

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ

Соња Ђурић

СИНТЕЗА, КАРАКТЕРИЗАЦИЈА И АНТИМИКРОБНА АКТИВНОСТ ПОЛИНУКЛЕАРНИХ КОМПЛЕКСА СРЕБРА(I) СА АРОМАТИЧНИМ АЗОТ-ДОНОРСКИМ ЛИГАНДИМА

Докторска дисертација

Крагујевац, 2024



UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC FACULTY OF SCIENCE

Sonja Đurić

SYNTHESIS, CHARACTERIZATION AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF POLINUCLEAR SILVER(I) COMPLEXES WITH AROMATIC NITROGEN-DONOR LIGANDS

Doctoral dissertation

Kragujevac, 2024

Име и презиме: Соња Ђурић

Датум и место рођења: 28. март 1988. године, Косовска Митровица, Република Србија Садашње запослење: професор хемије, Медицинска школа са домом ученика Косовска Митровица

Аутор

Докторска дисертација

Наслов: Синтеза, карактеризација и антимикробна активност полинуклеарних комплекса сребра(I) са ароматичним азот-донорским лигандима

Број страница: 87

Број слика: 46

Број библиографских података: 203

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 Глишић, ванредни професор, Природно-математички факултет, Унивезитет у Крагујевцу

Број и датум одлуке Већа универзитета о прихватању теме докторске дисертације: *IV-01-466/6, 15. јул 2020. године*

Захвалница

Ова докторска дисертација рађена је на Институту за хемију, Природноматематичког факултета, Универзитета у Крагујевцу под менторством др Биљане Ђ. Глишић, ванредног професора Природно-математичког факултета у Крагујевцу. Посебну захвалност дугујем свом ментору др Биљани Ђ. Глишић на стрпљењу, разумевању, помоћи и подрици при изради и писању ове докторске дисертације, која ми је помогла да напредујем у пољу истраживања, била пријатељски расположена и увек доступна за сарадњу.

Истакла бих и велику захвалност проф. др Милошу И. Ђурану, председнику комисије за оцену и одбрану ове докторске дисертације, који је прихватио да се придружим његовој истраживачкој групи, као и на саветима, сугестијама и коментарима при писању овог рада.

Захвалност дугујем и члановима комисије, др Душану Миливојевићу, научном сараднику у Институту за молекуларну генетику и генетичко инжењерство Универзитета у Београду, др Биљани Петровић, редовном професору Природноматематичког факултета у Крагујевцу и др Марији Ристић, научном сараднику Природно-математичког факултета у Крагујевцу за време које су издвојили и све коментаре које су дали приликом прегледа и оцене ове докторске дисертације.

Велику захвалност дугујем др Дејану Гурешићу, редовном професору Природноматематичког факултета Универзитета у Приштини са привременим седиштем у Косовској Митровици са којим сам започела експериментални рад при изради дисертације, имала изузетну сарадњу и који је прихватио да буде и члан комисије за оцену и одбрану ове докторске дисертације.

Захваљујем се колегиницама из групе проф. Биљане Ђ. Глишић, на сарадњи и несебичној помоћи, које су се трудиле да ми сваки долазак у лабораторију буде пријатан и да осетим да припадам тиму.

Неизмерну захвалност дугујем својој и породици свог супруга која ме је увек бодрила и била поносна, својим родитељима на моралној и финансијској помоћи, који су увек веровали у мене и које сам се трудила да не изневерим, свом брату Ђорђу и сестрама Александри и Златани.

Огромну захвалност дугујем свом супругу Велимиру на стрпљењу, разумевању и безусловној подршци свих ових година брака, где смо постали поносни родитељи Видака, Јане, Ленке и Вукашина који су мој највећи животни успех.

Соња Ђурић

Апстракт

У овој докторској дисертацији описана је синтеза, структурна карактеризација и биолошка активност осам комплекса сребра(I) са различитим ароматичним азотдонорским лигандима (1,10-фенантролин, 5,6-епокси-5,6-дихидро-1,10-фенантролин, 1,5-нафтиридин, 1,2-*bis*(4-пиридил)етан и 1,2-*bis*(4-пиридил)етен). У циљу испитивања утицаја контра-анјона на структурне карактеристике комплекса сребра(I), у њиховој синтези су коришћене различите соли сребра(I) (AgNO₃, AgCF₃SO₃ и AgCF₃COO). Испитивана је антимикробна активност синтетисаних комплекса сребра(I) према различитим бактеријама и гљивицама, као и њихов цитотоксични ефекат на нормалној ћелијској линији фибробласта плућа (MRC-5). У појединим случајевима, одређена је антитуморска активност комплекса на основу *in vitro* испитивања цитотоксичности на различитим ћелијским линијама тумора, као и ембриотоксичност на *in vivo* моделу зебра рибица (*Danio rerio*). У циљу дефинисања афинитета синтетисаних комплекса сребра(I) према биолошки значајним молекулима, испитиване су њихове интеракције са нуклеинским киселинама (DNA) и протеинима (албумин говеђег серума, BSA).

У првом делу докторске дисертације приказан је значај комплекса различитих јона метала у медицини са посебним освртом на комплексе сребра(I) који показују значајну антимикробну и антитуморску активност. У другом делу дисертације детаљно су описани поступци за синтезу комплекса и методе за њихову структурну карактеризацију и биолошко испитивање. У делу дисертације који се односи на дискусију резултата приказани су резултати спектроскопске и кристалографске карактеризације синтетисаних комплекса, резултати добијени испитивањем њихове антимикробне и антитуморске активности и токсичности, као и испитивањем њихових интеракција са биолошки значајним молекулима.

Кључне речи

- Комплекси сребра(I)
- Азот-донорски лиганди
- Спектроскопска карактеризација
- Рендгенска структурна анализа
- Антимикробна активност
- Цитотоксичност
- Ембриотоксичност
- DNA интеракције
- BSA интеракције

Abstract

This doctoral dissertation describes the synthesis, structural characterization and biological activity of eight silver(I) complexes with different aromatic nitrogen-donor ligands (1,10-phenanthroline, 5,6-epoxy-5,6-dihydro-1,10-phenanthroline, 1,5-naphthyridine, 1,2-*bis*(4-pyridyl)ethane and 1,2 *-bis*(4-pyridyl)ethene). In order to investigate the influence of the counter anions on the structural characteristics of the synthesized silver(I) complexes, different silver(I) salts (AgNO₃, AgCF₃SO₃ and AgCF₃COO) were used in their synthesis. The antimicrobial activity of the synthesized silver(I) complexes was studied against various bacterial and fungal strains, as well as their cytotoxic effect on the normal human lung fibroblast cell line (MRC-5). In particular cases, the antitumor activity of the complexes was determined based on the evaluation of their *in vitro* cytotoxicity on different human tumor cell lines, as well as embryotoxicity *in vivo* in the zebrafish model (*Danio rerio*). In order to determine the affinity of the synthesized silver(I) complexes towards biologically important molecules, their interactions with nucleic acids (DNA) and proteins (bovine serum albumin, BSA) were investigated.

In the first part of this doctoral dissertation, the importance of metal complexes in medicine is presented, with special attention on the silver(I) complexes that have shown significant antimicrobial and antitumor activities. In the second part of the dissertation, the procedures for the synthesis of complexes and methods for their structural characterization and biological evaluation are described in detail. The results of the spectroscopic and crystallographic characterization of the synthesized complexes and the results obtained by testing their antimicrobial and antitumor activity and toxicity, as well as studying their interactions with biologically important molecules, are presented in the part of the dissertation related to the discussion of the results.

Keywords

- Silver(I) complexes
- Nitrogen-donor ligands
- Spectroscopic characterization
- Single-crystal X-ray diffraction analysis
- Antimicrobial activity
- Cytotoxicity
- Embryotoxicity
- DNA interactions
- BSA interactions

САДРЖАЈ

1.	ОПШТИ ДЕО	1
1.1.	Улога комплекса метала у медицини	2
1.2.	Примена сребра и његових једињења у медицини	8
1.2.1.	Комплекси сребра(I) са фосфор-донорским лигандима	10
1.2.2.	Комплекси сребра са N-хетероцикличним карбенима	17
1.2.3.	Комплекси сребра(I) са ароматичним N-хетероцикличним једињењима	20
2.	ПРЕДМЕТ ИСТРАЖИВАЊА	25
3.	ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО	
3.1.	Хемикалије и реагенси	29
3.2.	Физичка мерења	29
3.2.1.	Елементална микроанализа	29
3.2.2.	IR мерења	29
3.2.3.	- NMR мерења	29
3.2.4.	- UV-Vis мерења	29
3.2.5.	Кондуктометријска мерења	29
3.2.6.	Испитивање стабилности комплекса у раствору	30
3.3.	Синтеза комплекса Ад1-Ад8	30
3.4.	Рендгенска структурна анализа комплекса Ag2 – Ag5	30
3.5.	Биолошка испитивања	35
3.5.1.	Испитивање антимикробне активности	35
3.5.2.	Испитивање филаментације C. albicans у присуству комплекса	35
3.5.3.	Испитивање инхибиције формирања биофилма C. albicans	36
3.5.4. PAOI	Испитивање инхибиције формирања мешовитог биофилма C. albicans и P. aer	uginosa 36
3.5.5.	Испитивање цитотоксичне активности	36
3.5.6.	Испитивање токсичности на моделу ембриона зебра рибица	
3.6.	Интеракције са биомолекулима	
3.6.1.	Испитивање интеракција комплекса са DNA	
3.6.2.	Испитивање интеракција комплекса са BSA	39
4.	РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА	40
4.1.	Синтеза и карактеризација Ag1 и Ag2 комплекса	41
4.1.1.	Опис кристалне структуре Ag2 комплекса	41
4.1.2.	Спектроскопска карактеризација	43
4.1.3.	Испитивање стабилности комплекса у раствору	45
4.1.4. компл	Испитивање антимикробне и антипролиферативне активности Ag1 и Ag2 екса	46
4.1.5.	Интеракције са DNA	

4.2. Синтеза, карактеризација и биолошка активност комплекса Ag3 – Ag5	
4.2.1. Опис кристалних структура	50
4.2.2. Спектроскопска карактеризација	
4.2.3. Испитивање стабилности комплекса у раствору	53
4.2.4. Испитивање антимикробне активности комплекса Ag3 – Ag5	
4.2.5, In vivo токсичност комплекса Ag3 – Ag5 на моделу ембриона зебра ри	бице57
4.3. Синтеза, карактеризација и биолошка активност комплекса Ag6 – Ag8	60
4.3.1. Спектроскопска карактеризација	61
4.3.2. Испитивање антимикробне активности Ag6 – Ag8 комплекса	
4.3.3. Испитивање DNA/BSA интеракција Ад6 – Ад8 комплекса	64
5. ЗАКЉУЧАК	70
6. ЛИТЕРАТУРА	72
7. ПРИЛОГ	
ЛИСТА СКРАЋЕНИЦА И ТЕРМИНА КОРИШЋЕНИХ У ТЕКСТУ	
СПИСАК СЛИКА	
СПИСАК ТАБЕЛА	
Биографија са подацима о досадашњем раду	

1. ОПШТИ ДЕО

1.1. Улога комплекса метала у медицини

Јони метала имају важну улогу у правилном функционисању метаболичких процеса код свих живих организама.¹ Они учествују у изградњи ткива, регулисању осмотског притиска, одржавању рН вредности крви и кофактори су различитих металоензима. По заступљености у организму, метали се могу поделити на макроелементе (Na, K, Ca и Mg), елементе у траговима (Fe, Cu и Zn) и елементе у микротраговима (Mn, Mo, Co, Cr, V, Ni, Cd, Sn, Pb и Li). Смањен унос појединих јона метала може довести до физиолошких поремећаја, као што су пернициозна анемија, која је последица недостатка гвожђа, успоравање раста који се доводи у директну везу са недовољним уносом цинка, и срчане болести код новорођенчади, која настаје услед недовољног уноса бакра. С друге стране, важно је поменути да превелик унос јона метала може изазвати токсичне ефекте.¹ Разумевање функције јона метала на молекулском нивоу у лечењу болести које су изазване њиховим недостатком или прекомерним уносом представља важан аспект изучавања медицинске неорганске хемије. На слици 1 су приказани различити аспекти изучавања медицинске неорганске хемије. На слици 1 су приказани различити аспекти изучавања медицинске неорганске хемије. На слици 1 су



Слика 1. Различити аспекти проучавања медицинске неорганске хемије¹

Осим физиолошких функција, јони метала улазе у састав различитих фармацеутских формулација које се примењују за лечење различитих болести.¹ Поред тога, комплексна једињења метала се користе и као дијагностички агенси за откривање појединих патолошких стања.²

Италијански хемичар Пејрон (*Peyrone*) синтетисао је, 1843. године, једињење платине(II), које је назвао Пејронова со.² Скоро пола века након овог открића, Вернер (*Werner*) је одредио кристалну структуру овог једињења, које представља комплексно једињење платине(II), *cis*-[PtCl₂(NH₃)₂] (цисплатина).¹ Антитуморски потенцијал овог квадратно-планарног комплекса платине(II) је потврђен у експериментима на мишевима 1969. године.^{3,4} Цисплатина (Слика 2, 1) је одобрена 1978. године за лечење тумора јајника и тестиса од стране Америчке управе за храну и лекове (FDA, енгл. *U.S. Food and*

Drug Administration).⁵ Међутим, упоредо с повећањем броја и врста тумора у чијем лечењу је коришћена цисплатина, вршене су и интензивна токсиколошка испитивања овог једињења, која су показала да је цисплатина неуротоксична,⁶ нефротоксична^{7,8} и хемотоксична.⁹ Након сазнања да се применом цисплатине значајно успорава раст и развој појединих врста тумора, али и да се истовремено отвара могућност за друга патолошка стања усред њеног токсичног дејства, започето је истраживање других комплекса платине (Слика 2, 2 - 4). Иако је синтетисан велики број комплекса платине, само се још два примењују за лечење туморских обољења у целом свету, карбоплатина (2) и оксалиплатина (3). Карбоплатина је у клиничкој употреби од 1989. године и користи се у лечењу многих врста тумора као што су тумор јајника, плућа, врата и мозга.^{10,11} С друге стране, оксалиплатина се примењује за лечење тумора дебелог црева од 1996. године у Европи, а од 2002. године у Америци.¹² Међутим, показало се да је комбинована терапија, која се заснива на примени оксалиплатине са 5-флуороурацилом и леуковорином, много ефикаснија од терапије помоћу самог комплекса платине(II) у лечењу тумора дебелог црева (FOLFOX) протокол.¹² Сатраплатина (4) представља октаедарски комплекс платине(IV), који је показао значајно антитуморско дејство на ћелијама тумора простате.¹³ И поред клиничке примене, комплекси карбоплатина и оксалиплатина су испољили и значајну токсичност, због чега се и даље интензивно ради на развоју нових комплекса платине. Неки од комплекса који су били или су тренутно у фазама клиничких испитивања су зениплатина, спироплатина, ароплатина, циклоплатам, себриплатина, ормаплатина и мибоплатина.¹⁴

И поред примене комплекса платине(II) у терапеутске сврхе као антитуморских агенаса, њихови токсични ефекти су подстакли истраживање комплекса других јона метала, који би имали сличне или боље антитуморске ефекте у лечењу патолошких стања, али и мању токсичност.¹ Лечење тумора засновано на једињењима платине(II) је, у великој мери, отежано развојем резистенције. Поред тога, познато је да биомолекули који садрже атом сумпора имају важну улогу у хемиотерапији лековима на бази платине и то пре свега због њиховог великог афинитета према Pt(II) јону.¹ Наиме, иреверзибилно везивање цисплатине за интрацелуларне тиолато лиганде сматра се главним фактором инактивације. Због тога се упоредо са развојем антитуморских лекова на бази платине, развијала и медицинска неорганска хемија комплекса рутенијума.¹⁵⁻¹⁷ Уопштено говорећи, комплекси рутенијума су нестабилни на ваздуху или у присуству влаге. Ипак, синтетисани су различити комплекси овог метала који су стабилни у воденим и алкохолним растворима, и који су мање осетљиви на присуство кисеоника и сумпора као донорских атома.¹⁸

При физиолошким условима, рутенијум је стабилан у два оксидациона стања, +2 и +3, од којих је редуковани облик реактивнији.¹⁹ За оба оксидациона стања, карактеристична геометрија комплекса рутенијума је октаедарска. Променом лиганада у структури комплекса рутенијума може се утицати на њихову биолошку активност. Аксијално координовани лиганди, најчешће, учествују у супституционим реакцијама са биомолекулима. Важно је напоменути да је брзина супституције ових лиганада реда величине 10^{-2} до 10^{-3} s, слично комплексима платине, и налази се у опсегу просечног живота ћелије.²⁰ Ипак, показало се да су комплекси рутенијума мање токсични и селективнији у односу на комплексе платине који се користе у лечењу различитих врста тумора.²¹

Иако је још 1952. године утврђено да комплекси рутенијума са полипиридинским типом лиганда показују антитуморску активност,²² до данас ниједан комплекс рутенијума није клинички одобрен за лечење канцера. Неки од комплекса рутенијума су, ипак, били предмет клиничких испитивања. Њихове структурне формуле су приказане на слици 2 (КР1019 (5),²³ NKP1339 (6),²⁴ NAMI-A (7)²⁵ и TLD1433 (8)²⁶).



Слика 2. Структурне формуле неких комплекса платине(II/IV) и рутенијума(III) који показују антитуморску активност

Комплекси NAMI-A и KP1019 су структурно слични, али се њихове активности значајно разликују при *in vitro* и *in vivo* условима. Комплекс NAMI-A показује значајан антиангиогенетски, као и антиметастатски потенцијал код секундарних тумора.²⁷ С друге стране, комплекс KP1019 показује широк спектар антитуморске активности према већем броју примарних тумора. Комплекс NKP1339 се разликује од KP1019 у врсти катјона и представља његов синтетички прекурсор. У поређењу са KP1019, NKP1339 има значајно већу растворљивост у води, а самим тим и већу биорасположивост, што је омогућило примену значајно већих доза код пацијената.²⁸ Комплекс TLD1433 је у I и IIa фази клиничких испитивања, као агенс за фотодинамичку терапију тумора простате.²⁹ Од свих ових комплекса, највећи потенцијал за примену у медицини има NKP1339. Приликом примене овог комплекса долази до значајног смањења тумора, које је још израженије у комбинованој терапији са сорафенибом. Механизам деловања комплекса NKP1339 се

заснива на редукцији Ru(III) до Ru(II) у туморској ћелији, који утиче на регулисање стреса ендоплазматичног ретикулума и доводи до ћелијске смрти, односно апоптозе.²⁹

Међу антитуморским агенсима који не садрже платину, комплекси злата привлаче све већу пажњу због свог инхибиторног деловања на раст туморских ћелија.¹ Важно је напоменути да се једињења злата(I) примењују за лечење реуматоидног артритиса (Слика 3, комплекси 9 – 11).^{30,31} Првобитно је утврђено да терапија тиолатозлато(I) комплексима значајно смањује бол у зглобовима у групи пацијената који немају туберкулозу, што је навело француског лекара Форестијера (*Forestier*) да испита њихову могућу примену у лечењу реуматоидног артритиса.³¹ Тиолатозлато(I) комплекси су почели да се примењују пре око једног века у лечењу реуматоидног артритиса, при чему се још увек користе.



Слика 3. Структурне формуле комплекса злата(I) који се примењују у лечењу реуматоидног артритиса

На слици 4 приказане су структурне формуле комплекса злата(I/III), који су показали значајно бољу антитуморску активност у односу на цисплатину, и чији се механизам деловања заснива на инхибицији тиоредоксин редуктазе (TrxR) и глутатион редуктазе.¹ Злато(I) комплекси који садрже фосфоле, фосфине или карбене као лиганде представљају најчешће испитиване комплексе злата(I).¹ Комплекси злата(I) са фосфолом као лигандом садрже фосфациклопентадиенски фрагмент, који је координован за јон метала.

Комплекс злата(I) 12 (GoPI) има наномоларну EC₅₀ вредност (половина максималне ефективне концентрације) инхибиције глутатион редуктазе, што је у микромоларним IC₅₀ вредностима (половина сагласности ca инхибиторне концентрације), које су добијене приликом *in vitro* испитивања на ћелијама глиобластома.³² Супституцијом 2-пиридинског лиганда са 2-тиофенил групом добијен је комплекс који има сличне вредности ензимске инихибиције и антипролиферативне активности. Сличне вредности инхибиције ензима TrxR су добијене приликом третмана малигних ћелија аналогним комплексом платине(II). С друге стране, аналогни комплекс платине(II) је, у мањој мери, инхибирао глутатион редуктазу, при чему је показао и мању антипролиферативну активност према ћелијама глиобластома.³³ Супституцијом хлоридо лиганда у GoPI комплексу тиоглукозом (шећерна компонента у структури ауранофина) постиже се већа стабилност, добра инхибиција TrxR, као и добар цитотоксични ефекат према MCF-7 ћелијским линијама тумора дојке.³⁴

У комплексу 13, четири фосфинска лиганда су координована за централни јон метала.³⁵ Овај комплекс злата(I) је показао наномоларну активност на ћелијама тумора простате, колона и гастроинтестиналног тракта. Поред тога, испитивања у *in vivo* условима су потврдила антитуморски потенцијал комплекса 13.^{35,36} Наиме, приликом прелиминарног испитивања овог комплекса на псима добијен је обећавајући фармакокинетички профил, који омогућава овом једињењу улазак у фазу I клиничких испитивања.³⁶



Слика 4. Структурне формуле комплекса злата(I/III) који су показали значајну антитуморску активност

Значајну антитуморску активност и селективност према туморским ћелијама јетре показује комплексно једињење злата(I) 14, које садржи *N*-хетероциклични карбен (NHC) као лиганд.³⁷ Неутрални комплекс 15 (Слика 4) представља структурни аналог комплекса 14 и, такође, инхибира раст туморских ћелија, али није ефикасан као одговарајући катјонски комплекс.³⁷ Разлика у антитуморској активности ова два струкурно слична комплекса је последица њихове различите липофилности и наелектрисања. Комплекс 14 се задржава у митохондријама и активира апоптозу.³⁷ Поред тога, приликом испитивања инхибиције ћелијског TrxR ензима у присуству комплекса 14, користећи модел реакције са цистеином или селеноцистеином, нађено је да карбенски лиганд може бити супституисан тиолом или селенотиолом.³⁸

Поред комплекса злата(I), и једињења злата(III) представљају потенцијалне антитуморске агенсе.¹ Међутим, недовољна растворљивост комплекса злата(III) при физиолошким условима је главни проблем за њихову потенцијалну примену.³⁹ И поред овог значајног ограничења, с обзиром на све већу потребу за новим антитуморским агенсима, комплексна једињења злата(III) привлаче све већу пажњу хемичара. На слици 4 приказане су структурне формуле комплекса злата(III) 16 – 20 са азот-, сумпор- и угљеник-донорским лигандима, који су показали значајну антитуморску активност на различитим туморским ћелијама.

Катјонски комплекси злата(III) са азот-донорским лигандима, као што су етилендиамин, терпиридин, диетилентриамин и фенантролин, показали су значајну цитотоксичност на ћелијској линији тумора јајника A2780.⁴⁰ Од свих наведених, комплекс злата(III) са терпиридином (Слика 4, 16) показао је највећу активност, са IC₅₀ вредношћу која је приближно десет пута мања од одговарајуће вредности за цисплатину.⁴⁰ Важно је напоменути да је комплекс 16 стабилан при физиолошким условима, што представља неопходан предуслов за клиничку примену. Још један веома интересантан комплекс злата(III) са азот-донорским лигандима је комплекс 17, који садржи тетраарилпорфирински лиганд (Слика 4) и који је показао цитотоксичност према ћелијама назофарингеалног тумора SUNE1.⁴¹ Присуство брома и хлора, као и метил или метокси групе у *p*-положају фенил група на порфиринском прстену значајно је смањило цитотоксични ефекат комплекса на испитиваним ћелијским линијама тумора. Ипак, сви испитивани комплекси злата(III) са тетраарилпорфиринима су показали вишеструко већу цитотоксичност у односу на цисплатину.

Комплекси злата(III) са сумпор-донорским лигандима, као што су дитиокарбамати, показали су, такође, већу цитотоксичност у односу на цисплатину.^{42,43} Структурне формуле два представника ове групе комплекса су приказане на слици 4 (комплекси 18 и 19).^{42,43} Комплекси 18 и 19 су стабилни при физиолошким условима и инхибирају синтезу нуклеинских киселина, при чему интерагују са DNA. Комплекс 20 са 2-фенилпиридином има микромоларне IC₅₀ вредности на ћелијама леукемије MOLT-4 и тумора мишева C2C12, при чему показује већу активност од одговарајуће активности цисплатине.⁴⁴

Међу комплексима који имају антитуморску активност, веома су важни и често проучавани комплекси паладијума(II).¹ Јон Рd(II) је изоелектронски са Pt(II) јоном, због чега је за очекивати да ће и комплекси паладијума(II) имати добру антитуморску активност. Мања нефротоксичност комплекса паладијума(II) произилази из чињенице да се хелатни лиганди ових комплекса не могу супституисати сулфхидрилним групама протеина у бубрежним тубулама, што представља њихову предност у односу на клинички коришћене комплексе платине(II).^{45,46} Ипак, комплекси платине(II) су термодинамички и кинетички стабилнији од структурних паладијум(II) аналога, при чему се супституција лиганада у комплексима паладијума(II) одвија 10⁴ - 10⁵ пута брже.^{47,48} Као последица тога, комплекси *cis*-[PdCl₂(en)] и *cis*-[PdCl₂(dach)] имају мању активност у односу на cis-[PtCl₂(en)] и cis-[PtCl₂(dach)] комплексе (en је етилендиамин, dach је 1,2-диаминоциклохексан).⁴⁹ Наиме, услед брзе супституције лиганада, комплекси паладијума(II) нису довољно стабилни при физиолошким условима, што, у значајној мери, умањује вероватноћу да ће комплекс доспети до циљане ћелије.^{50,51} Избор лиганда у синтези комплекса паладијума(II) доприноси повећању њихове кинетичке и термодинамичке стабилности при физиолошким условима. 52,53 У складу са тим, лиганди који садрже сумпор- и азот-донорске атоме су најчешће коришћени у синтези комплекса паладијума(II). На слици 5 су приказане структурне формуле комплекса паладијума(II) 21 – 23, који су показали значајну антитуморску активност у *in vitro* и *in vivo* испитивањима.54,55



Слика 5. Структурне формуле антитуморски активних комплекса паладијума(II)

У реакциіи алдехида или кетона ca тиосемикарбазидима настају који представљају тиосемикарбазони, важне лиганде за синтезу комплекса паладијума(II).⁵⁴ Комплекс 21 садржи 2-хидроксиацетофенон-тиосемикарбазон и у *in* vitro условима показао је значајно већу активност на туморским ћелијским линијама леукемије HL-60 и U-937 у односу на цисплатину, 5-флуороурацил и хидроксиуреу.⁵⁴ Комплекси паладијума(II) са сахаринато лигандом 22 и 23, показали су активност према туморским ћелијама дојке MCF-7 и MDA-MB-231.55 Ова активност је потврђена и у *in* vivo условима приликом експеримената на Balb/с мишевима. Поред тога, комплекси 22

и 23 инхибирају формирање тубула, што указује на њихову могућу антиинвазивну активност.

Поред значајне антитуморске активности, комплекси паладијума(II) су се веома добро показали као катализатори хидролитичких реакција код раскидања пептидне везе.^{56,57} Могући механизам ове реакције је приказан на слици 6. У првом ступњу реакције долази до координације Pd(II) јона за електрон-донорске атоме у полипептидном ланцу (24), и то пре свега за сумпор из метионина или азот из имидазоловог прстена хистидина. Интермедијерна комплексна врста (25) реагује са водом, дајући комплексну со 26 и со аминокиселине 27 у киселим реакционим условима.



Слика 6. Претпостављени механизам хидролизе пептидне везе у пептидима и протеинима у присуству комплекса паладијума(II) као катализатора^{56,57}

Комплекси метала се примењују у медицини и као контрастни агенси за дијагностику различитих болести помоћу магнетне резонанце.⁵⁸ Неки од контрастних агенаса су комплекси гадолинијума(III) и мангана(II), чије су структурне формуле приказане на слици 7 (28 - 30). Најзначајнији контрастни агенс, који је нашао примену у клиничкој пракси, представља Gd-DOTA комплекс 29 са азакрунским етром.^{59,60} Поред тога, важно је поменути и Mn-DPDP комплекс 30, који је повучен из клиничке примене у Европи и Америци због токсичних ефеката који су последица ослобађања Mn(II) јона.⁶¹



Слика 7. Структурне формуле неких комплекса гадолинијума(III) и мангана(II) који се користе у медицини као контрастни агенси

Комплекси сребра(I) имају значајну биолошку активност, пре свега антибактеријску, антифунгалну, антисептичну и антинеопластичну.¹ Показало се да на комплексе овог јона метала микроорганизми не показују резистенцију, коју су развили различити сојева бактерија и гљивица према неким другим клинички коришћеним антимикробним агенсима. Због тога ће у наредном поглављу Општег дела докторске дисертације бити речи о биолошкој активности комплекса сребра(I).

1.2. Примена сребра и његових једињења у медицини

Антимикробне особине сребра су познате још од давних времена.⁶² Феничани су примењивали сребро за чување појединих производа и напитака у боцама које су биле обложене овим металом, чиме су спречавали контаминацију прехрамбених производа. Сребро се примењивало и у старој Грчкој и Римском царству као дезинфекционо

средство. Хипократ је користио сребро за ублажавање симптома појединих болести које би настајале услед контаминације рана на кожи. Поред примене сребра, у појединим историјским списима, забележена је и примена сребро(I)-нитрата у фармацеутске сврхе.⁶²

Са развојем науке у средњем веку, а пре свега алхемије, сребро и његова једињења добијају све више пажње.⁶² У то време, овај метал се примењивао за лечење срчаних болести, пречишћавање крви и за уклањање непријатног задаха. На почетку 16. века, познати алхемичар Парацелзус (*Paracelsus*) користио је сребро(I)-нитрат за третман рана. Поред тога, племићи су употребљавали прибор од сребра за јело и пиће, као и за чување хране, штитећи се, на тај начин, од разних болести. Тада се веровало да је племићка крв плава, услед појаве плаве боје на кожи, за коју се данас зна да је последица таложења сребра у поткожним ткивима (*аргирија*).⁶² Први велики допринос примени сребра у лечењу пацијената дао је амерички хирург, Џејмс Марион Симс (*James Marion Sims*), који је, у првој половини 19. века, користио сребрне конце за ушивање рана, спречавајући на тај начин компликације током опоравка услед настанка инфекција.⁶³ Значајан помак у примени сребра и његових једињења у терапеутске сврхе остварен је крајем 19. века употребом 1% раствора АgNO₃ за спречавање инфекције ока код тек рођених беба, за шта је био заслужан немачки лекар Карл Зигмунд Франц Креде (*Carl Siegmund Franz Credé*).⁶⁴

Након овог открића, лекари почињу да користе колоидно сребро у клиничкој пракси за лечење различитих болести ока, гонореје, епилепсије и неких тропских болести.⁶² Ово је претходило открићу антибиотика пеницилина 1928. године, након чега се примена колоидног сребра у медицинске сврхе значајно смањила.⁶⁵ Ипак, микроорганизми су веома брзо развили резистентност на пеницилин, због чега је средином 20. века пажња поново посвећена сребру и његовим једињењима. Један од првих комплекса сребра(I) који је нашао клиничку примену је сребро(I)-сулфадиазин (AgSD, **31**),⁶⁶ полимерни комплекс чија је структурна формула приказана на слици 8.



Слика 8. Структурна формула сребро(I)-сулфадиазина (AgSD)

Комплекс AgSD је слабо растворан у води. Лагано отпушта Ag(I) јоне, услед чега има продужено антибактеријско дејство, како према Грам-позитивним, тако и према Грам-негативним сојевима бактерија. Најчешће се користи у облику креме за заштиту рана приликом тешких опекотина.^{67,68} Комерцијално су доступне различите креме, које садрже AgSD комплекс као активни састојак. Што се тиче механизма деловања, овај комплекс интерагује са DNA, спречавајући транскрипцију овог биомолекула, а самим тим и размножавање бактерија, а реагује и са протеинима крвног серума. Активност AgSD комплекса не потиче искључиво од слободног Ag(I) јона, већ и од лиганда који показује антибактеријску активност. Поред тога, недавно је припремљен нанокомпозит који је садржавао AgSD и мезопорозни силицијум, и који је показао знатно дуже антибактеријско деловање у односу на AgSD комплекс према *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* и *Pseudomonas aeruginosa*.⁶⁹ Побољшање биолошке активности AgSD комплекса је примећено и након његовог превођења у наносуспензију и наношења на термостабилне хидрогелове.⁷⁰ Као резулат тога, постигнута је значајно мања цитотоксичност, већа биорасположивост и антибактеријска активност према *S. aureus*, *E. coli* и *P. aeruginosa*.⁷⁰ Додатак церијум-нитрата AgSD комплексу појачава његово антисептично деловање, због чега се ова комбинација користи за лечење најтежих облика опекотина.^{71,72}

Као што је већ напоменуто, велики проблем у лечењу микробних инфекција представља развој резистенције код сојева бактерија и гљивица на клинички коришћене лекове. Комплекс AgSD се клинички примењује од 1968. године, али се само двадесет година након тога почело говорити о резистенцији микробних сојева према овом агенсу.⁷² Комбинација 10 mM раствора комплекса AgSD и 5 mM раствора хинолонских антибиотика, нофлоксацина, пефлоксацина и еноксацина показала се ефикасном за превазилажење резистенције микробних сојева након *in vivo* експеримената на огледним мишевима, који су били инфицирани *P. aeruginosa* бактеријом.⁶⁸ Ипак, и поред овог значајног открића, резистентност микроорганизама према Ag(I) јонима може се развити у случају честе примене агенаса на бази овог јона метала. У прилог томе иде и чињеница да је бактерија Pseudomonas stutzeri AG259 изолована на руди сребра 1984. године у Jути.⁷³ Испитивана је резистентност бактерије Salmonella typhimurium на Ag(I) јоне код пацијената са тешким опекотинама.⁷³ Нађено је да сви узорци испитиване бактерије садрже плазмид који кодира сребро-специфични протеин SilE, везујући Ag(I) јон за ћелијску мембрану и блокирајући његову даљу ресорпцију. Поред тога, постоје и SilA, SilB, SilC, SilP, SilR и SilS протеини, који спречавају дифузију Ag(I) јона у ћелију.⁷⁴ Важно је напоменути да, поред *P. aeruginosa* и *S. typhimurium*, *E. coli*, *Enterobacter* cloacae, Klebsiella pneumonia и Acinetobacter buamannii развијају резистенцију ка антибактеријским препаратима на бази сребра.^{75,76}

Проблем резистентности се може превазићи синтезом нових комплекса сребра(I). Најзначајнији комплекси сребра(I) у контексту њихове биолошке активности садрже фосфор- и азот-донорске лиганде.⁷⁷ Ови комплекси показују значајну антимикробну и антитуморску активност, а веома су интересантни и са структурне тачке гледишта. Стога, у наредним поглављима биће речи о биолошкој активности комплекса сребра(I) са фосфинима, *N*-хетероцикличним карбенима (NHC) и ароматичним *N*-хетероцикличним једињењима.

1.2.1. Комплекси сребра(I) са фосфор-донорским лигандима

Фосфор-донорски лиганди представљају један од најзначајнијих и најчешће коришћених типова лиганада у координационој хемији. Фосфини или фосфани представљају најзначајније фосфор-донорске лиганде у координационој хемији сребра(I), при чему се одговарајућим избором супституента на фосфор-донорском атому може постићи жељена биолошка активност и растворљивост.⁷⁷ Фосфини су σ -донори и π -акцептори, због чега је веома значајна електронска природа супституента на атому фосфора. Поред тога, волуминозност која настаје услед присуства ароматичних група на фосфору може бити кључна за одређену биолошку активност.

На слици 9 приказане су структурне формуле комплекса сребра(I), који су добијени у реакцији сребро(I)-трифлата и одговарајућег фероценил-амид фосфина

(комплекси **32** и **33**).⁷⁸ Испитивана је њихова антитуморска активност на ћелијама мишева (NIH-3T3 и PC-12) и хуманим туморским ћелијама (A549 и Hep-G2), при чему су они показали значајну активност која је упоредива са одговарајућом активношћу цисплатине на NIH-3T3 и A549 ћелијама. Одређене IC₅₀ вредности за комплекс **32** износе 23,3 μ M на NIH-3T3 и 21,0 μ M на A549 ћелијској линији, док је слабију активност показао комплекс **33** за који су израчунате IC₅₀ 42,3 μ M за NIH-3T3 и 26,4 μ M за A549 ћелије.⁷⁸



Слика 9. Структурне формуле комплекса сребра(I) са фероценил-амид фосфинима који су показали значајну антитуморску активност⁷⁸

Синтетисани су и комплекси сребра(I) са различитим фосфор-донорским лигандима и камфорсулфонском киселином, чије су структурне формуле приказане на слици 10(34-41).⁷⁹ На основу кристалографске анализе закључено је да у чврстом стању ови комплекси формирају супрамолекулске агрегате, димере, макроцикле и координационе полимере. Испитивана је антимикробна активност ових комплекса према седам патогених врста, *S. aureus, E. coli, K. pneumoniae, P. aeruginosa, A. baumannii, C. albicans* и *Cryptococcus neoformans var. grubii*, при чему су они показали добру активност према испитиваним сојевима. Највећу активност је показао комплекс **40** који садржи три(*o*-толил)фосфин (MIC = 6 – 25 nmol/mL), који је и најмање токсичан на хуманим ћелијама, што га чини веома добрим кандидатом за будућа клиничка испитивања.⁷⁹



Слика 10. Структурне формуле комплекса сребра(I) са фосфор-донорским лигандима и камфорсулфонском киселином⁷⁹

Трифенилфосфин и семикарбазони су се, такође, показали као одлична комбинација лиганада у синтези биолошки активних комплекса сребра(I).⁸⁰ На слици 11 приказане су структурне формуле комплекса сребра(I) овог типа **42** и **43**, који су стабилни на ваздуху и DMSO раствору. Активност ових комплекса је испитивана на

ћелијским линијама тумора дојке MDA-MB-231 и MCF-7 и простате DU-145, као и на патогеним бактеријама *S. aureus, Streptococcus agalactiae* и *Salmonella typhi.*⁸⁰ Оба комплекса су показала већу цитотоксичну активност на испитиваним ћелијским линијама у односу на одговарајућу активност цисплатине. На пример, за комплексе **42** и **43** су израчунате IC₅₀ вредности 1,68 и 2,48 μ M на MDA-MB-231 ћелијској линији, у поређењу са 67,0 μ M, колико износи IC₅₀ вредност на истој ћелијској линији за цисплатину. Поред тога, индекс селективности (SI) за исту ћелијску линију је приближно 1,5 за оба комплекса, што је значајно већа селективност у поређењу са цисплатином (SI = 0,18). Сличан след активности је потврђен и на MCF-7 и DU-145 ћелијским линијама у присуству комплекса **42** и **43**. С друге стране, ови комплекси нису показали значајну активност ни на једном од испитиваних патогених сојева.⁸⁰



 $R = H (42), CH_3 (43)$

Слика 11. Структурне формуле комплекса сребра(I) са семикарбазонима и трифенилфосфином, који су показали значајну активност према ћелијској линији канцера дојке⁸⁰

На слици 12 приказане су структурне формуле комплекса сребра(I) 44 – 48, који поред трифенилфосфина, садрже цикличне тиоамиде.⁸¹ Комплекси 44 – 47 имају незнатно дисторговану тетраедарску геометрију, док је комплекс 48 тригоналнопланаран. Синтетисани комплекси су показали веома добру активност на *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *S. aureus* и *E. coli* сојевима.⁸¹ Највећу антимикробну активност показује комплекс 48, који је 2 пута активнији у односу на комплекс 47, који садржи исте лиганде у координационој сфери сребра(I) као 48, али има различиту геометрију (Слика 12). Резултати испитивања интеракција ових комплекса са DNA су показали да долази до њихове интеркалације услед присуства тиоамида (вредности константе везивања и комплекса и тиомида су реда величине 10^5).⁸¹ Интеркалациони начин везивања комплекса за DNA додатно је потврђен и мерењем вискозности.



Слика 12. Структурне формуле комплекса сребра(I) са цикличним тиоамидима и трифенилфосфином који показују антимикробну активност⁸¹

Tris(p-толил)фосфин представља веома значајан лиганд у координационој хемији сребра(I), и у комбинацији са 5-хлор-2-меркаптобензотиазолом формира комплексе **49** и **50** (Слика 13).⁸² Испитивана је антиинфламаторна и антипролиферативна активност ових комплекса на веома ретком облику тумора глатког мишићног ткива (LMS ћелијска линија), при чему су одређене IC₅₀ вредности од 13,7 µM за **49** и 2,9 µM за **50**. Двоструко мања IC₅₀ вредност комплекса **50** у односу на цисплатину, као и одуство токсичног ефекта на здравим ћелијским линијама MRC-5, чини овај комплекс веома погодним за даљу фазу испитивања. Проточном цитометријом је испитиван механизам антитуморског деловања ових комплекса, при чему је нађено да је апоптоза у раној фази могући тип ћелијске смрти, и утврђено је да је проценат некротичних ћелија свега 1,5.⁸² Антиинфламаторна активност комплекса **49** и **50** је испитивана у *in vivo* условима, при чему је на местима на кожи након третмана комплексом **50** за 51,33% смањена површина на којој је био развијен запаљенски процес.⁸²



Слика 13. Структурне формуле комплекса сребра(I) са *tris(p*-толил)фосфином и 5хлор-2-меркаптобензотиазолом који су испитивани као потенцијални антитуморски и антиинфламаторни агенси⁸²

На слици 14 приказане су структурне формуле пет динуклеарних комплекса сребра(I) са *tris*(*p*-толил)фосфином и различитим тиосемикарбазонима (**51** – **55**).⁸³ Антипролиферативна активност ових комплекса је испитивана на ћелијским линијама тумора дојке (MDA-MB-231 и MCF-7) и дебелог црева (HT-29), при чему су њихове IC₅₀ вредности биле у опсегу 2,20 – 4,66 µМ. Комплекс **54** је, у највећој мери, инхибирао раст HT-29 и MDA-MB-231 туморских ћелија (IC₅₀ = 2,20 и 2,55 µM, респективно), док је према MCF-7 ћелијама, највећу активност показао комплекс **55** (IC₅₀ = 3,20 µM; десет пута већа активност у односу на цисплатину).⁸³



Слика 14. Структурне формуле динуклеарних комплекса сребра(I) са тиосемикарбазонима и *tris*(*p*-толил)фосфином⁸³

Поред значајне антипролиферативне активности, комплекси **51** – **55** су активни и према паразиту *Plasmodium falciparum*, који изазива маларију.⁸³ Одређене EC₅₀ вредности (50% ефективне концентрације) за ове комплексе су у опсегу $0,75 - 2,02 \mu$ M, при чему је највећу антималаријску активност показао **55**, што је последица присуства брома и метокси групе у овом комплексу. С друге стране, комплекс **53** не садржи метокси групу, а **54** не садржи бром у структури, и као последица тога имају два пута мању активност у поређењу са комплексом **55**.⁸³

Биолошки значај присуства метокси групе у структури комплекса сребра(I) са тиосемикарбазонима и фосфинима додатно су потврдили Силва (Silva) и коаутори (Слика 15).⁸⁴ У овом истраживању, синтетисана су три комплекса сребра(I) са трифенилфосфином и тиосемикарбазонима, који садрже неалкиловани фрагмент ванилина (56), као и ванилин који је алкилован *N*-етилморфолином (57) или *N*етилпипиперидином (**58**).⁸⁴ Ови комплекси имају дисторговану тетраедарску геометрију и стабилни су у раствору Tris-HCl пуфера у периоду од 48 h. Поред тога, комплекси 56 – 58 показују већу цитотоксичност на ћелијским линијама тумора дојке (MCF-7 и MDA-MB-231) и плућа (А549), као и већу селективност у односу на цисплатину. Одређене IC₅₀ вредости за ове комплексе су биле у опсегу од 5,63 до 18,80 µM, док је индекс селективности износио од 1,3 до 1,7. Комплекс 57 је показао највећу активност према свим тестираним туморским ћелијским линијама. Након 3 h, приближно 30% комплекса 56 – 58 је транспортовано у ћелију, при чему је присуство липофилног трифенилфосфина, који олакшава дифузију кроз ћелијску мембрану, пресудно за антитуморску активност. Испитивање ћелијског циклуса је показало да приближно 70% ћелија доспева у стање апоптозе након деловања ових комплекса, што је изазвано стварањем реактивних кисеоничних врста.⁸⁴



Слика 15. Структурне формуле комплекса сребра(I) са *О*-алкилованим тиосемикарбазонима и трифенилфосфином⁸⁴

5,5-Диетилбарбитурна киселина, познати антиепилептик, коришћена је као лиганд за синтезу нових комплекса сребра(I) са различитим монофосфинима (комплекси **59** – **62**; Слика 16).⁸⁵ Ови комплекси су растворни у алкохолним растварачима и DMSO, али не и у води. Једињење **59** представља динуклеарни комплекс, док су остали комплекси мононуклеарни. Биолошка активност ових комплекса је испитивана на ћелијским линијама тумора (МСF-7, HT-29, A549 и PC3 – тумор простате) и шест сојева микроорганизама (*E. coli* ATCC 25922, *E. coli* O157:H7, *S. typhimurium* ATCC 14028, *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* ATCC 33591 и *Lactococcus garvieae* 40456). Вредности IC₅₀ испитиваних комплекса су се повећале у складу са следећим низом на свим испитиваним ћелијским линијама: **62** < **61** < **60** < **59**.⁸⁵ Највећи цитотоксични ефекат на MCF-7 ћелијама постигнут је након деловања комплекса **62**, који је истовремено имао и већи индекс селективности (SI = 12) у односу на цисплатину и карбоплатину. На активност комплекса утиче повећање липофилности која настаје као последица присуства циклохексил групе/а на атому фосфора. Једињење **62** је индуковало апоптозу ћелија у раној фази ћелијског циклуса, активирањем ензима каспаза-3 и -7.⁸⁵



Слика 16. Структурне формуле комплекса сребра(I) са барбитурном киселином и фосфинима⁸⁵

Приликом испитивања комплекса 59 – 62 на микроорганизмима, највећу активност показао је комплекс 59.⁸⁵ Сви комплекси су показали знатно бољу активност

(MIC = 0,01 – 14,3 µМ) према Грам-позитивним бактеријама *S. aureus* и *L. garvieae*. Комплекс **59** је показао око 2000 пута већу активност према *L. garvieae* у односу на активност AgSD комплекса. Поред тога, овај комплекс није био токсичан на здравим ћелијским линијама и представља потенцијални комплекс за клиничка испитивања. Претпоставља се да је значајна антибактеријска активност комплекса **59** последица присуства слабијих Ag–N/O веза, које се лако раскидају у присуству сумпор-, азот- или кисеоник-донорских атома из аминокиселина или нуклеотида.⁸⁵

На слици 17 приказане су структурне формула фосфор-донорских лиганада, који су коришћени за синтезу комплекса сребра(I) као потенцијалних антитуморских агенаса.⁸⁶⁻⁸⁹ Полазећи од (2-аминофенил)фосфина **63** и **64**, синтетисани су комплекси сребра(I) **63а-d** и **64а**, чија је антитуморска активност испитивана према три ћелијске линије мишева (мастоцитом P815, меланом B16 и леукемија P388).⁸⁷ Вредности IC₅₀ ових комплекса су значајно ниже у односу на одговарајуће вредности за цисплатину, која је коришћена као контрола. Највећу активност је показао комплекс **63с** на ћелијској линији B16, при чему је IC₅₀ вредност била 1,75 µМ. Различит контра-анјон није имао значајан утицај на антитуморску активност комплекса, као што се може закључити на примеру комплекса **63а** и **63с**. Повећање броја лиганада координованих за Ag(I) јон има за последицу слабије цитотоксично дејство, тако да су комплекси **63а** и **63с** показали бољу активност у односу на **63b** и **63d**. Поред тога, незнатно већу активност су показали комплекси који садрже 2-(аминофенил)дифенилфосфин (аdpp) (**63a-d**) у односу на оне са 2-(аминофенил)метилфенилфосфином (аmpp) лигандом (**64a**).



63a [Ag(adpp)₂]NO₃ 64a [Ag(ampp)₃]PF₆ **65a** [Ag{(*R*,*R*)-diph}₂]PF₆ **66a** $[Ag_2\{(R,R) - tetraphos\}_2](PF_6)_2$ 63b [Ag(adpp)₃]NO₃ **65b** $[Ag\{(S,S)-diph\}_2]PF_6$ **66b** $[Ag_{2}\{(S,S) - tetraphos\}_{2}](PF_{6})_{2}$ 63c [Ag(adpp)₂]PF₆ 63d [Ag(adpp)₃]PF₆ 67 d3pype d4pype d2pype 67a [Ag₂(d2pype)₄](NO₃)₂ 67b [Ag(d3pype)₂]NO₃ 67c [Ag(d4pype)₂]NO₃

Слика 17. Структурне формуле фосфор-донорских лиганада и молекулске формуле њихових сребро(I) комплекса⁸⁶⁻⁸⁹

Према P815 и B16 ћелијама, комплекси сребра(I) који садрже tetraphos као лиганд (**66а** и **66b**) показују већу активност у односу на комплексе који садрже diph (**65а** и **65b**).⁸⁷ Највећу активност (IC₅₀ = 0,04 µM) показао је комплекс **66а** на ћелијској P815 линији. Поред тога, антитуморска активност овог комплекса је испитивана на ћелијским

линијама хуманог тумора јајника 41M, 41McisR, CH1, CHlcisR и SKOV-3.⁸⁷ Важно је напоменути да су ћелијске линије 41McisR, CHlcisR и SKOV-3 резистентне на цисплатину. За једињење **66b** су одређене IC₅₀ вредности 0,029, 0,022, 0,077, 0,016 и 0,012 μ M на 41M, 41McisR, SKOV-3, CH1 и CHlcisR ћелијским линијама. Поред тога, значајну активност на ћелијским линијама тумора јајника 41M, 41McisR, CH1, CHlcisR и SKOV-3 показују комплекси сребра(I) са 1,2-*bis*(ди-*n*-пиридилфосфино)етаном (d2pype, d3pype и d4pype, Слика 17).⁸⁸

1.2.2. Комплекси сребра са N-хетероцикличним карбенима

Упоредо са синтезом комплекса сребра(I) са фосфор-донорским лигандима, синтетисани су и комплекси сребра(I) са *N*-хетероцикличним карбенима (NHC). Ова једињења представљају неутралне двоелектронске доноре, који се могу координовати за меке и тврде Луисове киселине и базе. NHC лиганди формирају знатно јаче везе са јонима метала у односу на фосфине, што је веома важно имајући у виду нестабилност јона сребра(I).^{90,91} Прва синтеза комплекса метала са овим лигандима урађена је 1968. године,^{92,93} док је 1991. године изолован први стабилни карбен.^{94,95} Осим што су значајни у катализи, NHC лиганди су веома важни у координационој хемији паладијума, сребра, рутенијума и родијума,⁹⁶ при чему синтетисани комплекси ових јона метала показују антимикробну и антитуморску активност. Комплекси сребра(I) са NHC лигандима споро дисосују уз лагано и одрживо отпуштање јона сребра(I) што доприноси продуженом антимикробном деловању.⁹⁷⁻¹⁰²

Комплекс **68** са *N*-хетероцикличним карбеном (Слика 18) показује незнатну активност на бактеријама *E. coli*, *P. aeruginosa* и *S. aureus* и гљивицама, *C. albicans*, *Aspergillus niger* и *Saccharomyces cerevisiae*.¹⁰³ У циљу побољшавања активности овог комплекса, извршена је његова енкапсулација на биокомпатибилни полимер полиуретан применом методе електроспининга.¹⁰³ Добијени нанокомпозит је показао значајно бољу активност на *P. aeruginosa*, *E. coli* и *S. aureus* током седам дана инокулације, при чему је једињење **68** показивало бактерицидно и бактериостатско дејство.

На слици 18 су приказани и комплекси сребра(I) 69 и 70 са NHC лигандима који садрже теобромин.^{104,105} Комплекс 69 је испитиван према *P. aeruginosa, Alcaligenes xylosoxidans, Stenotrophomonas maltophilia, S. aureus и Burkholderia* бактеријама, при чему су MIC вредности биле 1 µg/mL.¹⁰⁵ Вредности MIC за сребро-резистентне плазмиде, *E. coli* J53 и *E. coli* JP3+pMG101, износе 2 и 10 µg/mL, што указује да је антимикробна активност комплекса 69 у директној вези са присуством јона сребра(I). Испитиван је утицај комплекса 69 и 70 у *in vivo* условима на моделу мишева, који су претходно били инфицирани *P. aeruginosa* бактеријом.¹⁰⁵ Оба комплекса су уношена назално и довела су до губитка тежине код експерименталних мишева, али су показали значајну антибактеријску активност и прихватљиву стопу преживљавања. Поред тога, антимикробни потенцијал комплекса 69 је испитиван на великом броју патогених микроорганизама, укључујући и патогене изоловане из респираторног тракта пацијената оболелих од цистичне фиброзе.¹⁰⁵ Вредности MIC су биле у опсегу од 1 до 8 µg/mL за све тестиране бактеријске врсте, док је активност на гљивицама била нешто мања (MIC = 4 – 13 µg/mL).



Слика 18. Структурне формуле неких комплекса сребра(I) са NHC лигандима¹⁰³⁻¹⁰⁶

Од испитиваних гљивица, комплекс **69** је показао највећу активност према *C. albicans* (MIC = 4 μ g/mL).¹⁰⁴ У циљу бољег разумевања механизма деловања комплекса **69**, поређена је морфологија *Burkholderia dolosa* бактерије пре и након деловања овог комплекса применом трансмисионе електронске микроскопије, при чему је нађено да се сребро акумулира на ћелијском зиду.¹⁰⁵ У прелиминарним испитивањима токсичности комплекса **69** на мишевима након интравенозне примене добијена је LD₅₀ (летална доза) вредност 1068 mg/kg. Хистопатолошки налази органа су били уредни и нису показивали знаке патолошких промена у присуству комплекса **69**.¹⁰⁴

Комплекси 71 – 73 (Слика 18) показују различиту стабилност у физиолошким условима.¹⁰⁶ Применом ¹Н NMR спектроскопије закључено је да комплекси 72 и 73 потпуно хидролизују након 2 h у D₂O, док је комплекс 71 стабилан у воденој средини услед присуства атома хлора на имидазоловом прстену. Овај комплекс је стабилан у воденој средини чак и након 17 недеља, када је утврђено да 34% комплекса 71 хидролизује, при чему настаје слободан лиганд.¹⁰⁶ Активност ових комплекса је испитивана на великом броју изолата из респираторног тракта пацијената инфицираних *P. aeruginosa* и *Burkholderia* бактеријама. И поред велике нестабилности, комплекс 72 је показао одличну активност као и 71 (MIC = 1 – 10 µg/mL), док антимикробна активност комплекса 73 није била значајна.



Слика 19. Структурне формуле халогенидосребро(I) комплекса са NHC лигандима^{107,108}

Синтетисана је серија халогенидо сребро(I)-карбенских комплекса 74 – 87, чије су структурне формуле приказане на слици 19.^{107,108} Испитивана је антибактеријска активност ових комплекса према сојевима *E. coli*, *S. aureus*, *S. aureus* MRSA и *S. aureus* NorA (и у присуству ципрофлоксацина).¹⁰⁷

Комплекси 77 и 87 показују највећу антибактеријску активности, при чему су МІС вредности од 2 до 8 µg/mL.¹⁰⁷ Услед присуства 2,6-диизопропил фрагмента у структури, комплекси 78 и 86 показују најмању антимикробну активност на тестираним сојевима бактерија. Једињења 86 и 87 се структурно разликују у алкил групама на фенил фрагменту. Присуство метил група у комплексу 87 је, у великој мери, утицало на повећање активности у односу на комплекс 86 који садржи изопропил групе. Поређења ради, 87 је показао до 128 пута већу активност на свим сојевима *S. aureus* (MIC = 1 µg/mL (87) и 128 µg/mL (86)).¹⁰⁷ Поред тога, ови комплекси су испитивани и на резистентним врстама, као што су *S. aureus* MRSA и *S. aureus* NorA (у одсуству и присуству ципрофлоксацина).¹⁰⁷ Као и у случају испитивања активности на *E. coli* и *S. aureus*, најмању активност показује комплекс 86 (64 µg/mL), док је 87 најактивнији са MIC = 0,5 µg/mL (иста МIС вредност је добијена приликом тестирања еритромицина).¹⁰⁷ Међутим, приликом испитивања токсичности на здравим хуманим фибробластима MRC-5, утврђено је да најактивнији комплекси 77 и 87 не показују селективност и да имају изражен токсични ефекат на здравим ћелијама.

1.2.3. Комплекси сребра(I) са ароматичним N-хетероцикличним једињењима

Комплекси сребра(I) са ароматичним хетероцикличним једињењима који садрже азот у прстену (*N*-хетероциклична једињења) показују значајну цитотоксичност, антибактеријску и антифунгалну активност.¹⁰⁹⁻¹¹⁵ 1,10-Фенантролин (1,10-phen) и 2,2'бипиридин (2,2'-bipy) су коришћени у синтези динуклеарних комплекса сребра(I) са тиоуреом (**88** – **90**, Слика 20), који су испитивани према паразитским, бактеријским и гљивичним врстама.¹⁰⁹



Слика 20. Структурне формуле комплекса сребра(I) са 1,10-фенантролином и 2,2'-бипиридином и њиховим дериватима^{109,110}

На основу резултата испитивања антипаразитске активности, може се закључити да су комплекси са 1,10-рћеп **88** и **89** показали значајнији ефекат у односу на комплекс **90**.¹⁰⁹ Највећу активност је показао комплекс **89**, који има степен селективности 15,5, који је већи у односу на комерцијални лек амфотерицин В (SI = 4,40).¹¹⁶ Трифлатни анјон у комплексу **89** је допринео бољој растворљивости овог комплекса, што је утицало на његову већу активност у односу на комплексе који садрже нитрат као контра-анјон. Поред тога, комплекси **88** и **89** су активнији према различитим сојевима бактерија и гљивица у односу на **90**, што је последица њихове веће липофилности.¹⁰⁹ Највећи антимикробни потенцијал је показао комплекс **88**, за који је одређена MIC₅₀ вредност 17,6 µМ према *E. coli* и *C. tropicalis*. Као и у случају антипаразитске активности, замена нитрата трифлатним анјоном (комплекс **89**) доводи до приближно пет пута мање активности на истим микроорганизмима.

Једињење **91** (Слика 20) представља комплекс сребра(I) са бидентатно координованим 1,10-фенантролин-5,6-дионом.¹¹⁰ Овај комплекс показује већу анти-*Candida* активност у односу на аналогни комплекс **92** који садржи бидентатно координовани 1,10-рћеп (Слика 20).¹¹⁰ Поређења ради, МІС вредности за комплексе **91** и **92** износе 0,5 и 8,8 μ M према *C. albicans*. Наиме, присуство две кето групе се показало као веома важно због могућности грађења водоничних веза са биомолекулима који изграђују ћелије гљивица. Поред тога, испитиван је ефекат комплекса **91** и **92** на DNA која је изолована из једра *C. albicans*, при чему су утврђене мале структурне промене у овом биомолекулу, које су настале услед координације Ag(I) јона за пуринске и/или пиримидинске базе.¹¹⁰

Осим 1,10-фенанотролина, и 1,7- и 4,7-фенантролини су коришћени као лиганди у синтези комплекса сребра(I).^{111,112} У реакцији различитих AgX соли (X = NO₃⁻, ClO₄⁻, CF₃SO₃⁻, BF₄⁻ и SbF₆⁻) и 1,7-фенантролина синтетисани су комплекси 93 – 97, чије су структурне формуле приказане на слици 21.¹¹¹ Ови комплекси имају задовољавајућу стабилност у DMSO на собној температури и изражену селективност према испитиваним *Candida* сојевима, у односу на бактерије (MIC вредности према *Candida* сојевима у опсегу од 1,2 до 11,3 μ M). На основу MIC вредности, као и IC₅₀ вредности које су одређене приликом испитивања на нормалним фибробластима, закључено је да најбољи терапеутски профил има комплекс 93, чији је механизам деловања детаљније испитиван.¹¹¹ Овај комплекс смањује вирулентност *C. albicans* и оштећење епителијалних ћелија у моделу инфекције. Поред тога, он иницира стварање реактивних кисеоничних врста у ћелијама *C. albicans*, и реагује са гљивичном DNA.¹¹¹ Токсиколошки профил комплекса 93 је испитиван на моделу зебра рибица *Danio rerio*, при чему је показао знатно нижу токсичност у односу на клинички коришћен сребро(I)сулфадиазин (Слика 8).

Синтетисана је и серија комплекса сребра(I) са 4,7-фенантролином као лигандом (комплекси 98 – 102, Слика 21).¹¹² Слично комплексима сребра(I) са 1,7-фенантролином, комплекси 98 – 102 су показали значајну активност и селективност према *Candida* сојевима, при чему су МІС вредности од 2,0 до 10,0 μ M.¹¹² Модел зебра рибице је коришћен за испитивање токсиколошког профила комплекса 98 – 102, при чему су се најбоље показали комплекси 98, 100 и 102, који су даље испитивани на моделу леталне кандидијазе код зебра рибица.¹¹² Комплекси 98 и 100 су ефикасно контролисали и спречавали филаментацију *C. albicans*, чак и применом мањих концентрација од претходно одређених МІС вредности. Приликом примене МІС вредности, оба комплекса су потпуно заштитила све инфициране зебра рибица од смртног исхода.¹¹²

На слици 22 су приказане структурне формуле комплекса сребра(I) са пиридазином (103), пиримидином (104), пиразином (105), хиноксалином (106) и феназином (107).¹¹³ Антимикробна активност ових комплекса је испитивана на сојевима Грам-позитивних (*S. aureus* и *L. monocytogenes*) и Грам-негативних бактерија (*E. coli* и *P. aeruginosa* PAO1), као и на гљивици *C. albicans*.¹¹³



Слика 21. Структурне формуле комплекса сребра(I) са 1,7- и 4,7-фенантролином.^{111,112}

Комплекси 103 – 107 су показали добру антимикробну активност према испитиваним микроорганизмима, при чему су МІС вредности биле у опсегу од 2,5 до 31,2 µg/mL. Ови комплекси су показали одличну активност према *P. aeruginosa* PAO1 и *E. coli*, при чему су МІС вредности од 2,5 – 15,6 и 7,8 – 15,6 µg/mL. Највећу активност су показали комплекси сребра(I) са пиридазином (103) и пиримидином (104) према *P. aeruginosa* PAO1, чија је МІС вредност од 2,5 µg/mL била мања од одговарајуће вредности за сребро(I)-нитрат (MIC = 3,1 µg/mL).



Слика 22. Структурне формуле комплекса сребра(I) са пиридазином, пиримидином, пиразином, хиноксалином и феназином¹¹³

С друге стране, најмању активност показали су комплекси **106** (са хиноксалином) и **107** (са феназином), на основу чега се може закључити да је повећање броја ароматичних прстенова негативно утицало на антимикробну активност. Важно је напоменути да комплекси **103**, **106** и **107** показују највећу активност према формираним биофилму *P. aeruginosa* бактерије.

Деривати хинолина су, такође, коришћени као лиганди за синтезу комплекса сребра(I) **108** – **113** (Слика 23).¹¹⁴ Структура ових комплекса је потврђена применом рендгенске структурне анализе, након чега је испитивана њихова антимикробна активност на петнаест патогених микроорганизама. Комплекс **108** је имао значајну активност на свим испитиваним врстама, док је **113** био најактивнији према *Corynebacterium urealyticum* (MIC = 4 µg/mL).



Слика 23. Структурне формуле комплекса сребра(I) са дериватима хинолина¹¹⁴

Бензимидазол и његови деривати су такође значајни лиганди, који се користе у координационој хемији сребра.¹¹⁵ На слици 24, приказана је општа формула комплекса

сребра(I) са дериватима бензимидазола 114 и 115, који садрже нитрат као контраанјон.¹¹⁵



R = H, 114; CH₃, 115

Слика 24. Структурне формуле комплекса сребра(I) са дериватима бензимидазола¹¹⁵

Антимикробна активност комплекса **114** и **115** је испитивана према Грамнегативним (*E. coli*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii* и *K. pneumoniae*) и Грам-позитивним (*S. aureus*, *S. aureus* MRSA и *E. faecalis*) бактеријским врстама.¹¹⁵ Поред тога, испитивана је и њихова антифунгална активност према *C. albicans* и *C. glabrata*. Оба комплекса су показала сличну антимикробну активност, при чему су МІС вредности од 25 до 100 µg/mL. Бактерија *E. coli* је најосетљивија према овим комплексима. С друге стране, комплекси **114** и **115** нису цитотоксични према ћелијским линијама тумора простате, плућа, дебелог црева, као и према здравим ћелијским линијама фибробласта плућа.¹¹⁵

2. ПРЕДМЕТ ИСТРАЖИВАЊА

Лечење болести, које cy изазване штетним утицајима различитих микроорганизама, представља један од највећих изазова са којим се сусреће савремени свет. И поред све већег броја ефикасних антимикробних лекова, који се појављују на тржишту, и даље постоји потреба за развојем нових антимикробних агенаса. Осим токсичних ефеката које могу изазивати антимикробни лекови, највећи проблем представља појава резистентности микроорганизама, која подстиче истраживања заснована на структурној модификацији постојећих или синтези потпуно нових лекова. У циљу превазилажења резистености на клинички коришћене лекове, велика пажња се посвећује синтези и испитивању комплекса метала као антимикробних агенаса.¹¹⁷ Интеракцијом јона метала са органским молекулима, који су често планарне или дводимензионалне структуре, настају комплексна једињења са тродимензионалним распоредом атома у простору.¹¹⁷ Ова тродимензионална структура комплексних једињења има важну улогу у њиховој биолошкој активности. Поред тога, хелатна координација органског молекула за јон метала смањује његову поларност и повећава липофилност формираног комплексног једињења, чиме је олакшана његова дифузија кроз ћелијску мембрану. Координацијом јона метала за органски молекул долази до промене у електронској структури, поларности, густини и симетрији електронског облака координованог органског једињења. Поред тога, могућност супституције координованог органског лиганда у комплексном једињењу, након његове дифузије у ћелијски простор, значајно доприноси биолошкој активности овог једињења. Након дифузије кроз ћелијску мембрану микроорганизма, комплексно једињење продукује слободне радикале (нпр. реактивне кисеоничне врсте) који изазивају ћелијску смрт и/или интереагује са ћелијским биомолекулима.

Имајући ове чињенице у виду, као и значајну антимикробну активност комплекса сребра(I) (*Општи део*), у овој докторској дисертацији су коришћена ароматична азотдонорска хетероциклична једињења, 1,10-фенантролин (1,10-phen), 5,6-епокси-5,6-дихидро-1,10-фенантролин (5,6-ероху-1,10-phen), 1,5-нафтиридин (1,5-naph), 1,2-*bis*(4-пиридил)етан (bpa) и 1,2-*bis*(4-пиридил)етен (bpe), као лиганди за синтезу комплекса сребра(I) **Ag1** – **Ag8** (Слика 25). Различите соли сребра(I) (AgNO₃, AgCF₃SO₃ и AgCF₃COO) су коришћене у циљу испитивања утицаја анјона на структурне и биолошке особине синтетисаних комплекса. Координацијом 1,10-phen и 5,6-ероху-1,10-phen лиганада за Ag(I) јон добијени су комплекси **Ag1** и **Ag2**. Полинуклеарни комплекси **Ag3** – **Ag5** су синтетисани у реакцији 1,5-парh са различитим AgX солима (X = NO₃⁻, CF₃COO⁻ и CF₃SO₃⁻), док су bpa и bpe мостни лиганди у полинуклеарним комплексима **Ag6** – **Ag8** (Слика 25).

Комплекси Ag1 – Ag8 су окарактерисани применом спектроскопских метода (NMR, IR и UV-Vis) и рендгенске-структурне анализе. Њихова цитотоксичност је испитивана на здравој ћелијској линији фибробласта плућа (MRC-5) и на туморским ћелијским линијама (хумани микроцелуларни карцином плућа, A549, хумани канцер дојке, MDA-MB 231, и хумани канцер панкреаса, MIA PaCa-2). Антимикробна активност комплекса Ag1 – Ag8 је испитивана према различитима сојевима Грам-позитивних и Грам-негативних бактерија и гљивица. У циљу дефинисања терапеутског профила синтетисаних комплекса, испитивана је њихова ембриотоксичност на *in vivo* моделу зебра рибица (*Danio rerio*). Поред тога, испитиване су интеракције одабраних комплекса (Ag1, Ag2, Ag6 – Ag8) са DNA и транспортним протеином, албумином говеђег серума (BSA), у циљу дефинисања њиховог афинитета према овим биомолекулима.











Ag5



Слика 25. Структурне формуле комплекса Ag1 – Ag8 који су синтетисани у овој докторској дисертацији

3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО
3.1. Хемикалије и реагенси

Хемикалије и реагенси, 1,10-фенантролин (1,10-рћеп), 5,6-епокси-5,6-дихидро-1,10-фенантролин (5,6-ероху-1,10-рћеп), 1,5-нафтиридин (1,5-парћ), 1,2-*bis*(4пиридил)етан (bpa) и 1,2-*bis*(4-пиридил)етен (bpe), етанол, метанол, диметил-сулфоксид (DMSO), деутерисани диметил-сулфоксид (DMSO- d_6), диметил-формамид (DMF) и деутерисани диметил-формамид (DMF- d_7), сребро(I)-нитрат (AgNO₃), сребро(I)трифлуорацетат (AgCF₃COO) и сребро(I)-трифлуорметансулфонат (AgCF₃SO₃), етидијум-бромид (EthBr), DNA из тимуса телета (ct-DNA) и албумин говеђег серума (BSA) били су највећег степена чистоће и купљени су од произвођача Sigma-Aldrich.

3.2. Физичка мерења

3.2.1. Елементална микроанализа

Применом елементалне микроанализе је одређен проценат угљеника, водоника и азота у синтетисаним комплексима. За ову анализу коришћен је елементални анализатор Elementar Vario EL III (C, H, N, O, S) у Микроаналитичкој лабораторији Хемијског факултета Универзитета у Београду.

3.2.2. IR мерења

Инфрацрвени спектри синтетисаних комплекса су добијени применом KBr технике у опсегу таласних бројева 4000 – 450 сm⁻¹ на инструменту Perkin Elmer spectrum 100.

3.2.3. NMR мерења

NMR спектри су снимљени на собној температури на спектрометрима Bruker Avance III (¹H на 400 MHz и ¹³C на 101 MHz) на Природно-математичком факултету Универзитета у Новом Саду и Varian Gemini 2000 (¹H на 200 MHz и ¹³C на 50 MHz). NMR спектри су снимљени након растварања 5 mg комплекса у 0,6 mL DMSO- d_6 (**Ag1**, **Ag2**, **Ag6** – **Ag8**) и DMF- d_7 (**Ag3** – **Ag5**). Хемијска померања, δ , приказана су у *parts per million* (*ppm*). Мултиплицитет сигнала у ¹H NMR спектрима је означен као синглет (*s*), дублет (*d*), дублет дублета (*dd*) и мултиплет (*m*). Константе купловања, *J*, изражене су у Hz.

3.2.4. UV-Vis мерења

UV-Vis спектри синтетисаних комплекса су снимљени на Shimadzu double-beam спектрофотометру у опсегу таласних дужина од 900 до 200 nm након растварања узорака у одговарајућем растварачу (DMSO или DMF). За ова мерења, коришћене су следеће концентрације раствора комплекса: $c(Ag1) = 9,9 \times 10^{-6}$ M, $c(Ag2) = 3,0 \times 10^{-5}$ M, $c(Ag3, Ag4) = 1,25 \times 10^{-4}$ M, $c(Ag5) = 6,0 \times 10^{-5}$ M, $c(Ag6) = 2,36 \times 10^{-4}$ M, $c(Ag7) = 4,31 \times 10^{-5}$ M и $c(Ag8) = 1,50 \times 10^{-5}$ M.

3.2.5. Кондуктометријска мерења

Моларна проводљивост раствора комплекса **Ag1** – **Ag5** у одговарајућем растварачу (DMSO или DMF) при концентрацији $1,0 \times 10^{-3}$ М измерена је на инструменту Crison Multimeter MM 41.

3.2.6. Испитивање стабилности комплекса у раствору

Стабилност комплекса **Ag1** – **Ag8** у DMSO раствору је праћена применом UV-Vis и ¹H NMR спектроскопије. У ту сврху, снимљени су спектри одмах након растварања комплекса сребра(I), као и 24 и 48 h након растварања (раствори испитиваних комплекса су чувани у мраку на собној температури).

3.3. Синтеза комплекса Ag1 – Ag8

Комплекси Ag1 – Ag8 су синтетисани у складу са модификованим поступком за синтезу комплекса сребра(I) са ароматичним *N*-хетероцикличним лигандима.¹¹⁸ Синтеза и структурна карактеризација Ag1 – Ag8 комплекса детаљно је описана у научним радовима (реф. 119-121) који су публиковани у оквиру ове докторске дисертације. AgCF₃COO је коришћен за синтезу комплекса Ag1, Ag2 и Ag4, за синтезу Ag5, Ag7 и Ag8 коришћен је AgCF₃SO₃, док је AgNO₃ коришћен за добијање Ag3 и Ag6 комплекса (структурне формуле синтетисаних комплекса су приказане на слици 25). 1,0 mmol AgX соли (220,9 mg AgCF₃COO, 169,9 mg AgNO₃ и 256,9 mg AgCF₃SO₃) растворено је у 10,0 mL етанола. У овај раствор је додата еквимоларна количина одговарајућег хетероцикличног лиганда за комплексе Ag1 – Ag5 (180,2 mg 1,10-phen за Ag1, 196,2 mg 5,6-epoxy-1,10-phen за Ag2 и 130,2 mg 1,5-naph за Ag3 – Ag5), као и 0,5 mmol bpa (92,1 mg за Ag6 и Ag7) и 0,5 mmol bpe лиганда (91,1 mg за Ag8). Лиганди су, најпре, растворени у 5.0 mL етанола и затим је тај раствор лагано укапаван у раствор одговарајуће соли сребра(I). Након што је додата целокупна количина лиганда, настављено је мешање раствора 3 – 4 h на собној температури у одсуству светлости. Безбојни кристали комплекса Ag1 и Ag2, који су добијени након 3 - 5 дана упаравањем матичног раствора на собној температури, процеђени су и осушени на собној температури у одсуству светлости. У случају комплекса Ag3 – Ag8, бели талог који се формирао након додатка лиганда, прекристалисан је у одговарајућем растварачу у циљу добијања кристала. Тако је метанол коришћен за прекристализацију белог талога у случају Ag3 комплекса, а етанол у случају Ag4 и Ag5 комплекса. Кристали Ag6 комплекса су добијени прекристализацијом белог талога у ацетонитрилу, док је смеша ацетонитрил/вода (v/v, 1 : 1) коришћена за добијање кристала комплекса Ag7 и Ag8. Принос: 74% за Ag1 (221,7 mg), 66% 3a Ag2 (275,3 mg), 72% 3a Ag3 (216,0 mg), 65% 3a Ag4 (228,2 mg), 68% 3a Ag5 (263,2 mg), 75% за Ag6 (132,8 mg), 71% за Ag7 (114,2 mg) и 84% за Ag8 (184,4 mg).

Ag1

Израчунато за **Ag1** = C₂₆H₁₈AgF₃N₄O₃ (M_r = 599,31): C, 52,11; H, 3,03; N, 9,35. Нађено: C, 51,96; H, 3,09; N, 9,47%. ¹H NMR (200 MHz, DMSO- d_6): δ = 8,04 (dd, J = 8,1, 4,5 Hz, H3 и H8), 8,23 (s, H5 и H6), 8,80 (dd, J = 8,2, 1,6 Hz, H4 и H7), 9,18 (dd, J = 4,5, 1,6 Hz, H2 и H9) ppm. ¹³C NMR (50 MHz, DMSO- d_6): δ = 124,9 (C3 и C8), 127,2 (C5 и C6), 129,0 (C4a и C6a), 138,4 (C4 и C7), 141,9 (C1a и C10a), 151,2 (C2 и C9) ppm. IR (KBr, v, cm⁻¹): 3457br (v(O–H)), 2924w (v(C_{ar}–H)), 1679vs (v_{as} (COO)), 1621w, 1589w, 1509m, 1423m (v(C_{ar}=C_{ar}) и v(C_{ar}= N)), 1210s (v_s (CF₃)), 1122s (v_{as} (CF₃)), 841m, 727m (γ (C_{ar}–H)). UV-Vis (DMSO, λ_{max} , nm): 266 (ε = 8,3 × 10⁴ M⁻¹cm⁻¹). Λ_{M} (DMSO): 31,0 Ω^{-1} cm²mol⁻¹.

Ag2

Израчунато за **Ag2** = C₂₈H₁₆Ag₂F₆N₄O₆ (M_r = 834,19): C, 40,32; H, 1,93; N, 6,72. Нађено: C, 40,44; H, 1,88; N, 6,85%. ¹H NMR (200 MHz, DMSO- d_6): δ = 5,00 (s, H5 μ H6), 7,80 (dd, J = 7,7, 4,9 Hz, H3 μ H8), 8,53 (dd, J = 7,7, 1,6 Hz, H4 μ H7), 8,85 (dd, J = 4,9, 1,6 Hz, H2 μ H9) ppm. ¹³C NMR (50 MHz, DMSO- d_6): δ = 54,2 (C5 μ C6), 125,9 (C3 μ C8), 131,1 (C4a μ

С6а), 140,6 (С4 и С7), 143,7 (С1а и С10а), 150,9 (С2 и С9) ppm. IR (КВг, v, cm⁻¹): 3087w, 3017w, 2920w (v(С_{аг}-H)), 2856 (v(С-H)), 1670vs (v_{as} (СОО)), 1567m, 1472w, 1437s (v(С_{аг}=С_{аг}) и v(С_{аг}=N)), 1199vs, 1170vs (v_s (СF₃)), 1127s (v_{as} (СF₃)), 837m, 803s (епоксидни прстен), 724m (γ (С_{аг}-H)). UV-Vis (DMSO, λ_{max} , nm): 262 ($\varepsilon = 1,5 \times 10^4$ M⁻¹cm⁻¹), 300 ($\varepsilon = 2,9 \times 10^4$ M⁻¹cm⁻¹). $\Lambda_{\rm M}$ (DMSO): 34,0 Ω^{-1} cm²mol⁻¹.

Ag3

Израчунато за **Ag3** = C₈H₆AgN₃O₃ (M_r = 300,03): C, 32,03; H, 2,02; N, 14,01. Нађено: C, 31,98; H, 2,11; N, 14,01%. ¹H NMR (400 MHz, DMF- d_7): δ = 7,88 (dd, J = 8,4, 4,1 Hz, H3 и H7), 8,54 (d, J = 8,3 Hz, H4 и H8), 9,10 (dd, J = 4,1, 1,5 Hz, H2 и H6) ppm. ¹³C NMR (101 MHz, DMF- d_7): δ = 126,08 (C3 и C7), 138,51 (C4 и C8), 144,88 (C4a и C8a), 152,99 (C2 и C6) ppm. IR (KBr, v, cm⁻¹): 3042w, 2924w (v(C_{ar}-H)), 1589w, 1497m (v(C_{ar}=C_{ar}) и v(C_{ar}=N)), 1384vs, 1359vs и 1310s (v_{as} (NO₃)), 820s, 637m (γ (C_{ar}-H)). UV-Vis (DMF, λ_{max} , nm): 308 (ε = 5,1 × 10³ M⁻¹cm⁻¹). $\Lambda_{\rm M}$ (DMSO): 52,6 Ω^{-1} cm²mol⁻¹; $\Lambda_{\rm M}$ (DMF): 67,2 Ω^{-1} cm²mol⁻¹.

Ag4

Израчунато за **Ag4** = C₁₀H₆AgF₃N₂O₂ (M_r = 351,04): C, 34,22; H, 1,72; N, 7,98. Нађено: C, 34,08; H, 1,85; N, 7,93%. ¹H NMR (400 MHz, DMF- d_7): δ = 7,75 (dd, J = 8,5, 4,2 Hz, H3 и H7), 8,46 (dd, J = 8,3, 1,0 Hz, H4 и H8), 8,97 (dd, J = 4,2, 1,6 Hz, H2 и H6) ppm. ¹³C NMR (101 MHz, DMF- d_7): δ = 126,11 (C3 и C7), 138,70 (C4 и C8), 144,64 (C4a и C8a), 153,25 (C2 и C6) ppm. IR (KBr, v, cm⁻¹): 3033w (v(C_{ar}-H)), 1682vs (v(C=O)), 1591w, 1498s, 1430m (v(C_{ar}=C_{ar}) и v(C_{ar}=N)), 1208s (v_s (CF₃)), 1132s (v_{as} (CF₃)), 820m, 723m (γ (C_{ar}-H)). UV-Vis (DMF, λ_{max} , nm): 308 (ε = 7,8 × 10³ M⁻¹cm⁻¹). $\Lambda_{\rm M}$ (DMSO): 46,1 Ω^{-1} cm²mol⁻¹; $\Lambda_{\rm M}$ (DMF): 63,1 Ω^{-1} cm²mol⁻¹.

Ag5

Израчунато за **Ag5** = C₉H₆AgF₃N₂O₃S (M_r = 387,09): C, 27,93; H, 1,56; N, 7,24. Нађено: C, 27,84; H, 1,65; N, 7,26%. ¹H NMR (400 MHz, DMF- d_7): δ = 7,87 (m, H3 и H7), 8,64 (m, H4 и H8), 9,09 (dd, J = 4,4, 1,3 Hz, H2 и H6) ppm. ¹³C NMR (101 MHz, DMF- d_7): δ = 126,68 (C3 и C7), 139,57 (C4 и C8), 144,46 (C4a и C8a), 154,34 (C2 и C6) ppm. IR (KBr, v, cm⁻¹): 3054w, 2924w (v(C_{ar}-H)), 1591w, 1506s, 1411w (v(C_{ar}=C_{ar}) и v(C_{ar}=N)), 1276vs, 1254vs (v_{as} (SO₃)), 1223vs (v_s (CF₃)), 1152s (v_{as} (CF₃)), 1023s (v_s (SO₃)), 820s, 633s (γ (C_{ar}-H)). UV-Vis (DMF, λ_{max} , nm): 308 (ε = 1,1 × 10⁴ M⁻¹cm⁻¹). $\Lambda_{\rm M}$ (DMSO): 35,8 Ω^{-1} cm²mol⁻¹; $\Lambda_{\rm M}$ (DMF): 60,8 Ω^{-1} cm²mol⁻¹.

Ag6

Израчунато за **Ag6** = C₁₂H₁₂AgN₃O₃ (M_r = 354,12): C 40,70; H, 3,42; N, 11,87%; Haђeho: C, 40,54; H, 3,51; N, 11,69%. ¹H NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 2,98 (*s*, CH₂), 7,32 (*d*, *J* = 5,8 Hz, H3 и H5), 8,46 (*s*, H2 и H6) ppm. ¹³C NMR (50 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 34,57 (CH₂), 124,31 (C3 и C5), 149,36 (C2 и C6), 150,9 (C4) ppm. IR (KBr, *v*, cm⁻¹): 3030w, 2925w (*v*(C_{ar}-H)), 2858w (*v*(C-H)), 1606s, 1559w, 1499w (*v*(C_{ar}=C_{ar}) и *v*(C_{ar}=N)), 1384vs (*v*_{as}(NO₃)), 1221m (*v*(C_{ar}-N)), 826s, 546m (*γ*(C_{ar}-H)). UV-Vis (DMSO, λ_{max} , nm): 257 (ε = 3,3 × 10³ M⁻¹cm⁻¹).

Ag7

Израчунато за **Ag7** = C₂₅H₂₆AgF₃N₄O₄S (M_r = 643,43): C 46,67; H, 4,07; N, 8,71%. Нађено: C, 46,44; H, 4,01; N, 8,59%. ¹H NMR (200 MHz, DMSO- d_6): δ = 2,96 (s, CH₂), 7,29 (dd, J = 4,5, 1,5 Hz, H3 μ H5), 8,45 (dd, J = 4,5, 1,5 Hz, H2 μ H6) ppm. ¹³C NMR (50 MHz, DMSO- d_6): δ = 34,52 (CH₂), 124,05 (C3 μ C5), 149,57 (C2 μ C6), 150,02 (C4) ppm. IR (KBr, v, cm⁻¹): 3429br (v(O–H)), ~3000w (v(C_{ar}–H)) μ (v(C–H)), 1615s, 1560m, 1507w, 1434m (v(C_{ar}=C_{ar}) μ $v(C_{ar}=N)$), 1279vs, 1251vs ($v_{as}(SO_3)$), 1223s ($v_s(CF_3)$), 1160s ($v_{as}(CF_3)$), 1024vs ($v_s(SO_3)$), 831m, 597w ($\gamma(C_{ar}-H)$). UV-Vis (DMSO, λ_{max} , nm): 257 ($\varepsilon = 1,8 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Ag8

Израчунато за **Ag8** = C₁₃H₁₀AgF₃N₂O₃S (M_r = 439,16): C 35,55; H, 2,30; N, 6,38%. Нађено: C, 35,32; H, 2,11; N, 6,29%. ¹H NMR (200 MHz, DMSO- d_6): δ = 7,57 (s, CH), 7,65 (dd, J = 4,6, 1,7 Hz, H3 μ H5), 8,61 (dd, J = 4,6, 1,6 Hz, H2 μ H6) ppm. ¹³C NMR (50 MHz, DMSO- d_6): δ = 121,34 (C3 μ C5), 130,66 (CH), 143,51 (C4), 150,23 (C2 μ C6) ppm. IR (KBr, v, cm⁻¹): 3061w, 2921w (v(C_{ar}-H)), 1610s, 1560m, 1505m, 1434m (v(C=C) μ v(C_{ar}=N)), 1280vs, 1251vs (v_{as} (SO₃)), 1222s (v_s (CF₃)), 1156vs (v_{as} (CF₃)), 1025vs (v_s (SO₃)), 837m, 553m (γ (C_{ar}-H)). UV-Vis (DMSO, λ_{max} , nm): 303 (ε = 4,9 ×10⁴ M⁻¹cm⁻¹) μ 313 (ε = 4,0 × 10⁴ M⁻¹cm⁻¹).

3.4. Рендгенска структурна анализа комплекса Ag2 – Ag5

Кристали комплекса **Ag2** – **Ag5** су испитивани применом рендгенске структурне анализе.^{119,120} Кристалографски подаци за ове комплексе, као и подаци који се односе на одређивање и утачњавање структуре, приказани су у табелама 1 и 2. Интензитет рефлексије кристала комплекса **Ag3** је мерен на дифрактометру Agilent Technologies Supernova-E CCD (Cu- K_{α} зрачење), док је за кристале комплекса **Ag2**, **Ag4** и **Ag5** коришћен дифрактометар Bruker AXS Smart 1000 CCD (Mo- K_{α} зрачење). Примењена је корекција апсорпције ваздуха и детектора, као и Лоренцовог и поларизационог ефекта,^{122,123} док је скалирање извршено применом одговарајућих сферних хармоничних функција.^{124,125} Структуре комплекса су одређене применом "*charge flip*" поступка^{126,127} и утачњавањем помоћу методе најмањих квадрата на бази F^2 (пуна матрица).¹²⁸ Свим атомима који су тежи од водоника су дати параметри анизотропног померања. Атоми водоника су смештени на израчунатим растојањима и утачњавани применом "*riding*" модела.¹²⁹⁻¹³² Програм MERCURY је употребљен за графички приказ структуре комплекса **Ag2** – **Ag5**.¹³³

Ag2	
Молекулска формула	$C_{28}H_{16}Ag_2F_6N_4O_6$
Молекулска маса	834,19
Кристални систем, просторна група	триклиничан, <i>Р</i> ī
<i>a</i> (Å)	7,850(4)
<i>b</i> (Å)	9,393(5)
<i>c</i> (Å)	10,296(5)
α (°)	93,987(9)
β (°)	105,094(8)
γ (°)	113,695(14)
$V(Å^3)$	658,0(6)
F_{000}	408
Ζ	1
Х-зрачење, λ / Å	Mo- <i>K</i> _α 0,71073
Сакупљени подаци, температура / К	100(1)
Израчуната густина (Mg/m ³)	2,105
Апсорпциони коефицијент (mm ⁻¹)	1,586
Дименизије кристала (mm ³)	$0,22 \times 0,21 \times 0,10$
θ ранг (°)	2,1 до 32,4
Опсег индека <i>h</i> , <i>k</i> , <i>l</i>	-11 11, -14 13, -15 15
Број сакупљених, независних и	16880, 4403, 4048
употребљених [I > 2 _б (I)] рефлексија	
$R_{ m int}$	0,0259
Трансмисиони фактори: max, min	0,7464, 0,6778
Подаци / ограничења / параметри	4403 / 132 / 263
Коначни <i>R</i> индекси	0,0224, 0,0547
$[F_0 > 4\sigma(F_0)]R(F), wR(F^2)$	
Коначни <i>R</i> индекси	0,0263, 0,0567
(сви подаци) $R(F)$, $wR(F^2)$	
$\Delta \rho_{\text{max}}, \Delta \rho_{\text{min}} (e/Å^3)$	1,157, -0,355

Табела 1. Релевантни подаци добијени рендгенском структурном анализом комплекса Ag2

	Ag3	Ag4	Ag5
Молекулска формула	C ₈ H ₆ AgN ₃ O ₃	$C_{10}H_6AgF_3N_2O_2$	$C_9H_6AgF_3N_2O_3S$
Молекулска маса	300,03	351,04	387,09
Кристални систем, просторна група	триклиничан, <i>Р</i> ī	моноклиничан, <i>C</i> 2/ <i>c</i>	моноклиничан, P21/n
<i>a</i> (Å)	7,7473(4)	11,6739(13)	9,380(4)
<i>b</i> (Å)	7,8824(3)	12,0214(13)	9,811(4)
<i>c</i> (Å)	7,9650(4)	7,7781(9)	13,132(6)
α (°)	68,770(4)		
β (°)	89,490(4)	105,544(2)	109,760(9)
γ (°)	70,855(4)		
$V(Å^3)$	424,97(4)	1051,6(2)	1137,4(8)
F_{000}	292	680	752
Ζ	2	4	4
Х-зрачење, λ / Å	Cu-Ka 1,54184	Mo-Ka 0,71073	Μο-Κα 0,71073
Температура / К	120(1)	100(1)	100(1)
Израчуната густина (Mg/m ³)	2,345	2,217	2,261
Арсорпциони коефицијент (mm ⁻¹)	18,992	1,954	2,001
Димензије кристала (mm)	0,10 × 0,05 × 0,04	$0,22 \times 0,22 \times 0,17$	$0,23 \times 0,19 \times 0,10$
θ опсег (°)	6,0 до 71,1	2,5 до 32,5	2,3 до 30,5
Опсег индека <i>h</i> , <i>k</i> , <i>l</i>	$\pm 9, \pm 9, \pm 9$	-17 16, ±17, ±11	$\pm 13, \pm 14, \pm 18$
Број сакупљених,			
независних и употребљених [<i>I</i> > 2 _б (<i>I</i>)] рефлексија	10908, 1765, 1735	13190, 1800, 1686	27055, 3466, 3298
Rint	0,0193	0,0265	0,0284
Трансмисиони фактори: max, min	0,6596, 0,6358	0,6954, 0,6422	0,4347, 0,3757
Подаци / ограничења / параметри	1765 / 0 / 137	1800 / 24 / 97	3466 / 0 / 172
Коначни R индекси $[F_0 > 4_{\sigma}(F_0)]R(F), wR(F^2)$	0,0201, 0,0601	0,0190, 0,0459	0,0180, 0,0451
Коначни <i>R</i> индекси (сви подаци) <i>R</i> (<i>F</i>), <i>wR</i> (<i>F</i> ²)	0,0204, 0,0603	0,0212, 0,0471	0,0193, 0,0457
$\Delta \rho_{\text{max}}, \Delta \rho_{\text{min}} (e/Å^3)$	0,589, -0,482	0,893, -0,377	1,179, -0,310

Табела 2. Релевантни подаци добијени рендгенском структурном анализом комплекса Ag3 – Ag5

3.5. Биолошка испитивања

3.5.1. Испитивање антимикробне активности

Микроорганизми који су коришћени за испитивање антимикробне активности синтетисаних једињења су добијени од National Collection of Type Cultures (NCTC) и American Type Culture Collection (ATCC). За ово испитивање коришћене су Грампозитивне бактеријске врсте као што су: Staphylococcus aureus NCTC 6571 и S. aureus ATCC 4330 MRSA (S. aureus резистентна на пеницилин), Listeria monocytogenes NCTC 11994, Enterococcus faecalis ATCC 29212 и Bacillus subtilis ATCC 6633. Од Грамнегативних бактеријских врста у овој докторској дисертацији коришћене су Escherichia coli NCTC 9001, Pseudomonas aeruginosa NCTC 10332, P. aeruginosa NCTC 10662, P. aeruginosa PAO1 и P. aeruginosa PAO1-GFP (зелени флуоресцентни протеин, енгл. "green fluorescent protein"),¹³⁴ Salmonella enteritidis ATCC 13075, Salmonella pullorum ATCC 13036 и Klebsiella pneumoniae ATCC BAA2146. Осим бактеријских врста, у овој докторској дисертацији коришћене су и следеће врсте Candida гљивица, које узрокују више од 95% кандидемија,¹³⁵ С. albicans ATCC 1023, С. albicans SC5314-RFP (црвени флуоресцентни протеин, енгл. "red fluorescent protein"),¹³⁶ С. krusei ATCC 6258, С. parapsilosis ATCC 22019 и С. glabrata ATCC 2001. Раствори комплекса и лиганада коришћених за њихову синтезу су припремљени растварањем у DMSO (50 mM).

Минимална инхибиторна концентрација (MIC) за све испитиване бактеријске врсте је одређена применом Luria-Bertani подлоге, која се састоји од 10 g/L триптона, 10 g/L натријум-хлорида и 5 g/L екстракта квасца при pH = 7,2. Мерења су вршена у сагласности са стандардним микродилуционим есејима за бактерије које расту аеробно, који су прописани од стране CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard - Tenth Edition M07-A10. CLSI). Вредности MIC су одређене након периода инкубације од 24 h на 37 °C, као најниже концентрације које у потпуности инхибирају раст бактеријске врсте.

Анти-*Candida* активност је испитивана применом микродилуционе методе одређене од стране CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute, Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts - third Edition: Approved Standard M27-A3; Clinical and Laboratory Standards Institute, Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts: Fourth Informational Supplement M27-S4). Коришћена је RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute medium, Gibco) подлога који садржи 2% глукозе (w/v), при чему су MIC вредности одређене након 24 h на 37 °C.

3.5.2. Испитивање филаментације С. albicans у присуству комплекса

Морфолошке промене *C. albicans* соја у одсуству и присуству субинхибиторних концентрација 1,5-naph и комплекса **Ag3** – **Ag5** (MIC₈₀, 80% MIC вредности према *C. albicans*) праћене су у Spider подлози у складу са раније описаним поступком.¹³⁷

Поред тога, праћена је филаментација *C. albicans* у RPMI 1640 подлози, који садржи 10% (v/v) серума фетуса говечета (FBS, енгл. "*fetal bovine serum*").¹³⁸ Суспензија *C. albicans* SC5314-RFP је третирана са MIC₈₀ концентрацијама комплекса сребра(I) уз одржавање температуре на 37 °C и константно мешање. Као контрола, коришћене су ћелије третиране DMSO растварачем. Након 6 h инкубације, добијени резултати су праћени флуоресцентним микроскопом (Olympus BX51, Applied Imaging Corp., San Jose, CA, United States) са увећањем од 20 пута.

3.5.3. Испитивање инхибиције формирања биофилма C. albicans

Тест инхибиције биофилма *C. albicans* ATCC 10231 соја је изведен у полистиренским микротитрационим плочама са 96 бунарића са равним дном, као што је раније описано у литератури.^{139,140} Ћелије су сакупљене из културе, које су узгајане преко ноћи (Sabouraud broth, 180 rpm, 30 °C) центрифугирањем (5000 ×g, 5 min, 4 °C), затим су испране два пута стерилним фосфатним пуфером (PBS; Sigma-Aldrich, Минхен, Немачка) и поново суспендоване у RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) подлози који садржи 2% глукозе (w/v) у концентрацији од 2 × 10⁶ ћелија/mL. Да би се омогућило формирање биофилма, суспензија *C. albicans* је инкубирана са опадајућим концентрацијама (почевши од 5 µg/mL) анализираних једињења у 200 µL коначне запремине по бунарићу током 48 h на 37 °C. Раст биофилма је анализиран бојењем адхерентних ћелија бојом "*crystal violet"* (CV), при чему је апсорпција на 590 nm очитана на инструменту Тесап Infinite 200 Pro multiplate reader (Tecan Group Ltd., Мандеорф, Швајцарска).

3.5.4. Испитивање инхибиције формирања мешовитог биофилма C. albicans и P. aeruginosa PAO1

Врсте *С. albicans* SC5314-RFP и *P. aeruginosa* PAO1-GFP су се размножавале у Sabouraud и Luria-Bertani подлози, при 180 о/min на 37 °C. Током ноћи културе су се формирале, након чега су изоловане центрифугирањем, испране раствором PBS и ресуспендоване у RPMI 1640 подлози који садржи 2% глукозе. Коначна суспензија је садржавала 3×10^5 и 3×10^6 cfu/mL за *С. albicans* SC5314-RFP и *P. aeruginosa* PAO1-GFP. Мешовити биофилм је узгајан на стакленој површини, која је претходно третирана серумом за време од 2 h. Мешовита суспензија *С. albicans* SC5314-RFP и *P. aeruginosa* PAO1-GFP (2 mL по бунарићу) инкубирана је 48 h на 37 °C без мућкања, у нагнутом стању, тј. у положају који омогућава формирање мешовитог биофилма на површини ваздух-течност. Испитивано је формирање мешовитог биофилма у присуству 1,5-naph и **Ag3** – **Ag5** комплекса при 1 µg/mL (субинхибиторна концентрација). Као контрола коришћен је мешовити биофилм у присуству DMSO. Биофилм је анализиран флуоресцентним микроскопом (Olympus BX51, Applied Imaging Corp., Caн Xose, Калифорнија, САД) са увећањем од 20 пута.

3.5.5. Испитивање цитотоксичне активности

сребра(I) је испитивана применом комплекса 3-(4,5-Цитотоксичност диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенитетразолијум-бромида (МТТ).¹⁴¹ Цитотоксични ефекат комплекса сребра(I) је одређен на нормалној хуманој ћелијској линији фибробласта плућа (MRC-5), као и на ћелијским линијама тумора плућа (A549), дојке (MDA-MB 231) и панкреаса (MIA PaCa-2). Концентрације комплекса Ag1 и Ag2 су биле у опсегу од 1,5 до 300 μ M, док су комплекси Ag6 – Ag8 испитивани у области концентрација 5 – 500 µg/mL. Инкубација је трајала 48 h. Све ћелијске линије су биле у RPMI 1640 подлози, која је садржавала 100 μ g/mL стрептомицина, 100 U/mL пеницилина и 10% (ν/ν) FBS (1,0 × 10⁴ ћелија). Ћелије су узгајане у инкубатору на температури од 37 °C и атмосфери са 5% СО2. Тест цитотоксичности, МТТ тест, изведен је два пута у четири репликата. Проценат редукције МТТ једињења је праћен спектрофотометријски на 540 nm помоћу инструмента Tecan Infinite 200 Pro multiplate reader (Tecan Group Ltd. Männedorf, Switzerland). Цитотоксичност је изражена као концентрација испитиваног једињења која успорава раст малигних ћелија за 50% у односу на нетретирану контролу.

3.5.6. Испитивање токсичности на моделу ембриона зебра рибица

Токсичност комплекса Ag3 - Ag5 је испитивана на основу резултата добијених анализом у *in vivo* модел систему ембриона зебра рибица *Danio rerio (zebrafish* модел; Табела 3). Ови експерименти су урађени у складу са упутствима која се налазе у ОЕСD водичу за испитивање супстанци применом овог модела (OECD - Organisation for Economic Co-operation and Development).¹⁴² Поред тога, сва испитивања на зебра рибицама су урађена у складу са регулативом Европске уније 2010/63/ЕU и етичким упутствима за рад са лабораторијским животињама Института за молекуларну генетику и генетичко инжењерство Универзитета у Београду.

Ембриони дивљих зебра рибица Danio rerio, набављени из Welcome Trust Sanger Института из Велике Британије, одгајани су у посебно опремљеном објекту са контролисаном температуром од 28 °C и периодом светлост : тама 14 : 10 h. Храњени су два пута дневно комерцијално доступном храном (TetraMinTM пахуљице; Tetra Melle, Немачка), и једном дневно са Artemia nauplii. Ембриони зебра рибица су размножавани парењем на 28 °C, затим су распоређени у микротитрационе плоче са 24 бунарића, по десет ембриона у 1,0 mL ембрионске воде (0,2 g/L Instant Ocean[®] Salt у дестилованој води) по сваком бунарићу. Приликом испитивања смртности и развијене токсичности, ембриони су третирани различитим концентрацијама испитиваних комплекса 6 h након оплодње (hpf, енгл. "hours post fertilization"). Као негативна контрола коришћен је DMSO (0,25%) док је сребро(I)-сулфадизаин (AgSD, Слика 8) коришћен као позитивна контрола. Експерименти су понављани по три пута (30 ембриона за сваку концентрацију). Апикалне тачке приказане у табели 3 су коришћене за процену токсичности посматрањем помоћу инвертног микроскопа CKX41 Olympus (Токио, Јапан). Угинули ембриони су пребројавани и одбацивани сваког дана. После 120 hpf извршен је преглед ембриона, затим су им мерени откуцаји срца након анестезије 0,1% (w/v) раствором трикаина. Након фотографисања, зебрице су залеђене на -20 °C. За одређивање терапеутског профила Ag5 комплекса, који је показао најповољније токсиколошке особине, урађена су додатна испитивања. Наиме, за процену мијелотоксичности, коришћени су трансгени ембриони Tg(mpx:EGFP), коіи експримирају зелени флуоресцентни протеин. Присуство неутрофила и интензитет флуоресценције су детектовани после 120 hpf на флуоресцентном микроскопу Olympus BX51 (Applied Imaging Corp., Сан Хозе, САД). Софтвер ImageJ (NIH-National Institutes of Health) употребљен је за одрећивање флуоресценције.

Категорија	Крајње тачке		Време изложености (hpf)			
		48	72	96	120	
Летални ефекти	Коагулисана јаја ^а	•	•	•	٠	
	Недостатак срчаних откуцаја	•	•	•	•	
Тератогени ефекти	Малформације главе	٠	•	•	•	
	Малформације очију ⁶	•	•	•	•	
	Малформације	•	•	•	•	
	сакулуса/отолита ^в					
	Малформације нотохорде	•	•	•	•	
	Малформације репа ^г	•	•	•	•	
	Сколиоза	•	•	•	•	
	Едем жуманца	•	•	•	•	
	Деформација жуманца	•	•	•	•	
	Успоравање раста ^д		•	•	•	
	Излегање ембриона			•	•	
Кардиотоксичност	Перикардијални едем		•	•	٠	
-	Срчана морфологија			•	•	
	Брзина откуцаја срца				•	
	(otkyliai/min)					

Табела 3. Летални и тератогени ефекти уочени на ембрионима зебра рибица у различитим периодима након оплодње

^аНе препознаје се јасна структура органа; ^бмалформација очију представља недовољан развој ока и абнормалности у облику и величини; ^вприсуство ниједног, једног или више од два отолита по сакулусу, као и смањење и повећање отолита и/или сакулуса; ^гмалформација репа је забележена када је реп био савијен, уврнут или краћи од контроле; ^дуспоравање раста је забележено поређењем дужине тела са контролним ембрионима.

3.6. Интеракције са биомолекулима

3.6.1. Испитивање интеракција комплекса са DNA

Интеракције комплекса Ag6 - Ag8 са DNA изолованим из тимуса телета (ct-DNA) праћене су применом UV-Vis спектрофотометрије и емисионе флуоресцентне спектроскопије. У случају UV-Vis спектрофотометријских мерења, концентрација комплекса ја била константна, док је концентрација ct-DNA повећавана. UV-Vis спектри су снимани у опсегу таласних дужина од 600 до 200 nm. Комплекси Ag6 - Ag8 и ct-DNA су растварани у Tris пуферу, при чему су спектри снимљени 5 min након мешања раствора комплекса и ct-DNA. Подаци који су добијени на основу UV-Vis титрација су коришћени за израчунавање константе везивања (K_b) на основу следеће једначине¹⁴³:

$$[\text{ct-DNA}]/(\varepsilon_{a} - \varepsilon_{f}) = [\text{ct-DNA}]/(\varepsilon_{b} - \varepsilon_{f}) + 1/K_{b}(\varepsilon_{b} - \varepsilon_{f})$$

У овој једначини ε_a , ε_b и ε_f представљају екстинционе коефицијенте A_{obs}/[комплекс], комплекса везаног за сt-DNA и слободног комплекса. На основу података добијених титрацијом, добијен је график зависности [ct-DNA]/($\varepsilon_a - \varepsilon_f$) у функцији од [ct-DNA]. Константа везивања је дата као однос нагиба (1/($\varepsilon_b - \varepsilon_f$)) и одсечка (1/ $K_b(\varepsilon_b - \varepsilon_f)$).

Након тога, интеракција комплекса сребра(I) и ct-DNA је испитивана применом емисионе флуоресцентне спектроскопије у присуству етидијум-бромида (EthBr) на pH = 7,4. Однос [ct-DNA]/[EthBr] = 5 је био константан у присуству растуће концентрације испитиваних комплекса. Емисија раствора је праћена у опсегу 525 – 800 nm, при ексцитацији од 520 nm. Афинитет везивања комплекса за ct-DNA је одређен Стерн-Волмеровом константом (K_{sv}). За израчунавање поменуте константе коришћена је следећа једначина:¹⁴⁴

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

 F_o и F представљају интензитете флуоресценције у одсуству и присуству комплекса. K_q представља бимолекулску константу гашења флуоресценције, а τ_0 је животни век флуорофоре (10⁻⁸ s) у одсуству комплекса. K_A означава константу везивања комплекса сребра(I) са ct-DNA, а *n* је број везујућих места. Ови подаци су израчунати помоћу следеће једначине¹⁴⁴:

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

Применом гел електрофорезе испитиване су интеракције комплекса **Ag1** и **Ag2** са DNA у складу са раније описаним поступком.¹¹⁶ У ту сврху, коришћена је комерцијално доступна λ DNA (500 ng, Thermo ScientificTM). λ DNA концентрације 5 ng/µL је инкубирана са 5, 50, 100 и 500 µM раствора комплекса **Ag1** и **Ag2** у Tris пуферу (pH = 8,5) у запремини од 30 µL. DMSO је коришћен као контрола. Након 2 h инкубације на 30 °C, раствори су нанети на 0,8% агарозни гел који садржи EthBr (HiperLadder TM 1 kb DNK Ladder plus) на 60 V у периоду од 1 h. Гел је испитиван применом Gel Doc EZ система (BioRad, Life Sciences, Hercules, САД) и Image LabTM софтвера.

3.6.2. Испитивање интеракција комплекса са BSA

Интеракције комплекса **Ag6** – **Ag8** са албумином говеђег серума (BSA, енгл. "bovine serum albumin") су праћене применом емисионе флуоресцентне спектроскопије. Раствор BSA је био константне концетрације (13,1 μ M), док су концентрације испитиваних комплекса повећаване до 464,9 μ M. BSA и комплекси су растварани у Tris пуферу. Смањење емисије триптофана из BSA праћено је на 352 nm. Емисиони спектри су снимани у опсегу од 280 до 500 nm, са таласном дужином ексцитације на 275 nm. Константе везивања комплекса за протеин су израчунате као што је претходно описано за њихове интеракције са ct-DNA.^{143,144}

4. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

4.1. Синтеза и карактеризација Ag1 и Ag2 комплекса

Комплекси сребра(I), $[Ag(1,10-phen)_2]CF_3COO·H_2O$ (Ag1) и $[Ag(CF_3COO)(5,6-epoxy-1,10-phen)]_2$ (Ag2) синтетисани су у складу са поступком описаном у Експерименталном делу докторске дисертације (Слика 26).¹¹⁹ У етанолном раствору који садржи AgCF_3COO додаван је постепено раствор еквимоларне количине одговарајућег ароматичног *N*-хетероцикличног једињења у истом растварачу на собној температури у одсуству светлости. Кристали комплекса **Ag1** и **Ag2** су добијени упаравањем раствора на собној температури.



Слика 26. Шематски приказ за реакције синтезе Ag1 и Ag2 комплекса

Као што се може видети са слике 26, увођење епоксидног прстена у структуру 1,10-рhen лиганда утиче на нуклеарност комплекса сребра(I) и на координацију CF₃COO⁻ јона. Тако је **Ag1** комплекс, који садржи 1,10-рhen мононуклеаран, док је **Ag2** комплекс са 5,6-ероху-1,10-рhen лигандом динуклеаран. У **Ag1** комплексу бидентатно су координована два 1,10-рhen лиганда, док је CF₃COO⁻ у спољашњој координационој сфери. Иако су реакције за синтезу комплекса **Ag1** и **Ag2** изведене при истим експерименталним условима, у **Ag2** комплекс је остварена бидентатна координација два 5,6-ероху-1,10-рhen лиганда и монодентатна координација CF₃COO⁻ јон за централни јон метала.¹¹⁹

4.1.1. Опис кристалне структуре Ag2 комплекса

Кристална структура **Ag2** комплекса је приказана на слици 27, док су одабране дужине везе (Å) и углови између веза (°) дати у табели 4.¹¹⁹ Овај динуклеарни комплекс има C_i молекулску симетрију и садржи две [Ag(CF₃COO)(5,6-ероху-1,10-phen)] јединице, које су међусобно повезане помоћу кратке Ag···Ag интеракције од 2,963(1) Å. Важно је напоменути да је дужина Ag···Ag интеракције у области од 2.853 до 3.290 Å.¹⁰³ За оба Ag(I) јона бидентатно је координован 5,6-ероху-1,10-phen преко два атома азота, док се CF₃COO⁻ координује монодентатно. Као што се у табели 4 може видети, Ag–O2 веза (2,248(1) Å) је краћа од Ag–N1 и Ag–N2 веза (2,288(2) и 2,411(2) Å). Услед постојања Ag···Ag интеракције, тетраедарска геометрија око Ag(I) јона је дисторгована у значајном степену ($\tau_4 = 0,51$; $\tau_4 = [360^\circ - (\beta + \alpha)]/141^\circ$ где β и α представљају највеће углове око јона метала, ($\beta = O2$ –Ag–N1 = 159,04(5)° и $\alpha = O2$ –Ag–N2 = 128,43(5)°. τ_4 вредности износе 0 за идеалну квадратно-планарну и 1 за идеалну тетраедарску геометрију.¹⁴⁵ Епоксидни прстен нема значајан утицај на кристално паковање **Ag2** комплекса.

Табела 4. Одабране дужине веза (Å) и углови између веза (°) у **Ag2** комплексу. Симетријска трансформација: $(i) -x, -y, -z + 2^{119}$

Ag-N1	2,2876(15)
Ag–N2	2,4112(17)
Ag–O2	2,2475(14)
Ag–Ag ⁱ	2,9633(12)
O2–Ag–Ag i	111,14(4)
O2-Ag-N1	159,04(5)
O2-Ag-N2	128,43(5)
N1–Ag–Ag ⁱ	83,54(5)
N1-Ag-N2	71,09(5)
N2–Ag–Ag i	62,97(4)
C13A–O2–Ag	103,9(5)
C13B-O2-Ag	104,5(5)
C1–N1–Ag	123,76(11)
C11–N1–Ag	117,50(11)
C10-N2-Ag	126,86(10)
C12–N2–Ag	113,69(10)



Ag2

Слика 27. Молекулска структура комплекса Ag2. Елипсоиди су дати са вероватноћом од 50%, док су атоми водоника приказани као сфере произвољног пречника¹¹⁹

Исти начин координације 5,6-ероху-1,10-рhen лиганда је утврђен за комплексе, *fac*-[ReCl(5,6-ероху-1,10-phen)(CO)₃],¹⁴⁶ [Cu(5,6-ероху-1,10-phen)₃](ClO₄)₂·0,5CH₃CN,¹⁴⁷ [Cu(NO₃)(5,6-ероху-1,10-phen)(1,10-phen)]NO₃·H₂O¹⁴⁸ и [Fe(5,6-ероху-1,10-phen)₃](ClO₄)₂·2H₂O,¹⁴⁹ чије су структуре, такође, одређене применом рендгенске структурне анализе.

Важно је напоменути да **Ag1** комплекс има идентичну структуру као и одговарајући комплекс чија је структура претходно утврђена применом рендгенске структурне анализе на 180(2) К.¹⁵⁰

4.1.2. Спектроскопска карактеризација

У IR спектрима комплекса Ag1 и Ag2 могу се приметити траке које потичу од асиметричних валенционих вибрација депротоноване COO^- групе (на 1679 cm⁻¹) и монодентатне координоване карбоксилне групе (на 1670 cm⁻¹).^{119,151,152} Услед преклапања са тракама које потичу од ароматичног *N*-хетероцикличног лиганда, у IR спектрима ових комплекса не може се разликовати трака од симетричних валенционих вибрација COO^- групе. С друге стране, у IR спектрима оба комплекса уочене су веома интензивне траке на 1210 и 1122 cm⁻¹ код Ag1, односно на 1199, 1170 и 1127 cm⁻¹ код Ag2, које потичу од симетричних и асиметричних вибрација CF₃ групе.¹⁵³ Широка трака на 3457 cm⁻¹ која се јавља у IR спектру Ag1 комплекса приписује се вибрацијама O-H веза у води, која је присутна у кристалној решетки, док се присуство епоксидног прстена у Ag2 комплексу може потврдити интензивном траком на 800 cm⁻¹.¹⁵⁴

UV-Vis спектри комплекса Ag1 и Ag2 су снимљени у DMSO на собној температури (Слика 28) и веома су слични спектрима одговарајућих ароматичних Nхетероцикличних лиганада.¹¹⁹ Апсорпциони максимум комплекса Ag1 је на 266 nm, док се у UV-Vis спектру Ag2 комплекса јављају два апсорпциона максимума на 262 и 300 nm. Ови апсорпциони максимуми потичу од прелаза унутар лиганада.¹⁵⁵



Слика 28. UV-Vis спектри комплекса Ag1 и Ag2 снимљени у DMSO на собној температури¹¹⁹

¹Н NMR спектри комплекса **Ag1** и **Ag2** су снимљени у DMSO- d_6 и садрже четири сигнала (Слика 29; не узимајући у обзир сигнале које потичу од растварача), чија се хемијска померања разликују од хемијских померања сигнала некоординованих лиганада.¹¹⁹ Хемијска померања сигнала, у великој мери, зависе од положаја одговарајућег протона у односу на азот, који је координован за Ag(I) јон. Посебно је важно поменути померања H4/H7 протона ка нижем пољу, која су износила +0,36 и +0,26 ррт за комплексе **Ag1** и **Ag2**. С друге стране, хемијска померања ароматичних протона H2/H9, који су суседни координованом атому азота, скоро су непромењена (+0,06 и +0,04 ррт за **Ag1** и **Ag2**).

¹³С NMR спектри **Ag1** и **Ag2** садрже шест сигнала (Слика 30; не узимајући у обзир сигнале које потичу од растварача), чија се хемијска померања разликују од померања сигнала некоординованих лиганада. Ипак, не постоји правилност између померања ¹³С NMR сигнала комплекса у односу на одговарајућа померања слободних лиганада. Важно је напоменути да услед координације 5,6-ероху-1,10-рhen лиганда за Ag(I) јон долази до померања сигнала угљеника C1a/C10a са 149,0 ppm на 143,7 ppm.



Слика 29. ¹Н NMR спектри комплекса Ag1 и Ag2 снимљени у DMSO- d_6 на собној температури¹¹⁹



Слика 30. ¹³С NMR спектри комплекса **Ag1** и **Ag2** снимљени у DMSO-*d*₆ на собној температури¹¹⁹

4.1.3. Испитивање стабилности комплекса у раствору

Стабилност **Ag1** и **Ag2** комплекса у DMSO раствору је испитивана применом UV-Vis и ¹H NMR спектроскопије, као и мерењем моларне проводљивости.¹¹⁹ Овај растварач је коришћен за припрему раствора комплекса који су даље коришћени за испитивање њихове антимикробне и антипролиферативне активности.

¹Н NMR спектри Ag1 и Ag2 комплекса који су снимљени 48 h након њиховог растварања у DMSO- d_6 указују да 1,10-phen и 5,6-ероху-1,10-phen лиганди остају бидентатно координовани за Ag(I) јон у том временском периоду (Слика 31, Ag2 комплекс).¹¹⁹ Сигнали који потичу од слободних лиганада нису се појавили у ¹Н NMR спектрима након 48 h, што указује да не долази до њихове супституције са молекулом растварача. Поред тога, нису уочене значајне промена у интензитету и положају апсорпционих максимума у UV-Vis спектрима Ag1 и Ag2 комплекса у DMSO.



Слика 31. ¹Н NMR спектри комплекса Ag2 снимљени одмах након растварања (а) и 48 h (б) након растварања комплекса у DMSO-*d*₆ у односу на спектар 5,6-ероху-1,10-рhen лиганда у истом растварачу (в)

Као што се могло и претпоставити, моларна проводљивост **Ag1** комплекса, који садржи CF₃COO⁻ контра-анјон, у складу је са моларном проводљивошћу електролита типа 1 : 1.^{156,157} Приликом мерења проводљивости раствора **Ag2** утврђено је да CF₃COO⁻ веома брзо одлази из координационе сфере Ag(I) јона.

4.1.4. Испитивање антимикробне и антипролиферативне активности Ag1 и Ag2 комплекса

Антимикробна активност комплекса Ag1 и Ag2 и одговарајућих лиганада, који су коришћени у њиховој синтези, испитивана је на четири бактеријска соја *P. aeruginosa, E. coli, S. aureus* и *L. monocytogenes* и четири *Candida* соја (*C. albicans, C. krusei, C. parapsilosis* и *C. glabrata*).¹¹⁹ Минималне инхибиторне концентрације (MIC) за Ag1 и Ag2

комплексе су у опсегу од 0,9 до 333 μ M, у зависности од тестираног микроорганизма (Табела 5). У односу на комплексе, 1,10-рhen и 5,6-ероху-1,10-рhen лиганди показали су мању антимикробну активност према свим испитиваним сојевима. Нађено је да увођење епоксидног прстена у структуру 1,10-рhen смањује антифунгалну активност, али да значајно утиче на повећање антипролиферативне активности (Табела 5). Испитивани комплекси и лиганди показују бољу анти-*Candida* у односу на антибактеријску активност.

Табела 🗄	5. Антимикр	обна актив	ност Agl	и Ag2	комплекс	а и одгова	рајућих л	иганада
(MIC, µN	М) у односу	на њихов ц	итотокси	чни ефе	кат према	нормалној	ћелијској	линији
фибробл	аста плућа М	4RC-5 (IC ₅₀	$(\mu M))^{119}$					

	Ag1	Ag2	1,10-phen	5,6-epoxy-1,10-phen
P. aeruginosa	20,9	299	555	1274
E. coli	41,7	14,9	1110	509
S. aureus	333	29,9	2776	127
L. monocytogenes	83,4	29,9	555	509
C. albicans	2,1	7,4	13,9	127
C. krusei	4,2	2,9	13,9	62,4
C. parapsilosis	2,1	0,9	17,2	62,4
C. glabrata	12,5	7,4	17,2	127
MRC-5	12,5	1,9	69,4	17,1

Вредности МІС добијене испитивањем активности комплекса и одговарајућих лиганада на *Candida* сојевима су у опсегу између 0,9 и 62,4 μ M (Табела 5). Лиганд 1,10phen је показао значајну антифунгалну активност (13,9 – 17,2 μ M), при чему његова координација за Ag(I) јон доприноси значајном повећању анти-*Candida* активности (од 1,4 до 8,2 пута, у зависности од *Candida* соја). Побољшање активности је још израженије у случају 5,6-ероху-1,10-рhen лиганда и Ag2 комплекса према *C. parapsilosis* соју и износи 69,3 пута. Важно је напоменути да је *C. parapsilosis* сој најосетљивији према испитиваним једињењима (Табела 5).

Антифунгална активност 1,10-рhen и комплекса сребра(I) са овим лигандом је раније утврђена, при чему је нађено да ова једињења инхибирају раст и изазивају оштећење митохондрија гљивице.¹⁵⁸⁻¹⁶⁰ С друге стране, 5,6-ероху-1,10-рhen је први пут коришћен као лиганд за координацију Ag(I) јона, а одабран је због значаја епоксидне функционалне групе која се често јавља у природним производима и део је структуре клинички коришћених лекова.¹⁶¹ У поређењу са активношћу сребро(I)-сулфадиазина (AgSD; Слика 8), који се користи код опекотина у циљу спречавања инфекција, комплекси Ag1 и Ag2 имају сличну или бољу антимикробну активност (Tабеле 5 и 6). Према *C. albicans* соју, Ag1 и Ag2 комплекси показују бољу активност (MIC = 2,1 и 7,4 µM; Табела 5) у односу на AgSD комплекс (MIC = 10 µM; Табела 6). Поред тога, *in vitro* цитотоксичност комплекса Ag1 према MRC-5 ћелијама је нешто мања у односу на AgSD, док је, у случају Ag2 комплекса, 5 пута већа (Табеле 5 и 6).

Слично **Ag1** и **Ag2** комплексима, различити комплекси сребро(I) са 1,10-рhen лигандом и његовим дериватима представљају значајне инхибиторе раста *C. albicans* соја, при чему су MIC вредности у опсегу од 0,5 до 9 μ M.^{160,161} Највећу активност је показао [Ag(1,10-phendio)₂]ClO₄ комплекс (1,10-phendio је 1,10-фенантролин-5,6-дион), са MIC = 0,5 μ M. Међутим, овај комплекс је показао значајну хепатотоксичност при субтерапеутској концентрацији (IC₅₀ = 0,3 μ M). Комплекс који је показао значајну антифунгалну активност у *in vitro* условима је [Ag₂(1,10-phen)₃(mal)]²H₂O, међутим није показао значајну *in vivo* активност на *C. albicans–Galleria mellonella* моделу инфекције.¹⁶² Значајна анти-*Candida* активност и умерена ефикасност према тестираним бактеријским сојевима је, такође, утврђена за комплексе сребра(I) са 1,7- и 4,7-фенантролином^{111,112} и са супституисаним имидазолима, 2-амино-3-метилпиридином, пиридин-2-карбоксалдоксимом и пиридин-3,5-дикарбоксилатом.¹⁶³⁻¹⁶⁵

Табела 6. Антимикробна активност AgSD комплекса, антибиотика канамицина и антимикотика нистатина (MIC, μ M), као и антипролиферативна активност AgSD на нормалној MRC-5 ћелијској линији (IC₅₀, μ M)¹¹⁹

	AgSD	канамицин	нистатин
P. aeruginosa	50	103,2	/
E. coli	20	25,8	/
S. aureus	75	25,8	/
L. monocytogenes	50	25,8	/
C. albicans	10	/	4,3
C. krusei	2,5	/	2,5
C. parapsilosis	2,5	/	2,0
C. glabrata	5,1	/	2,7
MRC-5	10	/	/

Као што је већ претходно напоменуто, присуство епоксидне групе повећава цитотоксичност и 5,6-ероху-1,10-рhеп лиганда и одговарајућег **Ag2** комплекса (Табеле 5 и 7). Комплекс **Ag2** је показао највећу *in vitro* цитотоксичност на здравој MRC-5 ћелијској линији (IC₅₀ = 1,9 μ M). У складу са тим, испитивана је активност овог комплекса према три туморске ћелијске линије, тумор плућа (A549), дојке (MDA-MB 231) и панкреаса (MIA PaCa-2) (Табела 7).¹¹⁹ Значајан антипролиферативни ефекат **Ag2** комплекса је примећен према MDA-MB 231 ћелијама, док су A549 и MIA PaCa-2 ћелијске линије биле 2 до 4 пута мање осетљиве (Табела 7).

Табела 7. Антипролиферативна активност (IC₅₀, µM) **Ag2** комплекса и одговарајућег 5,6ероху-1,10-рhen лиганда. Резултати су представљени као средња вредност три независна мерења са стандардном грешком између 1 и 3%¹¹⁹

	Ag2	5,6-epoxy-1,10-phen
MRC-5	1,9	17,1
A549	7,8	22,2
MIA PaCa-2	2,6	38,2
MDA-MB 231	1,4	17,8

Добијени резултати указују да би се комплекс Ag2 могао даље испитивати у комбинованој терапији за лечење гљивичних инфекција које су често присутне код туморских обољења. У прилог томе иде и чињеница да је слична активност остварена на истим ћелијским линијама за клинички коришћену цисплатину.¹⁶⁶

Различити комплекси сребра(I) су, такође, показали значајну антитуморску активност, која је, у неким случајевима, већа у поређењу са цисплатином.^{167,168} Слично **Ag2** комплексу, раније испитивани [Ag(1,10-phendio)₂]СlO₄ комплекс је показао значајну анти-*Candida* активност и цитотоксичност према хуманим туморским ћелијским

линијама (хумани аденокарцином бубрега А-498 и хумани хепатоцелуларни карцином Hep-G2), већу од одговарајуће активности цисплатине.¹⁶⁹ Поред тога, [Ag(1,10-phendio)₂]ClO₄ комплекс инхибира синтезу DNA, без повећаног ризика од генотоксичности.¹⁶⁹

4.1.5. Интеракције са DNA

Многи лекови ступају у интеракцију са DNA на различите начине, што, најчешће, подразумева њихово везивање (ковалентно или нековалентно) за одређена места у овом биомолекулу. На тај начин се мења структура DNA, што даље утиче на активност ензима који су укључени у метаболизам биомолекула. У циљу испитивања интеракције лекова са DNA, веома често се, као супстрат, користи λ DNA. Имајући ове чињенице у виду, у оквиру ове докторске дисертације испитивана је интеракција **Ag1** и **Ag2** комплекса са λ DNA (48,5 K парова база и молекулска маса од 31,5 × 10⁶ Da) применом гел електрофорезе (Слика 32).¹¹⁹



Слика 32. *In vitro* интеракција Ag1 и Ag2 комплекса и 1,10-phen и 5,6-ероху-1,10-phen лиганада са λDNA; Концентрације једињења су 500, 100, 50 и 5 μM, док је М молекулски маркер HypeLadderTM 1kb – Bioline¹¹⁹

Приликом експеримента, утврђено је да **Ag1** и **Ag2** комплекси, као и 1,10-рhen и 5,6-ероху-1,10-рhen лиганди, не ступају у интеракцију са λ DNA и не узрокују деградацију овог молекула (Слика 32). Наиме, испитивана једињења не спречавају везивање етидијум-бромида (EthBr, интеркалирајући агенс). Примећено је незнатно смањење емисије светлости приликом излагања UV зрачењу само када је λ DNA инкубирана са већим концентрацијама комплекса **Ag2** (100 и 500 μ M). Добијени резултати су у складу са резултатима који се односе на интеракције комплекса сребра(I) са 1,7- и 4,7-фенантролином са DNA.^{111,112} Поред тога, претходно је утврђено да 1,10-рhendio и [Ag(1,10-phendio)₂]ClO₄ комплекс доводе до неспецифичног раскидања везе у DNA молекулу.¹⁶²

4.2. Синтеза, карактеризација и биолошка активност комплекса Ag3 – Ag5

Полазећи од еквимоларних количина различитих AgX соли (X = NO₃⁻, CF₃COO⁻ и CF₃SO₃⁻) и 1,5-нафтиридина (1,5-naph), синтетисани су $[Ag(NO_3)(1,5-naph)]_n$, (Ag3), $[Ag(CF_3COO)(1,5-naph)]_n$ (Ag4) и $[Ag(CF_3SO_3)(1,5-naph)]_n$ (Ag5) комплекси у добром приносу (~70%) (Слика 33).¹²⁰ Иако су различите AgX соли коришћене у синтези комплекса,1,5-naph реагује са њима на исти начин, формирајући структурно сличне полинуклеарне комплексе. У структурама ових комплекса два Ag(I) јона су повезана

преко два атома азота из 1,5-naph (који има улогу мостног лиганда), док се за преостала координациона места координују атом(и) кисеоника из одговарајућег X анјона (Слика 33). Резултати елементалне микроанализе су потврдили стехиометрију комплекса **Ag3** – **Ag5**, док су њихове структуре потврђене применом NMR, UV-Vis и IR спектроскопије, као и рендгенске структурне анализе.



Слика 33. Шематски приказ за реакције синтезе комплекса Ag3 – Ag5

4.2.1. Опис кристалних структура

Молекулске структуре комплекса Ag3 – Ag5 су одређене применом дифракције Х-зрака са монокристала (Слика 34).¹²⁰ Одабране дужине веза (Å) и углови између веза (°) за ове комплексе су приказане у табели 8. Као што се може видети са слике 34, комплекси Ag3 – Ag5 представљају полинуклеарне врсте са истим начином координације 1,5-naph лиганда и различитим начином координације одговарајућег Х анјона (X = NO₃⁻ (Ag3), CF₃COO⁻ (Ag4) и CF₃SO₃⁻ (Ag5)). У свим структурама су присутни ланци који се састоје од Ag-1,5-naph-Ag-1,5-naph- секвенце (Слика 34). У Ag3 комплексу, ланци су међусобно повезани преко Ag(µ2-NO3)2Ag интеракција, при чему нитратни јон има улогу мостног лиганда измећу два Ag(I) јона. У структури Ag4 комплекса не могу се уочити везе између ланаца, док је CF₃COO⁻ бидентатно координован за један Ag(I) јон. С друге стране, у Ag5 комплексу само један атом кисеоника $CF_3SO_3^-$ јона је координован за Ag(I) јон (Слика 34). У овом комплексу постоје и две слабе интеракције између ланца Ag'-O3 (2,852 Å) и Ag'-O1 (2,871 Å), што је у складу са одступањем геометрије Ag(I) јона од тригонално-планарне. Да долази до одступања од тригонално-планарне геометрије овог комплекса може се закључити на основу вредности углова око Ag(I) јона, који значајно одступају од 120° (Табела 8).





Слика 34. Молекулске структуре комплекса Ag3 – Ag5. Елипсоиди су дати са вероватноћом од 50%, док су атоми водоника приказани као сфере произвољног пречника

Дужине Ag–N1/N2 веза у Ag3 комплексу износе 2,217(3) и 2,199(3) Å, док су у комплексима Ag4 и Ag5 два атома азота скоро једнако удаљена од централног јона метала (Табела 8). Дужина Ag–N(1,5-naph) везе у комплексима Ag3 – Ag5 могу се упоредити са дужинама одговарајућих веза за различите комплексе сребра(I) са ароматичним азот-донорским лигандима.¹⁷⁰⁻¹⁷³ Дужине Ag–O веза у Ag3 – Ag5 комплексима су од 2,5773(13) до 2,688(3) Å и значајно су веће од просечне дужине Ag–O везе од 2,3 Å,¹⁷⁴ што указује да је веза са одговарајућим X анјоном слаба. Претрагом CSD базе (верзија 5.40, новембар 2018),¹⁷⁵ утврђено је да постоји само један комплекс сребра(I) који садржи 1,5-naph фрагмент, тј. [Ag4(2,2'-bi-1,5-naph)₃] који је кристалисао са BF4⁻ контра-анјоном.¹⁷⁰ Oвај комплекс садржи би- и трикоординоване Ag(I) јоне и 2,2'-bi-1,5-naph, који се координује на два различита начина.¹⁷⁰ C друге стране, постоји 16 различитих структура које садрже 1,8-нафтиридин и његове супституисане деривате координоване за Ag(I) јон.¹⁷⁵

Aş	g3	А	.g4	Ag5		
Ag–N1	2,217(3)	Ag–N1	2,2515(11)	Ag–N1	2,1920(13)	
Ag–N2	2,199(3)	Ag–N1 ^{<i>ii</i>}	2,2515(11)	Ag–N2	2,1978(13)	
Ag-O1	2,586(2)	Ag-O1	2,5994(13)	Ag–O1	2,5773(13)	
Ag– $O2^i$	2,6884(25)	Ag–O1 ^{<i>ii</i>}	2,5994(13)			
N1-Ag-O1	87,39(9)	N1-Ag-O1	89,21(4)	N1-Ag-O1	104,56(5)	
N2-Ag-O1	112,71(9)	N1 ^{<i>ii</i>} –Ag–O1 ^{<i>ii</i>}	89,21(4)	N2–Ag–O1	94,12(5)	
N1-Ag-N2	153,92(10)	N1–Ag–O1 ⁱⁱ	127,07(4)	N1-Ag-N2	161,05(4)	
$O1-Ag-O2^i$	74,66(7)	N1 ^{<i>ii</i>} –Ag–O1	127,07(4)	S–O1–Ag	110,88(6)	
N1–Ag–O2 i	77,68(8)	N1–Ag–N1 ^{<i>ii</i>}	141,91(6)	C1–N1–Ag	120,23(10)	
N2–Ag–O2 i	122,42(9)	O1 ^{<i>ii</i>} –Ag–O1	50,99(5)	C4–N1–Ag	119,70(9)	
N3–O1–Ag	122,53(18)	C5–O1–Ag	89,54(10)	C5–N2–Ag	118,59(9)	
N3–O2–A g^i	108,9(2)	C1–N–Ag	121,20(8)	C8–N2–Ag	122,88(9)	
C1–N1–Ag	118,3(2)	C4–N1–Ag	118,04(9)			
C4–N1–Ag	123,5(2)					
C5–N2–Ag	119,6(2)					
C8–N2–Ag	123,2(2)					

Табела 8. Одабране дужине веза (Å) и углови између веза (°) у Ag3 – Ag5 комплексима.

Симетријска трансформација: (*i*) -x + 1, -y, -z + 2; (*ii*) -x + 2, y, -z + 1

4.2.2. Спектроскопска карактеризација

IR спектри Ag3 – Ag5 комплекса су у сагласности са структурама које су одређене применом рендгенске структурне анализе (Слика 34).¹²⁰ У IR спектру **Ag3** комплекса може се уочити веома интензивна трака са три максимума на 1384, 1359 и 1310 cm⁻¹, која потиче од координованог NO₃⁻ јона.¹⁷⁶ Појава три максимума је последица мостне координације овог јона, што је у сагласности са раније окарактерисаним полинуклеарним комплексима сребра(I).^{172,177} У IR спектру **Ag4** комплекса присутне су две веома интензивне траке на 1208 и 1132 стт-1, које потичу од симетричних и асиметричних валенционих вибрација CF₃ групе у CF₃COO⁻ јону.¹⁵³ Поред тога, присуство веома интензивне апсорпционе траке на 1682 ст⁻¹ потврђује координацију карбоксилне групе CF₃COO⁻ јона.¹⁵² Присуство CF₃SO₃⁻ јона у структури Ag5 комплекса може се додатно потврдити присуством интензивних трака у области 1300 – 1000 cm⁻¹.^{178,179} Траке на 1276, 1254 и 1023 сm⁻¹ потичу од асиметричних и симетричних валенционих вибрација –SO₃ групе у CF₃SO₃⁻ јону.¹⁷⁸ Цепање траке која потиче од асиметричних валенционих вибрација –SO3 групе представља последицу монодентатне координације $CF_3SO_3^-$ у Ag5 комплексу.¹⁷⁹ Поред тога, две траке на 1223 и 1152 cm⁻¹ потичу од симетричних и асиметричних валенционих вибрација –CF3 групе у CF3SO3јону.¹⁷⁸

UV-Vis спектри Ag3 – Ag5 комплекса су снимљени у DMF на собној температури.¹²⁰ За све сребро(I) комплексе је нађено да су њихови UV-Vis спектри веома слични одговарајућем спектру некоординованог 1,5-парh лиганда, што указује да апсорпциони максимум на 308 nm у UV-Vis спектрима Ag3 – Ag5 комплекса потиче од $\pi \rightarrow \pi^*$ прелаза у 1,5-парh лиганду.^{155,180}

¹Н и ¹³С NMR спектри Ag3 - Ag5 комплекса су снимљени у DMF- d_7 на собној температури и садрже исти број сигнала као и одговарајући спектри 1,5-парћ лиганда.¹²⁰ Ово је било за очекивати с обзиром на мостни начин координације 1,5-парћ лиганда, тј.

да су N1 и N5 атоми азота координовани за Ag(I) јон. Као што се може видети у Експерименталном делу докторске дисертације (поглавље 3.3), не може се уочити повезаност у хемијским померањима одговарајућих сигнала у комплексима Ag3 – Ag5 у односу на одговарајуће сигнале 1,5-naph. У ¹³С NMR спектрима комплекса, сигнали угљеникових атома који су директно повезани са атомом азота који је координован за Ag(I) јон (C4a/C8a) померени су ка нижем хемијском померању (ка вишем пољу) за 0,05 ррт, док су сигнали преосталих угљеникових атома у комплексу померени ка вишем хемијском померњу (ка нижем пољу) у односу на одговарајуће сигнале 1,5-naph лиганда (до +1,79 ррт за C2/C6 у Ag5 комплексу).

4.2.3. Испитивање стабилности комплекса у раствору

Стабилност **Ag3** – **Ag5** комплекса у DMSO, растварачу који је коришћен за припрему матичних раствора комплекса у циљу испитивања њихове биолошке активности, праћена је мерењем моларне проводљивости и снимањем ¹H NMR спектара у периоду од 48 h.¹²⁰ На основу мерења моларне проводљивости раствора комплекса може се закључити да одговарајући анјони нису координовани за Ag(I) јон у DMSO и да су **Ag3** – **Ag5** комплекси 1 : 1 тип електролита.^{156,157} Поред тога, нису уочене значајне разлике у вредностима моларних проводљивости непосредно након растварања комплекса и након 48 h. Снимањем ¹H NMR спектара комплекса **Ag3** – **Ag5** током 48 h утврђено је да 1,5-парћ лиганд остаје координован за Ag(I) јон током 48 h. ¹H NMR спектри ових комплекса су, такође, снимљени у присуству RPMI 1640 медијума у DMSO*d*₆/D₂O (*v*/*v* 1 : 9) раствору (**Ag3** комплекс; Слика 35). Сигнали слободног лиганда нису уочени у спектрима комплекса, на основу чега је закључено да присуство растварача (DMSO-*d*₆ и D₂O) и RPMI 1640 медијума не утиче на стабилност испитиваних комплекса при датим експерименталним условима (Слика 35).





4.2.4. Испитивање антимикробне активности комплекса Ag3 – Ag5

Антимикробна активност комплекса **Ag3** – **Ag5** је испитивана на различитим микроорганизмима, укључујући и два флуоресцентна соја, *P. aeruginosa* PAO1-GFP и *C. albicans*-RFP (Табела 9).¹²⁰

Табела 9. Антимикробна активност комплекса **Ag3** – **Ag5** (MIC) у односу на одговарајућу активност сребро(I)-сулфадиазина (AgSD). 1,5-Нафтиридин који је коришћен у синтези комплекса не показује антимикробну активност при концентрацијама већим од 250 µg/mL

	A	g3	Ag	<u>5</u> 4	Ag5 Ag		AgS	AgSD	
	µg/mL	μΜ	µg/mL	μΜ	μg/mL	μΜ	μg/mL	μΜ	
C. albicans	3,1	10,3	3,1	8,8	1,25	3,2	3,6	10	
C. albicans-RFP	2	6,7	2	5,7	2,5	6,5	1,56	4,4	
C. parapsilosis	6,25	20,8	3,1	8,8	2,5	6,5	0,89	2,5	
C. krusei	0,78	2,6	1,56	4,4	1,25	3,2	0,89	2,5	
C. glabrata	3,1	10,3	1,25	3,6	1,25	3,2	1,82	5,1	
P. aeruginosa	25	83,3	25	71,2	25	64,6	8,93	25	
P. aeruginosa-GFP	2,5	8,3	2,5	7,1	2,5	6,5	3,12	8,8	
S. aureus	50	166,6	50	142,4	25	64,6	26,8	75	
S. aureus MRSA	25	83,3	25	71,2	25	64,6	6,25	17,5	
B. subtilis	12,5	41,7	25	71,2	25	64,6	3,12	8,8	
E. coli	25	83,3	12,5	35,6	12,5	32,3	7,14	20	
K. pneumoniae	100	333,3	100	284,9	50	129,2	26,8	75	

Испитивани комплекси су показали знатно бољу анти-*Candida* у односу на антибактеријску активност (Табела 9). Изузетак представља *P. aeruginosa* PAO1-GFP, према којој су комплекси показали значајну активност са MIC вредностима од 6,5 до 8,3 μ M, које су мање од одговарајуће вредности за AgSD комплекс (8,8 μ M; Табела 9). У већини случајева, MIC вредности комплекса према сојевима бактерија су \geq 12,5 μ g/mL, док у случају *P. aeruginosa* PAO1-GFP MIC вредност за сва три комплекса износи 2,5 μ g/mL. Важно је напоменути да је овај сој генетски модификован да експримира зелени протеин и да, као такав, није погодан за антимикробна испитивања. Вредности MIC према *Candida* сојевима су од 0,78 до 6,25 μ g/mL, при чему је *C. krusei* најосетљивији, посебно према **Ag3** комплексу (Табела 9).

Поред тога, **Ag3** – **Ag5** спречавају раст хифа *C. albicans* соја на *Spider* подлози, при субинхибиторним концентрацијама (80% од МІС вредности; Слика 36). Лиганд 1,5парћ не показује антимикробну активност при испитиваним концентрацијама.



Слика 36. Утицај субинхибиторне концентрације Ag3 – Ag5 комплекса (80% од MIC вредности) на формирање хифа *C. albicans* соја на чврстој *Spider* подлози

Формирање биофилма је процес у којем се микроорганизми, као што су бактерије и гљивице, везују на површину и формирају заштитни матрикс, који им омогућава да

опстану. Биофилм се може формирати на различитим површинама, укључујући ткива, медицинску и индустријску опрему. Биофилм, такође, има улогу у развоју инфекција и хроничних болести. Поред антимикробних особина, јони сребра(I) могу инхибирати раст и формирање биофилма и нарушити структуру формираног биофилма.^{181,182} Имајући те чињенице у виду, испитиван је потенцијал комплекса **Ag3** – **Ag5** да инхибирају формирање биофилма *C. albicans* соја.¹²⁰ Добијени резултати су показали да комплекси **Ag3** и **Ag4** ефикасно инхибирају формирање биофилма *C. albicans* соја.¹²⁰ Добијени резултати су показали да комплекси **Ag3** и **Ag4** ефикасно инхибирају формирање биофилма *C. albicans* у концентрације биле 2,5 пута мање у односу на МIС вредности, комплекси **Ag3** и **Ag4** су инхибирали формирање биофилма за 18 и 40%. Комплекс **Ag5** је инхибирао формирање биофилма за 20% при МIС вредности. Овај комплекс, иако је био најефикаснији у инхибицији раста *C. albicans* (Табела 9), није ефикасно инхибирао формирање биофилма овог соја при концентрацијама мањим од MIC вредности (Слика 37). Лиганд 1,5-нафтиридин није инхибирао формирање биофилма *C. albicans* соја при



Слика 37. Ефекат комплекса Ag3 – Ag5 на формирање биофилма *C. albicans* coja. Грешке су представљене као стандарадна девијација три независна експеримента¹²⁰

Микроорганизми *C. albicans* и *P. aeruginosa* се, често, могу наћи у мешовитом биофилму који се формира на биотичким и абиотичким површинама. Имајући то у виду, испитивана је инхибиција формирања мешовитог *C. albicans – P. aeruginosa* биофилма у присуству комплекса **Ag3** – **Ag5** (Слика 38).¹²⁰ Комплекс **Ag3** је, у умереној мери, инхибирао формирање мешовитог биофилма при субинхибиторној концентрацији, док комплекс **Ag5** није имао утицаја. С друге стране, 1,5-naph је поспешио формирање мешовитог биофилма, док је комплекс **Ag4** веома ефикасно инхибирао раст *P. aeruginosa*, али не и *C. albicans*, унутар мешовитог биофилм (Слика 38). Важно је напоменути да су раније синтетисани комплекси сребра(I) са фталазином и хиназолином били веома ефикасни инхибитори формирања биофилма *P. aeruginosa* соја.¹¹⁸



Слика 38. Ефекат субинхибиторне концентрације (1 µg/mL) комплекса Ag3 – Ag5 на формирање мешовитог *C. albicans* (црвени сигнал) – *P. aeruginosa* (зелени сигнал).¹²⁰ Биофилм је анализиран помоћу флуоресцентног микроскопа при увећању од 20 пута

4.2.5. In vivo токсичност комплекса Ag3 – Ag5 на моделу ембриона зебра рибице

Зебра рибице се, обично, користе као модел организми у претклиничким испитивањима приликом развоја нових лекова.¹⁸³ Оне су генетски и физиолошки сличне људима. Малих су димензија, лако се одржавају у великом броју и имају провидан ембрион који омогућава праћење развојних процеса. Поред тога, њихов геном је добрим делом сличан геному људи, што их чини погодним за проучавање хуманих болести

(кардиоваскуларне и неуролошке болести и туморска обољења). Приликом развоја лекова, зебра рибице се могу користити за основна испитивања ефикасности једињења, затим за одређивање потенцијалне терапеутске ефикасности, као и за проучавање механизма деловања. Зебра рибице су као модел систем коришћене за испитивање утицаја наночестица сребра и сребро(I) јона на развојне процесе, као што су развојне малформације и заостајање у развоју, промене у раду срчаног мишића и протоку крви.¹⁸⁴ Поред тога, испитиван је утицај једињења сребра(I) на кардиоваскуларни, нервни и имуни систем зебра рибица.¹⁸⁵

У циљу испитивања токсичности и терапеутског потенцијала комплекса Ag3 – Ag5, испитиван је њихов ефекат на ембрионима зебра рибице (*Danio rerio*).¹²⁰ Ембриони зебра рибице у раној фази развоја су изложени различитим концентрацијама синтетисаних комплекса и AgSD, при чему је праћено њихово преживљавање, појава тератогених малформација и кардиоваскуларних оштећења након 120 hpf (Слика 39). На основу утврђених LC₅₀ вредности (LC₅₀ представља концентрацију при којој долази до смртног исхода код 50% ембриона), може се закључити да токсичност испитиваних комплекса сребра(I) опада у следећем низу: AgSD (1,75 μ g/mL) > Ag3 (2,58 μ g/mL) > Ag5 $(3,99 \ \mu g/mL) > Ag4 \ (4,45 \ \mu g/mL)$. С обзиром на најмању токсичност, може се претпоставити да комплекси Ag4 и Ag5 имају потенцијал у лечењу фунгалних инфекција које су узроковане сојевима C. albicans, C. krusei и C. glabrata. Поред тога, комплекс Ag3 није био токсичан на ембрионима при МІС вредности одређеној према C. krusei (Слика 39). Ниједан од испитиваних комплекса није изазвао кардиотоксичне ефекте (појава перикардијалног едема и поремећај срчаног ритма) при испитиваним концентрацијама. С друге стране, примећене су тератогене малформације приликом примене супратерапеутских концентрација (концентрације које су веће од MIC), као што је смањена димензија тела, изостанак формирања рибљег мехура, као и смањена потрошња жуманцета (знак могуће хепатотоксичности; Слика 396). Клинички коришћен AgSD комплекс је показао знатно већу токсичност у односу на комплексе Ag3 – Ag5 и изазвао озбиљне скелетне малформације, као што су деформисана глава, очи и вилица, смањени раст и оштећење репа. При MIC концентрацији овог комплекса примећени су кардиотоксични (перикардијални едем) и хепатотоксични ефекти (затамњена јетра; Слика 396). За 1,5-нафтиридин није примећена токсичност при концентрацијама до 20 $\mu g/mL$.



Слика 39. Резултати испитивања токсичности (а) и морфолошке малформације (б) у ембрионима зебра рибица у присуству комплекса Ag3 – Ag5, AgSD и 1,5-naph лиганда

Мијелотоксичност се односи на токсичне ефекте испитиваног једињења на коштану срж и може се манифестовати као смањење броја црвених и белих крвних зрнаца и тромбоцита, што може довести до анемије, повећане осетљивости ка инфекцијама и проблема са коагулацијом крви. Мијелотоксичност је уобичајена и пратећи је ефекат дејства неких хемиотерапеутика, који се користе за лечење туморских обољења, укључујући и цисплатину.¹⁸⁶ У овој докторској дисертацији, испитивана је мијелотоксичност комплекса **Ag5**, који није показао мијелосупресивне и инфламаторне ефекте према неутрофилима при концентрацији од 4 × MIC према *C. albicans, C. krusei* и *C. glabrata* сојевима (6 µg/mL; Слика 40).



Слика 40. Испитивање мијелотоксичности Ад5 комплекса на моделу зебра рибице

Терапеутски индекс (Ti) представља параметар безбедности и ефикасности неког лека и дефинише се као однос његове токсичне и терапеутске концентрације. Лек са високим терапеутским индексом је безбеднији од оног са ниским, јер се може применити у већој концентрацији без изазивања нежељених ефеката. На основу резултата

испитивања ембриотоксичности на *in vivo* моделу зебра рибице, може се закључити да комплекси Ag3 - Ag5 имају веће терапеутске индексе од AgSD (Табела 10), а тиме и потенцијал да се користе као антифунгални агенси (посебно Ag5). Према испитиваним гљивицама, Ti Ag5 комплекса износи 3,20, док AgSD има Ti у опсегу 0,49 до 1,98 (Табела 10). Приликом третмана ембриона зебра рибице након 34 hpf, што одговара времену лечења антифунгалне инфекције код зебра рибице изазване *C. albicans* гљивицом,¹⁸⁷ Ag5 комплекс је показао знатно бољи токсиколошки профил и већи терапеутски индекс (Ti = 5,58; Табела 10) него након 6 hpf (Ti = 3,20).

Табела 10. Терапеутски индекс (Ti) комплекса Ag3 - Ag5 у односу на AgSD комплекс; ^aZF = зебра рибица; ⁶Ti за испитивање након 34 hpf

	ZF ^a	MIC			Ti (LC ₅₀ /MIC)		
	LC ₅₀	С.	С.	С.	С.	С.	С.
		albicans	krusei	glabrata	albicans	krusei	glabrata
Ag3	2,583	3,1	0,78	3,1	0,86	3,31	0,83
Ag4	4,446	3,1	1,56	1,25	1,43	2,85	3,56
Ag5	3,995	1,25	1,25	1,25	3,20	3,20	3,20
AgSD	1,76	3,6	0,89	1,82	0,49	1,98	0,97
Ag5 ⁶	6,98	1,25	1,25	1,25	5,58	5,58	5,58

4.3. Синтеза, карактеризација и биолошка активност комплекса Ag6 – Ag8

У трећем делу докторске дисертације, синтетисани су комплекси сребра(I) са азот-донорским лигандима, 1,2-*bis*(4-пиридил)етаном (bpa) и 1,2-*bis*(4-пиридил)етеном (bpe), који садрже два пиридинска прстена повезана преко -CH₂–CH₂- и -CH=CH- групе, респективно.¹²¹ У реакцијама ових лиганада и AgX соли (X = NO₃⁻ и CF₃SO₃⁻) у 1 : 2 молском односу у етанолу на собној температури, добијени су полинуклеарни $\{[Ag(bpa)]NO_3\}_n$ (Ag6), $\{[Ag(bpa)_2]CF_3SO_3H_2O\}_n$ (Ag7) и $\{[Ag(bpe)]CF_3SO_3\}_n$ (Ag8) комплекси (Слика 41) у приносу већем од >70%.¹²¹ Ови комплекси су слабо растворни у води, али након додатка мале количине DMSO, долази до њиховог потпуног растварања.¹²¹



Слика 41. Шематски приказ за реакције синтезе комплекса Ag6 – Ag8

4.3.1. Спектроскопска карактеризација

¹H NMR спектри комплекса Ag6 – Ag8 у DMSO- d_6 садрже две карактеристичне групе сигнала у ароматичној области, који потичу од пиридинских протона и који су померени ка нижем пољу у односу на исте протоне некоординованих bpa и bpe лиганада.¹²¹ Комплекси Ag6 и Ag7 се разликују у врсти контра-анјона и имају идентичне ¹Н NMR спектре. Интересантно је напоменути да су разлике у хемијским померањима НЗ и Н5 протона за сва три комплекса и истих протона некоординованих лиганада веће од одговарајућих разлика у хемијским померањима Н2 и Н6 протона, који су везани за угљеникове атоме који су суседни атому азота. Од алифатичних протона -CH₂-CH₂групе у комплексима Ag6 и Ag7 потиче синглет на 2,98 и 2,96 ppm, респективно, док синглет на 7,57 ppm у спектру Ag8 комплекса потиче од протона -CH=CH- групе. Снимањем ¹H NMR спектара комплекса Ag6 - Ag8 у DMSO- d_6 у различитим временским интервалима, може се закључити да лиганди остају координовани за јон сребра(I) након 48 h. ¹³C NMR спектри комплекса Ag6 – Ag8 y DMSO- d_6 су веома слични спектрима одговарајућих лиганада.¹²¹ Међутим, након координације bpa лиганда за Ag(I) јон, долази до померања сигнала који потиче од угљеника C4 за +0,95 ppm у комплексу Ag6. Померања осталих угљеникових атома су готово идентична померањима одговарајућих атома у некоординованом лиганду.

У IR спектрима комплекса Ag6 - Ag8 могу се уочити траке које потичу од вибрација координованих азот-донорских лиганада и NO₃⁻ или CF₃SO₃⁻ контра-анјона.¹²¹ У IR спектру комплекса Ag6, присутна је веома интензивна трака на 1384 cm⁻¹, која потиче од асиметричних валенционих вибрација нитратног јона.¹⁷⁶ Комплекси Ag7 и Ag8 имају у својој структури трифлатни контра-анјон и у њиховим IR спектрима присутно је неколико интензивних трака у области од 1300 – 1000 cm⁻¹. У тој области, у IR спектру Ag7 комплекса, присутне су интензивне траке на 1279, 1251 и 1024 cm⁻¹, док се у спектру комплекса Ag8 могу уочити траке на 1280, 1251 и 1025 cm⁻¹. Ове траке потичу од асиметричних и симетричних валенционих вибрација –SO₃ групе у CF₃SO₃⁻ јону.^{178,179} Поред тога, траке које потичу од симетричних и асиметричних валенционих вибрација – CF_3 групе су присутне на 1223 и 1160 сm⁻¹ и 1222 и 1156 сm⁻¹ код **Ag7** и **Ag8**, респективно. У IR спектру комплекса **Ag7** присутна је широка трака на 3429 сm⁻¹ која потиче од вибрација О–Н групе у кристалној води.

Апсорпциони максимуми (λ_{max}) и моларни екстинциони коефицијенти (ε) комплекса **Ag6** – **Ag8** су одређени одмах након њиховог растварања у DMSO.¹²¹ Таласна дужина апсорпционог максимума комплекса **Ag6** и **Ag7** ($\lambda_{max} = 257$ nm) је веома слична таласној дужини на којој је присутан апсорпциони максимум bpa лиганд ($\lambda_{max} = 258$ nm). У UV-Vis спектру комплекса **Ag8**, присутна су два апсорпциона максимума на 303 и 313 nm, што је у складу са UV-Vis спектром некоординованог bpe лиганда ($\lambda_{max} = 303$ и 315 nm). Ово указује да су апсорпциони максимуми комплекса последица $\pi \rightarrow \pi^*$ прелаза у bpa и bpe лигандима.

4.3.2. Испитивање антимикробне активности Ag6 – Ag8 комплекса

Применом микродилуционе методе испитивана је антимикробна активност синтетисаних комплекса Ag6 - Ag8 и лиганада bpa и bpe (Табела 11),¹²¹ док је антимикробна активност AgNO₃ и AgCF₃SO₃ соли раније испитивана према различитим сојевима микроорганизама.¹¹⁸ Испитивана је активност према три Грам-позитивне (*Listeria monocytogenes, Enterococcus faecalis* и *Staphylococcus aureus*) и четири Грам-негативне (*Pseudomonas aeruginosa* PAO1, *Escherichia coli, Salmonella enteritidis* и *Salmonella pullorum*) бактеријске врсте, које су чести узрочници инфекција коже, меких ткива, респираторног и уринарног тракта. Поред тога, испитивана је активност комплекса **Ag6** – **Ag8** и bpa и bpe лиганада на четири *Candida* врсте (*C. albicans, C. parapsilosis, C. glabrata* и *C. krusei*), које узрокују ≥95% свих кандидемија. Антимикробна активност испитиваних једињења је изражена као минимална инхибиторна концентрација (MIC, µg/mL). У циљу одређивања терапеутског потенцијала комплекса, испитивана је њихов ефекат на нормалној ћелијској линији фибробласта плућа (MRC-5).

Табела 11. Антимикробна активност комплекса Ag6 – Ag8 и bpa и bpe лиганада (MIC,
µg/mL) у односу на њихову цитотоксичност на нормалној MRC-5 ћелијској линији (IC50,
$\mu g/mL)^{121}$

	Ag6	Ag7	Ag8	bpa	bpe
E. coli NCTC 9001	12,5 ^a	12,5	12,5	>500	250
P. aeruginosa PAO1	50	200	25	>500	500
L. monocytogenes NCTC 11994	50	50	25	>500	100
S. aureus ATCC 43300	50	200	100	>500	>500
E. faecalis ATCC 29212	12,5	25	25	>500	>500
S. enteritidis ATCC 13075	50	50	200	>500	>500
S. pullorum ATCC 13036	25	12,5	250	>500	>500
C. albicans ATCC 10231	6,25	6,25	25	125	200
C. parapsilosis ATCC 22019	3,1	2,5	3,1	250	125
C. glabrata ATCC 2001	6,25	12,5	25	>500	100
C. krusei ATCC 6258	6,25	3,1	6,25	125	200
MRC-5	40	30	40	300	220

^аРезултати представљају средњу вредност три независна експеримента са стандардном девијацијом између 1 и 3%

Добијени резултати су показали да комплекси **Ag6** – **Ag8** имају добру до умерену антибактеријску активност са МІС вредностима од 12,5 до 250 µg/mL. С друге стране, активност bpa и bpe лиганада није била значајна (Табела 11). Комплекси **Ag6** – **Ag8**

показују најбољу активност према *E. coli* (MIC = 12,5 μ g/mL). Као што се може видети у табели 11, највећу антибактеријску активност показује комплекс **Ag6**, који је и најмање токсичан на здравој ћелијској линији (IC₅₀ = 40 μ g/mL).

Комплекси Ag6 - Ag8 показују значајну антифунгалну активност, посебно према *C. parapsilosis* и *C. krusei* сојевима (Табела 11).¹²¹ Важно је напоменути да је *C. parapsilosis* сој одговоран за тешке облике инфекција код новорођенчади и пацијената у јединицама интензивне неге. Према овој гљивици, комплекс Ag7 је имао највећу антифунгалну активност (MIC = 2,5 µg/mL). Међутим и поред тога, комплекси Ag6 и Ag8 имају бољи терапеутски профил, због индекса селективности који према овој гљивици износи 12,9. Имајући у виду значајну антифунгалну активност ових комплекса, испитиван је њихов ефекат на процес формирања хифа код *C. albicans* соја (Слика 42).

Комплекс Ag7 је ефикасно инхибирао формирање хифа *C. albicans* coja (Слика 42). Овај комплекс утиче на смањење броја и дужине хифа. С друге стране, и поред тога што спречава раст *C. albicans* (MIC = $6,25 \mu \text{g/mL}$; Табела 11), **Ag6** комплекс не инхибира формирање хифа. Као што се са слике 42 може видети, комплекс Ag8, такође, не спречава формирање хифа С. albicans coja. Раније синтетисани комплекси сребра(I) са 1,7- и 4,7фенантролинским лигандима су показали селективност према различитим Candida spp. у поређењу са бактеријским врстама,^{111,112} при чему, при MIC вредностима комплекса [Ag(NO₃)(4,7-phen)]_n и [Ag(CF₃COO)(4,7-phen)]_n долази до потпуног спречавања филаментације C. albicans.¹¹¹² Сличне особине имају и комплекси сребра(I) са 2-амино-3-метилпиридином, супституисаним имидазолима, пиридин-2карбоксалдоксимом и пиридин-3,5-дикарбоксилатом, који су показали значајну анти-Candida активност и умерену ефикасност према одабраним сојевима бактерија.¹⁶³⁻¹⁶⁵ Супротно томе, комплекси сребра(I) који садрже ароматична *N*-хетероциклична једињења са два атома азота у прстену (пиридазин, пиримидин, пиразин, фталазин, хиназолин, хиноксалин и феназин) показују селективну антибактеријску активност, посебно према *P. aeruginosa*.^{118,119,172}



Слика 42. Утицај комплекса Ag6 – Ag8 на формирање хифа код *C. albicans* соја у присуству MIC₈₀ вредности. DMSO је коришћен као контрола¹²¹

4.3.3. Испитивање DNA/BSA интеракција Ag6 – Ag8 комплекса

Испитивање интеракције комплекса сребра(I) и DNA је веома значајно у развоју нових лекова, који у структури садрже јон сребра(I).^{188,189} Начин интеракције комплекса сребра(I) и DNA зависи од структурних особина комплекса и концентрације и врсте испитиваног DNA молекула. Поред тога, комплекси сребра(I) могу ступати у интеракцију са различитим биомолекулима, од којих је најзначајнији транспортни протеин албумин.¹⁹⁰ Комплекси сребра(I) са албумином могу интереаговати преко електростатичких интеракција, као и водоничним и ковалентним везивањем. Ове интеракције изазивају конформационе промене у протеину, што може или да повећа или да наруши његову стабилност, доводећи до денатурације. Најповољније је да се испитивано једињење везује за албумин умерено, јер то омогућава његов транспорт и испоруку до циљног места. Имајући ове чињенице у виду, у овој докторској дисертацији су испитиване интеракције **Аg6** – **Ag8** комплекса са DNA и BSA.¹²¹

Једна од метода које се користе за испитивање интеракција комплекса сребра(I) са DNA је UV-Vis спектрофотометрија. На слици 43, могу се видети промене у апсорпционим спектрима након додатка растућих концентрација ct-DNA у раствор комплекса Ag6 – Ag8 у 10 mM Tris пуферу. За спектрофотометријску титрацију коришћене су равнотежне концентрације ct-DNA у опсегу од 0 - 87 µM, док су равнотежне концентрације комплекса Ag6 - Ag8 биле константе и износиле су 63, 40 и 6,6 µМ, респективно. Са повећањем концентрације сt-DNA долази до хиперхромног ефекта, што указује да између комплекса Ag6 - Ag8 и ct-DNA долази до нековалентних интеракција, које укључују електростатичке интеракције са фосфатним групама и/или интеракцију са малим или великим жљебом.^{191,192} Константе везивања комплекса (K_b) се могу израчунати из графика зависности [ct-DNA]/(ε_a - ε_f) у функцији од [ct-DNA] (Слика 43). На основу добијених K_b вредности, може се закључити да се комплекс Ag6 незнатно јаче везује за ct-DNA у односу на преостала два комплекса (Табела 12). Ипак, може се рећи да су K_b вредности израчунате за Ag6 – Ag8 комплексе у складу са одговарајућим вредностима за комплексе сребра(I), $\{[Ag(asp)(tpp)_3(napr)](DMF)\}, [Ag(Hsal)(tpp)_2],$ [Ag(pHbza)(tpp)₂], {[Ag(napr)(tpp)₃](H₂O)} и [Ag(nim)(tpp)₂], (napr је напроксен, Hasp је аспирин, sal је салицилна киселина, pHbza је *p*-хидроксибензоева киселина, nim је нимесулид и tpp је трифенилфосфин), као и за $[Ag(pHbza)(tptp)_2]$ и $[Ag(nim)(tptp)_2]$ комплексе (tptp је три(*p*-толил)фосфин).¹⁹³ На основу вредности промене Гибсове енергије ($\Delta G < 0$) закључено је да је интеракција између комплекса Ag6 – Ag8 и ct-DNA спонтана.


Слика 43. (a) Апсорпциони спектри комплекса Ag6 – Ag8 у Tris пуферу (10 mM, pH = 7,4) након додатка растуће концентрације ct-DNA. Црна стрелица показује промену апсорбанце са повећањем концентрације ct-DNA. (б) Зависност [ct-DNA]/(ε_a – ε_f) у функцији од [ct-DNA]

UV-Vis титрација			Флуоресцентна титрација				
Комплекс	K_{b} (M ⁻¹)	ΔG^{o}	K_{sv} (M ⁻¹)	Хипохромизам	$K_q (\mathrm{M}^{-1}/\mathrm{s})$	$K_A(\mathrm{M}^{-1})$	п
		(kcal/mol)		(%)			
Ag6	$6,65 \times 10^{5}$	-7,9	$(2,5\pm 0,2) \times 10^3$	11,3	$2,53 \times 10^{11}$	$1,8 \times 10^{4}$	1,4
Ag7	$4,58 \times 10^{5}$	-7,7	$(2,4\pm 0,5) \times 10^3$	12,0	$2,39 \times 10^{11}$	$4,22 \times 10^{4}$	0,80
Ag8	6×10^{5}	-7,8	$(9,1\pm 0,7) \times 10^2$	3,8	$9,07 imes 10^{10}$	59,16	0,72





Слика 44. (а) Емисиони спектри EthBr-ct-DNA система у присуству растуће концентрације комплекса Ag7 (инсертовани график: Стерн-Волмеров дијаграм). (б) *In vitro* интеракција комплекса Ag7 са хромозомалном DNA из *C. albicans* (концентрације комплекса: 40, 100 и 400 µM) праћена применом гел електрофорезе¹²¹

Афинитет комплекса Ag6 - Ag8 за ct-DNA у присуству етидијум-бромида (EthBr) је испитиван применом емисионе флуоресцентне спектроскопије.¹²¹ Раније је нађено да се EthBr интеркалативно везује између суседних парова база у двострукој спирали DNA, што доводи до повећања интензитета његове флуоресценције.¹⁴⁴ Ако се испитивани комплекс интеркалативно везује за DNA, долази до смањења интензитета флуоресценције EthBr-ct-DNA система.^{112,194} Поред тога, везивање испитиваног једињења за EthBr-ct-DNA може довести до формирања нове нефлуоресцентне врсте.¹¹² Као што се може видети са слика 44 и 45, додавањем комплекса сребра(I) у раствор EthBr-ct-DNA система интензитета емисије.



Слика 45. Емисиони спектри EthBr-ct-DNA система у присуству растуће концентрације комплекса Ag6 и Ag8. Инсертовани график представља Стерн-Волмеров дијаграм

Интеракција Ag6 - Ag8 са хромозомалном DNA из *C. albicans* праћена је применом гел електрофорезе, при чему је уочено да долази до незнатног смањења емисије EthBr-ct-DNA система након додавања ових комплекса. При овим условима нађено је да је DNA интеракција Ag6 и Ag7 комплекса нешто значајнија у односу на Ag8, што се посебно примећује при концентрацији испитиваних комплекса од 400 μ M.

Као што из табеле 12 може видети, вредности Стерн-Волмерове константе (K_{SV}) за испитиване комплексе указују на неинтеракалативни начин њихове интеракције са сt-DNA. У прилог томе иде и проценат хипохромизма, који износи до 12%. Раније је нађено да проценат хипохромизма за интеркалатор луцигенин износи 50%.¹⁹⁵ На основу вредности K_{SV} константи може се закључити да комплекси који садрже bpa (**Ag6** и **Ag7**) имају већи афинитет према сt-DNA у односу на **Ag8** (Табела 12). Применом исте методе, израчунате су сличне вредности за K_{SV} константе за раније испитиване комплексе сребра(I).^{112,174,196} С друге стране, на основу вредности константи K_q које су веће од 2 × 10^{10} M⁻¹/s може се закључити да интеракција између комплекса сребра **Ag6** – **Ag8** и сt-DNA доводи до статичког механизма гашења флуоресценције.¹⁹⁴ Израчунате вредности константи везивања (K_A , Табела 12) су знатно мање од одговарајуће константе израчунате за EthBr ($K_A = 2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$).

Серум албумин је најзаступљенији протеин у крви и има важну улогу у транспорту различитих фармацеутских формулација. У складу са тим, истраживања интеракција синтисаних једињења за овај транспортни протеин су веома значајна и дају информације о њиховој биодистрибуцији, токсичности и механизму деловања.^{197,198} Говеђи серум албумин (BSA) представља структурни аналог хуманог серум албумина (HSA) и највише је проучаван протеин за интеракције са комплексима метала.¹⁹⁹ BSA садржи три флуорофоре триптофан, тирозин и фенилаланин, али, у највећој мери, флуоресценција BSA потиче од присуства триптофана.²⁰⁰

Интеракције комплекса Ag6 - Ag8 са BSA су испитиване применом флуоресцентне емисионе спектроскопије (Слика 45). Концентрација BSA је била константна (13,1 µM), док су концентрације испитиваних комплекса биле у опсегу од 0 до 464,9 µM. Додавање комплекса у раствор BSA константе концентрације доводи до гашења флуоресценције овог протеина, услед њихове интеракције са BSA, чиме долази до промене терцијарне структуре протеина.²⁰¹ Поред тога, смањење интензитета флуоресценције BSA може бити последица преноса енергије и реакција у побуђеном стању.²⁰²



Слика 46. (а) Емисиони спектри BSA у присуству растуће концентрације комплекса Ag7 и Ag8. Стрелица показује промену интензитета флуоресценције са повећањем концентрације комплекса. (б) Инсертовани график представља Стерн-Волмеров дијаграм

Вредности константе K_{SV} за испитиване комплексе опадају у следећем низу: **Ag8** > **Ag7** > **Ag6** (Табела 13), што указује да комплекс **Ag8** који садржи bpe лиганд има највећи афинитет према BSA. Вредност K_{SV} константе за комплекс **Ag8** је слична вредностима за комплексе сребра(I) са *N*-метил-1,3,5-триаза-7-фосфадамантаном и tris(пиразол-1-ил)метансулфонатом.¹⁴⁴ На основу вредности константе K_q (Табела 13) може се закључити да комплекси **Ag6** – **Ag8** имају способност гашења флуоресценције BSA протеина, што, такође, указује на њихов афинитет према овом биомолекулу. Вредности K_q константи су веће од 2 × 10¹⁰ M⁻¹/s, што указује на статички механизам гашења флуоресценције.¹⁹⁴ Вредности K_A константи су у оптималном опсегу за све испитиване комплексе (Табела 13); оне указују да се комплекси везују за BSA, који их транспортује, али да није спречено њихово ослобађање по доласку на циљано место.²⁰³ Вредност броја везујућих места *n* за све комплексе указује да постоји једно место које је доступно за везивање комплекса за испитивани протеин.

Комплекс	K_{sv} (M ⁻¹)	Хипохромизам (%)	$K_q (\mathrm{M}^{-1}/\mathrm{s})$	$K_A \left(\mathrm{M}^{-1} \right)$	п
Ag6	$(4,1\pm 1,0) imes 10^3$	65,6	$3,45 \times 10^{11}$	$1,34 \times 10^{4}$	1,14
Ag7	$(8,2\pm 0,2) imes 10^3$	76,1	$8,16 \times 10^{11}$	$1,97 \times 10^{4}$	1,10
Ag8	$(2,76\pm0,05)\times10^4$	81,1	$2,76 \times 10^{12}$	$1,27 \times 10^{5}$	1,30

Табела 13	. Вредности	константи везивања	комплекса А	Ag6 – A	\g8 за	BSA ¹²¹
-----------	-------------	--------------------	-------------	----------------	---------------	--------------------

5. ЗАКЉУЧАК

У оквиру ове докторске дисертације синтетисано је осам комплекса сребра(I) са различитим ароматичним азот-донорским хетероцикличним једињењима, $[Ag(1,10-phen)_2]CF_3COO:H_2O$ (Ag1), $[Ag(CF_3COO)(5,6-epoxy-1,10-phen)]_2$ (Ag2), $[Ag(NO_3)(1,5-naph)]_n$, (Ag3), $[Ag(CF_3COO)(1,5-naph)]_n$ (Ag4), $[Ag(CF_3SO_3)(1,5-naph)]_n$ (Ag5), $\{[Ag(bpa)]NO_3\}_n$ (Ag6), $\{[Ag(bpa)_2]CF_3SO_3:H_2O\}_n$ (Ag7) и $\{[Ag(bpe)]CF_3SO_3\}_n$ (Ag8). Сва синтетисана једињења су окарактерисана применом различитих спектроскопских метода (UV-Vis, IR и NMR), елементалне микроанализе, док је у случају погодних кристала, коришћена рендгенска структурна анализа за одређивање структуре комплекса.

Комплекси који садрже 1,10-фенантролин (Ag1) и 5,6-епокси-1,10-фенантролин (Ag2) показују значајну антифунгалну активност према *Candida* сојевима (MIC = $0,9 - 12,5 \mu$ M). Приликом испитивања цитотоксичности Ag1 и Ag2 комплекса утврђено је да кључну улогу на повећање антипролиферативног ефекта има епоксидни прстен присутан у структури Ag2 комплекса. Овај комплекс показује значајну антипролиферативну активност према ћелијама тумора дојке, плућа и панкреаса, и могао би се даље испитивати у комбинованој терапији за лечење гљивичних инфекција које су повезане са тумором.

У комплексима сребра(I) са 1,5-нафтиридином (**Ag3** – **Ag5**) овај лиганд повезује два Ag(I) јона, док се за преостала места координује атом кисеоника из одговарајућег анјона AgX соли коришћене за синтезу комплекса (X = NO₃⁻, CF₃COO⁻ и CF₃SO₃⁻). Различит начин координације X анјона доводи до различите геометрије комплекса, што је и потврђено применом рендгенске структурне анализе. Комплекси **Ag3** – **Ag5** показују значајну антимикробну активност са већим антифунгалним потенцијалом (MIC = 0,78 – 6,25 µg/mL (2,6 – 20,8 µM)). Комплекси **Ag3** и **Ag4** ефикасно инхибирају формирања биофилма *C. albicans*. У *in vivo* испитивањима на ембрионима зебра рибица показано је да сва три комплекса имају добар терапеутски профил, који је најповољнији у случају **Ag5** комплекса. Приликом ових испитивања утврђено је да су комплекси **Ag3** – **Ag5** мање токсични на ембрионима зебра рибица у односу на клинички коришћени сребро(I)-сулфадиазин (AgSD).

У полинуклеарним Ag6 - Ag8 комплексима 1,2-*bis*(4-пиридил)етан и 1,2-*bis*(4-пиридил)етен имају улогу мостног лиганда између два Ag(I) јона, док је X (X = NO₃⁻ и CF₃SO₃⁻) уграђен у кристалну решетку као контра-анјон. Ови комплекси ефикасно инхибирају раст четири *Candida* coja (*C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* и *C. krusei*), при чему су MIC вредности од 2,5 до 25 µg/mL. Поред тога, комплекси Ag6 – Ag8 показују антибактеријску активност, посебно према *E. coli* (MIC = 12,5 µg/mL). Комплекс Ag7 инхибира филаментацију *C. albicans* coja, која представља важан процес за патогенезу гљивичних инфекција. Комплекси Ag6 и Ag8 имају бољи терапеутски потенцијал и мање су токсични према нормалној ћелијској линији фибробласта плућа MRC-5 у односу на Ag7, при чему је њихов индекс селективности према *C. parapsilosis* cojy 12,9. Поред тога, комплекси Ag6 и Ag7 имају већи афинитет према DNA у односу на Ag8, док највећи афинитет према BSA показује Ag8 комплекс.

Резултати који су добијени приликом израде ове докторске дисертације могу значајно допринети равоју нових антибактеријских и антифунгалних лекова за лечење мултирезистентних микробних инфекција. Поред тога, значајна антитуморска активност комплекса сребра(I) са азот-донорским лигандима указује на њихову потенцијалну примену у комбинованој терапији за лечење микробних инфекција које су повезане са туморским обољењима.

6. ЛИТЕРАТУРА

1. E. Alessio, Bioinorganic Medicinal Chemistry, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA (2011).

- **2.** M. Peyrone, Ann. Chem. Pharm. **51** (1844) 1.
- 3. B. Rosenberg, L. VanCamp, J. E. Trosko, V. H. Mansour, Nature 222 (1969) 385.
- **4.** B. Rosenberg, L. VanCamp, T. Krigas, *Nature* **205** (1965) 698.

5. Approval Summary for cisplatin for Metastatic ovarian tumors. FDA Oncology Tools. Food and Drug Administration, *Center for Drug Evaluation and Research*. 19 December 1978.

- 6. H. Milosavljević, C. Duranton, N. Djerbi, P. H. Puech, P. Gounon, D. Lagadic-Gossmann,
- M. Thérèse Dimanche-Boitrel, C. Rauch, M. Tauc, L. Counillon, M. Poët, *Cancer Res.* 70 (2010) 7514.
- 7. R. P. Miller, R. K. Tadagavadi, G. Ramesh, W. B. Reeves, Toxins 2 (2010) 2490.
- 8. N. Singh, A. Vik, D. B. Lybrand, C. Morisseau, B. D. Hammock, *Chem. Res. Toxicol.* 34 (2021) 2579.
- 9. J. A. Levi, R. S. Aroney, D. N. Dalley, Br. Med. J. 282 (1981) 2003.
- 10. J. Fischer, R. C. Ganellin, Analogue-based Drug Discovery, John Wiley & Sons (2006)
- 11. M. G. Apps, E. H. Y. Choi, N. J. Wheate, Endocr. Relat. Cancer 22 (2015) 219.
- 12. H. Ehrsson, I. Wallin, J. Yachnin, Med. Oncol. 19 (2002) 261.
- 13. L. R. Kelland, G. Abel, M. J. McKeage, M. Jones, P. M. Goddard, M. Valenti, B. A. Murrer, K. R. Harrap, *Cancer Res.* 53 (1993) 2581.
- 14. N. J. Wheate, S. Walker, G. E. Craig, R. Oun, Dalton Trans. 39 (2010) 8113.
- 15. X. Zhou, D. Zhu, Y. Liao, W. Liu, H. Liu, Z. Ma, D. Xing, Nature Protoc. 9 (2014) 1146.
- 16. W. Zhang, D. Zhao, R. Zhang, Z. Ye, G. Wang, J. Yuan, M. Yang, Analyst 136 (2011) 1867.
- 17. N. Cook, K. Kilpatrick, L. Segatori, A.A. Marti, J. Am. Chem. Soc. 134 (2012) 20776.
- **18.** R. Crabtree, The Organometallic Chemistry of the Transition Metals, 6th ed. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc. (2014).
- **19.** A. Jabłońska-Wawrzycka, P. Rogala, S. Michałkiewicz, M. Hodorowicz, *Dalton Trans.* **42** (2013) 6092.
- 20. J. Reedijk, Platin. Metals Rev. 52 (2008) 2.
- 21. G. Gasser, N. Metzler-Nolte, Curr. Opin. Chem. Biol. 16 (2012) 84.
- 22. F. P. Dwyer, E. C. Gyarfas, W. P. Rogers, J. H. Koch, Nature 170 (1952) 190.
- **23.** C. Hartinger, M. Jakupec, S. Zorbas-Seifried, M. Groessl, A. Egger, W. Berger, H. Zorbas, P. J. Dyson, B. K. Keppler, *Chem. Biodivers.* **5** (2008) 2140.
- 24. R. Trondl, P. Heffeter, C. Kowol, M. A. Jakupec, W. Bergerbd, B. K. Keppler, *Chem. Sci.* 5 (2014) 2925.
- **25.** J. Rademaker-Lakhai, D. van den Bongard, D. Pluim, J. H. Beijnen, J. H. Schellens, *Clin. Cancer Res.* **10** (2004) 3717.
- **26.** S. Monro, K. L. Colon, H. Yin, J. Roque III, P. Konda, S. Gujar, R. P. Thummel, L. Lilge, C. G. Cameron, S. A. McFarland, *Chem. Rev.* **119** (2019) 797.
- **27.** G. Sava, A. Bergamo, S. Zorzet, B. Gava, C. Casarsa, M. Cocchietto, A. Furlani, V. Scarcia, B. Serli, E. Lengo, E. Alessio, G. Mestroni, *Eur. J. Cancer* **38** (2002) 427.
- **28.** D. S. Thompson, G. J. Weiss, S.F. Jones, H. A. Burris, R. K. Ramanathan, J. R. Infante, J. C. Bendell, A. Ogden, D. D. Von Hoff, *J. Clin. Oncol.* **30** (2012) abstract #3033.
- 29. S. Y. Lee, C. Y. Kim, T.-G. Nam, Drug Des. Devel. Ther. 14 (2020) 5375.
- **30.** S. J. Berners-Price, A. Filipovska, *Metallomics* **3** (2011) 863.
- **31.** W. F. Kean, F. Forestier, Y. Kassam, W. W. Buchanan, P. J. Rooney, *Semin. Arthritis Rheum.* **14** (1985) 180.
- **32.** M. Deponte, S. Urig, L. D. Arscott, K. Fritz-Wolf, R. Reau, C. Herold-Mende, S. Konkarevic, M. Meyer, E. Davioud-Charvet, D. P. Ballou, C. H.Williams, K. Becker, *J. Biol. Chem.* **280** (2005) 20628.

- **33.** S. Urig, K. Fritz-Wolf, R. Reau, C. Herold-Mende, K. Toth, E. Davioud-Charvet, K. Becker, *Angew. Chem. Int. Ed.* **45** (2006) 1881.
- **34.** E. Viry, E. Battaglia, V. Deborde, T. Müller, R. Reau, E. Davioud-Charvet, D. Bagrel, *ChemMedChem* **3** (2008) 1667.
- **35.** N. Pillarsetty, K. K. Katti, T. J. Hoffman, W. A. Volkert, K. V. Katti, H. Kamei, T. Koide, *J. Med. Chem.* **46** (2003) 1130.
- **36.** M. L. Higginbotham, C. J. Henry, K. V. Katti, S. W. Casteel, P. M. Dowling, N. Pillarsetty, *Vet. Ther.* **4** (2003) 76.
- **37.** M. M. Jellicoe, S. J. Nichols, B. A. Callus, M. V. Baker, P. J. Barnard, S. J. Berners-Price, J. Whelan, G. C. Yeoh, A. Filipovska, *Carcinogenesis* **29** (2008) 1124.
- **38.** J. L. Hickey, R. A. Ruhayel, P. J. Barnard, M. V. Baker, S. J. Berners-Price, A. Filipovska, J. Am. Chem. Soc. **130** (2008) 12570.
- **39.** I. Ott, Coord. Chem. Rev. **253** (2009) 1670.
- **40.** L. Messori, F. Abbate, G. Marcon, P. Orioli, M. Fontani, E. Mini, T. Mazzei, S. Carotti, T. O'Connell, P. Zanello, *J. Med. Chem.* **43** (2000) 3541.
- **41.** C. -M. Che, R. W. -Y. Sun, W. -Y. Yu, C. -B. Ko, N. Zhu, H. Sun, *Chem. Commun.* (2003) 1718.
- 42. L. Giovagnini, L. Ronconi, D. Aldinucci, D. Lorenzon, S. Sitran, D. Fregona, J. Med. Chem. 48 (2005) 1588.
- **43.** L. Ronconi, L. Giovagnini, C. Marzano, F. Bettio, R. Graziani, G. Pilloni, D. Fregona, *Inorg. Chem.* **44** (2005) 1867.
- 44. D. Fan, C. T. Yang, J. D. Ranford, J. J. Vittal, P. F. Lee, *Dalton Trans.* (2003) 3376.
- **45.** A. Divsalar, A. A. Saboury, H. Mansoori-Torshizi, A. A. Moosavi-Movahedi, J. Biomol. Struct. Dyn. **25** (2007) 173.
- **46.** A. Divsalar, A. A. Saboury, L. Ahadi, E. Zemanatiyar, H. Mansouri-Torshizi, D. Ajloo, R. H. Sarma, J. *Biomol. Struct. Dyn.* **29** (2011) 283.
- 47. A. Garoufis, S. K. Hadjikakou, N. Hadjiliadis, Coord. Chem. Rev. 253 (2009) 1384.
- **48.** A. Garoufis, S. K. Hadjikakou, N. Hadjiliadis, ₄₆Pd The Use of Palladium Complexes in *Medicine*, in Metallotherapeutic Drugs and Metal-Based Diagnostic Agents, ed. by M. Gielen, E. R. T. Tiekink (Wiley, Chichester) (2005) 399.
- 49. J. L. Butour, S. Wimmer, F. Wimmer, P. Castan, Chem. Biol. Inter. 104 (1997) 165.
- **50.** F. V. Rocha, C. V. Barra, A. V. G. Netto, A. E. Mauro, I. Z. Carlos, R. C. G. Frem, S. R. Ananias, M. B. Quilles, A. Stevanato, M. C. Rocha, *Eur. J. Med. Chem.* **45** (2010) 1698.
- 51. E. Budzisz, U. Krajewska, M. Rozalski, A. Szulawska, M. Czyz, B. Nawrot, *Eur. J. Pharm.* 502 (2004) 59.
- **52.** S. Ray, R. Mohan, J. K. Singh, M. K. Samantaray, M. M. Shaikh, D. Panda, P. Ghosh, *J. Am. Chem. Soc.* **129** (2007) 15042.
- 53. T. Storr, K. H. Thompson, C. Orvig, Chem. Soc. Rev. 35 (2006) 534.
- **54.** S. Halder, S. M. Peng, G. H. Lee, T. Chatterjee, A. Mukherjee, S. Dutta, U. Sanyal, S. Bhattacharya, *New J. Chem.* **32** (2008) 105.
- **55.** E. Ulukaya, F. Ari, K. Dimas, E. I. Ikitimur, E. Guney, V. T. Yilmaz, *Eur. J. Med. Chem.* **46** (2011) 4957.
- 56. N. M. Milović, N. M. Kostić, J. Am. Chem. Soc. 124 (2002) 4759.
- 57. D. P. Ašanin, S. Rajković, D. Molnar-Gabor, M. I. Đuran, Monatsh. Chem. 135 (2004) 1445.
- 58. N. Sakol, A. Egawa, T. Fujiwara, Int. J. Mol. Sci. 21 (2020) 4042.
- **59.** L. Dai, C. M. Jones, W. T. K. Chan, T. A. Pham, X. Ling, E. M. Gale, N. J. Rotile, W. C.-S. Tai, C. J. Anderson, P. Caravan, G.-L. Law, *Nat. Commun.* **9** (2018) 857.
- **60.** V. Granata, M. Cascella, R. Fusco, N. Dell' Aprovitola, O. Catalano, S. Filice, V. Schiavone, F. Izzo, A. Cuomo, A. Petrillo, *Biomed. Res. Int.* **2016** (2016) 1.

61. D. Pan, A. H. Schmieder, S. A. Wickline, G. M. Lanza, Tetrahedron 67 (2011) 8431.

62. J. Dissemond, J. G. Böttrich, H. Braunwarth, J. Hilt, P. Wilken, K. C. Münter, J. Dtsch. Dermatol. Ges. 15 (2017) 524.

63. J. W. Alexander, Surg. Infect. (Larchmt) 10 (2009) 289.

64. P. M. Dunn, Arch. Dis. Child. Fetal Neonatal Ed. 83 (2000) F158.

65. N. Grier, Silver and its Compounds, In: Disinfection, Sterilization, and Preservation, 1st ed. Philadelphia: Lea & Febiger (1968) 375.

66. N. J. Farrer, P. J. Sadler, Medicinal Inorganic Chemistry: State of the Art, New Trends, and a Vision of the Future. In Bioinorganic Medicinal Chemistry, ed. E. Alessio, WileyVCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim (2011).

67. M. I. Đuran, Primena kompleksnih jedinjenja u medicini, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Kragujevcu (2000).

68. G. McDonnell, A. D. Russell, Clin. Microbiol. Rev. 12 (1999) 147.

69. S. Jangra, S. Devi, V. K. Tomer, V. Chhokar, S. Duhan, J. Asian Ceram. Soc. **4** (2016) 282. **70.** X. Liu, H. Gan, C. Hu, W. Sun, X. Zhu, Z. Meng, R. Gu, Z. Wu, G. Dou, Int. J. Nanomedicine **14** (2019) 289.

71. S. Silver, Gene 179 (1996) 9.

72. S. M Modak, L. Sampath, C. L. Fox Jr., J. Burn Care Rehabil. 9 (1988) 359.

73. C. Haefeli, C. Franklin, K. J. Hardy, J. Bacteriol. 158 (1984) 389.

74. A. Gupta, K. Matsui, J. F. Lo, S. Silver, Nat. Med. 5 (1999) 183.

75. A. B. G. Lansdown, J. Wound Care **16** (2007) 15.

76. A. Gupta, C. Silver, Nat. Biotechnol. 16 (1998) 888.

77. S. Medici, M. Peana, G. Crisponi, V. M. Nurchi, J. I. Lachowicz, M. Remelli, M. Antonietta Zoroddu, *Coord. Chem. Rev.* **327-328** (2016) 349.

78. H. Goitia, Y. Nieto, M. D. Villacampa, C. Kasper, A. Laguna, M. Concepcion Gimeno, *Organometallics* **32** (2013) 6069.

79. J. Kuchar, J. Rust, C. W. Lehmann, F. Mohr, Inorg. Chem. 59 (2020) 10557.

80. V. Y. G. Almeida, J. S. Rocha, D. P. Felix, G. P. Oliveira, M. A. Lima, R. L. Farias, R. D. Zanetti, A. V. G. Netto, C. R. Zambom, S. S. Garrido, F. V. Rocha, *ChemistrySelect* **5** (2020) 14559.

81. D. Varna, E. Kapetanaki, A. Koutsari, A. G. Hatzidimitriou, G. Psomas, P. Angaridis, R. Papi, A. A. Pantazaki, P. Aslanidis, *Polyhedron* **151** (2018) 131.

82. L. Kyros, N. Kourkoumelis, M. Kubicki, L. Male, M. B. Hursthouse, I. I. Verginadis, E. Gouma, S. Karkabounas, K. Charalabopoulos, S. K. Hadjikakou, *Bioinorg. Chem. Appl.* (2010) 386860.

83. S. N. A. Halim, F. J. Nordin, M. R. M. A. Razak, N. R. F. M. Sofyan, S. N. A. Halim, N. F. Rajab, R. Sarip, *J. Coord. Chem.* **72** (2019) 879.

84. D. E. S. Silva, A. B. Becceneri, J. V. B. Santiago, J. A. Gomes Neto, J. Ellena, M. R. Cominetti, J. C. M. Pereira, M. J. Hannond, A. V. G. Netto, *Dalton Trans.* **49** (2020) 16474.

85. V. T. Yilmaz, C. Icsel, J. Batur, S. Aydinlik, M. Cengiz, O. Buyukgungor, *Dalton Trans.* **46** (2017) 8110.

86. P. Papathanasiou, G. Salem, P. Waring, A. C. Willis, J. Chem. Soc. Dalton Trans. (1997) 3435.

87. M. J. McKeage, P. Papathanasiou, G. Salem, A. Sjaarda, G. F. Swiegers, P. Waring, S. B.Wild, *Met.-Based Drugs* **5** (1998) 217.

88. S. J. Berners-Price, R. J. Bowen, P. J. Harvey, P. C. Healy, G. A. Koutsantonis, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* (1998) 1743.

89. J. J. Liu, P. Galettis, A. Farr, L. Maharaj, H. Samarasinha, A. C. McGechan, B. C. Baguley, R. J. Bowen, S. J. Berners-Price, M. J. McKeage, *J. Inorg. Biochem.* **102** (2008) 303.

90. W. A. Herrmann, L. J. Goossen, M. Spiegler, Organometallics 17 (1998) 2162.

91. D. S. McGuinness, K. J. Cavell, B. W. Skelton, A. H. White, *Organometallics* 18 (1999) 1596.

- 92. K. Öfele, J. Organomet. Chem. 12 (1968) P42.
- 93. H. -W. Wanzlick, H. -J. Schönherr, Angew. Chem. Int. Ed. 7 (1968) 141.
- 94. M. N. Hopkinson, C. Richter, M. Schedler, F. Glorius, Nature 510 (2014) 485.
- 95. A. J. Arduengo III, R. L. Harlow, M. Kline, J. Am. Chem. Soc. 113 (1991) 361.
- **96.** K. M. Hindi, M. J. Panzner, C. A. Tessier, C. L. Cannon, W. J. Youngs, *Chem. Rev.* **109** (2009) 3859.
- 97. S. Y. Hussaini, R. A. Haque, M. R. Razali, J. Organomet. Chem. 882 (2019) 96.
- 98. S. J. Tan, Y. K. Yan, P. P. F. Lee, K. H. Lim, Future Med. Chem. 2 (2010) 1591.
- 99. A. Kascatan-Nebioglu, M. J. Panzner, C. A. Tessier, C. L. Cannon, W. J. Youngs, *Coord. Chem. Rev.* 251 (2007) 884.
- 100. J. C. Garrison, W. J. Youngs, Chem. Rev. 105 (2005) 3978.

101. M. K. Samantaray, D. Roy, A. Patra, R. Stephen, M. Saikh, R. B. Sunoj, P. Ghosh, J. Organomet. Chem. 691 (2006) 3797.

102. M. K. Samantaray, K. Pang, M. M. Shaikh, P. Ghosh, Inorg. Chem. 47 (2008) 4153.

103. A. Melaiye, Z. Sun, K. Hindi, A. Milsted, D. Ely, D. H. Reneker, C. A. Tessier, W. J. Youngs, J. Am. Chem. Soc. 127 (2005) 2285.

104. A. Kascatan-Nebioglu, A. Melaiye, K. Hindi, S. Durmus, M. Panzner, A. Milsted, D. Ely, C. A. Tessier, L. A. Hogue, R. J. Mallett, C. E. Hovis, M. Coughenour, S. D. Crosby, A. Milsted,

D. L. Ely, C. A. Tessier, C. L. Cannon, W. J. Youngs, J. Med. Chem. 49 (2006) 6811.

105. M. J. Panzner, K. M. Hindi, B. D. Wright, J. B. Taylor, D. S. Han, W. J. Youngs, C. L. Cannon, *Dalton Trans.* (2009) 7308.

106. K. M. Hindi, T. J. Siciliano, S. Durmus, M. J. Panzner, D. A. Medvetz, D. V. Reddy, L. A. Hogue, C. E. Hovis, J. K. Hilliard, R. J. Mallet, C. A. Tessier, C. L. Cannon, W. J. Youngs, *J. Med. Chem.* **51** (2008) 1577.

107. S. Roland, C. Jolivalt, T. Cresteil, L. Eloy, P. Bouhours, A. Hequet, V. Mansuy, C. Vanucci, J.-M. Paris, *Chem.-Eur. J.* 17 (2011)1442.

108. L. Eloy, A. -S. Jarrousse, M. -L. Teyssot, A. Gautier, L. Morel, C. Jolivalt, T. Cresteil, S. Roland, *ChemMedChem* 7 (2012) 805.

109. D. F. Segura, A. V. G. Netto, R. C. G. Frem, A. E. Mauro, P. B. da Silva, J. A. Fernandes, F. A. Almeida Paz, A. L. T. Dias, N. C. Silva, E. T. de Almeida, M. J. Marques, L. de Almeida, K. F. Alves, F. R. Pavan, P. C. de Souza, H. B. de Barros, C. Q. F. Leite, *Polyhedron* **79** (2014) 197.

110. M. McCann, B. Coyle, S. McKay, P. McCormack, K. Kavanagh, M. Devereux, V. McKee, P. Kinsella, R. O'Connor, M. Clynes, *BioMetals* **17** (2004) 635.

111. N. D. Savić, S. Vojnović, B. Đ. Glišić, A. Crochet, A. Pavić, G. V. Janjić, M. Pekmezović, I. M. Opsenica, K. M. Fromm, J. Nikodinović-Runić, M. I. Djuran, *Eur. J. Med. Chem.* 156 (2018) 760.

112. Á. Pavić, N. D. Savić, B. Đ. Glišić, A. Crochet, S. Vojnović, A. Kurutos, D. M. Stanković, K. M. Fromm, J. Nikodinovic-Runić, M. I. Djuran, *J. Inorg. Biochem.* **195** (2019) 149.

113. N. D. Savić, D. R. Milivojević, B. Đ. Glišić, T. Ilic-Tomić, J. Veselinović, A. Pavić, B. Vasiljević, J. Nikodinović-Runić, M. I. Djuran, *RSC Adv.* **6** (2016) 13193.

114. A. A. Massoud, V. Langer, Y. M. Gohar, M. A. M. Abu-Youssef, J. Janis, G. Lindberg, K. Hansson, L. Öhrström, *Inorg. Chem.* 52 (2013) 4046.

115. M. Olgun Karataş, N. Özdemir, M. Sarıman, S. Günal, E. Ulukayae, İ. Özdemir, *Dalton Trans.* **50** (2021) 11596.

116. L. P. Franco, E. P. de Góis, B. S. Codonho, A. L. R. Pavan, I. O. Pereira, M. J. Marques, E. T. de Almeida, *Med. Chem. Res.* **22** (2013) 1049.

117. A. Frei, J. Zuegg, A. G. Elliott, M. Baker, S. Braese, C. Brown, F. Chen, C. G. Dowson, G. Dujardin, N. Jung, A. P. King, A. M. Mansour, M. Massi, J. Moat, H. A. Mohamed, A. K. Renfrew, P. J. Rutledge, P. J. Sadler, M. H. Todd, C. E. Willans, J. J. Wilson, M.A. Cooper, M. A. T. Blaskovich, *Chem. Sci.* **11** (2020) 2627.

118. B. Đ. Glišić, L. Senerovic, P. Comba, H. Wadepohl, A. Veselinovic, D. R. Milivojevic, M. I. Djuran, J. Nikodinovic-Runic, *J. Inorg. Biochem.* **155** (2016) 115.

119. S. Ž. Đurić, M. Mojicević, S. Vojnović, H. Wadepohl, T. P. Andrejević, N. Lj. Stevanović, J. Nikodinović-Runić, M. I. Djuran, B. Đ. Glišić, *Inorg. Chim. Acta* **502** (2020) 119357.

120. S. Đurić, S. Vojnović, A. Pavić, M. Mojicević, H. Wadepohl, N. D. Savić, M. Popsavin, J. Nikodinovic-Runić, M. I. Djuran, B. Đ. Glišić, *J. Inorg. Biochem.* **203** (2020) 110872.

121. S. Ž. Đurić, S. Vojnović, T. P. Andrejević, N. Lj. Stevanović, N. D. Savić, J. Nikodinović-Runić, B. Đ. Glišić, M. I. Djuran, *Bioinorg. Chem. Appl.* **2020** (2020) 3812050.

122. CrysAlisPro, Agilent Technologies UK Ltd., Oxford, UK (2011–2014) and Rigaku Oxford Diffraction, Rigaku Polska Sp.z o.o., Wrocław, Poland (2015–2019).

123. SAINT, Bruker AXS GmbH, Karlsruhe, Germany (1997–2017).

124. G. M. Sheldrick, SADABS, Bruker AXS GmbH, Karlsruhe, Germany (2004–2014).

125. L. Krause, R. Herbst-Irmer, G. M. Sheldrick, D. Stalke, J. Appl. Crystallogr. 48 (2015) 3.

126. L. Palatinus, SUPERFLIP, EPF Lausanne, Switzerland and Fyzikální ústav AV ČR, v. v. i., Prague, Czech Republic (2007–2014).

127. L. Palatinus, G. Chapuis, J. Appl. Crystallogr. 40 (2007) 786.

128. G. M. Sheldrick, SHELXL–20xx, University of Göttingen and Bruker AXS GmbH, Karlsruhe, Germany (2012–2018).

129. J. S. Rollett, F. R. Ahmed, S. R. Hall, C. P. Huber (Eds.), Crystallographic Computing, Munksgaard, Copenhagen, Denmark (1970) p. 167.

130. D. Watkin, N. W. Isaaks, M. R. Taylor (Eds.), Crystallographic Computing, vol. 4, IUCr and Oxford University Press, Oxford, United Kingdom, 1988, Ch. 8.

131. P. Müller, R. Herbst-Irmer, A. L. Spek, T. R. Schneider, M. R. Sawaya, P. Müller (Ed.), Crystal Structure Refinement, Oxford University Press, Oxford, United Kingdom, 2006, Ch. 5. **132.** D. Watkin, *J. Appl. Crystallogr.* **41** (2008) 491-522.

133. 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.

134. D. P. da Silva, M. P. Castañeda-Ojeda, C. Moretti, R. Buonaurio, C. Ramos, V. Venturi, *Microbiol.* 160 (2014) 556-566.

135. Q. Saleh, R. Kovacs, G. Kardos, R. Gesztelyi, T. Kardos, A. Bozó, L. Majoros, *Microb. Drug Resist.* 23 (2017) 764.

136. Á. Jakab, S. Mogavero, T. M. Förster, M. Pekmezovic, N. Jablonowski, V. Dombrádi, I. Pócsi, B. Hube, *Microbiol.* **162** (2016) 2116-2125.

137. V. Ajdačić, L. Senerovic, M. Vranić, M. Pekmezovic, V. Arsic-Arsnijevic, A. Veselinovic, J. Veselinovic, B. A. Šolaja, J. Nikodinovic-Runic, I. M. Opsenica, *Bioorg. Med. Chem.* 24 (2016) 1277-1291.

138. R. Ahmed, S. Kodgire, B. Santhakumari, R. Patil, M. Kulkarni, G. Zore, *J. Proteomics* **185** (2018) 25.

139. J. Lazić, V. Ajdačić, S. Vojnovic, M. Zlatović, M. Pekmezovic, S. Mogavero, I. Opsenica, J. Nikodinovic-Runic, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **102** (2018) 1889-1901.

140. C. G. Pierce, P. Uppuluri, A. R. Tristan, F. L. Wormley Jr., E. Mowat, G. Ramage, J. L. Lopez-Ribot, *Nat. Protoc.* 3 (2008) 1494-1500.

141. M. B. Hansen, S. E. Nielsen, K. Berg, J. Immunol. Methods 119 (1989) 203.

142. OECD, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Test No. 236 (2013).

143. A. Wolfe, G. H. Shimer Jr., T. Meehan, *Biochem.* 26 (1987) 6392.

144. P. Smolenski, C. Pettinari, F. Marchetti, M. F. C. Guedes da Silva, G. Lupidi, G. V. Badillo Patzmay, D. Petrelli, L. A. Vitali, A. J. L. Pombeiro, *Inorg. Chem.* 54 (2015) 434.

145. L. Yang, D. R. Powell, R. P. Houser, *Dalton Trans.* (2007) 955.

146. A. A. Martí, G. Mezei, L. Maldonado, G. Paralitici, R. G. Raptis, J. L. Colón, *Eur. J. Inorg. Chem.* (2005) 118.

147. N. K. Shee, D. Das, F. A. O. Adekunle, M. G. B. Drew, D. Datta, *Inorg. Chim. Acta* **366** (2011) 198.

148. S. Baskaran, M. M. Krishnan, M. N. Arumugham, J. Coord. Chem. 68 (2015) 4395.

149. N. K. Shee, M. G. B. Drew, D. Datta, New J. Chem. 41 (2017) 452.

150. S. E. Paramonov, N. P. Kuzmina, S. I. Troyanov, *Polyhedron* **22** (2003) 837.

151. G. B. Deacon, R.J. Phillips, Coord. Chem. Rev. 33 (1908) 227.

152. K. Nakamato, Infrared spectra of inorganic and coordination compounds, Wiley-interscience a division of John Wiley & Sons (1979).

153. U. Kalinowska-Lis, A. Felczak, L. Chęcińska, K. Zawadzka, E. Patyna, K. Lisowska, J. Ochocki, *Dalton Trans.* **44** (2015) 8178.

154. G. Nikolić, S. Zlatković, M. Cakić, S. Cakić, Č. Lacnjevac, Z. Rajić, *Sensors* 10 (2010) 684.

155. Y. Jiang, C. -F. Zhu, Z. Zheng, J. -B. He, Y. Wang, *Inorg. Chim. Acta.* **451** (2016) 143. **156.** W. J. Geary, *Coord. Chem. Rev.* **7** (1971) 81.

157. P. E. Aranha, M. P. dos Santos, S. Romera, E.R. Dockal, *Polyhedron* **26** (2007) 1373.

158. B. Coyle, K. Kavanagh, M. McCann, M. Devereux, M. Geraghty, *Biometals* 16 (2003) 321.

159. B. Coyle, P. Kinsella, M. McCann, M. Devereux, R. O'Connor, K. Kavanagh, *Toxicol. In Vitro* **18** (2004) 63.

160. M. McCann, B. Coyle, S. McKay, P. McCormack, K. Kavanagh, M. Devereux, V. McKee, P. Kinsella, R. O'Connor, M. Clynes, *Biometals* **17** (2004) 635.

161. R. Ouellette, J.D. Rawn, Principles of Organic Chemistry, Elsevier (2015).

162. R. Rowan, C. Moran, M. McCann, K. Kavanagh, Biometals 22 (2009) 461.

163. M. A. M. Abu-Youssef, S. M. Soliman, V. Langer, Y.M. Gohar, A.A. Hasanen, M.A. Makhyoun, A. H. Zaky, L. R. Öhrström, *Inorg. Chem.* 49 (2010) 9788.

164. M. McCann, R. Curran, M. Ben-Shoshan, V. McKee, M. Devereux, K. Kavanagh, A. Kellet, *Polyhedron* 56 (2016) 180.

165. S. H. Alisir, S. Demir, B. Sariboga, O. Buyukgungor, J. Coord. Chem. 68 (2015) 155.

166. L. Senerovic, M. D. Zivkovic, A. Veselinovic, A. Pavic, M. I. Djuran, S. Rajkovic, J. Nikodinovic-Runic, J. Med. Chem. 58 (2015) 1442.

167. C. N. Banti, S. K. Hadjikakou, Metallomics 5 (2013) 569.

168. S. Kankala, N. Thota, F. Björkling, M. K. Taylor, R. Vadde, R. Balusu, *Drug Develop. Res.* 80 (2019) 188.

169. C. Deegan, B. Coyle, M. McCann, M. Devereux, D. A. Egan, *Chem.-Biol. Interact.* 164 (2006) 115.

170. I. Chakraborty, M. Pinto, J. Stenger-Smith, J. Martinez-Gonzalez, P. K. Mascharak, *Polyhedron* 69 (2019) 1.

171. C. M. Fitchett, P. J. Steel, Polyhedron 26 (2007) 400.

172. N. D. Savić, B. Đ. Glišić, H. Wadepohl, A. Pavic, L. Senerovic, J. Nikodinovic-Runic, M. I. Djuran, *MedChemComm* **7** (2016) 282.

173. I. M. Stanojević, N. D. Savić, A. Crochet, K. M. Fromm, M. I. Djuran, B. Đ. Glišić, *J. Serb. Chem. Soc.* **84** (2019) 689.

174. C. Pettinari, F. Marchetti, G. Lupidi, L. Quassinti, M. Bramucci, D. Petrelli, L. A. Vitali, M. F. C. G. da Silva, L. M. D. R. S. Martins, P. Smoleński, A. J. L. Pombeiro, *Inorg. Chem.* 50 (2011) 11173.

175. F. H. Allen, Acta Crystallogr. Sect. B Struct. Sci. 58 (2002).

176. A. S. Potapov, E. A. Nudnova, A. I. Khlebnikov, V. D. Ogorodnikov, T. V. Petrenko, *Inorg. Chem. Commun.* 53 (2015) 72.

177. T. P. Andrejević, A. M. Nikolić, B. Đ. Glišić, H. Wadepohl, S. Vojnovic, M. Zlatović, M. Petković, J. Nikodinovic-Runic, I. M. Opsenica, M. I. Djuran, *Polyhedron* **154** (2018) 325.

178. D. H. Johnston, D. F. Shriver, Inorg. Chem. 32 (1993) 1045.

179. G. A. van Albada, W. J. J. Smeets, A. L. Spek, J. Reedijk, *Inorg. Chim. Acta* **260** (1997) 151.

180. J.-A. Zhang, M. Pan, J.-Y. Zhang, H.-K. Zhang, Z.-J. Fan, B.-S. Kang, C.-Y. Su, *Polyhedron* **28** (2009) 145.

181. R. P. Alaker, J. Dent. Res. (2010) 89.

182. D. Inbakandan, C. Kumar, L. Stanley Abraham, R. Kirubagaran, R. Venkatesan, S. Ajmal Khan, *Colloids Surf. B* **111** (2013) 636.

183. Ruchika, A. Sharma, A. Saneja, Drug Discov. Today 27 (2022) 1513.

184. K. Bilberg, M. Bruun Hovgaard, F. Besenbacher, E. Baatrup, J. Toxic. 2012 (2012) Article ID 293784.

185. M. d'Amora, V. Raffa, F. De Angelis, F. Tantussi, Int. J. Mol. Sci. 22 (2021) 6372.

186. Z. Zazuli, R. Kos, J. D. Veltman, W. Uyterlinde, C. Longo, P. Baas, R. Masereeuw, S. J.

H. Vijverberg, A.-H. Maitland-van der Zee, Front. Pharmacol. 11 (2020) article 975.

187. K. M. Brothers, R. T. Wheeler, J. Vis. Exp. **65** (2012) e4051.

188. A. C. M. Galdino, L. Viganor, M. Mendonça Pereira, M. Devereux, M. McCann, M. H. Branquinha, Z. Molphy, S. O'Carroll, C. Bain, G. Menounou, A. Kellett, A. L. S. dos Santos, *J. Biol. Inorg. Chem.* **27** (2022) 201.

189. Q. Sun, X. Xie, Y. Song, L. Sun, Biomat. Res. 26 (2022) 9.

190. N. Shahabadi, M. Maghsudi, Z. Ahmadipour, *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* **92** (2012) 184.

191. C. -H. Wang, W. -C. Shih, H. C. Chang, Y. -Y. Kuo, W. -C. Hung, T. -G. Ong, W. -S. Li, *J. Med. Chem.* **54** (2011) 5245.

192. N. Shahabadi, M. Maghsudi, Mol. Biosys. 10 (2014) 338.

193. C. N. Banti, C. Papatriantafyllopoulou, A. J. Tasiopoulos, S. K. Hadjikakou, *Eur. J. Med. Chem.* 143 (2018) 1687.

194. Y. Shi, C. Guo, Y. Sun, Z. Liu, F. Xu, Y. Zhang, Z. Wen, Z. Li, *Biomacromolecules* **12** (2011) 797.

195. H. -L. Wu, W. -Y. Li, X. -W. He, K. Miao, H. Liang, *Anal. Bioanal. Chem.* **373** (2002) 163.

196. M. Rendošová, Z. Vargová, J. Kuchár, D. Sabolová, Š. Levoča, J. Kudláčová, H. Paulíková, D. Hudecová, V. Helebrandtová, M. Almáši, M. Vilková, M. Dušek, D. Bobáľová, *J. Inorg. Biochem.* **168** (2017) 1.

197. A. R. Timerbaev, C. G. Hartinger, S. S. Aleksenko, B. K. Keppler, *Chem. Rev.* **106** (2006) 2224.

198. O. Dömötör, C. G. Hartinger, A. K. Bytzek, T. Kiss, B. K. Keppler, E. A. Enyedy, J. Bio. Inorg. Chem. 18 (2013) 9.

199. M. M. Milutinović, A. Rilak, I. Bratsos, O. Klisurić, M. Vraneš, N. Gligorijević, S. Radulović, Ž. D. Bugarčić, *J. Inorg. Biochem.* **169** (2017) 1.

200. P. N. Naik, S. A. Chimatadar, S. T. Nandibewoor, J. Photochem. Photobio. B: Biology 100 (2010) 147.

201. J. S. Johansson, J. Biolog. Chem. 272 (1997) 17961.

202. M. Sedighipoor, A. H. Kianfar, M. R. Sabzalian, F. Abyar, *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* **198** (2018) 38.

203. V. Rajendiran, R. Karthik, M. Palaniandavar, H. Stoeckli-Evans, V. Subbarayan Periasamy, M. A. Akbarsha, B. S. Srinag, H. Krishnamurthy, *Inorg. Chem.* **46** (2007) 8208.

7. ПРИЛОГ

ЛИСТА СКРАЋЕНИЦА И ТЕРМИНА КОРИШЋЕНИХ У ТЕКСТУ

FDA	Америчка управа за храну и лекове (енгл.
T. D.	U. S. Food & Drug Administration)
	тиоредоксин редуктаза
EC_{50}	половина максималне ефективне
	концентрације
IC_{50}	концентрација једињења која је неопходна за
	50% инхибиције
MCF-7	ћелијска линија тумора дојке
NHC	<i>N</i> -хетероциклични карбен
A2780	ћелијска линија тумора јајника
SUNE1	ћелије назофарингеалног тумора
DNA	дезоксирибонуклеинска киселина
MOLT-4	ћелије леукемије
C2C12	туморске ћелије мишева
HL-60	туморска ћелија леукемије
U-937	туморска ћелија леукемије
MCF-7	туморска ћелија дојке
MDA-MB-231	туморска ћелија дојке
AgSD	сребро(I)-сулфалиазин
NIH-3T3	туморска ћелија ембрионалних фибробласта
	у тура та
PC-12	туморска ћелија ембрионалних фибробласта
	мищева
A 549	хумана туморска ћелија плућа
HeP-G2	хумана туморска ћелија јетре
MIC	минимална инхибиторна концентрација
DMSO	лиметип-супфоксил
DU-145	ћеније тумора простате
IMS	ћеније тумора глатког мишићног ткива
MRC-5	
HT_29	здраве нелије фиорооласта плуна ћенија тумора небеног прева
PC3	туморска ћенија простате
SI	
DQ15	
D16	туморска пелија мастоцитома код мишева
D10 D288	туморска пелија меланома код мишева
adam	2 (алинофония) вифонияфорфия
adpp	
41M	2-(аминофенил)метилфенилфосфин
	пелија хуманог тумора јајника
41 MICISK	пелија хуманог тумора јајника
	пелија хуманог тумора јајника
CHICISK SKOV 2	пелија хуманог тумора јајника
SKUV-3	пелија хуманог тумора јајника
a2pype	1, <i>2-ріs</i> (ди- <i>n</i> -пиридилфосфино)етан
LD50	летална доза
1,10-phen	1,10-фенантролин
2,2'-bipy	2,2'-оипиридин
5,6-epoxy-1,10-phen	5,6-епокси-5,6-дихидро-1,10-фенантролин

1,5-naph	1,5-нафтиридин
bpa	1,2-bis(4-пиридил)етан
bpe	1,2- <i>bis</i> (4-пиридил)етен
MIA PaCa-2	ћелија хуманог канцера панкреаса
¹ H NMR	протонска нуклеарна магнетна резонанца
¹³ C NMR	угљеник-13 нуклеарна магнетна резонанца
δ	хемијско померање
ppm	parts per million
UV-Vis	спектроскопија у ултраљубичастом и
	видљивом делу спектра
BSA	албумин говеђег серума
$DMSO-d_6$	деутерисани диметил-сулфоксид
DMF	диметил-формамид
$DMF-d_7$	деутерисани диметил-формамид
ct-DNA	DNA изолован из тимуса телета
NCTC	National Collection of Type Cultures
ATCC	American Type Culture Collection
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CV	crvstal violet
MTT	3-(4,5-диметил(тиазол-2-ил)-2,5-дифенил-
	тетразолијум-бромид
PBS	фосфатни пуфер (енгл. phosphate-buffered
	saline)
OECD	Organisation for Economic Co-operation and
	Development
hpf	hours post fertilization
$\dot{K_b}$	константа везивања
3	екстинкциони коефицијент
EthBr	етидијум-бромид
en	етилендиамин
dach	1,2-диаминоциклохексан
IR	инфрацрвена спектроскопија
FET	fish embryo test
λ_{max}	апсорпциони максимум
J	константа купловања
K_{sv}	Стерн-Волмерова константа
1,10-phendio	1,10-фенантролин-5,6-дион
A-498	ћелија хуманог аденокарцинома бубрега
LC ₅₀	концентрација при којој долази до смртног
	исхода код 50% ембриона
T _i	терапеутски индекс
napr	напроксен
Hasp	аспирин
sal	салицилна киселина
pHbza	р-хидроксибензоева киселина
nim	нимесулид
tpp	трифенилфосфин
tptp	три(р-толил)фосфин
ΔĜ	промена Гибсове енергије
HSA	хумани серум албумин

_

Ред. бр.	Назив слике	Стр.
слике		2
	Различити аспекти проучавања медицинске неорганске хемије	۲ ۸
Слика 2.	Структурне формуле неких комплекса платине(п/ту) и рутенијума(пп) који	4
Cauro 3	показују антитуморску активност	5
Слика 5.	Структурне формуле комплекса злата(1) који се примењује у лечењу реуматоидног	3
Слико А		6
Слика 4.	Структурне формуле комплекса злата(1/111) који су показали значајну антитуморску	0
Слико 5		7
Слика 5.	Структурне формуле антитуморски активних комплекса паладијума(п)	/ Q
CJINKA U.	претностављени механизам хидролизе пентидне везе у пентидима и протеинима у	0
Слика 7	присуству комплекса паладијума(п) као катализатора	8
Слика 7.	Структурне формуле неких комплекса тадолинијума(пт) и мангана(п) који се	0
Спика 8	Cтристе у медицини као контрастни агенси (A gSD)	9
Слика 0.	Структурна формула сребро(1)-сулфадиазина (AgSD) Структурна формула сребро(1)-сулфадиазина (AgSD)	11
Cinka).	структурне формуле комплекса среора(1) са фероценил-амид фосфинима који су показали значајну антитуморску активност ⁷⁸	11
Слика 10.	Показали значајну антитуморску активност Структурне формуле комплекса сребра(I) са фосфор-лонорским лигандима и	11
	камфорсулфонском киселином ⁷⁹	
Слика 11.	Структурне формуле комплекса сребра(I) са семикарбазонима и	12
	трифенилфосфином, који су показали значајну активност према ћелијској линији	
	канцера дојке ⁸⁰	
Слика 12.	Структурне формуле комплекса сребра(I) са шикличним тиоамилима и	13
	трифенилфосфином који показују антимикробну активност ⁸¹	
Слика 13.	Структурне формуле комплекса сребра(I) са <i>tris(p</i> -толил)фосфином и 5-хлор-2-	13
	меркаптобензотиазолом који су испитивани као потенцијални антитуморски и	
	антиинфламаторни агенси ⁸²	
Слика 14.	Структурне формуле динуклеарних комплекса сребра(I) са тиосемикарбазонима и	14
	tris(<i>p</i> -толил)фосфином ⁸³	
Слика 15.	Структурне формуле комплекса сребра(I) са О-алкилованим тиосемикарбазонима	15
	и трифенилфосфином ⁸⁴	
Слика 16.	Структурне формуле комплекса сребра(I) са барбитурном киселином и	15
	фосфинима ⁸⁵	
Слика 17.	Структурне формуле фосфор-донорских лиганада и молекулске формуле њихових	16
	сребро(I) комплекса ⁸⁶⁻⁸⁹	
Слика 18.	Структурне формуле неких комплекса сребра(I) са NHC лигандима ¹⁰³⁻¹⁰⁶	18
Слика 19.	Структурне формуле халогенидосребро(I) комплекса са NHC лигандима ^{107,108}	19
Слика 20.	Структурне формуле комплекса сребра(I) са 1,10-фенантролином и 2,2'-	20
	бипиридином и њиховим дериватима ^{109,110}	
Слика 21.	Структурне формуле комплекса сребра(I) са 1,7- и 4,7-фенантролином. ^{111,112}	22
Слика 22.	Структурне формуле комплекса сребра(I) са пиридазином, пиримидином,	23
	пиразином, хиноксалином и феназином ¹¹³	
Слика 23.	Структурне формуле комплекса сребра(I) са дериватима хинолина ¹¹⁴	23
Слика 24.	Структурне формуле комплекса сребра(I) са дериватима бензимидазола ¹¹⁵	24
Слика 25.	Структурне формуле комплекса Ag1 – Ag8 који су синтетисани у овој докторској	27
a	дисертацији	4.1
Слика 26.	Шематски приказ за реакције синтезе Agl и Ag2 комплекса	41
Слика 27.	Молекулска структура комплекса Ag2. Елипсоиди су дати са вероватноћом од 50%,	42
	док су атоми водоника приказани као сфере произвољног пречника ¹¹⁹	

СПИСАК СЛИКА

Слика 28.	UV-Vis спектри комплекса Ag1 и Ag2 снимљени у DMSO на собној температури ¹¹⁹	43				
Слика 29.	¹ Н NMR спектри комплекса Ag1 и Ag2 снимљени у DMSO- d_6 на собној	44				
	температури ¹¹⁹					
Слика 30.	¹³ С NMR спектри комплекса Ag1 и Ag2 снимљени у DMSO- d_6 на собној	45				
	температури ¹¹⁹					
Слика 31.	¹ Н NMR спектри комплекса Ag2 снимљени одмах након растварања (а) и 48 h (б)	46				
	након растварања комплекса у DMSO- d_6 у односу на спектар 5.6-ероху-1.10-рhen					
	лиганда у истом растварачу (в)					
Слика 32.	In vitro интеракција Ag1 и Ag2 комплекса и 1.10-phen и 5.6-epoxy-1.10-phen	49				
	пиганала са λ DNA: Концентрације јелињења су 500–100–50 и 5 иМ лок је М	.,				
	молекулски маркер Hypel adderTM 1kb – Bioline ¹¹⁹					
Слика 33	Mолекулски маркер нуреданаети тко – Бюнне – $Ag3 - Ag5$	50				
Слика 35.	$M_{\text{сматски приказ за реакције синтезе комплекса Ag3 – Ag5}$	51				
CJINKA 54.	Monekyncke Cipykrype kominekca $Ag_{3} - Ag_{3}$. Елипсоиди су дати са вероватнопом	51				
C	11 NMD сточка h_{2}^{2} исследовани као сфере произвольног пречника	51				
Слика 55.	¹ H NMR chekrap Ag3 kominekca y hpucycrby RPMI 1640 Medujyma chumber y D_{1}	34				
	DMSO- $a_6/D_2O(v/v + 1 + 9)$ y odhocy ha chektap RPMI 1640 y $D_2O(a)$ u 1,5-naph y					
0 20	DMSO- $a_6/D_2O(v/v 1:9)(0)$					
Слика 56.	Утицај субинхибиторне концентрације $Ag3 - Ag5$ комплекса (80% од MIC	22				
c	вредности) на формирање хифа С. albicans соја на чврстој Spider подлози	-				
Слика 37.	Ефекат комплекса Ag3 – Ag5 на формирање биофилма C. <i>albicans</i> соја. I решке су	56				
~ ••	представљене као стандарадна девијација три независна експеримента ¹²⁰					
Слика 38.	Ефекат субинхибиторне концентрације (1 µg/mL) комплекса Ag3 – Ag5 на	57				
	формирање мешовитог <i>C. albicans</i> (црвени сигнал) – <i>P. aeruginosa</i> (зелени					
	сигнал). ¹²⁰ Биофилм је анализиран помоћу флуоресцентног микроскопа при					
	увећању од 20 пута					
Слика 39.	Резултати испитивања токсичности (а) и морфолошке малформације (б) у	59				
	ембрионима зебра рибица у присуству комплекса Ag3 – Ag5, AgSD и 1,5-naph					
	лиганда					
Слика 40.	Испитивање мијелотоксичности Ag5 комплекса на моделу зебра рибице	59				
Слика 41.	Шематски приказ за реакције синтезе комплекса Ag6 – Ag8	61				
Слика 42.	Утицај комплекса Ag6 – Ag8 на формирање хифа код C. albicans соја у присуству 6					
	MIC_{80} вредности. DMSO је коришћен као контрола ¹²¹					
Слика 43.	(a) Апсорпциони спектри комплекса $Ag6 - Ag8$ у Tris пуферу (10 mM, pH = 7,4)	65				
	након додатка растуће концентрације ct-DNA. Црна стрелица показује промену					
	апсорбанце са повећањем концентрације ct-DNA. (б) Зависност [ct-DNA]/($\varepsilon_a - \varepsilon_f$) у					
	функцији од [ct-DNA]					
Слика 44.	(a) Емисиони спектри EthBr-ct-DNA система у присуству растуће концентрације	66				
	комплекса Ag7 (инсертовани график: Стерн-Волмеров дијаграм). (б) In vitro					
	интеракција комплекса Ag7 са хромозомалном DNA из C . albicans (концентрације					
	комплекса: 40, 100 и 400 µM) праћена применом гел електрофорезе ¹²¹					
Слика 45.	Емисиони спектри EthBr-ct-DNA система у присуству растуће концентрације	67				
	комплекса Адб и Ад8. Инсертовани график представља Стерн-Волмеров лијаграм					
Слика 46.	(а) Емисиони спектри BSA у присуству растуће концентрације комплекса $\Lambda \sigma^7$ и	68				
	$\Delta \sigma 8$ CTDERING ROKED DOT Y REPORTS PROTYRE KONDERING CONDICKER AGY R					
	концентрације комплекса (б) Инсерторани график предстари а Стери Волмарор					
	концентрације комплекса. (о) инсертовани трафик представља стерн-долмеров					
	дијаг рам					

СПИСАК ТАБЕЛА

Ред. бр. табеле	Назив табеле	Стр.
Табела 1	Рецевантни полаци добијени ренлгенском структурном анализом комплекса Ад?	33
Табела 2.	Релевантни подаци добијени рендгенском структурном анализом комплекса Ag3 – Ад5	34
Табела 3.	Адо Летални и тератогени ефекти уочени на ембрионима зебра рибицама у различитим периолима након оплолње	38
Табела 4.	Одабране дужине веза (Å) и углови између веза (°) у Ag2 комплексу. Симетријска трансформација: (<i>i</i>) $-x$, $-y$, $-z + 2^{119}$	42
Табела 5.	Антимикробна активност Ag1 и Ag2 комплекса и одговарајућих лиганада (MIC, μ M) у односу на њихов цитотоксични ефекат према нормалној ћелијској линији фибробласта плућа MRC-5 (IC ₅₀ (μ M)) ¹¹⁹	47
Табела 6.	Антимикробна активност AgSD комплекса, антибиотика канамицина и антимикотика нистатина (MIC, μM), као и антипролиферативна активност AgSD на нормалној MRC-5 ћелијској линији (IC ₅₀ , μM) ¹¹⁹	48
Табела 7.	Антипролиферативна активност (IC ₅₀ , µM) Ag2 комплекса и одговарајућег 5,6- ероху-1,10-рhen лиганда. Резултати су представљени као средња вредност три независна мерења са стандардном грешком између 1 и 3% ¹¹⁹	48
Табела 8.	Одабране дужине веза (Å) и углови између веза (°) у Ag3 – Ag5 комплексима.	52
Табела 9.	Антимикробна активност комплекса Ag3 – Ag5 (MIC) у односу на одговарајућу активност сребро(I)-сулфадиазина (AgSD). 1,5-Нафтиридин који је коришћен у синтези комплекса не показује антимикробну активност при концентрацијама већим од 250 µg/mL	55
Табела 10.	Терапеутски индекс (Ti) комплекса $Ag3 - Ag5$ у односу на AgSD комплекс; ^a ZF = зебрица: ⁶ Ti за испитивање након 34 hpf	60
Табела 11.	Антимикробна активност комплекса Ag6 – Ag8 и bpa и bpe лиганада (MIC, μ g/mL) у односу на њихову цитотоксичност на нормалној MRC-5 ћелијској линији (IC ₅₀ , μ g/mL) ¹²¹	62
Табела 12.	Вредности константи везивања комплекса $Ag6 - Ag8$ за ct-DNA ¹²¹	66
Табела 13.	Вредности константи везивања комплекса $Ag6 - Ag8$ за BSA^{121}	69

Вредности константи везивања комплекса Ag6 - Ag8 за BSA^{1} Табела 13.

Биографија са подацима о досадашњем раду



Соња Ђурић је рођена 28. марта 1988. године у Косовској Митровици од оца Живојина и мајке Марине. Основну школу "Јован Цвијић" и средњу школу "Григорије Божовић" завршила је у Зубином Потоку са одличним успехом. На Природно-математички факултет Универзитета у Крагујевцу, студијски програм хемија, смер наставник хемије, уписала се школске 2007/08. године, где је дипломирала октобра 2011. године са просечном оценом у току студија 8,50. Школске 2011/12.

године уписала је мастер академске студије, смер професор хемије, на Природноматематичком факултету у Крагујевцу, где је у септембру 2012. године одбранила мастер рад. Докторске академске студије, модул неорганска хемија, уписала је школске 2012/13. године на Природно-математичком факултету Универзитета у Крагујевцу.

У фебруару 2012. године засновала је радни однос у средњој школи "Григорије Божовић" у Зубином Потоку, након чега је радила у више основних и средњих школа на територији општина Зубин Поток и Косовска Митровица. Тренутно је запослена у Основној школи "Бранко Радичевић" у Косовској Митровици и "Медицинској школи са домом ученика" Косовска Митровица.

Соња Ђурић се бави научноистраживачким радом у области координационе и бионеорганске хемије. Предмет њеног истраживања је синтеза и структурна карактеризација комплекса метала као потенцијалних терапеутских агенаса за лечење туморских обољења и микробних инфекција. До сада је објавила пет научних радова у међународним научним часописима (1M21a, 1M21 и 3M22), један научни рад у националном научном часопису (M53), једно саопштење на међународној научној конференцији (M34) и седам саопштења на националним научним конференцијама (M64).

Contents lists available at ScienceDirect

Inorganica Chimica Acta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ica

Inorganica Chimica Acta

Research paper

Silver(I) complexes with 1,10-phenanthroline-based ligands: The influence of epoxide function on the complex structure and biological activity



Sonja Ž. Đurić^a, Marija Mojicevic^b, Sandra Vojnovic^b, Hubert Wadepohl^c, Tina P. Andrejević^a, Nevena Lj. Stevanović^a, Jasmina Nikodinovic-Runic^b, Miloš I. Djuran^{d,*}, Biljana Đ. Glišić^{a,*}

^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, 11000 Belgrade, Serbia

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

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

ARTICLE INFO

Keywords: Silver(I) complexes 1,10-Phenanthroline-based ligands Antimicrobial activity Cytotoxicity DNA interactions

ABSTRACT

In a continuing search for a novel metal-containing antimicrobial agents, the present study reports the synthesis, characterization and biological evaluation of two silver(I) complexes with 1,10-phenanthroline-based ligands, [Ag(1,10-phen)₂]CF₃COO·H₂O (Ag1) and [Ag(CF₃COO)(5,6-epoxy-1,10-phen)]₂ (Ag2), 1,10-phen is 1, 10-phenanthroline and 5,6-epoxy-1,10-phen is 5,6-epoxy-5,6-dihydro-1,10-phenanthroline. The complexes were characterized by different spectroscopic techniques (IR, ¹H and ¹³C NMR and UV-Vis), while the crystal structure of Ag2 complex was determined by a single-crystal X-ray diffraction analysis. The spectroscopic data confirmed that the structure of Ag1 complex, with silver(I) ion tetrahedrally coordinated by two bidentate 1, 10-phen ligands, is in accordance to the previous report (S.E. Paramonov et al., 2003). The crystallographic results showed that in dinuclear Ag2 complex, both Ag(I) ions are coordinated bidentately by 5,6-epoxy-1, 10-phen and monodentately by trifluoroacetate, with presence of the short Ag. Ag contact of 2.963 Å. Both silver (I) complexes were evaluated in vitro for antimicrobial activity against four bacterial and four Candida species, showing selectivity towards the investigated species of Candida with minimal inhibitory concentrations (MICs) between 0.9 and 12.5 µM. Moreover, Ag2 complex manifested significant antiproliferative properties in the case of a range of human cell lines, including human breast cancer (MDA-MB 231), which resulted from the presence of epoxy functional group in the ligand. The gel electrophoresis results obtained from the studies of Ag1 and Ag2 interactions with bacteriophage lambda DNA (\lambda DNA) suggested that these complexes did not cause DNA degradation.

1. Introduction

There is currently an increasing interest regarding the relation existing between invasive fungal infections and cancer [1]. Invasive fungal infections are considered to be common and serious complications in cancer patients and have become one of the major causes of morbidity and mortality [2]. These infections are most likely a consequence of transient immunodeficiency, which is commonly in cancer patients due to cancer chemotherapy [3]. Apart from the increased risk of developing fungal infections during the immunosuppression, there is a growing strength of evidence that the reverse is also true, *i.e.* that *Candida* or other fungi can cause the development and/or progression of cancer [1,4]. A recent review by Ramirez-Garcia *et al* described in detail mechanisms by which *C. albicans* may be able to contribute to the increasing risk of carcinogenesis and metastasis [1]. Both, *C. albicans* and non-*albicans Candida* species, such as *C. parapsilosis, C. tropicalis* and *C. krusei*, can produce different carcinogenic substances, such as nitrosamines [5], acetaldehyde [6,7], and/or can be involved in metabolism of pro-carcinogens [6–8]. Furthermore, the influence of *C. albicans* on the promotion of metastasis seems to be based on an inflammatory process [1]. Considering all the above mentioned, there is an urgent need to combat cancers more effectively by preventing the aggravation and progression of their associated invasive fungal infections.

Metal-based drugs have a wide range of medicinal applications and are routinely administered to patients for both therapeutic and diagnostic purposes [9]. Fundamental widespread medical problems, such as microbial infections, cancer, cardiovascular and neurological

* Corresponding authors.

E-mail addresses: 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.2019.119357

Received 28 October 2019; Received in revised form 11 December 2019; Accepted 11 December 2019 Available online 13 December 2019

0020-1693/ © 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.



Contents lists available at ScienceDirect



Journal of Inorganic Biochemistry



journal homepage: www.elsevier.com/locate/jinorgbio

New polynuclear 1,5-naphthyridine-silver(I) complexes as potential antimicrobial agents: The key role of the nature of donor coordinated to the metal center

Check for updates

Sonja Đurić^{a,1}, Sandra Vojnovic^{b,1}, Aleksandar Pavic^b, Marija Mojicevic^b, Hubert Wadepohl^c, Nada D. Savić^{a,d}, Mirjana Popsavin^e, Jasmina Nikodinovic-Runic^{b,*}, Miloš I. Djuran^f, Biljana Đ. Glišić^{a,*}

^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, 11000 Belgrade, Serbia

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

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

e Department of Chemistry, Biochemistry and Environmental Protection, Faculty of Sciences, University of Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 3, 21000 Novi Sad, Serbia

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

ARTICLE INFO

Keywords: Silver(1) complexes 1,5-Naphthyridine Antimicrobial activity Biofilm Danio rerio

ABSTRACT

New polynuclear silver(I) complexes with 1,5-naphthyridine (1,5-naph), $[Ag(NO_3)(1,5-naph)]_n$ (Ag1), $[Ag(CF_3COO)(1,5-naph)]_n$ (Ag2) and $[Ag(CF_3SO_3)(1,5-naph)]_n$ (Ag3) were synthesized by the reaction of the corresponding silver(I) salt and 1,5-naph in ethanol at room temperature. These complexes were characterized by NMR, IR and UV–Vis spectroscopy, while their crystal structures were determined by single-crystal X-ray diffraction analysis. In all these complexes, 1,5-naph acts as a bridging ligand between two Ag(I) ions, while the remaining coordination sites are occupied by oxygen atom(s) of the corresponding anion. The antimicrobial efficiency of these silver(I) complexes was evaluated against the broad panel of Gram-positive and Gram-negative bacteria and fungi. The complexes showed good to moderate antibacterial activity with the minimal inhibitory concentration (MIC) values being in the range 2.5–100 µg/mL (6.5–333.3 µM), while their antifungal activity against the investigated *Candida* spp. was significantly higher (MIC = 0.78–6.25 µg/mL; 2.6–20.8 µM). Moreover, complexes Ag1 and Ag2 effectively inhibited *C. albicans* biofilms formation, while Ag1 was also shown to inhibit the formation of mixed *C. albicans/Pseudomonas aeruginosa* biofilms. Toxicological evaluations on zebrafish (*Danio rerio*) embryos revealed that all silver(I) complexes could be applied as antifungal agents, whereas Ag3 had the best therapeutic potential showing both the lowest MIC values against the tested *Candida* strains and the non-toxic *in vivo* response in the zebrafish embryos at these doses.

1. Introduction

The emergence of multiple antibacterial and antifungal resistance has become the global problem since the most commonly used antimicrobials have been shown to be ineffective in the treatment of disseminated microbial infections [1]. The intensive use and misuse of antibiotics are believed to be the main reasons associated with the appearance of high numbers of pathogens evolving into their multidrug-resistant form [2]. Besides that, microorganisms growing in biofilms are found to be even more resistant [3,4]. Given the increasing problems connected with the developing resistance to the traditionally used antibiotics, research on development of alternative antimicrobial agents has gained in interest in recent years.

Silver is a metal of importance in medicinal chemistry since its simple salts, nanoparticles and complexes have been used as antiseptic [5], antimicrobial [6] and anti-inflammatory agents [7], exhibiting acceptable toxicity towards human cells [8–10]. For instance, dilute solutions of AgNO₃ have traditionally been administrated to the eyes of newborn infants to prevent contraction of gonorrhea from the mother [11]. It has been found that silver(I) ions administered in the form of complexes provide long-term effective antimicrobial agents which can prevent microbial proliferation and re-colonization [12]. Silver(I)

* Corresponding authors.

E-mail addresses: jasmina.nikodinovic@imgge.bg.ac.rs (J. Nikodinovic-Runic), biljana.glisic@pmf.kg.ac.rs (B.D. Glišić).

https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2019.110872 Received 24 July 2019: Received in revised form 7 Ser

Received 24 July 2019; Received in revised form 7 September 2019; Accepted 27 September 2019 Available online 23 October 2019 0162-0134/ © 2019 Elsevier Inc. All rights reserved.

¹ S.Đ. and S.V. contributed equally.



Research Article

Antimicrobial Activity and DNA/BSA Binding Affinity of Polynuclear Silver(I) Complexes with 1,2-Bis(4-pyridyl)ethane/ethene as Bridging Ligands

Sonja Ž. Đurić,¹ Sandra Vojnovic,² Tina P. Andrejević,¹ Nevena Lj Stevanović,¹ Nada D. Savić,^{1,3} Jasmina Nikodinovic-Runic,² Biljana Đ. Glišić ⁽¹⁾, ¹ and Miloš I. Djuran ⁽¹⁾

¹University of Kragujevac, Faculty of Science, Department of Chemistry, R. Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Serbia

²Institute of Molecular Genetics and Genetic Engineering, University of Belgrade, Vojvode Stepe 444a, 11000 Belgrade, Serbia

³University of Kragujevac, Institute for Information Technologies Kragujevac, Department of Science, Jovana Cvijića bb, 34000 Kragujevac, Serbia

⁴Serbian Academy of Sciences and Arts, Knez Mihailova 35, 11000 Belgrade, Serbia

Correspondence should be addressed to Biljana Ð. Glišić; biljana.glisic@pmf.kg.ac.rs and Miloš I. Djuran; milos.djuran@pmf.kg.ac.rs

Received 22 September 2019; Accepted 17 January 2020; Published 14 April 2020

Academic Editor: Guillermo Mendoza-Diaz

Copyright © 2020 Sonja Ž. Đurić et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

1,2-Bis(4-pyridyl)ethane (bpa) and 1,2-bis(4-pyridyl)ethene (bpe) were used for the synthesis of polynuclear silver(I) complexes, $\{[Ag(bpa)]NO_3\}_n$ (1), $\{[Ag(bpa)_2]CF_3SO_3H_2O\}_n$ (2) and $\{[Ag(bpe)]CF_3SO_3\}_n$ (3). In complexes 1–3, the corresponding nitrogencontaining heterocycle acts as a bridging ligand between two Ag(I) ions. *In vitro* antimicrobial activity of these complexes, along with the ligands used for their synthesis, was evaluated against the broad panel of Gram-positive and Gram-negative bacteria and fungi. The silver(I) complexes 1–3 showed selectivity towards *Candida* spp. and Gram-negative *Escherichia coli* in comparison to the other investigated bacterial strains, effectively inhibiting the growth of four different *Candida* species with minimal inhibitory concentrations (MICs) between 2.5 and 25 µg/mL and the growth of *E. coli*, with MIC value being 12.5 µg/mL. Importantly, complex 2 significantly reduced *C. albicans* filamentation, an essential process for its pathogenesis. Antiproliferative effect on the normal human lung fibroblast cell line MRC-5 was also evaluated with the aim of determining the therapeutic potential of the complexes 1–3. The interactions of these complexes with calf thymus DNA (ctDNA) and bovine serum albumin (BSA) were studied to evaluate their binding activities towards these biomolecules for possible insights on their mode of action.

1. Introduction

The invasive microbial infections are seen as a rapidly increasing global threat to human health, in particular in immunocompromised patients, having an unacceptably high mortality rate despite the availability of antimicrobial drugs [1, 2]. This high mortality rate originates primarily from an inadequate diagnostics and shortcomings of the conventionally used agents, such as toxic side effects and/or resistance development. Compared to the traditional organic (synthetic or natural) drugs, metal-containing therapeutics might have the advantages in the synergistic effect, the accessible redox states, and the tunable pharmacophore geometries [3, 4]. Since the successful use of cream containing silver(I) sulfadiazine for the treatment of burn wounds [5], numerous silver(I) complexes have been synthesized and screened for their antimicrobial properties. Silver(I) complexes showed effective and wide-spectrum antimicrobial activity, including the strains which are resistant to the currently used antimicrobials, while their toxicity to the normal human cells was not pronounced [6]. Besides that, one of the main advantages of silver(I) complexes, in comparison to the used antimicrobials, is their multidirectional activity, which slows down the

Образац 1

ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Изјављујем да докторска дисертација под насловом:

Синтеза, карактеризација и антимикробна активност полинуклеарних комплекса сребра(I) са ароматичним азот-донорским лигандима

оригинално представља 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, 31. мај 2024. године,

Соно Зурић потпис аутора

Образац 2

ИЗЈАВА АУТОРА О ИСТОВЕТНОСТИ ШТАМПАНЕ И ЕЛЕКТРОНСКЕ ВЕРЗИЈЕ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Изјављујем да су штампана и електронска верзија докторске дисертације под насловом:

Синтеза, карактеризација и антимикробна активност полинуклеарних комплекса сребра(I) са ароматичним азот-донорским лигандима

истоветне.

У Крагујевцу, 31. мај 2024. године,

Сова Турић потписаутора

Образац 3

ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ja,

дозвољавам

не дозвољавам

Соња Ђурић,

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

Синтеза, карактеризација и антимикробна активност полинуклеарних комплекса сребра(I) са ароматичним азот-донорским лигандима

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 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.

1) Ауторство

(2))Ауторство - делити под истим условима

3) Ауторство - без прерада

4) Ауторство - некомерцијално

5) Ауторство - некомерцијално - делити под истим условима

6) Ауторство - некомерцијално - без прерада²

У Крагујевцу, 31. мај 2024. године,

Cotba ty

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/