cm}^2 \text{ mol}^{-1}$.

3.2.2. Добијање $[\text{Ag}(\text{icz})_2]\text{NO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Ag1) и $[\text{Ag}(\text{NO}_3)(\text{mcz})_2]$ (Ag2) комплекса

Комплекс **Ag1** је синтетисан по модификованом поступком који је објављен у литератури за синтезу комплекса сребра(I) са ароматичним хетероцикличним једињењима која садрже азот у прстену,¹⁵⁵ док је комплекс **Ag2** синтетисан по модификованом поступку претходно описаних синтеза комплекса сребра(I) са антифунгалним азолима.^{137,154}

У 30,0 mL загрејаног етанола растворити 0,25 mmol итраконазола (176,4 mg за **Ag1**) или 1,0 mmol миконазола (416,1 mg за **Ag2**) и у добијени раствор додавати у капима раствор добијен растварањем еквимоларне количине AgNO_3 (42,5 mg за **2** и 169,9 mg за **Ag2**) раствореног у 5,0 mL етанола. Суд са реакционом смешом заштитити од светлости и оставити на собној температури уз лагано мешање 24 h. Бели талог који се формирао 5 – 10 min након додатка соли сребра(I) процедити и прекристалисати у 20,0 mL ацетонитрила за

Ag1 и у смеси ацетонитрил/вода (v/v 1:1) за **Ag2**. Издвојене беле кристале комплекса **Ag1** и **Ag2** одвојити цеђењем и сушити их на собној температури. Принос је 62% (123,9 mg) за **Ag1** и 76% (380,8 mg) за **Ag2**.

Израчунато за **Ag1** = C₇₀H₇₈AgCl₄N₁₇O₁₂; *Mr* = 1599,16; C, 52,57; H, 4,92; N, 14,89. Нађено: C, 52,72; H, 4,83; N, 14,97%. IR (KBr, ν, cm⁻¹): 3395br (ν(O–H)), 3117w, 3060w, 2969w (ν(C_{ar}–H)), 2927w, 2852w (ν(C–H)), 1685vs (ν(C=O)), 1334s (ν_{as}(NO₃)), 822m, 668w (γ(C_{ar}–H)), 739w (δ(NO₃)). ¹H NMR (500 MHz, dmso-*d*₆; Прилог, Слика 73): δ = 8,42 (s, 1H, H10), 8,34 (s, 1H, H12), 7,87 (s, 1H, H42), 7,69 (d, *J* = 1,9 Hz, 1H, H6), 7,51 (m, 3H, H3 и H34/H36), 7,44 (dd, *J* = 8,5, 2,0 Hz, 1H, H5), 7,11 (d, *J* = 9,1 Hz, 2H, H27/H31), 6,98 (d, *J* = 9,2 Hz, 2H, H22/H24), 6,85 (d, *J* = 9,1 Hz, 2H, H21/H25), 4,82 (s, 1H, H8), 4,35 (d, *J* = 5,6 Hz, 1H, H15), 4,12 (d, *J* = 8,2 Hz, 1H, H43), 3,92 (t, *J* = 7,5 Hz, 2H, H16), 3,72 (d, *J* = 5,7 Hz, 2H, H18), 3,33 (m, 4H, H28/H30), 3,20 (s, 4H, H27/H31), 1,69 (dd, *J* = 14,2, 6,7 Hz, 2H, H44), 1,29 (d, *J* = 6,7 Hz, 3H, H46), 0,80 (t, *J* = 7,4 Hz, 3H, H45) ppm. UV-Vis (dmso, λ_{max}, nm): 266 (ε = 6,3 × 10⁴ M⁻¹cm⁻¹). *Λ*_M (dmso): 32,2 Ω⁻¹cm²mol⁻¹.

Израчунато за **Ag2** = C₃₆H₂₈AgCl₈N₅O₅, *Mr* = 1002,10; C, 43,15; H, 2,82; N, 6,99. Нађено: C, 42,94; H, 2,73; N, 6,89%. ESI-HRMS (CH₃CN): Нема сигнала. IR (KBr, ν, cm⁻¹): 3123w, 3100w (ν(C_{ar}–H)), 2932w, 2885w (ν(C–H)), 1630w, 1617w, 1589m, 1564w, 1519w, 1471s (ν(C_{ar}=C_{ar})) и (ν(C_{ar}=N)), 1383vs, 1330vs (ν_{as}(NO₃)), 1099s (ν(C–O)), 792m (γ(C_{ar}–H)). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃; Прилог, Слика 74): δ = 8,04 (s, 1H, C2H), 7,46 (d, *J* = 2,0 Hz, 1H, C17H), 7,31 (m, 5H, C4H/C5H/C10H/C19H/C20H), 7,05 (d, *J* = 1,0 Hz, 1H, C12H), 6,95 (t, *J* = 1,3 Hz, 1H, C13H), 5,04 (dd, *J* = 7,8, 2,7 Hz, 1H, C7H), 4,43 (dd, *J* = 77,2, 12,5 Hz, 2H, C14H), 4,19 (ddd, *J* = 22,4, 14,5, 5,3 Hz, 2H, C6H) ppm. UV-Vis (dmso, λ_{max}, nm): 272 (ε = 1,3 × 10³ M⁻¹cm⁻¹), 280 (ε = 1,1 × 10³ M⁻¹cm⁻¹).

3.2.3. Добијање [AuCl₃(im)] (**Au1**), [AuCl₃(ipim)] (**Au2**), [AuCl₃(phim)] (**Au3**), [AuCl₃(ctz)] (**Au4**), [AuCl₃(ecz)] (**Au5**), [AuCl₃(tcz)] (**Au6**), [AuCl₃(vcz)] (**Au7**) и [AuCl₃(mcz)] (**Au8**) комплекса

Комплекси **Au1** – **Au8** су синтетисани по модификованом поступку који је раније описан у литератури за синтезу комплекса злата(III) са азинима.¹⁵⁶ У 30,0 mL загрејаног етанола растворити 1,0 mmol одговарајућег азола (68,1 mg **im** за **Au1**, 110,2 mg **ipim** за **Au2**, 144,2 mg **phim** за **Au3**, 344,8 mg **ctz** за **Au4**, 444,7 mg **ecz** за **Au5**, 387,7 mg **tcz** за **Au6**, 349,3 mg **vcz** за **Au7** и 416,1 mg **mcz** за **Au8**) и добијени раствор додавати у капима раствору који је добијен растварањем еквимоларне количине K[AuCl₄] (377,9 mg) раствореног у 5,0 mL етанола. Добијену реакциону смешу загревати на 70 °C 3 h у одсуству светлости. Кристали злата(III) комплекса **Au1** – **Au8** су добијени из матичних раствора након упаравања раствора на собној температури у мраку након 3 – 4 дана. У случају комплекса **Au3** – **Au5** и **Au7** су добијени жути кристали, који су одвојени цеђењем и сушени на собној температури у одсуству светлости. Принос је 78% (289,7 mg) за **Au1**, 72% (297,7 mg) за **Au2**, 74% (331,1 mg) за **Au3**, 63% (408,3 mg) за **Au4**, 66% (452,1 mg) за **Au5**, 71% (490,6 mg) за **Au6**, 68% (443,8 mg) за **Au7** и 54% (388,5 mg) за **Au8**.

Израчунато за **Au1** = C₃H₄AuCl₃N₂; *Mr* = 371,40; C, 9,70; H, 1,09; N, 7,54. Нађено: C, 9,62; H, 1,01; N, 7,41%. ESI-HRMS (CH₃CN): *m/z* израчунато за [C₅H₇AuN₃]³⁺: 306,0305; нађено: 306,0299. IR (KBr, ν, cm⁻¹): 3130s (ν(N–H)), ~3000w (ν(C_{диазол}–H)), 1636m, 1579m, 1548w, 1411w (ν(C=C) и ν(C=N)), 758m, 737m, 617m (γ(C_{диазол}–H)). ¹H NMR (200 MHz, dmso-*d*₆; Прилог, Слика 75) δ = 8,74 (d, *J* = 47,0 Hz, 1H, C2H), 7,48 (dd, *J* = 20,5, 19,2 Hz, 2H, C4H/C5H). UV-Vis (CHCl₃, λ_{max}, nm): 260 (ε = 2,4 × 10³ M⁻¹cm⁻¹). *Λ*_M (dmf): 26,3 Ω⁻¹cm²mol⁻¹.

Израчунао за **Au2** = $C_6H_{10}AuCl_3N_2$; $Mr = 413,48$: C, 17,43; H, 2,44; N, 6,77. Нађено: C, 17,25; H, 2,26; N, 6,57%. ESI-HRMS (CH_3CN): m/z израчунао за $[C_8H_{13}AuN_3]^{3+}$: 348,0775; нађено: 348,0773. IR (KBr, ν , cm^{-1}): 3152m, 3133s ($\nu(C_{\text{диазол}}-H)$), 2978m, 2929w ($\nu(C-H)$), 1606m, 1542m, 1523s, 1459m, 1373m ($\nu(C=C)$ и $\nu(C=N)$), 826m, 818m, 748m, 650m, 631m ($\gamma(C_{\text{диазол}}-H)$). 1H NMR (200 MHz, $dmsO-d_6$; Прилог, Слика 76): $\delta = 8,73$ (d, $J = 1,3$ Hz, 1H, C2H), 7,83 (dt, $J = 12,4, 1,7$ Hz, 1H, C4H), 7,48 (m, 1H, C5H), 4,70 (dq, $J = 20,1, 6,8$ Hz, 1H, C6H), 1,44 (q, $J = 6,1$ Hz, 6H, C7H/C8H). UV-Vis ($CHCl_3$, λ_{max} , nm): 315 ($\epsilon = 1,7 \times 10^3 M^{-1}cm^{-1}$). A_M (dmf): $35,5 \Omega^{-1}cm^2mol^{-1}$.

Израчунао за **Au3** = $C_9H_8AuCl_3N_2$; $Mr = 447,49$: C, 24,16; H, 1,80; N, 6,26. Нађено: C, 24,08; H, 1,72; N, 6,34%. ESI-HRMS (CH_3CN): m/z израчунао за $[C_{11}H_{11}AuN_3]^{3+}$: 382,0618; нађено: 382,0610. IR (KBr, ν , cm^{-1}): 3158m, 3131m, 3061w ($\nu(C_{\text{диазол}}-H)$ и $\nu(C_{\text{ар}}-H)$), 1594m, 1538m, 1518s, 1492m, 1460m ($\nu(C_{\text{ар}}=C_{\text{ар}})$ и $\nu(C=N)$), 828m, 761s, 749m, 737m, 692m ($\gamma(C_{\text{ар}}-H)$ и $\gamma(C_{\text{диазол}}-H)$). 1H NMR (200 MHz, $dmsO-d_6$; Прилог, Слика 77): $\delta = 9,25$ (s, 1H, C2H), 8,23 (s, 1H, C4H), 7,66 ppm (m, 6H, C5H, C7H-C11H). UV-Vis ($CHCl_3$, λ_{max} , nm): 299 ($\epsilon = 1,7 \times 10^3 M^{-1}cm^{-1}$). A_M (dmf): $18,08 \Omega^{-1}cm^2mol^{-1}$.

Израчунао за **Au4** = $C_{22}H_{17}AuCl_4N_2$; $Mr = 648,16$: C, 40,77; H, 2,64; N, 4,32. Нађено: C, 40,59; H, 2,42; N, 4,34%. ESI-HRMS (CH_3CN): Нема сигнала. IR (cm^{-1} , KBr): 3126w, 3101w ($\nu(C_{\text{ар}}-H)$ и $\nu(C_{\text{диазол}}-H)$), 2930w ($\nu(C-H)$), 1508w, 1465w, 1446m, 1432w ($\nu(C_{\text{ар}}=C_{\text{ар}})$ и $\nu(C=N)$), 756m, 747m, 704m, 679m, 669m ($\gamma(C_{\text{ар}}-H)$ и $\gamma(C_{\text{диазол}}-H)$), 638w ($\nu(C-Cl)$). 1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$; Прилог, Слика 78): $\delta = 8,41$ (t, $J = 1,5$ Hz, 1H, C2H), 7,66 (m, 1H, C8H), 7,51 (dd, $J = 7,9, 1,4$ Hz, 1H, C9H), 7,43 (m, 7H, C10H/C14H/C15H/C16H/C20H/C21H/C22H), 7,32 (m, 1H, C4H), 7,10 (m, 4H, C13H/C17H/C19H/C23H), 6,99 (dd, $J = 3,3, 1,6$ Hz, 1H, C5H), 6,98 ppm (dd, $J = 8,0, 1,4$ Hz, 1H, C11H). UV-Vis ($CHCl_3$, λ_{max} , nm): 301 ($\epsilon = 2,0 \times 10^3 M^{-1}cm^{-1}$). A_M (dmf): $7,89 \Omega^{-1}cm^2mol^{-1}$.

Израчунао за **Au5** = $C_{18}H_{15}AuCl_6N_2O$; $Mr = 684,99$: C, 31,56; H, 2,21; N, 4,09. Нађено: C, 31,67; H, 1,96; N, 4,05%. ESI-HRMS (CH_3CN): m/z израчунао за $[C_{20}H_{18}AuCl_3N_3O]^+$: 618,0181; нађено: 618,0174. IR (KBr, ν , cm^{-1}): ~3100m ($\nu(C_{\text{диазол}}-H)$ и $\nu(C_{\text{ар}}-H)$), 2871w ($\nu(C-H)$), 1590m, 1563w, 1543w, 1522m, 1491m, 1436w ($\nu(C_{\text{ар}}=C_{\text{ар}})$ и $\nu(C=N)$), 1246w, 1223w ($\beta(C_{\text{ар}}-H)$ и $\beta(C_{\text{диазол}}-H)$), 1110s ($\nu(C-O)$), 1093vs, 1044m, 1015m ($\nu(C_{\text{ар}}-Cl)$), 808m, 787m, 737w, 669w, 632w ($\gamma(C_{\text{ар}}-H)$ и $\gamma(C_{\text{диазол}}-H)$). 1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$; Прилог, Слика 79): $\delta = 8,36$ (s, 1H, C2H), 7,59 (m, 1H, C10H), 7,48 (d, $J = 1,9$ Hz, 1H, C4H), 7,37 (dd, $J = 8,4, 1,9$ Hz, 1H, C5H), 7,35 (m, 1H, C13H), 7,33 (d, $J = 1,8$ Hz, 1H, C12H), 7,32 и 7,09 (m, 2H, C17H/C19H), 7,08 и 7,02 (m, 2H, C16H/C20H), 4,98 (dd, $J = 7,8, 2,6$ Hz, 1H, C7H), 4,52 (d, $J = 11,7$ Hz, 1H, C6H), 4,29 (dd, $J = 14,4, 2,6$ Hz, 1H, C6H), 4,21 (d, $J = 11,7$ Hz, 1H, C14H), 4,14 ppm (dd, $J = 14,4, 7,8$ Hz, 1H, C14H). UV-Vis ($CHCl_3$, λ_{max} , nm): 300 ($\epsilon = 1,8 \times 10^3 M^{-1}cm^{-1}$). A_M (dmf): $14,34 \Omega^{-1}cm^2mol^{-1}$.

Израчунао за **Au6** = $C_{16}H_{13}AuCl_6N_2OS$; $Mr = 619,04$: C, 27,81; H, 1,90; N, 4,05. Нађено: C, 27,91; H, 1,78; N, 4,08%. ESI-HRMS (CH_3CN): m/z израчунао за $[C_{16}H_{13}AuCl_5N_2OS]^+$: 654,8827; нађено: 654,8813. IR (KBr, ν , cm^{-1}): 3182w, 3157w, 3139m, 3101w, 3090w ($\nu(C_{\text{диазол}}-H)$ и $\nu(C_{\text{ар}}-H)$), 2931w ($\nu(C-H)$), 1589m, 1542m, 1521m, 1468m, 1440m ($\nu(C_{\text{ар}}=C_{\text{ар}})$ и $\nu(C=N)$), 1244w, 1230w, 1213w ($\beta(C_{\text{ар}}-H)$ и $\beta(C_{\text{диазол}}-H)$), 1103vs, 1087s ($\nu(C-O)$), 825m, 788m, 686w ($\gamma(C_{\text{ар}}-H)$), 748s ($\nu(C-S)$), 637m ($\nu(C-Cl)$). 1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$; Прилог, Слика 80): $\delta = 8,32$ (s, 1H, C2H), 7,58 (m, 1H, C10H), 7,48 (m, 1H, C12H), 7,37 (m, 2H, C13H/C17H), 7,14 (t, $J = 7,2$ Hz, 1H, C5H), 7,03 (t, $J = 1,7$ Hz, 1H, C16H), 6,77 (d, $J = 5,7$ Hz, 1H, C4H), 4,96 (dd, $J = 8,2, 2,5$ Hz, 1H, C7H), 4,49 (t, $J = 12,2$ Hz, 1H, C14H), 4,26 (m, 2H, C6H/C14H), 4,07 ppm (dd, $J = 14,4, 8,2$ Hz, 1H, C6H). UV-Vis ($CHCl_3$, λ_{max} , nm): 301 ($2,0 \times 10^3 M^{-1}cm^{-1}$). A_M (dmf): $3,32 \Omega^{-1}cm^2mol^{-1}$.

Израчунао за **Au7** = $C_{16}H_{14}AuCl_3F_3N_5O$; $Mr = 652,64$; C, 29,45; H, 2,16; N, 10,73. Нађено: C, 29,22; H, 1,98; N, 10,63%. ESI-HRMS (CH_3CN): m/z израчунао за $[C_{16}H_{15}AuCl_3F_3N_5O]^+$: 651,9960; нађено: 651,9952. IR (KBr, ν , cm^{-1}): 3436br ($\nu(O-H)$), 3145m, 3041w, 3016w, 3003w ($\nu(C_{\text{триазол}}-H)$ и $\nu(C_{\text{ар}}-H)$), 2986w, 2967w, 2942w ($\nu(C-H)$), 1621s, 1589s, 1547s, 1500s, 1459m, 1405s ($\nu(C_{\text{ар}}=C_{\text{ар}})$ и $\nu(C=N)$), 1273m ($\delta(O-H)$), 1254w, 1214w ($\beta(C_{\text{ар}}-H)$ и $\beta(C_{\text{триазол}}-H)$), 1129vs ($\nu(C-F)$), 1056m ($\nu(C-O)$), 864m, 847m, 832w, 789w, 676w ($\gamma(C_{\text{ар}}-H)$ и $\gamma(C_{\text{триазол}}-H)$), 578w ($\beta(C_{\text{ар}}-F)$). 1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$; Прилог, Слика 81): $\delta = 9,11$ (s, 1H, C18H), 9,08 (d, $J = 2,3$ Hz, 1H, C20H), 8,73 (s, 1H, C5H), 8,27 (s, 1H, C3H), 7,55 (td, $J = 9,1, 6,5$ Hz, 1H, C9H), 6,91 (m, 1H, C12H), 6,87 (dd, $J = 9,2, 3,2$ Hz, 1H, C10H), 6,84 (s, 1H, OH), 4,92 (d, $J = 13,9$ Hz, 1H, C6H), 4,33 (d, $J = 13,9$ Hz, 1H, C6H), 4,16 (q, $J = 7,0$ Hz, 1H, C14H), 1,13 ppm (d, $J = 7,1$ Hz, 3H, C15H). UV-Vis ($CHCl_3$, λ_{max} , nm): 305 ($\epsilon = 1,7 \times 10^3 M^{-1}cm^{-1}$). A_M (dmf): $3,84 \Omega^{-1}cm^2mol^{-1}$.

Израчунао за **Au8** = $C_{18}H_{14}AuCl_7N_2O$; $Mr = 719,45$; C, 30,05; H, 1,96; N, 3,89. Нађено: C, 30,10; H, 1,87; N, 3,83%. ESI-HRMS (CH_3CN): m/z израчунао за $[C_{20}H_{17}AuCl_4N_3O]^+$: 653,9762; нађено: 653,9760. IR (KBr, ν , cm^{-1}): 3137w, 3078w ($\nu(C_{\text{ар}}-H)$), 2930w, 2873 ($\nu(C-H)$), 1640w, 1616w, 1589m, 1562m, 1543m, 1471s ($\nu(C_{\text{ар}}=C_{\text{ар}})$ и $\nu(C_{\text{ар}}=N)$), 1101s ($\nu(C-O)$), 788m ($\gamma(C_{\text{ар}}-H)$). 1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$; Прилог, Слика 82): $\delta = 8,35$ (s, 1H, C2H), 7,59 (m, 1H, C17H), 7,50 (d, $J = 1,9$ Hz, 1H, C10H), 7,41 (d, $J = 2,0$ Hz, 1H, C19H), 7,34 (m, 2H, C5H/C20H), 7,29 (dd, $J = 8,2, 2,1$ Hz, 1H, C4H), 7,20 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H, C12H), 7,04 (t, $J = 1,7$ Hz, 1H, C13H), 5,05 (dd, $J = 7,7, 2,6$ Hz, 1H, C7H), 4,48 (m, 2H, C14H), 4,24 (m, 2H, C6H) ppm. UV-Vis (dmf, λ_{max} , nm): 272 ($\epsilon = 2,5 \times 10^3 M^{-1}cm^{-1}$), 280 ($\epsilon = 2,3 \times 10^3 M^{-1}cm^{-1}$), 325 ($\epsilon = 3,7 \times 10^3 M^{-1}cm^{-1}$).

3.3. Карактеризација азола

Спектроскопска карактеризација лиганата је дата у сврху поређења.

Флуконазол (**fcz**): IR (ATR, ν , cm^{-1}): ~3200br ($\nu(O-H)$), 3107w и 3026w ($\nu(C_{\text{триазол}}-H)$ и $\nu(C_{\text{ар}}-H)$), 2956w ($\nu(C-H)$), 1619m, 1513m, 1502m, 1421m, 1366m ($\nu(C_{\text{ар}}=C_{\text{ар}})$ и $\nu(C_{\text{ар}}=N)$), 1445w ($\delta(CH_2)$), 1271s ($\delta(O-H)$), 1226m, 1208m ($\beta(C_{\text{ар}}-H)$ и $\beta(C_{\text{триазол}}-H)$), 1138s ($\nu(C-N)$), 1112m ($\nu(C-F)$), 1082m ($\nu(C-OH)$), 1011w ($\beta(C_{\text{ар}}-H)$), 966s ($\beta(C_{\text{триазол}}-H)$), 916m ($\delta(C-N)$), 869w, 846m ($\gamma(C_{\text{ар}}-H)$), 767w ($\gamma(C_{\text{триазол}}-H)$), 673s ($\gamma(C_{\text{ар}}-H)$), 651m (деформације триазоловог прстена), 570m ($\beta(C_{\text{ар}}-F)$), 527m (деформације прстена). UV-Vis (dmsO, λ_{max} , nm): 256 ($\epsilon = 5,2 \times 10^4 M^{-1}cm^{-1}$).

Имидазол (**im**): IR (KBr, ν , cm^{-1}): 3124s ($\nu(N-H)$), 3020s ($\nu(C_{\text{диазол}}-H)$), 1576m, 1542s, 1497m, 1448m ($\nu(C=C)$ и $\nu(C=N)$), 842s, 757s, 738s, 660s, 620m ($\gamma(C_{\text{диазол}}-H)$). 1H NMR (200 MHz, dmsO- d_6 , Прилог, Слика 83): $\delta = 12,05$ (s, 1H, NH), 7,64 (s, 1H, C2H), 7,01 (s, 2H, C4H/C5H). UV-Vis ($CHCl_3$, λ_{max} , nm): 260 ($\epsilon = 2,2 \times 10^3 M^{-1}cm^{-1}$).

1-изопропилимидазол (**ipim**): IR (KBr, ν , cm^{-1}): 3113m, 3044w, 3032w ($\nu(C_{\text{диазол}}-H)$), 2980s, 2935m ($\nu(C-H)$), 1500s, 1460m, 1409m, 1373m ($\nu(C=C)$ и $\nu(C=N)$), 917m, 818m, 739m, 667s, 643m ($\gamma(C_{\text{диазол}}-H)$). 1H NMR (200 MHz, dmsO- d_6 , Прилог, Слика 84): $\delta = 7,72$ (s, 1H, C2H), 7,21 (s, 1H, C4H), 6,89 (s, 1H, C5H), 4,32 (m, C6H), 1,34 (m, 6H, C7H/C8H). UV-Vis ($CHCl_3$, λ_{max} , nm): 260 ($\epsilon = 3,0 \times 10^3 M^{-1}cm^{-1}$).

1-фенилимидазол (**phim**): IR (KBr, ν , cm^{-1}): 3116m, 3069m ($\nu(C_{\text{диазол}}-H)$ и $\nu(C_{\text{ар}}-H)$), 1601s, 1514s, 1505s, 1483m, 1461m ($\nu(C_{\text{ар}}=C_{\text{ар}})$ и $\nu(C=N)$), 817m, 760s, 692s, 659s ($\gamma(C_{\text{ар}}-H)$ и $\gamma(C_{\text{диазол}}-H)$). 1H NMR (200 MHz, dmsO- d_6 , Прилог, Слика 85): $\delta = 8,30$ (s, 1H, C2H), 7,77 (s, 1H, C4H), 7,66 (m, 2H, C7H/C11H), 7,52 (m, 2H, C8H/C10H), 7,36 (m, 1H, C9H), 7,13 ppm (d, $J = 0,9$ Hz, 1H, C5H). UV-Vis ($CHCl_3$, λ_{max} , nm): 262 ($\epsilon = 3,5 \times 10^3 M^{-1}cm^{-1}$).

Клотримазол (**ctz**): IR (KBr, ν , cm^{-1}): 3195w, 3167w, 3136w, 3112w ($\nu(\text{C}_{\text{диазол}}\text{--H})$ и $\nu(\text{C}_{\text{ар}}\text{--H})$), 2977w, 2916w, 2870w ($\nu(\text{C--H})$), 1585w, 1566w, 1493m, 1466m, 1443m, 1434m ($\nu(\text{C}_{\text{ар}}=\text{C}_{\text{ар}})$ и $\nu(\text{C=N})$), 1211s, 1192w ($\beta(\text{C}_{\text{ар}}\text{--H})$ и $\beta(\text{C}_{\text{диазол}}\text{--H})$), 766vs, 753vs, 708s, 696m, 672s ($\gamma(\text{C}_{\text{ар}}\text{--H})$ и $\gamma(\text{C}_{\text{диазол}}\text{--H})$), 634m ($\nu(\text{C--Cl})$). ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3 , Прилог, Слика 86): δ = 7,46 (d, J = 5,6 Hz, 1H, C2H), 7,42 (dd, J = 7,9, 1,4 Hz, 1H, C8H), 7,33 (m, 7H, C10H/C14H/C15H/C16H/C20H/C21H/C22H), 7,26 (m, 1H, C9H), 7,19 (m, 4H, C13H/C17H/C19H/C23H), 7,05 (m, 1H, C4H), 6,92 (dd, J = 8,0, 1,6 Hz, 1H, C5H), 6,74 ppm (t, J = 1,3 Hz, 1H, C11H). UV-Vis (CHCl_3 , λ_{max} , nm): 260 (ϵ = $3,1 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

Еконазол (**ecz**): IR (KBr, ν , cm^{-1}): 3194w, 3176w, 3132w, 3115w, 3091w, 3064w ($\nu(\text{C}_{\text{диазол}}\text{--H})$ и $\nu(\text{C}_{\text{ар}}\text{--H})$), 2981w, 2969w, 2946w ($\nu(\text{C--H})$), 1590m, 1564m, 1505s, 1489s, 1473m, 1432m ($\nu(\text{C}_{\text{ар}}=\text{C}_{\text{ар}})$ и $\nu(\text{C=N})$), 1233s, 1200m ($\beta(\text{C}_{\text{ар}}\text{--H})$ и $\beta(\text{C}_{\text{диазол}}\text{--H})$), 1107s ($\nu(\text{C--O})$), 1090vs, 1046m, 1032m ($\nu(\text{C}_{\text{ар}}\text{--Cl})$), 800m, 787m, 733m, 661m, 626m ($\gamma(\text{C}_{\text{ар}}\text{--H})$ и $\gamma(\text{C}_{\text{диазол}}\text{--H})$). ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3 , Прилог, Слика 87): δ = 9,02 (s, 1H, C2H), 7,48 (d, J = 1,8 Hz, 1H, C10H), 7,38 (d, J = 1,7 Hz, 1H, C4H), 7,35 (d, J = 1,8 Hz, 1H, C5H), 7,32 (m, 1H, C13H), 7,31 (m, 1H, C12H), 7,29 (m, 1H, C17H), 7,09 (s, 1H, H19), 7,08 (s, 1H, C16H), 7,01 (t, J = 1,6 Hz, 1H, C20H), 5,05 (dd, J = 7,8, 2,9 Hz, C7H), 4,51 (d, J = 11,8 Hz, 1H, C6H), 4,46 (dd, J = 14,4, 2,9 Hz, 1H, C6H), 4,36 (dd, J = 14,4, 7,8 Hz, 1H, C14H), 4,22 ppm (d, J = 11,8 Hz, 1H, C14H). UV-Vis (CHCl_3 , λ_{max} , nm): 260 (ϵ = $3,1 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

Тиоконазол (**tcz**): IR (KBr, ν , cm^{-1}): 3119w, 3094w, 3065w, 3023w ($\nu(\text{C}_{\text{диазол}}\text{--H})$ и $\nu(\text{C}_{\text{ар}}\text{--H})$), 2979w, 2935w ($\nu(\text{C--H})$), 1589m, 1562m, 1503s, 1467s, 1434m ($\nu(\text{C}_{\text{ар}}=\text{C}_{\text{ар}})$ и $\nu(\text{C=N})$), 1230m, 1221m ($\beta(\text{C}_{\text{ар}}\text{--H})$ и $\beta(\text{C}_{\text{диазол}}\text{--H})$), 1120s ($\nu(\text{C--O})$), 828m, 815m, 785m, 692m ($\gamma(\text{C}_{\text{ар}}\text{--H})$), 736vs ($\nu(\text{C--S})$), 628m ($\nu(\text{C--Cl})$). ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3 , Прилог, Слика 88): δ = 7,43 (d, J = 2,1 Hz, 2H, C2H/C10H), 7,33 (d, J = 8,4 Hz, 1H, C12H), 7,28 (dd, J = 8,4, 2,0 Hz, 1H, C17H), 7,05 (d, J = 5,7 Hz, 1H, C13H), 7,01 (s, 1H, C9H), 6,88 (s, 1H, C5H), 6,75 (d, J = 5,7 Hz, 1H, C4H), 4,94 (dd, J = 7,7, 2,7 Hz, 1H, C7H), 4,40 (d, J = 11,9 Hz, 1H, C14H), 4,24 (d, J = 11,9 Hz, 1H, C14H), 4,16 (dd, J = 14,5, 2,7 Hz, 1H, C6H), 4,00 ppm (dd, J = 14,5, 7,7 Hz, 1H, C6H). UV-Vis (CHCl_3 , λ_{max} , nm): 262 (ϵ = $1,3 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

Вориконазол (**vcz**): IR (KBr, ν , cm^{-1}): 3196br ($\nu(\text{O--H})$), 3120w, 3047w, 3017w ($\nu(\text{C}_{\text{триазол}}\text{--H})$ и $\nu(\text{C}_{\text{ар}}\text{--H})$), 2995w, 2979w, 2941w ($\nu(\text{C--H})$), 1619s, 1587vs, 1507s, 1496vs, 1451vs, 1408vs ($\nu(\text{C}_{\text{ар}}=\text{C}_{\text{ар}})$ и $\nu(\text{C=N})$), 1278s ($\delta(\text{O--H})$), 1249m, 1210m ($\beta(\text{C}_{\text{ар}}\text{--H})$ и $\beta(\text{C}_{\text{триазол}}\text{--H})$), 1132s ($\nu(\text{C--F})$), 1054m ($\nu(\text{C--O})$), 858s, 825w, 787w, 779m, 724m, 718m ($\gamma(\text{C}_{\text{ар}}\text{--H})$ и $\gamma(\text{C}_{\text{триазол}}\text{--H})$), 622m ($\beta(\text{C}_{\text{ар}}\text{--F})$). ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3 , Прилог, Слика 89): δ = 8,93 (t, J = 3,7 Hz, 1H, C18H), 8,62 (d, J = 1,4 Hz, 1H, C20H), 7,96 (s, 1H, C5H), 7,62 (m, 1H, C3H), 7,55 (s, 1H, C9H), 6,85 (m, 1H, C12H), 6,82 (m, 1H, C10H), 6,49 (s, 1H, OH), 4,72 (d, J = 14,2 Hz, 1H, C6H), 4,32 (d, J = 14,2 Hz, 1H, C6H), 4,13 (q, J = 7,1 Hz, 1H, C14H), 1,11 ppm (d, J = 7.1 Hz, 3H, C15H). UV-Vis (CHCl_3 , λ_{max} , nm): 267 (ϵ = $2,3 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

Миконазол (**mcz**): IR (KBr, ν , cm^{-1}): 3161w, 3109w, 3089w, 3068w, 3026w ($\nu(\text{C}_{\text{диазол}}\text{--H})$ и $\nu(\text{C}_{\text{ар}}\text{--H})$), 2992w, 2933w, 2904w ($\nu(\text{C--H})$), 1590m, 1562m, 1509s, 1469s, 1435m, 1409m ($\nu(\text{C}_{\text{ар}}=\text{C}_{\text{ар}})$ и $\nu(\text{C=N})$), 1233s, 1213m ($\beta(\text{C}_{\text{ар}}\text{--H})$ и $\beta(\text{C}_{\text{диазол}}\text{--H})$), 1093vs ($\nu(\text{C--O})$), 1079vs, 1053m, 1042m, 1020m ($\nu(\text{C}_{\text{ар}}\text{--Cl})$), 819m, 809m, 787m, 734m, 659m, 621m ($\gamma(\text{C}_{\text{ар}}\text{--H})$ и $\gamma(\text{C}_{\text{диазол}}\text{--H})$). ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3 , Прилог, Слика 90): δ = 7,45 (t, J = 5,1 Hz, 2H, C2H/C10H), 7,33 (m, 2H, C4H/C5H), 7,27 (m, 2H, C13H/C12H), 7,20 (m, 2H, C17H/CH19), 7,04 (d, J = 12,2 Hz, 1H, C16H), 6,89 (t, J = 1,2 Hz, 1H, C20H), 5,01 (dd, J = 7,5, 2,7 Hz, 1H, C7H), 4,48 (d, J = 12,6 Hz, 1H, C6H), 4,34 (d, J = 12,6 Hz, 1H, C6H), 4,23 (dd, J = 14,6, 2,7 Hz, 1H, C14H), 4,07 ppm (dd, J = 14,6, 7,5 Hz, 1H, C6H).

3.4. Експериментална мерења

3.4.1. Кристалографски подаци и рендгенска структурна анализа за комплексе **Cu1**, **Ag1**, **Ag2**, **Au3** – **Au5** и **Au7**

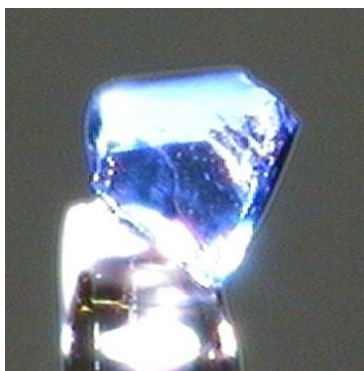
Силиконска маст се користи за премазивање монокристала комплекса **Cu1** (Слика 24), **Ag2** (Слика 25), **Au3** – **Au5** (Слика 26 и 27а) и **Au7** (Слика 27б) који су постављени на врх стаклене игле и пренети на главу гониометра у течном азоту на 150,00(10) К у циљу одређивања структуре ових комплекса. За прикупљање података се користи SuperNova дифрактометар који је опремљен Atlas детектором и CrysAlis софтвером применом монокроматског МоК α зрачења ($\lambda = 0,71073 \text{ \AA}$).¹⁵⁷ Структуре комплекса **Cu1**, **Ag2**, **Au3** – **Au5** и **Au7** су утврђене употребом Olex2 програма,¹⁵⁸ применом директних метода коришћењем SHELXT програма. Метода најмањих квадрата на бази F^2 је примењена за утачњавање структуре, при чему су сви атоми тежи од водоника утачњавани анизотропно, користећи Olex2 или SHELXL-2018/3.^{158,159}

Рендгенска структурна анализа за кристале комплекса **Ag1** вршена је на 150(2) К помоћу Agilent Technologies Supernova-E CCD дифрактомера и применом CuK α зрачења (микрофокусна рендгенска цев, вишеслојна огледала). Добијени подаци су кориговани за апсорпцију ваздуха и детектора, Лоренцов и поларизациони ефекат¹⁶¹ и скалирани применом одговарајућих сферних хармонијских функција.^{162,163} Структура је решена поступком извртања електронске густине,^{164,165} док је утачњавање вршено методом најмањих квадрата на бази F^2 .^{166–170}

Положаји водоникових атома који су везани за атоме угљеника су израчунати на стандардним растојањима, док се њихово утачњавање врши употребом „riding” модела. Координате водоникових атома у води израчунавају се из разлика Фуријеових мапа и даље су прецизно постављене коришћењем одговарајућих растојања. За приказивање кристалне структуре употребљен је MERCURY програм, а добијени експериментални подаци су дати у табелама 1 – 4.^{160,171}

Табела 1. Кристалографски подаци за комплекс **Cu1**

Cu1	
Емпиријска формула	$C_{26}H_{34}Cl_2CuF_4N_{12}O_7$
Моларна маса (g/mol)	837,09
Температура (K)	150,00(10)
Кристални систем	моноклинични
Просторна група	C2/c
a (Å)	23,4829(17)
b (Å)	9,3380(4)
c (Å)	19,7355(14)
β (°)	123,964(10)
V (Å ³)	3589,3(5)
Z	4
ρ (g/cm ³)	1,549
μ (mm ⁻¹)	0,839
F (000)	1716,0
Димензије кристала (mm ³)	0,25 × 0,2 × 0,15
Извор зрачења (Å)	MoK α (λ = 0,71073)
2 Θ опсег за прикупљене податке (°)	5,952 – 54,962
Опсег индекса	$-30 \leq h \leq 25$, $-8 \leq k \leq 12$, $-18 \leq l \leq 25$
Број прикупљених рефлексија	8472
Број независних рефлексија	4103
	[$R_{int} = 0,0182$, $R_{sigma} = 0,0252$]
Подаци/ограничења/параметри	4103/0/251
Коначни R индекси [$I > 2\sigma(I)$]	$R_1 = 0,0311$, $wR_2 = 0,0821$
Коначни R индекси [сви подаци]	$R_1 = 0,0360$, $wR_2 = 0,0849$
$\Delta\rho_{max}$ (e/Å ³)	0,62
$\Delta\rho_{min}$ (e/Å ³)	-0,46

Слика 24. Кристали **Cu1** комплекса

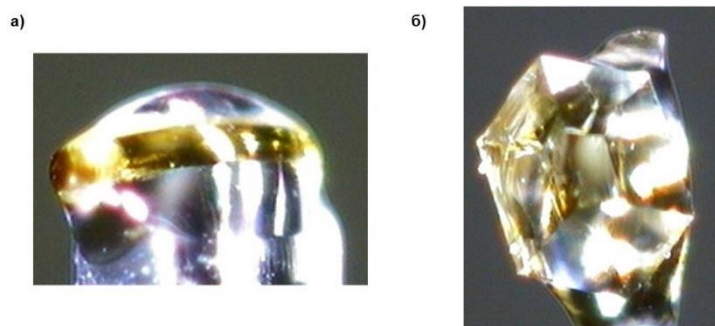
Табела 2. Кристалографски подаци за комплексе **Ag1** и **Ag2**

	Ag1	Ag2
Емпиријска формула	$C_{70}H_{78}AgCl_4N_{17}O_{12}$	$C_{36}H_{28}AgCl_8N_5O_5$
Моларна маса (g/mol)	1599,16	1002,10
Температура (K)	120(1)	150,00(10)
Кристални систем	триклинични	моноклинични
Просторна група	$P\bar{1}$	$C2/c$
a (Å)	11,53484(13)	25,6185(14)
b (Å)	12,50545(13)	7,9992(4)
c (Å)	25,9384(4)	19,6473(13)
α (°)	102,2903(10)	90
β (°)	91,4546(11)	104,295(6)
γ (°)	102,3954(9)	90
V (Å ³)	3560,68(8)	3901,6(4)
Z	2	4
ρ (g/cm ³)	1,492	1,706
μ (mm ⁻¹)	4,274	1,115
$F(000)$	1656,0	2008,0
Димензије кристала (mm ³)	0,11 × 0,10 × 0,07	0,30 × 0,20 × 0,20
Извор зрачења (Å)	CuK α (λ = 1,54184)	MoK α (λ = 0,71073)
2 Θ опсег за прикупљене податке (°)	3,5 – 70,9	5,35 – 60,914
Опсег индекса	-14 ≤ h ≤ 14, -15 ≤ k ≤ 15, -30 ≤ l ≤ 31	-35 ≤ h ≤ 35, -11 ≤ k ≤ 7, -20 ≤ l ≤ 27
Број прикупљених рефлексија	188791	15121
Број независних рефлексија	12380	5309
Подаци/ограничења/параметри	[R_{int} = 0,0414] 13619/309/1147	[R_{int} = 0,0239, R_{sigma} = 0,0291] 5309/0/259
Коначни R индекси [$I > 2\sigma(I)$]	R_1 = 0,0421, wR_2 = 0,1007	R_1 = 0,0325, wR_2 = 0,0697
Коначни R индекси [сви подаци]	R_1 = 0,0472, wR_2 = 0,1035	R_1 = 0,0416, wR_2 = 0,0743
$\Delta\rho_{max}$ (e/Å ³)	1,276	0,83
$\Delta\rho_{min}$ (e/Å ³)	-0,562	-1,33

Слика 25. Кристали **Ag2** комплекса

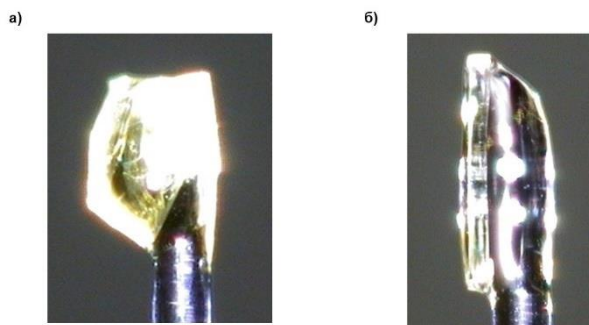
Табела 3. Кристалографски подаци за комплексе **Au3** и **Au4**

	Au3	Au4
Емпиријска формула	C ₉ H ₈ AuCl ₃ N ₂	C ₂₂ H ₁₇ AuCl ₄ N ₂
Моларна маса (g/mol)	447,49	648,14
Температура (K)	150,00(10)	150,00(10)
Кристални систем	моноклинични	моноклинични
Просторна група	<i>P21/n</i>	<i>P21/n</i>
<i>a</i> (Å)	8,7297(5)	9,4310(4)
<i>b</i> (Å)	6,9516(3)	18,1660(7)
<i>c</i> (Å)	19,7326(11)	1,7936(6)
β (°)	102,008(5)	100,300(4)
<i>V</i> (Å ³)	1171,28(11)	2156,52(16)
<i>Z</i>	4	4
ρ (g/cm ³)	2,538	1,996
μ (mm ⁻¹)	13,210	7,329
<i>F</i> (000)	824,0	1240,0
Димензије кристала (mm ³)	0,3 × 0,05 × 0,05	0,6 × 0,5 × 0,4
Извор зрачења (Å)	MoK α (λ = 0,71073)	MoK α (λ = 0,71073)
2 Θ опсег за прикупљене податке (°)	4,7704 – 58,8898	4,93 – 51,362
Опсег индекса	-10 ≤ <i>h</i> ≤ 11, -9 ≤ <i>k</i> ≤ 9, -24 ≤ <i>l</i> ≤ 24	-11 ≤ <i>h</i> ≤ 11, -21 ≤ <i>k</i> ≤ 22, -11 ≤ <i>l</i> ≤ 15
Број прикупљених рефлексија	8011	13267
Број независних рефлексија	2782	4091
Подаци/ограничења/параметри	[<i>R</i> _{int} = 0,0316, <i>R</i> _{sigma} = 0,0467] 2782/0/136	[<i>R</i> _{int} = 0,0247, <i>R</i> _{sigma} = 0,0242] 4091/0/262
Коначни <i>R</i> индекси [<i>I</i> > 2 σ (<i>I</i>)]	<i>R</i> ₁ = 0,0280, <i>wR</i> ₂ = 0,0603	<i>R</i> ₁ = 0,0231, <i>wR</i> ₂ = 0,0535
Коначни <i>R</i> индекси [сви подаци]	<i>R</i> ₁ = 0,0359, <i>wR</i> ₂ = 0,0656	<i>R</i> ₁ = 0,0289, <i>wR</i> ₂ = 0,0561
$\Delta\rho_{\max}$ (e/Å ³)	1,93	1,06
$\Delta\rho_{\min}$ (e/Å ³)	-2,15	-1,08

Слика 26. Кристали **Au3** (а) и **Au4** (б) комплекса

Табела 4. Кристалографски подаци за комплексе **Au5** и **Au7**

	Au5	Au7
Емпиријска формула	C ₁₈ H ₁₅ AuCl ₆ N ₂ O	C ₁₆ H ₁₄ AuCl ₃ F ₃ N ₅ O
Моларна маса (g/mol)	684,99	652,64
Температура (K)	150,00(10)	150,00(10)
Кристални систем	триклинични	моноклинични
Просторна група	<i>P</i> $\bar{1}$	<i>P</i> 2 ₁
<i>a</i> (Å)	7,5671(3)	12,1573(5)
<i>b</i> (Å)	9,5470(5)	5,8115(2)
<i>c</i> (Å)	15,8505(7)	15,0653(6)
α (°)	89,941(4)	90
β (°)	80,989(4)	99,973(4)
γ (°)	76,380(4)	90
<i>V</i> (Å ³)	1098,39(9)	1048,32(7)
<i>Z</i>	2	2
ρ (g/cm ³)	2,071	2,068
μ (mm ⁻¹)	7,439	7,443
<i>F</i> (000)	652,0	620,0
Димензије кристала (mm ³)	0,2 × 0,2 × 0,1	0,3 × 0,05 × 0,05
Извор зрачења (Å)	MoK α (λ = 0,71073)	MoK α (λ = 0,71073)
2 Θ опсег за прикупљене податке (°)	5,208 – 54,968	5,492 – 54,964
Опсег индекса	-9 ≤ <i>h</i> ≤ 8, -12 ≤ <i>k</i> ≤ 12, -20 ≤ <i>l</i> ≤ 20	-15 ≤ <i>h</i> ≤ 15, -7 ≤ <i>k</i> ≤ 5, -19 ≤ <i>l</i> ≤ 17
Број прикупљених рефлексија	10977	8078
Број независних рефлексија	5033	3723
Подаци/ограничења/параметри	[<i>R</i> _{int} = 0,0493, <i>R</i> _{sigma} = 0,0605]	[<i>R</i> _{int} = 0,0290, <i>R</i> _{sigma} = 0,0407]
Коначни <i>R</i> индекси [<i>I</i> > 2 σ (<i>I</i>)]	<i>R</i> ₁ = 0,0369, <i>wR</i> ₂ = 0,0789	<i>R</i> ₁ = 0,0263, <i>wR</i> ₂ = 0,0621
Коначни <i>R</i> индекси [сви подаци]	<i>R</i> ₁ = 0,0465, <i>wR</i> ₂ = 0,0851	<i>R</i> ₁ = 0,0282, <i>wR</i> ₂ = 0,0633
$\Delta\rho_{\max}$ (e/Å ³)	1,66	1,34
$\Delta\rho_{\min}$ (e/Å ³)	-1,56	-1,08

Слика 27. Кристали **Au5** (а) и **Au7** (б) комплекса

3.4.2. Елементална микроанализа

Елементалне микроанализе за С, Н и N параметре рађене су у Микроаналитичкој лабораторији на Хемијском факултету Универзитета у Београду и на Факултету за хемију и хемијску технологију Универзитета у Љубљани (PerkinElmer 2400 Series II инструмент).

3.4.3. Масени спектри

Масени спектри комплекса сребра(I), бакра(II) и злата(III) су снимљени на Agilent 62224 accurate масеном спектрометру. Спектри су снимљени у позитивном моду након растварања одговарајућих комплекса у ацетонитрилу.

3.4.4. IR спектри

Инфрацрвени спектри су снимљени на Bruker FTIR Alpha Platinum ATR спектрометру у опсегу таласних дужина $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$ и применом КВг технике на Perkin Elmer Spectrum 100 спектрометру у опсегу таласних дужина $4000 - 450 \text{ cm}^{-1}$.

3.4.5. UV-Vis спектри

UV-Vis спектри су снимљени у опсегу таласних дужина $900 - 200 \text{ nm}$ након растварања комплекса и одговарајућег лиганда у dmsO, CHCl_3 и dmf на PerkinElmer Lambda 750 UV/Vis/near-IR и Shimadzu double-beam спектрофотометрима. Поред тога, UV-Vis спектофотометрија је коришћена за праћење стабилности комплекса, при чему су спектри снимљени одмах након растварања комплекса упоређивани са спектрима снимљеним 24 и 48 h након растварања.

3.4.6. ^1H NMR спектри

^1H NMR спектри су снимљени на Varian Gemini 2000 спектрометру на 200 MHz и Bruker Avance III спектрометру (тетраметилсилан као интерни стандард) на 500 MHz на собној температури. Снимање ^1H NMR спектра је вршено растварањем 5,0 mg комплекса или одговарајућег лиганда у 0,6 mL dmsO- d_6 или CDCl_3 у NMR киветама пречника 5 mm. Хемијска померања, δ , изражена су у ppm, док су константе купловања, J , дате у Hz. Мултиплицитет сигнала се означава као: s, синглет; d, дублет; dd, дублет дублета; ddd, дублет дублета дублета; t, триплет; td, триплет дублета; q, квартет; dq, дублет квартета и m, мултиплет.

3.4.7. Моларна проводљивост

Мерења моларне проводљивости су вршена на собној температури на Crison Multimeter MM 41 и HI-2003 Edge® Conductivity Meter кондуктометрима. Концентрација раствора испитиваних комплекса у dmsO или dmf износила је $1,0 \times 10^{-3} \text{ M}$.

3.4.8. Волтаметријска мерења

Циклични волтамограми су снимљени на потенциостату/галваностату (AutoLab PGSTAT204) применом ћелије са троелектродним системом (радна електрода – стакласти угљеник (GC), референтна електрода – zasiћена Ag/AgCl и помоћна електрода – платинска жица). Тетра-*n*-бутиламонијум-хексафлуорофосфат је коришћен као проводни електролит. Концентрација раствора испитиваних комплекса у dmsо је износила $1,0 \times 10^{-3}$ М.

3.5. Биолошка испитивања

3.5.1. Припрема хранљивих подлога за биолошка испитивања

Припрема *Luria Bertani* подлоге (LB-течна подлога)

За припрему LB-течне подлоге, растворити 10,0 g триптона, 5,0 g екстракта квасца и 10,0 g натријум-хлорида у 1,0 L дејонизоване воде. Раствор мешати док се ове супстанце не растворе, а након тога стерилисати у аутоклаву 20 min на 15 psi. Поступак је исти за припрему LA-чврсте подлоге уз додатак 14,2 g агара у 1,0 L дејонизоване воде.

Припрема *Sabouraud dextrose* подлоге (SAB)

Растворити 40,0 g глукозе, 10,0 g пептона и 15,0 g агара у 0,95 L дејонизоване воде уз подешавање рН вредности у опсегу 5,0 – 6,0. Раствор разблажити водом до 1,0 L, а након тога стерилисати у аутоклаву 20 min на 15 psi.

Припрема *RPMI* подлоге

Растворити 10,4 g комерцијалног RPMI (Roswell Park Memorial Institute, Merck, Минхен, Немачка) и 34,5 g MOPS (3-(*N*-морфолин)пропансулфонска киселина) у 0,9 L дејонизоване воде уз подешавање рН вредности на приближно 7,0 помоћу 1,0 М раствора NaOH. Раствор разблажити водом до 1,0 L, а након тога стерилисати и чувати на 4 °C.

Припрема *Spider* подлоге

Растворити 10,0 g манитола, 2,0 g калијум-фосфата и 13,5 g агара у 0,95 L дејонизоване воде уз подешавање рН вредности у опсегу 5,0 – 6,0. Раствор разблажити водом до 1,0 L, а након тога стерилисати и чувати на 4 °C.

3.5.2. *In vitro* антимикробна активност

Вредности минималне инхибиторне концентрације (MIC) за комплексе **Cu1**, **Ag1**, **Ag2**, **Au1** – **Au8** и одговарајуће азоле који су коришћени у њиховим синтезама одређене су микродилуционим тестом у складу са стандардном методом која се користи у микробиолошким лабораторијама. Ову методу препоручује Национални комитет за Стандарде клиничких бактериолошких лабораторија (M07-A8), EUCAST (Европски комитет за испитивање осетљивости на антимикробне лекове; верзија 7.3.1)¹⁷² и CLSI (Институт за клиничке и лабораторијске стандарде; M07-A10).¹⁷³ За испитивање

антибактеријске активности, коришћене су различите врсте бактерија: *Escherichia coli* NCTC 9001, *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 10332, *P. aeruginosa* PA14, *P. aeruginosa* BK25H,¹⁷⁴ *P. aeruginosa* S20,¹⁷⁴ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *S. aureus* NCTC 6571, *S. aureus* MRSA и *Listeria monocytogenes* NCTC 11994, док су за испитивање антифунгалне активности коришћене следеће *Candida* врсте: *C. albicans* ATCC 10231, *C. parapsilosis* ATCC 22019, *C. glabrata* ATCC 2001, *C. krusei* ATCC 6258, *C. auris* ATCC 21092, као и клинички изолати из ветеринарских и хуманих узорака *C. albicans* 1c, *C. albicans* 1f,¹⁷⁵ *C. albicans* 11, *C. albicans* 13¹⁷⁶, *C. albicans* SC5314 RFP (гљивица која експримира црвени флуоресцентни протеин) и *C. albicans* SC5314 GFP (гљивица која експримира зелени флуоресцентни протеин).¹⁷⁷ Тестирана једињења су растварана у dmsо у концентрацији од 50 mg/mL. Највећа коришћена концентрација је била 200 µg/mL. Сојеви гљивица су узгајани у плочама са 96 бунарића у RPMI 1640 медијуму, са коначном концентрацијом 1×10^5 cfu/mL у сваком бунарићу, док су бактерије узгајане у LB подлози, при чему је концентрација у сваком бунарићу била 5×10^5 cfu/mL. Све плоче су покривене и инкубиране на 37 °C током 24 h без мућкања. Инхибиција раста микроба је одређена мерењем апсорбанце на 530 nm (OD₅₃₀) за гљивице и 625 nm (OD₆₂₅) за бактерије, коришћењем Tecan Infinite 200 Pro multiplate reader (Tecan Group Ltd., Манедорф, Швајцарска).

Microsporium canis је добијен из бриса коже пса у ветеринарској лабораторији VetLab из Београда. Гљивице су изоловане и размножене на SAB плочама и узгајане на плочама са 24 бунарића. Свеж SAB течни медијум је припремљен након хлађења на 50 °C и помешан са испитиваним једињењима (коначне концентрације комплекса и лиганада су биле 25 и 50 µg/mL). После хлађења на собну температуру у току 1 h, стерилним чачкалицама додата је бактерија *M. canis*. Плоче су инкубиране на собној температури 7 дана, а бунарићи су посматрани након 4 и 7 дана. Подлога са *M. canis* и подлога без гљивица биле су позитивна и негативна контрола.

3.5.3. Цитотоксичност

In vitro цитотоксичност је одређена као антипролиферативна активност на хуманим ћелијским линијама фибробласта плућа (MRC-5) и алвеоларног базалног епитела A549 (обе ћелијске линије су добијене из ATCC колекције (American Type Culture Collection), помоћу МТТ теста.^{175,178} Приликом одређивања цитотоксичности, метаболички активне ћелије редукују жути 3-(4,5-диметил(тиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолијум-бромид (МТТ) у формазањ лубичасте боје у присуству сукцинат дехидрогеназе, при чему се настали лубичасти кристали растварају у dmsо док се спектрофотометријски мерењем апсорбанце на 540 nm помоћу Tecan Infinite 200 Pro multiplate инструмента одређује интензитет лубичасте боје који је пропорционалан броју метаболички активних ћелија. Цитотоксичност се изражава као концентрација једињења која инхибира раст ћелије за 50% (IC₅₀). Обе поменуте ћелијске линије су инкубиране 48 h на 37 °C у RPMI 1640 подлози суплементираној са испитиваним једињењима, у влажној атмосфери од 95% ваздуха и 5% CO₂.

3.5.4. Дејство комплекса на формирање хифа код *C. albicans*

Испитивана је активност комплекса на формирање хифа код *C. albicans* ATCC 10231, при чему је формирање хифа *C. albicans* праћено на чврстој Spider¹⁷⁹ и течној RPMI 1640 (са додатком 2% (v/v) глукозе) подлози. Ћелије *C. albicans* су узгајане преко ноћи у SAB на 30

°C, испране фосфатним пуфером и засејане на RPMI 1640 подлози до коначне концентрације од 1×10^6 ћелија/mL и инкубиране на 37 °C на ротационом шејкеру са 180 rpm. Ћелије третиране dmsо растварачем су коришћене као контрола. Микроскоп са светлим пољем (Olympus BX51) са увећањем од 20 пута је коришћен у циљу праћења формирања хифа.

3.5.5. Дејство комплекса на формирање и разарање претходно формираног биофилма код *C. albicans*

Испитивана је активност комплекса на формирање биофилма и разарање претходно формираног биофилма *Candida* сојева (*C. albicans* ATCC 10231 и *C. parapsilosis* ATCC 22019) у складу са модификованом методом, која је раније описана у литератури.¹⁸⁰

Инокулум *Candida* сојева за тестове инхибиције формирања и разарања биофилма је био 1×10^6 cfu/mL. Почетне концентрације комплекса су 5 µg/mL. Најмања концентрација испитиваних комплекса која је инхибирала формирање биофилма је одређена након 48 h на 37 °C. У тестовима разарања биофилма, претходно формиран биофилм (24 h на 37 °C) инкубиран је 24 h са опадајућим концентрацијама комплекса и лиганда. Раст биофилма је квантификован кристално љубичастим (*crystal violet*, CV) бојењем адхерентних ћелија и мерењем апсорбанце на 590 nm помоћу Tecan Infinite 200 Pro multiplate инструмента.

3.5.6. Адхезиони тест код *C. albicans*

Способност *C. albicans* врсти које експримирају црвени (*C. albicans* SC5314-RFP) и зелени (*C. albicans* SC5314-GFP) флуоресцентни протеин да инфицирају ћелије карцинома плућа A549 (добијене из ATCC колекције) проучавана је адхезионим тестом у присуству субминималних инхибиторних концентрација комплекса.¹⁷⁷ Конфлуентни монослојеви A549 су коинкубирани са ћелијама *C. albicans* SC5314 у плочама са бунарићима током 1 h у RPMI 1640 подлози, на 37 °C и 5% CO₂. Након коинкубације, неадхерентне ћелије *C. albicans* су уклоњене, док су ћелије *C. albicans* A549 обојене помоћу 1,0 µg/mL 2-(4-амидинофенил)-6-индолкарбамадин дихидрохлорида у мраку током 20 min. Адхерентне ћелије *C. albicans* су визуелно одређене помоћу флуоресцентног микроскопа (Olympus BX51) са увећањем од 20 пута.

3.5.7. Стварање реактивних кисеоничних врста (ROS) код *C. albicans*

Стварање интрацелуларних реактивних кисеоничних врста је праћено помоћу флуоресцентне боје, 2',7'-дихлорфлуоресцин-диацетата (DCFH-DA).¹⁷⁵ Ћелије *C. albicans* су инокулисане у SAB и инкубиране на 30 °C и 200 rpm до постизања густине од 1×10^7 ћелија/mL. Комплекс је додат у MIC вредностима и инкубација је настављена 2,5 h при истим условима. Као позитивна контрола је коришћен амфотерицин Б. Након бојења са 10 µM раствором DCFH-DA на 30 °C током 30 min, ћелије су сакупљене и испране PBS раствором. Интензитет флуоресценције (ексцитација на 488 nm и емисија на 540 nm) одређен је CyFlow Space Partec проточним цитометром помоћу Partec FloMax софтвера.

3.5.8. Одређивање количине ергостерола код *C. albicans*

Испитиван је утицај комплекса у концентрацијама од $0,25 \times \text{MIC}$ и $0,5 \times \text{MIC}$ на укупну количину ергостерола код *C. albicans* ATCC 10231 соја у складу са модификованом

методом која је раније описана у литератури.¹⁸¹ Количина ергостерола је одређена након 18 h инкубације на 37 °C на ротационом шејкеру са 180 rpm спектрофотометријски одређивањем апсорбанце између 240 и 300 nm користећи Ultrospec 3300pro 573 инструмент.

3.5.9. Анти-QS (*quorum sensing*) активност

У циљу одређивања анти-QS активности комплекса, коришћени су *Chromobacterium violaceum* CV026,¹⁸² за производњу љубичастог пигмента виолацеина, *Serratia marcescens* ATCC 27117, за производњу продигиозина¹⁸³ и *P. aeruginosa* PA14, за производњу пиоцијанина.¹⁸⁴

C. violaceum CV026 је узгајан у LB подлози са антибиотиком преко ноћи на 30 °C уз мешање на ротационом шејкеру (180 rpm) и разливен у Петријеве шоље. У полуврсти LB агар (0,3%, w/v, 5,0 mL), додато је 50,0 µL бактеријске културе и *N*-хексаноил-L-хомосерин лактон до коначне концентрације 5,0 µM. *N*-хексаноил-L-хомосерин лактон индукује производњу виолацеина. Након очвршћавања, стерилни дискови су стављени на површину подлоге, и на њих додавани комплекси у концентрацијама од 500 и 250 µg/диску. Петријеве шоље су инкубирани на 30 °C у усправном положају.

За производњу продигиозина коришћен је *S. marcescens* ATCC 27117, при чему не треба додавати једињење које индукује његову производњу.¹⁸⁴ Инхибиција синтезе продигиозина је идентификована на основу одсуства црвене боје око диска, односно као зона у којој не долази до синтезе пигмената. Инхибиторно деловање комплекса је изражено у mm.

За производњу пиоцијанина, *P. aeruginosa* PA14 је узгајана преко ноћи и та култура је субкултурисана у односу 1 : 1000 у 5,0 mL свежег LB медијума. Испитивани комплекси су анализирани у концентрацији од 20 и 50 µg/mL и период инкубације је био 20 h на 37 °C на 180 rpm. Измерен је OD₆₀₀, док су ћелије сакупљене из култура центрифугирањем (13000 rpm, 15 min). OD₆₉₅ супернатаната је измерен на спектрофотометру Ultrospec 3300pro 573 (Amersham Biosciences, Енглеска).

3.5.10. Антитуберкулозна активност

Испитивана је антитуберкулозна активност миконазола и одговарајућих комплекса **Ag2** и **Au8**, при чему је инокулум припремљен у свежем LJ (Löwenstein–Jensen) медијуму, који је поново субкултурисан у 7H9-S медијуму (7H9 бујон, 0,1% казитон, 0,5% глицерол, олеинска киселина, албумин, декстроза и каталаза [OADC]). OD₅₉₀ је подешен на 1,0 и разблажен у односу 1 : 20, при чему је коришћено 100,0 µL инокула. Раствор сваког једињења је одмрзнут и разблажен у 7H9-S медијуму. Серија двоструких разблажења сваког једињења припремљена је директно у стерилној микротитарској плочи са 96 бунарића коришћењем 100,0 µL 7H9-S. Контрола раста која не садржи антибиотик и стерилна контрола су такође припремљени на свакој плочи. Стерилна вода је додата у све бунариће како би се избегло испаравање током инкубације. Период инкубације је 7 дана на 37 °C при нормалним условима. После 7 дана инкубације, 30,0 µL раствора аламар плаве боје је додато у сваки бунарић, при чему је плоча поново инкубирана преко ноћи. Промена боје из плаве у ружичасту указује на раст бактерија. MIC је дефинисан као најнижа концентрација једињења која је спречила ову промену боје.

3.5.11. Статистичка анализа

Резултати су представљени као средње вредности $\pm$ стандардне девијације (SD) при чему су разлике између експерименталних и контролних група одређивање применом Студентовог *t*-теста. Ова анализа је урађена помоћу SPSS 20 софтвера.

3.6. *In vivo* испитивање токсичности

Испитивана је токсичност комплекса на моделу зебра рибица (*Danio rerio*) према општим правилима OECD (Guidelines for the Testing of Chemicals), водича за испитивање супстанци применом овог модела.¹⁸⁵ Сви експерименти са зебра рибицама су у складу са регулативом Европске уније 2010/63/EU и етичким упутствима за рад са лабораторијским животињама Института за молекуларну генетику и генетичко инжењерство Универзитета у Београду. Зебрице је обезбедила др Ана Цвејић (Trust Sanger Institute, Кембриџ, Велика Британија). Ембриони зебра рибица су узгајани и размножавани на 28 °C у периоду светлост : тама 14 : 10 h. Зебра рибице су редовно храњене два пута дневно комерцијално сувом храном и *Artemia nauplii* једном дневно. Ембриони произведени размножавањем су сакупљени и распоређени у плоче са 24 бунарића које садрже по 10 ембриона по бунарићу у 1,0 mL ембрионске воде (0,2 g/L Instant Ocean®Salt у дестилованој води) у сваком бунарићу. За процену морталитета и развојне токсичности, ембриони су третирани различитим концентрацијама испитиваних комплекса 6 h након оплодње (*hours post fertilization*, hpf). Као негативна контрола коришћен је dmsо. Експерименти су извођени три пута са 20 ембриона по концентрацији. При 120 hpf, ембриони су прегледани ради утврђивања откуцаја срца, анестезирани додатком 0,1% (v/v) раствора трикаина, фотографисани и замрзавани на -20 °C за ≥ 24 h. Токсичност је процењена одређивањем леталне концентрације (LC₅₀; концентрација која има за резултат 50% морталитета ембриона током 120 hpf). Вредност LC₅₀ је одређена програмом ToxRatPro (ToxRat®, Software for the Statistical Analysis of Biotests, ToxRat Solution GmbH, Alsdorf, Germany, Version 2.10.05) коришћењем анализе са линеарном регресијом максималне вероватноће.

3.6.1. Инфекција зебра рибица *C. albicans* сојем

Да би се проценила *in vivo* антифунгална активност комплекса у односу на лиганд, коришћен је модел леталне дисеминоване кандидијазе зебра рибица, у складу са претходно описаном процедуром.^{186,187} Антифунгална активност је процењена на основу процента преживљавања инфицираних ембриона током четири дана након инфекције (*days post infection*, dpi). Ефекат примењеног третмана на појаву гљивичних ћелија унутар инфицираних ембриона је праћен флуоресцентним микроскопом (Olympus BX51, Applied Imaging Corp., San Jose, CA, USA).

3.6.2. Припрема за микроинјектирање

За вршење експеримената, коришћен је сој M137 *Candida albicans* CS5314 који експримира зелени флуоресцентни протеин (GFP). У циљу добијања ћелија погодних за инјектирање, култура гљивица је узгајана преко ноћи у YPD медијуму (екстракт пептон декстрозе квасца) на 37 °C уз мућкање (180 rpm), субкултурисана 1 : 100 у истом медијуму и узгајана до оптичке густине (OD₅₃₀) од 0,7 до 0,8. Да би се припремио коначни инокулум

за микроинјектирање, 2,0 mL ћелија се издваја центрифугирањем (1500 g током 10 min; Centrifuge 5415D, Eppendorf, Хамбург, Немачка), испере три пута стерилним PBS раствором и на крају суспендује у 5% поливинилпиролидону (PVP), како би се постигла коначна концентрација од 2×10^7 ћелија/mL.

3.6.3. Инфекција ембриона зебра рибица

Експерименти инфекције су изведени коришћењем ембриона зебра рибица дивљег типа. Пре инјектирања, 24 h након оплодње (hpf) ембриони су ручно дехорионисани и чувани у ембрионској води на 28,5 °C. При 34 – 36 hpf, ембриони су анестезирани трикаином и микроинјектирани помоћу пнеуматске пикопумпе (PV820, World Precision Instruments, USA) са приближно 5 nL суспензије ћелија *C. albicans* M137 која садржи 2×10^7 ћелија/mL у 5% PVP. Преживљавање инфицираних зебра рибица је праћено свакодневно до 4 dpi под стереомикроскопом (SMZ143-N2GG, Motic, Germany). Угинуле зебра рибице су уклањане свакодневно.

3.7. Интеракције са биомолекулима

Интеракције комплекса са говеђим серум албумином (BSA) и DNA који је изолован из тимуса телета (ct-DNA) испитиване су флуориметријски на Jasco FP-6600 спектрофлуориметру. Флуоресцентни емисиони спектри BSA-комплекс система снимљени су у опсегу таласних дужина 295 – 500 nm са ексцитацијом на 290 nm.¹⁸⁸ PBS је коришћен за припрему раствора ct-DNA чија је концентрација одређена на основу вредности UV апсорбације на 258 nm и вредности моларног екстинкционог коефицијента $\varepsilon = 6,6 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.¹⁹⁰ Флуоресцентни емисиони спектри ct-DNA-EthBr-комплекс система су снимљени у опсегу таласних дужина 525 – 750 nm са ексцитацијом на 520 nm. Израчуната је Стерн-Волмерова константа формирања комплекса са ct-DNA-EthBr/BSA (K_{sv}), коришћењем једначине:

$$F_0/F = 1 + K_q\tau_0[Q] = 1 + K_{sv}[Q]$$

F_0 и F представљају интензитет флуоресценције пре и после додатка комплекса, K_q је биомолекулска константа гашења, τ_0 је време живота флуорофлоре у одсуству комплекса, а $[Q]$ је концентрација слободног комплекса. Број везујућих места n и константа везивања K_A за биомолекул могу се израчунати коришћењем једначине:

$$\log(F_0 - F)/F = \log K_A + n\log[Q]$$

Добијени резултати приказани су графички као зависност $\log(F_0 - F)/F$ од $[Q]$. Број везујућих места (n) може се добити из нагиба праве, док се вредност K_A може добити из пресека праве $\log(F_0 - F)/F = f(\log[Q])$.^{188,190}

Поред тога, испитиване су компетитивне интеракције комплекса са BSA у присуству маркера еозина Y (**eos Y**), ибупрофена (**ibu**) и дигитоксина (**dig**), при чему eos Y представља маркер за домен I и поддомен IА, **ibu** маркер за домен II и поддомен IIIА и **dig** за домен III и поддомен IВ.

3.8. Квантно-механички прорачуни

DFT прорачуни су вршени коришћењем ADF¹⁹¹ програма у Amsterdam Modeling Suite (верзија 2024.101).¹⁹² За све атоме је примењен TZP као базисни скуп. Помоћу ZORA апроксимације урачунати су релативистички ефекти.^{193,194} За оптимизацију геометрије комплекса коришћена је апроксимација локалне густине (LDA), са Слејтеровом разменом¹⁹⁵ и Vosko-Wilk-Nusair (VWN) корелацијом.¹⁹⁶ Утицај растварача (етанол, dmsO и dmF) на геометрију комплекса је испитиван помоћу COSMO солватационог модела.^{197,198} Корекција интерполације слободног ротора за ниске вибрационе фреквенције^{199,200} коришћена је за израчунавање унутрашњих енергија и Гибсове (*Gibbs*) слободне енергије на 298 K. Електронске енергије су одређене применом мета-хибридног TPSSh функционала^{201,202} са Грмеовом четвртом генерацијом дисперзионих енергетских корекција,²⁰³ односно TPSSh-D4. COSMO солватациони модел је коришћен у TDDFT прорачуну, помоћу NOCSMRSP који обезбеђује да електронска наелектрисања индукована током TDDFT прорачуна не утичу на COSMO површинска наелектрисања. Природне транзиционе орбитале (*Natural Transition Orbitals*, NTO)²⁰⁴ су примењене за одређивање електронских прелаза.

Хемијско везивање миконазола је испитивано помоћу анализе декомпозиције енергије (*Energy Decomposition Analysis*, EDA)^{205–207} на ZORA-TPSSh-D4/TZP//ZORA-LDA/TZP нивоу теорије. Енергија интеракције између фрагмената се разлаже на следећи начин: $E_{\text{int}} = E_{\text{elst}} + E_{\text{Pauli}} + E_{\text{orb}} + E_{\text{disp}}$. Проток наелектрисања између фрагмената је квантификован коришћењем Хиршфилдове анализе наелектрисања.²⁰⁸

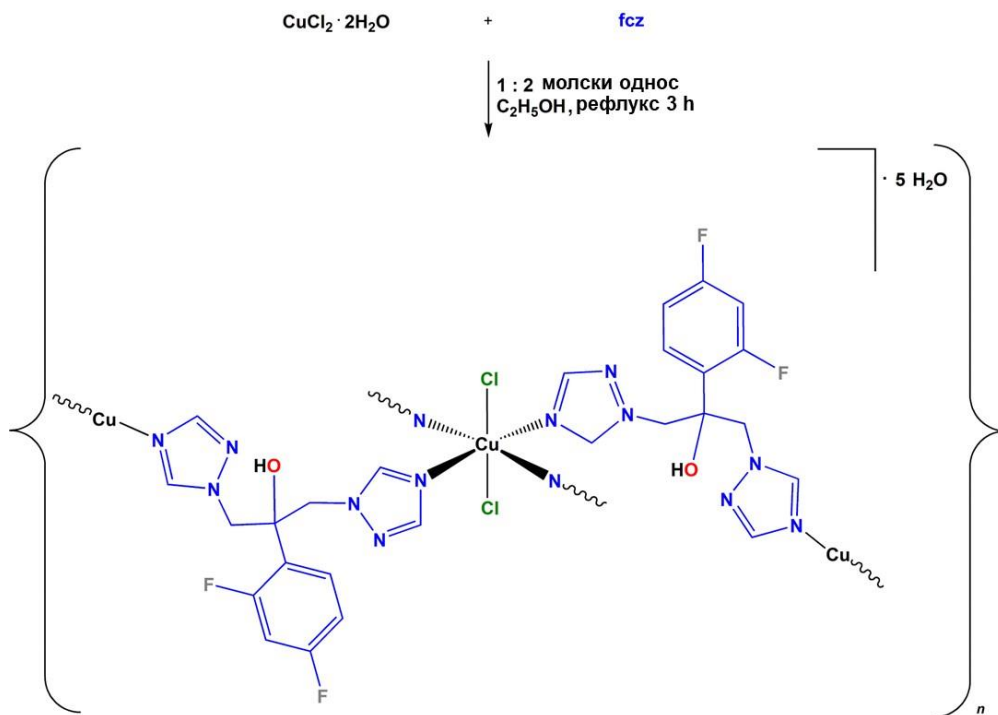
Молекулски докинг

Молекулски докинг је коришћен за одређивање интеракција између комплекса и циљног ензима и за израчунавање енергија везивања. За оптимизацију одговарајуће геометрије комплекса коришћен је полуемпиријски приступ (PM6).^{209–213} За све прорачуне везане за оптимизацију геометрије примењен је софтверски програм Gaussian 09. Као циљни ензим изабран је цитохром P450 стерол 14 α -деметилаза (CYP51) из *M. tuberculosis* (PDB: 1EA1). Коришћен је софтвер Molegro Virtual Docker (MVD v. 2013.6.0.1.). Визуелизација најниже енергије је урађена у CHIMERA (<http://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>) програму.

4. ДИСКУСИЈА РЕЗУЛТАТА

4.1. Синтеза, карактеризација и антимикробна активност комплекса бакра(II) са флуконазолом¹

Антифунгални агенс, флуконазол (**fcz**) коришћен је као лиганд за синтезу комплекса бакра(II), $\{[\text{CuCl}_2(\text{fcz})_2] \cdot 5\text{H}_2\text{O}\}_n$ (**Cu1**).²¹⁴ Овај комплекс је добијен у реакцији флуконазола и $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ која је изведена у молском односу 1 : 2 уз рефлукс 3 h (Слика 28). Кристали **Cu1** комплекса погодни за рендгенску структурну анализу су настали упаравањем раствора добијеног растварањем плавог талога у смеши ацетонитрил/вода (v/v 1:1) на собној температури након 3 – 5 дана.



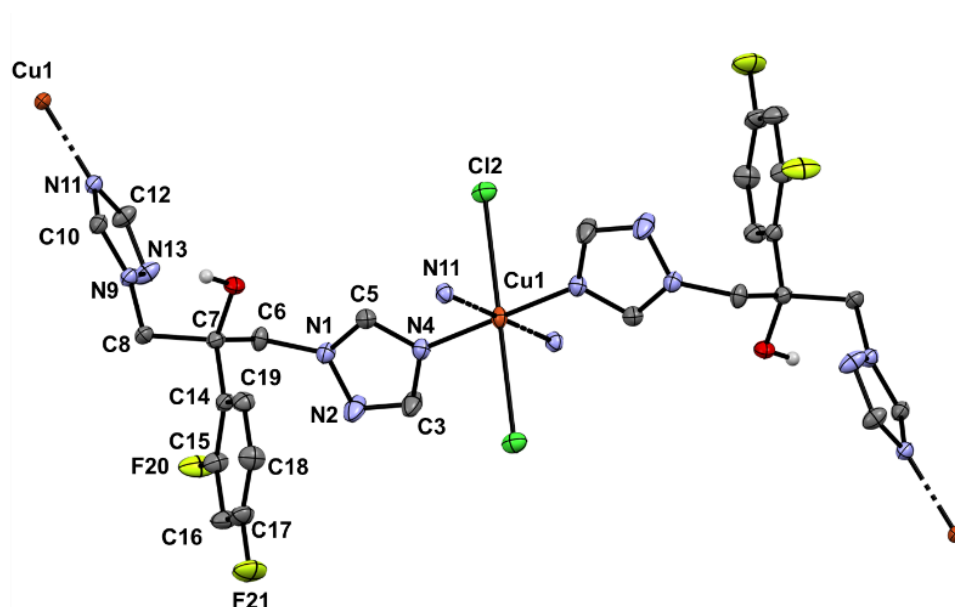
Слика 28. Шематски приказ реакције за синтезу **Cu1** комплекса

Комплекс **Cu1** је окарактерисан применом елементалне микроанализе, масене спектрометрије, IR спектроскопије, UV-Vis спектрофотометрије, мерењем моларне проводљивости, док је његова кристална структура одређена методом дифракције рендгенских зрака са монокристала.²¹⁴ Испитивана је антимикробна активност **Cu1** комплекса, која је поређена са његовом цитотоксичношћу на нормалној ћелијској линији фибробласта плућа (MRC-5). Поред тога, испитиван је утицај овог комплекса на формирање хифа и биофилма код *S. albicans*, и на биосинтезу ергостерола код овог соја. Како би се објаснио механизам антимикробног деловања **Cu1** комплекса испитиване су његове интеракције са протеином говеђег серума (BSA) и DNA изолованим из тимуса телета (st-DNA).²¹⁵

¹ Резултати овог истраживања су објављени у раду N. Lj. Stevanović et al., *Pharmaceuticals* **14** (2021) 24 (Реф. 214).

4.1.1. Опис кристалне структуре

Резултати рендгенске структурне анализе кристала **Cu1** комплекса су показали да у овом комплексу **fcz** има улогу мостног лиганда између два Cu(II) јона, координујући се преко атома азота триазолових прстенова.²¹⁴ Комплекс **Cu1** је полимеран, при чему су за Cu(II) јон координована два хлоридо и четири **fcz** лиганда. Овај комплекс има издужену октаедарску геометрију, што је последица Јан-Телеровог ефекта, при чему дужина $\text{Cu}-\text{Cl}$ везе износи 2,802 Å (Табела 5).

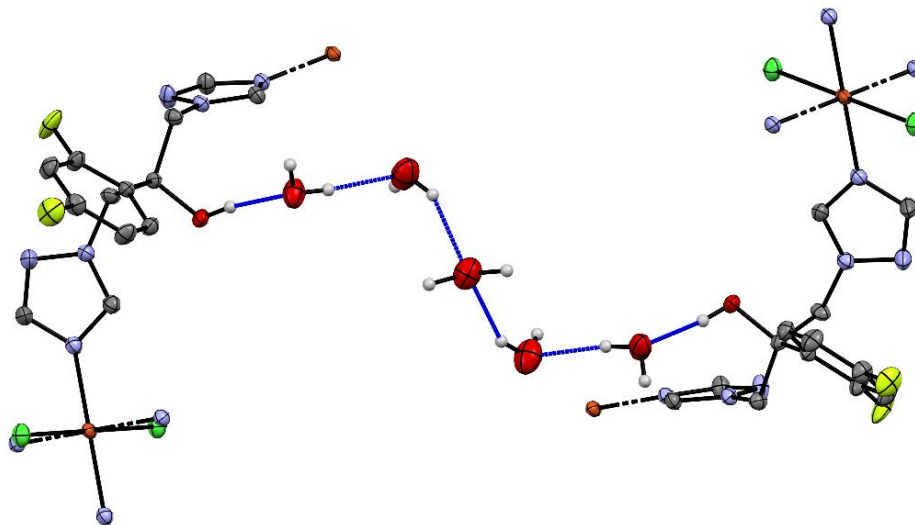


Слика 29. Кристална структура **Cu1** комплекса. Термички елипсоиди су приказани са 35% вероватноће. Молекули растварача су изостављени и приказани су само атоми водоника из $-\text{OH}$ група флуконазола²¹⁴

Табела 5. Одабране дужине веза (Å) и углови између веза ($^{\circ}$) у **Cu1** комплексу²¹⁴

Cu1	
$\text{Cu1}-\text{Cl2}$	2,802(2)
$\text{Cu1}-\text{N11}$	2,0367(14)
$\text{Cu1}-\text{N4}$	2,0061(14)
$\text{N11}-\text{Cu1}-\text{N11}$	180,00(5)
$\text{N4}-\text{Cu1}-\text{N11}$	89,30(6)
$\text{N4}-\text{Cu1}-\text{N11}$	90,70(6)
$\text{N4}-\text{Cu1}-\text{N4}$	180,0

У структури **Cu1** комплекса се налази шупљина у којој је налазе пет молекула воде који формирају мрежу водоничних веза, укључујући две хидроксилне групе два молекула **fcz**, као и слабе интеракције са координованим хлоридо лигандима (Слика 30).²¹⁴



Слика 30. Водоничне везе у структури **Cu1** комплекса (обележене плавом бојом)²¹⁴

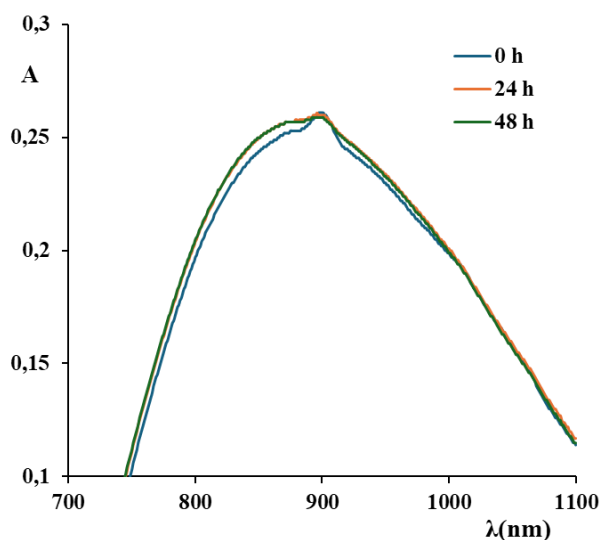
4.1.2. Спектроскопска карактеризација **Cu1** комплекса

Инфрацрвени спектар **Cu1** комплекса је снимљен у опсегу таласних бројева 4000 – 400 cm^{-1} и показује очекиване траке које се могу приписати координаном **fcz** лиганду²¹⁶ и кристалној води. Према томе, широка трака која се јавља у IR спектру на $\sim 3300 \text{ cm}^{-1}$ може се приписати вибрацијама O–H групе у молекулу **fcz** и у води која је присутна у кристалној решетки.²¹⁵ Поред тога, карактеристичне вибрације ароматичних прстенова, $\nu(\text{C}_{\text{ar}}=\text{C}_{\text{ar}})$ и $\nu(\text{C}_{\text{ar}}=\text{N})$, које се налазе у опсегу ($1620 - 1370 \text{ cm}^{-1}$), померене су у односу на одговарајуће траке у спектру некоординаног **fcz**, потврђујући на тај начин његову координацију за Cu(II) јон.²¹⁴

У масеном спектру **Cu1** комплекса може се уочити сигнал на $m/z = 675, 1372$ што је у складу са теоријском m/z вредношћу за $[\text{Cu}(\text{fcz})_2]^{2+}$ катјон.²¹⁴

Стабилност **Cu1** комплекса у **dms**o раствору испитивана је применом UV-Vis спектрофотометрије (Слика 31).²¹⁴ UV-Vis спектар је снимљен одмах након растварања, као и након 24 и 48 h на собној температури. Као што се може очекивати за комплексе бабра(II), у UV-Vis спектру **Cu1** комплекса јавља се широк апсорпциони максимум (λ_{max}) на 879 nm²¹⁷ који потиче од $d_z^2, d_{xy}, d_{xz}, d_{yz} \rightarrow d_{x^2-y^2}$ прелаза из $d_{x^2-y^2}$ основног стања.²¹⁸ Облик спектра, интензитет и положај апсорпционог максимума остаје непромењен током времена, што указује на чињеницу да лиганд остаје координан за Cu(II) јон у раствору у испитиваном периоду (Слика 31).

Стабилност **Cu1** комплекса у раствору је праћена и мерењем моларне проводљивости током 48 h.²¹⁴ Вредност моларне проводљивости (Λ_{M}) за **Cu1** комплекс дата је у Експерименталном делу и у складу је са чињеницом да се овај комплекс понаша као неелектролит, с обзиром на чињеницу да неелектролити имају вредности моларне проводљивости мање од $50 \Omega^{-1}\text{cm}^2\text{mol}^{-1}$ у **dms**o.^{219,220} Поред тога, вредност моларне проводљивости непосредно након растварања комплекса није се значајно променила током 48 h што указује на његову стабилност.



Слика 31. Стабилност **Cu1** комплекса праћена UV-Vis спектрофотометријом у dmsо током времена ($c = 4,0 \times 10^{-3} \text{ M}$)²¹⁴

4.1.3. Биолошка активност **Cu1** комплекса

Антимикробна активност

Као што је већ поменуто, **fcz** се користи као ефикасан антифунгални агенс у лечењу кандидијазе од осамдесетих година прошлог века.^{91–95} Међутим, све је већи број сојева микроорганизама који су развили резистентност на овај антимикотик. Према томе, неопходно је модификовати његову структуру увођењем јона метала у циљу добијања комплексног једињења које би потенцијално било ефикасно у лечењу фунгалних инфекција изазваних родом *Candida*. Као што је раније показано, комплекси различитих јона метала имају значајну активност према микороорганизмима.^{21,36} У складу са тим, испитивана је антифунгална активност **Cu1** комплекса према гљивицама (*C. albicans* ATCC 10231, *C. parapsilosis* ATCC 22019 и *C. krusei* ATCC 6258), као и према четири клиничка изолата из ветеринарских и хуманих узорак *C. albicans* (*C. albicans* 1c, *C. albicans* 1f, *C. albicans* 11 и *C. albicans* 13).²¹⁴ Испитивана је и антибактеријска активност **Cu1** комплекса према Грам-позитивним бактеријама (*S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* NCTC 6571 и *S. aureus* ATCC 43300) и према Грам-негативним бактеријама (*P. aeruginosa* ATCC 10332, *P. aeruginosa* PA14, *P. aeruginosa* BK25H, *P. aeruginosa* S20 и *E. coli* NCTC 9001).²¹⁴

МИС вредности добијене за **Cu1** комплекс и **fcz** су поређене са њиховом антипролиферативном активношћу на здравим ћелијским линијама фибробласта плућа MRC-5 (IC₅₀) (Табела 6).

Табела 6. Антифунгална активност **Cu1** комплекса и **fcz** лиганда (MIC, $\mu\text{g/mL}$ и μM) у поређењу са њиховим антипролиферативним ефектом на здравој MRC-5 ћелијској линији фибробласта плућа (IC_{50} , $\mu\text{g/mL}$ и μM)²¹⁴

	Cu1		fcz	
	$\mu\text{g/mL}$	μM	$\mu\text{g/mL}$	μM
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	50	59,8	0,88	2,87
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	1,75	2,09	1,75	5,71
<i>C. krusei</i> ATCC 6258	50	59,8	12,50	40,81
<i>C. albicans</i> 1c	2	2,39	2	6,53
<i>C. albicans</i> 1f	2	2,39	2	6,53
<i>C. albicans</i> 11	2	2,39	2	6,53
<i>C. albicans</i> 13	2	2,39	2	6,53
MRC-5	72 $\pm$ 2	86 $\pm$ 2	300 $\pm$ 8	980 $\pm$ 26

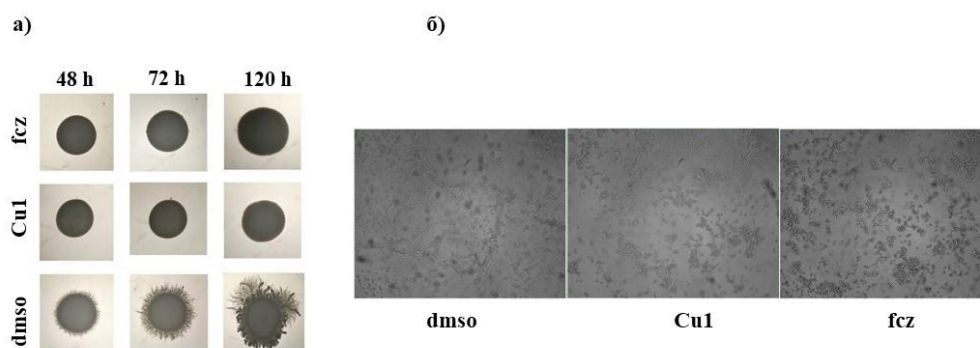
На основу резултата приказаних у табели 6. може се закључити да **Cu1** комплекс показује бољу активност према клиничким изолатима *C. albicans* од **fcz** (2,7 пута; μM концентрације).²¹⁴ С друге стране, овај комплекс показује мању активност у односу на **fcz** према *C. albicans* ATCC 10231 и *C. krusei* ATCC 6258. Поред тога, **Cu1** комплекс је токсичнији према ћелијама фибробласта плућа (MRC-5) у односу на **fcz**. Међутим, индекс селективности (SI) комплекса **Cu1** према клиничким изолатима *C. albicans* износи 41.

Познато је да комплекси бакра(II) са ароматичним хетероцикличним лигандима који садрже азот у прстену показују значајну антибактеријску активност.^{221,222} Према томе, испитивана је антибактеријска активност **Cu1** комплекса. Међутим, овај комплекс није показао антибактеријску активност према испитиваним врстама бактерија (*S. aureus* и *E. coli*), при чему су MIC вредности биле веће од 200 $\mu\text{g/mL}$ ($> 239 \mu\text{M}$).²¹⁴

4.1.3.2. Инхибиција филаментног раста и формирања биофилма *C. albicans*

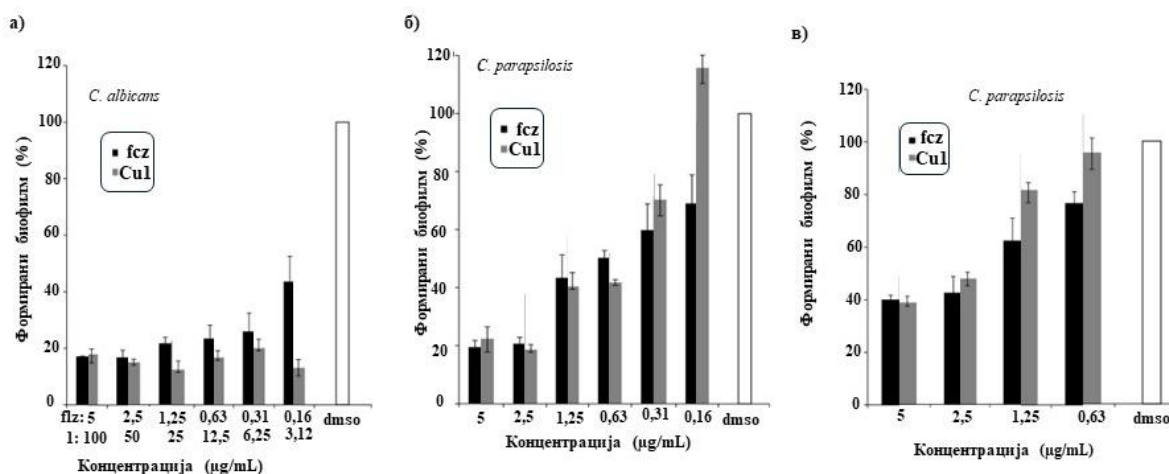
Познато је да је један од главних патогених својстава *Candida* рода морфолошка трансформација из облика квасца у облик хифе. Услед ове трансформације долази и до формирања биофилма и развоја гљивичне инфекције. Претходна испитивања су показала да присуство јона метала, као што су Ag(I), Ni(II), Mn(II) и Cd(II), инхибира ћелијску диференцијацију *Candida* сојева.^{223,224} У складу са тим, ћелије *C. albicans* ATCC 10231 су третиране флуконазолом и **Cu1** комплексом у концентрацији 0,5 $\times$ MIC (субинхибиторна концентрација; Слика 32).²¹⁴

Комплекс **Cu1** и **fcz** инхибирају филаментацију *C. albicans* соја у поређењу са dmso, који је коришћен као контрола. Иако **Cu1** комплекс није показао значајну антифунгалну активност према овом соју, у потпуности је спречио формирање хифа на чврстој Spider подлози, као и у течной RPMI подлози (Слика 32). Ови резултати су у складу са претходним испитивањем које је показало да комплекси метала са пиразолима значајно инхибирају трансформацију квасца у хифе код *C. albicans* врста (инхибиција је у опсегу од 30 до 54%).²²⁵



Слика 32. Раст *C. albicans* ATCC 10231 соја на *Spider* (а) и *RPMI* (б) подлози у присуству субинхибиторних концентрација ($0,5 \times \text{MIC}$) **Cu1** комплекса и **fcz**²¹⁴

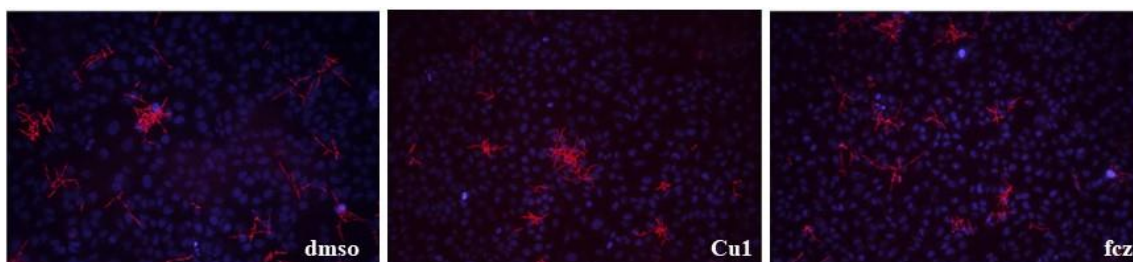
Као што је напоменуто, трансформација из квасца у хифе представља рани корак у стварању биофилма, доводећи до развоја гљивичне инфекције.²¹⁴ У складу са тим, једињења која инхибирају овај процес представљају потенцијалне антифунгалне агенсе.²²⁶ Према томе, испитиван је утицај **Cu1** комплекса и флуконазола на формирање и разарање претходно формираног биофилма (Слика 33). Као што се са слике може видети, **Cu1** комплекс показује умерен, а у неким случајевима и значајан, ефекат на формирање биофилма код сојева *C. albicans* ATCC 10231 и *C. parapsilosis* ATCC 22019. При концентрацији 25 $\mu\text{g/mL}$, **Cu1** инхибира формирање биофилма *C. albicans* за 87,6%. Поред тога, овај комплекс инхибира стварање биофилма *C. parapsilosis* врста, при концентрацијама 5 – 0,63 $\mu\text{g/mL}$ (Слика 33б). Важно је поменути да комплекс **Cu1** разара претходно формиран биофилм *C. parapsilosis* врста при концентрацијама 5 и 2,5 $\mu\text{g/mL}$ (Слика 33в), при чему показује активност сличну флуконазолу. Раније је утврђено да флуконазол инхибира стварање биофилма *C. glabrata*, *C. parapsilosis* и *C. rugosa* врста, узрокујући значајно оштећење виталности и интегритета *Candida* ћелија.²²⁷ Поред тога, нађено је да комплекс бакра(II) са 2-тиоурацилом инхибира формирање биофилма *C. glabrata* и *C. krusei* врста за 9,9%.²²⁸



Слика 33. Ефекат **Cu1** комплекса и флуконазола на формирање биофилма *C. albicans* (а) и *C. parapsilosis* (б) и на разарање претходно формираног биофилма *C. parapsilosis* (в)²¹⁴

4.1.3.3. Адхезиони тест

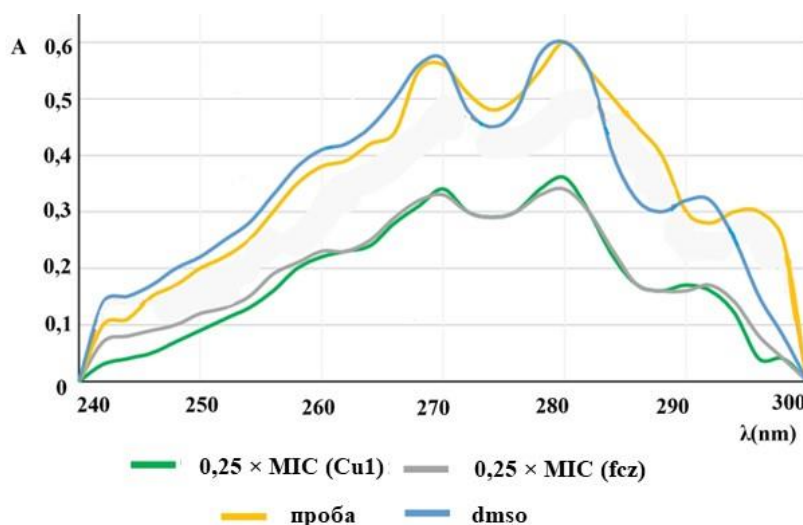
Како би се детаљније испитала антифунгална активност **Cu1** комплекса на патогенезу изазвану *Candida* гљивицама, испитиван је ефекат овог комплекса на адхезију *C. albicans* на A549 ћелије карцинома плућа.²¹⁴ Праћен је ефекат флуоресцентних ћелија *C. albicans* врсте које експримирају црвени (*C. albicans* SC5314-RFP) и зелени (*C. albicans* SC5314-GFP) протеин у присуству MIC вредности комплекса **Cu1**. Као што се са слике 34 може видети, испитивани **Cu1** комплекс и **fcz** не утичу значајно на сузбијање адхезије *C. albicans* у поређењу са dmsO који је коришћен као контрола.



Слика 34. Адхезија *C. albicans* SC5314-RFP на A549 ћелије карцинома плућа у присуству **Cu1** комплекса и **fcz** (увећање 20 ×). DAPI (2-(4-амидинофенил)-6-индолкарбамидин дихидрохлорид) ћелије су обојене плавом бојом, док су црвеном бојом означене *C. albicans* ћелије²¹⁴

Биосинтеза ергостерола код *C. albicans* соја

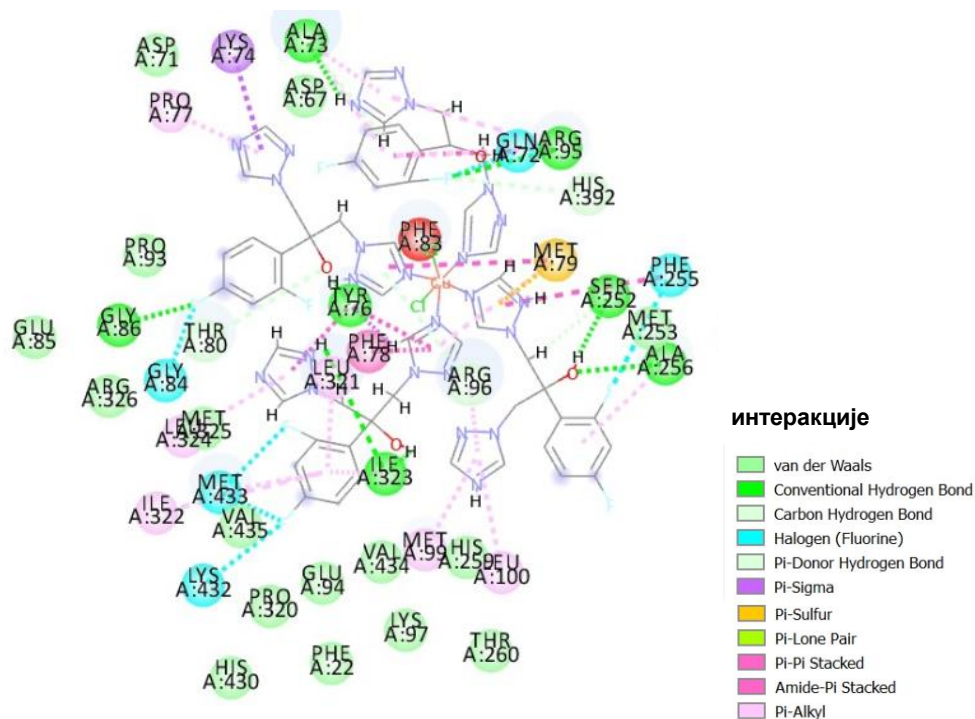
Као што је напоменуто у Општем делу ове докторске дисертације, ергостерол представља стерол који се налази у ћелијској мембрани гљивица и регулише пермеабилност и флуидност ћелијске мембране. Механизам деловања азола, укључујући флуконазол, заснива се на немогућности конверзије ланостерола у ергостерол приликом везивања за цитохром P450.²³⁰ У складу са тим, одређена је укупна количина ергостерола код *C. albicans* врсте у присуству субинхибиторних концентрација **Cu1** комплекса и флуконазола ($0,25 \times \text{MIC}$; Слика 35).²¹⁴ Комплекс **Cu1** значајно утиче на смањење количине ергостерола, због чега се може претпоставити да има исти механизам деловања као и флуконазол. Поред тога, претпоставка је да **Cu1** комплекс додатно интерагује са неким биомолекулом, што утиче на смањење укупне количине ергостерола.¹⁵¹



Слика 35. Одређивање количине ергостерола код *C. albicans* у присуству **Cu1** комплекса и **fcz** ($0,25 \times \text{MIC}$) применом UV спектрофотометрије²¹⁴

4.1.4. Молекулски докинг

Интеракција антифунгалних азола са CYP51 је детаљно проучавана и претпоставља се да триазоли формирају ван дер Валсове (J. D. van der Waals) интеракције унутар хидрофобног цепа активног места.²³¹ Међутим, азоли су координовани за јон метала преко атома азота, услед чега долази до спречавања његовог везивања за гвожђе из хема CYP51 ензима.



Слика 36. Дводимензионални приказ израчунатих интеракција између **Cu1** комплекса и аминокиселина унутар активног места CYP51 ензима²¹⁴

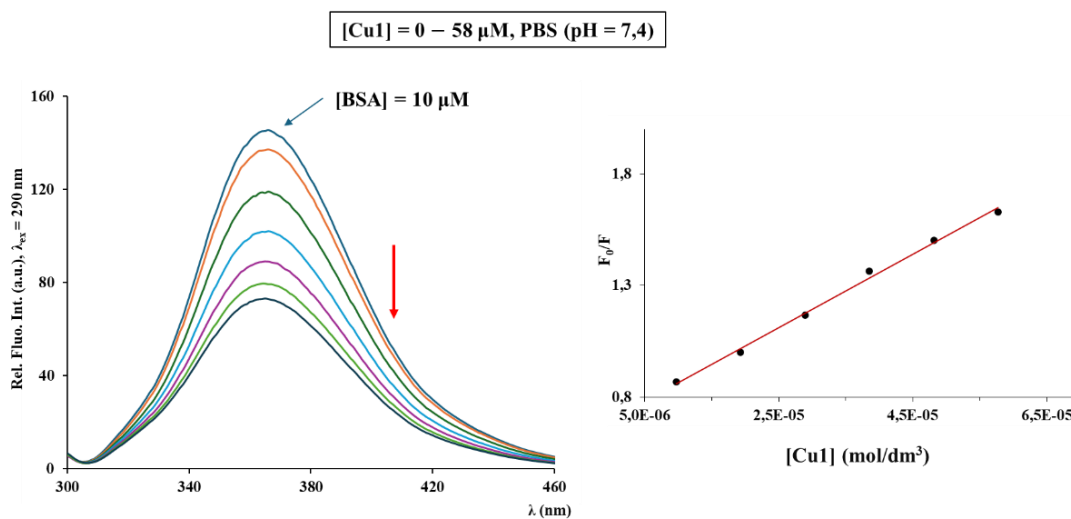
Комплекс **Cu1** показује стерне, хидрофобне и непланарне интеракције, као и водоничне везе са аминокиселинама у активном центру ензима, док, није утврђено директно везивање између јона метала и ензима. Између комплекса и протеина се успостављају електростатичке и ван дер Валсове интеракције, при чему се планарни ароматични систем комплекса интеркалативно везује (Слика 36).²¹⁴

4.1.5. Интеракције Cu1 комплекса са биомолекулима

Интеракција са BSA

Албумин хуманог серума (*Human serum albumin*, HSA) представља најзаступљенији протеин у крвној плазми за који се агенси најчешће везују. Због структуре која је слична структури HSA протеина, чешће се за испитивање интеракција као модел протеина користи говеђи серум албумин (*Bovine serum albumin*, BSA).²³² Флуоресцентна емисиона спектроскопија је веома корисна метода која може дати информације о везивању различитих једињења за овај протеин.²³³ Флуоресценција BSA протеина потиче од триптофана (Trp), тирозина (Tyr) и фенилаланина (Phe), при чему триптофан (Trp-134 и Trp-212) у највећој мери доприноси интензивној флуоресценцији биомолекула. Промене у флуоресцентном спектру BSA након додавања комплекса могу настати услед промене у конформацији протеина, повезивања субјединица, везивања комплекса за протеин или његове денатурације.²³³

Подаци добијени коришћењем једначина приказаних у Експерименталном делу дисертације (вредности Стерн-Волмерове константе (K_{SV}), константе гашења емисије (K_q), константе везивања (K_A) и броја везујућих места (n), приказани су у табели 7, док су емисиони спектри флуоресценције BSA у присуству растуће концентрације **Cu1** комплекса приказани на слици 37.²¹⁵



Слика 37. Флуоресцентни емисиони спектар BSA у присуству растуће концентрације **Cu1** комплекса. Инсертован је Стерн-Волмеров дијаграм²¹⁵

Додавањем растуће концентрације **Cu1** комплекса у раствор BSA константне концентрације (10 μM), долази до смањења интензитета флуоресценције на 365 nm, као

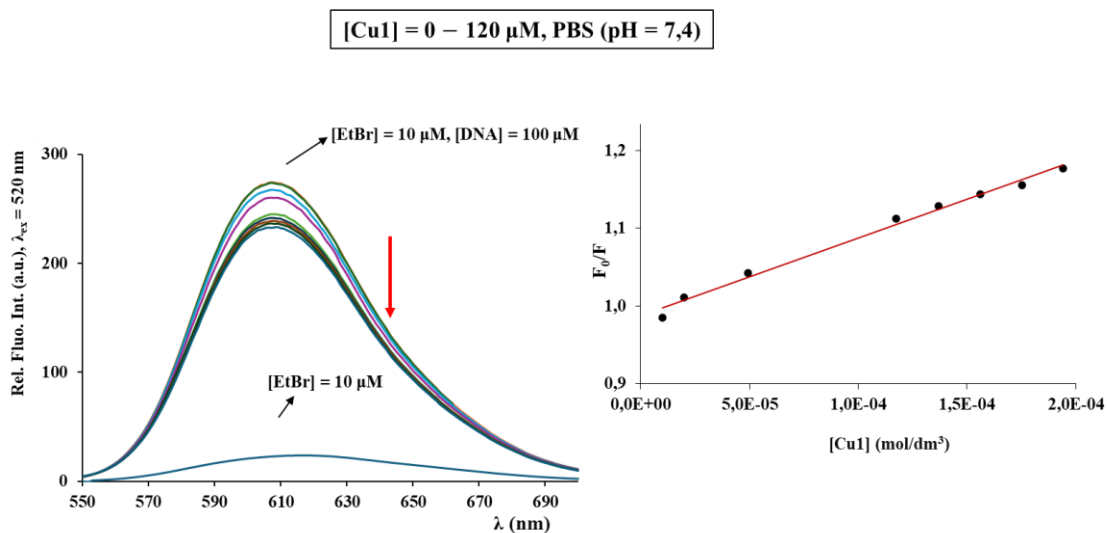
последица везивања комплекса за овај биомолекул, што потврђују и израчунате вредности K_A константе (Табела 7). С друге стране, K_A за **Cu1** комплекс је много мања од 10^{15} M^{-1} ,²³⁴ што указује да након транспорта овог комплекса до циљане ћелије долази до раскидања његове везе са транспортним протеином. Везивање комплекса **Cu1** за једно место у испитиваном протеину потврђује и n вредност. Проценат хипохромизма за **Cu1** комплекс је 49,8, док је вредност K_q у складу са статичким механизмом гашења емисије **Trp** у BSA.²³⁵

Табела 7. Вредности везујућих константи **Cu1** комплекса и **fcz** за BSA²¹⁵

	$K_{sv} (\text{M}^{-1})$	Хипохромизам (%)	$K_q (\text{M}^{-1}\text{s}^{-1})$	$K_A (\text{M}^{-1})$	n
fcz	$(2,02 \pm 0,02) \times 10^3$	14,6	$2,02 \times 10^{11}$	$1,57 \times 10^3$	0,98
Cu1	$(2,34 \pm 0,02) \times 10^4$	49,8	$2,34 \times 10^{12}$	$6,19 \times 10^6$	1,59

Интеракција са ct-DNA

Флуоресцентна спектроскопија је коришћена за испитивање интеракција **Cu1** комплекса са EthBr-ct-DNA системом ($[\text{ct-DNA}]/[\text{EthBr}] = 10$).²¹⁵ Етидијум бромид (EthBr) се интеркалативно везује између суседних парова база у двострукој спирали DNA, што доводи до повећања флуоресценције овог биомолекула.²³⁶ Након додавања **Cu1** комплекса у EthBr-ct-DNA систем, долази до смањења интензитета флуоресценције, што указује на њихову интеракцију (Слика 34).²³⁷ Вредност K_A константе (Табела 8) за **Cu1** комплекс је много мања у односу на одговарајућу вредност за EthBr ($K_A = 2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$), што указује да овај комплекс није интеркалирајући агенс. У складу са овом чињеницом је и проценат хипохромизма, који је мањи од 30%. На основу вредности константи гашења (K_q) за **Cu1** комплекс може се закључити интеракција овог комплекса са EthBr-ct-DNA системом доводи до статичког механизма гашења емисије.²³⁵



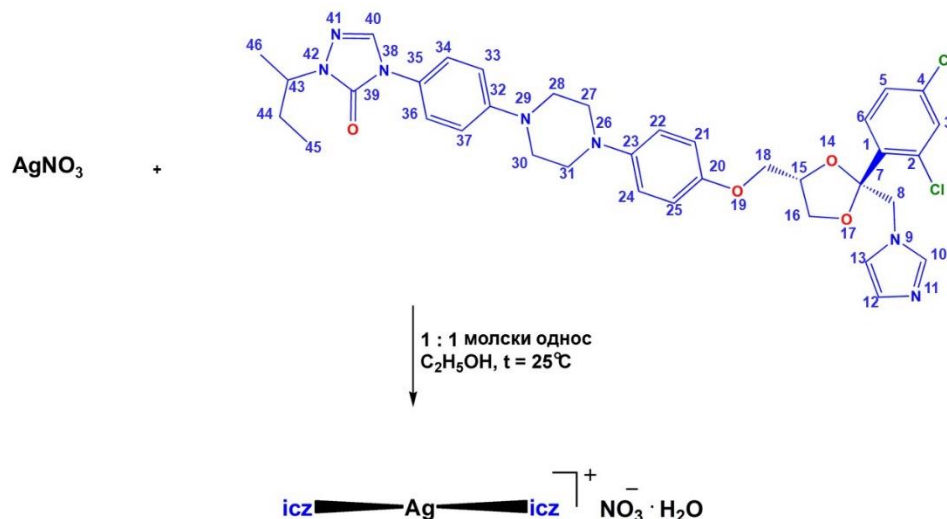
Слика 38. Флуоресцентни емисиони спектар EthBr-ct-DNA система у присуству растуће концентрације **Cu1** комплекса. Инсертован је Стерн-Волмеров дијаграм²¹⁵

Табела 8. Вредности везујућих константи **Cu1** комплекса и **fcz** за EthBr-ct-DNA систем²¹⁵

	$K_{sv} (M^{-1})$	Хипохромизам (%)	$K_q (M^{-1}s^{-1})$	$K_A (M^{-1})$	n
fcz	$(3,55 \pm 0,01) \times 10^2$	9,0	$3,55 \times 10^{10}$	$1,91 \times 10^4$	1,48
Cu1	$(9,29 \pm 0,01) \times 10^2$	15,2	$9,29 \times 10^{10}$	$2,26 \times 10^4$	1,35

4.2. Синтеза, карактеризација и антимикробна активност комплекса сребра(I) са итраконазолом²

У реакцији сребро(I)-нитрата са еквимоларном количином итраконазола (**icz**) у етанолу на собној температури, добијен је мононуклеарни $[Ag(icz)_2]NO_3 \cdot H_2O$ комплекс (**Ag1**; Слика 39).²³⁸ Кристали **Ag1** комплекса погодни за рендгенску структурну анализу су добијени прекристалисавањем талоба добијеног у реакцији у ацетонитрилу. Стехиометрија **Ag1** комплекса је потврђена применом елементалне микроанализе, док је комплекс окарактерисан применом 1H NMR, UV-Vis и IR спектроскопије, мерењем моларне проводљивости и рендгенске структурне анализе.²³⁸



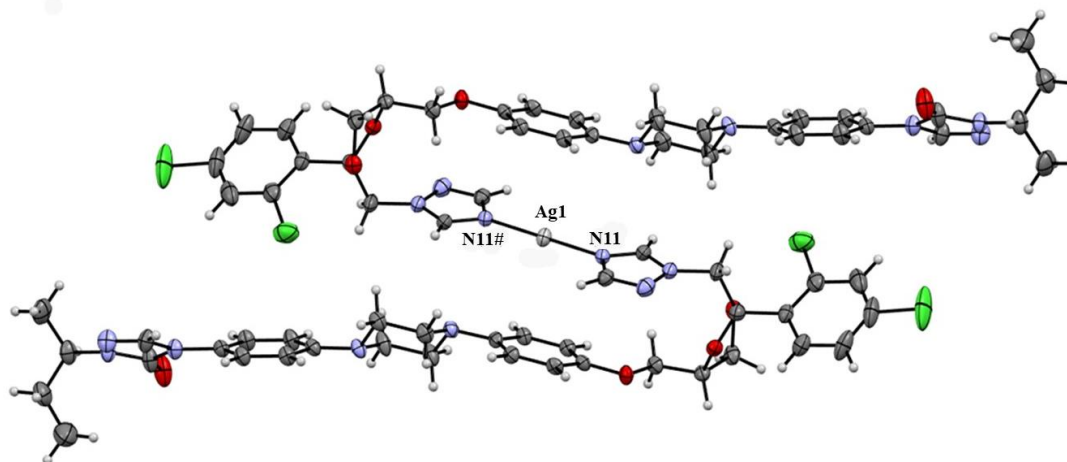
Слика 39. Шематски приказ реакције за синтезу **Ag1** комплекса. Нумерација атома у **icz** је коришћена за анализу 1H NMR спектра²³⁸

4.2.1. Опис кристалне структуре комплекса **Ag1**

Молекулска структура **Ag1** комплекса је приказана на слици 40. Два молекула **icz** су монодентатно координована за $Ag(I)$ јон преко атома азота из триазоловог прстена формирајући $[Ag(icz)_2]^+$ комплексни катјон, док се у спољашњој координационој сфери налази NO_3^- анјон и молекул воде.²³⁸ Два атома азота из два молекула итраконазола се налазе на подједнако удаљеном растојању од $Ag(I)$ јона, при чему **Ag1** комплекс има идеалну линеарну геометрију ($N11-Ag1-N11\#1 = 180^\circ$; $\#1 -x + 1, -y + 1, -z + 1$). Дужине веза између $Ag(I)$ јона и атома азота координованог итраконазола у **Ag1** комплексу приближно су

² Резултати овог истраживања су објављени у раду N. Lj. Stevanović et al., *J. Mol. Struct.* **1232** (2021) 130006 (Реф. 238).

једнаке одговарајућим дужинама веза у комплексу сребра(I) са антибиотиком ципрофлоксацином (ciph), $[\text{Ag}(\text{ciph})_2]\text{NO}_3 \cdot 0,75\text{MeOH} \cdot 1,2\text{H}_2\text{O}$.²³⁹ Геометрија овог комплекса је дисторговано линеарна ($\text{N1}-\text{Ag1}-\text{N2} = 169,47^\circ$).²³⁹ Комплекс **Ag1** кристалише са једним молекулом воде, који поред NO_3^- анјона, учествује у водоничним везама. Важно је напоменути да у **Ag1** комплексу долази до $\text{Ag} \cdots \text{O}$ интеракција (дужине $\text{Ag}-\text{O}$ веза износе 2,776(2) и 2,810(2) Å), које су краће од одговарајућих интеракција у комплексу сребра(I) са ципрофлоксацином (3.041 Å).²³⁹



Слика 40. Кристална структура **Ag1** комплекса. Термички елипсоиди су приказани са 50% вероватноће. Симетријска трансформација #1 $-x + 1, -y + 1, -z + 1$ ²³⁸

4.2.2. Спектроскопска карактеризација

IR спектар **Ag1** комплекса је у складу са структуром утврђеном применом рендгенске структурне анализе.²³⁸ Присутна је интензивна трака која потиче од валенционих асиметричних вибрација нитратног анјона на 1334 cm^{-1} . Осим тога, није примећено цепање траке која одговара деформационој вибрацији нитратног анјона у равни на 739 cm^{-1} , што указује на присуство нитратног анјона у спољашњој координационој сфери комплекса.²⁴⁰ Поред тога, широка трака на 3395 cm^{-1} потиче од вибрација $\text{O}-\text{H}$ везе, што је у складу са присуством молекула воде у кристалној решетки **Ag1** комплекса.²³⁸

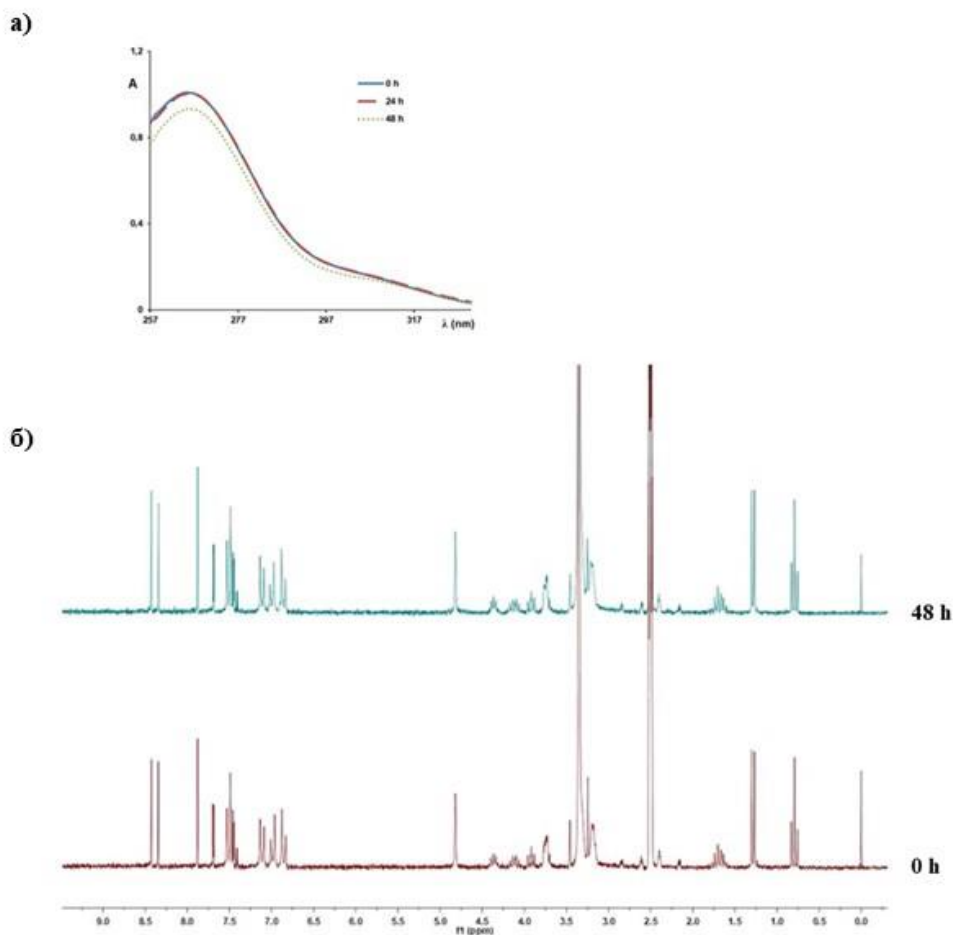
UV-Vis и ^1H NMR спектри **Ag1** комплекса су снимљени у dmsO и веома су слични одговарајућим спектрима некоординованог итраконазола, што се може очекивати за комплексе сребра(I) са ароматичним хетероцикличним једињењима која садрже азот у прстену.²⁴¹ Апсорпциони максимум за **Ag1** комплекс је на 266 nm и потиче од електронских прелаза у лиганду.²⁴² Сигнали у ^1H NMR спектру **Ag1** комплекса су дефинисани на основу одговарајућих сигнала ^1H NMR спектра итраконазола снимљеног у смеши $\text{CDCl}_3 : \text{CD}_3\text{OD} : \text{D}_2\text{O}$ (16 : 8 : 1, v/v/v).²⁴³ Сигнали који се јављају у алифатичној области од 0,7 до 1,7 ppm се могу приписати изобутил групи која је везана за триазолов прстен, уз изузетак метинског протона. Сигнали који се јављају у алифатичном делу спектра у области од 3,2 до 4,8 ppm се могу приписати протонима пиперазина и диоксолана, док сигнали који се јављају у области од 6,8 до 8,5 ppm припадају ароматичним протонима (Прилог, слика 73).

Претходно ^1H NMR испитивање итраконазола је показало да N26 атом азота пиперазиновог прстена има највећи афинитет за протоновање, док се на другом месту налази N11 атом азота триазоловог прстена.²⁴³ Резултати добијени у оквиру ове дисертације су показали да N11 атом азота триазоловог прстена представља најповољније место за

координацију Ag(I) јона.²³⁸ Исти начин координације *icz* лиганда је уочен и код два комплекса цинка(II), $[\text{ZnCl}_2(\text{icz})_2] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ и $[\text{Zn}(\text{OH})_2(\text{icz})_2] \cdot \text{H}_2\text{O}$, који су окарактерисани елементалном анализом, моларном проводљивошћу, као и NMR (^1H и ^{13}C), UV-Vis и IR спектроскопијом.¹⁴⁹

У циљу испитивања стабилности **Ag1** комплекса снимљени су UV-Vis и ^1H NMR спектри у *dmsO* одмах након растварања комплекса, као и након 24 и 48 h на собној температури.²³⁸ Примећена је незнатна промена у интензитету апсорпционог максимума док је облик UV-Vis спектра остао непромењен (Слика 41a). Поред тога, у ^1H NMR спектру снимљеном након 48 h нису се појавили сигнали који потичу од некоординованог *icz*, што указује на чињеницу да не долази до супституције овог лиганда молекулом растварача. Иако је **Ag1** комплекс веома стабилан у раствору, може се претпоставити да долази до ослобађања Ag(I) јона из $[\text{Ag}(\text{icz})_2]^+$ комплексне јединице при физиолошким условима у присуству ћелијских компоненти, као што су протеини и други биомолекули.²⁴⁴ Сматра се да су управо интеракције Ag(I) јона са биомолекулима одговорне за његово антимикуробно деловање.²⁴⁴

На основу вредности моларне проводљивости може се закључити да се испитивани комплекс понаша као 1 : 1 тип електролита у *dmsO*.²²⁰ Вредност моларне проводљивости, која је измерена непосредно након растварања, није се значајно променила током 48 h.



Слика 41. Стабилност **Ag1** комплекса током времена праћена UV-Vis (a) и ^1H NMR (б) спектроскопијом на 25 °C у *dmsO* ($c = 1,6 \times 10^{-5} \text{ M}$)²³⁸

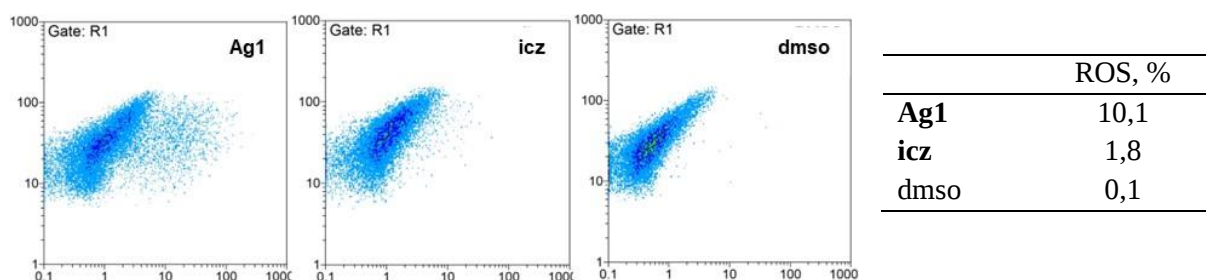
4.2.3. *In vitro* испитивање антифунгалне активности **Ag1** комплекса

Активност **Ag1** комплекса и итраконазола је испитивана према четири *Candida* врсте (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei* и *C. parapsilosis*).²³⁸ Како би се одредио терапеутски потенцијал **Ag1** комплекса, одређена је *in vitro* токсичност на ћелијској линији фибробласта плућа (MRC-5) и *in vivo* токсичност према ембриону зебра рибица.²³⁸ Комплекс **Ag1** је показао од 2,3 до 4,5 пута већу антифунгалну активност према *Candida* врстама у односу на итраконазол (Табела 9). Сличну активност су показали и комплекси сребра(I) са вориконазолом (**vcz**), $[\text{Ag}(\text{vcz})_2]_n(\text{ClO}_4)_n$ и $[\text{Ag}_2(\text{vcz})_4]_n(\text{NO}_3)_{2n}$, према различитим *Candida* сојевима, укључујући и оне који су резистентни на вориконазол.²⁴⁵ Поред тога, комплекси цинка(II) са итраконазолом, $[\text{ZnCl}_2(\text{icz})_2] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ и $[\text{Zn}(\text{OH})_2(\text{icz})_2] \cdot \text{H}_2\text{O}$, показали су бољу активност у односу на итраконазол према *S. brasiliensis* и *S. schenckii* врстама, као и према медицински важним протозоима, *L. amazonensis*, *T. cruzi* и *T. gondii*.¹⁴⁹

Табела 9. Резултати *in vitro* испитивања антифунгалне активности **Ag1** комплекса и итраконазола према *Candida* врстама (MIC) и токсичности ових једињења према MRC-5 ћелијској линији (IC₅₀), као и *in vivo* испитивања њихове токсичности према ембриону зебра рибице (LC₅₀)²³⁸

	Ag1		icz	
	µg/mL	µM	µg/mL	µM
<i>C. albicans</i>	0,31	0,19	0,31	0,44
<i>C. glabrata</i>	0,62	0,39	1,25	1,77
<i>C. krusei</i>	0,62	0,39	0,31	0,44
<i>C. parapsilosis</i>	0,31	0,19	0,31	0,44
MRC-5	0,96	0,60	0,56	0,79
Ембрион зебра рибице	0,69	0,43	0,50	0,71

Формирање реактивних кисеоничних врста (ROS) повезана је са антимикуробним деловањем комплекса сребра(I).²⁴⁷ Наиме, услед интеракција Ag(I) јона са ензимима у респираторном ланцу долази до формирања ROS.²⁴⁶ У складу са тим, испитиван је утицај **Ag1** комплекса и итраконазола на формирање ROS у ћелијама *C. albicans* методом проточне цитометрије, у односу на dmsо који је коришћен као контрола. На слици 42 приказани су резултати испитивања након 2 h инкубације ћелија *C. albicans* у присуству MIC вредности **Ag1** комплекса и итраконазола. Проценат формираних ROS у присуству **Ag1** комплекса у ћелији гљивице је 5,6 пута већи у односу на проценат ROS у присуству итраконазола при истој концентрацији. Већи проценат ROS у случају комплекса сребра(I) је последица присуства слободних Ag(I) јона који потичу из **Ag1** комплекса након његове интеракције са ћелијским компонентама *C. albicans*.²⁴⁷ Међутим, испитивани комплекс у мањој мери доводи до формирања ROS од клинички коришћеног амфотерицина Б који има способност да индукује производњу ROS код *C. albicans*. На основу добијених резултата може се закључити да се побољшана активност **Ag1** комплекса у односу на **itz** може приписати производњи ROS врста.²⁴⁷



Слика 42. Формирање ROS врста (%) у *C. albicans* ћелијама у присуству MIC концентрација **Ag1** комплекса и **icz** након 2 h²³⁸

С обзиром на чињеницу да филаментација представља главни фактор вируленце код *C. albicans* и има улогу приликом стварања биофилма,²⁴⁸ испитиван је утицај **Ag1** комплекса и итраконазола на формирање хифа. На слици 43. приказана је филаментација *C. albicans* соја у присуству субинхибиторних концентрација ($0,5 \times \text{MIC}$) испитиваних једињења.²³⁸ На основу добијених резултата, утврђено је да **Ag1** комплекс инхибира филаментацију код више од 90% ћелија, при чему скоро потпуно спречава формирање хифа у гљивици. Супротно томе, утицај некоординованог **icz** лиганда на формирање хифа је значајно мањи.



Слика 43. Утицај **Ag1** комплекса и **icz** на формирање хифа *C. albicans* при $0,5 \times \text{MIC}$ концентрацијама²³⁸

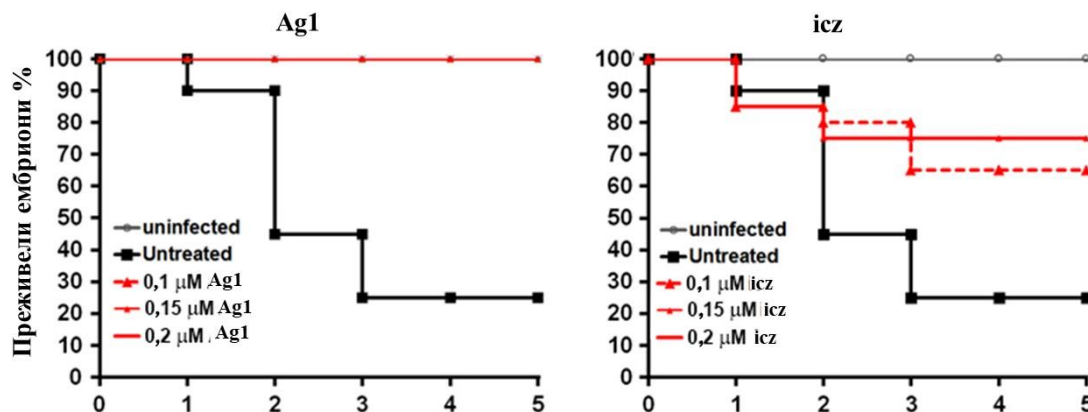
4.2.4. *In vivo* испитивање антифунгалне активности **Ag1** комплекса

Модел ембриона зебра рибица (*Danio rerio*) коришћен је у циљу испитивања *in vivo* ембриотоксичности и терапеутског потенцијала **Ag1** комплекса.²³⁸ С обзиром на генетску сличност са људима, ембриони зебра рибица се користе као *in vivo* модел кичмењака за испитивање антимикуробне ефикасности фармаколошки активних једињења, као и за проучавање њиховог механизма деловања.²⁴⁹ У складу са тим, праћено је развијање ембриона током времена након њиховог третирања са различитим концентрацијама **Ag1** комплекса и итраконазола.²³⁸ На основу LC_{50} вредности које су добијене након пет дана излагања ембриона деловању **Ag1** комплекса и итраконазола, може се закључити да је **Ag1** комплекс показао од 1,4 до 1,6 пута већу токсичност у односу на итраконазол (Табела 9). Међутим, поређењем вредности терапеутског индекса за антифунгалну активност **Ag1** комплекса и итраконазола према испитиваним *Candida* врстама, може се закључити да **Ag1** има 1,7 (*C. albicans* и *C. parapsilosis*) и 3,4 пута (*C. glabrata*) веће вредности терапеутског индекса у односу на итраконазол (Табела 10).

Табела 10. Вредности терапеутског индекса (Ti) и индекса селективности (Si) за **Ag1** комплекс и итраконазол према различитим *Candida* врстама (Ti = LC₅₀/MIC; Si = IC₅₀/MIC)²³⁸

	Ag1		icz	
	Ti	Si	Ti	Si
<i>C. albicans</i>	2,2	3,1	1,6	1,8
<i>C. glabrata</i>	1,1	1,5	0,4	0,5
<i>C. krusei</i>	1,1	1,5	1,6	1,8
<i>C. parapsilosis</i>	2,2	3,1	1,6	1,8

Како би се испитала ефикасност **Ag1** комплекса и итраконазола у сузбијању фунгалне инфекције, ембриони зебра рибица су инфицирани *C. albicans* врстом.²³⁸ Преживљавање ембриона је праћено у току пет дана након инфекције, без присуства **Ag1** комплекса и итраконазола и при њиховим различитим концентрацијама (0,10, 0,15 и 0,20 μM). У случају када инфицирани ембриони зебрице нису били третирани **Ag1** комплексом или итраконазолом, смртност ембриона је била преко 70% након три дана, док је око 55% ембриона угинуло прва два дана након инфекције (Слика 44). У случају када су инфицирани ембриони третирани **Ag1** комплексом, при испитиваним концентрацијама, сви ембриони су преживели инфекцију за време од пет дана. Супротно томе, када су инфицирани ембриони третирани итраконазолом проценат њиховог преживљавања при концентрацији од 0,15 и 0,20 μM је био око 70%, док је при концентрацији од 0,1 μM проценат преживљавања био око 60% (Слика 44).²³⁸

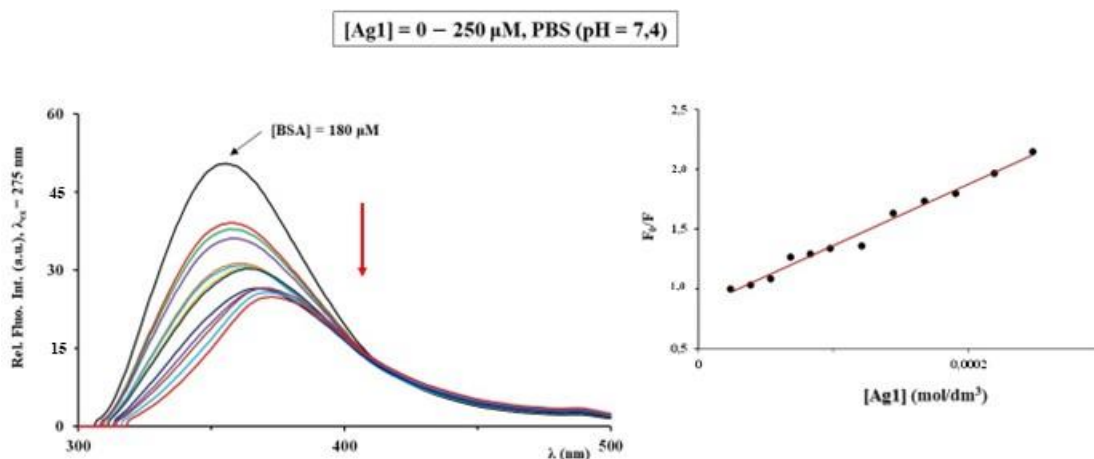


Слика 44. Комплекс **Ag1** и итраконазол спречавају угинуће ембриона услед инфекције *C. albicans* врстом. Инфекција је успостављена ињектирањем 40 - 65 ћелија гљивице *C. albicans* CS5314, која експримира зелени флуоресцентни протеин. Каплан-Мајерове криве приказују преживљавање инфицираних ембриона током пет дана третмана различитим концентрацијама **Ag1** комплекса и итраконазола (0,10, 0,15 и 0,20 μM). Приказане су вредности два независна експеримента у дупликату са 20 ембриона за сваку концентрацију

4.2.5 Интеракције **Ag1** комплекса са BSA

Емисиони спектри BSA (180 μM) у присуству растућих концентрација **Ag1** комплекса снимљени су у раствору фосфатног пуфера (PBS; pH = 7,4) у опсегу таласних

дужина од 280 до 500 nm, са ексцитацијом на 275 nm (Слика 45). Као што се са слике може видети, додавање комплекса у раствор BSA доводи до интензивног гашења флуоресценције, праћено батохромним померањем од 20 nm, што указује на промене у терцијарној структури протеина.²⁵⁰ Добијене вредности за везивање **Ag1** комплекса за BSA су приказане у табели 11. Вредност константе гашења је већа од $2 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, што сугерише да је процес гашења флуоресценције статички. На основу n вредности може се потврдити везивање **Ag1** комплекса за једно место у испитиваном протеину. Вредност константе везивања K_A је слична вредности одговарајућих константи за комплексе сребра(I) са амантадином (atd) и мемантином (mtn).²⁵¹



Слика 45. Флуоресцентни емисиони спектар BSA у присуству **Ag1** комплекса растуће концентрације. Инсертована слика представља Стерн-Волмеров дијаграм.²³⁸

Табела 11. Вредности везујућих константи **Ag1** комплекса за BSA²³⁸

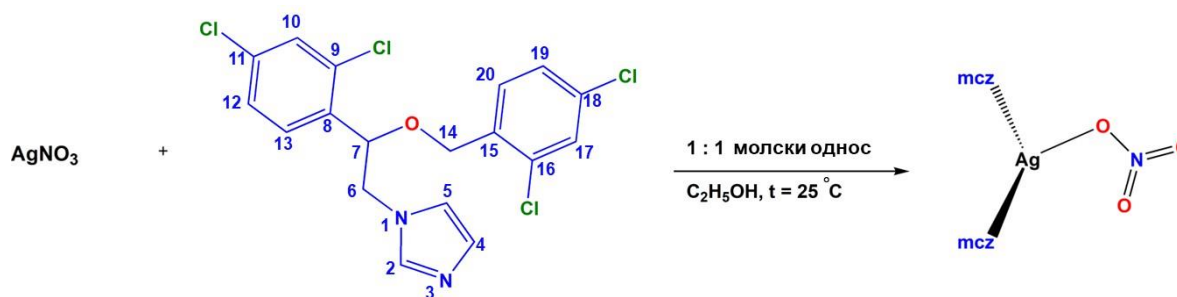
	$K_{sv} (\text{M}^{-1})$	Хипохромизам (%)	$K_q (\text{M}^{-1}\text{s}^{-1})$	$K_A (\text{M}^{-1})$	n
Ag1	$(6,04 \pm 0,20) \times 10^3$	64,1	$6,04 \times 10^{11}$	$1,31 \times 10^3$	0,8

4.3. Синтеза, карактеризација и антимикуробна активност комплекса сребра(I) са миконазолом³

Миконазол (**mcz**) коришћен је као лиганд за синтезу комплекса сребра(I), $[\text{Ag}(\text{NO}_3)(\text{mcz})_2]$ (**Ag2**). Овај комплекс је добијен у реакцији сребро(I)-нитрата са еквимоларном количином **mcz** у етанолу на собној температури (Слика 46). Кристали **Ag2** комплекса погодни за рендгенску структурну анализу, добијени су упаравањем раствора добијеног растварањем белог талогa у смеси ацетонитрил/вода (v/v 1:1) на собној температури након 3 – 5 дана. Комплекс **Ag2** је окарактерисан применом елементарне микроанализе, ^1H NMR, IR и UV-Vis спектроскопије и цикличне волтаметрије, док је његова кристална структура одређена методом дифракције рендгенских зрака са монокристала. Како би се објаснила његова структура у раствору, коришћени су DFT прорачуни. Поред

³ Резултати овог истраживања су објављени у раду N. Lj. Stevanović et al., *Inorg. Chim. Acta* **574** (2025) 122393 (Реф. 252).

тога, испитивана је антимикробна и антитуберкулозна активност **Ag2** комплекса, која је поређена са његовом цитотоксичношћу на нормалној ћелијској линији фибробласта плућа (MRC-5).²⁵²

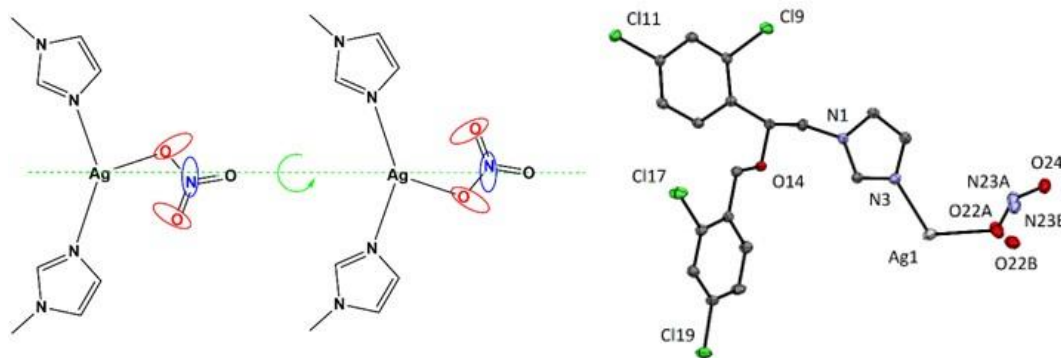


Слика 46. Шематски приказ реакције за синтезу **Ag2** комплекса. Нумерација атома у **mcz** је коришћена за анализу ^1H NMR спектра²⁵²

4.3.1. Опис кристалне структуре

На основу резултата добијених претраживањем Кембричке базе података (*Cambridge Structural Database*, CSD), може се закључити да је до сада објављено шест кристалних структура комплекса метала са **mcz** лигандом, укључујући четири кристалне структуре комплекса сребра(I) са овим азолом.^{135,136} У кристалним структурама комплекса сребра(I) са **mcz**, молски однос метал : лиганд је био 1 : 2, док је овај однос у кристалним структурама комплекса кобалта(II) и бабра(II) био 1 : 4. У зависности од полазне соли сребра(I) коришћене у синтези, раније су добијени $[\text{Ag}(\text{NO}_3)(\text{mcz})_2]$, $[\text{Ag}(\text{mcz})_2]\text{ClO}_4$, $[\text{Ag}(\text{mcz})_2]\text{BF}_4$ и $[\text{Ag}(\text{mcz})_2]\text{SbF}_6$ комплекси,^{135,136} при чему $[\text{Ag}(\text{mcz})_2]\text{X}$ ($\text{X} = \text{BF}_4^-$, ClO_4^- и SbF_6^-) комплекси имају линеарну геометрију, док је геометрија $[\text{Ag}(\text{NO}_3)(\text{mcz})_2]$ комплекса дисторговано планарна са углом између веза $\text{N}_{\text{mcz}}-\text{Ag}-\text{N}_{\text{mcz}}$ који приближно износи 152° . У циљу добијања бољег увида у начин координације NO_3^- анјона у реакцији **mcz** и AgNO_3 , синтетисан је **Ag2** комплекс (Слика 46), док његова кристална структура (Слика 47) одређена дифракцијом X-зрака са монокристала на ниској температури (150 K).²⁵²

На основу вредности термичких параметара координованог атома кисеоника из NO_3^- анјона за сребро(I) јон, као и дужина $\text{Ag}-\text{O}_{\text{нитрат}}$ веза, може се закључити да је овај анјон монодентатно координован за $\text{Ag}(\text{I})$ јон. Наиме, $\text{Ag}(\text{I})$ јон и некоординовани атом кисеоника из NO_3^- анјона леже на истој оси, при чему асиметрична јединица садржи само половину комплекса (Слика 47). Анализирајући струкуру **Ag2** комплекса, може се закључити да је геометрија овог комплекса дисторговано тригонално-планарна.²⁵²



Слика 47. Лево – шематски приказ неуређености која је присутна у координационој сфери Ag(I) јона у **Ag2** комплексу. Десно – асиметрична јединица кристалне структуре **Ag2** комплекса. Термални елипсоиди су приказани са 35% вероватноће²⁵²

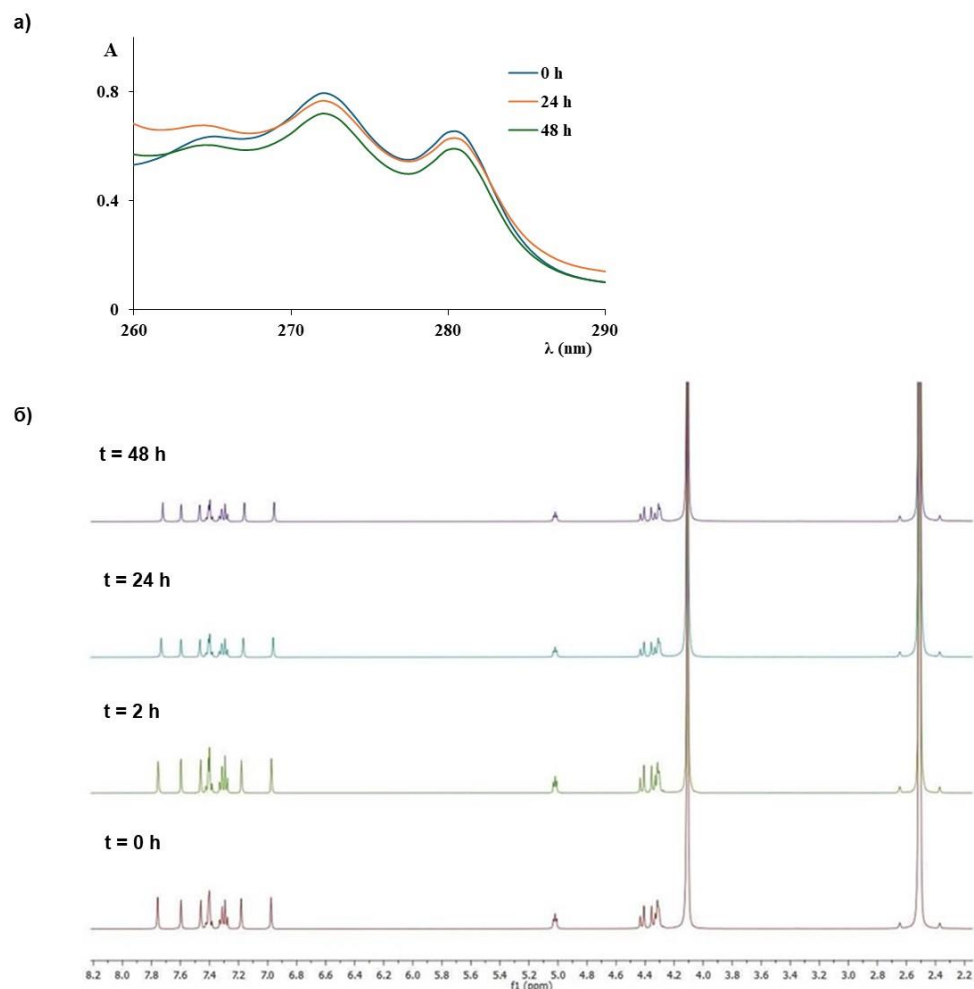
4.3.2. Спектроскопска карактеризација **Ag2** комплекса

Инфрацрвени спектар **Ag2** комплекса је снимљен у опсегу таласних бројева 4000 – 450 cm^{-1} и показује очекиване траке које се могу приписати координованом **mcz** лиганду и NO_3^- аниону.²⁵² Карактеристичне вибрације петочланих и шесточланих ароматичних прстена, $\nu(\text{C}_{\text{ar}}=\text{C}_{\text{ar}})$ и $\nu(\text{C}_{\text{ar}}=\text{N})$, налазе се у опсегу 1630 – 1471 cm^{-1} , потврђујући координацију миконазола за Ag(I) јон. Поред тога, присутне су две интензивне траке које потичу од валенционих асиметричних вибрација нитратног аниона на 1383 и 1330 cm^{-1} , што указује на координацију овог аниона за Ag(I).^{253,254}

UV-Vis спектар **Ag2** комплекса је снимљен у dmsO и веома је сличан одговарајућем спектру некоординованог миконазола.²⁵² Апсорпциони максимуми за **Ag2** комплекс ($\lambda_{\text{max}} = 272$ и 280 nm) потичу од електронских прелаза у лиганду,^{255,256} што је у складу са UV-Vis спектроскопским карактеристикама комплекса сребра(I) са ароматичним хетероцикличним једињењима која садрже азот у прстену.²⁴¹

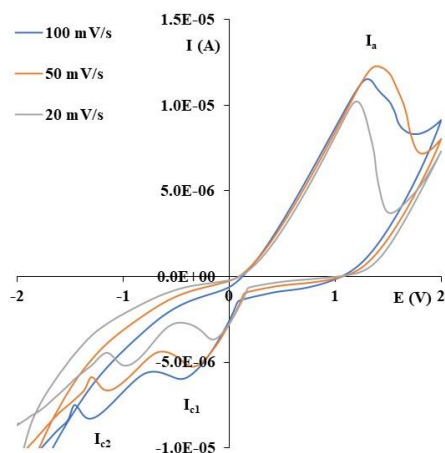
Протонски NMR спектар **Ag2** комплекса у CDCl_3 је поређен са спектром некоординованог **mcz** лиганда у истом растварачу.²⁵² Сигнали у спектру комплекса су одређени на основу одговарајућих сигнала у ^1H NMR спектру некоординованог миконазола снимљеног у CDCl_3 који је раније објављен.^{136,257} Највеће хемијско померање ($\Delta(^1\text{H})_{\text{coord}}$) од +0,56 ppm уочено је за C2H протон који је суседан координованом атому азота у **mcz** лиганду (Прилог, Слика 74). Овај сигнал се јавља на 7,48 ppm у ^1H NMR спектру некоординованог **mcz**, односно на 8,04 ppm у спектру **Ag2** комплекса. С друге стране, уочено је незнатно померање већине преосталих сигнала ка већој вредности хемијског померања, услед координације одговарајућег азота за Ag(I) јон, што је углавном спектроскопска карактеристика комплекса сребра(I) у раствору.^{137,138}

У циљу испитивања стабилности **Ag2** комплекса снимљени су UV-Vis и ^1H NMR спектри у dmsO и смеси dmsO/ H_2O ($v/v = 9 : 1$), одмах након растварања комплекса, и након 24 и 48 h на собној температури.²⁵² Примећена је незнатна промена у интензитету апсорпционих максимума у UV-Vis спектру, док је њихов положај и облик овог спектра остао непромењен (Слика 48а). Поред тога, у ^1H NMR спектру **Ag2** комплекса снимљеном након 48 h (Слика 48б) нису се појавиле траке које потичу од некоординованог **mcz** лиганда, што указује на чињеницу да не долази до супституције овог лиганда молекулом растварача.²⁵²



Слика 48. Стабилност **Ag2** комплекса током времена праћена UV-Vis (a) у dmsO/H₂O (v/v = 9 : 1; c = 3,1 × 10⁻⁴ M) и ¹H NMR (б) спектроскопијом на 25 °C²⁵²

Електрохемијско понашање **Ag2** комплекса је испитивано применом цикличне волтаметрије у dmsO у присуству 0,1 M ТВАНР као помоћног електролита у опсегу потенцијала од -2,0 до +2,0 V. Као што се може видети са слике 49, када је мерење потенцијала вршено у анодном смеру, долази до оксидативног процеса са дефинисаним пиком I_a који потиче од оксидације Ag(I) до Ag(II) јона.^{258,259} У катодном смеру се уочавају два пика. Пик I_{c1} се може приписати редукцији Ag(II) до Ag(I), док други редукциони пик I_{c2} потиче од редукције Ag(I) до Ag(0).²⁵²



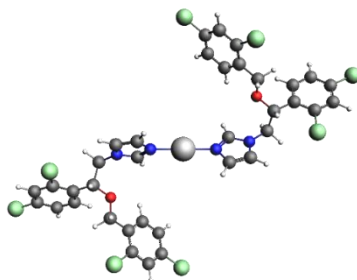
Слика 49. Циклични волтамограм **Ag2** комплекса снимљен на GC електроди у dmsO у присуству 0,1 М ТВАНР при различитим брзинама скенирања²⁵²

4.3.3. DFT прорачуни

DFT прорачуни су коришћени у циљу објашњавања структуре **Ag2** комплекса.²⁵² За оптимизацију геометрије комплекса је коришћен ZORA-LDA(VWN-V)/TZP-COSMO ниво теорије. Вредности промене слободне Гибсове енергије ($\Delta_r G$, kcal/mol; 298 K) за **Ag2** комплекс су израчунате на ZORA-TPSSH-D4/TZP-COSMO нивоу теорије. Утицај растварача (етанол, dmsO) на геометрију комплекса је испитиван помоћу COSMO солватационог модела (Табела 12), при чему је закључено да је у раствору термодинамички најповољније формирање линеарног $[Ag(mcz)_2]^+$ комплексног катјона (Слика 50).²⁵²

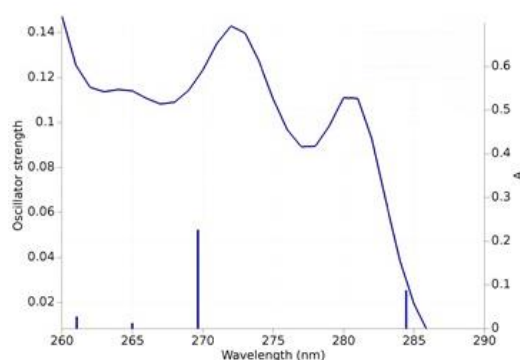
Табела 12. Промена слободне Гибсове енергије ($\Delta_r G$, kcal/mol) добијене на ZORA-TPSSH-D4/TZP-COSMO//ZORA-LDA/TZP-COSMO нивоу теорије за формирање комплекса сребра(I) са миконазолом²⁵²

Реакције	$\Delta_r G$ (298 K)
$[Ag(NO_3)(mcz)_2] \rightleftharpoons [Ag(mcz)_2]^+ + NO_3^-$	-4,5 ^a
$[Ag(NO_3)(mcz)_2] \rightleftharpoons [Ag(mcz)_2]^+ + NO_3^-$	-5,5 ^b
$[Ag(mcz)_2]^+ + C_2H_5OH \rightleftharpoons [Ag(mcz)(C_2H_5OH)]^+ + mcz$	+10,7 ^a
$[Ag(mcz)_2]^+ + dmsO \rightleftharpoons [Ag(mcz)(dmsO)]^+ + mcz$	+5,1 ^b
Растварач: ^a етанол; ^b dmsO	



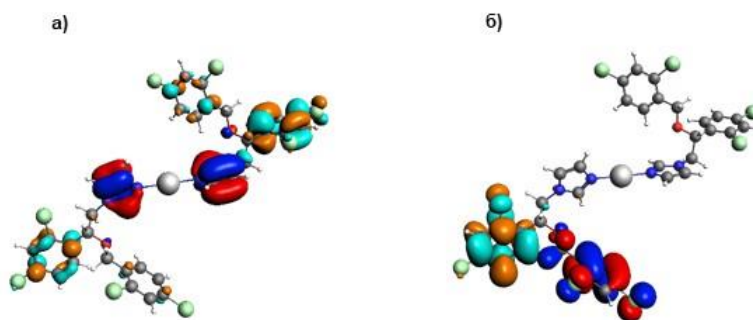
Слика 50. Структура $[Ag(mcz)_2]^+$ катјона оптимизована на ZORA-LDA/TZP-COSMO нивоу теорије²⁵²

Како би се потврдила структура комплекса сребра(I) са миконазолом у раствору, израчунати су електронски прелази.²⁵² TDDFT прорачуни су вршени помоћу ZORA-SAOP/TZP нивоа теорије и COSMO солватационог модела у dmsO. Поређене су експерименталне вредности за UV-Vis спектар **Ag2** комплекса са вредностима добијеним помоћу DFT прорачуна (Слика 51). Експерименталне $\lambda_{\max}$ вредности добијене за **Ag2** комплекс ($\lambda_{\max} = 272$ и 280 nm) су у складу са вредностима добијеним на основу DFT прорачуна ($\lambda_{\max} = 270$ и 284 nm).²⁵²



Слика 51. Поређење израчунатих вредности апсорпционих максимума (вертикалне линије) помоћу ZORA-SAOP/TZP-COSMO//ZORA-LDA/TZP-COSMO нивоа теорије са UV-Vis спектром $[\text{Ag}(\text{mcz})_2]^+$ комплекса²⁵²

Помоћу NTO анализе је утврђено да апсорпциони максимуми ($\lambda_{\max} = 270$ и 284 nm) за $[\text{Ag}(\text{mcz})_2]^+$ комплекс потичу од електронских прелаза у лиганду (Слика 52).



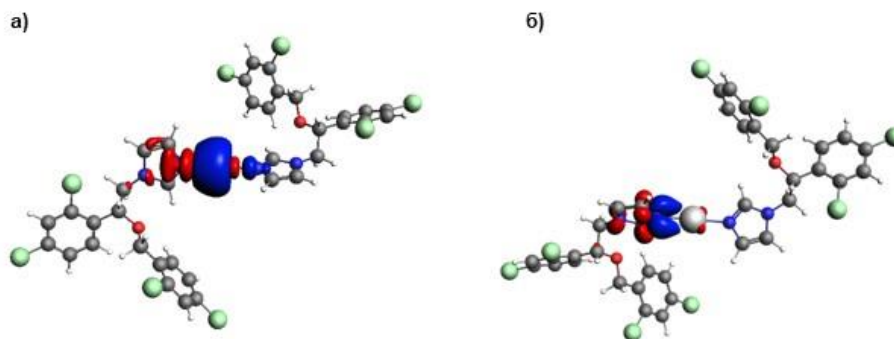
Слика 52. Најдоминантније NTO које одговарају електронским прелизима у $[\text{Ag}(\text{mcz})_2]^+$ на 270 (a) и 284 nm (б)²⁵²

Везивање миконазола за $[\text{Ag}(\text{mcz})]^+$ фрагмент испитивано је помоћу EDA анализе^{205–207} на ZORA-TPSSH-D4/TZP нивоу теорије. У EDA анализи, енергија интеракције између фрагмената (E_{int}) се разлаже на $E_{\text{elst}} + E_{\text{Pauli}} + E_{\text{orb}} + E_{\text{disp}}$, при чему су израчунате вредности приказане у табели 13.

Табела 13. Вредности различитих енергија везивања (kcal/mol) у систему $[\text{Ag}(\text{mcz})]^+--\text{mcz}$, добијених помоћу EDA анализе на ZORA-TPSSH-D4/TZP нивоу теорије. Δq представља Хиршфилдов проток наелектрисања између фрагмената; E_σ и E_π представљају σ и π ковалентне доприносе E_{orb} и добијени су помоћу NOCV анализе

	E_{Pauli}	E_{elst}	E_{orb}	E_σ	E_π	E_{disp}	E_{int}	Δq
$[\text{Ag}(\text{mcz})]^+--\text{mcz}$	95,2	-108,9	-40,1	-25,6	-6,2	-3,7	-57,5	0,14

У комплексу сребра(I) са миконазолом допринос енергије стварања π везе доводи до стабилизације комплекса (71%). NOCV анализа^{260,261} је примењена за разлагање E_{orb} у циљу одређивања преноса наелектрисања између фрагмената (Слика 53). На овај начин се могу одредити доприноси σ и π веза.



Слика 53. Деформације ковалентних густина, σ (лево) и π (десно), добијене помоћу NOCV анализе у $[\text{Ag}(\text{mcz})_2]^+$ на ZORA-TPSSH-D4/TZP нивоу теорије. Црвена/плава боја представља проток електрона²⁵²

4.3.4. Антимикробна активност **Ag2** комплекса

Испитивана је антимикробна активност **Ag2** комплекса и миконазола према два Грам-негативна (*P. aeruginosa* PAO1 NCTC 10322 и *E. coli* NCTC 9001) и три Грам-позитивна бактеријска соја (*S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* NCTC 6571 и метицилин-резистентни *S. aureus* (MRSA)), као и четири *Candida* соја (*C. albicans* ATCC 10231, *C. parapsilosis* ATCC 22019, *C. glabrata* ATCC 2001 и *C. krusei* ATCC 6258).²⁵² MIC вредности добијене за **Ag2** комплекс и миконазол су поређене са њиховом антипролиферативном активношћу на здравој ћелијској линији фибробласта плућа MRC-5 (IC_{50} ; Табела 14). Комплекс **Ag2** је показао умерену активност према Грам-негативним бактеријама (*P. aeruginosa* и *E. coli*), при чему је према овим сојевима активнији од **mcz** лиганда. С друге стране, **mcz** показује бољу антибактеријску активност у односу на **Ag2** према *S. aureus* (Табела 14). Комплекс **Ag2** је показао мању антифунгалну активност према *Candida* сојевима у односу на **mcz**, изузев према *C. glabrata* ATCC 2001, према којој показује бољу антифунгалну активност 2,4 пута.²⁵² Ови резултати су у супротности са резултатима за комплексе сребра(I) са итраконазолом, еконазолом, клотримазолом и вориконазолом који су показали значајно бољу антифунгалну активност од одговарајућих азола, при чему најбољу активност показује комплекс сребра(I) са вориконазолом према *C. glabrata* (9533 пута).^{137,238} Поред тога, комплекс **Ag2** је токсичнији према MRC-5 ћелијској линији ($\text{IC}_{50} = 4,5 \mu\text{M}$) у односу на миконазол ($\text{IC}_{50} = 8,4 \mu\text{M}$).

Табела 14. Антимикробна активност **Ag2** комплекса и миконазола (**mcz**, MIC, μM) у поређењу са њиховим антипролиферативним ефектом на здравој MRC-5 ћелијској линији фибробласта плућа (IC_{50} , μM)²⁵²

	Ag2	mcz
<i>E. coli</i> NCTC 9001	25	> 480
<i>P. aeruginosa</i> NCTC 10332	150	> 480
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	50	30
<i>S. aureus</i> NCTC 6571	100	30
<i>S. aureus</i> MRSA	50	15
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	25	1,1
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	25	2,4
<i>C. glabrata</i> ATCC 2001	25	60
<i>C. krusei</i> ATCC 6258	100	15
MRC-5	4,5 $\pm$ 0,2	8,4 $\pm$ 0,1

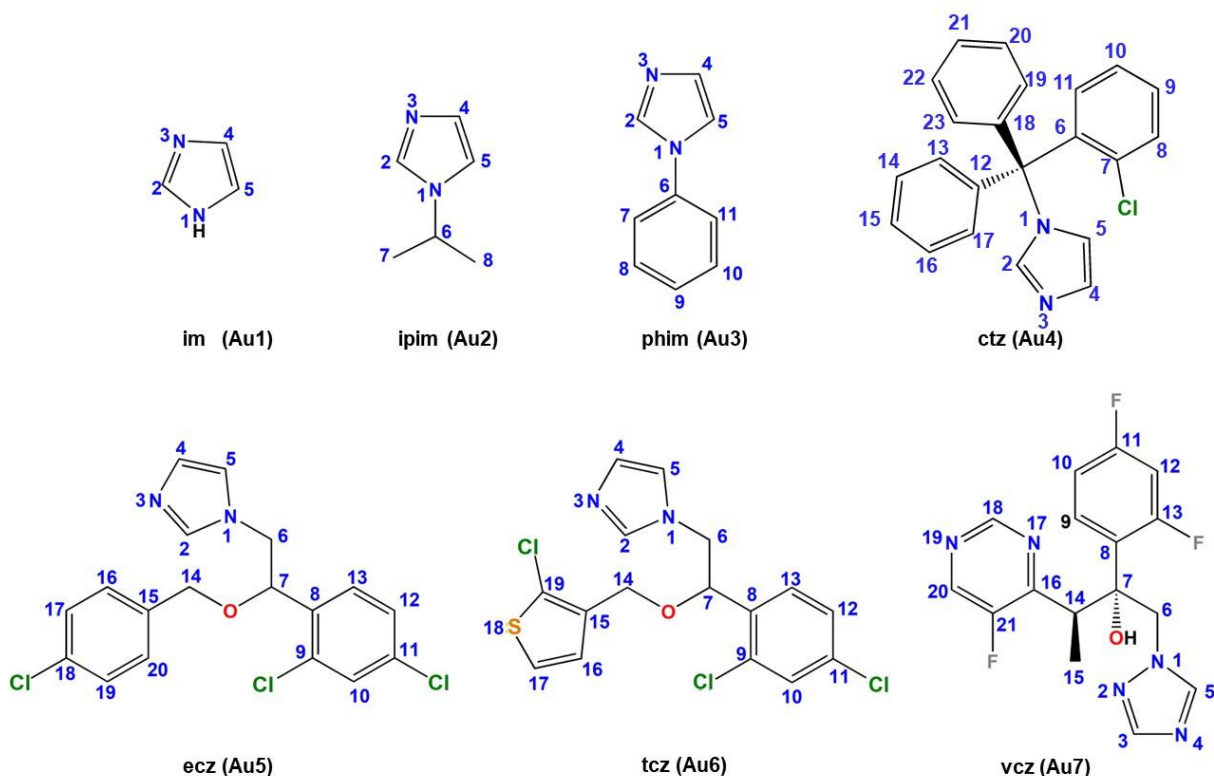
4.3.5. Антитуберкулозна активност **Ag2** комплекса

Антитуберкулозна активност **Ag2** комплекса према *M. tuberculosis* H37Rv испитивана је применом МАВА анализе, у концентрацији од 50 до 0,78 $\mu\text{g/mL}$. Комплекс **Ag2** показује бољу антитуберкулозну активност са MIC од 3,12 μM (3,125 $\mu\text{g/mL}$), у односу на миконазол (MIC = 7,5 μM ; 3,125 $\mu\text{g/mL}$)²⁵²

4.4. Синтеза, карактеризација и антимикробна активност комплекса злата(III) са различитим азолима⁴

У реакцијама калијум-тетрахлоридоаурата(III) са еквимоларном количином имидазола (**im**), 1-изопропилимидазола (**ipim**), 1-фенилимидазола (**phim**), клотримазола (**ctz**), еконазола (**ecz**), тиоконазола (**tcz**) и вориконазола (**vcz**) (Слика 54) у етанолу уз рефлукс, добијени су моноклеарни $[\text{AuCl}_3(\text{im})]$ (**Au1**), $[\text{AuCl}_3(\text{ipim})]$ (**Au2**), $[\text{AuCl}_3(\text{phim})]$ (**Au3**), $[\text{AuCl}_3(\text{ctz})]$ (**Au4**), $[\text{AuCl}_3(\text{ecz})]$ (**Au5**), $[\text{AuCl}_3(\text{tcz})]$ (**Au6**) и $[\text{AuCl}_3(\text{vcz})]$ (**Au7**) комплекси. Комплекси **Au1** – **Au7** су окарактерисани применом елементалне микроанализе, масене спектрометрије, ^1H NMR, UV-Vis и IR спектроскопије и мерењем моларне проводљивости, при чему је кристална структура **Au3** – **Au5** и **Au7** комплекса одређена методом дифракције рендгенских зрака са монокристала. Испитивана је антимикробна активност синтетисаних комплекса, која је поређена са њиховом цитотоксичношћу на здравој ћелијској линији фибробласта плућа (MRC-5). Испитиван је утицај **Au1** – **Au3** комплекса на биосинтезу ергостерола код *C. albicans*. Како би се објаснио механизам антимикробног деловања **Au4** – **Au7** комплекса испитиване су њихове интеракције са ct-DNA и BSA у одсуству и присуству маркера еозина Y(eos Y), ибупрофена (ibu) и дигитоксина (dig).²⁶²

⁴ Резултати овог истраживања су објављени у раду N. Lj. Stevanović et al., *Dalton Trans.* **51** (2022) 5322 (Реф. 262).



Слика 54. Структурне формуле лиганда коришћених за синтезу **Au1** – **Au7** комплекса. Нумерација атома је коришћена за анализу ^1H NMR спектра²⁶²

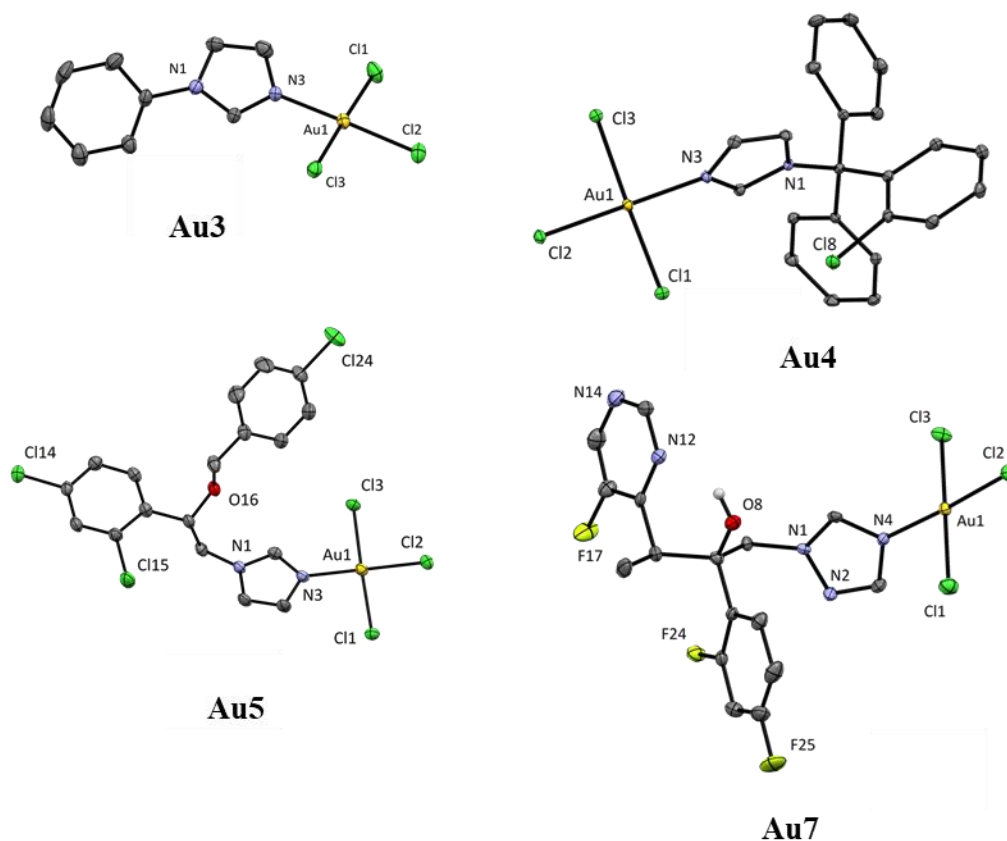
4.4.1. Опис кристалних структура комплекса **Au3** – **Au5** и **Au7**

Молекулске структуре **Au3** – **Au5** и **Au7** комплекса су приказане на слици 55, док су одабране дужине веза и структурни параметри наведени у табели 15.²⁶² Кристална структура **Au4** комплекса је раније објављена.²⁶³ Азоли **phim**, **ctz**, **ecz** и **vcz** су монодентатно координовани за Au(III) јон преко атома азота имидазоловог (**Au3** – **Au5**) односно триазоловог (**Au7**) прстена, док преостала координациона места заузимају хлоридо лиганди. На основу вредности τ_4/τ'_4 параметра за **Au3** – **Au5** и **Au7** комплексе (Табела 15) може се закључити да је њихова геометрија квадратно-планарна. Важно је напоменути да вредност овог квантитативног параметра код комплекса који имају идеалну квадратно-планарну геометрију износи 0.²⁶⁴ Као што се из табеле 15 може видети, дужина Au-Cl везе хлоридо лиганда који се налази у *trans* положају у односу на одговарајући азол, краћа је у поређењу са Au-Cl везом хлоридо лиганда који се налази у *cis* положају, што је складу са *trans* ефектом хлоридо лиганда.

Табела 15. Одабране дужине веза (Å) и структурни параметар у **Au3 – Au5** и **Au7** комплекса²⁶²

	Au3	Au4	Au5	Au7
Au–N _{azol} (Å)	2,036(4)	2,019(3)	2,037(4)	2,009(6)
Au–Cl (<i>trans</i> -N) (Å)	2,262(1)	2,253(1)	2,262(1)	2,257(2)
Au–Cl (<i>cis</i> -N) (Å)	2,272(1)	2,279(1)	2,278(1)	2,279(2)
Au–Cl (<i>cis</i> -N) (Å)	2,283(1)	2,282(1)	2,275(1)	2,270(2)
^a τ ₄ / τ ₄ ²⁶⁴	0,03/0,02	0,02/0,02	0,03/0,03	0,06/0,05

^a τ₄ = [360° (α + β)/(360° – 2θ)]; τ₄' = [(β – α)/(360° – 2θ)] + [(180° – β)/(360° – θ)]; α и β су два највећа валентна угла координационог центра; θ је квадратно-планарни угао од 90°



Слика 55. Кристалне структуре **Au3 – Au5** и **Au7** комплекса. Термички елипсоиди су приказани са 35% вероватноће. Атоми водоника који су везани за атоме угљеника нису приказани²⁶²

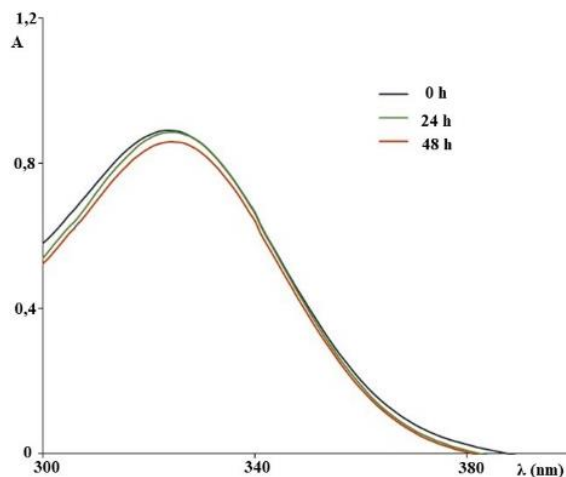
4.4.2. Спектроскопска карактеризација **Au1 – Au7** комплекса

Инфрацрвени спектри **Au1 – Au7** комплекса су снимљени у опсегу таласних бројева 4000 – 450 cm⁻¹ и показују очекиване траке које се могу приписати координаном азолу.²⁶² Карактеристичне вибрације петочланих и шесточланих ароматичних прстенова, ν(C_{ar}=C_{ar}) и ν(C_{ar}=N), које се налазе у опсегу 1636 – 1373 cm⁻¹, потврђују координацију одговарајућег азола за Au(III) јон. Поред тога, у IR спектру **Au6** комплекса присутна је интензивна трака

на 748 cm^{-1} која потиче од валенционих вибрација $\nu(\text{C-S})$,²⁶⁵ док се у IR спектру **Au7** комплекса на $\sim 3300\text{ cm}^{-1}$ јавља широка трака која се може приписати вибрацијама O-H групе у молекулу вориконазола.²⁶²

У Експерименталном делу ове докторске дисертације приказане су вредности таласних дужина апсорпционих максимума (λ_{max} , nm) и моларних екстинкционих коефицијената (ϵ , $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) за **Au1** – **Au7** комплексе, чији су UV-Vis спектри снимљени одмах након њиховог растварања у хлороформу.²⁶² Концентрација раствора **Au1** – **Au7** комплекса која је коришћена за снимање UV-Vis спектра износи $3,2 \times 10^{-4}\text{ M}$. Апсорпциони максимуми **Au1** – **Au7** комплекса ($\lambda_{\text{max}} = 260, 315, 299, 301, 300, 301$ и 305 nm) се могу приписати преносу електрона са лиганда у d орбитале Au(III) јона (LMCT).^{266,267} Апсорпциони максимуми за **Au1** – **Au7** комплексе показују батохромно (црвено) померање у поређењу са апсорпционим максимумом одговарајућег азола ($\lambda_{\text{max}} = \sim 260\text{ nm}$).²⁶²

У циљу испитивања стабилности **Au1** – **Au7** комплекса снимљени су UV-Vis спектри у dmsO одмах након њиховог растварања и након 24 и 48 h на собној температури.²⁶² Концентрације раствора **Au1** – **Au7** комплекса које су коришћене за снимање износе $1,7 \times 10^{-4}\text{ M}$ (**Au1**), $2,7 \times 10^{-4}\text{ M}$ (**Au2**, **Au3** и **Au7**), $1,8 \times 10^{-4}\text{ M}$ (**Au4**), $2,0 \times 10^{-4}\text{ M}$ (**Au5**) и $2,3 \times 10^{-4}\text{ M}$ (**Au6**). Примећена је незнатна промена у интензитету апсорпционог максимума током 48 h (до 11% за **Au3**), док је облик UV-Vis спектра остао непромењен, указујући да одговарајући азол остаје координован за Au(III) јон током 48 h (Слика 56).



Слика 56. Стабилност **Au7** комплекса праћена UV-Vis спектрофотометријом у dmsO током времена ($c = 2,3 \times 10^{-4}\text{ M}$)²⁶²

Протонски NMR спектри **Au1** – **Au3** комплекса су снимљени у $\text{dmsO-}d_6$ (Прилог, Слика 75 – 77), док су спектри **Au4** – **Au7** комплекса снимљени у CDCl_3 (Прилог, Слика 78 – 81).²⁶² Спектри **Au1** – **Au7** комплекса су поређени са спектрима некоординованих азола снимљеним у истом растварачу,^{134, 245, 265, 268–270} при чему број сигнала у ^1H NMR спектрима комплекса одговара броју сигнала у спектрима одговарајућих азола. Највећа хемијска померања су уочена за протоне који су суседни координованом атому азота. Према томе, $\Delta(^1\text{H})_{\text{coord}}$ од $+0,48\text{ ppm}$ је уочено за C4H протон код **Au1** комплекса, док су највећа хемијска померања за **Au2** – **Au6** комплексе уочена за C2H протон ($\Delta(^1\text{H})_{\text{coord}} = +1.00\text{ ppm}$ за комплекс **Au2**).²⁶² Највеће хемијско померање ($\Delta(^1\text{H})_{\text{coord}}$) од $+0,77\text{ ppm}$ код комплекса који садржи триазолов прстен, **Au7**, уочено је за C5H протон.

Вредности моларне проводљивости (Λ_m) за **Au1** – **Au7** комплексе у dmf, дате су у Експерименталном делу дисертације и у складу су са чињеницом да се испитивани комплекси злата(III) понашају као неелектролити.

4.4.3. Антифунгална активност **Au1** – **Au7** комплекса

Испитивана је антифунгална активност **Au1** – **Au7** комплекса, три азола (**im**, **ipim** и **phim**) и четири клинички коришћених азола (**ctz**, **ecz**, **tcz** и **vcz**) према *Candida* сојевима (*C. albicans* ATCC 10231, *C. parapsilosis* ATCC 22019, *C. glabrata* ATCC 2001, *C. krusei* ATCC 6258 и *C. auris* ATCC 21092), као и према *M. canis*.²⁶² MIC вредности добијене за **Au1** – **Au7** комплексе и одговарајуће лиганде су поређене са њиховом антипролиферативном активношћу на здравој ћелијској линији фибробласта плућа MRC-5 (IC₅₀; Табела 16).

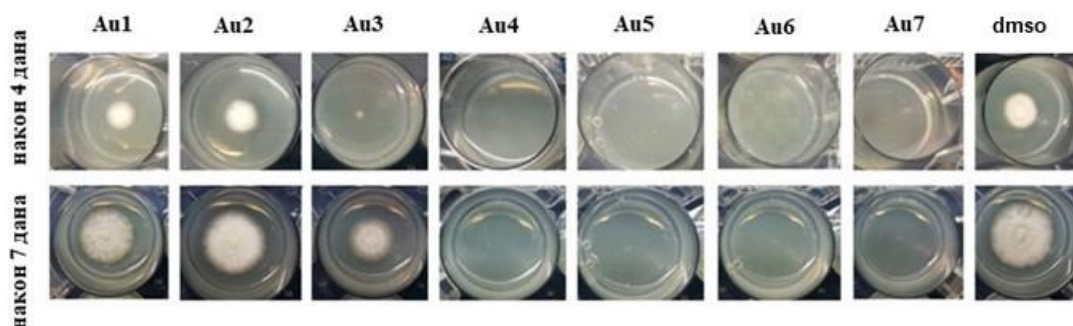
Комплекси **Au1** – **Au7** су показали антифунгалну активност са MIC вредностима од 0,2 – 484 μM (0,1 – 200 $\mu\text{g/mL}$).²⁶² С друге стране, као што је и очекивано, **im**, **ipim** и **phim**, не показују антифунгалну активност при највећој испитиваној концентрацији од 200 $\mu\text{g/mL}$ (1,3 – 3 mM). Међутим, ови азоли (**im**, **ipim** и **phim**) су показали мању цитотоксичност у поређењу са испитиваним комплексима злата(III) и клинички коришћеним азолима (Табела 16). Услед координације клинички коришћених азола за злато(III) јон, долази до побољшања антифунгалне активности, при чему **Au4**, **Au6** и **Au7** комплекси имају најбољу антифунгалну активност. Комплекси **Au5** – **Au7** инхибирају раст *C. glabrata* (MIC = 9,1, 9,0 и 76,6 μM), при чему показују од 6,1 до 7,5 пута бољу активност у односу на одговарајући азол (**ecz**, **tcz** и **vcz**).²⁶² Комплекси **Au4** и **Au7** инхибирају раст *C. krusei* (MIC = 0,4 и 1,5 μM), показујући 45 и 21,4 пута, респективно, бољу инхибиторну активност у односу на **ctz** и **ecz** лиганде, док је највећа антифунгална активност утврђена за **Au7** комплекс према *C. auris*, који показује 30 пута већу активност у односу на **vcz** лиганд. С друге стране, **Au4** – **Au7** комплекси су токсичнији према фибробластима плућа (MRC-5) у односу на одговарајуће лиганде (**ctz**, **ecz**, **tcz** и **vcz**).²⁶² Међутим, вредности индекса селективности (SI) су биле од 0,3 (за **Au2** комплекс према *C. glabrata*) до 1075 (за **Au7** комплекс према *C. parapsilosis*).²

Табела 16. Антифунгална активност **Au1 – Au7** комплекса и одговарајућих лиганата (MIC, µg/mL и µM) у поређењу са њиховом антипролиферативном активношћу на здравој MRC-5 ћелијској линији фибробласта плућа (IC₅₀, µg/mL и µM)^{a, 262}

	<i>C. albicans</i> ATCC 10231		<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019		<i>C. glabrata</i> ATCC 2001		<i>C. krusei</i> ATCC 6258		<i>C. auris</i> ATCC 21092		MRC-5	
Злато(III) комплекси са имидазолима												
	µM	µg/mL	µM	µg/mL	µM	µg/mL	µM	µg/mL	µM	µg/mL	µM	µg/mL
Au1	135	50	135	50	135	50	67,5	25	270	100	310	115
im	>2938	>200	>2938	>200	>2938	>200	>2938	>200	>2938	>200	>2938	>200
Au2	242	100	242	100	484	200	242	100	242	100	145	60
ipim	>1815	>200	>1815	>200	>1815	>200	>1815	>200	>1815	>200	>1815	>200
Au3	112	50	112	50	112	50	112	50	56	25	89	40
phim	>1387	>200	1387	200	1387	200	1387	200	>1387	>200	1387	200
Злато(III) комплекси са клинички коришћеним азолима												
Au4	38,6	25	1,4	0,9	4,8	3,1	0,4	0,3	1,9	1,2	6,2	4
ctz	2,6	0,9	10,2	3,5	9,1	3,2	1,4	0,5	9,1	3,2	8,7	3
Au5	4,6	3,1	2,5	1,7	9,1	6,2	18,3	12,5	9,1	6,2	26,3	18
ecz	7,0	2,7	3,9	1,5	56,2	21,5	14,1	5,4	7,0	2,7	10,1	3,9
Au6	0,6	0,4	0,6	0,4	9,0	6,2	1,5	1	3,6	2,5	6,5	4,5
tcz	2,3	0,9	0,3	0,1	64,5	25	32,2	12,5	8,1	3,1	14,2	5,5
Au7	4,8	3,1	0,2	0,1	76,6	50	1,5	1	19,1	12,5	215	140
vcz	35,8	12,5	0,3	0,1	572	200	1,4	0,5	572	200	859	300

^aВредности стандардне девијације су 0 – 2%.

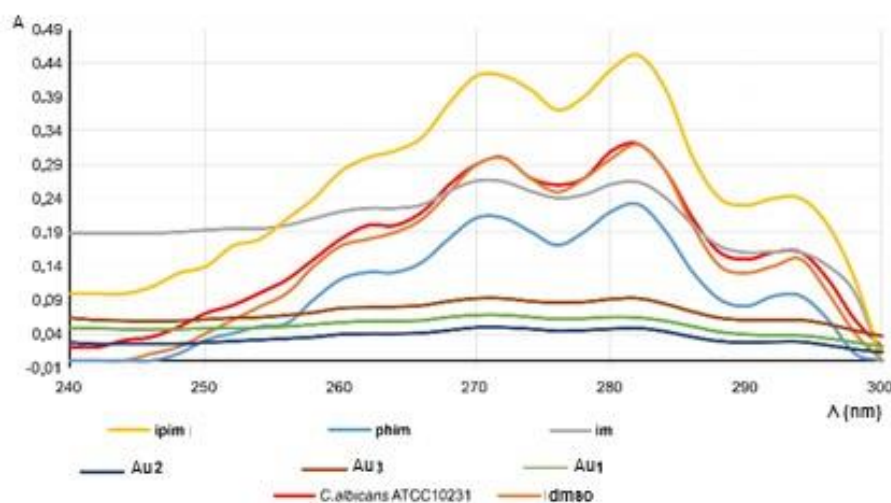
Испитивана је антифунгална активност **Au1** – **Au7** комплекса према *M. canis* у концентрацијама од 25 и 50 µg/mL. Комплекси **Au4** – **Au7** су у потпуности инхибирали раст *M. canis* при концентрацијама од 50 µg/mL у поређењу са dmsO у периоду од 7 дана (Слика 57).



Слика 57. Инхибиција раста *M. canis* у присуству **Au1** – **Au7** комплекса при концентрацији од 50 µg/mL²⁶²

4.4.4. Утицај **Au1** – **Au3** комплекса на биосинтезу ергостерола код *C. albicans* соја

С обзиром на чињеницу да клинички коришћени азоли инхибирају цитохром P450 ензиме укључене у биосинтезу ергостерола, који је основна компонента ћелијске мембране гљивица,^{49,54} одређена је укупна количина ергостерола код *C. albicans* ATCC 10231 соја у присуству субинхибиторних концентрација ($0,5 \times \text{MIC}$; Слика 54) комплекса **Au1** – **Au3** и одговарајућих азола (**im**, **ipim** и **phim**).²⁶² Комплекси **Au1** – **Au3** значајно утичу на смањење количине ергостерола, због чега се може претпоставити да имају сличан механизам деловања као и клинички коришћени азоли. С друге стране, **im**, **ipim** и **phim** не утичу значајно на биосинтезу ергостерола.²⁶²



Слика 58. Одређивање количине ергостерола код *C. albicans* ATCC 10231 соја у присуству **Au1** – **Au3** комплекса и одговарајућих лиганата (**im**, **ipim** и **phim**) применом UV спектрофотометрије ($0,5 \times \text{MIC}$)²⁶²

4.4.5. Антибактеријска активност **Au1** – **Au7** комплекса

Испитивана је антибактеријска активност **Au1** – **Au7** комплекса, и одговарајућих лиганада према *E. coli* NCTC 9001, *P. aeruginosa* NCTC 10332, *P. aeruginosa* PA14, *P. aeruginosa* BK25H, *S. aureus* ATCC 259233, *S. aureus* NCTC 6571 и *S. aureus* MRSA.²⁶² Комплекси **Au1** – **Au7** су показали умерену активност према тестираним бактеријским сојевима (Табела 17). Комплекс **Au4** је инхибирао раст *E. coli* при MIC вредности од 30,9 μM (20 $\mu\text{g/mL}$), док **Au5** инхибира раст *S. aureus* ATCC 259233 при MIC = 18,3 μM (12,5 $\mu\text{g/mL}$). Поред тога, комплекси **Au5** и **Au6** су показали добру антибактеријску активност према *P. aeruginosa* PA14 при MIC = 18,3 и 18,1 μM (12,5 $\mu\text{g/mL}$). Клинички коришћени азоли су инхибирали раст раст *S. aureus* MRSA при MIC вредностима од 14,1 до 572 μM (5,4 до 200 $\mu\text{g/mL}$; Табела 17). С друге стране, **im**, **ipim** и **phim** лиганди нису показали антибактеријску активност.²⁶²

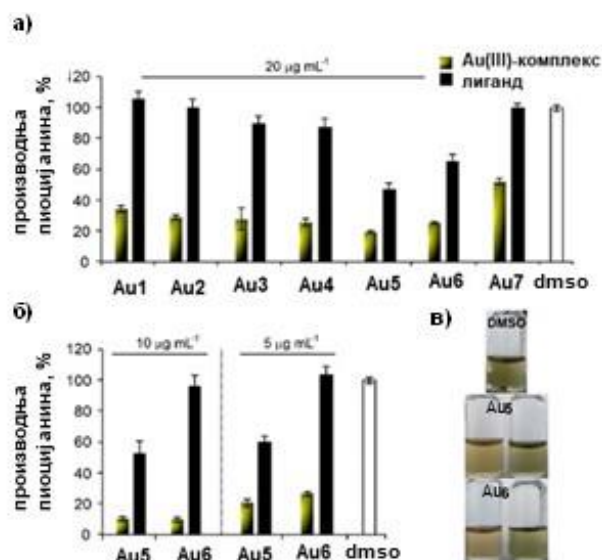
Табела 17. Антибактеријска активност **Au1** – **Au7** комплекса и одговарајућих лиганада (MIC, $\mu\text{g/mL}$ и μM)^{a, 262}

	<i>E. coli</i> NCTC 9001		<i>P. aeruginosa</i> NCTC 10332		<i>P. aeruginosa</i> PA14		<i>P. aeruginosa</i> BK25H		<i>S. aureus</i> ATCC 259233		<i>S. aureus</i> NCTC 6571		<i>S. aureus</i> MRSA	
Злато(III) комплекси са имидазолима														
	μM	μg/mL	μM	μg/mL	μM	μg/mL	μM	μg/mL	μM	μg/mL	μM	μg/mL	μM	μg/mL
Au1	67,5	25	135	50	67,5	25	270	100	67,5	25	135	50	67,5	25
im	>2938	>200	>2938	>200	>2938	>200	>2938	>200	>2938	>200	>2938	>200	>2938	>200
Au2	60,5	25	121	50	121	50	121	50	60,5	25	121	50	60,5	25
ipim	>1815	>200	>1815	>200	>1815	>200	>1815	>200	>1815	>200	>1815	>200	>1815	>200
Au3	55,9	25	223	100	223	50	112	50	55,9	25	56	25	27,9	12,5
phim	>1387	>200	>1387	>200	>1387	>200	>1387	>200	>1387	>200	>1387	>200	>1387	>200
Злато(III) комплекси са клинички коришћеним азолима														
Au4	30,9	20	231	150	38,6	25	38,6	100	19,3	12,5	9,6	6,2	19,3	12,5
ctz	>580	>200	>580	>200	>580	>200	>580	>200	290	100	290	100	36,3	12,5
Au5	36,5	25	219	150	18,3	12,5	18,3	50	18,3	12,5	36,5	25	9,1	6,2
ecz	>450	>172	>450	>172	>450	>172	>450	>172	225	86	28,1	10,7	14,1	5,4
Au6	36,2	25	217	150	18,1	12,5	18,1	50	72,4	50	36,2	25	18,1	12,5
tcz	>516	>200	>516	>200	>516	>200	>516	>200	258	100	129	50	32,2	12,5
Au7	76,6	50	268	175	76,6	50	76,6	50	153	100	153	100	76,6	50
vcz	572	200	572	200	572	200	572	200	572	200	572	200	572	200

^aВредности стандардне девијације су 0 — 2%.

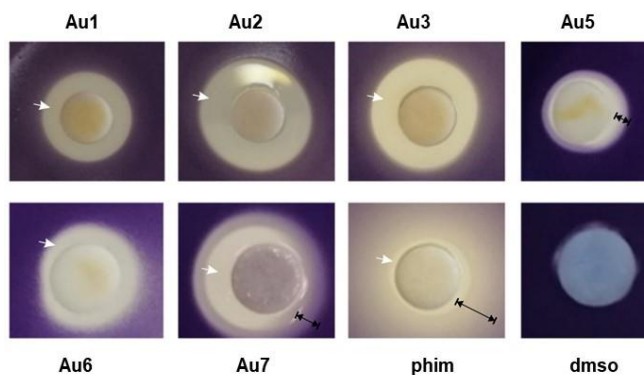
Испитивање анти-QS активности

Испитивана је и анти-QS активност **Au1** – **Au7** комплекса на инхибицију производње пиоцијанина помоћу *P. aeruginosa* PA14,¹⁸⁵ виолацеина помоћу *C. violaceum* CV026¹⁸³ и продигиозина коришћењем *S. marcescens*¹⁸⁴. Дискови са овим бактеријским врстама су третирани субинхибиторним концентрацијама испитиваних једињења.²⁶² Комплекси **Au1** – **Au7** инхибирају производњу пиоцијанина за 50 – 80% при концентрацији од 20 µg/mL (Слика 59а). С друге стране, азоли, изузев **ecz** и **tcz**, нису показали инхибиторну активност при овој концентрацији. Комплекси **Au5** и **Au6** су показали најбољу инхибиторну активност при нижим концентрацијама (Слика 59б), при чему су четири, односно осам пута, активнији у односу на одговарајуће азоле.²⁶²



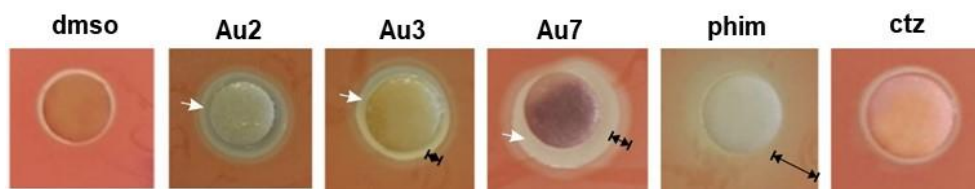
Слика 59. Инхибиција производње пиоцијанина у присуству **Au1** – **Au7** комплекса концентрације 20 µg/mL (а). Инхибиција производње пиоцијанина у присуству **Au5** и **Au6** комплекса концентрације 5 и 10 µg/mL (б). Изглед културе у присуству комплекса **Au5** и **Au6** (10 µg/mL) у поређењу са dmsol (в)²⁶²

Комплекси **Au1** – **Au3** и **Au6** инхибирају производњу виолацеина при концентрацији од 200 µg/mL, док комплекси **Au5** и **Au7** не показују значајну инхибиторну активност при истој концентрацији (Слика 60).



Слика 60. Инхибиција производње виолацеина у присуству 200 µg комплекса **Au1 – Au3** и **Au5 – Au7** и **phim** лиганда. Беле стрелице означавају зоне инхибиције раста, док црне линије указују на зоне инхибиције синтезе виолацеина. Као контрола је коришћен dmsol²⁶²

С друге стране, комплекс **Au7** и **phim** лиганд утичу на биосинтезу продигиозина коришћењем *S. marcescens*. Поред тога, комплекси **Au2**, **Au3** и **Au7** су показали умерену инхибиторну активност (Слика 61).



Слика 61. Инхибиција производње продигиозина у присуству 200 µg комплекса **Au2**, **Au3** и **Au7** и лиганда (**phim** и **ctz**). Беле стрелице означавају зоне инхибиције раста, док црне линије указују на зоне инхибиције синтезе продигиозина. Као контрола је коришћен dmsol²⁶²

4.4.6. Интеракције **Au4 – Au7** комплекса са биомолекулима

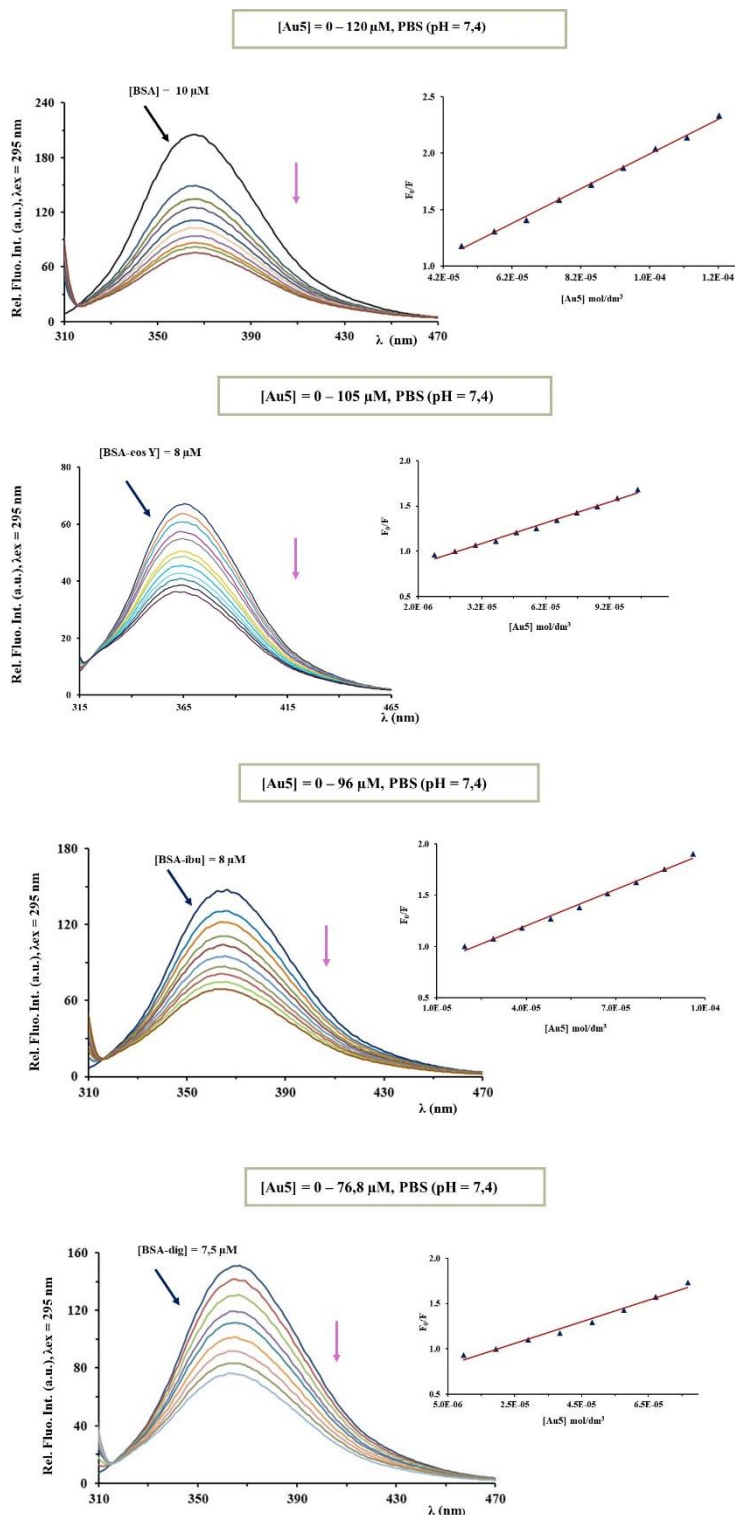
Испитиване су интеракције **Au4 – Au7** комплекса ct-DNA и BSA у одсуству и присуству (eos Y, ibu и dig). Од укупно 582 аминокиселина које граде BSA протеин, триптофан (Trp), тирозин (Tyr) и фенилаланин (Phe) представљају аминокиселине одговорне за његову флуоресценцију, која у највећој мери потиче од Trp.²⁷¹ Структура BSA се може поделити у три домена (I, II и III), при чему се сваки од ових домена састоји од два субдомена (A и B).²⁷¹ Хидрофобни џепови се налазе у субдоменима IIA и IIIA и представљају два активна места везивања (I и II) за која је утврђено да се комплекси метала најчешће везују.²⁷² Треће активно место везивања III се налази у хидрофилном џепу субдомена IB, и одговорно је за транспорт малих молекула.²⁷³

Флуоресцентни емисиони спектри BSA константне концентрације су снимљени у присуству **Au4 – Au7** комплекса растућих концентрација, у опсегу таласних дужина од 280 до 500 nm, са екситацијом протеина на 275 nm (Слика 62).¹⁸⁹ С порастом концентрације једињења долази до смањења интензитета флуоресценције BSA, што указује да испитивана једињења интерагују са овим биомолекулом. У складу са тим, снимљени су емисиони спектри BSA-маркер система у присуству растуће концентрације **Au4 – Au7** комплекса у

опсегу од 295 до 500 nm, са екситацијом протеина на 290 nm, а израчунате константе везивања наведене су у табели 18.

Табела 18. Вредности везујућих константи за интеракције **Au4** – **Au7** комплекса са BSA

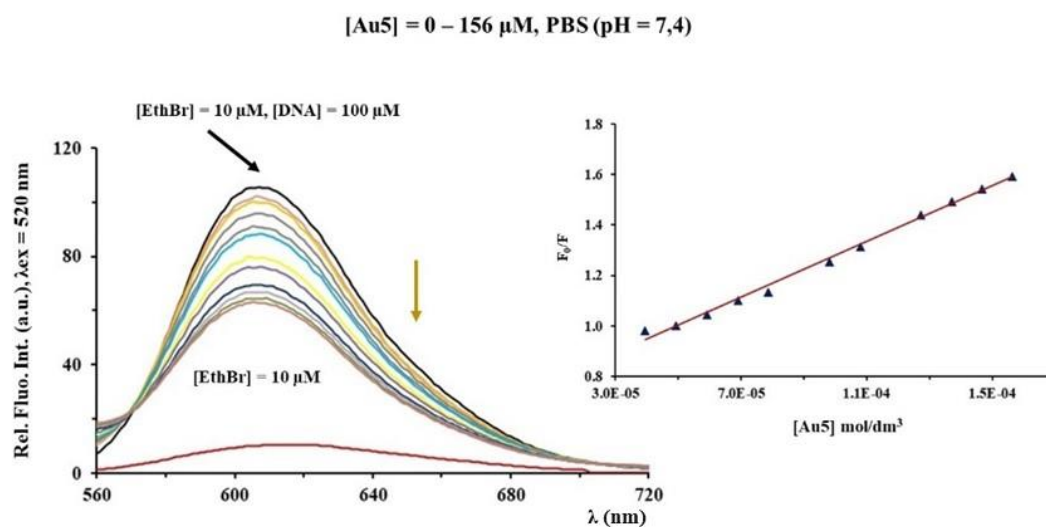
Систем	$K_{sv} (M^{-1})$	Хипохромизам (%)	$K_q (M^{-1}s^{-1})$	$K_A (M^{-1})$	n
Au4 –BSA	$(2,93 \pm 0,05) \times 10^4$	67,4	$2,93 \times 10^{12}$	$0,03 \times 10^6$	1,36
Au4 –BSA–eos Y	$(0,20 \pm 0,02) \times 10^4$	58,9	$2,00 \times 10^{12}$	$1,03 \times 10^6$	1,48
Au4 –BSA–ibu	$(0,29 \pm 0,04) \times 10^4$	62,7	$2,97 \times 10^{12}$	$1,29 \times 10^6$	1,46
Au4 –BSA–dig	$(5,44 \pm 0,05) \times 10^4$	68,3	$5,44 \times 10^{12}$	$1,46 \times 10^6$	1,42
Au5 –BSA	$(3,65 \pm 0,03) \times 10^4$	63,3	$3,65 \times 10^{12}$	$3,24 \times 10^6$	1,60
Au5 –BSA–eos Y	$(0,90 \pm 0,02) \times 10^4$	58,9	$2,00 \times 10^{12}$	$0,03 \times 10^6$	1,17
Au5 –BSA–ibu	$(1,61 \pm 0,02) \times 10^4$	53,4	$1,61 \times 10^{12}$	$0,36 \times 10^6$	1,37
Au5 –BSA–dig	$(2,29 \pm 0,03) \times 10^4$	49,9	$2,29 \times 10^{12}$	$0,16 \times 10^6$	1,27
Au6 –BSA	$(0,82 \pm 0,02) \times 10^4$	44,2	$0,82 \times 10^{12}$	$0,02 \times 10^6$	1,12
Au6 –BSA–eos Y	$(0,76 \pm 0,01) \times 10^4$	44,5	$0,76 \times 10^{12}$	$2,80 \times 10^3$	0,89
Au6 –BSA–ibu	$(12,7 \pm 0,08) \times 10^4$	62,5	$12,7 \times 10^{12}$	$44,0 \times 10^6$	1,85
Au6 –BSA–dig	$(1,49 \pm 0,03) \times 10^4$	49,8	$1,49 \times 10^{12}$	$0,11 \times 10^6$	1,24
Au7 –BSA	$(6,93 \pm 0,07) \times 10^4$	69,3	$6,93 \times 10^{12}$	$1,91 \times 10^6$	1,46
Au7 –BSA–eos Y	$(11,3 \pm 0,05) \times 10^4$	71,4	$11,3 \times 10^{12}$	$0,65 \times 10^6$	1,42
Au7 –BSA–ibu	$(8,48 \pm 0,06) \times 10^4$	68,0	$8,48 \times 10^{12}$	$1,48 \times 10^6$	1,33
Au7 –BSA–dig	$(1,08 \pm 0,09) \times 10^4$	53,4	$2,24 \times 10^{12}$	$0,66 \times 10^6$	1,41



Слика 62. Флуоресцентни емисиони спектри BSA у одсуству и присуству маркера по додатку растуће концентрације **AuS** комплекса. Инсертоване слике приказују Стерн-Волмеров дијаграм

Као што се може видети из табеле 18, у **Au4** комплексу је уочено повећање константе везивања K_A у присуству сва три маркера, што се може приписати конформационим променама у BSA молекулу услед истовременог везивања маркера и **Au4** комплекса (Табела 18). Поред тога, добијене вредности константи везивања за **Au5** – **Au7** комплексе су мање у присуству eos Y што указује да се ови комплекси везују за домен I и субдомен IIA у BSA.

Интеракције **Au4** – **Au7** комплекса са EthBr-ct-DNA ($[ct-DNA]/[EthBr] = 10$) системом испитиване су применом флуоресцентне емисионе спектроскопије. Флуоресцентни емисиони спектри EthBr-ct-DNA система у присуству **Au5** комплекса растуће концентрације (0 – 156 μM) приказани су на слици 63. Након додавања испитиваних комплекса у EthBr-ct-DNA систем, долази до смањења интензитета флуоресценције, што указује на њихову интеракцију са овим системом. Вредност константе везивања (K_A) за **Au6** комплекс је већа у односу на одговарајућу K_A вредност EthBr за ct-DNA ($2 \times 10^6 M^{-1}s^{-1}$), што указује на способност овог комплекса да супституише EthBr и да се интеркалативно везује за ct-DNA. Поред тога, вредност Стерн-Волмерове константе за **Au6** комплекс потврђује највећи афинитет везивања овог комплекса за ct-DNA. С друге стране, K_A вредности за **Au4** и **Au5** комплексе (Табела 19), мање су у односу на одговарајућу K_A вредност за EthBr, што указује да ови комплекси нису интеркалирајући агенси. Вредности K_q константе за комплексе злата(III) су у складу са статичким механизмом гашења флуоресценције, док су вредности n коефицијента од 1,30 до 2,12.



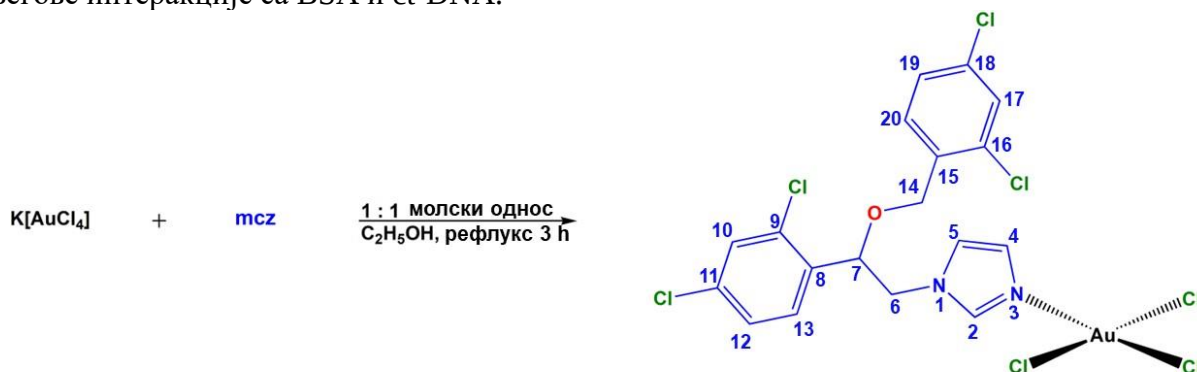
Слика 63. Флуоресцентни емисиони спектар EthBr-ct-DNA система у присуству **Au5** комплекса растуће концентрације. Инсертована слика представља Стерн-Волмеров дијаграм

Табела 19. Вредности везујућих константи **Au4** – **Au7** комплекса за EthBr-ct-DNA систем

	$K_{sv} (M^{-1})$	Хипохромизам (%)	$K_q (M^{-1}s^{-1})$	$K_A (M^{-1})$	n
Au4	$(0,28 \pm 0,01) \times 10^4$	29,4	$0,28 \times 10^{12}$	$0,23 \times 10^6$	1,53
Au5	$(0,33 \pm 0,01) \times 10^4$	27,8	$0,33 \times 10^{12}$	$0,04 \times 10^6$	1,30
Au6	$(0,76 \pm 0,02) \times 10^4$	40,7	$0,76 \times 10^{12}$	$94,8 \times 10^6$	2,12
Au7	$(3,20 \pm 0,05) \times 10^4$	58,3	$3,20 \times 10^{12}$	$2,76 \times 10^6$	1,55

4.5. Синтеза, карактеризација и антимикробна активност комплекса злата(III) са миконазолом⁵

Миконазол (**mcz**) је коришћен као лиганд за синтезу комплекса злата(III), $[\text{AuCl}_3(\text{mcz})]$ (**Au8**).²⁵² Овај комплекс је добијен у реакцији калијум-тетрахлоридаурата(III) са еквимоларном количином **mcz** у етанолу уз рефлукс 3 h (Слика 64). Комплекс **Au8** је окарактерисан применом елементалне микроанализе, ^1H NMR, IR и UV-Vis спектроскопије. Применом DFT прорачуна, објашњена је структура комплекса у раствору. Поред тога, испитивана је антимикробна и антитуберкулозна активност **Au8** комплекса, која је поређена са његовом цитотоксичношћу на здравој ћелијској линији фибробласта плућа (MRC-5).²⁵² Како би се објаснио механизам антимикробног деловања **Au8** комплекса, испитиване су његове интеракције са BSA и ct-DNA.



Слика 64. Шематски приказ реакције за синтезу **Au8** комплекса. Нумерација атома у **mcz** је коришћена за анализу ^1H NMR спектра²⁵²

4.5.1. Спектроскопска карактеризација **Au8** комплекса²⁵²

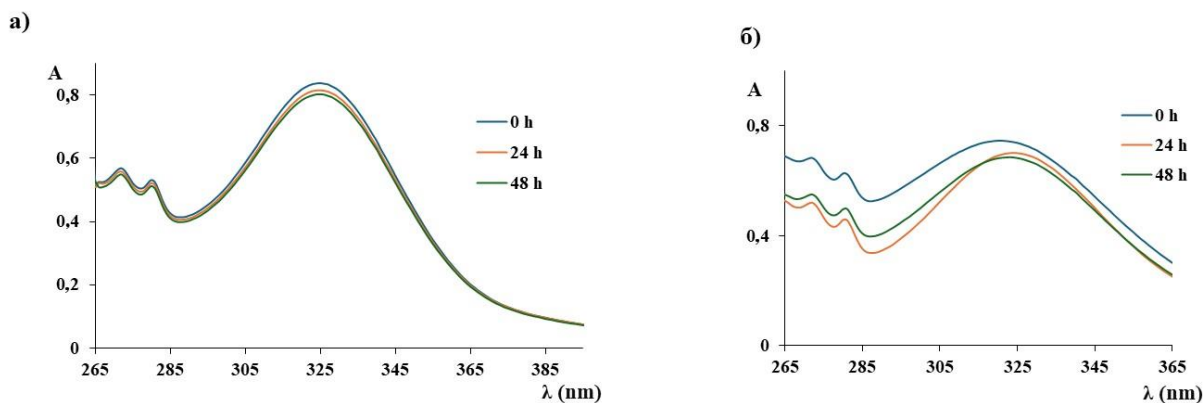
Инфрацрвени спектар **Au8** комплекса је снимљен у опсегу таласних бројева 4000 – 450 cm^{-1} и показује очекиване траке које се могу приписати координаном миконазолу. Карактеристичне вибрације петочланих и шесточланих ароматичних прстена, $\nu(\text{C}_{\text{ar}}=\text{C}_{\text{ar}})$ и $\nu(\text{C}_{\text{ar}}=\text{N})$, у опсегу 1640 – 1471 cm^{-1} , потврђују координацију миконазола за Au(III) јон.

UV-Vis спектар **Au8** комплекса је снимљен у dmf. Апсорпциони максимуми за **Au8** комплекс, $\lambda_{\text{max}} = 272, 280$ и 325 nm, могу се приписати преносу електрона са лиганда у d орбитале Au(III) јона (LMCT).²⁵²

Протонски NMR спектар **Au8** комплекса у CDCl_3 је поређен са спектром некоординаног **mcz** лиганда у истом растварачу.²⁵² Највеће хемијско померање $\Delta(^1\text{H})_{\text{coord}}$ од +0,87 ppm уочено је за C2H протон који је суседан координаном атому азота. Овај сигнал се јавља на 7,48 ppm у ^1H NMR спектру некоординаног **mcz** лиганда, односно на 8,35 ppm у спектру **Au8** комплекса.

⁵ Резултати овог истраживања су објављени у раду N. Lj. Stevanović et al., *Inorg. Chim. Acta* **574** (2025) 122393 (Реф. 252).

У циљу испитивања стабилности **Au8** комплекса снимљен је UV-Vis спектар у dmф и смеси dmsо/H₂O (v/v = 9 : 1), одмах након растварања комплекса, и након 24 и 48 h на собној температури. Примећена је незнатна промена у интензитету апсорпционих максимума, док је њихов положај и облик UV-Vis спектра остао непромењен (Слика 65).²⁵²



Слика 65. Стабилност **Au8** комплекса током времена праћена UV-Vis спектроскопијом на 25 °C у dmф ($c = 2,3 \times 10^{-4}$ M) и dmsо/H₂O (v/v = 2,2 × 10⁻⁴ M) (б)²⁵²

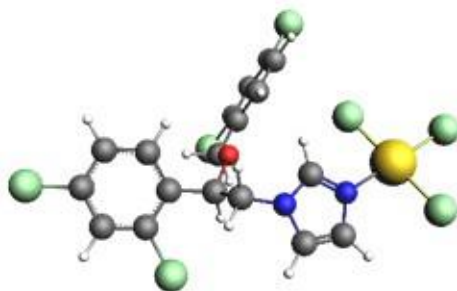
4.5.2. DFT прорачуни

DFT прорачуни су коришћени у циљу објашњавања структуре комплекса злата(III) са миконазолом у раствору.²⁵² За оптимизацију геометрије **Au8** комплекса је коришћен ZORA-LDA(VWN-V)/TZP-COSMO ниво теорије. Вредности промене слободне Гибсове енергије ($\Delta_r G$, kcal/mol; 298 K) за **Au8** комплекс су израчунате на ZORA-TPSSH-D4/TZP-COSMO нивоу теорије. Утицај растварача (етанол, dmф) на геометрију комплекса је испитиван помоћу COSMO солватационог модела (Табела 20), при чему је закључено да је у раствору термодинамички најповољније формирање квадратно-планарног [AuCl₃(mcz)] комплекса (Слика 66).²⁵²

Табела 20. Промена слободне Гибсове енергије ($\Delta_r G$, kcal/mol) добијене на ZORA-TPSSH-D4/TZP-COSMO//ZORA-LDA/TZP-COSMO нивоу теорије за формирање **Au8** комплекса²⁵²

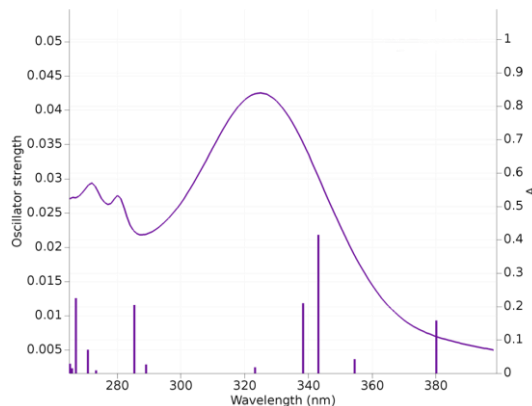
Реакције	$\Delta_r G$ (298 K)
[AuCl ₃ (mcz)] + C ₂ H ₅ OH $\rightleftharpoons$ [AuCl ₃ (C ₂ H ₅ OH)] + mcz	+19,9 ^a
[AuCl ₃ (mcz)] + dmф $\rightleftharpoons$ [AuCl ₃ (dmф)] + mcz	+16,1 ^b

Растварач: ^aетанол; ^bdmф



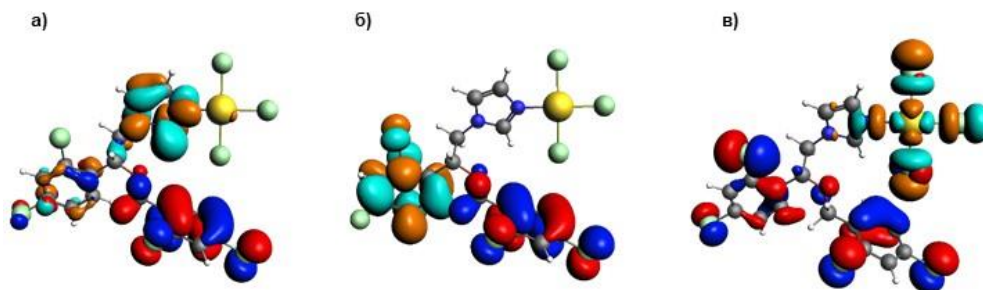
Слика 66. Структура **Au8** комплекса оптимизована на ZORA-LDA/TZP-COSMO нивоу теорије²⁵²

TDDFT прорачуни су коришћени за израчунавање електронских прелаза помоћу ZORA-SAOP/TZP нивоа теорије и COSMO солватационог модела у DMF.²⁵² Поређене су експерименталне вредности за UV-Vis спектар **Au8** комплекса са вредностима добијеним помоћу DFT прорачуна (Слика 67). Експерименталне $\lambda_{\max}$ вредности добијене за **Au8** комплекс ($\lambda_{\max} = 272, 280$ и 325 nm) у складу су са вредностима добијеним на основу DFT прорачуна ($\lambda_{\max} = 267, 285$ и 343 nm).



Слика 67. Поређење израчунатих вредности апсорпционих максимума (вертикалне линије) помоћу ZORA-SAOP/TZP-COSMO//ZORA-LDA/TZP-COSMO нивоа теорије са UV-Vis спектром **Au8** комплекса²⁵²

Помоћу NTO анализе је утврђено да апсорпциони максимуми на $\lambda_{\max} = 272$ и 280 nm за **Au8** комплекс потичу од електронских прелаза у лиганду, док максимум на $\lambda_{\max} = 325$ nm одговара LMCT прелазу (Слика 68).

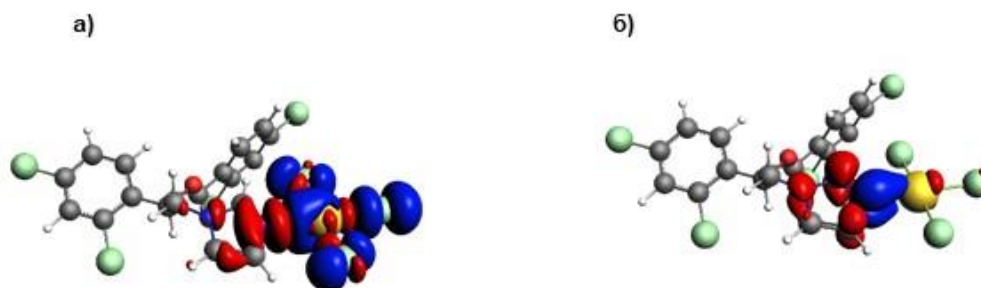


Слика 68. Најдоминантније NTO које одговарају електронским прелазима у **Au8** комплексу на 267 (a), 285 (б) и 343 (в) nm²⁵²

Везивање миконазола за Au(III) јон у **Au8** комплексу испитивано је помоћу EDA анализе^{205–207} на ZORA-TPSSH-D4/TZP нивоу теорије (Табела 21).²⁵² У **Au8** комплексу допринос енергије стварања π везе доводи до стабилизације комплекса (63%). NOCV^{260,261} анализа је примењена за разлагање E_{orb} у циљу одређивања преноса наелектрисања између фрагмената (Слика 69).

Табела 21. Вредности различитих енергија везивања (kcal/mol) у систему [AuCl₃]-mcz, добијених помоћу EDA анализе на ZORA-TPSSH-D4/TZP нивоу теорије. Δq представља Хиршфилдов проток наелектрисања између фрагмената; E_σ и E_π представљају σ и π ковалентне доприносе E_{orb} и добијени су помоћу NOCV анализе

	E_{Pauli}	E_{elst}	E_{orb}	E_σ	E_π	E_{disp}	E_{int}	Δq
[AuCl ₃]-mcz	171,1	-146,2	-76,5	-54,7	-6,4	-8,8	-60,4	0,26



Слика 69. Деформације ковалентних густина, σ (лево) и π (десно), добијене помоћу NOCV анализе у **Au8** комплексу на ZORA-TPSSH-D4/TZP нивоу теорије. Црвена/плава боја представља проток електрона

4.5.3. Антимикробна активност **Au8** комплекса

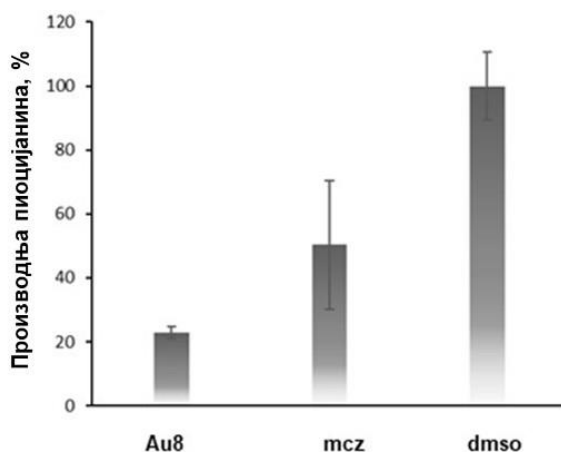
Испитивана је антимикробна активност **Au8** комплекса и **mcz** према две Грам-негативне (*P. aeruginosa* PAO1 NCTC 10322 и *E. coli* NCTC 9001) и три Грам-позитивне бактерије (*S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* NCTC 6571 и *S. aureus* MRSA), и према четири *Candida* соја (*C. albicans* ATCC 10231, *C. parapsilosis* ATCC 22019, *C. glabrata* ATCC 2001 и *C. krusei* ATCC 6258).²⁵² MIC вредности добијене за **Au8** комплекс и **mcz** су поређене са њиховом антипролиферативном активношћу на здравој ћелијској линији фибробласта плућа MRC-5 (IC₅₀). Као што се из табеле 22 може видети, комплекс **Au8** је показао умерену активност према Грам-негативним бактеријама (*P. aeruginosa* и *E. coli*), при чему показује бољу инхибиторну активност од миконазола према овим бактеријским сојевима. Комплекс **Au8** је показао бољу антибактеријску активност у односу на миконазол и према *S. aureus* MRSA, као и бољу антифунгалну активност према испитиваним *Candida* сојевима у односу на лиганд (2 до 9,7 пута; Табела 22).²⁵² Ипак, овај комплекс злата(III) је незнатно токсичнији према MRC-5 ћелијској линији (IC₅₀ = 9,0 μ M) у односу на **mcz** (IC₅₀ = 8,4 μ M; Табела 22).²⁵²

Табела 22. Антимикробна активност **Au8** комплекса и миконазола (MIC, μM) у поређењу са њиховим антипролиферативним ефектом на здравој MRC-5 ћелијској линији фибробласта плућа (IC_{50} , μM)²⁵²

	Au8	mcz
<i>E. coli</i> NCTC 9001	35	> 480
<i>P. aeruginosa</i> NCTC 10332	208	> 480
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	35	30
<i>S. aureus</i> NCTC 6571	35	30
<i>S. aureus</i> MRSA	8,7	15
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	0,6	1,1
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	1,2	2,4
<i>C. glabrata</i> ATCC 2001	6,2	60
<i>C. krusei</i> ATCC 6258	5,6	15
MRC-5	9,0 $\pm$ 0,4	8,4 $\pm$ 0,1

Испитивање анти-QS активности

У циљу одређивања анти-QS активности **Au8** комплекса и миконазола, коришћени су *Chromobacterium violaceum* CV026, за производњу виолацеина, *Serratia marcescens* ATCC 27117, за производњу продигиозина и *P. aeruginosa* PA14, за производњу пиоцијанина.²⁵² На основу добијених резултата, може се закључити да **Au8** комплекс не утиче на производњу виолацеина и продигиозина. С друге стране, овај комплекс и миконазол инхибирају производњу пиоцијанина ~80% односно ~50% у поређењу са dmsO при концентрацији од 20 $\mu\text{g/mL}$ (27,8 μM за **Au8** комплекс и 48,1 μM за mcz; Слика 70).²⁵²



Слика 70. Инхибиција производње пиоцијанина у присуству **Au8** комплекса и **mcz** лиганда при концентрацији 20 $\mu\text{g/mL}$. Као контрола коришћен је dmsO²⁵²

4.5.4. Антитуберкулозна активност **Au8** комплекса

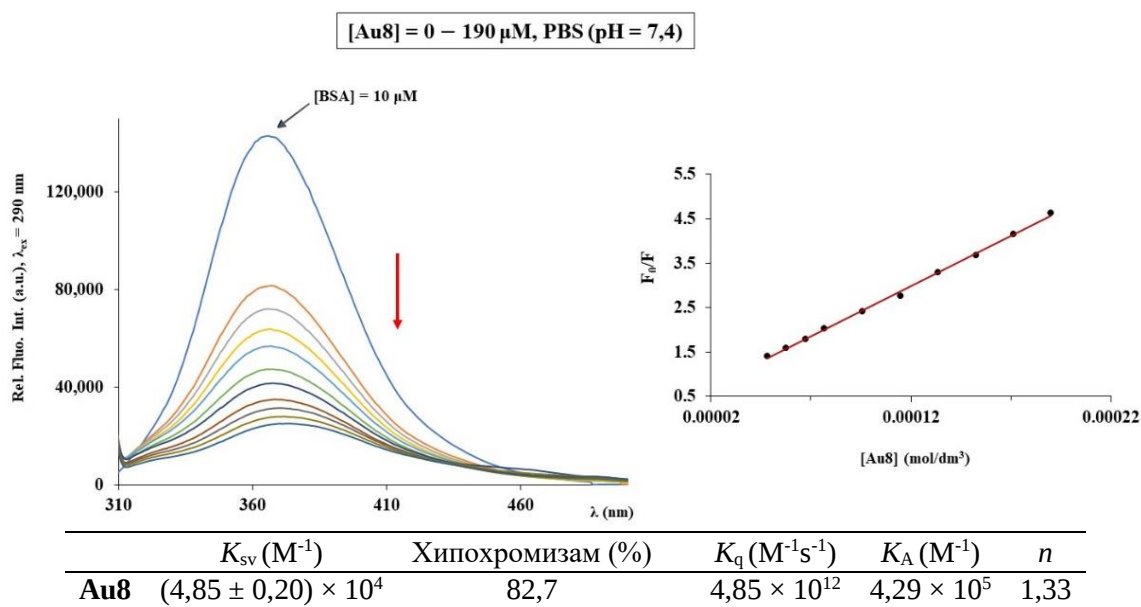
Антитуберкулозна активност **Au8** комплекса према *M. tuberculosis* H37Rv испитивана је применом МАВА анализе, у концентрацији од 50 до 0,78 $\mu\text{g/mL}$. Комплекс

Ag2 показује бољу антитуберкулозну активност са MIC од $8,69 \mu\text{M}$ ($6,25 \mu\text{g/mL}$), у односу на миконазол (MIC = $7,5 \mu\text{M}$; $3,125 \mu\text{g/mL}$)²⁵²

4.5.5. Интеракције Au8 комплекса са биомолекулима

Интеракције са BSA

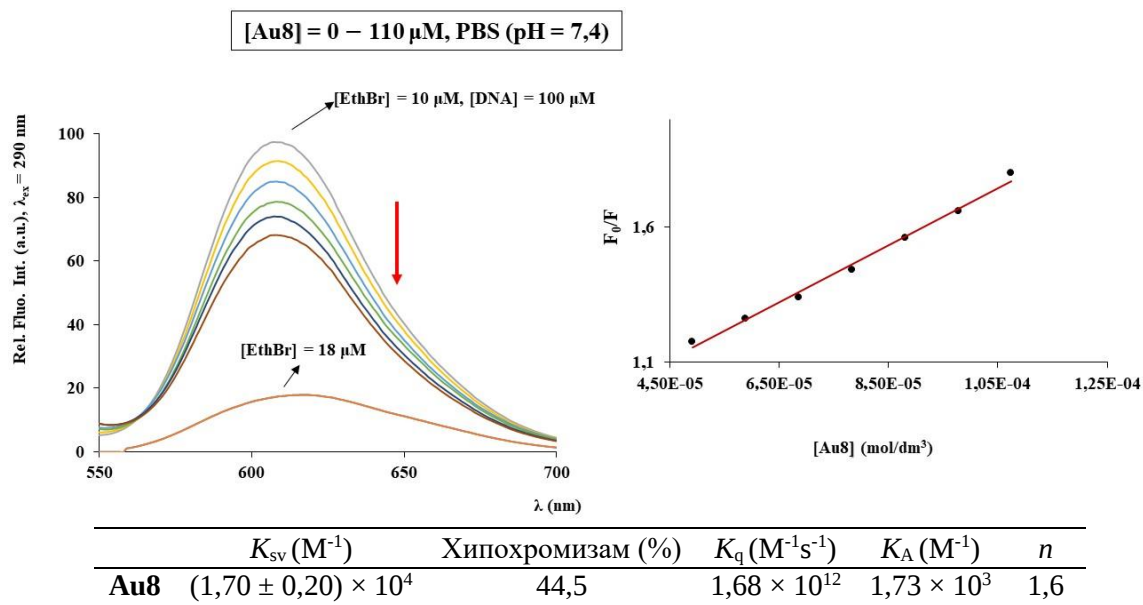
Флуоресцентни емисиони спектар BSA константне концентрације је снимљен у одсуству и присуству растућих концентрација **Au8** комплекса (Слика 71). Може се видети да се интензитет флуоресценције протеина смањује са порастом концентрације комплекса, што указује да **Au8** комплекс интерагује са овим биомолекулом. Вредност K_q ($4,85 \times 10^{12} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) константе је већа од 10^{10} , што указује на статички механизам гашења флуоресценције.²³⁵ На основу вредности K_A константе (Слика 71), може се закључити да се **Au8** комплекс може везати за BSA и на тај начин транспортовати до ћелије, а затим раскинути везу са овим транспортним протеином.²³⁴



Слика 71. Флуоресцентни емисиони спектар BSA у присуству растуће концентрације **Au8** комплекса. Инсертована слика показује Стерн-Волмеров дијаграм. У табели су приказане вредности константи везивања за испитивану интеракцију

Интеракције са ct-DNA

На основу резултата флуориметријских испитивања интеракција **Au8** комплекса са EthBr-ct-DNA системом, закључено је да се овај комплекс не понаша као интеркалирајући агенс (Слика 72). Наиме, K_A константа износи $1,73 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$, што је мање у односу на вредности константи везивања интеркалирајућих агенаса.²⁷⁴ Вредност K_q константе је $1,68 \times 10^{12} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, што указује на статички механизам гашења флуоресценције.²³⁵



Слика 72. Флуоресцентни емисиони спектар EthBr-ct-DNA система у присуству растуће концентрације **Au8** комплекса. Инсертована слика показује Стерн-Волмеров дијаграм. У табели су приказане вредности константи везивања за испитивану интеракцију

5. ЗАКЉУЧАК

У оквиру ове докторске дисертације, приказани су резултати који се односе на синтезу, структурну карактеризацију и биолошку активност комплекса сребра(I), бакра(II) и злата(III) са азолима који се клинички користе као антифунгални агенси (имидазол (**im**), 1-изопропилимидазол (**ipim**), 1-фенилимидазол (**phim**), флуконазол (**fcz**), итраконазол (**icz**), миконазол (**mcz**), клотримазол (**ctz**), еконазол (**ecz**), тиоконазол (**tcz**) и вориконазол (**vcz**)). У реакцијама ових јона метала са различитим азолима синтетисани су $\{[\text{CuCl}_2(\text{fcz})_2] \cdot 5\text{H}_2\text{O}\}_n$ (**Cu1**), $[\text{Ag}(\text{icz})_2]\text{NO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (**Ag1**), $[\text{Ag}(\text{NO}_3)(\text{mcz})_2]$ (**Ag2**), $[\text{AuCl}_3(\text{im})]$ (**Au1**), $[\text{AuCl}_3(\text{ipim})]$ (**Au2**), $[\text{AuCl}_3(\text{phim})]$ (**Au3**), $[\text{AuCl}_3(\text{ctz})]$ (**Au4**), $[\text{AuCl}_3(\text{ecz})]$ (**Au5**), $[\text{AuCl}_3(\text{tcz})]$ (**Au6**), $[\text{AuCl}_3(\text{vcz})]$ (**Au7**) и $[\text{AuCl}_3(\text{mcz})]$ (**Au8**) комплекси. Кристалне структуре **Cu1**, **Ag1**, **Ag2**, **Au3** – **Au5** и **Au7** комплекса одређене су методом дифракције рендгенских зрака са монокристала.

У циљу испитивања стабилности синтетисаних комплекса снимљени су UV-Vis спектри у одговарајућим растварањима одмах након њиховог растварања и након 24 и 48 h на собној температури. Комплекси су показали стабилност у раствору током 48 h, што је омогућило испитивање њихове антимикуробне и цитотоксичне активности.

Табела 23. Преглед синтетисаних и структурно окарактерисаних комплекса у оквиру докторске дисертације и њихове најзначајније антимикуробне активности

Комплекс	Лиганд	Резултати добијени применом спектроскопских метода и испитивањем антимикуробне активности
Cu1	fcz	✓ Полимеран комплекс.
		✓ Два хлоридо и четири fcz лигананда су координована за Cu(II) јон.
		✓ Издужено октаедарска геометрија.
		✓ Боља активност према клиничким изолатима <i>C. albicans</i> од fcz лиганда.
		✓ Инхибира филаментацију <i>C. albicans</i> .
		✓ Умерен, а у неким случајевима и значајан, ефекат инхибиције формирања биофилма код <i>C. albicans</i> ATCC 10231 и <i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019 сојева.
		✓ Утиче на смањење количине ергостерола при субинхибиторним концентрацијама.
		✓ Утврђено је да се интеракцијом са протеином може транспортовати до циљане ћелије.
		✓ Вредност константе везивања комплекса за ct-DNA указује на чињеницу да испитивани комплекс није интеркалирајући агенс.
Ag1	icz	✓ Два молекула icz лиганда су монодентатно координована за Ag(I) јон формирајући $[\text{Ag}(\text{icz})_2]^+$ комплексни катјон, док се у спољашњој координационој сфери налази NO_3^- анјон и молекул воде.
		✓ Идеална линеарна геометрија.
		✓ Боља антифунгална активност од icz лиганда.
		✓ Инхибира филаментацију код више од 90% ћелија
		✓ Потпуно спречава формирање хифа у гљивици.
		✓ Већа <i>in vivo</i> токсичност у односу на icz лиганд.
Ag2	mcz	✓ Повољнији терапеутски профил у односу на icz .
		✓ Два молекула mcz лиганда и NO_3^- анјон су монодентатно координовани за Ag(I) јон.
		✓ Дисторговано тригонално-планарна геометрија.

		✓ На основу DFT прорачуна, утврђено је да је у раствору термодинамички најповољније формирање линеарног $[Ag(mcz)_2]^+$ комплексног катјона. ✓ Показује већу антигуберкулозну активност од mcz.
Au1	im	✓ Утичу на смањење количине ергостерола код <i>C. albicans</i> ATCC 10231 соја у присуству субинхибиторних концентрација.
Au2	ipim	
Au3	phim	
Au4	ctz	✓ Инхибира раст <i>C. krusei</i> (MIC = 0,4 μM), показујући 45 пута бољу инхибиторну активност у односу на ctz лиганд. ✓ Није интеркалирајући агенс.
Au5	ecz	✓ Добра инхибиторна активност на формирање пиоцијанина. ✓ Инхибира раст <i>C. glabrata</i> ✓ Није интеркалирајући агенс. ✓ У присуству eos Y везује се за домен I и субдомен IIa у BSA.
Au6	tcz	✓ Добра инхибиторна активност на формирање пиоцијанина. ✓ Инхибира раст <i>C. glabrata</i> (MIC = 0,4 μM), показујући 6,1 пута бољу инхибиторну активност у односу на tcz лиганд. ✓ Интеркалативно се везује за ct-DNA. ✓ У присуству eos Y везује се за домен I и субдомен IIa у BSA.
		✓ Побољшана антифунгална активност. ✓ Квадратно-планарна геометрија.
Au7	vcz	✓ Инхибира раст <i>C. glabrata</i>, <i>C. krusei</i> и <i>C. auris</i> показујући 7,5, 21,4 и 30 пута бољу инхибиторну активност у односу на vcz лиганд. ✓ Већа токсичност према фибробластима плућа (MRC-5) у односу на vcz. ✓ Велика вредност индекса селективности (1075) према <i>C. parapsilosis</i>. ✓ У присуству eos Y везује се за домен I и субдомен IIa у BSA.
Au8	mcz	✓ Инхибира производњу пиоцијанина. ✓ Боља антибактеријска активност према <i>P. aeruginosa</i>, <i>E. coli</i> и <i>S. aureus</i> MRSA у односу на mcz лиганд. ✓ Боља антифунгална активност према испитиваним <i>Candida</i> сојевима у односу на mcz (2 до 9,7 пута).

Резултати у оквиру ове дисертације су од значаја у медицинској неорганској и координационој хемији јер омогућавају боље разумевање хемијских и биолошких особина комплекса сребра(I), бакра(II) и злата(III). Добијени резултати се могу применити за синтезу и дизајн комплекса метала са азолима у циљу проналажења нових антифунгалних агенаса, који имају другачији механизам деловања и могућност превазилажења појаве резистентности у односу на клинички коришћене лекове.

6. ЛИТЕРАТУРА

1. F. M. Garibotto, A. D. Garro, M. F. Masman, A. M. Rodriguez, P. G. Luiten, M. M. Raimondi, S. A. Zacchino, C. Somlai, B. Penke, R. D. Enriz, *Bioorg. Med. Chem.* **18** (2010) 158.
2. H. E. O'Brien, J. L. Parrent, J. A. Jackson, J. M. Moncalvo, R. Vilgalys, *Appl. Environ. Microbiol.* **71** (2005) 5544.
3. J. Kaur, C. J. Nobile, *Curr. Opin. Microbiol.* **71** (2023) 102237.
4. K. Kainz, M. A. Bauer, F. Madeo, D. Carmona-Gutierrez, *Microb. Cell* **7** (2020) 143.
5. S. Nami, A. Aghebati-Maleki, H. Morovati, L. Aghebati-Maleki, *Biomed. Pharmacother.* **110** (2019) 857.
6. G. D. Brown, D. W. Denning, N. A. R. Gow, S. M. Levitz, M. G. Netea, T. C. *Sci. Transl. Med.* **4** (2012) 165rv13.
7. R. Pérez-Torrado, A. Querol, *Front. Microbiol.* **6** (2016) 1522.
8. M. A. Pfaller, D. J. Diekema, *Clin. Microbiol. Rev.* **20** (2007) 133.
9. L. Ostrosky-Zeichner, A. Casadevall, J. N. Galgiani, F. C. Odds, J. N. Rex, *Nat. Rev. Drug. Discov.* **9** (2010) 719.
10. L. Mukaremera, K. K. Lee, H. M. Mora-Montes, N. A. R. Gow, *Front. Immunol.* **8** (2017) 1.
11. J. Talapko, M. Juzbašić, T. Matijević, E. Pustijanac, S. Bekić, I. Kotris, I. Škrlec, *J. Fungi* **7** (2021) 79.
12. H. O. J. Morad, A.-M. Wild, S. Wiehr, G. Davies, A. Maurer, B. J. Pichler, C. R. Thornton, *Front. Microbiol.* **9** (2018) 1996.
13. S. Bhattacharya, S. Sae-Tia, B. C. Fries, *Antibiotics* **9** (2020) 312.
14. J. D. Sobel, *Curr. Infect. Dis. Rep.* **8** (2006) 427.
15. F. Bongomin, S. Gago, R. O. Oladele, D. W. Denning, *J. Fungi* **3** (2017) 57.
16. D. Z. P. Friedman, I. S. Schwartz, *J. Fungi* **5** (2019) 67.
17. G. Wall, J. L. Lopez-Ribot, *Antibiotics* **9** (2020) 445.
18. D. W. Denning, *Lancet Infect. Dis.* **24** (2024) e428.
19. J. A. Cortés, I. F. Corrales, *Fungal Infection* (2018).
20. A. Czyrski, M. Resztak, P. Swiderski, J. Brylak, F. K. Głowska, *Pharmaceutics* **13** (2021) 1961.
21. Y. Cortat, F. Zobi, *Pharmaceutics* **15** (2023) 2398.
22. A. Silvestre de Sousa, D. Vermeij, A. N. Ramos Jr, A. O. Luquetti, *Lancet* **403** (2024) 203.
23. A. R. de Arias, C. Monroy, F. Guhl, S. Sosa-Estani, W. S. Santos, F. Abad-Franch, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **117** (2022) e210130.
24. M. P. Barrett, R. J. Burchmore, A. Stich, J. O. Lazzari, A. C. Frasch, J. J. Cazzulo, S. Krishna, *Lancet* **362** (2003) 1469.
25. M. Odiit, F. Kansime, J. C. Enyaru, *East. Afr. Med. J.* **74** (1997) 792.
26. V. K. B. K. Mesu, W. M. Kalonji, C. Bardonneau, O. V. Mordt, S. Blesson, F. Simon, S. Delhomme, S. Bernhard, W. Kuziena, J.-P. F. Lubaki, S. L. Vuvu, P. N. Ngima, H. M. Mbembo, M. Ilunga, A. K. Bonama, J. A. Heradi, J. L. L. Solomo, G. Mandula, L. K. Badibabi, F. R. Dama, P. K. Lukula, D. N. Tete, C. Lumbala, B. Scherrer, N. Strub-Wourgaft, A. Tarral, *Lancet* **391** (2018) 144.
27. D. Pace, *J. Infect.* **69** (2014) 69 Suppl 1.
28. D. Steverding, *Parasites Vectors* **10** (2017) 82.
29. J. Talapko, I. Škrlec, T. Alebić, M. Jukić, A. Včev, *Microorganisms* **7** (2019) 179.
30. T. Coque, D. W. Graham, A. Pruden, A. So, E. Topp, United Nations Environment Programme, Bracing for superbugs: strengthening environmental action in the One Health response to antimicrobial resistance, (2023).

31. J. O'Neill, *Antimicrobial resistance: tackling a crisis for the health and wealth of nations*, London: Review on Antimicrobial Resistance (2014).
32. M. L. Rodrigues, J. D. Nosanchuk, *PloS. Negl. Trop. Dis.* **17** (2023) e0011136.
33. P. T. McKenry, T. A. Nessel, P. M. Zito, *Antifungal Antibiotics* (2023).
34. G. Brewer, *Nat. Rev. Cancer* **22** (2022) 659.
35. *WHO Report on Cancer: Setting priorities, investing wisely and providing care for all*; by World Health Organization: Geneva, Switzerland, (2020).
36. Y. Lin, H. Betts, S. Keller, K. Cariou, G. Gasser, *Chem. Soc. Rev.* **50** (2021) 10346.
37. K. C. Howard, E. K. Dennis, D. S. Watt, S. Garneau-Tsodikova, *Chem Soc Rev.* **49** (2020) 2426.
38. J. Houšť, J. Spížek, V. Havlíček, *Metabolites* **10** (2020) 106.
39. A. Lemke, A. F. Kiderlen, O. Kayser, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **68** (2005) 151.
40. R. J. Hamil, *Drugs* **73** (2013) 919.
41. T. Brautaset, H. Sletta, K. F. Degnes, O. N. Sekurova, I. Bakke, O. Volokhan, T. Andreassen, T. E. Ellingsen, S. B. Zotchev, *Appl. Environ. Microb.* **77** (2011) 6636.
42. A. Patil, S. Majumdar, A. Patil, S. Majumdar, *J. Pharm. Pharmacol.* **69** (2017) 1635.
43. P. Vandeputte, S. Ferrari, A. T. Coste, *Int. J. Microbiol.* **2012** (2012) 713687.
44. K. M. Pianalto, J. A. Alspaugh, *J. Fungi* **2** (2016) 26.
45. R. Diasio, J. Bennett, C. Myers, *Biochem. Pharmacol.* **27** (1978) 703.
46. D. H. Halat, S. Younes, N. Mourad, M. Rahal, *Membranes* **12** (2022) 1171.
47. D. Sanglard, A. T. Coste, S. Ferrari, *FEMS Yeast Res.* **9** (2009) 1029.
48. J. A. Maertens, *Clin. Microbiol. Infect.* **10** (2004) 1.
49. M. M. Teixeira, D. T. Carvalho, E. Sousa, E. Pinto, *Pharmaceuticals*, **15** (2022) 1427.
50. A. Kuznetsov, *Introductory Chapter: Azoles, Their Importance, and Applications*; IntechOpen: London, UK (2021).
51. Preeti, K. N. Singh, *Org. Biomol. Chem.* **16** (2018) 9084.
52. D. W. Woolley, *J. Biol. Chem.* **152** (1944) 225.
53. M. Shafiei, L. Peyton, M. Hashemzadeh, A. Foroumadi, *Bioorg. Chem.* **104** (2020) 104240.
54. C. O. Wilson, O. Gisvold, J. H. Block, J. M. Beale, *Wilson and Gisvold's textbook of organic medicinal and pharmaceutical chemistry*, 11th ed., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, (2004).
55. M. K. Kathiravan, A. B. Salake, A. S. Chothe, P. B. Dudhe, R. P. Watode, M. S. Mukta, S. Gadhwe, *Bioorg. Med. Chem.* **20** (2012) 5678.
56. R. A. Fromtling, *Clin. Microbiol. Rev.* **1** (1988) 187.
57. A. W. Fothergill, *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* **4** (2006) 171.
58. G. E. Piérard, T. Hermanns-Lê, P. Delvenne, C. Piérard-Franchimont, *Expert Opin. Pharmacother.* **13** (2012) 1187.
59. P. R. Sawyer, R. N. Brogden, R. M. Pinder, T. M. Speight, G. S. Avery, *Drugs* **9** (1975) 406.
60. J. Heeres, L. Meerpoel, P. Lewi, *Molecules* **15** (2010) 4129.
61. F. R. Taylor, R. J. Rodriguez, L. W. Parks, *Antimicrob. Agents Chemother.* **23** (1983) 515.
62. K. Thevissen, K. R. Ayscough, A. M. Aerts, W. Du, K. De Brucker, E. M. K. Meert, J. Ausma, M. Borgers, B. P. A. Cammue, I. E. J. A. François, *J. Biol. Chem.* **282** (2007) 21592.
63. E. M. Johnson, M. D. Richardson, D. W. Warnock, *J. Antimicrob. Chemother.* **13** (1984) 547.
64. G. Liamis, M. Elisaf, *Hyponatremia* **4** (2013) 111.
65. J. F. Ryley, R. G. Wilson, K. J. Barrett-Bee, *J. Med. Vet. Mycol.* **22** (1984) 53.
66. M. A. Ghannoum, L. B. Rice, *Clin. Microbiol. Rev.* **12** (1999) 501.
67. D. Thienpont, J. Van Cutsem, J. M. Van Nueten, C. J. E. Niemegeers, R. Marsboom, *Arzneim.-Forsch.* **25** (1975) 224.

68. S. Cogswell, S. Berger, D. Waterhouse, M. B. Bally, E. K. Wasan, *Pharm. Res.* **23** (2006) 2575.
69. A. Najid, M. H. Ratinaud, *Tumori.* **77** (1991) 385.
71. H. T. Chang, C. S. Liu, C. T. Chou, C. H. Hsieh, C. H. Chang, W. C. Chen, S. I. Liu, S. S. Hsu, J. S. Chen, B. P. Jiann, J. K. Huang, C. R. Jan, *Human. Exp. Toxicol.* **24** (2005) 453.
72. J. K. Huang, C. S. Liu, C. T. Chou, S. I. Liu, S. S. Hsu, H. T. Chang, C. H. Hsieh, C. H. Chang, W. C. Chen, C. R. Jan, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **32** (2005) 735.
73. Y. S. Ho, C. H. Wu, H. M. Chou, Y. J. Wang, H. Tseng, C. H. Chen, L. C. Chen, C. H. Lee, S. Y. Lee, *Food Chem. Toxicol.* **43** (2005) 1483.
74. Y.-G. Na, H. W. Huh, M.-K. Kim, J.-J. Byeon, M.-G. Han, H.-K. Lee, C.-W. Cho, *Acta Biomaterialia* **101** (2020) 507.
75. S. P. Clissold, R. C. Heel, *Drugs* **31** (1986) 29.
76. A. J. Carrillo-Muñoz, C. Tur-Tur, J. M. Hernández-Molina, P. Santos, D. Cárdenes, G. Giusiano, *Rev. Iberoam. Micol.* **27** (2010) 49.
77. R. F. Ribeiro, M. H. Motta, A. P. G. Härter, F. C. Flores, R. C. R. Beck, S. R. Schaffazick, C. de Bona da Silva, *Mat. Sci. Eng: C* **59** (2016) 875.
78. Y. M. Clayton, R. J. Hay, D. H. McGibbon, R. J. Pye, *Clin. Exp. Dermatology*, **7** (1982) 543.
79. P. D. Crowley, H. C. Gallagher, *J. Appl. Microbiol.* **117** (2014) 611.
80. D. R. Eaton, R. G. Wilkins, *J. Biol. Chem.* **253** (1978) 908.
81. D. Eaton, K. Wilson, *J. Inorg. Biochem.* **10** (1979) 195.
82. E. L. Eliel, S. H. Wilen, L. N. Mander, *Stereochemistry of organic compounds*, New York: John Wiley and Sons (1994).
83. P. R. Sawyer, R. N. Brogden, R. M. Pinder, T. M. Speight, G. S. Avery, *Drugs* **9** (1975) 424.
84. I. Kyriakidisa, A. Tragiannidisa, S. Munchenb, A. H. Grollc, *Expert Opin. Drug Saf.* **16** (2017) 149.
85. L. Willems, R. van der Geest, K. de Beule, *J. Clin. Pharm. Ther.* **26** (2001) 159.
86. L. R. Peyton, S. Gallagher, M. Hashemzadeh, *Drugs Today* **51** (2015) 705.
87. H. Zhou, M. Goldman, J. Wu, R. Woestenborghs, A. E. Hassell, P. Lee, A. Baruch, L. Pesco-Koplowitz, J. Borum, L. J. Wheat, *J. Clin. Pharmacol.* **38** (1998) 593.
88. J. S. Hostetler, L. H. Hanson, D. A. Stevens, *Antimicrob. Agents. Chemother.* **36** (1992) 477.
89. S. M. Grant, S. P. Clissold, *Drugs* **37** (1989) 310.
90. J. Heykants, A. Van Peer, V. Van de Velde, P. Van Rooy, W. Meuldermans, K. Lavrijsen, R. Woestenborghs, J. Van Cutsem, G. Cauwenbergh, *Mycoses* **32** (1989) 67.
91. W. Graninger, M. Diab-Elschahawi, E. Presterl, *Clinically Relevant Mycoses* (2019).
92. J. C. R. Correa, H. R. Nunes Salgado, *Crit. Rev. Anal. Chem.* **41** (2011) 124.
93. C. Lass-Flörl, *Drugs* **71** (2011) 2405.
94. S. Pathadka, V. K. C. Yan, C. F. Neoh, D. Al-Badriyeh, D. C. M. Kong, M. A. Slavin, B. J. Cowling, I. F. N. Hung, I. C. K. Wong, E. W. Chan, *Drugs* **82** (2022) 1193.
95. M. Zervos, F. Meunier, *Int. J. Antimicrob. Ag.* **3** (1993) 147.
96. M. Cavling Arendrup, T. F. Patterson, *J. of Inf. Dis.* **216** (2017) S445.
97. L. E. Cowen, D. Sanglard, S. J. Howard, P. D. Rogers, D. S. Perlin, *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **8** (2004) 69.
98. N. Fattouh, D. Hdayed, G. Geukgeuzian, S. Tokajian, R. A. Khalaf, *Fungal. Genet. Biol.* **153** (2021) 103575.
99. L. de Almeida Campos, M. Taise Fin, K. S. Santos, M. W. de Lima Gualque, A. K. Lima Freire Cabral, N. Maissar Khalil, A. M. Fusco-Almeida, R. M. Mainardes, M. José Soares Mendes-Giannini, *Pharmaceutics* **15** (2023) 266.

100. E. K. Manavathu, J. L. Cutright, P. H. Chandrasekar, *Antimicrob. Agents Chemother.* **42** (1998) 3018.
101. A. L. Barry, S. D. Brown, *Antimicrob. Agents Chemother.* **40** (1996) 1948.
102. M. A. Pfaller, D. J. Diekema, R. N. Jones, H. S. Sader, A. C. Fluit, R. J. Hollis, S. A. Messer, *J Clin Microbiol*, **39** (2001) 3254.
104. K. L. Oakley, C. B. Moore, D. W. Denning, *J. Antimicrob. Chemoth.* **42** (1998) 91.
105. J. P. Donnelly, B. E. De Pauw, *Clin. Microbiol. Infect.* **Suppl 1** (2004) 107.
106. A. J. Carrillo, J. Guarro, *Antimicrob. Agents Chemother.* **45** (2001) 2151.
107. A. Espinel-Ingroff, *J. Clin. Microbiol.* **39** (2001) 954.
108. H. F. Salem, R. M. Kharshoum, L. F. Abdel Hakim, M. E. Abdelrahim, *J. Liposome Res.* **26** (2016) 324.
109. L. Cheng, R. Xiang, F. Liu, Y. Li, H. Chen, P. Yao, F. Sun, P. Xia, *Int. Immunopharmacol.* **78** (2020) 106078.
110. M. Resztak, K. Kosicka, P. Zalewska, J. Krawiec, F. K. Głowska, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **178** (2020) 112952.
111. U. Theuretzbacher, F. Ihle, H. Derendorf, *Clin. Pharmacokinet.* **45** (2006) 649.
112. M. T. Levine, P. H. Chandrasekar, *Clin. Transplant.* **11** (2016) 1377.
113. A. Musayeva, J. C. Riedl, A. K. Schuster, J. Wasielica-Poslednik, N. Pfeiffer, A. Gericke, *Cornea* **39** (2020) 986.
114. S. C. Li, S. L. Wu, W. J. Gong, P. Cao, X. Chen, W. Liu, L. Xiang, Y. Wang, J. G. Huang, *Front. Pharmacol.* **12** (2021) 730826.
115. M. J. P. Geist, G. Egerer, J. Burhenne, K.-D. Riedel, J. Weiss, G. Mikus, *J. Antimicrob. Chemother.* **68** (2013) 2592.
116. S. W. Lee, J. Oh, A. H. J. Kim, S. C. Ji, S. I. Park, S. H. Yoon, J. Y. Chung, K. S. Yu, I. J. Jang, S. H. Lee, *Pharmacogenomics Journal* **20** (2020) 792.
117. G. Mikus, I. M. Scholz, J. Weiss, *Pharmacogenomics* **12** (2011) 861.
118. Y. Xing, L. Chen, Y. Feng, Y. Zhou, Y. Zhai, J. Li, *BMC Infect Dis.* **17** (2017) 798.
119. E. Alessio, *Bioinorganic Medicinal Chemistry*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, (2011).
120. M. A. Zoroddu, J. Aaseth, G. Crisponi, S. Medici, M. Peana, V. M. Nurchi, *J. Inorg. Biochem.* **195** (2019) 120.
121. A. Frei, *Antibiotics* **9** (2020) 90.
122. Z. Jiang, Q. You, X. Zhang, *Eur. J. Med. Chem.* **165** (2019) 172.
- 123 U. Ndagi, N. Mhlongo, M. E. Soliman, *Drug Des. Devel. Ther.* **11** (2017) 599.
124. S. J. Berners-Price, A. Filipovska, *Metallomics* **3** (2011) 863.
125. J. A. R. Salvador, S. A. C. Figueiredo, R. M. A. Pinto, S. M. Silvestre, *Future Med. Chem.* **4** (2012) 1495.
126. M. Alda, *Mol. Psychiatry* **20** (2015) 661.
127. E. J. Anthony, E. M. Bolitho, H. E. Bridgewater, O. W. L. Carter, J. M. Donnelly, C. Imberti, E. C. Lant, F. Lermite, R. J. Needham, M. Palau, P. J. Sadler, H. Shi, F.-X. Wang, W.-Y. Zhang, Z. Zhang, *Chem. Sci.* **11** (2020) 12888.
128. J. Frei, A. G. Zuegg, M. Elliott, S. Baker, C. Braese, F. Brown, C. G. Chen, G. Dowson, N. Dujardin, A. P. Jung, A. M. King, M. Mansour, J. Massi, H. A. Moat, A. K. Mohamed, P. J. Renfrew, P. J. Rutledge, M. H. Sadler, C. E. Todd, J. J. Willans, M. A. Cooper, M. A. T. Blaskovich, *Chem. Sci.* **11** (2020) 2627.
129. B. Đ. Glišić, M. I. Djuran, *Dalton Trans.* **43** (2014) 5950.

130. C. N. Morrison, K. E. Prosser, R. W. Stokes, A. Cordes, N. Metzler-Nolte, S. M. Cohen, *Chem. Sci.* **11** (2020) 1216.
131. S. Medici, M. Peana, V. M. Nurchi, J. I. Lachowicz, G. Crisponi, M. A. Zoroddu, *Coord. Chem. Rev.* **284** (2015) 329.
132. H. F. A. El-Halim, F. A. Nour El-Dien, G. G. Mohamed, N. A. Mohamed, *J. Therm. Anal. Calorim.* **109** (2012) 883.
133. P. V. Simpson, C. Nagel, H. Bruhn, U. Schatzschneider, *Organometallics* **34** (2015) 3809.
134. J. Kljun, A. J. Scott, T. Lanišnik Rižner, J. Keiser, I. Turel, *Organometallics* **33** (2014) 1594.
135. K. Stryjska, L. Radko, L. Chęcińska, J. Kusz, A. Posyniak, J. Ochocki, *Int. J. Mol. Sci.* **21** (2020) 3629.
136. K. Stryjska, I. Korona-Glowniak, L. Chęcińska, J. Kusz, J. Ochocki, *Int. J. Mol. Sci.* **22** (2021) 1510.
137. M. Stanković, J. Kljun, N. Lj. Stevanović, J. Lazic, S. Skaro Bogojevic, S. Vojnovic, M. Zlatar, J. Nikodinovic-Runic, I. Turel, M. I. Djuran, B. Đ. Glišić, *Dalton Trans.* **53** (2024) 2218.
138. M. Stanković, S. Skaro Bogojevic, J. Kljun, N. Lj. Stevanović, Ž. Milanović, J. Lazic, S. Vojnovic, I. Turel, M. I. Djuran, B. Đ. Glišić, *J. Mol. Struct.* **1321** (2025) 140118.
139. C. Crisóstomo-Lucas, P. García-Holley, S. Hernández-Ortega, F. Sánchez-Bartéz, I. Gracia-Mora, N. Barba-Behrens, *Inorg. Chim. Acta* **438** (2015) 245.
140. C. Crisostomo-Lucas, R. Navarro-Peñaloza, N. Ortiz-Pastrana, F. Sanchez-Bartez, I. Gracia-Mora, N. Barba-Behrens, N. Synthesis, *J. Mex. Chem. Soc.* **62** (2018) 225.
141. T. Gagini, L. Colina-Vegas, W. Villarreal, L. P. Borba-Santos, P. C. de Souza, A. A. Batista, M. K. Fleury, W. de Souza, S. Rozental, L. A. S. Costa, *New J. Chem.* **42** (2018) 13641.
142. V. Midlej, F. Rubim, W. Villarreal, É. S. Martins-Duarte, W. Navarro M, de Souza, M. Benchimol, *Parasitology* **146** (2019) 1206.
143. J. A. de Azevedo-França, L. P. Borba-Santos, G. de Almeida Pimentel, C. H. J. Franco, C. Souza, J. de Almeida Celestino, E. F. de Menezes, N. P. dos Santos, E. G. Vieira, A. M. D. C. Ferreira, W. de Souza, S. Rozental, M. Navarro, *J. Inorg. Biochem.* **219** (2021) 111401.
144. R. A. Sanchez-Delgado, K. Lazard, L. Rincon, J. A. Urbina, A. J. Hubert, A. N. Noels, *J. Med. Chem.* **36** (1993) 2041.
145. M. Navarro, T. Lehmann, E. J. Cisneros-Fajardo, A. Fuentes, R. A. Sánchez-Delgado, P. Silva, J. A. Urbina, *Polyhedron* **19** (2000) 2319.
146. L. Colina-Vegas, K. M. Oliveira, B. N. Cunha, M. R. Cominetti, M. Navarro, A. Azevedo Batista, *Inorganics* **6** (2018) 13.
147. A. Martínez, T. Carreon, E. Iniguez, A. Anzellotti, A. Sánchez, M. Tyan, A. Sattler, L. Herrera, R. A. Maldonado, R. A. Sánchez-Delgado, *J. Med. Chem.* **55** (2012) 3867.
148. M. Soba, G. Scalese, F. Casuriaga, N. Pérez, N. Veiga, G. A. Echeverría, O. E. Piro, R. Faccio, L. Pérez-Díaz, G. Gasser, I. Machado, D. Gambino, *Dalton Trans.* **52** (2023) 1623.
149. J. A. de Azevedo-França, R. Granado, S. T. D. M. Silva, G. dos Santos-Silva, S. Scapin, L. P. Borba-Santos, S. Rozental, W. de Souza, S. Martins-Duarte Érica, E. Barrias, M. Navarro, *Antimicrob. Agents Chemother.* **64** (2020) e01919.
150. L. Zhang, Y. Ling, M. Du, *Inorg. Chim. Acta* **360** (2007) 3182.
151. S. Guo, W. Yang, M. Zhao, R. Tian, B. Zhang, Y. Qi, *Molecules* **23** (2018) 1122.
152. Y.-M. Zhao, G.-M. Tang, Y.-T. Wang, Y.-Z. Cui, *J. Coord. Chem.* **70** (2017) 189.
153. Y.-M. Zhao, G.-M. Tang, Y.-T. Wang, Y.-Z. Cui, S. Weng Ng, *Journal of Solid State Chemistry*, **259** (2018) 18.
154. M. Stanković, S. Skaro Bogojevic, J. Kljun, Ž. Milanović, N. Lj. Stevanović, J. Lazic, S. Vojnovic, I. Turel, M. I. Djuran, B. Đ. Glišić, *J. Inorg. Biochem.* **256** (2024) 112572.

155. B. Đ. Glišić, L. Senerovic, P. Comba, H. Wadehohl, A. Veselinovic, D. R. Milivojevic, M. I. Djuran, J. Nikodinovic-Runic, *J. Inorg. Biochem.* **155** (2016) 115.
156. B. Waržajtis, B. Đ. Glišić, N. S. Radulović, U. Rychlewska, M. I. Djuran, *Polyhedron* **79** (2014) 221.
157. Oxford Diffraction Ltd, *CrysAlis PRO*, Yarnton, Oxfordshire, England (2011).
158. O. V. Dolomanov, L. J. Bourhis, R. J. Gildea, J. A. K. Howard, H. Puschmann, *J. Appl. Crystallogr.* **42** (2009) 339.
159. G. M. Sheldrick, *SHELXL2018/3*; University of Göttingen, Germany (2018).
160. C. F. Macrae, P. R. Edgington, P. McCabe, E. Pidcock, G. P. Shields, R. Taylor, M. Towler, J. van de Streek, *J. Appl. Crystallogr.* **39** (2006) 453.
161. CrysAlisPro, Agilent Technologies UK Ltd., Oxford, UK, 2011–2014, and Rigaku Oxford Diffraction, Rigaku Polska Sp.z o.o., Wrocław, Poland, 2015–2019.
162. R. H. Blessing, *Acta Crystallogr. Sect. A Found. Crystallogr.* **51** (1995) 33.
163. SCALE3 ABSPACK CrysAlisPro, Agilent Technologies UK Ltd., Oxford, UK, 2011–2014, and Rigaku Oxford Diffraction, Rigaku Polska Sp.z o.o., Wrocław, Poland, 2015–2019.
164. L. Palatinus, SUPERFLIP, EPF Lausanne, Switzerland, 2007–2014, and Fyzikální ústav AV ČR, v. v. i., Prague, Czech Republic.
165. L. Palatinus, G. Chapuis, *J. Appl. Crystallogr.* **40** (2007) 786.
166. G. M. Sheldrick, SHELXL–20xx, University of Göttingen and Bruker AXS GmbH, Karlsruhe, Germany (2012).
167. W. Robinson, G. M. Sheldrick, N. W. Isaaks, M. R. Taylor (Eds.), *Crystallographic Computing 4*, Ch. 22, IUCr and Oxford University Press, Oxford, United Kingdom (1988).
168. G. M. Sheldrick, *Acta Crystallogr. Sect. A* **64** (2008) 112.
169. G. M. Sheldrick, *Acta Crystallogr. Sect. C Cryst. Struct. Commun.* **71** (2015) 3.
170. A. Thorn, B. Dittrich, G. M. Sheldrick *Acta Crystallogr. Sect. A Found. Crystallogr.* **68** (2012) 448.
171. I. J. Bruno, J. C. Cole, P. R. Edgington, M. Kessler, C. F. Macrae, P. McCabe, J. Pearson, R. Taylor, *Acta Crystallogr. Sect. B Struct. Sci.* **58** (2002) 389.
172. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, EUCAST Antifungal MIC Method for yeasts, v 7.3.1.
173. CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute. *Methods For Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically*; Approved Standard —Tenth Edition M07-A10.
174. D. Milivojevic, N. Šumonja, S. Medić, A. Pavic, I. Moric, B. Vasiljevic, L. Senerovic, J. Nikodinovic-Runic, *Pathog. Dis.* **76** (2018) fty041.
175. T. P. Andrejević, D. Milivojevic, B. Đ. Glišić, J. Kljun, N. Lj. Stevanović, S. Vojnovic, S. Medic, J. Nikodinovic-Runic, I. Turel, M. I. Djuran, *Dalton Trans.* **49** (2020) 6084.
176. V. Ajdačić, L. Senerovic, M. Vranić, M. Pekmezovic, V. Arsic-Arsnijevec, A. Veselinovic, J. Veselinovic, B. A. Šolaja, J. Nikodinovic-Runic, I. M. Opsenica, *Bioorg. Med. Chem.* **24** (2016) 1277.
177. Á. Jakab, S. Mogavero, T. M. Förster, M. Pekmezovic, N. Jablonowski, V. Dombradi, I. Pócsi, B. Hube, *Microbiology* **162** (2016) 2116.
178. M. B. Hansen, S. E. Nielsen, K. Berg, *J. Immunol. Methods* **119** (1989) 203.
179. B. S. R. Mohamed, M. Subramanian, K. P. Shunmugiah, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **98** (2014) 6775.
180. C. G. Pierce, P. Uppuluri, A. R. Tristan, F. L. Wormley Jr., E. Mowat, G. Ramage, J. L. Lopez-Ribot, *Nat. Protoc.* **3** (2008) 1494.

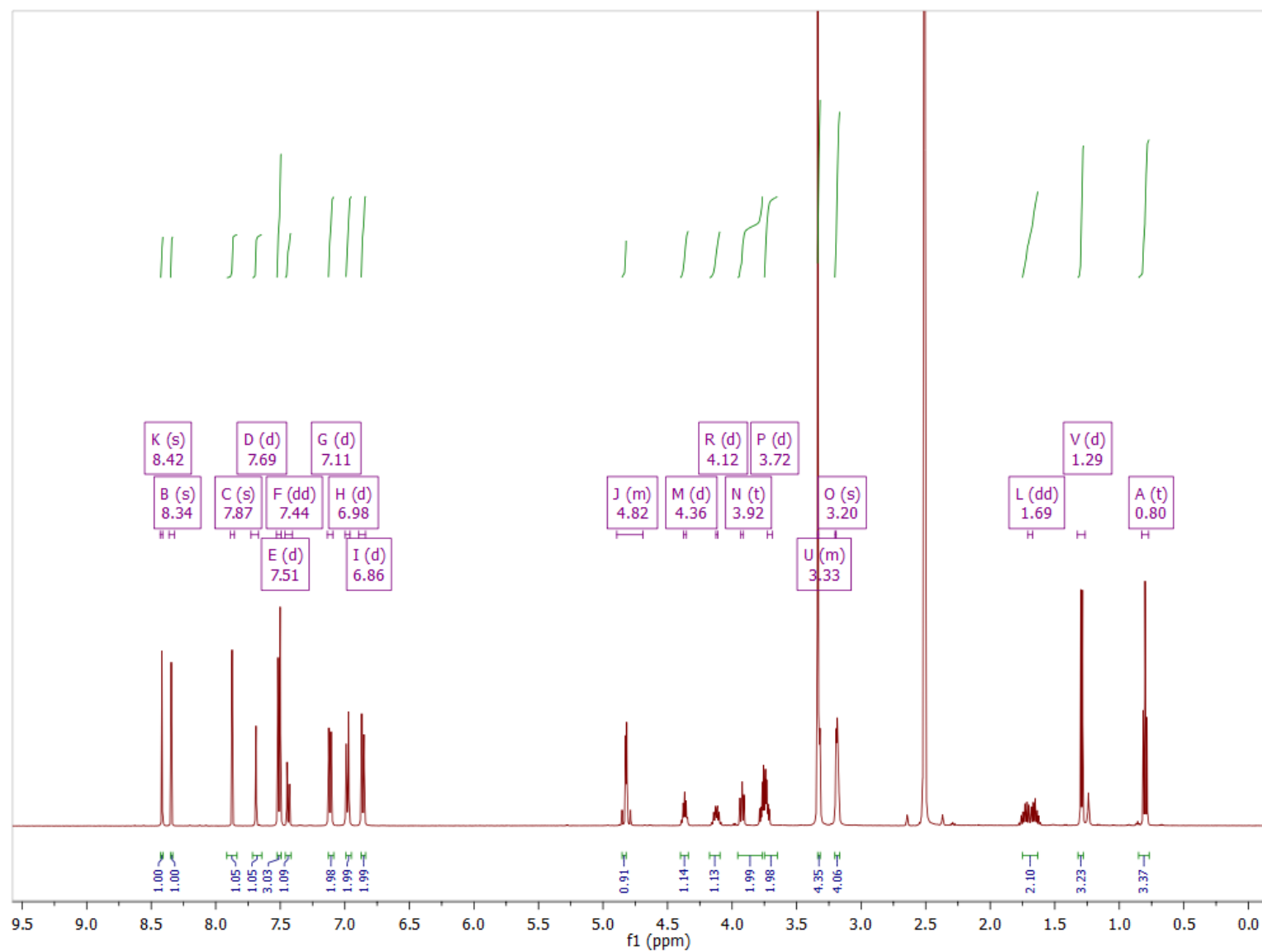
181. B. A. Arthington-Skaggs, H. Jradi, T. Desai, C. J. Morrison, *J. Clin. Microbiol.* **37** (1999) 3332.
182. K. H. McClean, M. K. Winson, L. Fish, A. Taylor, S. R. Chhabra, M. Camara, M. Daykin, J. H. Lamb, S. Swift, B. W. Bycroft, G. S. A. B. Stewart, P. Williams, *Microbiology* **143** (1997) 3703.
183. I. Aleksić, S. Šegan, F. Andrić, M. Zlatović, I. Moric, D. M. Opsenica, L. Senerovic, *ACS Chem. Biol.* **12** (2017) 1425.
184. C. T. O'Loughlin, L. C. Miller, A. Siryaporn, K. Drescher, M. F. Semmelhack, B. L. Bassler, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110** (2013) 17981.
185. OECD, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Test No. **236** (2013).
186. A. Pavic, N. D. Savić, B. Đ. Glišić, A. Crochet, S. Vojnovic, A. Kurutos, D. M. Stanković, K. M. Fromm, J. Nikodinovic-Runic, M. I. Djuran, *J. Inorg. Biochem.* **195** (2019) 149.
187. K. M. Brothers, R. T. Wheeler, *J. Vis. Exp.* **65** (2012) e4051.
- 188 Y.-Q. Wang, H.-M. Zhang, G.-C. Zhang, W.-H. Tao, S.-H. Tang, *J. Lumin.* **126** (2007) 211.
189. R. Bera, B. K. Sahoo, K. S. Ghosh, S. Dasgupta, *Int. J. Biol. Macromol.* **42** (2008) 14.
190. A. Wolfe G. H. Shimer, Jr, T. Meehan, *Biochemistry* **26** (1987) 6392.
191. G. te Velde, F. M. Bickelhaupt, E. J. Baerends, C. Fonseca Guerra, S. J. A. van Gisbergen, J. G. Snijders, T. Ziegler, *J. Comput. Chem.* **22** (2001) 931.
192. R. Rüger, M. Franchini, T. Trnka, A. Yakovlev, E. van Lenthe, P. Philipsen, T. van Vuren, B. Klumpers, T. Soini, AMS 2024.1, SCM, Theoretical Chemistry, Vrije Universiteit, Amsterdam, The Netherlands.
193. E. van Lenthe, E. J. Baerends, J. G. Snijders, *J. Chem. Phys.* **101** (1994) 9783.
194. C. van Wüllen, *J. Chem. Phys.* **109** (1998) 392.
195. J. C. Slater, *Phys. Rev.* **81** (1951) 385.
196. S. H. Vosko, L. Wilk, M. Nusair, *Can. J. Phys.* **58** (1980) 1200.
197. A. Klamt, G. Schüürmann, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* (1993) 799.
198. A. Klamt, *J. Phys. Chem.* **99** (1995) 2224.
199. Y. P. Li, J. Gomes, S. M. Sharada, A. T. Bell, M. Head-Gordon, *J. Phys. Chem. C* **119** (2015) 1840.
200. S. Grimme, *Chem. Eur. J.* **18** (2012) 9955.
201. J. Tao, J. P. Perdew, V. N. Staroverov, G. E. Scuseria, *Phys. Rev. Lett.* **91** (2003) 146401.
202. V. N. Staroverov, G. E. Scuseria, J. Tao, J. P. Perdew, *J. Chem. Phys.* **119** (2003) 12129.
203. E. Caldeweyher, S. Ehlert, A. Hansen, H. Neugebauer, S. Spicher, C. Bannwarth, S. Grimme, *J. Chem. Phys.* **150** (2019) 154122.
204. R. L. Martin, *J. Chem. Phys.* **118** (2003) 4775.
205. F. M. Bickelhaupt and E. J. Baerends, in Reviews in computational chemistry, eds. K. B. Lipkowitz and D. B. Boyd, Wiley-VCH Verlag, 2000, vol. 15, pp. 1–86.
206. T. Ziegler, A. Rauk, *Theor. Chim. Acta* **46** (1977) 1.
207. T. Ziegler, A. Rauk, *Inorg. Chem.* **18** (1979) 1558.
208. F. L. Hirshfeld, *Theor. Chim. Acta* **44** (1977) 129.
209. L. Senerovic, M. D. Zivkovic, A. Veselinovic, A. Pavic, M. I. Djuran, S. Rajkovic, J. Nikodinovic-Runic, *J. Med. Chem.* **58** (2015) 1442.
210. E. A. Amin, D. G. Truhlar, *J. Chem. Theory Comput.* **4** (2008) 75.
211. G. Frison, G. A. Ohanessian, *J. Com. Chem.* **29** (2008) 416.
212. J. J. P. Stewart, *J. Mol. Model.* **13** (2007) 1173.
213. B. Đ. Glišić, J. Nikodinovic-Runic, T. Ilic-Tomic, H. Wadepohl, A. Veselinović, I. M. Opsenica, M. I. Djuran, *Polyhedron* **139** (2018) 313.

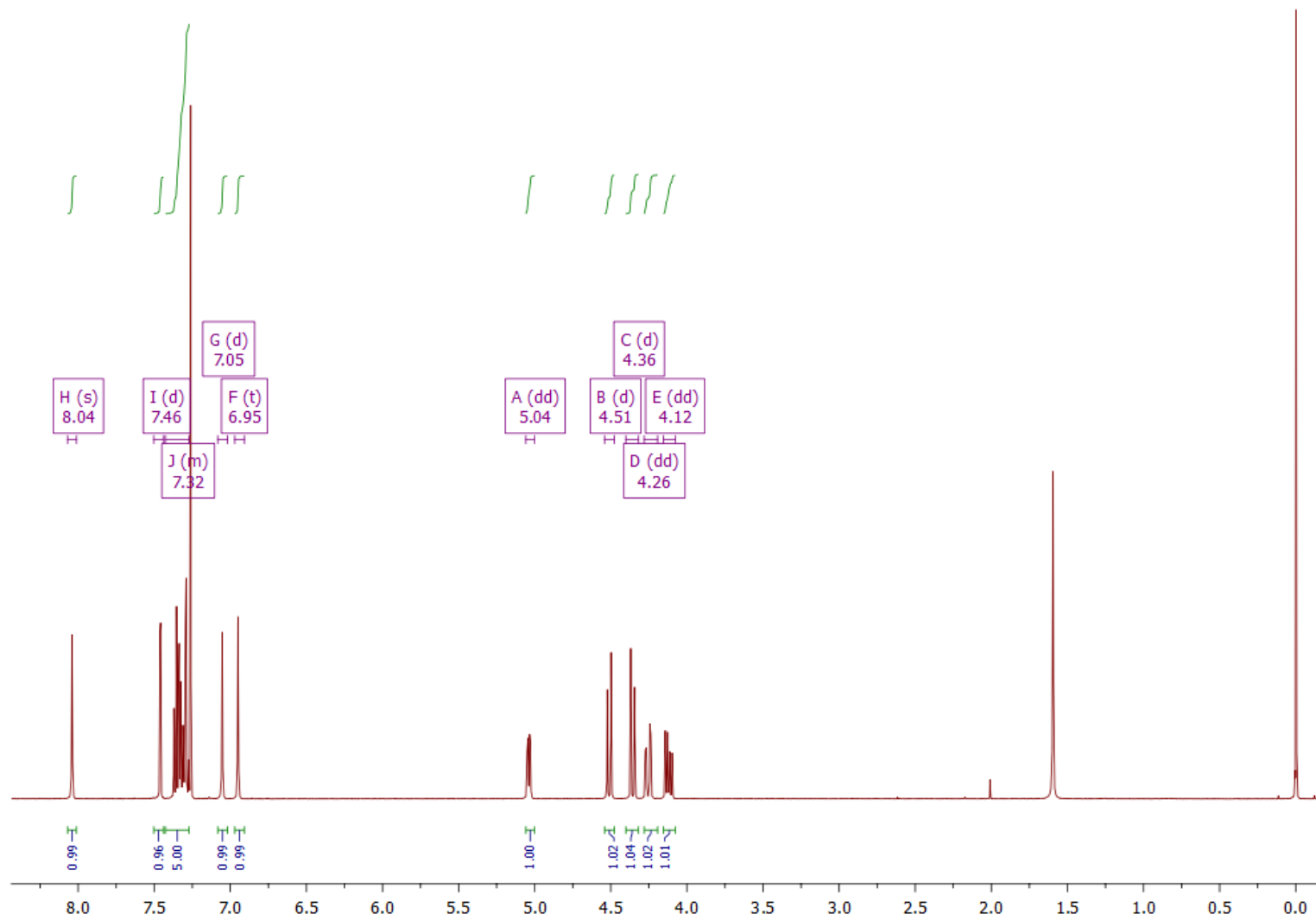
214. N. Lj. Stevanović, I. Aleksic, J. Kljun, S. Skaro Bogojevic, A. Veselinovic, J. Nikodinovic-Runic, I. Turel, M. I. Djuran, B. Đ. Glišić, *Pharmaceuticals* **14**(1) (2021) 24.
215. N. Lj. Stevanović, M. Stanković, T. P. Andrejević, D. P. Ašanin, I. M. Stanojević, B. Đ. Glišić, *1st International Conference on Chemo and BioInformatics, ICCBIKG 2021, Kragujevac, Serbia, October 2021, 26 – 27, page: 399-402; doi: 10.46793/ICCBI21.399S*
215. T. D. Cyr, B. A. Dawson, G. A. Neville, H. F. Shurvell, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **14** (1996) 247.
217. B. J. Hathaway, *Comprehensive Coordination Chemistry*; G. Wilkinson, R. D. Gillard, J. A. McCleverty, Eds.; Pergamon: Oxford, UK, 1987; Volume 5, pp. 533–774.
218. N. S. Drašković, D. D. Radanović, U. Rychlewska, B. Warżajtis, I. M. Stanojević, M. I. Djuran, *Polyhedron* **43** (2012) 185.
219. W. J. Geary, *Coord. Chem. Rev.* **7** (1971) 81.
220. I. Ali, W. A. Wani, K. Saleem, *Synth. React. Inorg. M.* **43** (2013) 1162.
221. B. Đ. Glišić, I. Aleksic, P. Comba, H. Wadepohl, T. Ilic-Tomic, J. Nikodinovic-Runic, M. I. Djuran, *RSC Adv.* **6** (2016) 86695
222. L. L. Ruta, I. C. Farcasanu, M. Bacalum, M. Raileanu, A. M. Rostas, C. Daniliuc, M. C. Chifiriuc, L. Măruțescu, M. Popa, M. Badea, E. E. Iorgulescu, R. Olar, *Molecules* **26** (2021) 6772.
223. J. Gitarić, I. M. Stanojević, M. V. Rodić, N. S. Drašković, M. Stevanović, S. Vojnović, M. I. Djuran, B. Đ. *Polyhedron* **188** (2020) 114688.
224. N. D. Savić, S. Vojnovic, B. Đ. Glišić, A. Crochet, A. Pavic, G. V. Janjić, M. Pekmezović, I. M. Opsenica, K. M. Fromm, J. Nikodinovic-Runic, M. I. Djuran, *Eur. J. Med. Chem.* **156** (2018) 760.
225. D. Fonseca, S. M. Leal-Pinto, M. V. Roa-Cordero, J. D. Vargas, E. M. Moreno-Moreno, M. A. Macías, L. Suescun, A. Muñoz-Castro, J. J. Hurtado, *Int. J. Mol. Sci.* **20** (2019) 3237.
226. H. T. Taff, K. F. Mitchell, J. A. Edward, D. R. Andes, *Future Microbiol.* **8** (2013) 1325.
227. P. Madhavan, F. Jamal, C. P. Pei, F. Othman, A. Karunanidhi, K. P. Ng, *Mycopathologia* **183** (2018) 499.
228. F. G. da Silva Dantas, A. A. de Almeida-Apolonio, R. P. de Araújo, L. R. V. Favarin, P. F. de Castilho, F. de Oliveira Galvão, T. I. E. Svidzinski, G. A. Casagrande, K. M. P. de Oliveira, *Molecules* **23** (2018) 1856.
229. C. J. Nobile, J. E. Nett, A. D. Hernday, O. R. Homann, J.-S. Deneault, A. Nantel, D. R. Andes, A. D. Johnson, A. P. Mitchell, *PLoS Biol.* **7** (2009) e1000133.
230. H.-Z Zhang, G. L. V Damu, G.-X Cai, C.-H Zhou, *Eur. J. Med. Chem.* **64** (2013) 329.
231. A. Chowdhary, S Kathuria, J Xu, J. F Meis, *PLoS Pathog.* **9** (2013) e1003633.
232. J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Plenum Press, New York, 3rd edn (2006).
233. Y.-Q. Wang, H.-M. Zhang, G.-C. Zhang, W.-H. Tao, S.-H. Tang, *J. Lumin.* **126** (2007) 211.
234. O. H. Laitinen, V. P. Hytönen, H. R. Nordlund, M. S. Kulomaa, *Cell. Mol. Life Sci.* **63** (2006) 2992.
235. Y. Shi, C. Guo, Y. Sun, Z. Liu, F. Xu, Y. Zhang, Z. Wen, Z. Li, *Biomacromolecules* **12** (2011) 797.
236. A. M. Godin, W. C. Ferreira, L. T. S. Rocha, J. G. T. Seniuk, A. L. L. Paiva, L. A. Merlo, E. B. Nascimento Jr., L. F. S. Bastos, M. M. Coelho, *Pharmacol., Biochem. Behav.* **99** (2011) 782.
237. J.-B. Lepecq, C. Paoletti, *J. Mol. Biol.* **27** (1967) 87.
238. N. Lj Stevanović, B. Đ. Glišić, S. Vojnovic, H. Wadepohl, T. P. Andrejević, S. Ž. Đurić, N. D. Savić, J. Nikodinovic-Runic, M. I. Djuran, A. Pavic, *J. Mol. Struct.* **1232** (2021) 130006.

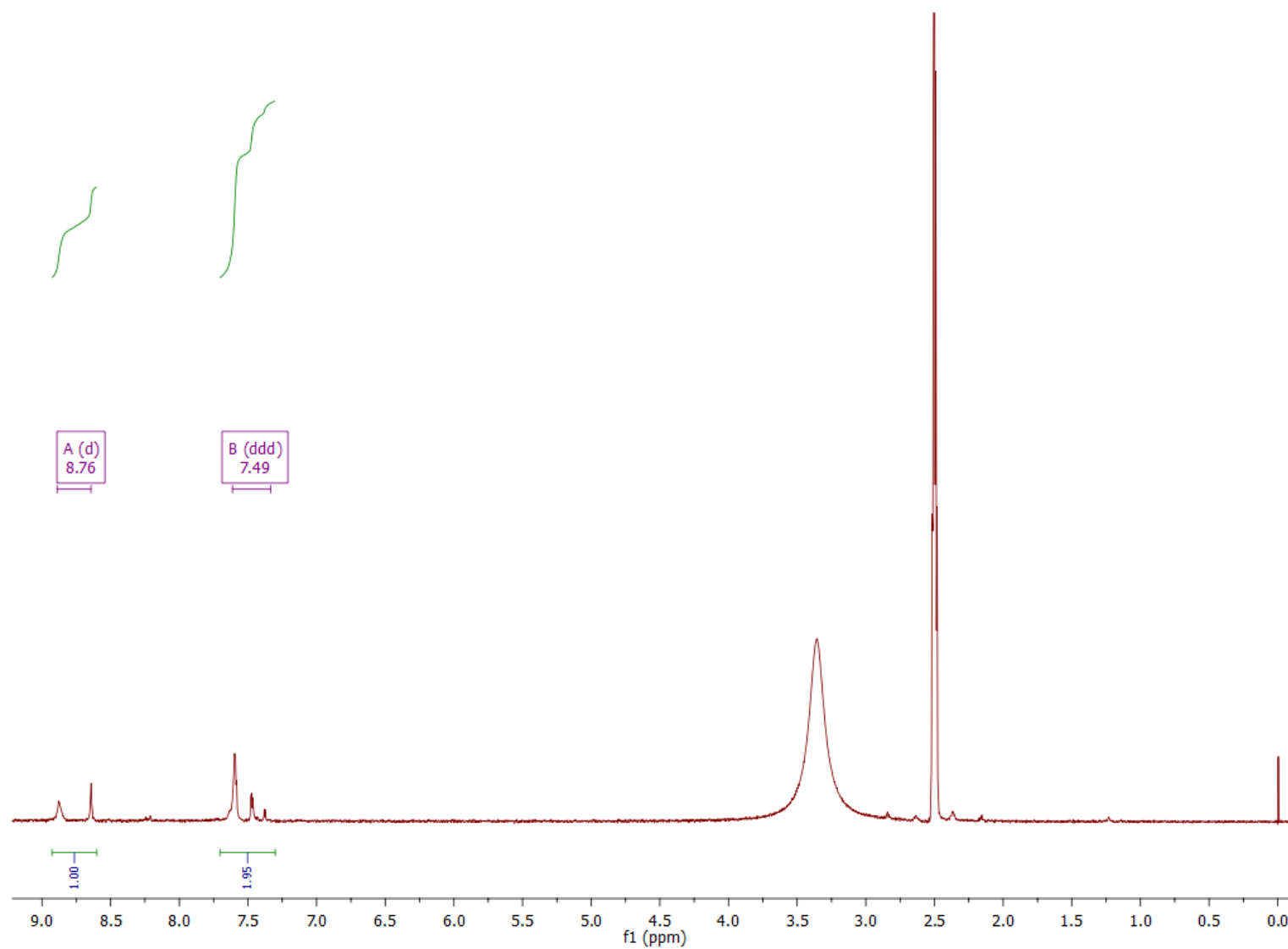
239. I. Milionis, C. N. Banti, I. Sainis, C. P. Raptopoulou, V. Psycharis, N. Kourkoumelis, S. K. Hadjikakou, *J. Biol. Inorg. Chem.* **23** (2018) 705.
240. A. S. Potapov, E. A. Nudnova, A. I. Khlebnikov, V. D. Ogorodnikov, T. V. Petrenko, *Inorg. Chem. Commun.* **53** (2015) 72.
241. U. Kalinowska-Lis, A. Felczak, L. Chęcińska, K. Zawadzka, E. Patyna, K. Lisowska, J. Ochocki, *Dalton Trans.* **44** (2015) 8178.
242. Y. Jiang, C.-F. Zhu, Z. Zheng, J.-B. He, Y. Wang, *Inorg. Chim. Acta* **451** (2016) 143.
243. E. Inkmann, U. Holzgrabe, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **20** (1999) 297.
244. S. Medici, M. Peana, V. M. Nurchi, M. A. Zoroddu, *J. Med. Chem.* **62** (2019) 5923.
245. Y.-H. Ou, R.-K. Du, S.-P. Zhang, Y. Ling, S. Li, C.-J. Zhao, W.-Z. Zhang, L. Zhang, *J. Mol. Struct.* **1215** (2020) 128229.
246. O. Gordon, T. V. Slenters, P. S. Brunetto, A. E. Villaruz, D. E. Sturdevant, M. Otto, R. Landmann, K. M. Fromm, *Antimicrob. Agents Chemother.* **54** (2010) 4208.
247. J. H. Kim, N. C. G. Faria, M. D. L. Martins, K. L. Chan, B. C. Campbell, *Front. Microbiol.* **3** (2012) 261.
248. L. Meng, H. Zhao, S. Zhao, X. Sun, M. Zhang, Y. Deng, *Antimicrob. Agents Chemother.* **63** (2019) e01891.
249. P. Letrado, I. de Miguel, I. Lamberto, R. Díez-Martínez, J. Oyarzabal, *Cancer Res.* **78** (2018) 6048.
250. J. S. Johansson, *J. Biol. Chem.* **272** (1997) 17961.
251. A. K. dos Santos Pereira, D. H. Nakahata, C. M. Manzano, D. de Alencar Simoni, D. H. Pereira, W. R. Lustri, A. L. B. Formiga, P. P. Corbi, *Polyhedron*, **173** (2019) 114116.
252. N. Lj. Stevanović, J. Kljun, S. Skaro Bogojevic, D. Sriram, M. Zlatar, Jasmina Nikodinovic-Runic, I. Turel, M. I. Djuran, B. Đ. Glišić, *Inorg. Chim. Acta* **574** (2025) 122393.
253. N. D. Savić, S. Vojnovic, B. Đ. Glišić, A. Crochet, A. Pavic, G. M. Janjić, M. Pekmezović, I. M. Opsenica, K. M. Fromm, J. Nikodinovic-Runic, M. I. Đuran, *Eur. J. Med. Chem.* **156** (2018) 760.
254. A. B. P. Lever, E. Mantovani, B. S. Ramaswamy, *Can. J. Chem.* **49** (1971) 1957.
255. J.-A. Zhang, M. Pan, J.-Y. Zhang, H.-K. Zhang, Z.-J. Fan, B.-S. Kang, C.-Y. Su, *Polyhedron* **28** (2009) 145.
256. A. Pavic, N. D. Savić, B. Đ. Glišić, A. Crochet, S. Vojnovic, A. Kurutos, D. M. Stanković, K. M. Fromm, J. Nikodinovic-Runic, M. I. Djuran, *J. Inorg. Biochem.* **195** (2019) 149257. G. Piel, B. Evrard, M. Fillet, G. Llabres, L. Delattre, *Int. J. Pharm.* **169** (1998) 15.
258. J.-Y. Wu, Y.-L. Pan, X.-J. Zhang, T. Sun, Y.-P. Tian, J.-X. Yang, Z.-N. Chen, *Inorg. Chim. Acta* **360** (2007) 2083.
259. P. Połczynski, R. Jurczakowski, W. Grochala, *J. Phys. Chem. C* **117** (2013) 20689.
260. R. F. Nalewajski, J. Mrozek, G. Mazur, *Can. J. Chem.* **74** (1996) 1121.
261. M. P. Mitoraj, A. Michalak, T. Ziegler, *J. Chem. Theory Comput.* **5** (2009) 962.
262. N. Lj. Stevanović, J. Kljun, I. Aleksic, S. Skaro-Bogojevic, D. Milivojevic, A. Veselinovic, I. Turel, M. I. Djuran, J. Nikodinovic-Runic, B. Đ. Glišić, *Dalton Trans.* **51** (2022) 5322.
263. R. A. Sánchez-Delgado, M. Navarro, K. Lazard, R. Atencio, M. Capparelli, F. Vargas, J. A. Urbina, A. Bouillez, A. F. Noels, D. Masi, *Inorg. Chim. Acta*, **275** (1998) 528.
264. A. W. Addison, T. N. Rao, J. Reedijk, J. van Rijn, G. C. Verschoor, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* (1984) 1349.
265. N. L. Calvo, V. A. Alvarez, M. C. Lamas, D. Leonardi, *J. Pharm. Anal.* **9** (2019) 40.
266. K. Esumi, M. Nawa, N. Aihara, K. Usui, *New J. Chem.* **22** (1998) 719.

267. N. Pantelić, B. B. Zmejkovski, J. Trifunović-Macedoljan, A. Savić, D. Stanković, A. Damjanović, Z. Juranić, G. N. Kaluđerović, T. J. Sabo, *J. Inorg. Biochem.* **128** (2013) 146.
268. T. D. Cyr, B. A. Dawson, G. A. Neville, H. F. Shurvell, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **14** (1996) 247.
269. J. Kujawski, K. Czaja, E. Jodłowska, K. Dettlaff, M. Politańska, J. Żwawiak, R. Kujawski, T. Ratajczak, M. K. Chmielewski, M. K. Bernard, *J. Mol. Struct.* 1119 (2016) 250.
270. T. M. Barbosa, G. A. Morris, M. Nilsson, R. Rittner, C. F. Tormena, *RSC Adv.* **7** (2017) 34000.
271. G. Zhang, A. Wang, T. Jiang, J. Guo, *J. Mol. Struct.* **891** (2008) 93.
272. X. M. He, D. C. Carter, *Nature* **358** (1992) 209.
273. S. Curry, *Vox Sang.* **83** (2002) 315.
274. H.-L. Wu, W.-Y. Li, X.-W. He, K. Miao, H. Liang, *Anal. Bioanal. Chem.* **373** (2002) 163.

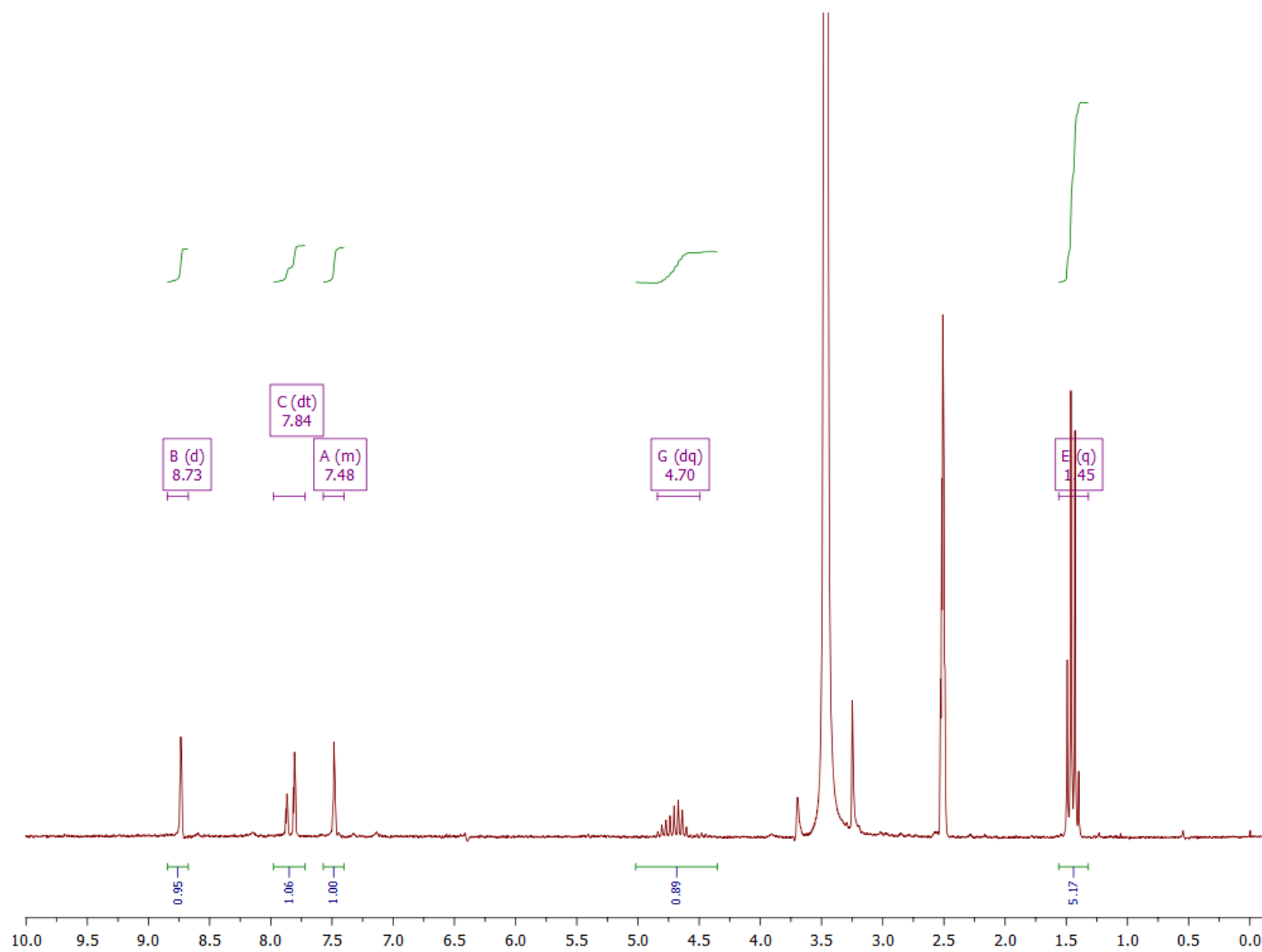
7. ПРИЛОГ

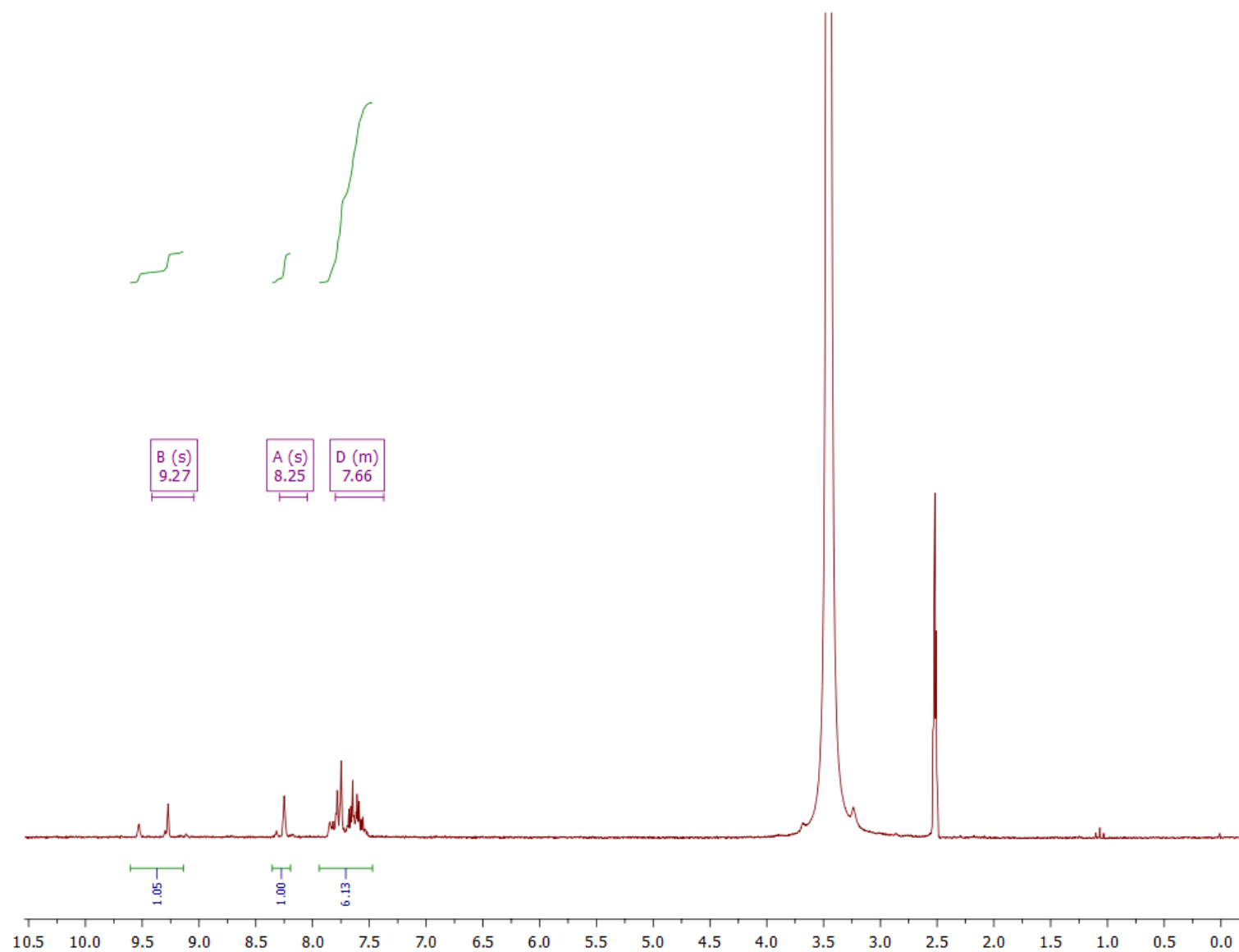
Слика 73. ¹H NMR спектар Ag1 комплекса у dmsO-d₆

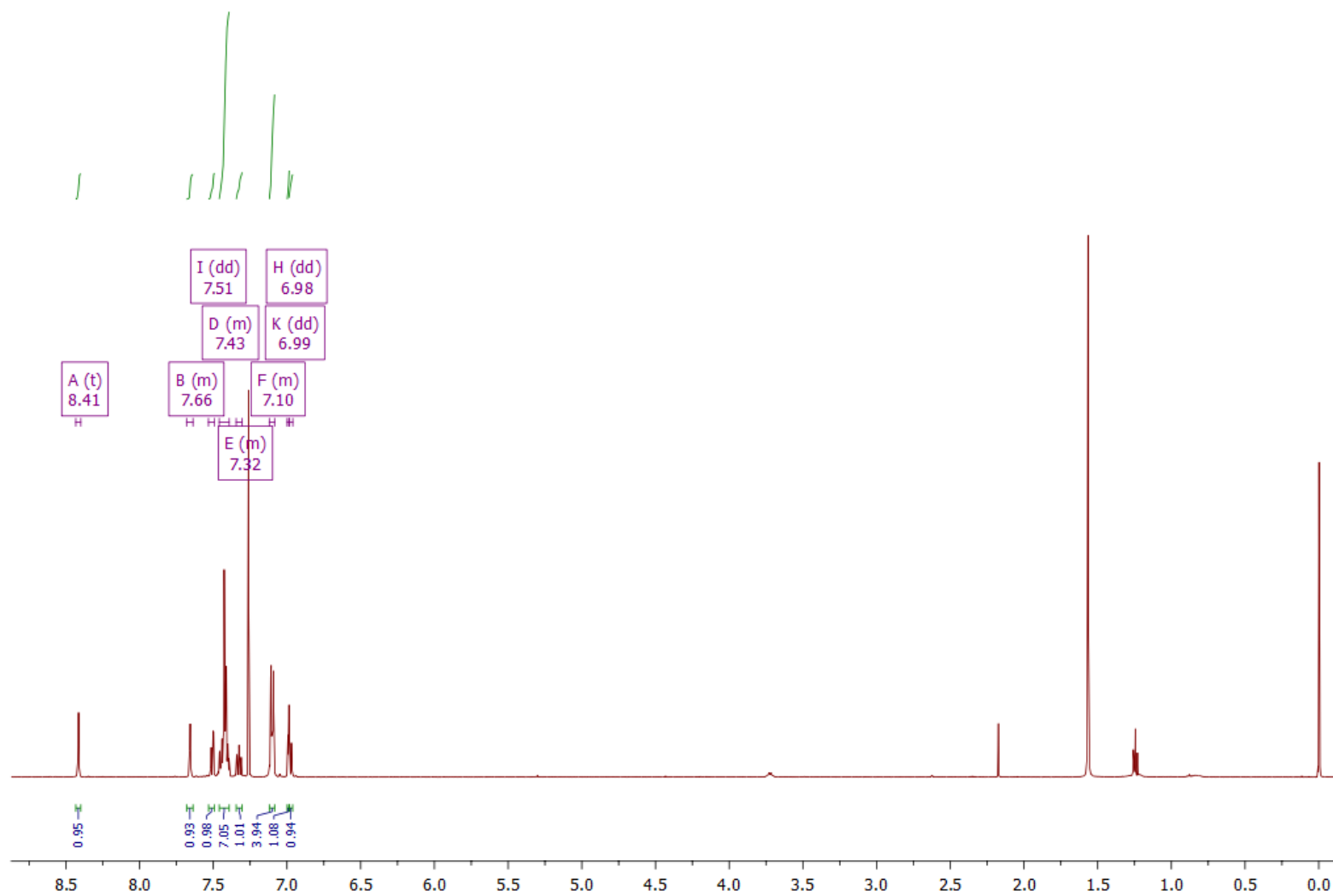
Слика 74. ¹H NMR спектар Ag₂ комплекса у CDCl₃

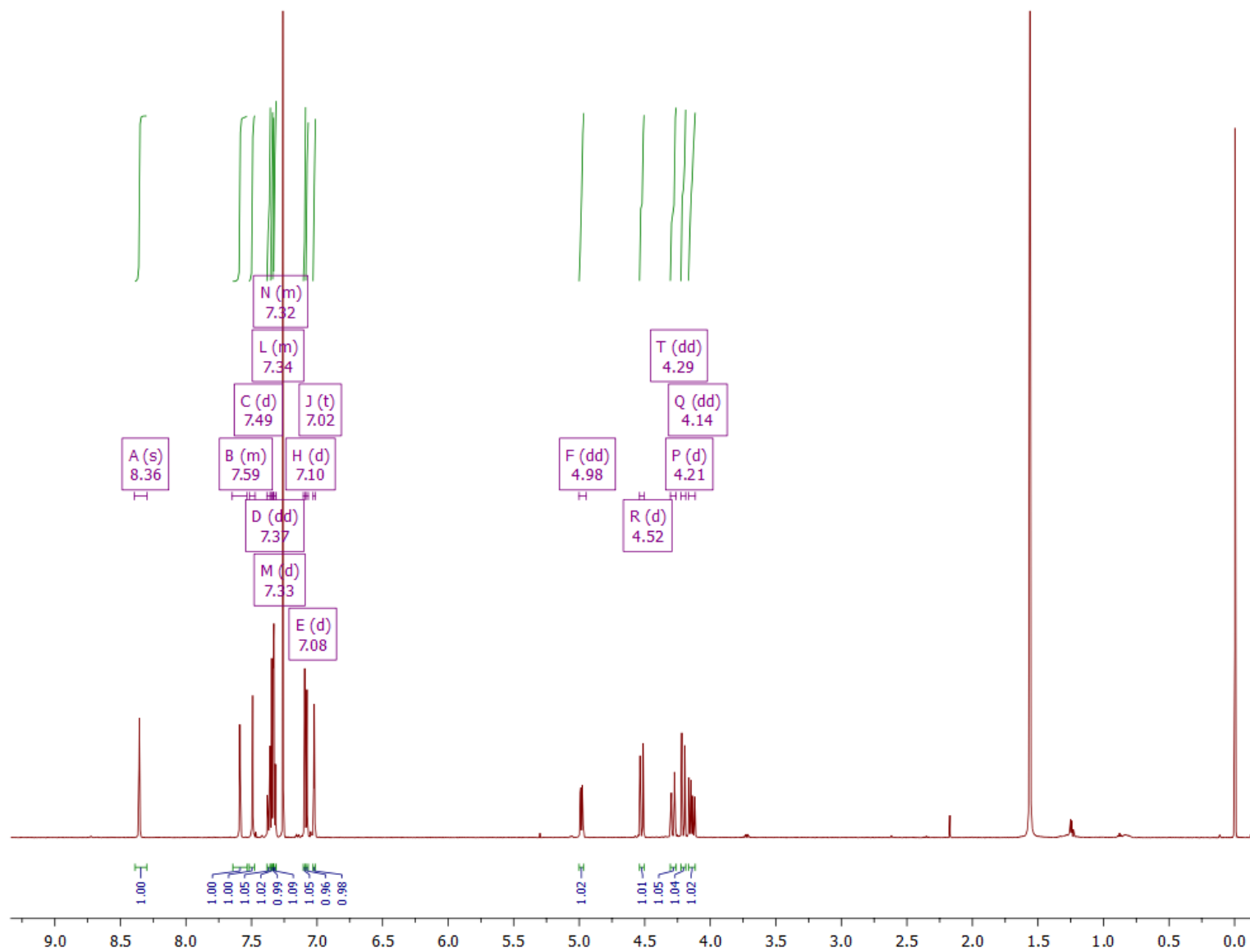


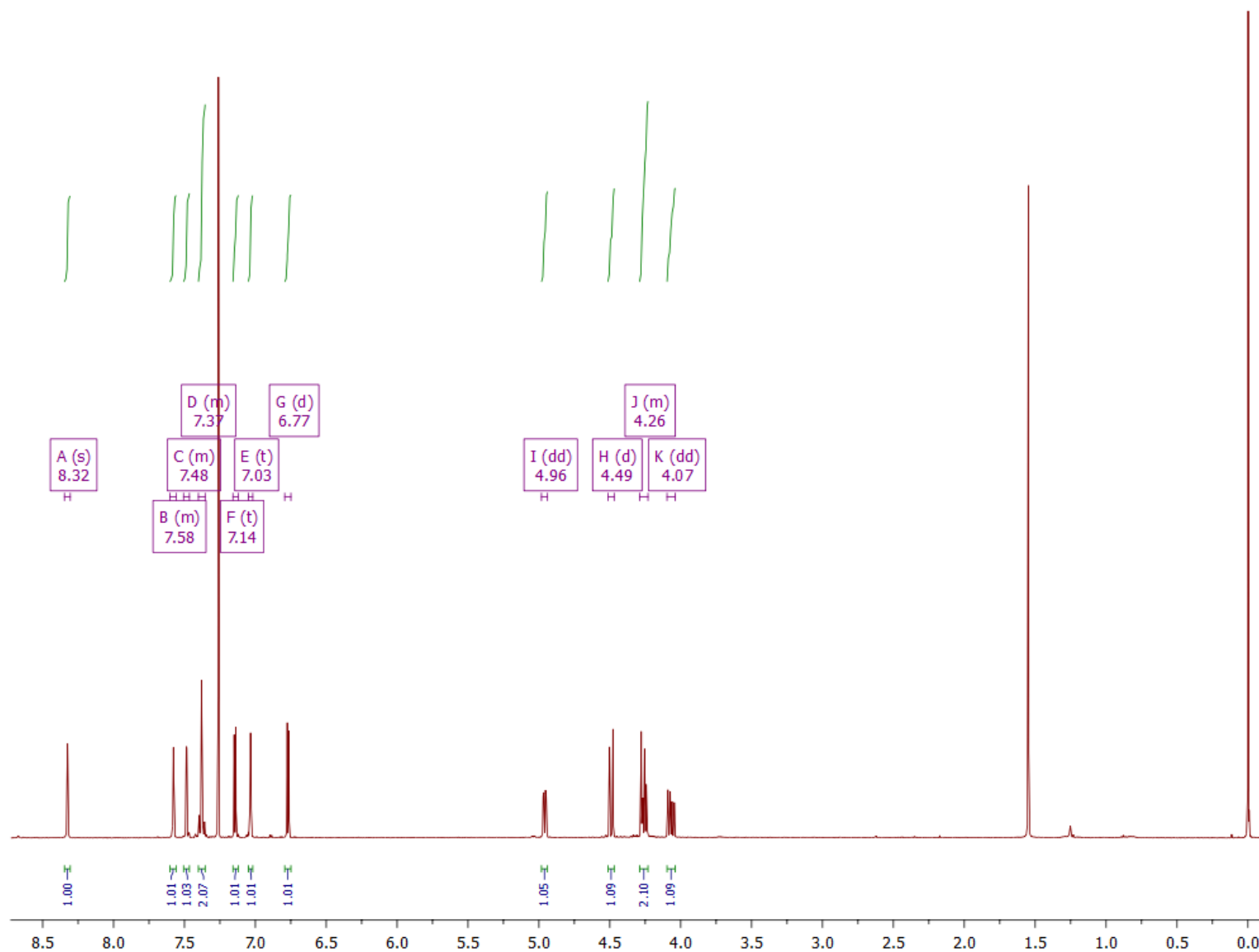
Слика 75. ^1H NMR спектар **Au1** комплекса у $\text{dmsO-}d_6$

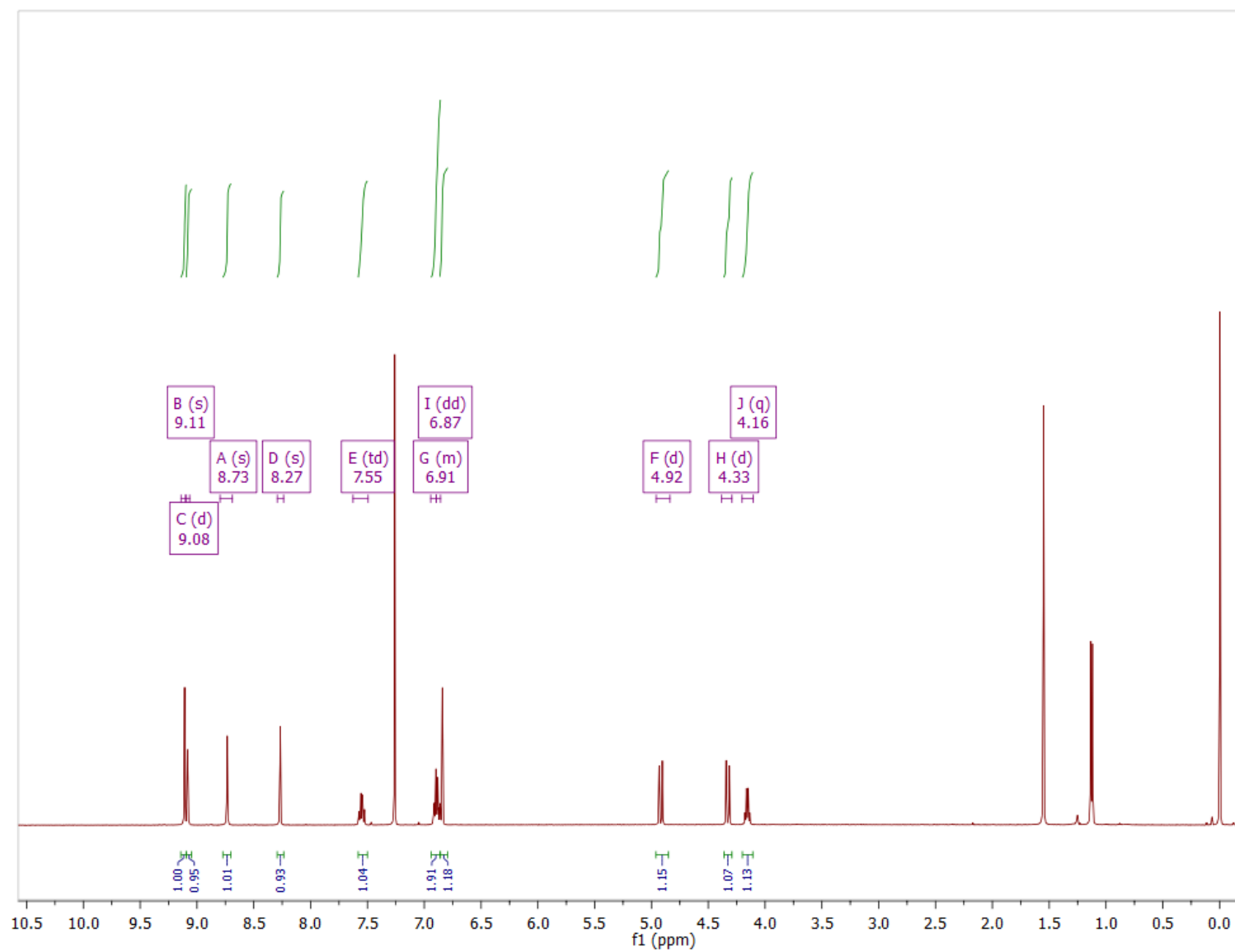
Слика 76. ¹H NMR спектар Au₂ комплекса у dmsO-*d*₆

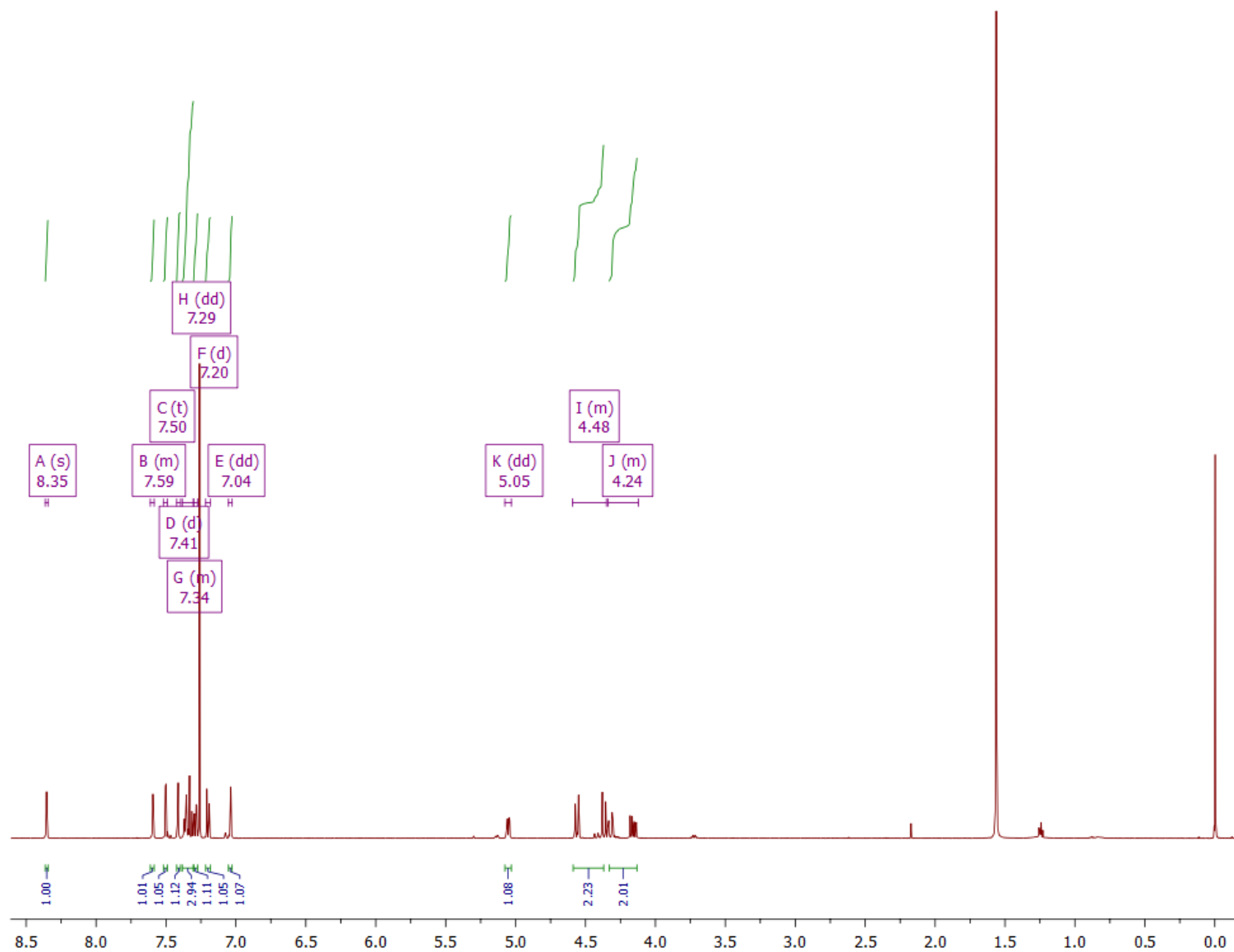
Слика 77. ^1H NMR спектар Au_3 комплекса у dmsO-d_6

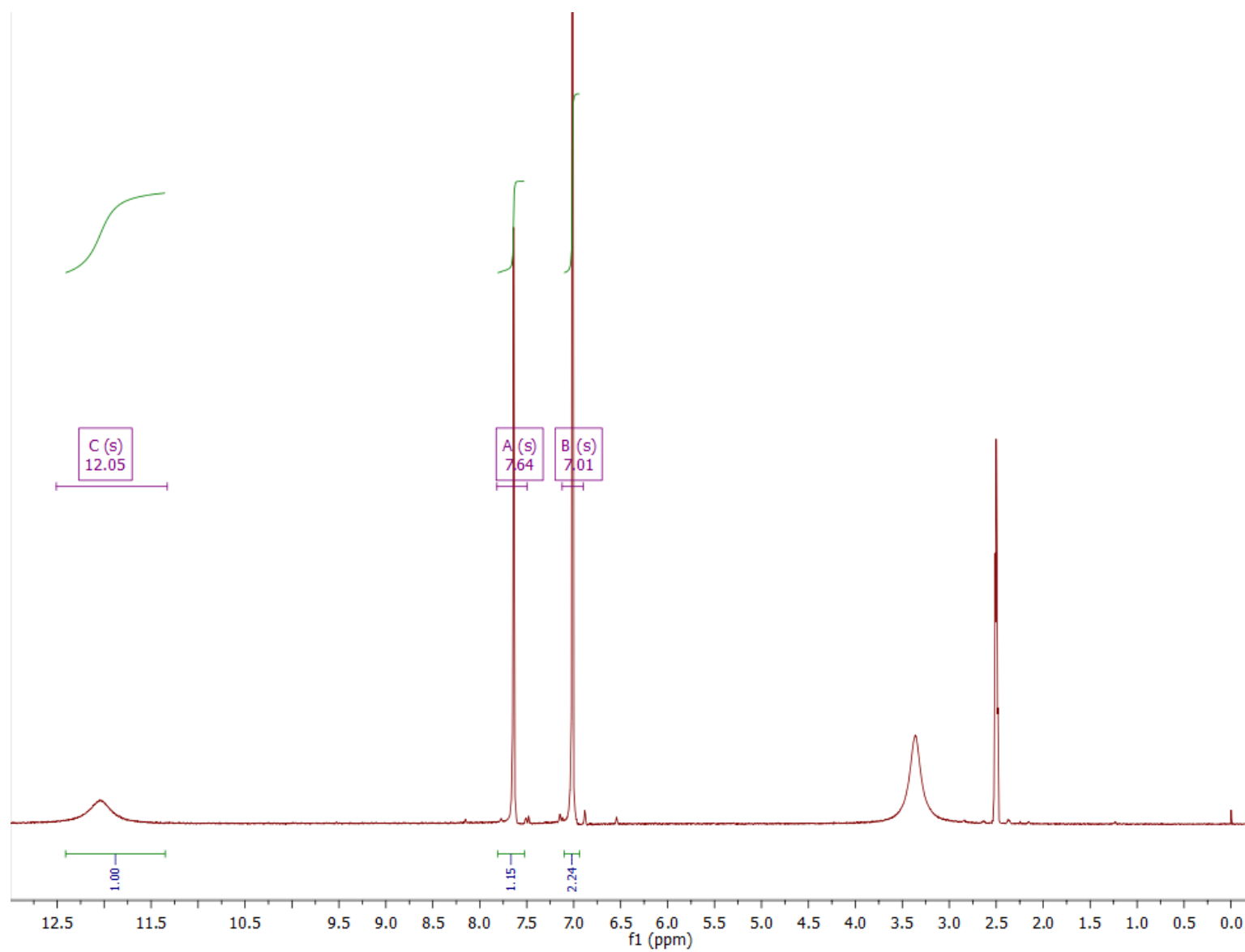
Слика 78. ¹H NMR спектар Au₄ комплекса у CDCl₃

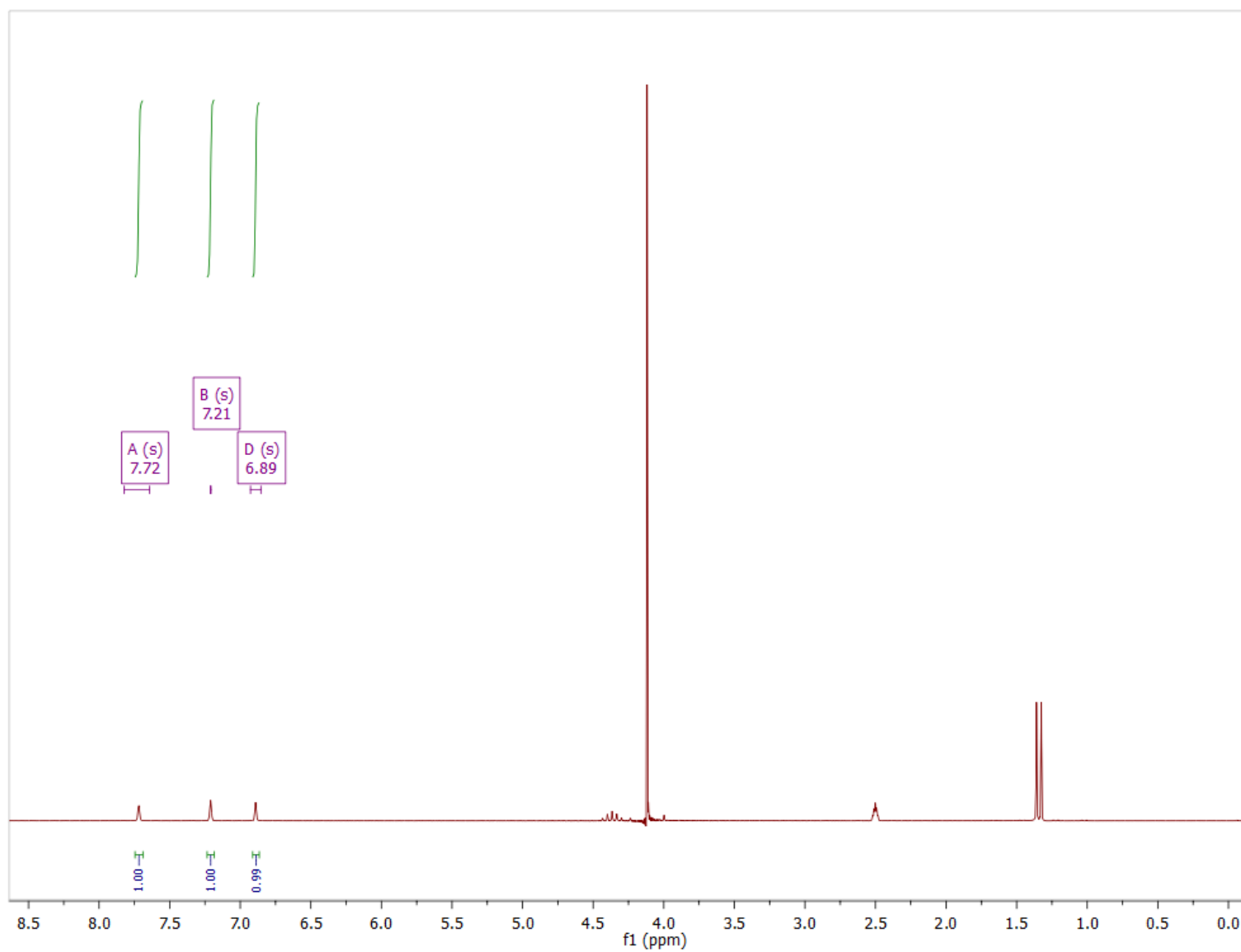
Слика 79. ^1H NMR спектар **Au5** комплекса у CDCl_3

Слика 80. ¹H NMR спектар Au6 комплекса у CDCl₃

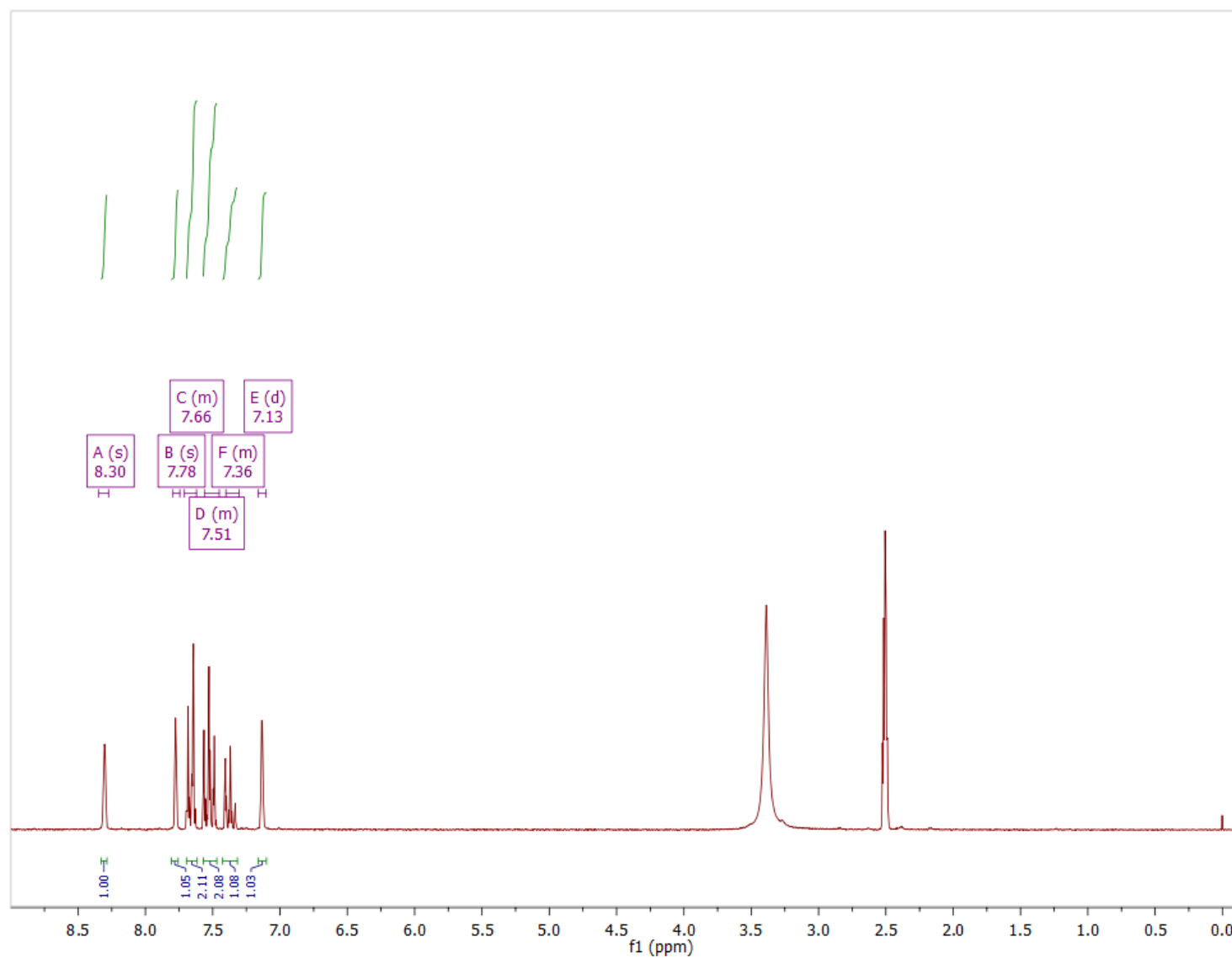
Слика 81. ¹H NMR спектар Au7 комплекса у CDCl₃

Слика 82. ¹H NMR спектар Au8 комплекса у CDCl₃

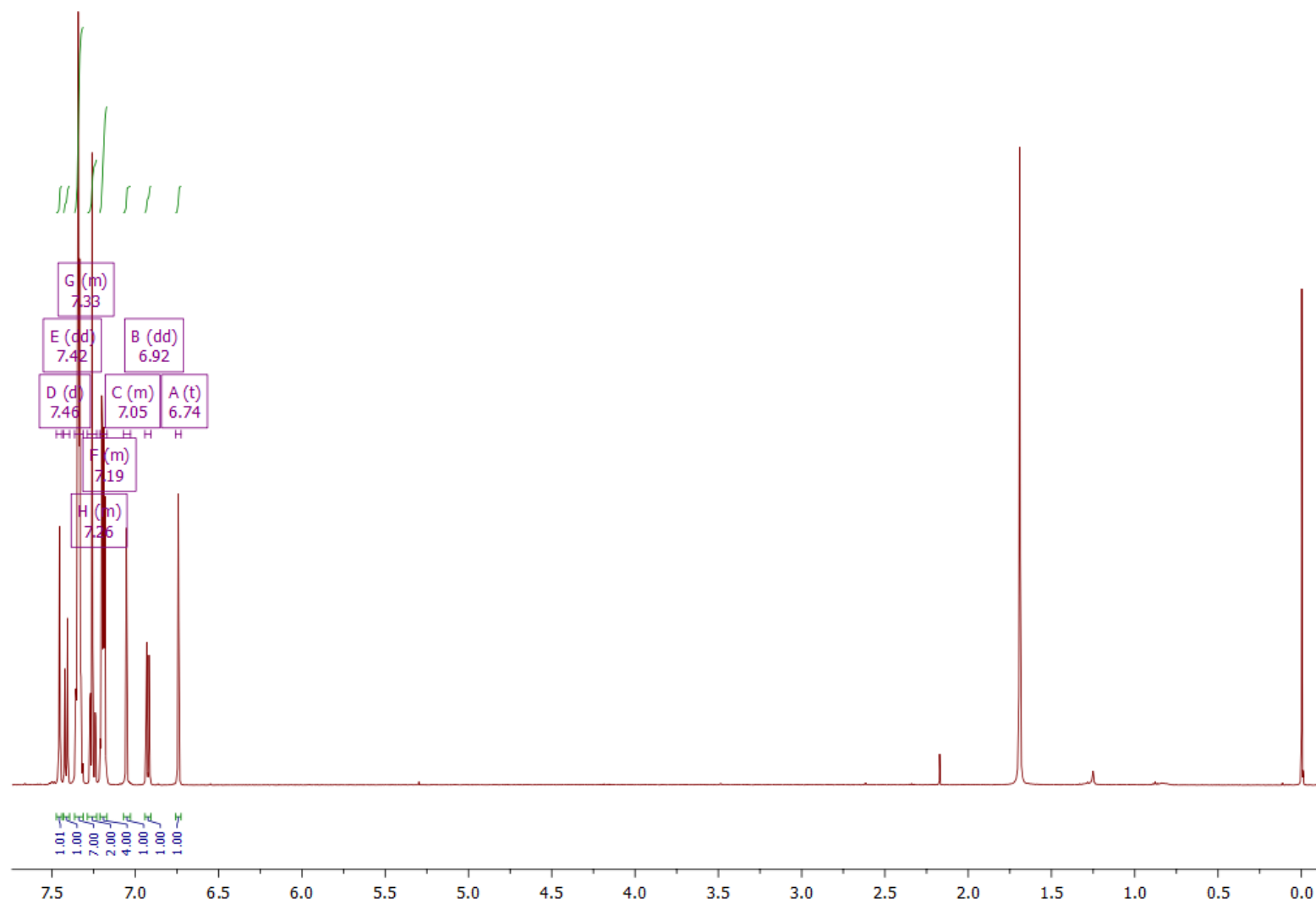
Слика 83. ^1H NMR спектар имидазола у $\text{dmsO}-d_6$

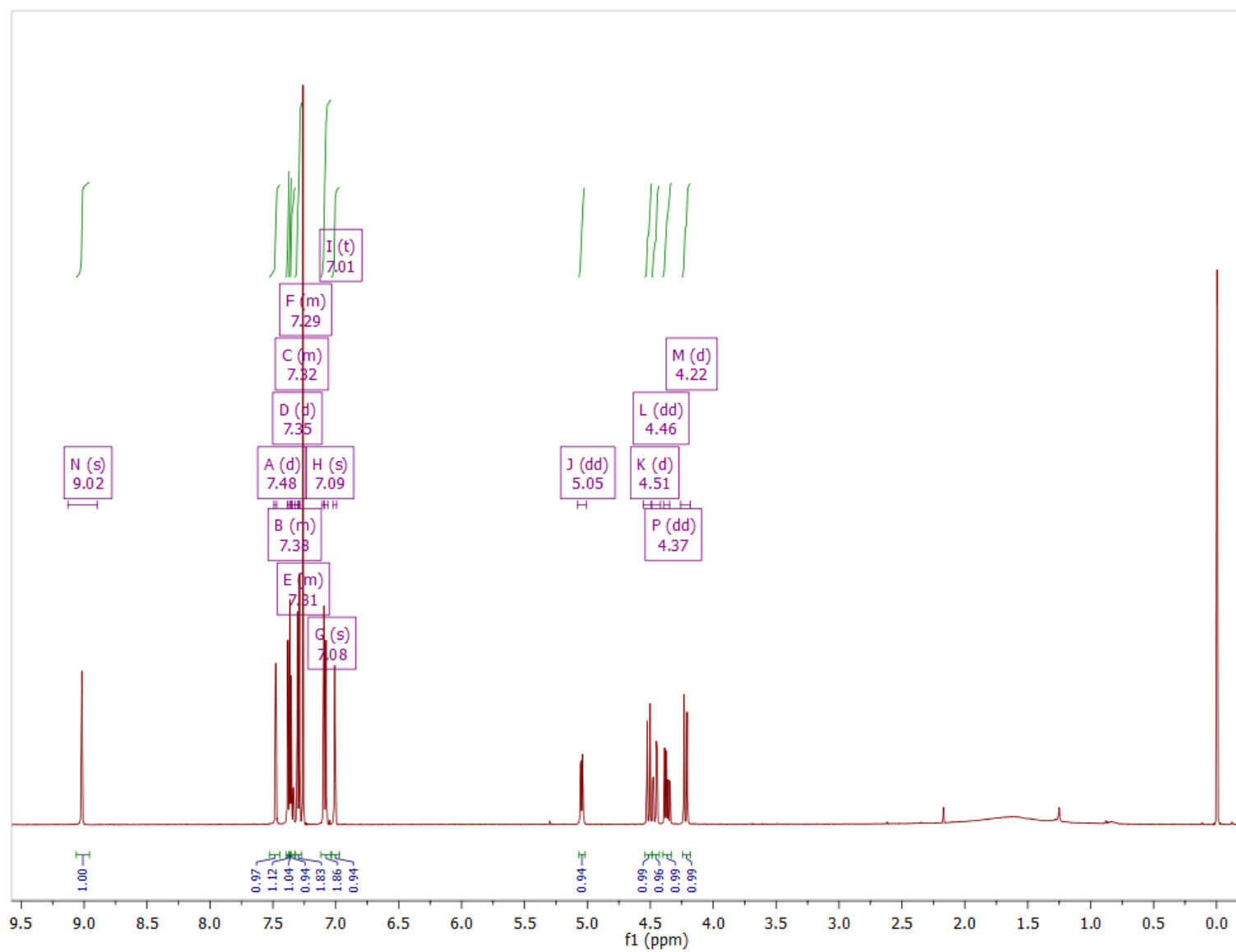


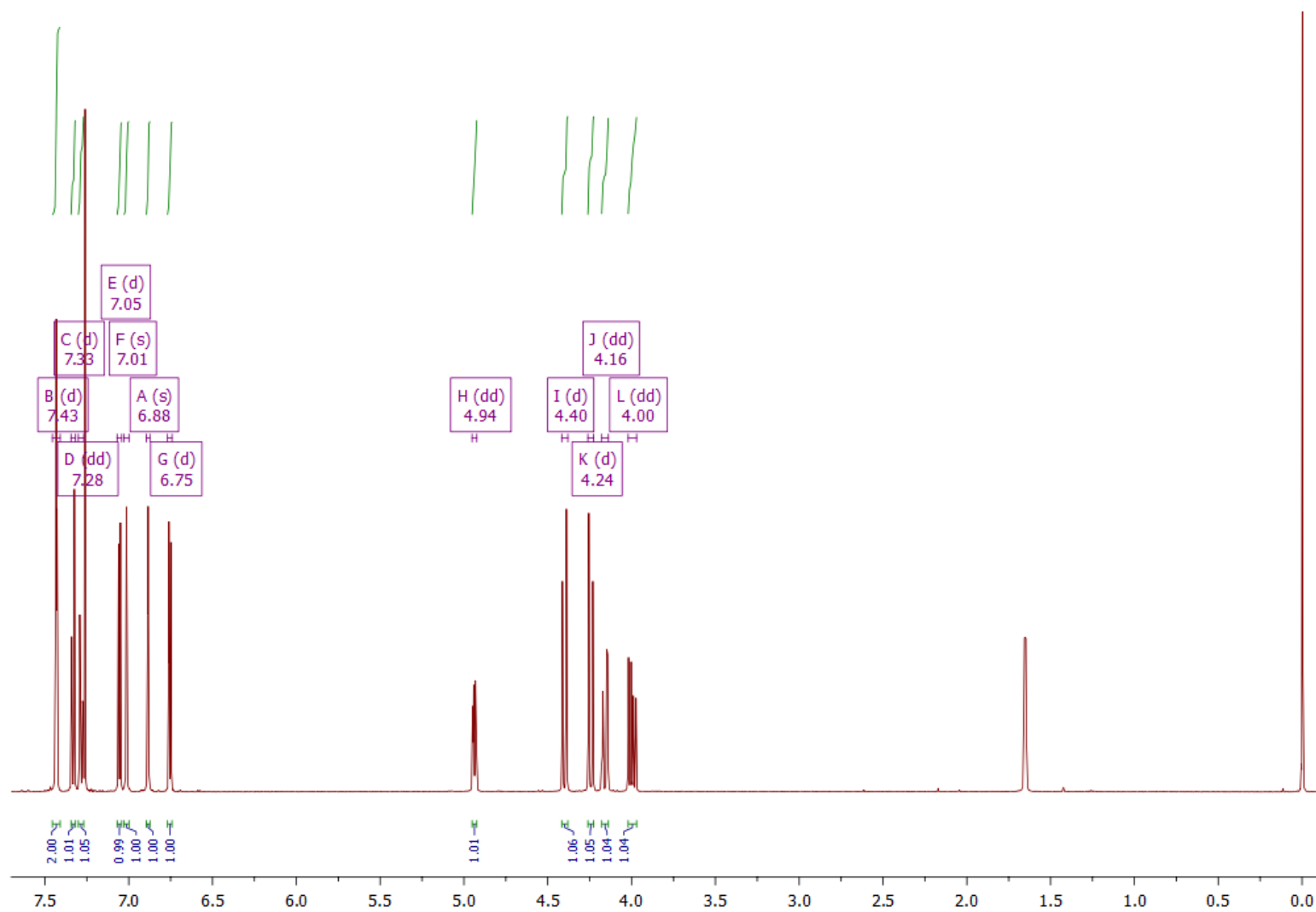
Слика 84. ^1H NMR спектар 1-изопропилимидазола у $\text{dmsO}-d_6$

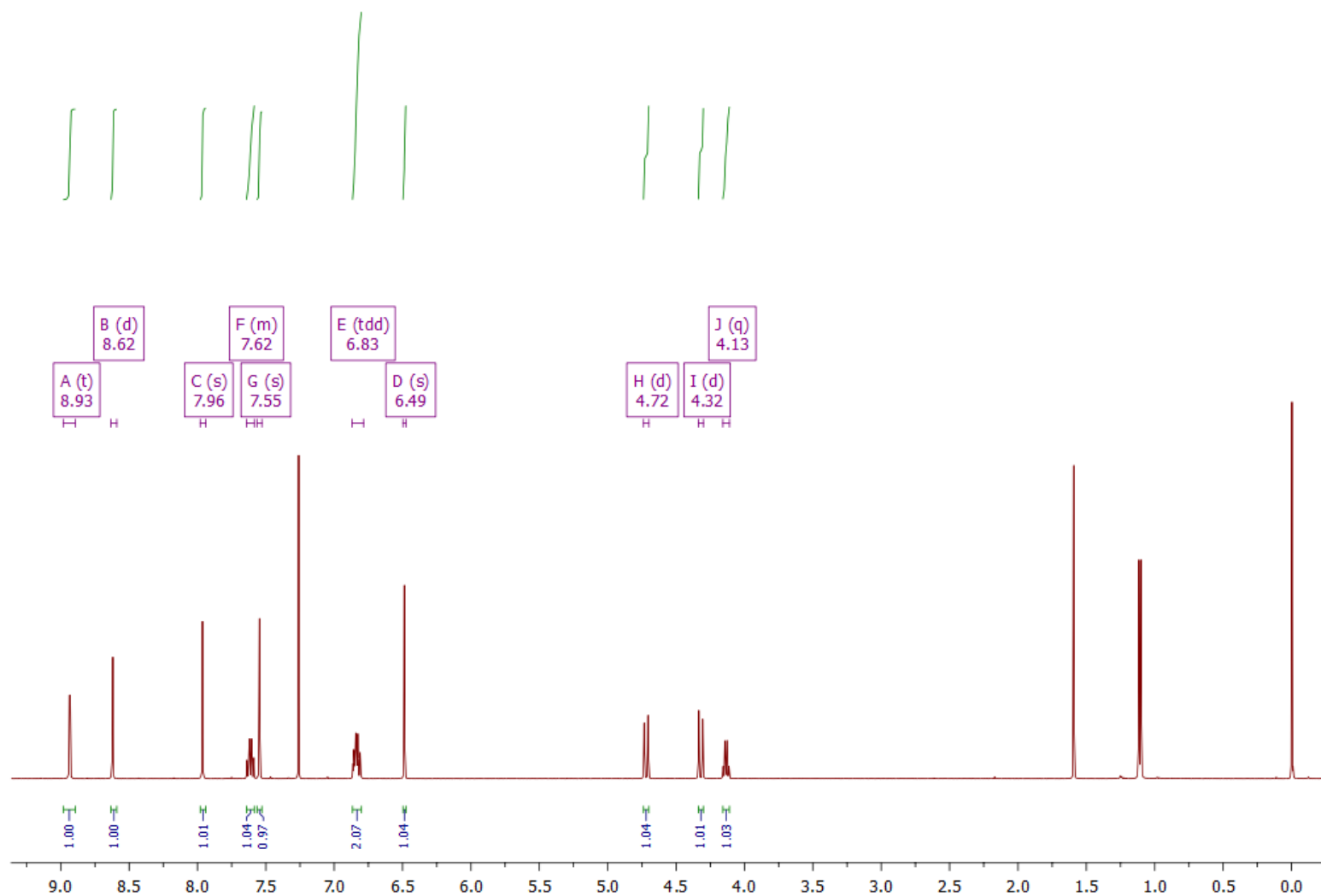


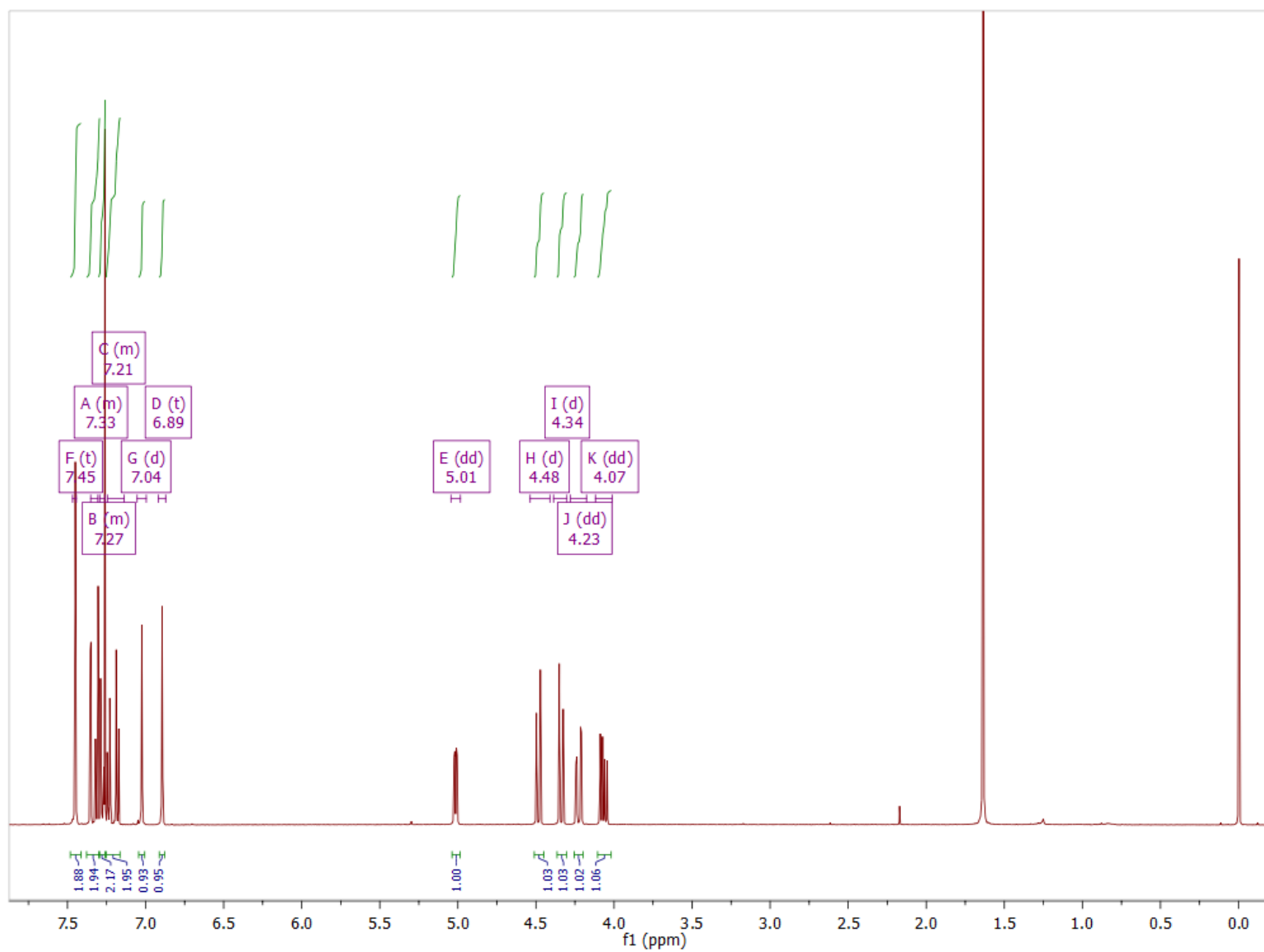
Слика 85. ^1H NMR спектар 1-фенилимидазола у $\text{dmsO}-d_6$

Слика 86. ¹H NMR спектар клотримазола у CDCl₃

Слика 87. ¹H NMR спектар еконазола у CDCl₃

Слика 88. ¹H NMR спектар тиоконазола у CDCl₃

Слика 89. ^1H NMR спектар вориконазола у CDCl_3

Слика 90. ¹H NMR спектар миконазола у CDCl₃

ЛИСТА СКРАЋЕНИЦА КОРИШЋЕНИХ У ДИСЕРТАЦИЈИ

HIV	вирус хумане имунодефицијенције (енгл. <i>Human immunodeficiency virus</i>)
IFI	инвазивна гљивична инфекција (енгл. <i>Invasive fungal infection</i>)
AMR	антимикробна резистентност (енгл. <i>antimicrobial resistance</i>)
WHO	Светска здравствена организација (енгл. <i>World Health Organization</i>)
ROS	реактивне кисеоничне врсте (енгл. <i>reactive oxygen species</i>)
DNA	деоксирибонуклеинска киселина
RNA	рибонуклеинска киселина
bim	бензимидазол
cim	хлоримидазол
ctz	клотримазол
mcz	миконазол
ecz	еконазол
ktz	кетоконазол
fcz	флуконазол
icz	итраконазол
vcz	вориконазол
psz	посаконазол
CYP51	ланостерол-14 α -деметилаза
MIC	минимална инхибиторна концентрација
tcz	тиоконазол
bpy	2,2'-бипиридин
AcO	ацетатни анјон
IC ₅₀	50% максималне инхибиторске концентрације
IC ₂₀	20% максималне инхибиторске концентрације
MCF-7	ћелијска линија канцера дојке
HCT-15	ћелијска линија канцера дебелог црева
HeLa	ћелијска линија канцера грлића материце
PC-3	ћелијска линија канцера простате
PPh ₃	трифенилфосфин
EC ₅₀	ефективна концентрација која инхибира раст 50% паразита
A549	ћелијска линија канцера плућа
MDA-MB-231	ћелијска линија канцера дојке
DU-145	ћелијска линија канцера простате
MRC-5	здрава ћелијска линија фибробласта плућа
L929	здрава ћелијска линија фибробласта код мишева
en	етилендиамин
acac	ацетилацетонат
LD ₅₀	средња летална доза
aminophen	5-амино-1,10-фенантролин
tmp	3,4,7,8-тетраметил-1,10-фенантролин
dmb	4,4'-диметил-2,2'-бипиридин
VERO	ћелијска линија сисара
MIC ₈₀	80% минималне инхибиторне концентрације
im	имидазол
ipim	1-изопропилимидазол
phim	1-фенилимидазол
dmf	диметилформамид
dmsO	диметилсулфоксид
dmsO-d ₆	деутеро диметилсулфоксид

CDCl ₃	деутеро хлороформ
PBS	фосфатни пуфер
BSA	албумин говеђег серума
ct-DNA	DNA изолован из тимуса телета
EthBr	етидијум-бромид
dig	дигитоксин
eos Y	еозин
ibu	ибупрофен
IR спектри	инфрацрвени спектри
¹ H NMR спектри	протонски NMR спектри
GC	стакласти угљеник
LB течна подлога	Luria Bertani подлога
SAB	Sabouraud dextrose подлога
ATCC	American Type Culture Collection
RFP	црвени флуоресцентни протеин
GFP	зелени флуоресцентни протеин
NCTC	<i>National Collection of Type Cultures</i>
MTT	3-(4,5-диметил(тиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолијум-бромид
DCFH-DA	2',7'-дихлорфлуоресцин-диацетат
LJ	Löwenstein–Jensen медијум
SD	стандардна девијација
OECD	<i>Organisation for Economic Co-operation and Development</i>
PVP	поливинилпиролидон
F ₀	интензитет флуоресценције пре додатка комплекса
F	интензитет флуоресценције после додатка комплекса
K _q	биомолекулска константа гашења
τ ₀	време живота флуорофоре у одсуству комплекса
K _A	константа везивања
n	број везујућих места
LDA	Апроксимација локалне густине
VWN	Vosko-Walk-Nusair колерација
NTO	<i>Natural Transition Orbitals</i>
EDA	<i>Energy Decomposition Analysis</i>
HSA	хумани серум албумин (енгл. <i>Human serum albumin</i>)
Trp	триптофан
Tyr	тирозин
Phe	фенилаланин
Ti	терапеутски индекс
Si	индекс селективности
atd	амантадин
mtn	мемантин
CSD	Кембричка база података (енгл. <i>Cambridge Structural Database</i>)
ТВАНР	тетрабутиламонијум-хексафлуорофосфат
Δ _r G	промена слободне Гибсове енергије
Δq	Хиршфилдов проток наелектрисања
LMCT	пренос наелектрисања са лиганда на метал

СПИСАК СЛИКА

Ред. бр. слике	Назив слике	Стр.
Слика 1.	Шематски приказ антифунгалног деловања различитих антимикотика	4
Слика 2.	Структурне формуле амфотерицина Б (а) и нистатина (б)	6
Слика 3.	Структурне формуле каспофунгина (а), микафунгина (б) и анидулафунгина (в)	6
Слика 4.	Структурне формуле 5-флуцитозина (а), тербинафина (б) и нафтифина (в)	7
Слика 5.	Структурне формуле најједноставнијих азола	8
Слика 6.	Године открића неких азола (bim = бензимидазол, cim = хлоримидазол, ctz = клотримазол, mcz = миконазол, ecz = еконазол, ktz = кетоконазол, fcz = флуконазол, icz = итраконазол, vcz = вориконазол, psz = посаконазол, ivz = изавуконазол)	8
Слика 7.	Механизам антифунгалног деловања азола	9
Слика 8.	Структурне формуле азола прве генерације који су слични миконазолу	11
Слика 9.	Структурне формуле азола прве генерације сличних клотримазолу	13
Слика 10.	Структурне формуле азола друге генерације	14
Слика 11.	Структурне формуле азола треће генерације	16
Слика 12.	Структурне формуле комплекса мангана(І), рутенијума(ІІ) и сребра(І) са миконазолом ¹³³⁻¹³⁶	19
Слика 13.	Структурне формуле комплекса сребра(І) са еконазолом ^{137,138}	21
Слика 14.	Структурне формуле комплекса кобалта(ІІ), бакра(ІІ), цинка(ІІ) и кадмијума(ІІ) са тиоконазолом (tcz) ¹³⁹	22
Слика 15.	Структурне формуле комплекса никла(ІІ), паладијума(ІІ) и платине(ІІ) са тиоконазолом (tcz) ¹⁴⁰	23
Слика 16.	Структурне формуле комплекса рутенијума(ІІ) са тиоконазолом (tcz) ¹³⁴	23
Слика 17.	Структурне формуле комплекса сребра(І), злата(І), цинка(ІІ), бакра(ІІ) и платине(ІІ) са клотримазолом (ctz) ^{137,141-143}	25
Слика 18.	Структурне формуле комплекса рутенијума(ІІ) са клотримазолом ¹³⁴	25
Слика 19.	Структурне формуле комплекса рутенијума(ІІ/ІІІ) са клотримазолом ¹⁴⁴⁻¹⁴⁶	26
Слика 20.	Структурне формуле комплекса рутенијума(ІІ/ІІІ) са клотримазолом који показују антипаразитску активност ¹⁴⁷	27
Слика 21.	Структурне формуле комплекса мангана(І) и ренијума(І) са клотримазолом ^{133,148}	28
Слика 22.	Структурне формуле комплекса цинка(ІІ) са итраконазолом ¹⁴⁹ и сребра(І), рутенијума(ІІ) и цинка(ІІ) са флуконазолом ^{146,150,151}	29
Слика 23.	Структурне формуле комплекса сребра(І), цинка(ІІ) и бакра(ІІ) са вориконазолом ¹⁵²⁻¹⁵⁴	31
Слика 24.	Кристали Cu1 комплекса	42
Слика 25.	Кристали Ag2 комплекса	43
Слика 26.	Кристали Au3 (а) и Au4 (б) комплекса	44

Слика 27.	Кристали Au5 (а) и Au7 (б) комплекса	45
Слика 28.	Шематски приказ реакције за синтезу Cu1 комплекса	55
Слика 29.	Кристална структура Cu1 комплекса. Термички елипсоиди су приказани са 35% вероватноће. Молекули растварача су изостављени и приказани су само атоми водоника из –ОН група флуконазола ²¹⁴	56
Слика 30.	Водоничне везе у структури Cu1 комплекса (обележене плавом бојом) ²¹⁴	57
Слика 31.	Стабилност Cu1 комплекса праћена UV-Vis спектрофотометријом у dmsO током времена ($c = 4,0 \times 10^{-3} \text{ M}$) ²¹⁴	58
Слика 32.	Раст <i>C. albicans</i> ATCC 10231 соја на <i>Spider</i> (а) и RPMI (б) подлози у присуству субинхибиторних концентрација ($0,5 \times \text{MIC}$) Cu1 комплекса и fcz ²¹⁴	60
Слика 33.	Ефекат Cu1 комплекса и флуконазола на формирање биофилма <i>C. albicans</i> (а) и <i>C. parapsilosis</i> (б) и на разарање претходно формираног биофилма <i>C. parapsilosis</i> (в) ²¹⁴	60
Слика 34.	Адхезија <i>C. albicans</i> SC5314-RFP на A549 ћелије карцинома плућа у присуству Cu1 комплекса и fcz (увећање 20 $\times$). DAPI (2-(4-амидинофенил)-6-индолкарбамадин дихидрохлорид) ћелије су обојене плавом бојом, док су црвеном бојом означене <i>C. albicans</i> ћелије ²¹⁴	61
Слика 35.	Одређивање количине ергостерола код <i>C. albicans</i> соја у присуству Cu1 комплекса и флуконазола ($0,25 \times \text{MIC}$) применом UV спектрофотометрије ²¹⁴	62
Слика 36.	Дводимензионални приказ израчунатих интеракција између Cu1 комплекса и аминокиселина унутар активног места CYP51 ензима ²¹⁴	62
Слика 37.	Флуоресцентни емисиони спектар BSA у присуству растуће концентрације Cu1 комплекса. Инсертован је Стерн-Волмеров дијаграм. ²¹⁵	63
Слика 38.	Флуоресцентни емисиони спектар EthBr-ct-DNA система у присуству растуће концентрације Cu1 комплекса. Инсертован је Стерн-Волмеров дијаграм ²¹⁵	64
Слика 39.	Шематски приказ реакције за синтезу Ag1 комплекса. Нумерација атома у icz је коришћена за анализу ¹ H NMR спектра ²³⁸	65
Слика 40.	Кристална структура Ag1 комплекса. Термички елипсоиди су приказани са 50% вероватноће. Симетријска трансформација #1 -x + 1, -y + 1, -z + 1 ²³⁸	66
Слика 41.	Стабилност Ag1 комплекса током времена праћена UV-Vis (а) и ¹ H NMR (б) спектроскопијом на 25 °C у dmsO ($c = 1,6 \times 10^{-5} \text{ M}$) ²³⁸	67
Слика 42.	Формирање ROS врста (%) у <i>C. albicans</i> ћелијама у присуству MIC концентрација Ag1 комплекса и icz након 2 h ²³⁸	68
Слика 43.	Утицај Ag1 комплекса и icz на формирање хифа <i>C. albicans</i> при $0,5 \times \text{MIC}$ концентрацијама ²³⁸	69
Слика 44.	Комплекс Ag1 и итраконазол спречавају угинуће ембриона услед инфекције <i>C. albicans</i> врстом. Инфекција је успостављена инјектирањем 40 - 65 ћелија гљивице <i>C. albicans</i> CS5314, која експримира зелени флуоресцентни протеин. Каплан-Мајерове криве приказују преживљавање инфицираних ембриона током пет дана	70

- третмана различитим концентрацијама **Ag1** комплекса и итраконазола (0,10, 0,15 и 0,20 μM). Приказане су вредности два независна експеримента у дупликату са 20 ембриона за сваку концентрацију
- Слика 45.** Флуоресцентни емисиони спектар BSA у присуству **Ag1** комплекса растуће концентрације. Инсертована слика представља Стерн-Волмеров дијаграм²³⁸ 71
- Слика 46.** Шематски приказ реакције за синтезу **Ag2** комплекса. Нумерација атома у **mcz** је коришћена за анализу ^1H NMR спектра²⁵² 72
- Слика 47.** Лево – шематски приказ неуређености која је присутна у координационој сфери Ag(I) јона у **Ag2** комплексу. Десно – асиметрична јединица кристалне структуре **Ag2** комплекса. Термални елипсоиди су приказани са 35% вероватноће²⁵² 73
- Слика 48.** Стабилност **Ag2** комплекса током времена праћена UV-Vis (а) у $\text{dmso}/\text{H}_2\text{O}$ ($v/v = 9 : 1$; $c = 3,1 \times 10^{-4} \text{ M}$) и ^1H NMR (б) спектроскопијом на 25 $^\circ\text{C}$ ²⁵² 74
- Слика 49.** Циклични волтамограм **Ag2** комплекса снимљен на GC електроди у dmso у присуству 0,1 М ТБАНР при различитим брзинама скенирања²⁵² 75
- Слика 50.** Структура $[\text{Ag}(\text{mcz})_2]^+$ катјона оптимизована на ZORA-LDA/TZP-COSMO нивоу теорије²⁵² 75
- Слика 51.** Поређење израчунатих вредности апсорпционих максимума (вертикалне линије) помоћу ZORA-SAOP/TZP-COSMO//ZORA-LDA/TZP-COSMO нивоа теорије са UV-Vis спектром $[\text{Ag}(\text{mcz})_2]^+$ комплекса²⁵² 76
- Слика 52.** Најдоминантније NTO које одговарају електронским прелазима у $[\text{Ag}(\text{mcz})_2]^+$ на 270 (а) и 284 nm (б)²⁵² 76
- Слика 53.** Деформације ковалентних густина, σ (лево) и π (десно), добијене помоћу NOCV анализе у $[\text{Ag}(\text{mcz})_2]^+$ на ZORA-TPSSH-D4/TZP нивоу теорије. Црвена/плава боја представља проток електрона²⁵² 77
- Слика 54.** Структурне формуле лиганата коришћених за синтезу **Au1** – **Au7** комплекса. Нумерација атома је коришћена за анализу ^1H NMR спектра²⁶² 79
- Слика 55.** Кристалне структуре **Au3** – **Au5** и **Au7** комплекса. Термички елипсоиди су приказани са 35% вероватноће. Атоми водоника који су везани за атоме угљеника нису приказани²⁶² 80
- Слика 56.** Стабилност **Au7** комплекса праћена UV-Vis спектрофотометријом у dmso током времена ($c = 2,3 \times 10^{-4} \text{ M}$) 81
- Слика 57.** Инхибиција раста *M. canis* у присуству **Au1** – **Au7** комплекса при концентрацији од 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ²⁶² 84
- Слика 58.** Одређивање количине ергостерола код *C. albicans* ATCC 10231 која у присуству **Au1** – **Au3** комплекса и одговарајућих лиганата (**im**, **ipim** и **phim**) применом UV спектрофотометрије ($0,5 \times \text{MIC}$)²⁶² 85
- Слика 59.** Инхибиција производње пиоцијанина у присуству **Au1** – **Au7** комплекса концентрације 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (а). Инхибиција производње пиоцијанина у присуству **Au5** и **Au6** комплекса концентрације 5 и 10 87

	$\mu\text{g/mL}$ (б). Изглед културе у присуству комплекса Au5 и Au6 ($10 \mu\text{g/mL}$) у поређењу са dmsO (в)	
Слика 60.	Инхибиција производње виолацеина у присуству $200 \mu\text{g}$ комплекса Au1 – Au3 и Au5 – Au7 и phim лиганда. Беле стрелице означавају зоне инхибиције раста, док црне линије указују на зоне инхибиције синтезе виолацеина. dmsO је коришћен као контрола ²⁶²	88
Слика 61.	Инхибиција производње продигозина у присуству $200 \mu\text{g}$ комплекса Au2 , Au3 и Au7 и лиганда (phim и ctz). Беле стрелице означавају зоне инхибиције раста, док црне линије указују на зоне инхибиције синтезе продигозина. dmsO је коришћен као контрола ²⁶²	88
Слика 62.	Флуоресцентни емисиони спектри BSA у одсуству и присуству маркера по додатку растуће концентрације Au5 комплекса. Инсертоване слике приказују Стерн-Волмеров дијаграм	90
Слика 63.	Флуоресцентни емисиони спектар EthBr-ct-DNA система у присуству Au5 комплекса растуће концентрације. Инсертована слика представља Стерн-Волмеров дијаграм	91
Слика 64.	Шематски приказ реакције за синтезу Au8 комплекса. Нумерација атома у mcz је коришћена за анализу ^1H NMR спектра ²⁵²	92
Слика 65.	Стабилност Au8 комплекса током времена праћена UV-Vis спектроскопијом на 25°C у dmf ($c = 2,3 \times 10^{-4} \text{ M}$) и $\text{dmsO}/\text{H}_2\text{O}$ ($v/v = 2,2 \times 10^{-4} \text{ M}$) (б) ²⁵²	93
Слика 66.	Структура Au8 комплекса оптимизована на ZORA-LDA/TZP-COSMO нивоу теорије ²⁵²	93
Слика 67.	Поређење израчунатих вредности апсорпционих максимума (вертикалне линије) помоћу ZORA-SAOP/TZP-COSMO//ZORA-LDA/TZP-COSMO нивоа теорије са UV-Vis спектром Au8 комплекса ²⁵²	94
Слика 68.	Најдоминантније NTO које одговарају електронским прелазима у Au8 комплексу на 267 (а), 285 (б) и 343 (в) nm ²⁵²	94
Слика 69.	Деформације ковалентних густина, σ (лево) и π (десно), добијене помоћу NOCV анализе у Au8 комплексу на ZORA-TPSSH-D4/TZP нивоу теорије. Црвена/плава боја представља проток електрона	95
Слика 70.	Инхибиција производње пиоцијанина у присуству Au8 комплекса и mcz лиганда при концентрацији $20 \mu\text{g/mL}$. Као контрола коришћен је dmsO ²⁵²	96
Слика 71.	Флуоресцентни емисиони спектар BSA у присуству растуће концентрације Au8 комплекса. Инсертована слика показује Стерн-Волмеров дијаграм. У табели су приказане вредности константи везивања за испитивану интеракцију	97
Слика 72.	Флуоресцентни емисиони спектар EthBr-ct-DNA система у присуству растуће концентрације Au8 комплекса. Инсертована слика показује Стерн-Волмеров дијаграм. У табели су приказане вредности константи везивања за испитивану интеракцију	98
Слика 73.	^1H NMR спектар Ag1 комплекса у $\text{dmsO}-d_6$	114
Слика 74.	^1H NMR спектар Ag2 комплекса у CDCl_3	115
Слика 75.	^1H NMR спектар Au1 комплекса у $\text{dmsO}-d_6$	116
Слика 76.	^1H NMR спектар Au2 комплекса у $\text{dmsO}-d_6$	117

Слика 77.	^1H NMR спектар Au3 комплекса у $\text{dmsO}-d_6$	118
Слика 78.	^1H NMR спектар Au4 комплекса у CDCl_3	119
Слика 79.	^1H NMR спектар Au5 комплекса у CDCl_3	120
Слика 80.	^1H NMR спектар Au6 комплекса у CDCl_3	121
Слика 81.	^1H NMR спектар Au7 комплекса у CDCl_3	122
Слика 82.	^1H NMR спектар Au8 комплекса у CDCl_3	123
Слика 83.	^1H NMR спектар имидазола у $\text{dmsO}-d_6$	124
Слика 84.	^1H NMR спектар 1-изопропилимидазола у $\text{dmsO}-d_6$	125
Слика 85.	^1H NMR спектар 1-фенилимидазола у $\text{dmsO}-d_6$	126
Слика 86.	^1H NMR спектар клотримазола у CDCl_3	127
Слика 87.	^1H NMR спектар еконазола у CDCl_3	128
Слика 88.	^1H NMR спектар тиоконазола у CDCl_3	129
Слика 89.	^1H NMR спектар вориконазола у CDCl_3	130
Слика 90.	^1H NMR спектар миконазола у CDCl_3	131

СПИСАК ТАБЕЛА

Ред. бр. табеле	Назив табеле	Стр.
Табела 1.	Кристалографски подаци за комплекс Cu1	42
Табела 2.	Кристалографски подаци за комплексе Ag1 и Ag2	43
Табела 3.	Кристалографски подаци за комплексе Au3 и Au4	44
Табела 4.	Кристалографски подаци за комплексе Au5 и Au7	45
Табела 5.	Одабране дужине веза (Å) и углови између веза (°) у Cu1 комплексу ²¹⁴	56
Табела 6.	Антифунгална активност Cu1 комплекса и fcz лиганда (MIC, µg/mL и µM) у поређењу са њиховим антипролиферативним ефектом на здравој MRC-5 ћелијској линији фибробласта плућа (IC ₅₀ , µg/mL и µM) ²¹⁴	59
Табела 7.	Вредности везујућих константи Cu1 комплекса и fcz за BSA ²¹⁵	64
Табела 8.	Вредности везујућих константи Cu1 комплекса и fcz за EthBr-ct-DNA систем ²¹⁵	65
Табела 9.	Резултати <i>in vitro</i> испитивања антифунгалне активности Ag1 комплекса и итраконазола према <i>Candida</i> сојевима (MIC) и токсичности ових једињења према MRC-5 ћелијској линији (IC ₅₀), као и <i>in vivo</i> испитивања њихове токсичности према ембриону зебра рибице (LC ₅₀) ²³⁸	68
Табела 10.	Вредности терапеутског индекса (Ti) и индекса селективности (Si) за Ag1 комплекс и итраконазол према различитим <i>Candida</i> врстама (Ti = LC ₅₀ /MIC; Si = IC ₅₀ /MIC) ²³⁸	70
Табела 11.	Вредности везујућих константи Ag1 комплекса за BSA ²³⁸	71
Табела 12.	Промена слободне Гибсове енергије (Δ _r G, kcal/mol) добијене на ZORA-TPSSH-D4/TZP-COSMO//ZORA-LDA/TZP-COSMO нивоу теорије за формирање комплекса сребра(I) са миконазолом ²⁵²	75
Табела 13.	Вредности различитих енергија везивања (kcal/mol) у систему [Ag(mcz)] ⁺ --mcz, добијених помоћу EDA анализе на ZORA-TPSSH-D4/TZP нивоу теорије. Δq представља Хиршфилдов проток наелектрисања између фрагмената; E _σ и E _π представљају σ и π ковалентне доприносе E _{orb} и добијени су помоћу NOCV анализе	77
Табела 14.	Антимикробна активност Ag2 комплекса и миконазола (MIC, µM) у поређењу са њиховим антипролиферативним ефектом на здравој MRC-5 ћелијској линији фибробласта плућа (IC ₅₀ , µM) ²⁵²	78
Табела 15.	Одабране дужине веза (Å) и структурни параметри у Au3 – Au5 и Au7 комплексима ²⁶²	80
Табела 16.	Антифунгална активност Au1 – Au7 комплекса и одговарајућих лиганата (MIC, µg/mL и µM) у поређењу са њиховом антипролиферативном активношћу на здравој MRC-5 ћелијској линији фибробласта плућа (IC ₅₀ , µg/mL и µM) ^{a, 262}	83
Табела 17.	Антибактеријска активност Au1 – Au7 комплекса и одговарајућих лиганата (MIC, µg/mL и µM) ^{a, 262}	86

Табела 18.	Вредности везујућих константи за интеракције Au4 – Au7 комплекса са BSA	89
Табела 19.	Вредности везујућих константи Au4 – Au7 комплекса за EthBr-ct-DNA систем	91
Табела 20.	Промена слободне Гибсове енергије ($\Delta_r G$, kcal/mol) добијене на ZORA-TPSSH-D4/TZP-COSMO//ZORA-LDA/TZP-COSMO нивоу теорије за формирање Au8 комплекса ²⁵²	93
Табела 21.	Вредности различитих енергија везивања (kcal/mol) у систему [AuCl ₃]-mcsz, добијених помоћу EDA анализе на ZORA-TPSSH-D4/TZP нивоу теорије. Δq представља Хиршфилдов проток наелектрисања између фрагмената; E_σ и E_π представљају σ и π ковалентне доприносе E_{orb} и добијени су помоћу NOCV анализе	95
Табела 22.	Антимикробна активност Ag2 комплекса и миконазола (MIC, μM) у поређењу са њиховим антипролиферативним ефектом на здравој MRC-5 ћелијској линији фибробласта плућа (IC ₅₀ , μM) ²⁵²	96
Табела 23.	Преглед синтетисаних и структурно окарактерисаних комплекса у оквиру докторске дисертације и њихове најзначајније антимикробне активности	100

Биографија са подацима о досадашњем раду

Невена Стевановић је рођена 24. децембра 1993. године у Јагодини од оца Љубише и мајке Весне. Основну школу „Бранко Радичевић” завршила је у Седлару, а гимназију је завршила у Свилајнцу. Основне академске студије хемије, смер истраживање и развој, завршила је 2017. године на Природно-математичком факултету Универзитета у Крагујевцу. Мастер академске студије, смер истраживање и развој, уписала је школске 2017/18. године на Природно-математичком факултету у Крагујевцу, где је августа 2018. године одбранила мастер рад. Докторске академске студије, модул Неорганска хемија, уписала је школске 2018/19. године на Природно-математичком факултету, Универзитета у Крагујевцу. Током докторских студија, провела је четири месеца (1. октобар 2019 – 1. фебруар 2020. године) на Факултету за хемију и хемијску технологију Универзитета у Љубљани у истраживачкој групи професора др Истока Турела, где је урадила део експеримената који се односе на предложену тему докторске дисертације.

Запослена је на Природно-математичком факултету Универзитета у Крагујевцу. У звање истраживач приправник изабрана је 2019. године, док је у звање истраживач сарадник изабрана 2021. године. Била је ангажована на пројекту Фонда за науку Републике Србије у оквиру програма ИДЕЈЕ „Value-added biologics through eco-sustainable routes” (бр. пројекта: 7730810; 1. јануар 2022 – 31. октобар 2022. године) и на билатералном пројекту Србија – Словенија „Развој нових терапеутика на бази комплекса метала са азолима за лечење гљивичних инфекција” од 2023. до 2025. године. Члан је Српског хемијског друштва, Клуба младих хемичара Србије и Српског кристалографског друштва. Добитница је награде Зимске школе Протеомике на конференцији Српског хемијског друштва у Нишу 2019. године за најбоље постерско саопштење. Предмет њеног истраживања је синтеза и карактеризација комплекса метала са азолима који се клинички користе као антифунгални агенси, применом различитих спектроскопских и електрохемијских метода, као и рендгенске структурне анализе, испитивање њихових реакција са биолошки значајним молекулима, као и испитивање њихове антимикробне активности. До сада је објавила 16 научних радова у међународним научним часописима (један M21a, осам M21, пет M22, један M23 и један M24 категорије), 1 научни рад у националном научном часопису (M53 категорија) и 36 саопштења на међународним и националним научним конференцијама (осам M33, дванаест M34 и шеснаест M64 категорије). Активно учествује у раду са студентима биологије, екологије и хемије Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу, изводећи вежбе из предмета: Основи хемије за студенте основних академских студија биологије, Одабрана поглавља хемије за екологе за студенте основних академских студија екологије и Комплекси у медицини за студенте мастер студија хемије.

Article

Copper(II) and Zinc(II) Complexes with the Clinically Used Fluconazole: Comparison of Antifungal Activity and Therapeutic Potential

Nevena Lj. Stevanović ¹, Ivana Aleksić ², Jakob Kljun ³, Sanja Skaro Bogojević ², Aleksandar Veselinović ⁴, Jasmina Nikodinović-Runic ^{2,*}, Iztok Turel ^{3,*}, Miloš I. Djuran ^{5,*} and Biljana Đ. Glišić ^{1,*}

- ¹ Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Kragujevac, R. Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Serbia; nevena.stevanovic@pmf.kg.ac.rs
- ² Institute of Molecular Genetics and Genetic Engineering, University of Belgrade, Vojvode Stepe 444a, 11042 Belgrade, Serbia; ivana_aleksic@imgge.bg.ac.rs (I.A.); sanja.bogojevic@imgge.bg.ac.rs (S.S.B.)
- ³ Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana, Večna pot 113, SI-1000 Ljubljana, Slovenia; Jakob.Kljun@fkkt.uni-lj.si
- ⁴ Department of Chemistry, Faculty of Medicine, University of Niš, Blvd. Dr Zorana Djindjica 81, 18108 Niš, Serbia; aveselinovic@medfak.ni.ac.rs
- ⁵ Department of Chemical and Biological Sciences, Serbian Academy of Sciences and Arts, Knez Mihailova 35, 11000 Belgrade, Serbia
- * Correspondence: jasmina.nikodinovic@imgge.bg.ac.rs (J.N.-R.); Iztok.Turel@fkkt.uni-lj.si (I.T.); milos.djuran@pmf.kg.ac.rs (M.I.D.); biljana.glicic@pmf.kg.ac.rs (B.Đ.G.); Tel.: +381-11-397-6034 (J.N.-R.); +386-1-47-98-525 (I.T.); +381-34-300-251 (M.I.D.); +381-34-336-223 (B.Đ.G.)



Citation: Stevanović, N.L.; Aleksić, I.; Kljun, J.; Skaro Bogojević, S.; Veselinović, A.; Nikodinović-Runic, J.; Turel, I.; Djuran, M.I.; Glišić, B.Đ. Copper(II) and Zinc(II) Complexes with the Clinically Used Fluconazole: Comparison of Antifungal Activity and Therapeutic Potential. *Pharmaceuticals* **2021**, *14*, 24. <https://doi.org/10.3390/ph14010024>

Received: 11 December 2020

Accepted: 25 December 2020

Published: 30 December 2020

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



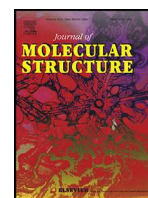
Copyright: © 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Copper(II) and zinc(II) complexes with clinically used antifungal drug fluconazole (fcz), $[\text{CuCl}_2(\text{fcz})_2] \cdot 5\text{H}_2\text{O}]_n$, **1**, and $[\text{ZnCl}_2(\text{fcz})_2] \cdot 2\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}]_n$, **2**, were prepared and characterized by spectroscopic and crystallographic methods. The polymeric structure of the complexes comprises four fluconazole molecules monodentately coordinated via the triazole nitrogen and two chlorido ligands. With respect to fluconazole, complex **2** showed significantly higher antifungal activity against *Candida krusei* and *Candida parapsilosis*. All tested compounds reduced the total amount of ergosterol at subinhibitory concentrations, indicating that the mode of activity of fluconazole was retained within the complexes, which was corroborated via molecular docking with cytochrome P450 sterol 14 α -demethylase (CYP51) as a target. Electrostatic, steric and internal energy interactions between the complexes and enzyme showed that **2** has higher binding potency to this target. Both complexes showed strong inhibition of *C. albicans* filamentation and biofilm formation at subinhibitory concentrations, with **2** being able to reduce the adherence of *C. albicans* to A549 cells in vitro. Complex **2** was able to reduce pyocyanin production in *Pseudomonas aeruginosa* between 10% and 25% and to inhibit its biofilm formation by 20% in comparison to the untreated control. These results suggest that complex **2** may be further examined in the mixed *Candida-P. aeruginosa* infections.

Keywords: copper(II) complex; zinc(II) complex; fluconazole; antifungal agents; anti-biofilm activity

1. Introduction

Over the last few decades, fungal strains causing invasive infections present not only a serious threat to human health worldwide, but also causing devastating effect for agriculture and the environment [1–3]. An estimated 1.5–2 million people die of a fungal infection each year and this mortality is mainly caused by *Aspergillus*, *Candida*, *Cryptococcus*, and *Pneumocystis* species [4]. Immunocompromised patients, such as recipients of solid organ transplants or hematopoietic stem cells, and those infected with HIV are most susceptible to these pathogens [5]. Four classes of organic compounds classified based on their mode of action are currently used for the treatment of fungal infections: the polyenes (including amphotericin B and nystatin), azoles, echinocandins (caspofungin and



Improvement of the anti-*Candida* activity of itraconazole in the zebrafish infection model by its coordination to silver(I)

Nevena Lj Stevanović^a, Biljana Đ. Glišić^{a,*}, Sandra Vojnović^b, Hubert Wadepohl^c, Tina P. Andrejević^a, Sonja Ž. Đurić^a, Nada D. Savić^d, Jasmina Nikodinovic-Runic^b, Miloš I. Djuran^e, Aleksandar Pavić^{b,*}

^a University of Kragujevac, Faculty of Science, Department of Chemistry, R. Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Serbia

^b Institute of Molecular Genetics and Genetic Engineering, University of Belgrade, Vojvode Stepe 444a, 11042 Belgrade, Serbia

^c Anorganisch-Chemisches Institut, Heidelberg University, Im Neuenheimer Feld 270, 69120 Heidelberg, Germany

^d University of Kragujevac, Institute for Information Technologies Kragujevac, Department of Science, Jovana Cvijića bb, 34000 Kragujevac, Serbia

^e Serbian Academy of Sciences and Arts, Knez Mihailova 35, 11000 Belgrade, Serbia

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 November 2020

Revised 13 January 2021

Accepted 15 January 2021

Available online 30 January 2021

Keywords:

Silver(I) complexes

Itraconazole

Candida albicans

Danio rerio

Infection model

ABSTRACT

In order to develop a novel antifungal agent, we synthesized and completely structurally characterized the silver(I) complex with the known antimycotic itraconazole (itraco), $[\text{Ag}(\text{itraco}-\text{N})_2]\text{NO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Agitraco). The spectroscopic and crystallographic results revealed that, in this complex, two itraco ligands are monodentately coordinated to the Ag(I) ion via the triazole nitrogen atom forming a cationic $[\text{Ag}(\text{itraco}-\text{N})_2]^+$ part, which is neutralized by the nitrate anion. The antifungal effect of silver(I) complex and itraconazole was evaluated against four different *Candida* species (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* and *C. krusei*) by means of minimal inhibitory concentrations (MICs). Agitraco complex shows enhanced antifungal activity than itraco, being 2.3- and 4.5-fold more active against *C. albicans* and *C. glabrata*, respectively. The complex was also more efficient in inhibiting yeast to hyphae transition process in *C. albicans*, which is an important step in its pathogenesis. Part of the improved activity of Agitraco could be attributed to the greater induction of reactive oxygen species in *Candida* spp. with respect to itraco. The toxicity evaluation in the zebrafish model (*Danio rerio*) suggests that the Agitraco complex has better therapeutic profile and improved antifungal efficacy with respect to the parent drug, which were also proven *in vivo* using the zebrafish model of lethal disseminated candidiasis. Interaction of Agitraco with bovine serum albumin (BSA) was investigated with the aim to assess its binding affinity toward this biomolecule.

© 2021 Elsevier B.V. All rights reserved.

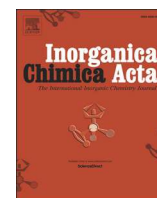
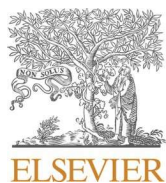
1. Introduction

Epidemiological reports released in the past three decades have stressed the emergence of fungal infections in humans, especially of invasive (systemic) infections, which are mainly associated with the epidemic of human immunodeficiency virus (HIV) infection, solid organ transplantation and diabetes, as well as with critically ill cancer patients treated with broad spectrum antimicrobial agents [1]. Infections with *Candida* species, candidiasis and candiduria, present the most prevalent fungal infections and rapidly increasing global threat to human health [2]. Nowadays, invasive candidiasis presents the 4th leading cause of all bloodstream infec-

tions worldwide, surpassing many bacterial pathogens [2]. According to the Leading International Fungal Education study, the global burden of invasive candidiasis accounts approximately 750,000 patients annually, with disturbingly high lethal incidence of nearly ~50%, despite of the applied antifungal therapy [3]. Although *Candida albicans* is the most prevalent life-threatening pathogen out of twenty different *Candida* species known to cause human infections, the recent studies revealed that global epidemiology of candidiasis is currently changing towards non-*albicans* *Candida* species, where *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. krusei* and *C. tropicalis* are recognized as emerging etiological agents of systemic diseases [4]. Among them, *C. parapsilosis* and *C. glabrata* are the most commonly associated with infections of neonates and patients in invasive care units or patients with solid malignancies and transplantations, while *C. krusei* and *C. tropicalis* infections present a particular risk in patients with hematological malignancies and corticosteroid therapy [5].

* Corresponding authors.

E-mail addresses: biljana.glisic@pmf.kg.ac.rs (B.Đ. Glišić), sasapavic@imgge.bg.ac.rs (A. Pavić).



Research paper

Silver(I) and gold(III) complexes with miconazole: The influence of the metal ion on the antimicrobial activity of the coordinated azole

Nevena Lj. Stevanović^a, Jakob Kljun^b, Sanja Skaro Bogojević^c, Dharmarajan Sriram^d,
Matija Zlatar^e, Jasmina Nikodinovic-Runic^c, Iztok Turel^{b,*}, Miloš I. Djuran^{f,*},
Biljana Đ. Glišić^{a,*}

^a University of Kragujevac, Faculty of Science, Radoja Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Serbia

^b University of Ljubljana, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, Večna pot 113, SI-1000 Ljubljana, Slovenia

^c University of Belgrade, Institute of Molecular Genetics and Genetic Engineering, Vojvode Stepe 444a, 11042 Belgrade, Serbia

^d Birla Institute of Technology & Science-Pilani, Medicinal Chemistry and Antimycobacterial Research Laboratory, Pharmacy Group, Hyderabad, India

^e University of Belgrade, Institute of Chemistry, Technology and Metallurgy, Department of Chemistry, Njegoševa 12, 11000 Belgrade, Serbia

^f Serbian Academy of Sciences and Arts, Knez Mihailova 35, 11000 Belgrade, Serbia

ARTICLE INFO

Keywords:

Silver(I)

Gold(III)

Miconazole

Antimicrobial activity

Antitubercular activity

Quorum sensing

ABSTRACT

To develop a new antimicrobial agent, we used the clinically approved antifungal azole, miconazole (mcz), as a ligand for the synthesis of silver(I) and gold(III) complexes. The new complexes $[\text{Ag}(\text{NO}_3\text{-O})(\text{mcz-N})_2]$ (**1**) and $[\text{AuCl}_3(\text{mcz-N})]$ (**2**) were synthesized and characterized by ^1H NMR, IR and UV–Vis spectroscopy and mass spectrometry, while the crystal structure of **1** was determined by single-crystal X-ray diffraction analysis. From the results obtained, it can be concluded that in both complexes, mcz is monodentately coordinated to the silver (I) and gold(III) ions through the imidazole nitrogen atom N3. In the solid state, complex **1** contains two mcz ligands and monodentately coordinated nitrate in the third position, while in the case of **2** gold(III) ion is coordinated by one mcz and three chlorido ligands, resulting in the expected square-planar arrangement around the metal center. DFT and TDDFT calculations were employed to elucidate the electronic structures and thermodynamic stability of the synthesized complexes in solution to complement the experimental findings. The coordination of mcz to silver(I) and gold(III) ions leads to an enhancement of its activity against Gram-negative *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* strains, while against the panel of *Staphylococcus aureus* and *Candida* species, only **2** shows improved activity compared to mcz. Both complexes **1** and **2** were tested *in vitro* for their antimycobacterial activity against the strain *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv and showed good growth inhibition with minimum inhibitory concentration (MIC) values of 3.12 and 8.69 μM , respectively, with complex **1** being twice effective as mcz (MIC = 7.50 μM). Complex **2** significantly reduced the production of pyocyanin, a virulence factor in *P. aeruginosa* controlled by quorum sensing, while this effect was not observed for **1**.

1. Introduction

The therapeutic potential of metal-based drugs has been established since ancient times [1]. Many metal compounds containing platinum, silver, iron, bismuth, and gold are used to treat a wide range of diseases, including fundamental medical problems such as bacterial and fungal infections [1]. Recently, the antibacterial and antifungal activities of 906 metal-containing compounds have been evaluated by Frei *et al.* [2], whereby the obtained results have revealed their impressively high success rate in comparison to organic-based drugs. This can be

attributed to the combination of an extended arsenal of potential modes of action of metal-based compounds (ligand exchange or release, formation of reactive oxygen species (ROS), redox activation, and catalytic generation of toxic species) with their three-dimensional shape [2]. Besides that, numerous metal-based compounds have been investigated as antiviral, anticancer, and antiparasitic agents and for other indications, however, only a few of them have successfully passed all phases of clinical trials [3,4].

Silver and its compounds have gained special attention in the design and development of novel metal-based antimicrobials [5–8]. Upon

* Corresponding authors.

E-mail addresses: Iztok.Turel@fkkt.uni-lj.si (I. Turel), milos.djuran@pmf.kg.ac.rs (M.I. Djuran), biljana.glisic@pmf.kg.ac.rs (B.Đ. Glišić).

<https://doi.org/10.1016/j.ica.2024.122393>

Received 7 August 2024; Received in revised form 24 September 2024; Accepted 25 September 2024

Available online 5 October 2024

0020-1693/© 2024 Published by Elsevier B.V.

Cite this: *Dalton Trans.*, 2022, **51**, 5322

Clinically used antifungal azoles as ligands for gold(III) complexes: the influence of the Au(III) ion on the antimicrobial activity of the complex†

Nevena Lj. Stevanović, ^a Jakob Kljun, ^{*b} Ivana Aleksic, ^c Sanja Skaro Bogojevic, ^c Dusan Milivojevic, ^c Aleksandar Veselinovic, ^d Iztok Turel, ^{*b} Miloš I. Djuran, ^{*e} Jasmina Nikodinovic-Runic ^{*c} and Biljana Đ. Glišić ^{*a}

In a search for novel antimicrobial metal-based therapeutic agents, mononuclear gold(III) complexes **1–7** of the general formula [AuCl₃(azole)], where azole stands for imidazole (im, **1**), 1-isopropylimidazole (ipim, **2**), 1-phenylimidazole (phim, **3**), clotrimazole (ctz, **4**), econazole (ecz, **5**), tioconazole (tcz, **6**) and voriconazole (vcz, **7**) were synthesized, characterized and biologically evaluated. In all complexes, the corresponding azole ligand is monodentately coordinated to the Au(III) via the imidazole or triazole nitrogen atom, while the remaining coordination sites are occupied by chloride anions leading to the square-planar arrangement. *In vitro* antimicrobial assays showed that the complexation of inactive azoles, imidazole, 1-isopropylimidazole and 1-phenylimidazole, to the Au(III) ion led to complexes **1–3**, respectively, with moderate activity against the investigated strains and low cytotoxicity on the human normal lung fibroblast cell line (MRC-5). Moreover, gold(III) complexes **4–7** with clinically used antifungal agents clotrimazole, econazole, tioconazole and voriconazole, respectively, have, in most cases, enhanced antimicrobial effectiveness relative to the corresponding azoles, with the best improvement achieved after complexation of tioconazole (**6**) and voriconazole (**7**). The complexes **4–7** and the corresponding antifungal azoles inhibited the growth of dermatophyte *Microsporum canis* at 50 and 25 µg mL⁻¹. Gold(III) complexes **1–3** significantly reduced the amount of ergosterol in the cell membrane of *Candida albicans* at the subinhibitory concentration of 0.5 × MIC (minimal inhibitory concentration), while the corresponding imidazole ligands did not significantly affect the ergosterol content, indicating that the mechanism of action of the gold(III)–azole complexes is associated with inhibition of ergosterol biosynthesis. Finally, complexes **5** and **6** significantly reduced the production of pyocyanin, a virulence factor in *Pseudomonas aeruginosa* controlled by quorum sensing, and increased cell survival after exposure to this bacterium. These findings could be of importance for the development of novel gold(III)-based antivirulence therapeutic agents that attenuate virulence without pronounced effect on the growth of the pathogens, offering a lower risk for resistance development.

Received 9th February 2022,
Accepted 9th March 2022

DOI: 10.1039/d2dt00411a

rsc.li/dalton

^aUniversity of Kragujevac, Faculty of Science, Department of Chemistry, R. Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Serbia. E-mail: biljana.glisic@pmf.kg.ac.rs^bFaculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana, Večna pot 113, SI-1000 Ljubljana, Slovenia. E-mail: Jakob.Kljun@fkt.uni-lj.si, Iztok.Turel@fkt.uni-lj.si^cInstitute of Molecular Genetics and Genetic Engineering, University of Belgrade, Vojvode Stepe 444a, 11042 Belgrade, Serbia. E-mail: jasmina.nikodinovic@imgge.bg.ac.rs^dUniversity of Niš, Faculty of Medicine, Department of Chemistry, Blvd. Dr Zorana Dinkića 81, 18108 Niš, Serbia^eSerbian Academy of Sciences and Arts, Knez Mihailova 35, 11000 Belgrade, Serbia. E-mail: milos.djuran@pmf.kg.ac.rs

†Electronic supplementary information (ESI) available: Fig. S1–S15 and Tables S1 and S2. CCDC 2099556–2099558 and 2099560. For ESI and crystallographic data in CIF or other electronic format see DOI: 10.1039/d2dt00411a

Introduction

The use of metals and metal compounds in medicine is diverse and includes fundamental wide-reaching medical problems such as bacterial and fungal,^{1,2} viral³ and parasitic⁴ infections. Besides that, metal-based drugs are used to treat cancer,⁵ rheumatoid arthritis and other inflammatory diseases,⁶ bipolar⁷ and gastrointestinal⁸ disorders. An important advantage of a medicinal use of metal complexes over organic drugs is that they have a versatile geometry, which may lead to a higher clinical success rate of metal complexes.⁹ Additionally, metal complexes can have different modes of action, which are often impossible to achieve with organic



ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ

Изјављујем да докторска дисертација под насловом:

Структура и биолошка активност комплекса бакра(II), сребра(I) и злата(III) са азолима као антифунгалним агенсима

представља оригинално ауторско дело настало као резултат сопственог истраживачког рада.

Овом Изјавом такође потврђујем:

- да сам једини аутор наведене докторске дисертације,
- да у наведеној докторској дисертацији нисам извршио/ла повреду ауторског нити другог права интелектуалне својине других лица,

У Крагујевцу, 17. јануар 2025. године,



потпис аутора

**ИЗЈАВА АУТОРА О ИСТОВЕТНОСТИ ШТАМПАНЕ И ЕЛЕКТРОНСКЕ ВЕРЗИЈЕ
ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Изјављујем да су штампана и електронска верзија докторске дисертације под насловом:
**Структура и биолошка активност комплекса бакра(II), сребра(I) и злата(III) са
азолима као антифунгалним агенсима**
истоветне.

У Крагујевцу, 17. јануар 2025. године,

Невена Стевановић
потпис аутора

ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Невена Љ. Стевановић,

☒ дозвољавам

☐ не дозвољавам

Универзитетској библиотеци у Крагујевцу да начини два трајна умножена примерка у електронској форми докторске дисертације под насловом:

Структура и биолошка активност комплекса бакра(II), сребра(I) и злата(III) са азолима као антифунгалним агенсима

и то у целини, као и да по један примерак тако умножене докторске дисертације учини трајно доступним јавности путем дигиталног репозиторијума Универзитета у Крагујевцу и централног репозиторијума надлежног министарства, тако да припадници јавности могу начинити трајне умножене примерке у електронској форми наведене докторске дисертације путем *преузимања*.

Овом Изјавом такође

☒ дозвољавам

☐ не дозвољавам¹

припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од следећих *Creative Commons* лиценци:

1) Ауторство

② Ауторство - делити под истим условима

¹ Уколико аутор изабере да не дозволи припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци, то не искључује право припадника јавности да наведену докторску дисертацију користе у складу са одредбама Закона о ауторском и сродним правима.

- 3) Ауторство - без прерада
- 4) Ауторство - некомерцијално
- 5) Ауторство - некомерцијално - делити под истим условима
- 6) Ауторство - некомерцијално - без прерада²

У Крагујевцу, 17. јануар 2025. године,

Hebert S. S. S. S.
потпис аутора

² Молимо ауторе који су изабрали да дозволе припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци да заокруже једну од понуђених лиценци. Детаљан садржај наведених лиценци доступан је на: <http://creativecommons.org/rs/>