

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ

Миа Станковић

СТРУКТУРА И АНТИМИКРОБНА АКТИВНОСТ КОМПЛЕКСА СРЕБРА(I) СА НЕКИМ КЛИНИЧКИ КОРИШЋЕНИМ АЗОЛИМА

Докторска дисертација

Крагујевац, 2026



UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC
FACULTY OF SCIENCE

Mia Stanković

STRUCTURE AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF SILVER(I) COMPLEXES WITH SOME CLINICALLY USED AZOLES

Doctoral dissertation

Kragujevac, 2026

Идентификациона страница докторске дисертације

Аутор
Име и презиме: Миа Станковић
Датум и место рођења: 10. март 1989. године, Сарајево, Босна и Херцеговина
Садашње запослење: Сарадник у настави на Катедри за општу и неорганску хемију на Металуршко-технолошком факултету Универзитета Црне Горе
Докторска дисертација
Наслов: Структура и антимикробна активност комплекса сребра(I) са неким клинички коришћеним азолима
Број страница: 107
Број слика: 58
Број библиографских података: 226
Установа и место где је рад израђен: Природно-математички факултет, Универзитет у Крагујевцу
Научна област (УДК): Хемијске науке – Неорганска хемија (546)
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-01-904/9 од 18. децембра 2024. године

Василију, Балши и Лазару

Захвалница

Ментор ове докторске дисертације је др Биљана Ђ. Глишић, ванредни професор, на Природно-математичком факултету Универзитета у Крагујевцу. Свом ментору дугујем бескрајну захвалност на несебичној помоћи приликом израде и писања докторске дисертације, огромном стрпљењу и разумевању током свих ових година. Биљо, неизмерно хвала на свему, без тебе не бих успела!

Захваљујем се академику Милошу И. Ђурану на прилици да се придружим његовој истраживачкој групи, да радим са њима и учим од њих.

Велику захвалност дугујем и проф. др Жељку Јаћимовићу који је од самог почетка уз мене на путу мог професионалног усавршавања. Хвала Вам на свим корисним саветима и добронамерним сугестијама.

Захваљујем се члановима комисије, др Сањи Шкаро Богојевић, научном сараднику на Институту за молекуларну генетику и генетичко инжењерство у Београду, др Невени Стевановић, научном сараднику на Природно-математичком факултету у Крагујевцу и др Жику Милановићу, научном сараднику на Институту за информационе технологије Крагујевац за време које су издвојили и све коментаре које су дали приликом прегледа и оцене ове докторске дисертације.

Велико хвала и колегиницама из истраживачке групе проф. др Биљане Ђ. Глишић, нарочито др Невени Стевановић на сарадњи и несебичној помоћи око свега. Захваљујући њима сваки долазак у Крагујевац је био дивно искуство.

Посебно хвала мом стрицу Николи који је увек веровао у мене, пружао ми и моралну и финансијску помоћ и надао се да ћемо дан када ова дисертација буде коначно готова заједно прославити. Нажалост, више није са нама али знам да негде горе слави заједно са мојом Потом и тојит Јовом.

Огромну захвалност дугујем својој породици, оцу, мајци и брату који су увек ту уз мене и за мене. Без ваше подршке не бих била ту где јесам и не бих постала ово што јесам.

Највећу захвалност дугујем свом супругу Данилу који је веровао у мене и онда кад ја нисам и који ми није дао да одустанем од свега онда кад ми је било најтеже. Круна мог успеха у животу су моји дечаци, Василије, Балша и Лазар, који су имали разумевања да мама некад мора да учи и да ради и не може да се игра са њима.

Хвала вам свима!

Миа Станковић

Апстракт

Предмет ове докторске дисертације обухвата синтезу, карактеризацију и испитивање антимикробне и цитотоксичне активности осам нових комплекса сребра(I) са азолима који се користе за лечење гљивичних инфекција (клотримазол, еконазол и вориконазол). За карактеризацију синтетисаних комплекса коришћене су NMR, IR и UV-Vis спектроскопске методе, масена спектрометрија и циклична волтаметрија. Састав и чистоћа комплекса су потврђени применом елементалне микроанализе, док је кристална структура одређена методом рендгенске структурне анализе. Квантно-механички прорачуни су коришћени у циљу утврђивања термодинамички најповољније структуре комплекса у раствору. Испитивана је активност синтетисаних комплекса сребра(I) према различитим бактеријским и гљивичним сојевима, при чему су утврђене минималне инхибиторне концентрације (MIC) у опсегу од 0,01 – 49,2 μM, док је цитотоксични потенцијал одређен на здравој ћелијској линији фибробласта плућа, са IC_{50} вредностима од 10 – 36,1 μM. Поред тога, испитивана је и способност инхибиције формирања биофилмова, при чему је забележено смањење формирања биофилма од 77 до 90%.

У Општем делу дисертације приказан је преглед лекова који се користе у терапији гљивичних инфекција, уз посебан осврт на појаву и раст резистентности микроорганизама на конвенционалне антигљивичне лекове. Акценат је стављен и на значај комплексних једињења у медицини са фокусом на антимикробна својства комплекса сребра(I). Други део дисертације обухвата методологију синтезе комплекса сребра(I) са азолима и методе спектроскопске, кристалографске и биолошке анализе. Завршни део дисертације посвећен је дискусији резултата, укључујући интерпретацију спектроскопских и кристалографских података, као и процену антимикробне и цитотоксичне активности синтетисаних једињења и резултата теоријских прорачуна.

Кључне речи:

- Азоли
- Комплекси сребра(I)
- Гљивичне инфекције
- Спектроскопске методе
- Дифракција X зрака са монокристала
- DFT прорачуни
- Антимикробна активност
- Цитотоксична активност
- Биофилм
- Механизам деловања

Abstract

The subject of this doctoral dissertation is related to the synthesis, characterization, and evaluation of the antimicrobial and cytotoxic activities of eight new silver(I) complexes with azoles used in the treatment of fungal infections (clotrimazole, econazole, and voriconazole). The synthesized complexes were characterized using NMR, IR, and UV-Vis spectroscopic methods, mass spectrometry, and cyclic voltammetry. The composition and purity of the complexes were confirmed by elemental microanalysis, while their crystal structures were determined by single crystal X-ray diffraction analysis. Quantum-mechanical calculations were employed to determine the thermodynamically favorable structures of the complexes in solution. The activity of the synthesized silver(I) complexes was tested against various bacterial and fungal species, with minimum inhibitory concentration (MIC) values ranging from 0.01 to 49.2 μM. The cytotoxic potential was assessed on a healthy human lung fibroblast cell line, yielding IC_{50} values in the range of 10 – 36.1 μM. In addition, the ability of the complexes to inhibit biofilm formation was investigated, revealing a reduction in biofilm formation of 77 – 90%.

The Introductory section of the dissertation provides an overview of antifungal drugs currently used in therapy, with particular emphasis on the emergence and increasing resistance of microorganisms to conventional antifungal agents. Special attention is also given to the importance of coordination compounds in medicine, focusing on the antimicrobial propreties of silver(I) complexes. The second part of the dissertation describes the syntetics procedures for the preparation of silver(I)-azole complexes, as well as the spectroscopic, crystallographic and biological methods applied for their characterization. The final section of the dissertation is devoted to the discussion of the results, including the interpretation of spectroscopic and crystallographic data, as well as the evaluation of antifmicrobial and cytotoxic activities and theoretical calculations.

Keywords:

- Azoles
- Silver(I) complexes
- Fungal infections
- Spectroscopic methods
- Single crystal X-ray diffraction
- DFT calculations
- Antimicrobial activity
- Cytotoxic activity
- Biofilm
- Mechanism of action

САДРЖАЈ

1. ОПШТИ ДЕО ... 1
1.1. Антигљивични лекови ... 2
1.2. Азоли као антигљивични лекови ... 5
1.3. Медицински значај комплексних једињења ... 10
1.4. Комплекси сребра(I) са азолима као лигандима ... 16
2. ПРЕДМЕТ ИСТРАЖИВАЊА ... 19
3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО ... 22
3.1. Хемикалије и реагенси ... 23
3.2. Физичка мерења за комплексе сребра(I) ... 23
3.2.1. Елементална микроанализа ... 23
3.2.2. Масени спектри ... 23
3.2.3. IR мерења ... 23
3.2.4. ^{1}H NMR мерења ... 23
3.2.5. UV-Vis мерења ... 23
3.2.6. Испитивање стабилности комплекса сребра(I) у раствору ... 23
3.2.7. Волтаметријска мерења ... 24
3.3. Синтезе **Ag1** – **Ag8** комплекса ... 24
*3.3.1. Добијање $[Ag(ctz)_2]SbF_6$ (**Ag1**) комплекса* ... 24
*3.3.2. Добијање $[Ag(ecz)_2]SbF_6$ (**Ag2**), $[Ag(ecz)_2]CF_3SO_3$ (**Ag3**) и $[Ag(ecz)_2]PF_6$ (**Ag4**) комплекса* ... 25
*3.3.3. Добијање $\{[Ag(vcz)_2]SbF_6\}_n$ (**Ag5**), $\{[Ag(vcz)(H_2O)]CH_3SO_3\}_n$ (**Ag6**), $\{[Ag(vcz)_2]BF_4\}_n$ (**Ag7**) и $\{[Ag(vcz)_2]PF_6\}_n$ (**Ag8**)* ... 26
3.4. Рендгенска структурна анализа комплекса **Ag1**, **Ag2** и **Ag5** – **Ag8** ... 28
3.5. Биолошка испитивања ... 31
3.5.1. Испитивање антимикробне активности ... 31
3.5.2. Испитивање цитотоксичности ... 32
3.5.3 Биосинтеза ергостерола ... 32
3.5.4. Инхибиција филаментације C. albicans ATCC 10231 ... 32
3.5.5. Испитивање утицаја комплекса на биофилм Candida сојева ... 33
3.5.6 Испитивање утицаја комплекса на биофилм S. aureus ATCC 25923 ... 33
3.5.7. Испитивање адхеренције ... 33
3.5.8 Анализа Хиршфилдових површина ... 34
3.5.9. Квантно-механички прорачуни ... 34
3.5.10. Молекулски докинг ... 35

3.5.11. Статистички прорачуни 36
4. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА 37
4.1. Синтеза, карактеризација и антимикробна активност комплекса сребра(I) са клотримазолом 38
*4.1.1. Опис кристалне структуре **Ag1** комплекса* 38
4.1.2. Спектроскопска карактеризација 39
4.1.3. DFT прорачуни 41
4.1.4 Електрохемијско понашање 42
*4.1.5. Испитивање антимикробне и цитотоксичне активности **Ag1** комплекса* 43
4.1.6. Тест филаментације C. albicans ATCC 10231 соја 45
4.1.7. Утицај на биофилм C. albicans ATCC 10231 соја 46
4.1.8. Тест адхеренције 46
4.2. Синтеза, карактеризација и биолошка активност комплекса сребра(I) са еконазолом 47
4.2.1. Опис кристалних структура 47
4.2.2. Спектроскопска карактеризација 49
4.2.3. Електрохемијско понашање 51
4.2.4. DTF прорачуни 52
4.2.5. Стабилност у раствору 54
*4.2.6. Испитивање биолошке активности комплекса **Ag2** – **Ag4*** 59
4.2.7. Молекулски докинг 62
4.3. Синтеза, карактеризација и биолошка активност комплекса сребра(I) са вориконазолом 65
*4.3.1. Испитивање понашања комплекса **Ag5** – **Ag8** у раствору* 68
4.3.2. DTF прорачуни 70
*4.3.3. Испитивање антигљивичне активности комплекса **Ag5** – **Ag8*** 79
4.3.4. Молекулски докинг 82
5. ЗАКЉУЧАК 86
6. ЛИТЕРАТУРА 89
7. ПРИЛОГ 101

1. ОПШТИ ДЕО

1.1. Антигљивични лекови

Микроорганизми, међу којима се убрајају бактерије, вируси и гљивице, представљају значајне патогене који су способни да изазову широк спектар обољења код људи. Гљивице су еукариотски организми који се, на основу ћелијске грађе, класификују на једноћелијске (квасце) и вишећелијске (плесни). Оне могу представљати значајан здравствени ризик, посебно код пацијената са имуносупресијом, укључујући особе након трансплантације органа, сложених хируршких захвата, као и код оболелих од различитих облика имунодефицијенције.[1] Гљивичне инфекције, познате као микозе, класификују се на површинске и системске, у зависности од дубине продора и анатомске локализације инфекције. Површинске гљивичне инфекције најчешће су узроковане дерматофитима из родова *Epidermophyton*, *Microsporum* и *Trichophyton*, који примарно инфицирају кожу, косу и нокте.[2] Иако углавном не изазивају озбиљне компликације, код имунокомпромитованих пацијената, попут HIV-позитивних особа (HIV је вирус хумане имунодефицијенције; енгл. *human immunodeficiency virus*), површинске гљивичне инфекције могу прећи у системске (инвазивне) са могућим смртним исходом.[3] Наиме, системске микозе захватају унутрашње органе или више система органа, и најчешће се јављају као последица имунодефицијентних стања код пацијената.

До данас је идентификовано приближно 1,5 милиона врста гљивица, од којих је више од 200 повезано са инфекцијама код људи.[4] Међу најчешћим узрочницима гљивичних инфекција издвајају се представници следећих родова: *Candida* (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. kefyr* и *C. gulliermondii*), *Aspergillus* (*A. flavus*, *A. niger* и *A. fumigatus*), *Cryptococcus* (*C. neoformans*), *Fusarium* (*F. oxysporum*, *F. moniliforme* и *F. solani*) и *Pneumocystis*.[5] Према епидемиолошким подацима, на годишњем нивоу се широм света пријављује више од 1,5 милиона смртних исхода узрокованих гљивичним инфекцијама.[6] Висока стопа морталитета углавном се приписује касној дијагностици и ограничењима постојећих антигљивичних терапија, које су често повезане са токсичношћу, уским спектром антигљивичне активности и све учесталијом појавом резистенције код патогених гљивица.[7] Развој нових антигљивичних лекова, заједно са унапређењем дијагностичких метода, представља кључну стратегију за смањење морталитета и побољшање клиничког исхода код пацијената оболелих од гљивичних инфекција.

Историјски гледано, гљивичне инфекције су препознате као узрок обољења још у раним фазама развоја медицине, али су истраживања и развој ефикасних антигљивичних лекова значајно заостајали у односу на антибактеријске лекове. Овај феномен се може објаснити чињеницом да су ћелијски и молекуларни процеси код гљивица, као еукариотских организама, слични или идентични онима код хуманих ћелија, чиме се знатно отежава одређивање циљног места деловања антигљивичног лека.[8] Да би одређени лек био препознат као ефикасан антимикотик, мора бити селективан, односно мора показивати значајну активност искључиво према гљивицама, уз минималну или занемарљиву токсичност по људски организам.[3] Истраживања су показала да антибиотици не показују значајну активност према ћелијама гљивица, што се може објаснити значајним разликама у структури ћелијског зида између гљивица и бактерија.[9] Ћелијски зид гљивица из рода *Candida* представља сложену структуру изграђену од хитина, који се налази унутар матрикса β-1,3 и β-1,6 глукана. Спољашњи слој чине гликозиловани протеини и манани (манозни полисахариди), који имају улогу у адхезији, имунолошком избегавању и комуникацији са ћелијама домаћина.[10] Једна од значајних разлика између ћелијских структура гљивица и хуманих ћелија односи се на састав ћелијске мембране, односно врсту стерола који се у њој налази. Док је у људским ћелијама главни стерол холестерол, код гљивица ту улогу има његов аналог,

ергостерол.[11] Управо та структурна разлика отвара могућности за дизајн нових антигљивичних лекова.

Специфичност деловања, односно способност да се селективно инхибирају виталне функције гљивичних, а не хуманих ћелија, кључна је за ефикасност и безбедност антигљивичне терапије.[7] До данас је за клиничку примену одобрено пет главних класа антигљивичних лекова, класификованих према њиховим хемијским структурама и механизму деловања и то: азоли, полиени, ехинокандини, алиламини и антиметаболити (Слика 1).[12]

1) Азоли представљају једну од главних класа антигљивичних лекова. Користе се у лечењу различитих гљивичних инфекција, при чему своје деловање испољавају инхибицијом ензима ланостерол 14α-деметилазе (CYP51), који има кључну улогу у биосинтези ергостерола, основне компоненте ћелијске мембране гљивица.[11] Азоли испољавају селективно дејство инхибицијом ензима CYP51, који је кључан за биосинтезу ергостерола у гљивицама. При терапијски релевантним концентрацијама, азоли инхибирају синтезу ергостерола, што доводи до смањења његове количине у мембрани, као и до акумулације ланостерола и других 14-метилованих стерола. Овај поремећај даље утиче на бројне функције ергостерола у ћелијској мембрани гљивица, доводећи до измена у њеној флуидности и интегритету. Као последица, мембрана постаје мање стабилна и подложнија оштећењима, што додатно утиче на активност мембранских ензима одговорних за транспорт хранљивих материја, синтезу хитина, као и на раст и пролиферацију гљивичних ћелија.[13]

У зависности од хемијске структуре, азоли се деле на имидазоле (са два атома азота) и триазоле (са три атома азота). Имидазоли се најчешће формулишу за локалну примену, што је последица њихове потенцијалне токсичности или слабе биорасположивости. Насупрот томе, триазоли се, због повољнијих фармакокинетичких својстава, користе у системској терапији инвазивних гљивичних инфекција.[14] Азоли се често примењују орално и одликују се ниским степеном нежељених ефеката, што их чини широко примењиваним у клиничкој пракси. Ипак, убрзо након њихове клиничке примене, почели су да се појављују извештаји о неуспешном деловању азола, који се, углавном, приписују развоју резистенције.[15-19] Поред тога, разлози за ову појаву укључују фунгистатичко (уместо фунгицидног) деловање азола, као и могућу хепатотоксичност, што додатно ограничава њихову ефикасност.[20] Ограничена ефикасност азола у лечењу инвазивних гљивичних инфекција наглашава потребу за развојем нових антимикотика са другачијим механизмом деловања, који би могао да превазиђе постојећа ограничења и смањи нежељене ефекте тренутно доступних лекова.

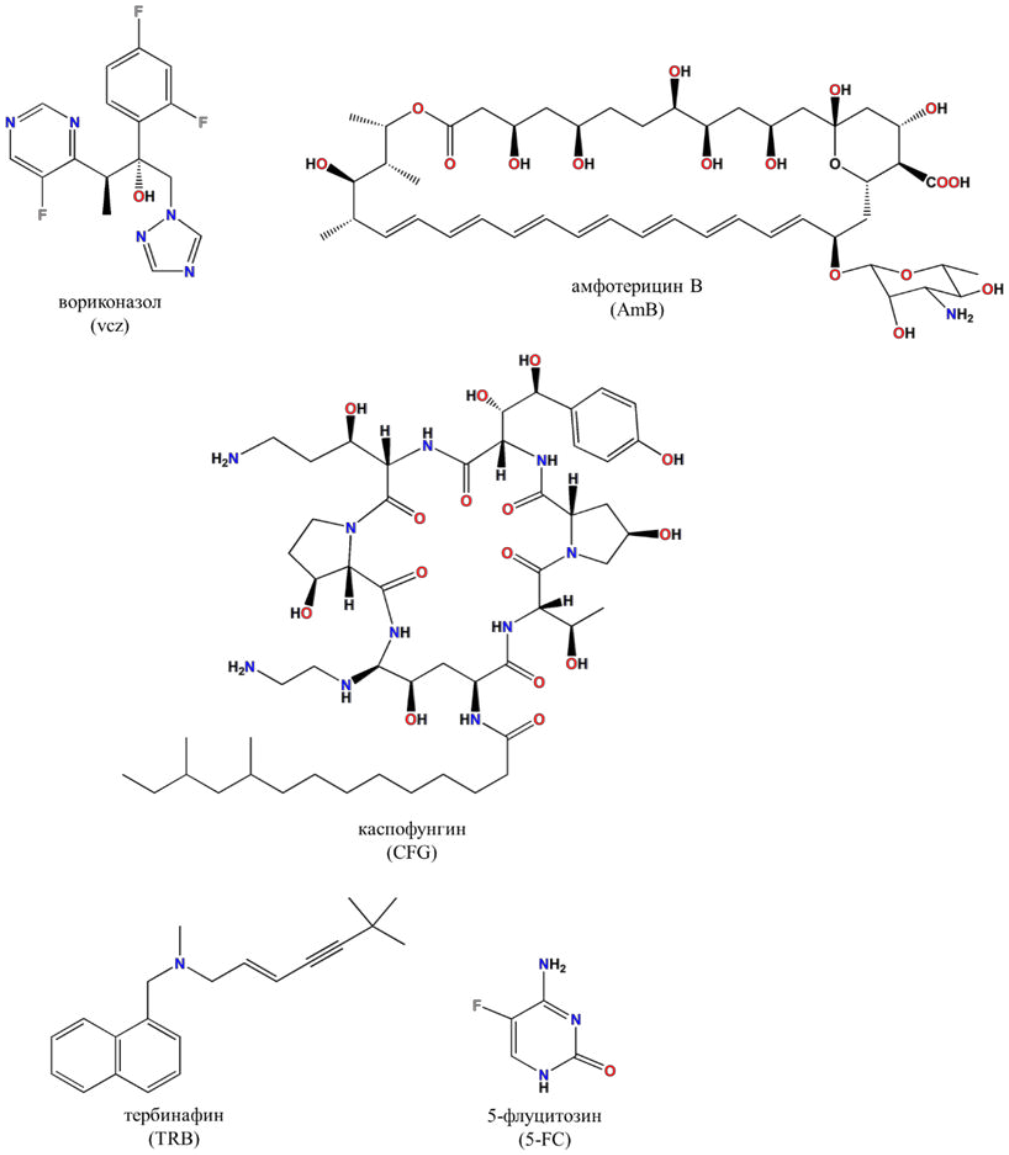
2) Полиени, као што су амфотерицин Б и нистатин, представљају амфотерне макролидне антимикотике. Супротно синтетичким и полусинтетичким лековима, полиени се добијају као производ секундарног метаболизма Грам-позитивних бактерија из рода *Streptomyces*.[21] Амфотерицин Б је почео клинички да се користи средином прошлог века и сматра се „златним стандардом" у лечењу системских микоза, упркос увођењу нових антимикотика у клиничку праксу.[22] Механизам деловања полиена се заснива на њиховом селективном везивању за ергостерол, што доводи до структурних промена у ћелијској мембрани, и за последицу има њену деполаризацију, повећану пропустљивост и нарушавање осмотског притиска.[23] Ови процеси доводе до истицања интрацелуларног садржаја, доводећи до денатурације и лизе гљивичне ћелије. Поред тога, полиени могу изазвати и оксидативна оштећења, што додатно доприноси њиховом фунгицидном ефекту.[24] Иако су веома ефикасни у лечењу системских микоза, њихова примена је ограничена услед изражене токсичности, посебно нефротоксичности, и парентералног начина примене.[25] Због тога се од недавно развијају липидне формулације

амфотерицина Б, чија примена има за циљ смањење токсичности, уз задржавање терапеутске ефикасности.

3) Ехинокандини, као што су каспофунгин, анидулафунгин и микафунгин, представљају класу антимикотика изведену из секундарних метаболита модификованих филаментозних гљивица.[26] У њиховој структури је присутан циклични хексапептид са липидним хидрофобним ланцем, који им обезбеђује везивање за ћелијску мембрану гљивичне ћелије.[27] Механизам деловања ехинокандина се заснива на инхибицији ензима UDP-глукоза β-1,3-глукан-β-(3)-глукозилтрансферазе, блокирајући синтезу β-(1,3)-глукана, једне од кључних компоненти ћелијског зида гљивица.[28] Последица овог процеса су структурне промене у ћелијском зиду, које доводе до лизе гљивичне ћелије. Пошто ћелијски зид хуманих ћелија не садржи β-глукане, ехинокандини показују значајну селективност и повољан терапеутски профил.[7] Упркос томе, ехинокандини немају широк спектар деловања, због чега се, најчешће, користе у терапији инвазивне кандидијазе и аспергилозе, посебно код пацијената код којих постоји контраиндикација за примену других антимикотика.[7] Једно од ограничења у њиховој примени је слаба орална биорасположивост, због чега се морају примењивати интравенским путем, слично као и амфотерицин Б.

4) Алиламини, као што су тербинафин, нафтифин и бутенафин, представљају класу антимикотика који инхибирају ензим сквален-епоксидазу, блокирајући биосинтезу ергостерола. Истовремено, алиламини инхибирају синтезу холестерола, што доводи до акумулације сквалена, који је токсичан за гљивичне ћелије.[29,30] Поред тога, недостатак ергостерола доводи до промена у структури и функцији ћелијске мембране, нарушава пермеабилност и транспорт хранљивих супстанци, доводећи до дисфункције и смрти ћелије.[31] За разлику од азола, који углавном делују фунгистатички, алиламини имају фунгицидно деловање, што их чини ефикасним у лечењу дерматофитоза.[23]

5) Антиметаболити представљају класу антигљивичних лекова који су структурно слични ендогеним молекулима присутним у здравим ћелијама, али делују као инхибитори одређених метаболичких процеса, ометајући синтезу нуклеинских киселина или протеина. Представник ове класе је флуцитозин, пиримидински антиметаболит који нема антимикотичко дејство, већ се активира унутар гљивичне ћелије, прелазећи у активни метаболит, 5-флуороцитозин. Упркос ефикасности флуцитозина, његова примена је ограничена због његове мијелотоксичности и појаве резистентности, због чега се, најчешће, користи у комбинацији са другим антимикотицима, попут амфотерицина Б.[32]



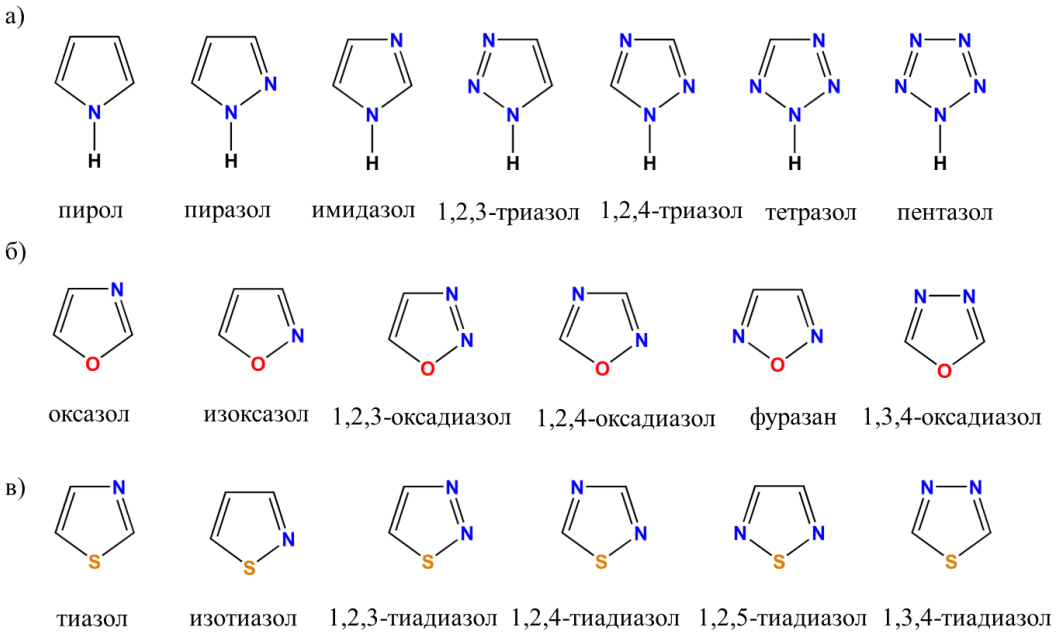
Слика 1. Структурне формуле представника главних класа антигљивичних лекова

Последица повећане примене антигљивичних лекова је развој резистентности гљивица на њих, што представља озбиљан здравствени проблем, који значајно ограничава ефикасност терапије гљивичних инфекција.[33] У циљу превазилажења овог проблема, значајна пажња се мора усмерити на детаљније испитивање механизама антимикробне резистентности, као и унапређивање метода за њено рано откривање, како би се на време прилагодила терапија и избегли нежељени ефекти.[34]

1.2. Азоли као антигљивични лекови

Азоли представљају групу хетероцикличних ароматичних једињења, природног или синтетичког порекла, која се одликују карактеристичним хемијским и физичким својствима. Азоли су петочлана ароматична хетероциклична једињења, чија ароматичност потиче од делокализације π-електрона у прстену. У структури њиховог

прстена могу се наћи до пет атома азота, при чему могу садржавати и атом сумпора или кисеоника.[35] На слици 2 приказане су структурне формуле неких представника азола.



Слика 2. Структурне формуле азола који у свом прстену садрже а) само азот, б) азот и кисеоник и в) азот и сумпор

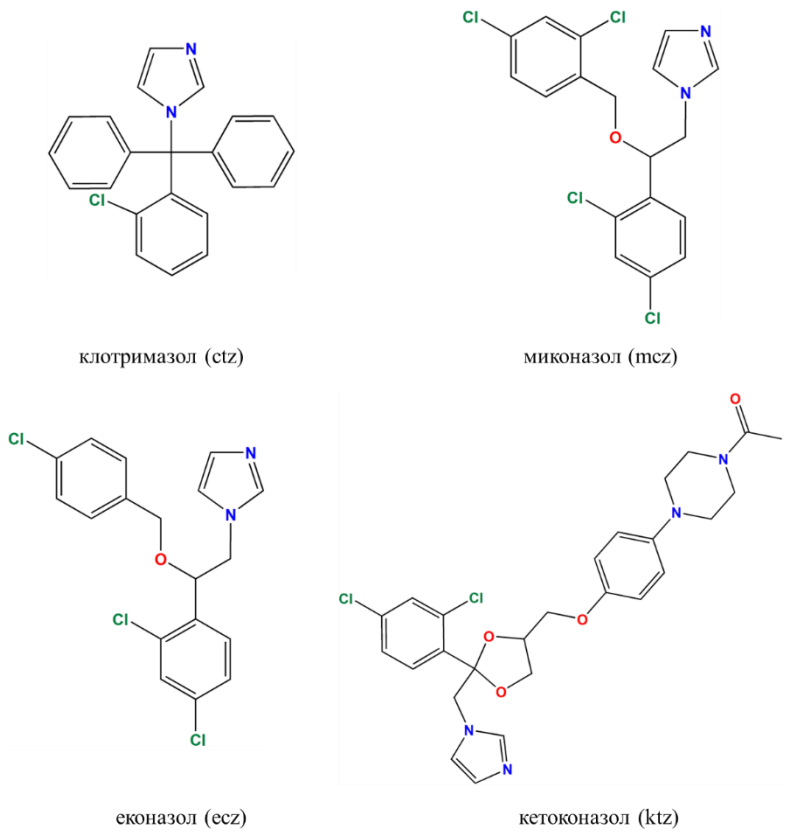
Бензимидазол представља једно од првих азолних једињења код којих је уочена антигљивична активност.[36] Примена азола у клиничке сврхе започиње 1958. године, када је употребљена маст хлоримидазол са локалним деловањем. Након тога, синтетисана су три нова антигљивична лека: клотримазол (ctz), миконазол (mcz) и еконазол (ecz), који се још увек клинички примењују за лечење гљивичних инфекција.[37] Лекови који у својој структури садрже имидазолов прстен, због сличне структуре и физичко-хемијских особина, сврставају се у прву генерацију антигљивичних азола.[38] Након примене азола прве генерације, модификације њихове структуре довеле су до проширења спектра деловања и развоја нове генерације азола. Поред тога, азоли се, према структури, могу поделити на имидазоле и триазоле. Неки од најважнијих антигљивичних азола који у својој структури садрже имидазол су:

1) Клотримазол (ctz; Слика 3) представља синтетички азол који у својој структури поседује четири ароматична прстена, од којих је један имидазолов. Показује врло добру *in vitro* активност при ниским концентрацијама према широком спектру гљивица. Фунгистатичка активност клотримазола се може повезати са његовим деловањем на биосинтезу ергостерола, чиме се спречава раст гљивица, због чега се примењује у лечењу вулвовагиналне и орофарингеалне кандидијазе, кожних инфекција изазваних дерматофитима и разних других гљивичних инфекција.[39] Поред тога, клотримазол показује *in vitro* активност према Грам-позитивним бактеријама, док при врло високим концентрацијама делује и на паразитске протозое рода *Trichomonas*.[40] Топикална примена клотиримазола у облику крема, масти и лосиона одобрена је од стране Америчке управе за храну и лекове (FDA, енгл. *U.S. Food and Drug Administration*). Неки лекови на бази клотримазола укључују лактат како би се побољшала његова растворљивост. Лактат може утицати на физиологију *C. albicans* гљивице и њену осетљивост на лекове, служећи као извор угљених хидрата за гљивице.[41]

2) Миконазол (mcz; Слика 3) је синтетички дериват имидазола који углавном делује фунгистатички, али при вишим концентрацијама може бити фунгицидан. Његов механизам деловања укључује повећање унутарћелијских реактивних кисеоничних врста (*reactive oxygen species*, ROS), што доводи до оксидативног стреса и оштећења ћелија. Претпоставља се да овај ефекат може бити повезан са инхибицијом антиоксидативних ензима, као што су каталаза и пероксидаза.[42] Користи се за лечење гљивичних инфекција слузокоже, укључујући оралну и вагиналну кандидијазу, као и инфекције коже и ноктију изазване врстама *Trichophyton* и *Epidermophyton*.[43,44] Миконазол се клинички може примењивати топикално или интравенски, при чему је интравенска терапија праћена нежељеним реакцијама, као што су мучнина, температура и кардиотоксичност при брзој инфузији.[45] Топикални препарати на бази миконазола су најчешће доступни у облику креме, гела, раствора или спреја у концентрацији од 1%.[42] У овом случају, озбиљни нежељени ефекти су веома ретки, а повремено се јавља црвенило коже и алергијски контактни дерматитис.

3) Еконазол (ecz; Слика 3) је имидазолни антигљивични лек структурно сличан миконазолу[46] и користи се углавном за лечење кожних инфекција.[47] Овај лек је комерцијално доступан у облику креме и масти за топикалну примену. Због ниске растворљивости еконазола, ограничена је његова концентрација на месту деловања, као и пермеабилност. Друга нежељена дејства, као што су иритација, црвенило, пецкање и свраб, пријављена су код 1 – 4% пацијената.[48] Такође, фунгицидна активност еконазола зависи од концентрације и времена излагања, због чега лечење применом овог антимикотика захтева дуготрајну терапију.[49] Поред тога, овај лек се брзо метаболише и везује за протеине у крви, што доводи до неповољног фармакокинетичког профила.[50] С обзиром на ову чињеницу, потребно је развити нове формулације овог антигљивичног лека у циљу побољшања његове ефикасности.

4) Кетоконазол (ktz; Слика 3) први је представник друге генерације антигљивичних азола, који поред имидазола у структури садржи и диоксоланску функционалну групу. За разлику од претходно поменутих азола, његова примена није била ограничена само на лечење површинских микоза, већ је овај антимикотик био и први орално доступан азол за лечење системских гљивичних инфекција.[11,51,52] Механизам деловања кетоконазола заснива се на инхибицији биосинтезе ергостерола у ћелијској мембрани *C. albicans* гљивице.[53,54] Међутим, један од главних недостатака примене кетоконазола је његова изузетно слаба растворљивост у води.[55] Као слаба база, кетоконазол се добро раствара у киселој средини, омогућавајући бољу апсорпцију лека. Насупрот томе, при високим pH вредности остаје непотпуно растворен, што доводи до знатно смањене апсорпције. Управо ова изражена зависност растворљивости кетоконазола од pH вредности за резултат има непредвидиву апсорпцију и широки опсег оралне биорасположивости, која се креће од 37 до 97%.[56,57] Због тога је неопходно предузети мере које ће истовремено повећати растворљивост и оралну биорасположивост овог лека.[58] Поред тога, утврђено је да терапија гљивичних инфекција кетоконазолом често изазива поремећаје гастроинтестиналног тракта, као и хепатотоксичност. Ова нежељена дејства кетоконазола, као и смањена ефикасност лечења довела су до његове замене новијим и ефикаснијим триазолним антигљивичним лековима.[7] Ипак, кетоконазол се и даље користи у облику крема и шампона због добре активности према кожним микозама. Као 2% шампон, ефикасан је у лечењу себорејног дерматитиса, а користи се и за третман масне коже и перути.[59]



Слика 3. Структурне формуле клинички одобрених антигљивичних лекова на бази имидазола

Као што је већ поменуто, имидазоли представљају једну од главних класа антигљивичних лекова на бази азола и значајно су допринели лечењу површинских и системских гљивичних инфекција. Међутим, многи антигљивични лекови из ове групе имају ограничену примену због уског спектра деловања, слабе растворљивости или појаве нежељених ефеката. У циљу превазилажења ових недостатака, новија истраживања усмерена су на развој нових деривата имидазола. Поред имидазола, триазоли представљају значајну класу антигљивичних лекова на бази азола и њихова примена је довела до значајног напретка у лечењу гљивичних инфекција.[37] У поређењу са имидазолима, триазоли обично показују шири спектар антигљивичне активности и смањену токсичност, што их чини погоднијим за клиничку примену. Истраживања су показала да на ефикасност триазола, осим азолног прстена, утичу и друге структурне компоненте у молекулу и стереоизомерија, што омогућава дизајн нових, ефикаснијих и мање токсичних антигљивичних лекова.[60-62] Триазоли делују као инхибитори CYP51 ензима, који је кључан за синтезу ергостерола, есенцијалног стерола ћелијске мембране гљивица. Триазоли су углавном фунгистатици, осим вориконазола и итраконазола који могу деловати фунгицидно. Поред тога, већи афинитет триазола према CYP51 изолованом из гљивица омогућава њихову бољу антигљивичну активност и мању токсичност. Неки од најважнијих антигљивичних лекова на бази триазола, чије су структурне формуле приказане на слици 4, су:

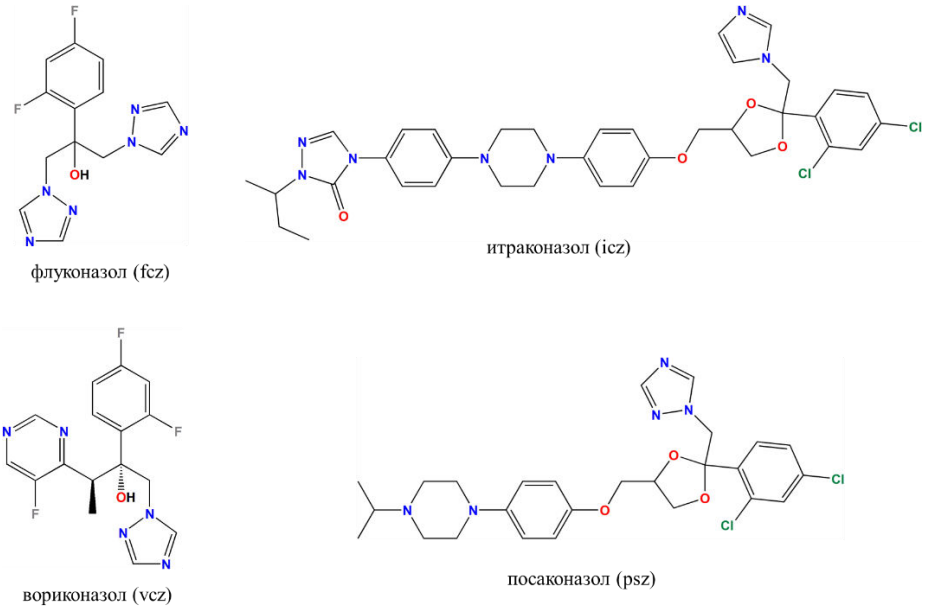
1) Флуконазол (fcz) је 1994. године одобрен од стране FDA за оралну примену у терапији вагиналне кандидијазе.[63] Поред тога, ефикасан је у превенцији и лечењу површинских и инвазивних инфекција изазваних *Candida* врстама.[64,65] Овај антигљивични лек из групе триазола у својој структури садржи дифлуорфенилну групу

(Слика 4), која доприноси његовој стабилности и растворљивости. Степен апсорпције лека је знатно већи у поређењу са другим азолима, што је највероватније последица његове веће растворљивости у води и ниског афинитета према протеинима плазме.[66]

2) Итраконазол (icz) представља први орално доступан антигљивични лек са израженом активношћу према врстама из *Aspergillus* рода.[66-68] Припада групи липофилних лекова, а његова структура обухвата триазолни прстен, диоксоланску групу и хлорфенилни остатак (Слика 4), што обезбеђује значајну стабилност и специфично везивање за ензиме из групе цитохрома P450. Делује фунгистатички или фунгицидно, у зависности од примењене концентрације и врсте гљивице. Захваљујући широком спектру деловања и повољном фармаколошком профилу, итраконазол представља један од најзначајнијих лекова у терапији системских и субкутаних микоза.[69] Поред тога, клиничке индикације за примену итраконазола обухватају инвазивне и хроничне гљивичне инфекције, укључујући респираторне инфекције и алергијску бронхопулмоналну аспергилозу. Начин примене итраконазола зависи од врсте инфекције, а лек је доступан у облику оралног раствора, капсула и интравенских формулација. Апсорпција итраконазола условљена је киселошћу желудачног садржаја и побољшава се применом лека уз оброк.[70]

3) Вориконазол (vcz) представља први триазолни антигљивични лек друге генерације мале молекулске масе, растворљив у води, и одобрен за терапију инвазивне аспергилозе и езофагеалне кандидијазе.[71,72] Показује ефикасност према врстама из *Aspergillus*, *Fusarium* и *Candida* рода (укључујући врсте *C. glabrata* и *C. krusei* које су резистентне или мање осетљиве на флуконазол). Поред тога, активан је у терапији инфекција изазваних *Fusarium* и *Scedosporium* врстама, које се сматрају тешко лечивим.[72] Нежељени ефекти терапије вориконазолом укључују појаву осипа на кожи и повишене нивое трансаминаза, енцефалопатију или халуцинације.[73-75]

4) Посаконазол (psz) примењује се у превенцији инвазивних инфекција изазваних квасцима и плеснима, укључујући инвазивну аспергилозу код пацијената са високим ризиком услед имуносупресије. Посебно је ефикасан у лечењу инвазивних инфекција изазваних гљивицама *Candida* и *Aspergillus*.[76] Лек је у почетку био доступан у облику оралне суспензије, међутим његову клиничку примену су ограничавали непредвидиви и променљиви профили апсорпције. Присуство флуорфенилног остатка поред триазолног прстена у структури овог антимикотика (Слика 4) условљава његову изражену липофилност, због чега апсорпција лека у значајној мери зависи од бројних гастроинтестиналних фактора, укључујући pH вредност. Поред тога, слаба растворљивост посаконазола у води условљава потребу за његовом применом уз храну богатом мастима.[77-79] Наведени недостаци у апсорпцији представљали су основу за развој новог фармацеутског облика, у виду таблета са продуженим ослобађањем, које су у поређењу са оралном суспензијом омогућиле постизање већих концентрација лека у крви. Убрзо након тога, развијена је и интравенска формулација посаконазола, намењена пацијентима код којих орална примена није могућа. Код обе формулације неопходна је примена веће дозе првог дана терапије ради бржег постизања терапијских концентрација, што није било изводљиво код оралне суспензије.[76]



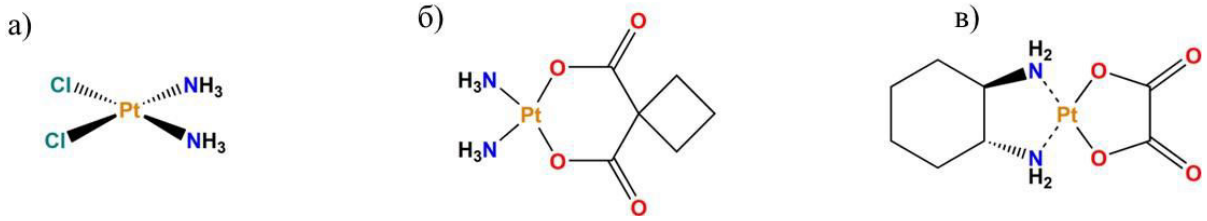
Слика 4. Структурне формуле клинички одобрених антигљивичних лекова на бази триазола

1.3. Медицински значај комплексних једињења

С обзиром на пораст антимикробне резистентности, неопходно је синтетисати нова једињења са потенцијалним антигљивичним деловањем. Последњих година истраживања су све више усмерена на једињења која садрже јоне метала. Иако се метали често повезују са индустријском применом и потенцијалном токсичношћу, познато је да су многи од њих есенцијални за нормално функционисање организма.[80] Есенцијални метали, као што су гвожђе, хром, манган, кобалт, цинк, бакар и молибден, неопходни су за низ виталних процеса, укључујући метаболичке реакције, фотосинтезу, раст и развој, ћелијско дисање, мишићну контракцију, пренос нервних импулса и фиксацију азота.[80-82]

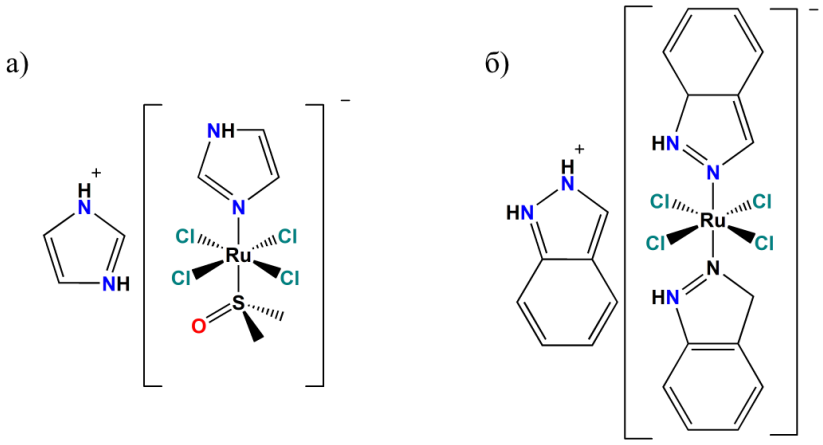
Метали и њихова једињења примењују се у медицини кроз историју цивилизације. Током последњих деценија све већи број истраживања усмерава пажњу на комплексе метала са органским лигандима, при чему настају једињења која често показују знатно већу ефикасност у односу на лекове засноване искључиво на органским молекулима. Комплекси метала делују на микроорганизме на више начина, што укључује отпуштање или супституцију лиганда, као и стварање реактивних врста кисеоника, доводећи до оштећења ћелије. Јон метала значајно утиче на структуру и геометрију комплекса. Тродимензионална структура ових комплекса омогућава биолошку активност која се разликује од активности самих органских лиганада.[83,84] Због своје сложене просторне структуре и специфичне геометрије, механизам деловања комплексних једињења често је тешко у потпуности разјаснити, при чему се управо та геометрија сматра одговорном за њихов другачији механизам деловања у односу на класичне органске лекове.[84,85] Бројна истраживања у области примене комплекса метала у медицини довела су до развоја научне дисциплине познате као неорганска медицинска хемија.[86] Између осталог, ова област хемије се бави проучавањем различитих механизама деловања комплекса метала у поређењу са органским једињењима и њихових интеракција са протеинима, пептидима и аминокиселинама.

Откриће антитуморске активности цисплатине (*cis*-[$Pt(NH_3)_2Cl_2$]; Слика 5а) 1969. године[87] изазвало је значајно интересовање за примену комплекса метала у медицини, како у дијагностичке, тако и у терапеутске сврхе.[88] Иако се у медицини користи још од 1970. године, цисплатина, под комерцијалним називом Platinol, званично је 1978. године одобрена од стране FDA за лечење тумора тестиса, јајника, грлића материце и мокраћне бешике.[89-91] Механизам деловања цисплатине заснива се на њеној интеракцији са DNA, при чему након уласка у ћелију долази до супституције хлоридних лиганада аква лигандима, који се даље супституишу атомима азота из пуринских база у DNA, чиме се инхибира репликација туморских ћелија, односно долази до програмиране смрти ћелија (апоптозе).[92] Међутим, због значајне токсичности и нежељених ефеката, као што су оштећења слуха, нарушавања анатомске структуре коштане сржи и поремећаја физиолошке функције бубрега,[93] истраживања су усмерена на развој нових цитостатика на бази платине, међу којима се издвајају карбоплатина (Слика 5б) и оксалиплатина (Слика 5в). Међутим, и ови комплекси платине(II) показују токсично деловање.[87]



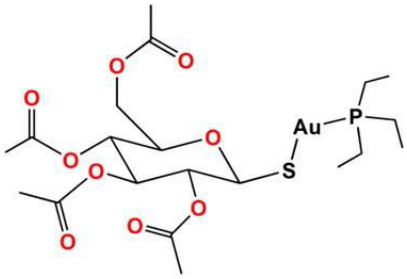
Слика 5. Структурне формуле цисплатине (а), карбоплатине (б) и оксалиплатине (в)

Антитуморску активност према одређеним врстама туморских ћелија показали су и комплекси галијума, рутенијума, титана, осмијума, паладијума, иридијума, и других метала.[87] У проналажењу комплекса прелазних метала који би показали бољу активност, већу селективност и мању токсичност у односу на комплексе платине(II), комплекси рутенијума(II/III) издвојили су се као најадекватнија замена (Слика 6). Тако је комплекс рутенијума(III), [HIm]{*trans*-[$RuCl_4$(Im)(dmso-*S*)]} (NAMI-A, Im = имидазол; Слика 6а) показао *in vivo* ефикасност према метастазирајућим туморима плућа, док је комплекс [HInd]{*trans*-[$RuCl_4(Ind)_2$]} (KP1019, Ind = индазол; Слика 6б) показао добру активност према туморима резистентним на цисплатину, нарочито код колоректалног карцинома (карцином дебелог црева).[94]



Слика 6. Структурне формуле комплекса рутенијума(III) NAMI-A (а) и KP1019 (б)

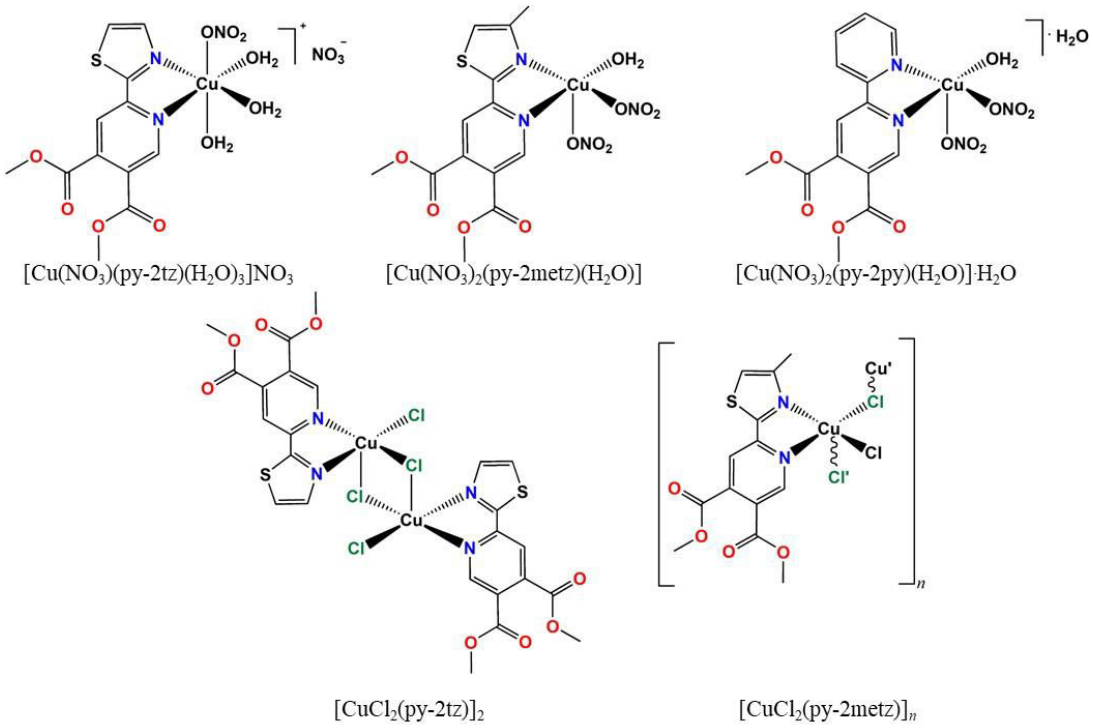
Комплекси злата(III), изоструктурни и изоелектронски комплексима платине(II), имају значајну улогу у испитивањима антитуморске активности.[95] Нарочито се као потенцијални антитуморски агенси испитују комплекси злата(III) са лигандима који садрже донорске атоме азота, као што су полиамини, порфирини и деривати фенантролина, бипиридина и терпиридина.[95,96] Поред комплекса злата(III) и комплекси злата(I) показују значајну биолошку активност, при чему је $K[Au(CN)_2]$ активан према *Mycobacterium tuberculosis* бактерији,[97] док се ауранофин (Слика 7) користи у лечењу реуматоидног артритиса.[98]



Слика 7. Структурна формула ауранофина који се примењује у терапији реуматоидног артритиса

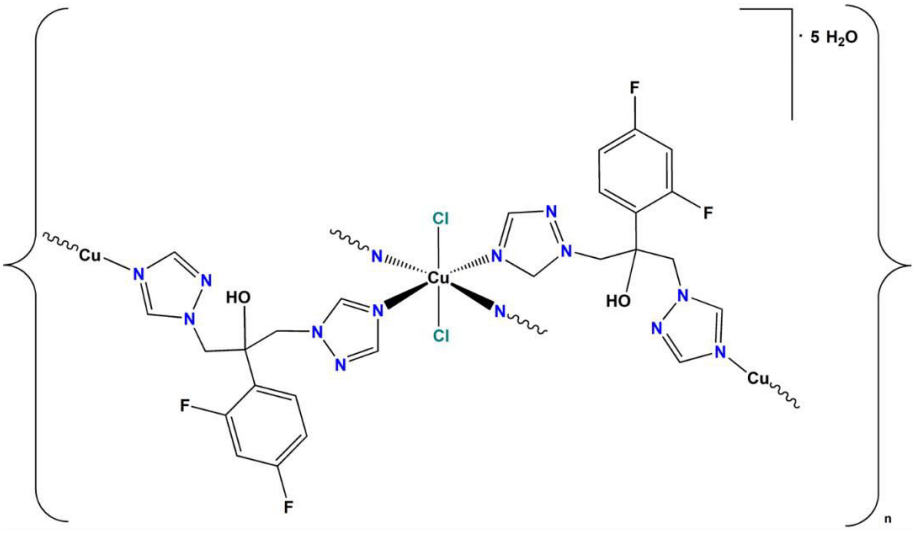
Бакар и цинк су есенцијални метали неопходни за правилно функционисање бројних биолошких процеса у људском организму. Недавно је синтетисано пет комплекса бакра(II), који садрже диметил-пиридин-4,5-дикарбоксилатне естре као лиганде (Слика 8), $[Cu(NO_3)(py\text{-}2tz)(H_2O)_3]NO_3$, $[Cu(NO_3)_2(py\text{-}2metz)(H_2O)]$, $[Cu(NO_3)_2(py\text{-}2py)(H_2O)]\cdot H_2O$ $[CuCl_2(py\text{-}2tz)]_2$ и $[CuCl_2(py\text{-}2metz)]_n$ (py-2tz је диметил-2-(тиазол-2-ил)пиридин-4,5-дикарбоксилат, py-2metz је диметил-2-(4-метилтиазол-2-ил)пиридин-4,5-дикарбоксилат и py-2py = диметил-2,2'-бипиридин-4,5-дикарбоксилат).[99] Кристалне структуре ових комплекса су одређене применом рендгенске структурне анализе. Комплекс $[Cu(NO_3)(py\text{-}2tz)(H_2O)_3]NO_3$ има дисторговану октаедарску геометрију, док преостали комплекси дисторговану квадратно-пирамидалну геометрију. Испитивана је антибактеријска активност комплекса према Грам-позитивној (*S. aureus*) и Грам-негативној бактеријској врсти (*P. aeruginosa*), као и њихова антигљивична активност према две *Candida* врсте (*C. albicans*

и *C. parapsilosis)*. Антимикробна активност комплекса је упоређивана са њиховом антипролиферативном активношћу према здравој ћелијској линији фибробласта плућа (MRC-5; IC_{50} представља концентрацију једињења која инхибира раст ћелије за 50%). Комплекси су показали умерену антигљивичну активност, при чему је најбоља активност уочена за комплексе $[Cu(NO_3)_2(py\text{-}2metz)(H_2O)]$ и $[CuCl_2(py\text{-}2metz)]_n$ (MIC = 31,25 μg/mL). Ћелије *C. albicans* ATCC 10231 су третиране субинхибиторним концентрацијама комплекса, при чему је нађено да комплекси $[Cu(NO_3)(py\text{-}2tz)(H_2O)_3]NO_3$ и $[CuCl_2(py\text{-}2tz)]_2$ скоро потпуно инхибирају стварање хифа након 120 h инкубације. Поред тога, $[Cu(NO_3)(py\text{-}2tz)(H_2O)_3]NO_3$ комплекс инхибира формирање биофилма за 70%, док је ефекат комплекса $[CuCl_2(py\text{-}2tz)]$ мањи (50%).



Слика 8. Структурне формуле комплекса бакра(II) који садрже диметил-пиридин-4,5-дикарбоксилатне естре као лиганде

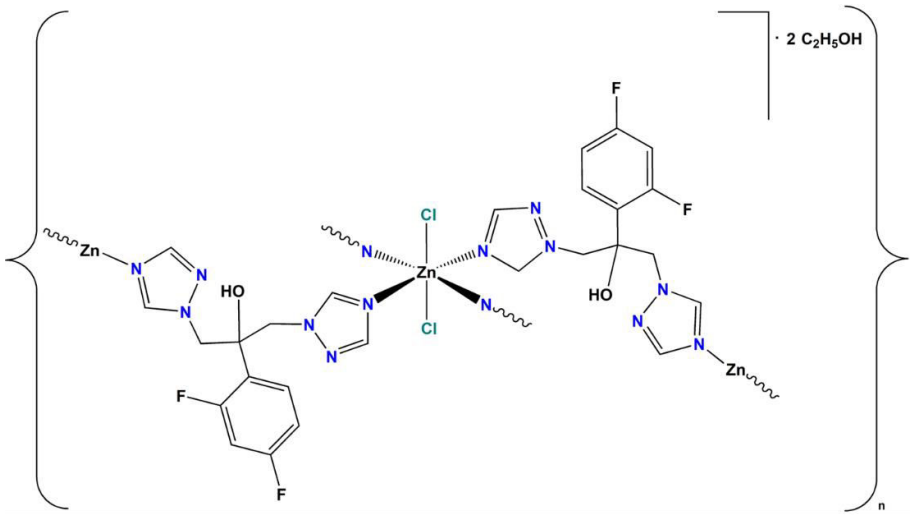
Испитивана је антиљивична активност комплекса бакра(II) са флуконазолом $\{[CuCl_2(fcz)_2]\cdot 5H_2O\}_n$ (Слика 9) према гљивичним врстама (*C. albicans* ATCC 10231, *C. parapsilosis* ATCC 22019 и *C. krusei* ATCC 6258), као и према четири изолата *C. albicans* (*C. albicans* 1c, *C. albicans* 1f, *C. albicans* 11 и *C. albicans* 13).[100] Поред тога, одређена је цитотоксичност овог комплекса на здравим MRC-5 ћелијама. Комплекс $\{[CuCl_2(fcz)_2]\cdot 5H_2O\}_n$ је показао 2,7 пута бољу активност према клиничким изолатима *C. albicans* од флуконазола (μM концентрације). Међутим, комплекс бакра(II) је токсичнији према MRC-5 ћелијама у односу на одговарајући азол. Ипак, утврђено је да је вредност индекса селективности (SI) $\{[CuCl_2(fcz)_2]\cdot 5H_2O\}_n$ комплекса према клиничким изолатима *C. albicans* 41. Инхибиција филаментације *C. albicans* гљивице је праћена при 0,5 × MIC вредности $\{[CuCl_2(fcz)_2]\cdot 5H_2O\}_n$ комплекса, при чему је утврђено да овај комплекс у потпуности инхибира формирање хифа.



$\{[CuCl_2(fcz)_2]\cdot 5H_2O\}_n$

Слика 9. Структурна формула комплекса бакра(II) са флуконазолом

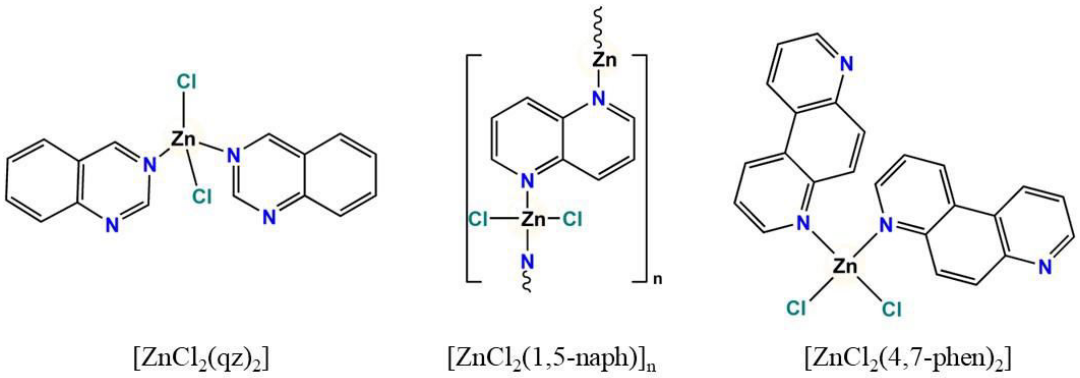
Испитивана је антигљивична активност комплекса цинка(II) са флуконазолом $\{[ZnCl_2(fcz)_2]\cdot 2C_2H_5OH\}_n$ (Слика 10) на три врсте гљивица (*C. albicans* ATCC 10231, *C. parapsilosis* ATCC 22019 и *C. krusei* ATCC 6258), као и према клиничким изолатима *C. albicans* (1c, 1f, 11 и 13).[100] Комплекс $\{[ZnCl_2(fcz)_2]\cdot 2C_2H_5OH\}_n$ је показао бољу активност према изолатима *C. albicans* од fcz лиганда (2,7 пута). Антигљивична активност $\{[ZnCl_2(fcz)_2]\cdot 2C_2H_5OH\}_n$ комплекса је упоређивана са антипролиферативном активношћу на здравој MRC-5 ћелијској линији (IC_{50}), при чему је утврђено да је комплекс токсичнији од флуконазола. Ипак, SI комплекса према клиничким изолатима *C. albicans* износи 73. Поред тога, испитиван је утицај овог комплекса на адхезију *C. albicans* на ћелије тумора плућа (A549) у присуству MIC вредности, при чему се на основу добијених резултата може закључити да $\{[ZnCl_2(fcz)_2]\cdot 2C_2H_5OH\}_n$ комплекс значајно утиче на сузбијање адхезије *C. albicans*.[100]



$\{[ZnCl_2(fcz)_2]\cdot 2C_2H_5OH\}_n$

Слика 10. Структурна формула комплекса цинка(II) са флуконазолом

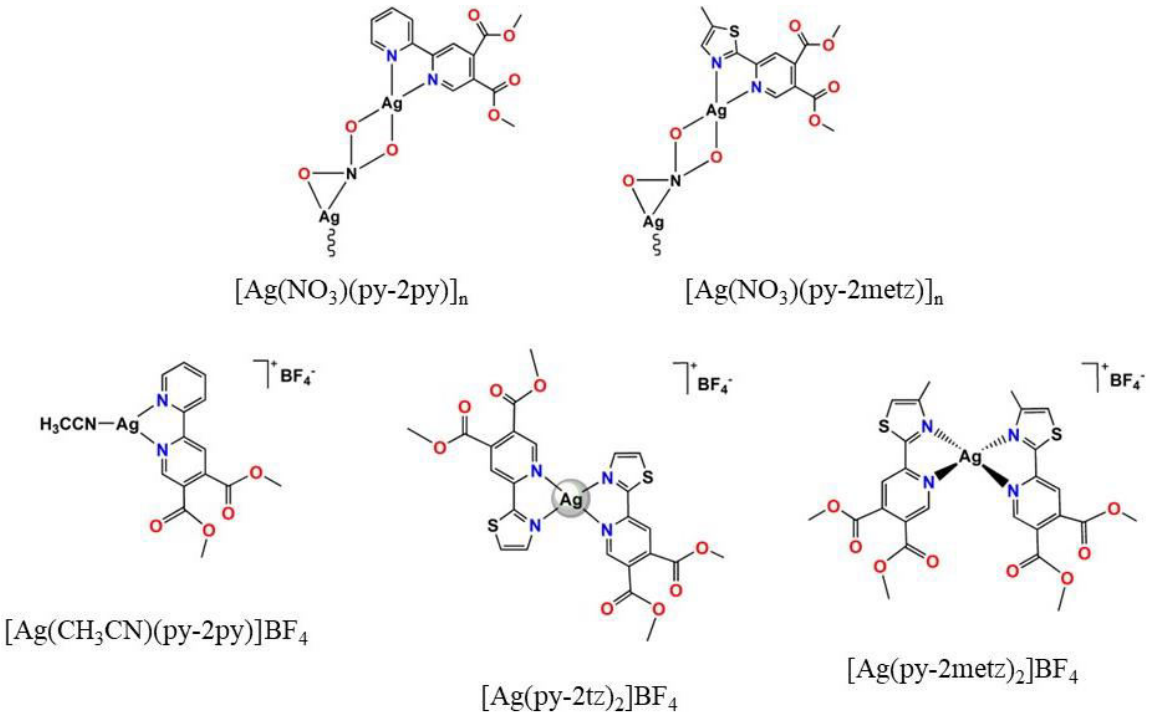
Синтетисана су и биолошки тестирана три комплекса цинка(II) (Слика 11) $[ZnCl_2(qz)_2]$, $[ZnCl_2(1,5\text{-naph})]_n$ и $[ZnCl_2(4,7\text{-phen})_2]$ (qz је хиназолин, 1,5-naph је 1,5-нафтиридин и 4,7-phen је 4,7-фенантролин).[101] Испитивана је антибактеријска активност синтетисаних комплекса, одговарајућих лиганада и $ZnCl_2$ према Грам-позитивним (*S. aureus* и *L. monocytogenes*) и Грам-негативним бактеријама (*E. coli* и *P. aeruginosa*), као и њихова антигљивична активност на *C. albicans* и *C. parapsilosis*. Синтетисани комплекси су показали умерену инхибиторну активност према *S. aureus*, при чему $[ZnCl_2(4,7\text{-phen})_2]$ комплекс показује најбољу антибактеријску активност. Поред тога, овај комплекс у потпуности инхибира филаментацију при MIC_{20} и MIC_{80} концентрацијама и показује синергистички ефекат у комбинацији са клинички коришћеним антимикотиком нистатином.[101]



$[ZnCl_2(qz)_2]$ $[ZnCl_2(1,5\text{-naph})]_n$ $[ZnCl_2(4,7\text{-phen})_2]$

Слика 11. Структурне формуле комплекса цинка(II) са ароматичним *N*-хетероцикличним лигандима

Недавно је синтетисано пет нових комплекса сребра(I) који садрже напред поменуте диметил-пиридин-4,5-дикарбоксилатне естре као лиганде у циљу проналажења нових антимикробних агенаса (Слика 12).[102] Синтетисани комплекси су показали добру активност према тестираним гљивицама (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei* и *C. parapsilosis*), при чему је најбоља антигљивична активност уочена према *C. parapsilosis* (MIC = 1,56 μg/mL). Поред тога, најбоља антигљивична активност према изолату *C. albicans* 1b је уочена за комплексе $[Ag(NO_3)(py\text{-}2metz)]_n$ (MIC = 0,12 μg/mL) и $[Ag(py\text{-}2metz)_2]BF_4$ (MIC = 0,25 μg/mL). Синтетисани комплекси сребра(I) су показали добру активност и према изолатима *Prototheca* (MIC од 1,56 до 4 mg/mL). Комплекси $[Ag(NO_3)(py\text{-}2metz)]_n$ и $[Ag(py\text{-}2metz)_2]BF_4$ инхибирају формирање хифа, док комплекс $[Ag(py\text{-}2metz)_2]BF_4$ може смањити вируленцију и спречити инфекције изазване *C. albicans* сојем. С друге стране, синтетисани комплекси сребра(I) су показали добру антибактеријску активност, посебно према изолату *S. agalactiae* (MIC вредности у опсегу од 1,56 до 16 μg/mL).[102]



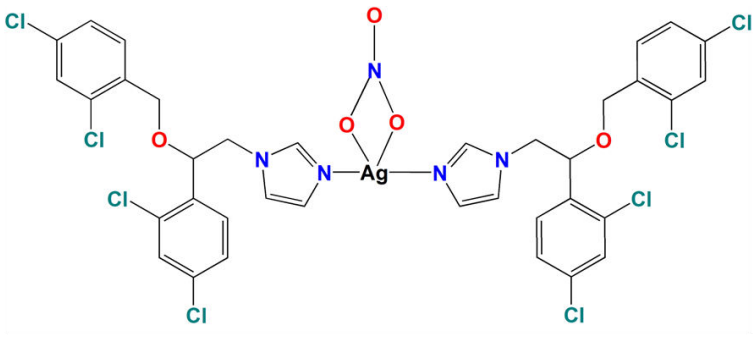
Слика 12. Структурне формуле комплекса сребра(I) који показују антимикробну активност

1.4. Комплекси сребра(I) са азолима као лигандима

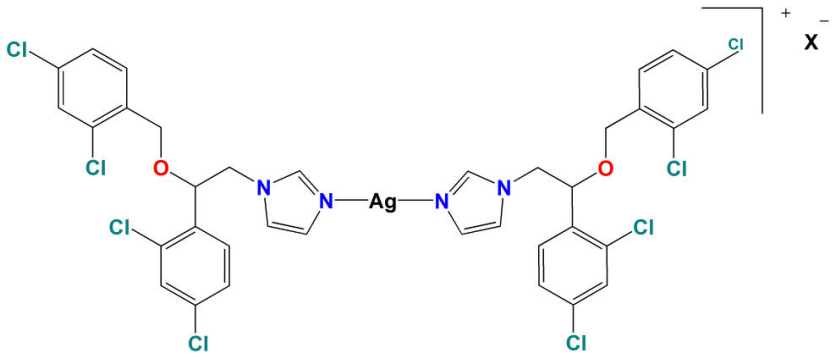
С обзиром на пораст антимикробне резистентности на све класе антигљивичних лекова, неопходно је синтетисати нове агенсе за лечење инфекција. Стога се азоли који се примењују у терапији гљивичних инфекција могу координовати за сребро(I) јоне у циљу проналажења нових антигљивичних агенаса.

Испитивана је антибактеријска активност четири комплекса сребра(I) са миконазолом (Слика 13), одговарајућих сребро(I) соли ($AgNO_3$, $AgClO_4$, $AgBF_4$ и $AgSbF_6$) и миконазола према Грам-позитивним (*S. epidermidis*, *S. aureus*, *B. cereus, B. subtilis*, *E. faecalis* и *Micrococcus luteus*) и Грам-негативним бактеријским врстама (*P. aeruginosa*, *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *Klebsiella pneumoniae* и *Proteus mirabilis*), као и њихова антигљивична активност према три *Candida* врсте (*C. glabrata*, *C. albicans* и *C. parapsilosis*).[103,104] Синтетисани комплекси сребра(I) су показали бољу антибактеријску активност према Грам-позитивним бактеријским врстама у односу на соли сребра(I) и сребро(I)-сулфадиазин (AgSD), антимикробни агенс који се клинички примењује. Комплекси сребра(I) са миконазолом показују MIC вредности до 23 пута мање у односу на AgSD и одговарајуће сребро(I) соли. Комплекс $[Ag(NO_3)(mcz)_2]$ показује најбољу антибактеријску активност према *M. luteus* при MIC од 0,49 μM (MIC за mcz лиганд је 1,18 μM). Комплекс $[Ag(mcz)_2]ClO_4$ инхибира раст *S. aureus* и *S. epidermidis* при MIC од 1,90 μM, односно показује активност која је 11,5 пута већа у односу на AgSD (MIC = 21,85 μM) према *S. aureus*, односно 23 пута већа према *S. epidermidis* (MIC = 43,70 μM). Миконазол инхибира раст ових бактерија при MIC вредности од 1,18 μM. С друге стране, $[Ag(NO_3)(mcz)_2]$, $[Ag(mcz)_2]ClO_4$, $[Ag(mcz)_2]BF_4$ и $[Ag(mcz)_2]SbF_6$ комплекси су показали умерену активност према испитиваним Грам-негативним бактеријама, при чему је најбоља активност уочена према *E. coli*. Поред тога, ови комплекси су показали

добру антигљивичну активност, при чему су инхибирали раст *C. parapsilosis*, *C. glabrata* и *C. albicans* (MIC од 0,10 до 0,12 μM).



$[Ag(NO_3)(mcz)_2]$

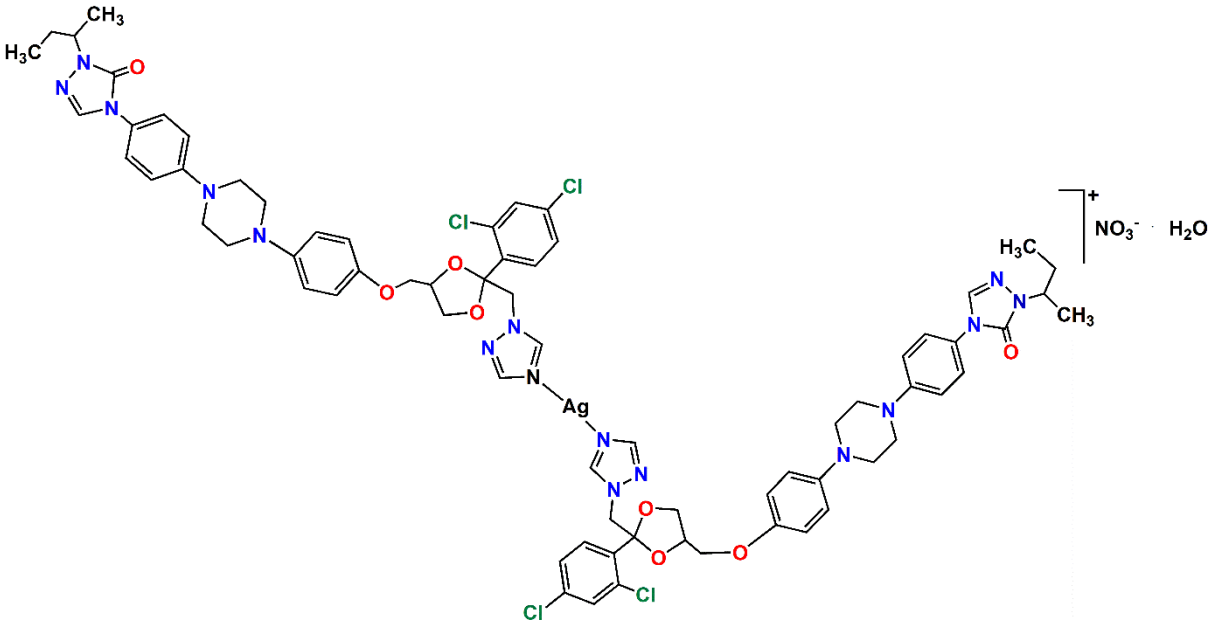


$[Ag(mcz)_2]X$

X = ClO_4^-
BF_4^-
SbF_6^-

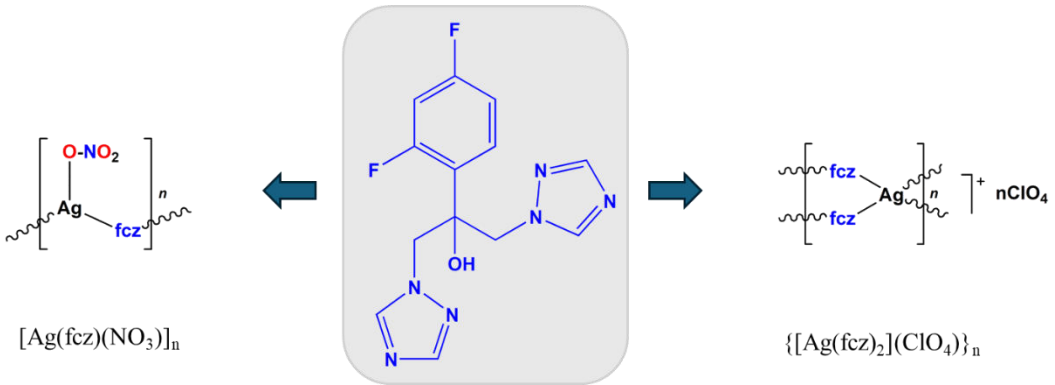
Слика 13. Структурне формуле комплекса сребра(I) са миконазолом

Синтетисан је и структурно окарактерисан комплекс сребра(I) са антигљивичним агенсом, итраконазолом (icz), $[Ag(icz)_2]NO_3{\cdot}H_2O$ (Слика 14). Кристална структура овог комплекса је одређена применом рендгенске структурне анализе. У кристалној структури комплекса, два молекула итраконазола су монодентатно координована за сребро(I) јон преко атома азота из триазоловог прстена формирајући $[Ag(icz)_2]^+$ комплексни катјон, док се у спољашњој координационој сфери налази NO_3^- анјон и молекул воде.[105] Испитивана је антигљивична активност сребро(I) комплекса и icz лиганда према *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* и *C. glabrata.*[105] Комплекс сребра(I) је показао већу активност према *Candida* врстама (MIC од 0,19 до 0,39 μM) у односу на итраконазол (MIC од 0,44 до 1,77 μM). Применом проточне цитометрије, нађено је да је проценат формираних реактивних врста кисеоника у присуству комплекса у ћелији *C. albicans* 5,6 пута већи у односу на њихов проценат у присуству одговарајућег азола. На основу испитивања *in vivo* ембриотоксичности и терапеутског потенцијала сребро(I) комплекса, може се закључити да је $[Ag(icz)_2]NO_3{\cdot}H_2O$ незнатно токсичнији од итраконазола.[105]



Слика 14. Структурна формула комплекса сребра(I) са итраконазолом

Флуконазол (fcz) је коришћен као лиганд за синтезу два комплекса сребра(I), $[Ag(fcz)(NO_3)]_n$ и $\{[Ag(fcz)_2](ClO_4)\}_n$ (Слика 15), чија је активност испитивана према шест врста гљивица (*C. albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Rhizopus tolonifer, Penicillium uniculosum, Mucor mucedo* и *A. niger*).[106] Највећа антигљивична активност комплекса је уочена према *C. albicans* (MIC_{80} = 0,25 μg/mL). Комплекс $[Ag(fcz)(NO_3)]_n$ (MIC_{80} = 5 μg/mL) показује бољу активност у односу на $\{[Ag(fcz)_2](ClO_4)\}_n$ (MIC_{80} = 10 μg/mL) према *A. niger*. Поред тога, ови комплекси показали су умерену активност према *P. uniculosum* (MIC_{80} = 10 μg/mL), која је 6,4 пута већа у односу на флуконазол (MIC_{80} = 64 μg/mL).[106]



Слика 15. Структурне формуле комплекса сребра(I) са флуконазолом

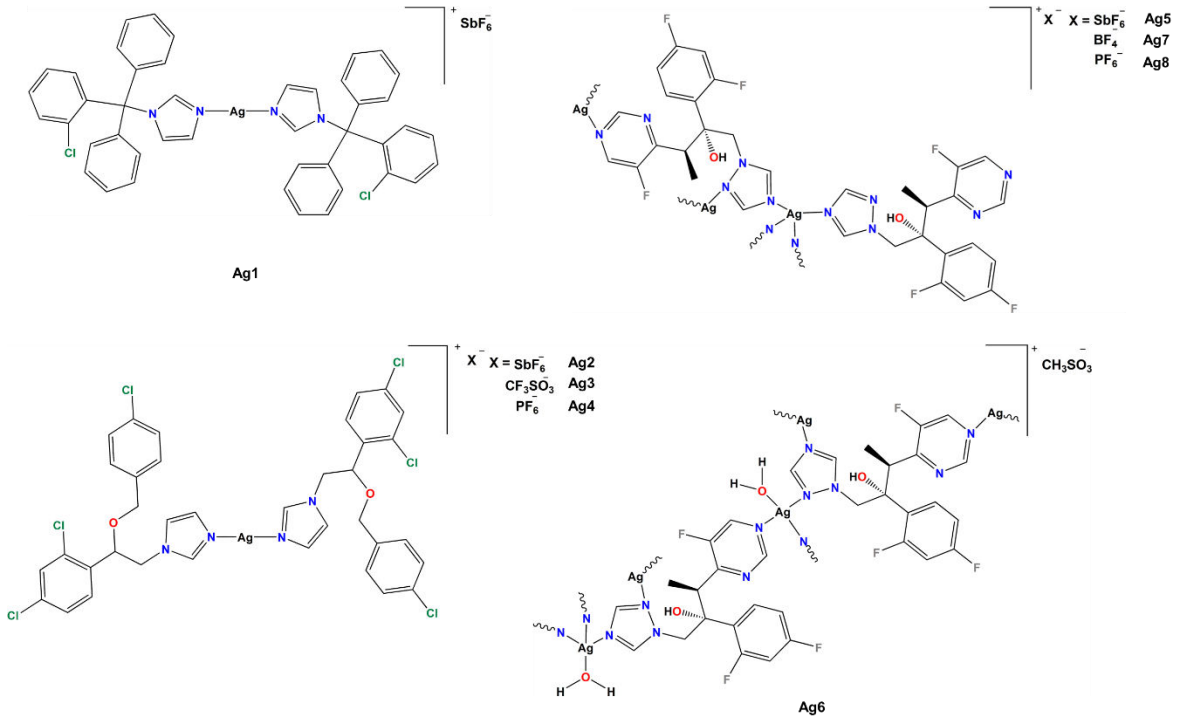
2. ПРЕДМЕТ ИСТРАЖИВАЊА

Инфекција се дефинише као процес уласка патогених микроорганизама у организам домаћина, где они могу да опстану, размножавају се и остваре свој патогени потенцијал.[107] Патогени могу бити различите врсте микроорганизама, бактерије, вируси, гљивице и протозое, и разликују се по својој морфологији, величини, генетичкој грађи и начину деловања на организам.[108] Управо те разлике утичу на тип инфекције који могу изазвати, а самим тим и на симптоме и ток болести. Инфективне болести и даље представљају значајан изазов за савремену медицину и здравствене системе широм света. Иако је у последњим деценијама развијен велики број ефикасних антимикробних лекова, све већи проблем представља појава резистенције код микроорганизама, што отежава лечење и смањује ефикасност постојећих терапија.[109] Из тог разлога, неопходна су континуирана истраживања и развој нових, напреднијих лекова који ће обезбедити повољнији клинички исход и успешно контролисати инфекције.[110]

Различите врсте гљивица које продиру у организам домаћина представљају узрочнике микоза, инфекције које се најчешће јављају код имунокомпромитованих особа. Ове инфекције могу представљати озбиљан здравствени проблем, а у комбинацији са другим системским болестима, могу довести до смртоносних последица.[111] На тржишту је доступан широк спектар антимикотика који су показали ефикасност у лечењу ових инфекција. Међутим, растућа појава резистенције гљивица на актуелне лекове покреће бројна истраживања која се фокусирају на структурну модификацију постојећих антимикотика, као и на развој нових антимикробних агенаса који би могли понудити боље решење у лечењу гљивичних инфекција.[112,113]

Азоли представљају једну од најзаступљенијих класа антигљивичних агенаса, захваљујући свом широком спектру антигљивичне активности и повољном профилу токсичности.[38] Механизам деловања ових једињења подразумева инхибицију ензима цитохром P450, који су укључени у синтезу ергостерола, главне компоненте ћелијске мембране гљивица.[8] Међутим, у последњим деценијама дошло је до значајног пораста броја сојева гљивица који су развили резистенцију на азоле услед дуготрајне и широко распрострањене клиничке примене.[114] У контексту ових изазова, постоји значајна потреба за развојем нових антигљивичних агенаса који могу превазићи постојећу резистенцију. Један од актуелних праваца истраживања је синтеза и испитивање антигљивичне активности комплекса метала.[115] Координација органских једињења са релативно планарном структуром за јоне метала води формирању комплекса, који најчешће има тродимензионалну структуру, што има значајан утицај на биолошку активност.[83,84] Наиме, комплекси могу имати значајно побољшана фармаколошка својства у поређењу са самим органским једињењима. Поред тога, координација лиганда за јон метала смањује поларност комплекса и повећава његову липофилност, што олакшава његову дифузију кроз ћелијску мембрану микроорганизма.[116] Након што комплекс доспе унутар ћелије, може изазвати формирање реактивних кисеоничних врста и/или интераговати са важним биомолекулима, што доводи до смрти ћелије патогена.[117]

Узимајући у обзир чињенице да азоли имају значајну антигљивичну активност, и да комплекси сребра(I) показују антимикробно дејство, предмет ове докторске дисертације се односи на синтезу нових комплекса сребра(I) са клинички коришћеним азолима као лигандима. У дисертацији је описана синтеза осам нових комплекса сребра(I) са антигљивичним азолима, клотримазолом (ctz), еконазолом (ecz) и вориконазолом (vcz) као лигандима (**Ag1** – **Ag8**), чије су структурне формуле приказане на слици 16.



Слика 16. Структурне формуле **Ag1** – **Ag8** комплекса

Синтетисани комплекси су окарактерисани применом масене спектрометрије, ^{1}H NMR, UV-Vis и IR спектроскопије, цикличне волтаметрије и рендгенском структурном анализом. Применом DFT прорачуна предвиђене су најстабилније структуре синтетисаних комплекса у DMSO раствору. *In vitro* активност комплекса **Ag1** – **Ag8**, заједно са азолима и сребро(I) солима који су коришћени за њихову синтезу, испитивана је на панелу бактеријских и *Candida* врста, док је њихова цитотоксичност одређена на здравој MRC-5 ћелијској линији. Поред тога, испитиван је утицај комплекса на процесе филаментације и формирања биофилма (гљивичног и бактеријског). У циљу детаљнијег испитивања утицаја **Ag1** комплекса на патогенезу *Candida* гљивице, проучаван је његов ефекат на адхезију *C. albicans* на A549 ћелије (хумане ћелије тумора плућа), као иницијалне фазе у инвазији ћелија микроорганизма.

3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО

3.1. Хемикалије и реагенси

Хемикалије и реагенси коришћени приликом израде ове докторске дисертације, сребро(I)-хексафлуороантимонат(V) ($AgSbF_6$), сребро(I)-метансулфонат ($AgCH_3SO_3$), сребро(I)-тетрафлуороборат ($AgBF_4$), сребро(I)-хексафлуорофосфат ($AgPF_6$), сребро(I)-трифлуорметансулфонат ($AgCF_3SO_3$), клотримазол (ctz), еконазол (ecz), вориконазол (vcz), етанол, метанол, ацетонитрил, диметилсулфоксид (DMSO), деутеро диметилсулфоксид (DMSO-d_6) и фосфатни пуфер (PBS) купљени су од произвођача Sigma-Aldrich Chemical Co и Acros Organics. Све хемикалије су коришћене без даљег пречишћавања.

3.2. Физичка мерења за комплексе сребра(I)

3.2.1. Елементална микроанализа

Проценат C, H и N у сребро(I) комплексима **Ag1** – **Ag8** одређен је применом елементалне микроанализе на инструменту Perkin-Elmer 2400 Series II (CHN).

3.2.2. Масени спектри

Масени спектри су снимљени након растварања 0,1 mg одговарајућих комплекса сребра(I) у 1,0 mL ацетонитрила на Agilent 62224 accurate масеном спектрометру.

3.2.3. IR мерења

Инфрацрвени спектри синтетисаних комплекса сребра(I) су снимљени у опсегу таласних бројева 4000 – 450 cm^{-1} на Perkin Elmer Spectrum 2 спектрометру (KBr техника).

3.2.4. ^{1}H NMR мерења

^{1}H NMR спектри су снимљени на собној температури на спектрометру Varian Gemini 2000 на 200 MHz, након растварања 5,0 mg комплекса сребра(I) у 600 μL DMSO-d_6. Мултиплицитет сигнала у ^{1}H NMR спектрима је означен као синглет (*s*), дублет (*d*), дублет дублета (*dd*), дублет триплета (*dt*), триплет (*t*), триплет дублета (*td*), квартет (*q*) и мултиплет (*m*).

3.2.5. UV-Vis мерења

UV-Vis спектри синтетисаних сребро(I) комплекса су снимљени на Shimadzu UV-1800 спектрофотометру у опсегу таласних дужина 1100 – 200 nm након њиховог растварања у DMSO на собној температури. За ова мерења, коришћене су следеће концентрације раствора комплекса сребра(I): c(**Ag1**) = 4,8 × 10^{-4} M, c(**Ag2**) = 6,4 × 10^{-4} M, c(**Ag3**) = 1 × 10^{-3} M, c(**Ag4**) = 1 × 10^{-3} M, c(**Ag5**) = 7,4 × 10^{-4} M, c(**Ag6**) = 8,3 × 10^{-4} M, c(**Ag7**) = 6,3 × 10^{-4} M и c(**Ag8**) = 7,7 × 10^{-4} M.

3.2.6. Испитивање стабилности комплекса сребра(I) у раствору

Стабилност сребро(I) комплекса у DMSO и смеши DMSO/PBS (*v*/*v* 7 : 3) праћена је применом UV-Vis спектрофотометрије током 48 h, док је стабилност **Ag6** – **Ag8** комплекса додатно праћена применом ^{1}H NMR спектроскопије у раствору DMSO-d_6 у

периоду од 9 дана на спектрометру Bruker Ascend на 400 MHz на Фармацеутском факултету Универзитета у Београду.

3.2.7. Волтаметријска мерења

Циклична волтаметријска (CV) мерења су вршена на потенциостату/галваностату AutoLab PGSTAT204 применом ћелије са троелектродним системом, који се састоји од стакластог угљеника (GC) као радне електроде, засићене Ag/AgCl као референтне и платинске жице као помоћне електроде. Као проводни електролит је коришћен тетра-*n*-бутиламонијум-хексафлуорофосфат (TBAHP). Концентрација раствора комплекса сребра(I) у DMSO за CV мерења износила је $1,0 \times 10^{-3}$ M.

3.3. Синтезе Ag1 – Ag8 комплекса

Комплекси **Ag1** – **Ag8** су синтетисани по модификованом поступку који је објављен у литератури за синтезу комплекса сребра(I) са итраконазолом, $[Ag(icz)_2]NO_3 \cdot H_2O$.[105] Синтеза и структурна карактеризација **Ag1** – **Ag8** комплекса детаљно је описана у научним радовима који су публиковани у оквиру ове докторске дисертације.[118-120]

3.3.1. Добијање $[Ag(ctz)_2]SbF_6$ (Ag1) комплекса

У 10,0 mL етанола растворити 0,5 mmol (172,4 mg) ctz и у добијени раствор додавати у капима раствор добијен растварањем еквимоларне количине $AgSbF_6$ соли (171,8 mg) претходно растворене у 5,0 mL етанола. Балон са реакционом смешом заштитити од светлости и оставити на собној температури уз мешање 3 h. Кристали комплекса **Ag1** добијени су након прекристализације белог талога у смеши ацетонитрил/етанол (*v*/*v* 1 : 1) и после упаравања тог раствора 3 – 5 дана на собној температури. Издвојене беле кристале **Ag1** одвојити цеђењем и сушити на собној температури у одсуству светлости. Принос је 73% (188,6 mg).

Ag1
Израчунато за **Ag1** = $C_{44}H_{34}AgCl_2F_6N_4Sb$; M_r = 1033,27: C, 51,14; H, 3,32; N, 5,42. Нађено: C, 51,07; H, 3,35; N, 5,35%. HRMS-ESI (CH_3CN): *m*/*z* израчунато за $[C_{44}H_{34}AgCl_2N_4]^+$: 795,1206; нађено 795,1209. IR (KBr, *v*, cm^{-1}): 3177w, 3162w, 3140w, 3108w, 3089w, 3037w ($\nu(C_{триазол}–H)$ и $\nu(C_{ar}–H)$), 2927w (ν(C–H)), 1603w, 1568w, 1530w, 1505m, 1495m, 1465w, 1447m, 1433m ($\nu(C_{ar}=C_{ar})$ и $\nu(C_{ar}=N)$), 1276m, 1225m ($\beta(C_{ar}–H)$) и $\beta(C_{диазол}–H)$, 1130m (ν(C–O)), 1093s ($\nu(C_{ar}–Cl)$), 765s, 753s, 748s ($\gamma(C_{ar}–H)$), 655vs ($\nu(SbF_6)$), 633m ($\gamma(C_{ar}–H)$). ^{1}H NMR (200 MHz, DMSO-d_6): δ = 7,83 (*s*, 1H, C2H), 7,57 (*dd*, *J* = 7,7, 2,0 Hz, 1H, C8H), 7,51 (*d*, *J* = 1,7 Hz, 1H, C10H), 7,46 (*m*, 2H, C14H, C15H), 7,42 (*m*, 5H, C9H, C16H, C20H, C21H, C22H), 7,15 (*m*, 1H, C13H), 7,09 (*m*, 3H, C17H, C19H, C23H), 7,06 (*d*, *J* = 1,7 Hz, 2H, C4H, C5H), 6,94 ppm (*dd*, *J* = 7,7, 1,5 Hz, 1H, C11H). UV-Vis (DMSO, λ_{max}, nm): 260 ($\varepsilon = 1,7 \times 10^3$ $M^{-1}cm^{-1}$).

Клотримазол (ctz)
IR (KBr, *v*, cm^{-1}): ~3000w ($\nu(C_{триазол}–H)$ и $\nu(C_{ar}–H)$), 2970w (ν(C–H)), 1673m, 1566m, 1547m, 1494m, 1467m, 1443m ($\nu(C_{ar}=C_{ar})$ и $\nu(C_{ar}=N)$), 1262m (ν(C–N)), 1210m ($\beta(C_{ar}–H)$ и $\beta(C_{триазол}–H)$), 1114vs, 1081s, 1041m ($\beta(C_{ar}–H)$), 903m ($\beta(C_{триазол}–H)$), 824m (δ(C–N)), 765s ($\gamma(C_{ar}–H)$), 672s ($\gamma(C_{ar}–H)$), 660m (деформације триазоловог прстена), 633s (ν(C–Cl)), 529m (деформације прстена). ^{1}H NMR (200 MHz, DMSO-d_6): δ = 7,52 (*dd*, *J* = 4,2, 3,1 Hz,

1H, C2H), 7,47 (*m,* 1H, C8H), 7,44 (*dd*, *J* = 2,5, 1,3 Hz, 1H, C10H), 7,41 (*m*, 2H, C14H, C15H) 7,37 (m, 5H, C9H, C16H, C20H, C21H, C22H), 7,10 (*dt*, *J* = 5,3, 2,1 Hz, 4H, C13H, C17H, C19H, C23H), 6,97 (*m*, 1H, C4H), 6,87 (*m*, 1H, C5H), 6,80 ppm (*t*, *J* = 1,4 Hz, 1H, C11H). UV-Vis (DMSO, λ_{max}, nm): 255 ($\varepsilon = 7{,}9 \times 10^3$ $M^{-1}cm^{-1}$).

3.3.2. Добијање $[Ag(ecz)_2]SbF_6$ (Ag2), $[Ag(ecz)_2]CF_3SO_3$ (Ag3) и $[Ag(ecz)_2]PF_6$ (Ag4) комплекса

У етанолу (10,0 mL за **Ag2** и 30,0 mL за **Ag3** и **Ag4**) растворити ecz, 0,5 mmol (190,8 mg) за **Ag2** и 1,0 mmol (381,7 mg) за **Ag3** и **Ag4**. У добијени раствор додавати у капима раствор добијен растварањем еквимоларне количине одговарајуће соли сребра(I) (171,8 mg $AgSbF_6$ за **Ag2**, 256,9 mg $AgCF_3SO_3$ за **Ag3** и 252,8 mg $AgPF_6$ за **Ag4**), претходно растворене у 5,0 mL етанола. Балон са реакционом смешом заштитити од светлости и оставити на собној температури уз мешање 3 h. Кристали погодни за рендгенску структурну анализу комплекса **Ag2** добијени су након што је бели талог из реакције прекристалисан у ацетонитрилу, док је у случају комплекса **Ag4**, бели талог прекристалисан у 20,0 mL смеше ацетонитрил/метанол (*v*/*v*, 1 : 1). Након 3 – 5 дана издвојене беле кристале комплекса **Ag2** и **Ag4** одвојити цеђењем и сушити на собној температури у одсуству светлости. Принос је 76% (210,3 mg) за **Ag2**, 71% (362,2 mg) за **Ag3** и 78% за **Ag4** (369,3 mg).

Ag2

Израчунато за **Ag2** = $C_{36}H_{30}AgCl_6F_6N_4O_2Sb$; *Mr* = 1106,96: C, 39,06; H, 2,73; N, 5,06. Нађено: C, 39,35; H, 2,79; N, 5,43%. HRMS-ESI (CH_3CN): *m*/*z* израчунато за $[C_{36}H_{30}AgCl_6N_4O_2]^+$: 866,9545; нађено 866,9583. IR (KBr, *v*, cm^{-1}): 3146m, 3101w, 3090w, 3072w, 3051m (ν($C_{диазол}$–H) и ν(C_{ar}–H)), 2939w, 2899w, 2871w, 2861w (ν(C–H)), 1599m, 1589m, 1561m, 1524s, 1492s, 1470s, 1439m, 1407m (ν(C_{ar}=C_{ar}) и ν(C=N)), 1246m, 1225m (β(C_{ar}–H) и β($C_{диазол}$–H)), 1109s (ν(C–O)), 1094vs (ν(C_{ar}–Cl)), 838m, 830m, 819m, 810m, 788m, 761m, 720w, 696w (γ(C_{ar}–H)) и (γ($C_{диазол}$–H)), 656vs (ν(SbF_6)). ^{1}H NMR (200 MHz, DMSO-d_6): δ = 7,80 (*s*, 1H, C2H), 7,68 (*d*, *J* = 2,0 Hz, 1H, C4H), 7,48 (*dd*, *J* = 8,4, 2,0 Hz, 1H, C10H), 7,37 (*dd*, *J* = 7,3, 5,2 Hz, 2H, C5H, C13H), 7,33 (*s*, 1H, C12H), 7,22 (*s*, 1H, C17H), 7,20 (*s*, 1H, C19H), 7,16 (*s*, 1H, C16H), 7,01 (*s*, 1H, C20H), 5,01 (*t*, *J* = 5,3 Hz, 1H, C7H), 4,40 (*m*, 2H, C6H), 4,29 ppm (*d*, *J* = 12,4 Hz, 2H, C14H). UV-Vis (DMSO, λ_{max}, nm): 271 ($\varepsilon = 1{,}2 \times 10^3$ M^{-1} cm^{-1}).

Ag3

Израчунато за **Ag3** = $C_{37}H_{30}AgCl_6F_3N_4O_5S$; M_r = 1020,31: C, 43,56; H, 2,96; N, 5,49. Нађено: C, 43,48; H, 2,85; N, 5,43%. HRMS-ESI (CH_3CN): *m*/*z* израчунато за $[C_{36}H_{30}AgCl_6N_4O_2]^+$: 866,9551; нађено 866,9536. IR (KBr, *v*, cm^{-1}): 3138w, 3123w (ν($C_{диазол}$–H) и ν(C_{ar}–H)), 2924w, 2900w (ν(C–H)), 1623w, 1589w, 1563w, 1541w, 1521w, 1491m, 1470m, 1457w, 1438w, 1408w (ν(C_{ar}=C_{ar}) и ν(C=N)), 1262vs (ν_{as}(SO_3)), 1153s (ν_s(CF_3)), 1110s (ν_{as}(CF_3)), 1094vs (ν(C_{ar}–Cl)), 1032s (ν_s(SO_3)), 865w, 840w, 829m, 817m, 789m (γ(C_{ar}–H)) и (γ($C_{диазол}$–H)). ^{1}H NMR (200 MHz, DMSO-d_6): δ = 7,83 (*s*, 1H, C2H), 7,70 (*d*, *J* = 2,0 Hz, 1H, C4H), 7,50 (*dd*, *J* = 8,4, 2,1 Hz, 1H, C10H), 7,41 (*d*, *J* = 5,8 Hz, 1H, C5H), 7,36 (*dd*, *J* = 5,4, 3,4 Hz, 2H, C12H, C13H), 7,25 (*t*, *J* = 1,3 Hz, 1H, C17H), 7,20 (*d*, *J* = 8,5 Hz, 2H, C16H, C19H), 7,04 (*s*, 1H, C20H), 5,03 (*t*, *J* = 5,4 Hz, C7H), 4,42 (*t*, *J* = 7,5 Hz, 2H, C6H), 4,33 ppm (*t*, *J* = 8,4 Hz, 2H, C14H). UV-Vis (DMSO, λ_{max}, nm): 271 ($\varepsilon = 8{,}3 \times 10^2$ $M^{-1}cm^{-1}$).

Ag4

Израчунато за **Ag4** = $C_{36}H_{30}AgCl_6F_6N_4O_2P$; M_r = 1016,18: C, 42,55; H, 2,98; N, 5,51. Нађено: C 42,48; H 2,91; N 5,43%. HRMS-ESI (CH_3CN): *m*/*z* израчунато за $[C_{36}H_{30}AgCl_6N_4O_2]^+$: 866,9551; нађено 866,9547. IR (KBr, *ν*, cm^{-1}): 3176w, 3142w, 3090w (*ν*($C_{диазол}$–H) и *ν*(C_{ar}–H)), 2948w, 2919w, 2900w (*ν*(C–H)), 1618w, 1589w, 1561w, 1525m, 1492m, 1470m, 1442w, 1408w (*ν*(C_{ar}=C_{ar}) и *ν*(C=N)), 1094vs (*ν*(C_{ar}–Cl)), 831vs (*ν*(PF_6)), 789m, 760m (*γ*(C_{ar}–H)) и (*γ*($C_{диазол}$–H)). ^{1}H NMR (200 MHz, DMSO-d_6): *δ* = 7,83 (*s*, 1H, C2H), 7,70 (*d*, *J* = 2,0 Hz, 1H, C4H), 7,50 (*dd*, *J* = 8,4, 2,1 Hz, 1H, C10H), 7,41 (*d*, *J* = 5,8 Hz, 1H, C5H), 7,39 (*d*, *J* = 2,1 Hz, 1H, C13H), 7,35 (*s*, 1H, C12H), 7,24 (*d*, *J* = 1,2 Hz, 1H, C17H), 7,22 (*s*, 1H, C19H), 7,18 (*s*, 1H, C16H), 7,03 (*s*, 1H, C20H), 5,03 (*t*, *J* = 5,4 Hz, C7H), 4,42 (*t*, *J* = 7,6 Hz, 2H, C6H), 4,35 (*d*, *J* = 3,4 Hz, 1H, C14H), 4,31 ppm (*d*, *J* = 12,3 Hz, 1H, C14H). UV-Vis (DMSO, λ_{max}, nm): 271 ($\varepsilon = 1{,}0 \times 10^3$ $M^{-1}cm^{-1}$).

Еконазол (ecz)

IR (KBr, *ν*, cm^{-1}): 3115w, 3091w, 3064w (ν($C_{диазол}$–H) и ν(C_{ar}–H)), 2981w, 2969w, 2946w (ν(C–H)), 1590m, 1564m, 1505s, 1489s, 1473m, 1432m (ν(C_{ar}=C_{ar}) и ν(C=N)), 1233s, 1200m (*β*(C_{ar}–H) и *β*($C_{диазол}$–H), 1107s (ν(C–O)), 1090vs, 1046m, 1032m (*ν*(C_{ar}–Cl)), 800m, 787m, 733m, 661m, 626m (γ(C_{ar}–H)) и (γ($C_{диазол}$–H)). ^{1}H NMR (200 MHz, DMSO-d_6): *δ* = 7,68 (*d*, *J* = 2,0 Hz, 1H, C2H), 7,50 (*m*, 1H, C4H), 4,56 (*d*, *J* = 2,0 Hz, 1H, C10H), 7,38 (*dd*, *J* = 4,8, 2,8 Hz, 2H, C5H, C13H), 7,34 (*m*, 1H, C12H), 7,21 (*s*, 1H, C17H), 7,17 (*s*, 1H, H19), 7,04 (*t*, *J* = 1,1 Hz, 1H, C16H), 6,86 (*s*, 1H, C20H), 4,99 (*dd*, *J* = 6,4, 4,4 Hz, C7H), 4,39 (*m*, 2H, C6H), 4,26 ppm (*m*, 2H, C14H). UV-Vis (DMSO, λ_{max}, nm): 255 ($\varepsilon = 4{,}1 \times 10^3$ $M^{-1}cm^{-1}$).

3.3.3. Добијање {[Ag(vcz)$_2$]SbF$_6$}$_n$ (Ag5), {[Ag(vcz)(H$_2$O)]CH$_3$SO$_3$}$_n$ (Ag6), {[Ag(vcz)$_2$]BF$_4$}$_n$ (Ag7) и {[Ag(vcz)$_2$]PF$_6$}$_n$ (Ag8)

У 5,0 mL етанола растворити 0,25 mmol (87,3 mg) vcz лиганда. Добијени раствор додавати у капима раствору који је добијен растварањем еквимоларне количине одговарајуће сребро(I) соли (85,9 mg $AgSbF_6$ за **Ag5**, 50,7 mg $AgCH_3SO_3$ за **Ag6**, 48,7 mg $AgBF_4$ за **Ag7** и 63,2 mg $AgPF_6$ за **Ag8**) у 5,0 mL етанола. Балон са реакционом смешом заштитити од светлости и оставити да се меша 3 h на собној температури. Бели талог **Ag5** – **Ag8** комплекса који се формирао током мешања процедити и прекристалисати у смеши ацетонитрил/етанол (*v*/*v*, 1 : 1) за **Ag5**, односно у ацетонитрилу за остале комплексе. Издвојене беле кристале комплекса **Ag5** – **Ag8**, настале упаравањем раствора након 3 – 5 дана, одвојити цеђењем и сушити на собној температури. Принос је 71% (92,5 mg) за **Ag5**, 61% (87,0 mg) за **Ag6**, 68% (75,9 mg) за **Ag7** и 71% (84,4 mg) за **Ag8**.

Ag5

Израчунато за **Ag5** = $C_{32}H_{28}AgF_{12}N_{10}O_2Sb$; *Mr* = 1042,26: C, 36,88; H, 2,71; N, 13,44. Нађено: C, 36,79; H, 2,68; N, 13,38%. HRMS-ESI (CH_3CN): *m*/*z* израчунато за $[C_{18}H_{17}AgF_3N_6O]^+$: 497,0467; нађено 497,0447. IR (KBr, *ν*, cm^{-1}): 3415br (*ν*(O–H)), 3192w (*ν*(C_{ar}–H)), 2992w, 2943w, 2976w (*ν*(C–H)), 1618s, 1596s, 1524m, 1499s, 1457m, 1423m, 1406vs (*ν*(C_{ar}=C_{ar}) и *ν*(C=N)), 1291m (*δ*(O–H)), 1242w, 1218w (*β*(C_{ar}–H) и *β*($C_{триазол}$–H)), 1132m (*ν*(C–F)), 966m (*ν*(C–O)), 852m, 827w, 804w, 781w, 756w, 737w (*γ*(C_{ar}–H)) и (*γ*($C_{триазол}$–H)), 660vs (*ν*(SbF_6)), 622m (*β*(C_{ar}–F)). ^{1}H NMR (200 MHz, DMSO-d_6): *δ* = 9,06 (*d*, *J* = 2,9 Hz, 1H, C18H), 8,87 (*d*, *J* = 2,1 Hz, 1H, C20H), 8,32 (*s*, 1H, C5H), 7,68 (*s*, 1H, C3H), 7,27 (*m*, 1H, C9H), 7,18 (*m*, 1H, C12H), 6,93 (*td*, *J* = 8,5, 2,5 Hz, 1H, C10H), 6,01 (*s*, 1H, OH), 4,83 (*d*, *J* = 14,3 Hz, 1H, C6H), 4,36 (*d*, *J* = 14,2 Hz, 1H, C6H), 3,94 (*q*, *J* = 7,0 Hz, 1H, C14H), 1,12 ppm (*d*, *J* = 7,0 Hz, 3H, C15H). UV-Vis (DMSO, λ_{max}, nm): 292 ($\varepsilon = 1{,}1 \times 10^3$ $M^{-1}cm^{-1}$).

Ag6

Израчунато за **Ag6** = $C_{34}H_{38}Ag_2F_6N_{10}O_{10}S_2$; M_r = 1140,60: C, 35,80; H, 3,36; N, 12,28. Нађено: C, 35,68; H, 3,28; N, 12,32%. HRMS-ESI (CH_3CN): *m/z* израчунато за $[C_{16}H_{14}AgF_3N_5O]^+$: 456,0201; нађено 456,0193. IR (KBr, ν, cm^{-1}): 3418br (ν(O–H)), 3108m, 3037w ($\nu(C_{триазол}–H)$ и $\nu(C_{ar}–H)$), 2984w, 2941w (ν(C–H)), 1619s, 1597s, 1559w, 1526m, 1501s, 1464m, 1457m, 1436m, 1407s ($\nu(C_{ar}=C_{ar})$ и ν(C=N)), 1293m (δ(O–H)), 1211vs, 1196vs ($\nu_{as}(SO_3)$), 1131m (ν(C–F)), 1039s ($\nu_s(SO_3)$), 867w, 846m, 824w, 773m ($\gamma(C_{ar}–H)$) и ($\gamma(C_{триазол}–H)$), 622m ($\beta(C_{ar}–F)$). ^{1}H NMR (200 MHz, DMSO-d_6): δ = 9,06 (*d*, *J* = 2,9 Hz, 1H, C18H), 8,87 (*d*, *J* = 2,2 Hz, 1H, C20H), 8,34 (*s*, 1H, C5H), 7,70 (*s*, 1H, C3H), 7,26 (*dt*, *J* = 6,9, 2,1 Hz, 1H, C9H), 7,19 (*m*, 1H, C12H), 6,93 (*td*, *J* = 8,3, 2,4 Hz, 1H, C10H), 6,02 (*s*, 1H, OH), 4,83 (*d*, *J* = 14,2 Hz, 1H, C6H), 4,37 (*d*, *J* = 14,3 Hz, 1H, C6H), 3,93 (*d, J* = 6,9 Hz, 1H, C14H), 1,10 ppm (*t*, *J* = 8,7 Hz, 3H, C15H). UV-Vis (DMSO, λ_{max}, nm): 291 ($\varepsilon = 9{,}4 \times 10^2$ $M^{-1}cm^{-1}$).

Ag7

Израчунато за **Ag7** = $C_{32}H_{28}AgBF_{10}N_{10}O_2$; M_r = 893,32: C, 43,03; H, 3,16; N, 15,68. Нађено: C, 42,87; H, 3,04; N, 15,82%. HRMS-ESI (CH_3CN): *m/z* израчунато за $[C_{32}H_{28}AgF_6N_{10}O_2]^+$: 807,1352; нађено 807,1324. IR (KBr, ν, cm^{-1}): 3371br (ν(O–H)), 3139w, 3118w, 3074w, 3063w ($\nu(C_{триазол}–H)$ и $\nu(C_{ar}–H)$), 2994w, 2981w, 2939w, 2910w (ν(C–H)), 1618s, 1596s, 1525s, 1500vs, 1458m, 1440m, 1422m, 1407vs ($\nu(C_{ar}=C_{ar})$ и ν(C=N)), 1293m, 1281m, 1272m (δ(O–H)), 1132m (ν(C–F)), 1059vs ($\nu(BF_4)$), 853s, 829w, 793w, 787w, 736w, 721w, 710w ($\gamma(C_{ar}–H)$) и ($\gamma(C_{триазол}–H)$), 621m ($\beta(C_{ar}–F)$). ^{1}H NMR (200 MHz, DMSO-d_6): δ = 9.05 (*d*, *J* = 2,9 Hz, 1H, C18H), 8,86 (*d*, *J* =2,1 Hz, 1H, C20H), 8,29 (*s*, 1H, C5H), 7,66 (*s*, 1H, C3H), 7,27 (*m*, 1H, C9H), 7,18 (*m*, 1H, C12H), 6,92 (*td*, *J* = 8,5, 2,5 Hz, 1H, C10H), 6,01 (*s*, 1H, OH), 4,82 (*d*, *J* = 14,3 Hz, 1H, C6H), 4,35 (*d*, *J* = 14,2 Hz, 1H, C6H), 3,93 (*d, J* = 7,6 Hz, 1H, C14H), 1,15 ppm (*t*, *J* = 13,2 Hz, 3H, C15H). UV-Vis (DMSO, λ_{max}, nm): 291 ($\varepsilon = 1{,}3 \times 10^3$ $M^{-1}cm^{-1}$).

Ag8

Израчунато за **Ag8** = $C_{32}H_{28}AgF_{12}N_{10}O_2P$; M_r = 951,45: C, 40,40; H, 2,97; N, 14,72. Нађено: C, 40,28; H, 2,91; N, 14,81%. HRMS-ESI (CH_3CN): *m/z* израчунато за $[C_{16}H_{14}AgF_3N_5O]^+$: 456,0201; нађено 456,0188. IR (KBr, ν, cm^{-1}): 3415br (ν(O–H)), 3196w, 3147w ($\nu(C_{триазол}–H)$ и $\nu(C_{ar}–H)$), 2992w, 2980w, 2943w (ν(C–H)), 1618s, 1596s, 1524m, 1499s, 1422m, 1406s ($\nu(C_{ar}=C_{ar})$ и ν(C=N)), 1292m, 1280m (δ(O–H)), 1132m (ν(C–F)), 838vs ($\nu(PF_6)$), 853s, 781w, 755w, 737w, 722w, 713w ($\gamma(C_{ar}–H)$) и ($\gamma(C_{триазол}–H)$), 621m ($\beta(C_{ar}–F)$). ^{1}H NMR (200 MHz, DMSO-d_6): δ = 9,06 (*d*, *J* = 2,9 Hz, 1H, C18H), 8,87 (*d*, *J* = 2,2 Hz, 1H, C20H), 8,31 (*s*, 1H, C5H), 7,68 (*s*, 1H, C3H), 7,22 (*m*, 2H, C9H, C12H), 6,94 (*m*, 1H, C10H), 6,01 (*s*, 1H, OH), 4,82 (*d*, *J* = 14,2 Hz, 1H, C6H), 4,36 (*d*, *J* = 14,3 Hz, C6H), 3,91 (*t*, *J* = 6,9 Hz, C14H), 1,12 (*d*, *J* = 7,1 Hz, 3H, C15H). UV-Vis (DMSO, λ_{max}, nm): 292 ($\varepsilon = 1{,}1 \times 10^3$ $M^{-1}cm^{-1}$).

Вориконазол (vcz)

IR (KBr, ν, cm^{-1}): 3196br (ν(O–H)), 3120w, 3047w, 3017w ($\nu(C_{триазол}–H)$ и $\nu(C_{ar}–H)$), 2995w, 2979w, 2941w (ν(C–H)), 1619s, 1587vs, 1507s, 1496vs, 1451vs, 1408vs ($\nu(C_{ar}=C_{ar})$ и ν(C=N)), 1278s (δ(O–H)), 1249m, 1210m ($\beta(C_{ar}–H)$ и $\beta(C_{триазол}–H)$), 1132s (ν(C–F)), 1054m (ν(C–O)), 858s, 825w, 787w, 779m, 724m, 718m ($\gamma(C_{ar}–H)$) и ($\gamma(C_{триазол}–H)$), 622m ($\beta(C_{ar}–F)$). ^{1}H NMR (200 MHz, DMSO-d_6): δ = 9,05 (*d*, *J* = 2,9 Hz, 1H, C18H), 8,86 (*d*, *J* =2,2 Hz, 1H, C20H), 8,24 (*s*, 1H, C5H), 7,62 (*s*, 1H, C3H), 7,29 (*dd*, *J* = 9,0, 6,9 Hz, 1H, C9H), 7,18 (*m*, 1H, C12H), 6,92 (*td*, *J* = 8,6, 2,4 Hz, 1H, C10H), 5,98 (*s*, 1H, OH), 4,81 (*d*, *J* = 14,3 Hz, 1H, C6H), 4,34 (*d*, *J* = 14,3 Hz, C6H), 3,93 (*q*, *J* = 6,9 Hz, C14H), 1,12 (*d*, *J* = 7,0 Hz, 3H, C15H). UV-Vis (DMSO, λ_{max}, nm): 256 ($\varepsilon = 8{,}6 \times 10^3$ $M^{-1}cm^{-1}$).

3.4. Рендгенска структурна анализа комплекса Ag1, Ag2 и Ag5 – Ag8

Кристали комплекса **Ag1, Ag2** и **Ag5 – Ag8** испитивани су применом рендгенске структурне анализе на температури од 150 K. Добијени кристалографски подаци су дати у табелама 1 – 4. Интензитет рефлексије кристала је измерен на SuperNova дифрактометру са Atlas детектором (MoKα зрачење, λ = 0,71073 Å).[121] Структуре комплекса су решене применом директних метода коришћењем SHELXT и Olex2 програма.[122] Утачњавање је вршено помоћу методе најмањих квадрата на бази F^2 (пуна матрица) коришћењем Olex2 или SHELXL-2018/3.[123] Свим атомима различитим од водоника дати су анизотропни параметри, док су атоми водоника смештени на израчунатим растојањима и даље утачњавани коришћењем „*riding*" модела. Програм MERCURY је употребљен за приказ структуре комплекса.[124]

Табела 1. Кристалографски подаци добијени рендгенском структурном анализом **Ag1** комплекса

Молекулска формула	$C_{44}H_{34}AgCl_2F_6N_4Sb$
Молекулска маса	1033,27
Кристални систем, просторна група	орторомбичан, Fdd2
a (Å)	31,1679(12)
b (Å)	30,6135(11)
c (Å)	8,4227(5)
α (°)	90
β (°)	90
γ (°)	90
V (Å^3)	8036,7(6)
F_{000}	4096,0
Z	16
X-зрачење, λ / Å	Mo-*K*α 0,71073
Температура / K	150(10)
Израчуната густина (g/cm^3)	1,708
Арсорпциони коефицијент (mm^{-1})	1,359
Димензије кристала (mm)	0,15 × 0,10 × 0,01
θ опсег (°)	5,184 до 54,95
Опсег индека *h*, *k*, *l*	-38 ≤ h ≤ 40, -24 ≤ k ≤ 38, -8 ≤ l ≤ 10
Број прикупљених рефлексија	9529
Број независних рефлексија	3778 [R_{int} = 0,0170, R_{sigma} = 0,0175]
Подаци / ограничења / параметри	3778/3/273
Коначни *R* индекси [*I* > 2σ(*I*)]	R_1 = 0,0252, wR_2 = 0,0566
Коначни *R* индекси (сви подаци)	R_1 =0,0286, wR_2 = 0,0582
$\Delta\rho_{max}$, $\Delta\rho_{min}$ (e/Å^3)	0,30/-0,61

Табела 2. Кристалографски подаци добијени рендгенском структурном анализом комплекса **Ag2** и **Ag4**

	Ag2	**Ag4**
Молекулска формула	$C_{36}H_{30}AgCl_6F_6N_4O_2Sb$	$C_{36}H_{30}N_4O_2F_6PCl_6Ag$
Молекулска маса	1106,96	1016,18
Кристални систем, просторна група	моноклиничан, P21/n	моноклиничан, $P2_1/c$
a (Å)	15,8651(10)	16,1833(11)
b (Å)	9,0452(4)	8,8929(4)
c (Å)	16,4734(12)	16,2356(9)
α (°)	90	90
β (°)	188,245(9)	119,131(8)
γ (°)	90	90
V (Å^3)	2082,5(3)	2041,0(2)
F_{000}	1088,0	1016,0
Z	2	2
X-зрачење, λ / Å	Mo-*K*α 0,71073	Mo-*K*α 0,71073
Температура / K	150(10)	150(10)
Израчуната густина (g/cm^3)	1,765	1,653
Арсорпциони коефицијент (mm^{-1})	1,569	0,992
Димензије кристала (mm^3)	0,20 × 0,05 × 0,05	0,30 × 0,20 × 0,20
θ опсег (°)	4,91 до 54,966	5,018 до 54,962
Опсег индекса *h*, *k*, *l*	$-20 \leq h \leq 20$, $-11 \leq k \leq 11$, $-20 \leq l \leq 21$	$-19 \leq h \leq 21$, $-9 \leq k \leq 11$, $-21 \leq l \leq 17$
Број прикупљених рефлексија	17804	18215
Број независних рефлексија	4711 [R_{int} = 0,0365, R_{sigma} = 0,0384]	4683 [R_{int} = 0,0709, R_{sigma} = 0,0764]
Подаци / ограничења / параметри	4711/0/256	4683/2/275
Коначни *R* индекси [$I > 2\sigma(I)$]	R_1 = 0,0434, wR_2 = 0,0994	R_1 = 0,0717, wR_2 = 0,1450
Коначни *R* индекси (сви подаци)	R_1 = 0,0757, wR_2 = 0,1125	R_1 = 0,1275, wR_2 = 0,1652
$\Delta\rho_{max}$, $\Delta\rho_{min}$ (e/Å^3)	0,97/-0,78	1,36/-0,84

Табела 3. Кристалографски подаци добијени рендгенском структурном анализом комплекса **Ag5** и **Ag6**

	Ag5	**Ag6**
Молекулска формула	$C_{32}H_{28}AgF_{12}N_{10}O_2Sb$	$C_{34}H_{38}Ag_2F_6N_{10}O_{10}S_2$
Молекулска маса	1042,26	1140,60
Кристални систем, просторна група	триклиничан, P1	моноклиничан, I2
a (Å)	6,4313(3)	21,3625(6)
b (Å)	9,8300(5)	6,38920(10)
c (Å)	15,7404(5)	32,5369(8)
α (°)	100,272(3)	90
β (°)	99,905(3)	93,740(2)
γ (°)	97,173(4)	90
V (Å^3)	952,05(7)	4431,48(18)
F_{000}	512,0	2288,0
Z	1	4
X-зрачење, λ / Å	Mo-*K*α 0,71073	Mo-*K*α 0,71073
Температура / K	150(10)	150(10)
Израчуната густина (g/cm^3)	1,818	1,710
Арсорпциони коефицијент (mm^{-1})	1,328	1,068
Димензије кристала (mm^3)	0,10 × 0,10 × 0,025	0,25 × 0,10 × 0,10
θ опсег (°)	5,368 до 54,964	4,706 до 54,956
Опсег индекса *h*, *k*, *l*	$-8 \leq h \leq 8$, $-12 \leq k \leq 12$, $-20 \leq l \leq 20$	$-27 \leq h \leq 27$, $-8 \leq k \leq 8$, $-40 \leq l \leq 42$
Број прикупљених рефлексија	14307	25385
Број независних рефлексија	7998 [R_{int} = 0,0355, R_{sigma} = 0,0577]	9314 [R_{int} = 0,0285, R_{sigma} = 0,0336]
Подаци / ограничења / параметри	7998/57/527	9314/1/585
Коначни *R* индекси [$I > 2\sigma(I)$]	R_1 = 0,0306, wR_2 = 0,0540	R_1 = 0,0267, wR_2 = 0,0599
Коначни *R* индекси (сви подаци)	R_1 = 0,0361, wR_2 = 0,0562	R_1 = 0,0304, wR_2 = 0,0612
$\Delta\rho_{max}$, $\Delta\rho_{min}$ (e/Å^3)	0,35/-0,55	0,90/-0,66

Табела 4. Кристалографски подаци добијени рендгенском структурном анализом комплекса **Ag7** и **Ag8**

	Ag7	**Ag8**
Молекулска формула	$C_{32}H_{28}AgBF_{10}N_{10}O_2$	$C_{32}H_{28}AgF_{12}N_{10}O_2P$
Молекулска маса	893,32	951,48
Кристални систем, просторна група	триклиничан, P1	триклиничан, P1
a (Å)	6,3243(2)	6,3775(4)
b (Å)	10,0422(4)	9,9811(7)
c (Å)	15,0179(7)	15,3969(10)
α (°)	98,193(4)	98,368(5)
β (°)	101,627(3)	101,275(5)
γ (°)	96,697(3)	97,285(5)
V (Å^3)	914,23(6)	938,68(11)
F_{000}	448,0	476,0
Z	1	1
X-зрачење, λ / Å	Mo-*K*α 0,71073	Mo-*K*α 0,71073
Температура / K	150(10)	150(10)
Израчуната густина (g/cm^3)	1,623	1,683
Арсорпциони коефицијент (mm^{-1})	0,648	0,685
Димензије кристала (mm^3)	0,30 × 0,20 × 0,20	0,20 × 0,20 × 0,05
θ опсег (°)	5,39 до 54,97	5,384 до 54,96
Опсег индекса *h*, *k*, *l*	$-8 \le h \le 8$, $-13 \le k \le 13$, $-19 \le l \le 19$	$-8 \le h \le 6$, $-10 \le k \le 12$, $-19 \le l \le 19$
Број прикупљених рефлексија	19743	7408
Број независних рефлексија	8064 [R_{int} = 0,0392, R_{sigma} = 0,0557]	5308 [R_{int} = 0,0344, R_{sigma} = 0,0718]
Подаци / ограничења / параметри	8064/3/461	5308/3/527
Коначни *R* индекси [$I > 2\sigma(I)$]	R_1 = 0,0504, wR_2 = 0,1194	R_1 = 0,0442, wR_2 = 0,0892
Коначни *R* индекси (сви подаци)	R_1 = 0,0543, wR_2 = 0,1234	R_1 = 0,0485, wR_2 = 0,0937
$\Delta\rho_{max}$, $\Delta\rho_{min}$ (e/Å^3)	1,34/-0,77	0,85/-0,92

3.5. Биолошка испитивања

3.5.1. Испитивање антимикробне активности

Вредности минималне инхибиторне концентрације (MIC) за комплексе **Ag1 – Ag8,** одговарајуће соли сребра(I) ($AgSbF_6$, $AgCF_3SO_3$, $AgPF_6$, $AgCH_3SO_3$ и $AgBF_4$) и азола (ctz, ecz и vcz) одређене су на основу стандардних тестова које препоручује Национални комитет за Стандарде клиничких бактериолошких лабораторија (M07-A8) и EUCAST (Европски комитет за испитивање осетљивости на антимикробне лекове; верзија 7.3.1). Микроорганизми који су коришћени за испитивање антимикробне активности синтетисаних једињења су из следећих колекција, NCTC (*National Collection of Type*

Cultures) и ATCC (*American Type Culture Collection*). За испитивање антимикробне активности коришћене су Грам-позитивне бактеријске врсте (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 и *Listeria monocytogenes* NCTC 11994), Грам-негативне бактеријске врсте (*Pseudomonas aeruginosa* PAO1 NCTC 10332 и *Escherichia coli* NCTC 2001), као и врсте *Candida* гљивица (*C. albicans* ATCC 10231 и RPF SC5314, *C. parapsilosis* ATCC 22019, *C. krusei* ATCC 6258 и *C. glabrata* ATCC 2001). Највећа концентрација за испитивање антигљивичне активности била је 250 mg/mL (или 500/250 μM), док је за испитивање антибактеријске активности износила 200 mg/mL (или 500 μM).

Вредност инокулума за бактеријске културе је износила 5×10^5 cfu/mL, док је инулокум за *Candida* сојеве разблажен до 1×10^5 cfu/mL оптичке густине. MIC вредност испитиваних једињења представља најмању концентрацију која у потпуности инхибира раст након 24 h инкубације на 37 °C, а одређена је помоћу Epoch Microplate Spectrophotometer, BioTek инструмента. Резултати су праћени статистичком анализом.

3.5.2. Испитивање цитотоксичности

Цитотоксичност комплекса сребра(I) одређена је применом стандардног колориметријског MTT теста (MTT је 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенитетразолијум-бромид)[125] на хуманим ћелијама фибробласта плућа (MRC-5). Ћелије су постављене у микротитарску плочу са 96 бунарића са равним дном у концентрацији од 1×10^4 ћелија по бунарићу. Све ћелијске линије су узгајане у влажној атмосфери од 95% ваздуха и 5% CO_2 на 37°C у RPMI 1640 подлози која је садржавала испитивана једињења. Вршена су серијска разблажења сваког испитиваног једињења, при чему је максимална концентрација комплекса сребра(I) износила 50 μM, док је концентрација вориконазола износила 1000 μM. За свако испитивано једињење, MTT тест је изведен два пута у четири понављања, при чему је проценат редукције MTT једињења праћен на 540 nm (Epoch Microplate Spectrophotometer, BioTek Instruments, Inc.,USA). Цитотоксичност представља концентрацију једињења која инхибира раст ћелија за 50% (IC_{50}) у односу на контролу.

3.5.3 Биосинтеза ергостерола

Испитиван је утицај синтетисаних комплекса сребра(I) и једињења коришћених у њиховој синтези при субинхибиторној концентрацији (0,5 × MIC) на укупну количину ергостерола код *C. albicans* ATCC 10231. Укупна количина ергостерола је одређена спектрофотометријски мерењем апсорбанце између 240 и 300 nm користећи Ultrospec 3300pro након 18 h инкубације на 37 °C на ротационом шејкеру (180 rpm).[126]

3.5.4. Инхибиција филаментације C. albicans ATCC 10231

Испитивано је формирање хифа код *C. albicans* ATCC 10231 соја у присуству субинхибиторних концентрација синтетисаних комплекса сребра(I) и једињења коришћених у њиховој синтези (0,5 × MIC). Ћелије *C. albicans* ATCC 10231 су узгајане у SAB (*Sabouraud*) подлози преко ноћи на 37 °C и испране са стерилним раствором PBS до коначне концентрације од 0,5 × MIC. Суспензија је инкубирана на 37 °C током 72 h.[127] Морфолошке промене *C. albicans* ATCC 10231, које укључују формирање хифа, праћене су коришћењем микроскопа са светлим пољем (Olympus BX51) и увећањем од 20 пута. Као контрола, коришћене су ћелије третиране DMSO растварачем.

3.5.5. Испитивање утицаја комплекса на биофилм Candida сојева

Испитивана је инхибиција формирања и разарање претходно формираног биофилма *Candida* сојева (*C. albicans* ATCC 10231 и *C. parapsilosis* ATCC 22019) у присуству комплекса сребра(I) и одговарајућих азола у полистиренским микротитрационим плочама са 96 бунарића са равним дном, у складу са поступком који је раније описан у литератури.[102,128] Ћелије из културе, узгајане преко ноћи су сакупљене, испране два пута стерилним PBS раствором и ресуспендоване у RPMI 1640 подлози која садржи 2% глукозе (*w*/*v*). Инокулум *C. albicans* ATCC 10231 соја за тестове инхибиције формирања и разарања биофилма је био 1×10^5 cfu/mL, док је вредност инокулума за *C. parapsilosis* ATCC 22019 соj износила 1×10^6 cfu/mL. Почетне концентрације комплекса су 5 μM. Како би се омогућило формирање биофилма, суспензије *Candida* сојева су инкубиране током 48 h на 37 °C. Раст биофилма је анализиран бојењем адхерентних ћелија бојом „*crystal violet"* (CV), при чему је апсорпција на 590 nm измерена на инструменту (Epoch Microplate Spectrophotometar, BioTek Instruents, Inc., USA). Формирани биофилм је инкубиран 24 h у присуству опадајуће концентрације испитиваних једињења. Раст биофилма је квантификован бојењем адхерентних ћелија, при чему је одређена апсорпција на 530 nm (Epoch Microplate Spectrophotometar, BioTek Instruents, Inc.)

3.5.6 Испитивање утицаја комплекса на биофилм S. aureus ATCC 25923

Тест инхибиције биофилма *S. aureus* ATCC 25923 соја је изведен у микротитрационим плочама са 96 бунарића са равним дном. Културе бактерија су узгајане преко ноћи и разблажене до 5×10^7 cfu/mL у Luria-Bertani (LB) подлози. Након тога, 100 μL добијене суспензије је додато у бунариће у присуству испитиваних једињења или DMSO (0.1%, *v*/*v*). Након инкубације 24 h на 37 °C, формирани биофилм је испран стерилним PBS раствором и адхерентне ћелије су бојене CV бојом.

У другом експерименту (дисперзија биофилма), након 24 h инкубације, подлога је уклоњена, ћелије су испране два пута PBS раствором и третиране различитим концентрацијама испитиваних једињења током додатних 24 h. За квантификацију биофилма коришћено је CV бојење.

3.5.7. Испитивање адхеренције

Способност ћелија *C. albicans* SC5314 које експримирају црвени флуоресцентни протеин (RFP, енгл. *red fluorescence protein*) да инфицирају ћелије тумора плућа A549 (добијене из ATCC колекције) проучавана је адхезионим тестом, у складу са методом која је раније описана у литератури.[129,130]

Ћелије A549 су узгајане на покровним стаклима у RPMI 1640 подлози током 48 h, након чега су ко-инкубиране са ћелијама *C. albicans* SC5314 у плочама са бунарићима током 1 h у RPMI 1640 подлози на 37 °C и 5% CO_2. Неадхерентне ћелије *C. albicans* су, након ко-инкубације, уклоњене испирањем. Ћелије A549 су обојене у мраку помоћу 1 μg/mL 2-(4-амидинофенил)-6-индолкарбамидин дихидрохлорида (DAPI) током 10 min. Ћелије A549 и *C. albicans* SC5314-RFP ћелије су анализиране коришћењем флуоресцентног микроскопа (Olympus BX51) са увећањем од 20 пута.

3.5.8 Анализа Хиршфилдових површина

Анализа Хиршфилдових површина (HSA, енгл. *Hirshfeld surface analysis*) коришћена је у циљу анализе и визуелизације интермолекулских интеракција које имају важну улогу у стабилизацији кристалне структуре, применом програма Crystal Explorer 21.5[131] и CIF датотека добијених рендгенском структурном анализом. Ова анализа је укључивала процену нормализоване контактне удаљености (d_{norm}) површина и генерисање 2D графика „отиска прста". Овај параметар генерисан је са стандардном површинском резолуцијом и израчунат према следећој једначини:

$$d_{norm} = \frac{(d_i + r_i^{vdW})}{r_i^{vdW}} + \frac{(d_e - r_e^{vdW})}{r_e^{vdW}}$$

где r_i^{vdW} и r_e^{vdW} представљају Ван дер Валсове радијусе одговарајућих атома унутрашњих и спољашњих у односу на површину.[132] Вредности d_e и d_i представљају мерење растојања између Хиршфилдове површине и најближег атома који се налази са спољашње односно унутрашње стране површине. Параметар d_{norm} се користи за креирање тродимензионалне (3D) Хиршфилдове површине са спектром боја (црвена, бела и плава), са константном скалом у распону од 0,42 Å (црвена) до 1,6 Å (плава). Дводимензионални дијаграми отиска прста, засновани на d_e и d_i растојањима (опсег од 0,6 – 2,6 Å), омогућавају квантификацију међумолекуларних интеракција које доприносе укупној стабилности кристала.

3.5.9. Квантно-механички прорачуни

Геометрије испитиваних комплекса су оптимизоване применом теорије функционала густине (DFT, енг. *Density functional theory*). За **Ag1**, **Ag2** и **Ag5** комплексе, коришћен је ADF[133] програм у Amsterdam Modeling Suite (верзија 2023.104)[134] и апроксимација ZORA (*Zeroth Order Regular Approximation*).[135-137] Солватациони модел COSMO[138,139] који је имплементиран у ADF програму[140] са DMSO растварачем, коришћен је у циљу испитивања утицаја овог растварача на геометрију комплекса. За оптимизацију геометрије комплекса коришћен је функционал BP86-D4.[141-144] За све атоме је коришћен TZP базни скуп, док су фреквенције израчунате на истом нивоу теорије. Вибрациона анализа са корекцијама интерполације ротора на ниској вибрационој фреквенцији,[145,146] коришћена је за процену унутрашњих енергија и ентропијских ефеката Гибсове (*Gibbs*) слободне енергије на 298 K (гранична фреквенција износи 100 cm^{-1}). Примењена је корекција због конверзије стандардног стања (1 atm на 1 mol/dm^3 стандардног стања раствора; 1,89 kcal/mol на слободну енергију на 298 K). За DMSO, извршена је корекција слободне енергије због конверзије у стандардно стање растварача (3,46 kcal/mol, на 298,15 K). Електронске енергије коришћене за израчунавање Гибсове слободне енергије су одређене применом MN15[147] и TPSSh-D4[148,149] мета-хибридних функционала на ZORA-BP86-D4/TZP-COSMO (DMSO) оптимизованим геометријама. За израчунавање електронских енергија коришћен је TZ2P базни скуп за све атоме. За сва израчунавања која користе MN15 функционал коришћена је LibXC библиотека.[150]

За **Ag3**, **Ag4** и **Ag6** – **Ag8** комплексе, примењен је софтверски пакет Gaussian16 у комбинацији са програмом GaussView 6.0.16 за графички приказ структура.[151] Промена Гибсове слободне енергије (ΔG^0) и константи равнотеже *(K*) формирања или дисоцијације комплекса одређене су оптимизацијом геометрија реактаната ($G°_{реактанти}$)

и производа ($G°_{производи}$) применом M06-2X функционала и базног скупа 6-311+G(dp) за све атоме, осим за атом сребра, за који је коришћен базни скуп LANL2TZ(f).[152,153] Модел CPCM (*Conductor-like Poralizable Continuum Model*) коришћен је у циљу испитивања утицаја DMSO растварача на геометрију испитиваних једињења.[154] Примењени солватациони модел веома ефикасно испитује утицај солватације на неутралне и поларизоване молекуле.[155,156]

Промена ΔG^0 је одређена одузимањем збира Гибсових енергија производа ($G°_{производи}$) од збира Гибсових енергија реактаната ($G°_{реактанти}$), које су добијене након оптимизације геометрије испитиваних комплекса:[157]

$$\Delta G^0 = \sum G^0_{products} - \sum G^0_{reactants}$$

Константа равнотеже испитиваних реакција одређена је коришћењем следеће једначине (T = 298,15 K; R = 8,314 J $K^{-1}mol^{-1}$):

$$K = e^{-\frac{\Delta G_0}{RT}}$$

Вибрациони спектри комплекса испитивани су применом анализе расподеле потенцијалне енергије (PED) и софтвера FCART верзије 7.0.[158] Хемијска померања протона испитиваних једињења у ^{1}H NMR спектру одређена су применом методе независне атомске орбитале (GIAO) у DMSO растварачу.[159] UV-Vis спектри испитиваних једињења добијени су коришћењем теорије функционала густине зависне од времена (TD-DFT) у DMSO.[160] Критичне тачке везе (BCPs, енгл. *Bond Critical Points*) комплекса **Ag6** – **Ag8** одређене су применом анализе Квантне теорије атома у молекулима (QTAIM) коришћењем софтверског пакета Multiwfn.[161]

3.5.10. Молекулски докинг

Софтверски програм AutoDock 4.0 је коришћен за одређивање интеракција између испитиваних комплекса сребра(I) и циљног ензима (два изомера цитохром P450 стерол 14α-деметилазе CYP130 и CYP51B).[162] Тродимензионална кристална структура CYP450 је добијена из RCSB Protein Data Bank у PDB формату.[163,164] Софтверски програм Discovery Studio 4.0 је коришћен за визуелизацију и анализу интеракција лиганда и протеина.[165] Вода и други молекули који ко-кристалишу су уклоњени током процеса припреме протеина. Молекул протопорфирина IX који садржи Fe (HEM580) се задржава у структури протеина због кључне улоге у каталитичкој активности и потенцијалних интеракција са испитиваним једињењима.

AutoDock софтвер користи семи-емпиријско поље за процену конформација током симулација у циљу одређивања термодинамичких параметара између испитиваних једињења и протеина.[166] Термодинамички параметар (ΔG_{bind}) представља слободну енергију везивања и односи се на енергију ослобођену током интеракције између испитиваних једињења и аминокиселинских остатака протеина. AutoDock софтвер израчунава ову вредност на основу следеће једначине:

$$\Delta G_{bind} = \Delta G_{inter} + \Delta G_{total} + \Delta G_{tor} - \Delta G_{unb}$$

где је ΔG_{tor} слободна торзиона енергија, ΔG_{total} укупна унутрашња енергија, ΔG_{unb} слободна енергија у систему и ΔG_{inter} интермолекулска енергија која представља збир енергије дисперзије и одбијања (ΔG_{vdw}), енергије водоничне везе (ΔG_{hbond}), енергије растварања (ΔG_{desolv}) и електростатичке енергије (ΔG_{elec}).[167]

$$\Delta G_{inter} = \Delta G_{vdW+hbond+desolv} + \Delta G_{elec}$$

Други значајан термодинамички параметар је константа инхибиције (K_i). AutoDock програм израчунава ове вредности проценом ΔG_{bind} помоћу једначине:

$$\Delta G_{bind} = RT\ln(K_i)$$

где је R гасна константа (R = 1,99 cal/molK), а T апсолутна температура (298,15 K).[168] Ова једначина може се математички трансформисати да би се добила једначина која се користи за израчунавање константе инхибиције:

$$K_i = e^{\frac{\Delta G_{bind}}{RT}}$$

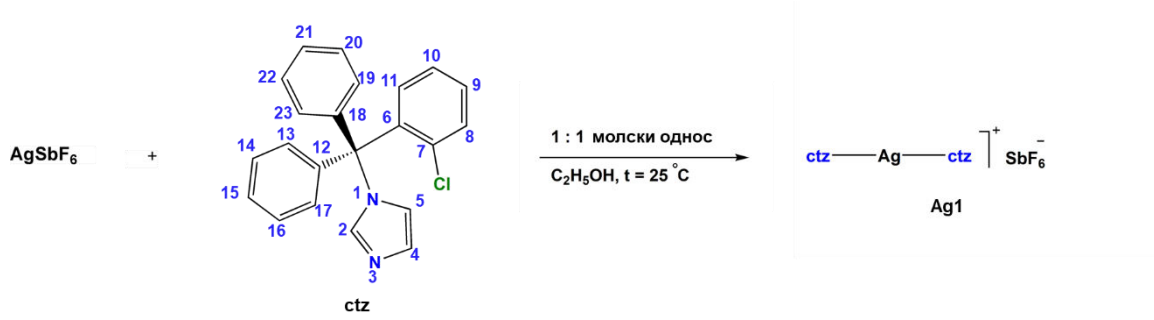
3.5.11. Статистички прорачуни

Статистичка анализа је одређена упоређивањем средњих вредности ± стандардне девијације (SD) између експерименталних и контролних група применом *t*-теста (Two-Sample Assuming Equal Variances) и анализе One-way ANalysis of VAriance (ANOVA, Single Factor) са Фишеровим тестом (Fisher's Least Significant Difference (LSD) *post-hoc* test). Вредност вероватноће, $p \leq 0{,}05$, статистички је значајна. Анализа статистичких података је урађена помоћу Microsoft Excel Spreadsheet софтвера.

4. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

4.1. Синтеза, карактеризација и антимикробна активност комплекса сребра(I) са клотримазолом[1]

Комплекс $[Ag(ctz)_2]SbF_6$ (**Ag1**) (ctz је клотримазол) добијен је у реакцији сребро(I)-хексафлуороантимоната(V) са клотримазолом у 1 : 1 молском односу у етанолу на собној температури у одсуству светлости (Слика 17).[118] Кристали комплекса су добијени прекристализацијом белог талога из реакције у смеши ацетонитрил/етанол (*v*/*v* 1 : 1) и упаравањем добијеног раствора на собној температури у мраку.

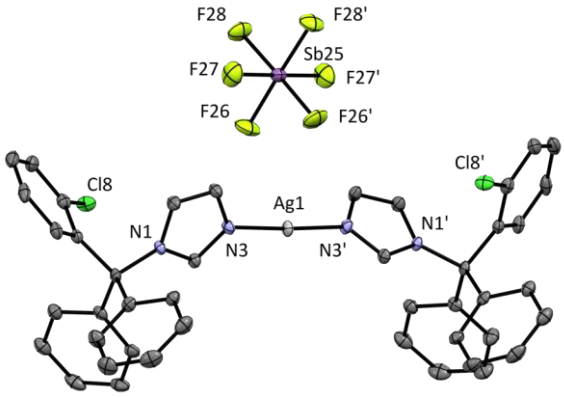


Слика 17. Шематски приказ реакције за синтезу **Ag1** комплекса. Нумерација атома у клотримазолу је коришћена за ^{1}H NMR спектроскопску карактеризацију

4.1.1. Опис кристалне структуре Ag1 комплекса

У комплексу **Ag1**, два ctz лиганда су монодентатно координована за сребро(I) јон преко имидазоловог атома азота N3 (Слика 18).[118] На овај начин, настаје комплексни катјон линеарне геометрије, који је неутралисан SbF_6^- јоном, који се налази у спољашњој координационој сфери. Начин координације клотримазола за сребро(I) јон је у складу са координацијом итраконазола (icz), који координацијом за овај јон метала даје линеаран $[Ag(icz)_2]NO_3{\cdot}H_2O$ комплекс (Слика 14).[105] У односу на комплекс са icz лигандом, везе Ag–N су незнатно краће у **Ag1** комплексу и износе 2,090(3) Å. У структури **Ag1** комплекса може се приметити електронска густина на приближно 1,6 Å од атома угљеника C14, што одговара могућој удаљености C_{ar}–Cl, због чега је атом хлора моделован тако да буде неуређен (везан за C8 и C14 у односу 92% : 8%, респективно).

[1]Резултати овог истраживања су објављени у раду M. Stanković et al., Dalton Trans., 53 (2024) 2218-2230.



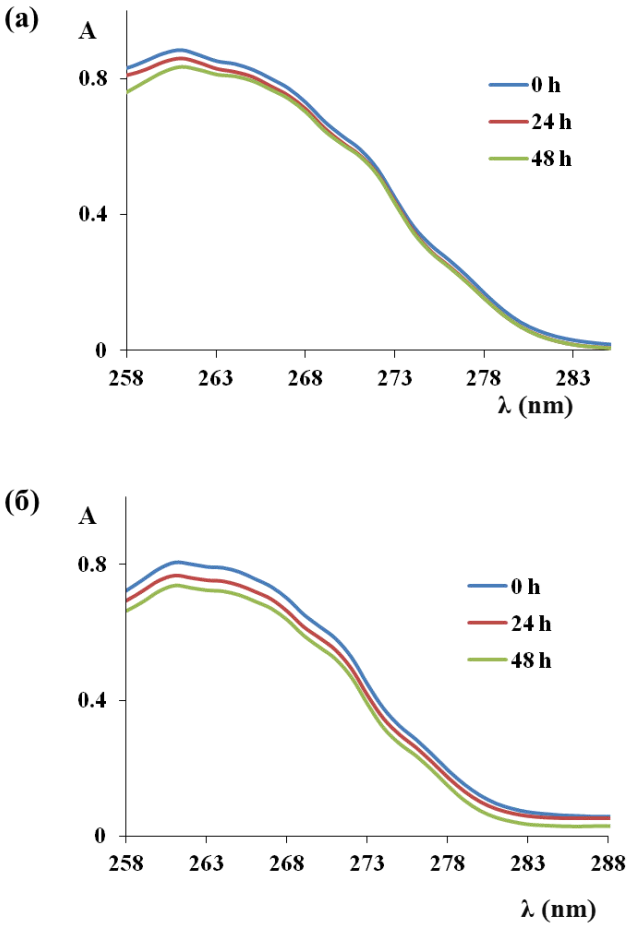
Слика 18. Кристална структура комплекса **Ag1**. Термички елипсоиди су дати на нивоу вероватноће од 35%. Атоми водоника су изостављени као и неуређеност атома хлора Cl8. Дужине веза и углови између веза (°): Ag1–N3=2,090(3) Å, N3–Ag1–N3' = 177,3°

Претраживањем кристалографске базе CSD (*Cambridge Structural Database*; WebCSD),[169] утврђено је да је укупно 21 комплекс метала са клотримазолом окарактерисан применом рендгенске структурне анализе (6 комплекса бакра(II), 5 комплекса рутенијума(II), 3 комплекса цинка(II), 2 комплекса злата(III) и по један комплекс платине(II), паладијума(II), родијума(III), мангана(II) и кадмијума(II)). Поред тога, недавно је публикована кристална структура *fac*-трикарбонилренијум(I) комплекса, који садржи два различита лиганда, монодентатно координован клотримазол и бидентатно координован 2,2'-бипиридин.[170]

4.1.2. Спектроскопска карактеризација

IR спектар **Ag1** комплекса у складу је са његовом структуром одређеном рендгенском структурном анализом.[118] Овај спектар садржи траке које потичу од карактеристичних вибрација координованог клотримазола, као и траке које потичу од SbF_6^- контра-анјона. У складу са тим, веома интензивна трака на 655 cm^{-1} у IR спектру **Ag1** комплекса одговара некоординованом SbF_6^- анјону,[171] што је у сагласности са IR спектроскопским подацима за претходно описани $[Ag(1,7\text{-phen})_2]SbF_6$ комплекс (1,7-phen је монодентатно координован 1,7-фенантролин).[172] Поред тога, траке на ~3100-3000 cm^{-1} потичу од C_{ar}–H валенционих вибрација,[173] док траке у опсегу од 1618 до 1406 cm^{-1} одговарају вибрацијама ароматичних прстенова ($\nu(C_{ar}=C_{ar})$ и $\nu(C=N)$).[174]

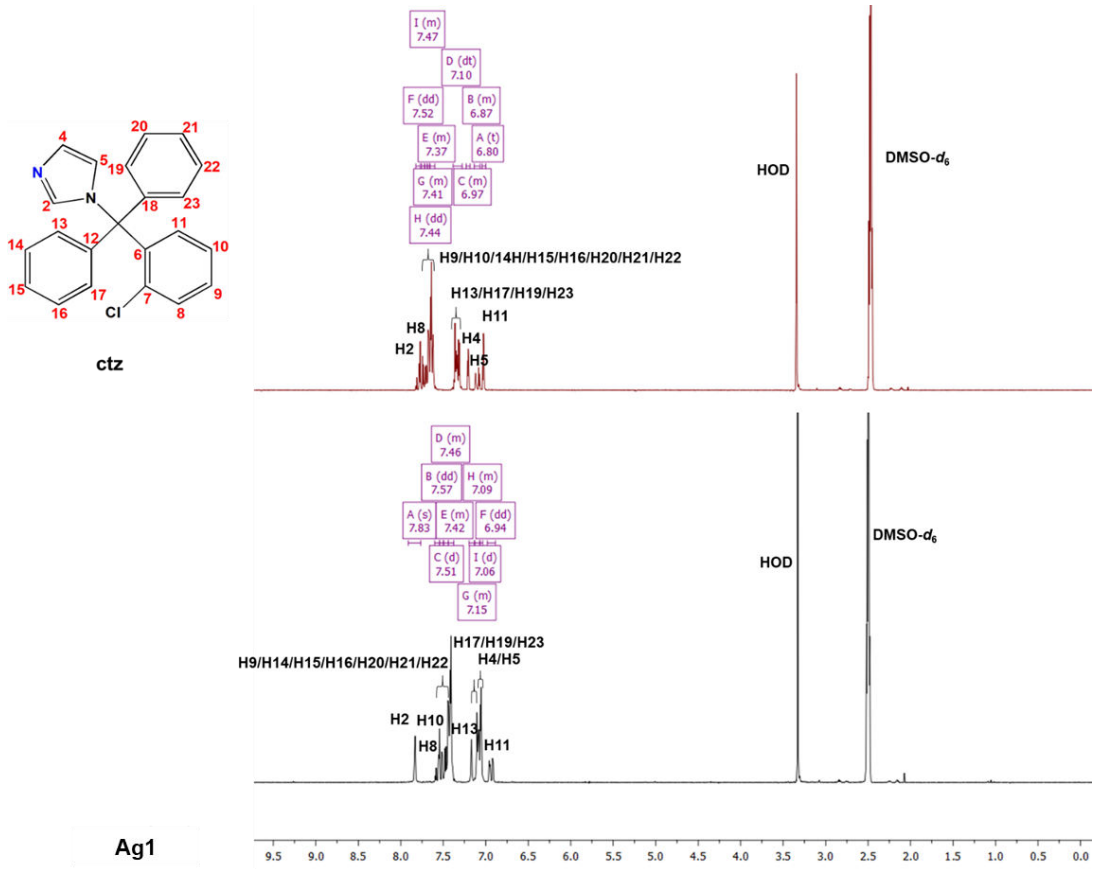
UV-Vis спектар комплекса **Ag1** је снимљен у DMSO на собној температури (Слика 19а) .[118] Због сличности у облику UV-Vis спектара комплекса сребра(I) и клотримазола, може се закључити да апсорпциони максимум комплекса на 260 nm потиче од прелаза унутар лиганада. Ово је у сагласности са UV-Vis спектроскопским особинама претходно публикованих комплекса сребра(I) са различитим азот- и сумпор-донор лигандима.[175,176] Апсорпциони максимум **Ag1** комплекса показује батохромно (црвено) померање у односу на апсорпциони максимум клотримазола (λ_{max} = 255 nm). UV-Vis спектри комплекса су, такође, снимљени 24 и 48 h након растварања у DMSO и смеши DMSO/PBS (*v/v* 7 : 3; Слика 19б).



Слика 19. UV-Vis спектри **Ag1** комплекса снимљени у DMSO (**а**) и DMSO/PBS (*v/v* 7 : 3, **б**) на собној температури у различитим временским интервалима

Нису уочене значајне промене између почетног UV-Vis спектра и спектра снимљеног после 48 h, осим незнатног смањења интензитета апсорпционог максимума (Слика 19). На основу тога се може закључити да клотримазол остаје координован за јон сребра(I) у раствору. Упркос томе, може се претпоставити да ће се јон сребра(I) ослободити из $[Ag(ctz)_2]^+$ јона при физиолошким условима у присуству протеина и других ћелијских биомолекула, јер су интеракције између овог јона метала и биомолекула одговорне за његову антимикробну активност.[177]

^{1}H NMR спектар комплекса **Ag1** је снимљен у DMSO-d_6 (Слика 20) и анализиран на основу одговарајућих података за клотримазол чији је ^{1}H NMR спектар претходно снимљен.[174] Већина сигнала за координовани клотримазол у **Ag1** комплексу је померена ка нижем пољу (веће вредности хемијског померања) у односу на одговарајуће сигнале некоординованог лиганда. У неким случајевима $\Delta(^1H)_{coord}$ координациона померања сигнала (одређени у односу на померања за клотримазол у DMSO-d_6) нису значајна, што је очекивана NMR спектроскопска особина сребро(I) комплекса у DMSO-d_6.[178,179] Хемијска померања сигнала, у великој мери, зависе од положаја одговарајућег протона у односу на азот, који је координован за сребро(I) јон. Највеће хемијско померање од +0,31 ppm је уочено за протон који је суседан координованом атому азота, C2H.

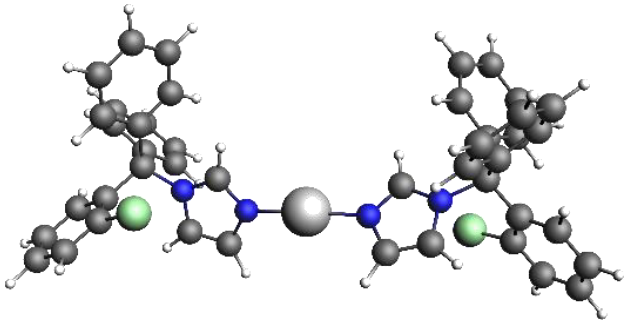


Слика 20. ^{1}H NMR спектри комплекса **Ag1** и клотримазола у DMSO-d_6 на собној температури и 200 MHz

Масени спектар за **Ag1** комплекс додатно потврђује координацију клотримазола за сребро(I) јон у раствору.

4.1.3. DFT прорачуни

Применом DFT прорачуна претпостављена је термодинамички најповољнија структура **Ag1** комплекса у DMSO раствору.[118] Полазећи од структуре која је одређена применом рендгенске структурне анализе, извршена је оптимизација геометрије комплекса на ZORA-BP86-D4/TZP-COSMO (DMSO) нивоу теорије. Енергије електрона коришћене за прорачун Гибсове слободне енергије испитиваних комплексних врста одређене су помоћу две теоријске методе, ZORA-MN15/TZ2P-COSMO (DMSO) и ZORA-TPSSh-D4/TZ2P-COSMO (DMSO), а добијени резултати су дати на слици 21. Може се закључити да је **Ag1** комплекс стабилан у DMSO, задржавајући своју линеарну геометрију уз монодентатно координована два ctz лиганда (Слика 21).

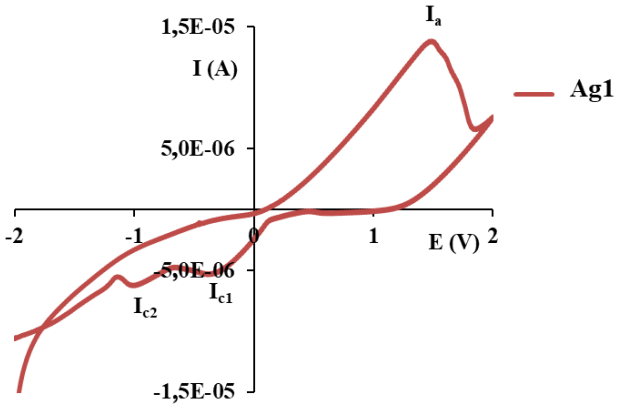


Реакција	MN15/TZ2P	TPSSh-D4/TZ2P
$[Ag(ctz)_2]^+ + 2DMSO \rightleftharpoons [Ag(DMSO)_2]^+ + 2ctz$	+11,2	+14,4

Слика 21. Структура $[Ag(ctz)_2]^+$ комплексног катјона оптимизована на ZORA-BP86-D4/TZP-COSMO(DMSO) нивоу теорије. Промена слободне Гибсове енергије (kJ/mol) на ZORA-MN15/TZ2P-COSMO (DMSO)/ZORA-BP86-D4/TZP-COSMO(DMSO) и ZORA-TPSSh-D4/TZ2P-COSMO (DMSO)/ZORA-BP86-D4/TZP-COSMO(DMSO) нивоима теорије за реакцију супституције ctz лиганада молекулом растварача

4.1.4 Електрохемијско понашање

У циљу бољег разумевања стабилности и биолошке активности једињења, веома је важно испитати његове редокс особине. Циклична волтаметрија одређује потенцијал при којем једињење може бити редуковано и/или оксидовано.[180] Циклични волтамограм **Ag1** комплекса је снимљен на стакластом угљенику (GC електрода) у DMSO и 0,1 M TBAHP као помоћном електролиту при следећим условима, $E_{\text{почетно}} = -2{,}0$ V, $E_{\text{крајње}} = 2{,}0$ V, брзина скенирања = 50 mV/s (Слика 22).[118] У волтамограму комплекса може се уочити један оксидациони пик I_a на 1,47 V, што се може приписати процесу оксидације сребро(I) јона у сребро(II) у складу са литературним подацима за редокс активне комплексе сребра(I).[102,181,182] С друге стране, у катодном смеру се могу приметити два редукциона пика $I_{c,1}$ и $I_{c,2}$ на −0,40 и −1,04 V (Слика 22), који се могу приписати процесима редукције сребро(II) → сребро(I) и сребро(I) → сребро(0), респективно.[102,181,182] Важно је напоменути да сребро може показати биолошку активност у свим оксидационим стањима.[183-185]



Слика 22. Циклични волтамограм за **Ag1** комплекс снимљен на GC електроди у DMSO и 0,1 M TBAHP као помоћни електролит при брзини скенирања 50 mV/s

4.1.5. Испитивање антимикробне и цитотоксичне активности Ag1 комплекса

Као што је поменуто у Општем делу докторске дисертације, комплекси сребра(I) показују значајну антимикробну активност, док су недавна истраживања, такође, указала на њихов цитотоксични и генотоксични потенцијал према нормалним и туморским ћелијама.[186,187] У поређењу са простим солима сребра(I), комплекси сребра(I) са органским лигандима показују разноврснија хемијска својства.[186] Поред тога, примена простих соли сребра(I) је ограничена због њихове брзе дисоцијације, која при физиолошким условима доводи до таложења сребро(I)-хлорида, чиме се спречава антимикробно деловање јона сребра(I).[177]

Да би се утврдио утицај јона сребра(I) на антимикробну активност **Ag1** комплекса, добијени резултати биолошких испитивања овог комплекса поређени са одговарајућим резултатима за клотримазол (Табела 5).[118] Комплекс **Ag1** показује значајну антигљивичну и умерену антибактеријску активност. У поређењу са некоординованим клотримазолом, овај комплекс показује 9 пута (*C. glabrata*), 22 пута (*C. albicans*), 47 пута (*C. krusei*) и 1020 пута (*C. parapsilosis*) већу активност у односу на клотримазол (Табела 5).

Табела 5. Антимикробна активност (MIC, μM) **Ag1** комплекса, клотримазола и $AgSbF_6$ према испитиваним *Candida* и бактеријским сојевима у поређењу са њиховом цитотоксичном активношћу (IC_{50}, μM)[a]

	Ag1	ctz	$AgSbF_6$
C. albicans ATCC 10231	0,12 ± 0,03	2,60 ± 0,15	3,64 ± 0,20
C. parapsilosis ATCC 22019	0,01 ± 0,001	10,20 ± 0,28	0,09 ± 0,01
C. krusei ATCC 6258	0,03 ± 0,01	1,40 ± 0,09	4,66 ± 0,19
C. glabrata ATCC 2001	0,97 ± 0,06	9,10 ± 0,19	2,33 ± 0,07
P. aeruginosa NCTC 10332	12,1 ± 0,22	>500	36,38 ± 0,11
E. coli NCTC 2001	12,1 ± 0,17	>500	18,19 ± 0,15
S. aureus ATCC 25923	2,61 ± 0,20	290,00 ± 0,02	36,38 ± 0,07
L. monocytogenes NCTC 11994	12,1 ± 0,27	>500	36,38 ± 0,22
MRC-5 ћелије	16,0 ± 0,9	8,7 ± 0,4	18,3 ± 0,3

[a]IC_{50} је концентрација једињења, која инхибира 50% раста ћелија након 48 h.

Добијени резултати су у складу са резултатима за $[Ag(icz)_2]NO_3 \cdot H_2O$ комплекс, који је 2,3 и 4,5 пута активнији од icz према *C. albicans* и *C. glabrata*, респективно.[105] Вредности MIC (μM) за $AgSbF_6$ су, такође, наведене у табели 5. Иако су ове вредности упоредиве са одговарајућим вредностима за клотримазол и сребро(I) комплекс, потенцијална примена ове соли је ограничена услед брзе дисоцијације и формирања талога AgCl, као што је већ наведено.[177]

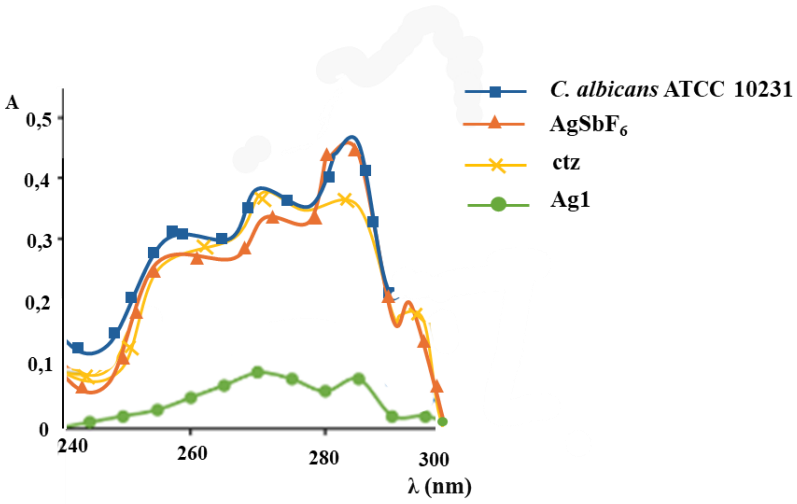
Координација различитих органских лиганада за јон сребра(I) доводи до формирања различитих комплекса који показују значајну антибактеријску активност.[116,177,188] У поређењу са клотримазолом, **Ag1** комплекс показује значајно већу антибактеријску активност према свим испитиваним сојевима у опсегу од 2,61 – 12,1 μM (Табела 5). Овај комплекс показује највећу активност према Грам-позитивној *S. aureus* бактерији, при чему је MIC вредност 2,61 μM. Важно да је напоменути да и клотримазол показује активност само према овој од свих испитиваних бактеријских сојева.

На основу IC_{50} вредности приказаних у табели 5 може се закључити да **Ag1** комплекс има повољнији профил токсичности у односу на клотримазол (комплекс је 1,8 пута мање токсичан од азола). Израчунат је индекс селективности (SI) за **Ag1** комплекс и ctz дељењем IC_{50} са MIC вредношћу (Табела 6). Вредности SI за комплекс на испитиваним *Candida* сојевима су у распону од 1600 (за *C. parapsilosis*) до 16,5 (за *C. glabrata*). Примера ради, SI вредност за клинички коришћени сребро(I)-сулфадиазин износи 4 према *C. parapsilosis* и *C. krusei*.[189]

Табела 6. Вредности индекса селективности (SI) за **Ag1** комплекс, клотримазол и $AgSbF_6$ према испитиваним *Candida* сојевима

Испитивани сојеви Једињење	*C. albicans* ATCC 10231	*C. parapsilosis* ATCC 22019	*C. krusei* ATCC 6258	*C. glabrata* ATCC 2001
Ag1	133,3	1600	533,3	16,5
клотримазол (ctz)	3,3	0,8	6,2	1,0
$AgSbF_6$	5,0	203,3	3,9	7,8

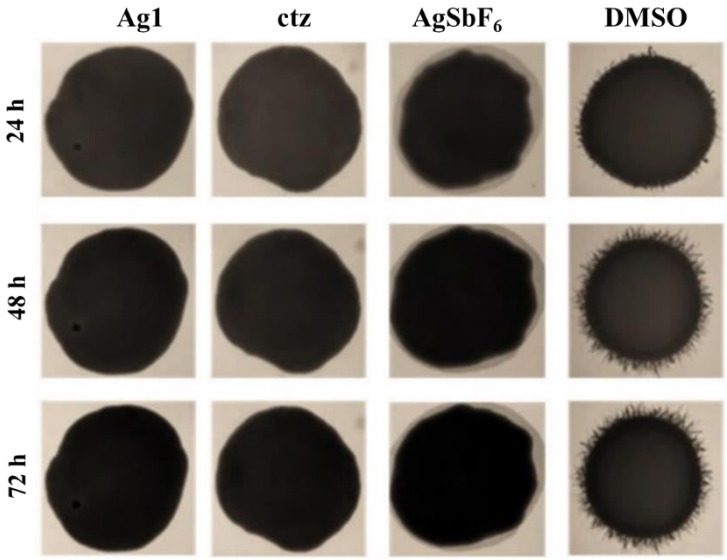
С обзиром да клинички коришћени азоли утичу на биосинтезу ергостерола инхибирањем цитохрома P450,[190] испитиван је ефекат **Ag1** комплекса, клотримазола и $AgSbF_6$ на овај процес (Слика 23).[118] Као што се може видети, **Ag1** комплекс значајно смањује количину ергостерола, док ctz и $AgSbF_6$ само незнатно утичу на њу. На основу овога, може се закључити да антигљивична активност овог комплекса може довести у везу са инхибицијом биосинтезе ергостерола.



Слика 23. Количина ергостерола за сој *C. albicans* ATCC 10231 у присуству 0,5 × MIC комплекса **Ag1**, ctz и $AgSbF_6$ одређена применом UV-Vis спектрофотометрије у опсегу таласних дужина од 240 до 300 nm

4.1.6. Тест филаментације C. albicans ATCC 10231 соја

Морфолошка трансформација из квасца у форму хифе за *C. albicans* гљивицу представља један од важних аспеката њене патогенезе.[191] Недавно је утврђено да присуство различитих комплекса сребра(I) може инхибирати ћелијску диференцијацију *Candida* гљивица.[192] У складу са тим, испитиван је ефекат субинхибиторних концентрација (0,5 × MIC) **Ag1** комплекса, ctz и $AgSbF_6$ на формирање хифа *C. albicans* соја (Слика 24).[118] Сва испитивана једињења у потпуности инхибирају формирање хифа у чврстој подлози, чак и током дужег излагања до 72 h.



Слика 24. Утицај субинхибиторних концентрација (0,5 × MIC) **Ag1** комплекса, ctz и $AgSbF_6$ на формирање хифа *C. albicans* ATCC 10231 соја после 24, 48 и 72 h у поређењу са DMSO контролом

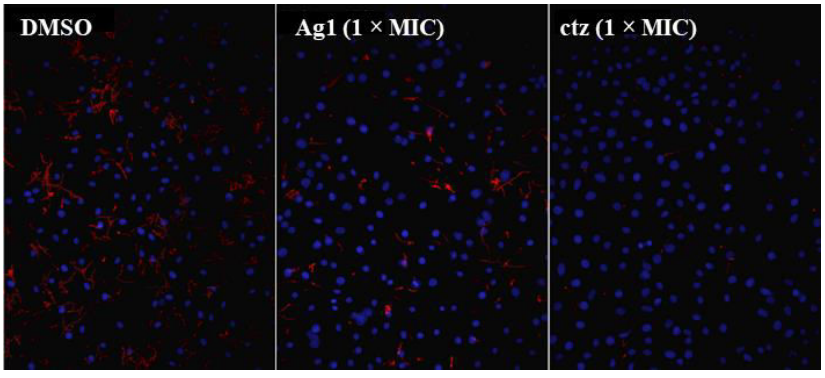
4.1.7. Утицај на биофилм C. albicans ATCC 10231 соја

Трансформација квасца у хифе представља важан процес током гљивичне инфекције и иницијална је фаза у формирању биофилма *Candida* гљивица.[193] Комплекс **Ag1** инхибира формирање биофилма *C. albicans* ATCC 10231 соја при 0,5 × MIC за 86%. У поређењу са ctz (79%), инхибиција формирања биофилма је повећана за одговарајући комплекс, указујући на позитиван утицај јона сребра(I).[118] С друге стране, ни једно од испитиваних једињења није утицало на већ формирани биофилм *C. albicans* ATCC 10231 соја.

4.1.8. Тест адхеренције

У циљу детаљнијег изучавања ефекта **Ag1** комплекса на патогенезу *Candida* гљивица, испитиван је његов утицај на адхеренцију *C. albicans* на A549 туморске ћелије (Слика 25). Ове ћелије су подложне инфекцији, јер показују прекомерну експресију муцина и коришћене су као модели у проучавању бактеријских и гљивичних инфекција.[194-196]

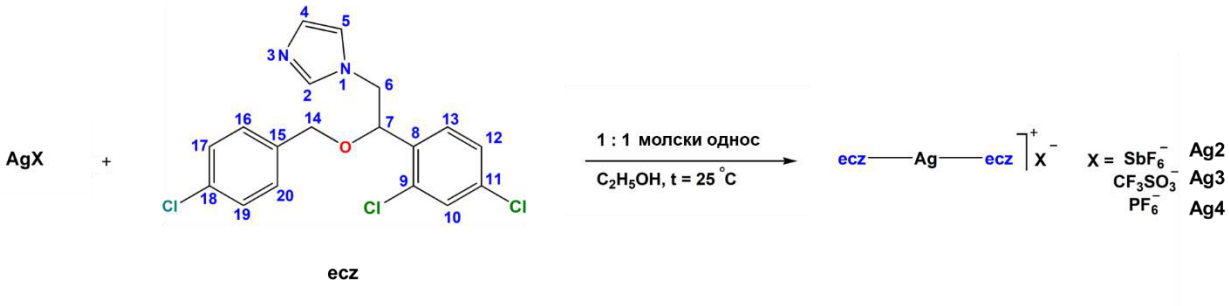
Као што се на слици 25 може приметити, у DMSO контроли јасно су видљиве ћелије *C. albicans* у филаментозној форми, везане за монослој A549 ћелија. Упоредива, али нешто мање изражена филаментозна адхезија *C. albicans* SC5314-RPF уочена је у присуству комплекса **Ag1**, док је најизраженије смањење адхезије *C. albicans* SC5314-RPF ћелија примећено у присуству клотримазола (Слика 25).[118] Приметно мања и светлија језгра су примећена на A549 моносло ју у присуству **Ag1** комплекса, након бојења са DAPI једињењем (DAPI је 2-(4-амидинофенил)-6-индолкарбамидин дихидрохлорид). Ово је индикација да A549 ћелије нису биле живе пре фиксације, пошто се DAPI обично користи за анализу морфолошких промена у једру, као што је кондензација хромозома у апоптотичким ћелијама. Концентрација **Ag1** комплекса у тесту адхеренције била је преко 100 пута мања од IC_{50} вредности одређене на MIC-5 ћелијама, што указује на већу осетљивост туморских ћелија према овом комплексу и истиче да би се он могао даље тестирати као антитуморски агенс. Важно је нагласити да су једињења која истовремено показују различите врсте биолошких активности (антитуморску, антигљивичну, антибактеријску) посебно интересантна, јер хемотерапија обично слаби имуни систем организма, због чега је неопходна заштита од инфекција.[197,198]



Слика 25. Инфекција A549 туморских ћелија плућа (плаво обојена једра) *C. albicans* SC5314-RPF ћелијама (црвено обојење) у присуству DMSO, **Ag1** комплекса и ctz при MIC вредностима (увећање 20 пута)

4.2. Синтеза, карактеризација и биолошка активност комплекса сребра(I) са еконазолом[2]

У другом делу докторске дисертације, синтетисана су три комплекса сребра(I) са еконазолом (ecz), $[Ag(ecz)_2]SbF_6$ (**Ag2**), $[Ag(ecz)_2]CF_3SO_3$ (**Ag3**) и $[Ag(ecz)_2]PF_6$ (**Ag4**) у складу са поступком описаним у Експерименталном делу (поглавље 3.3.2. и Слика 26).[118,120] За карактеризацију ових комплекса примењена је елементна микроанализа, масена спектрометрија, ^{1}H NMR, UV-Vis и IR спектроскопија, циклична волтаметрија и DTF прорачуни, док су структуре **Ag2** и **Ag4** комплекса потврђене применом рендгенске структурне анализе.

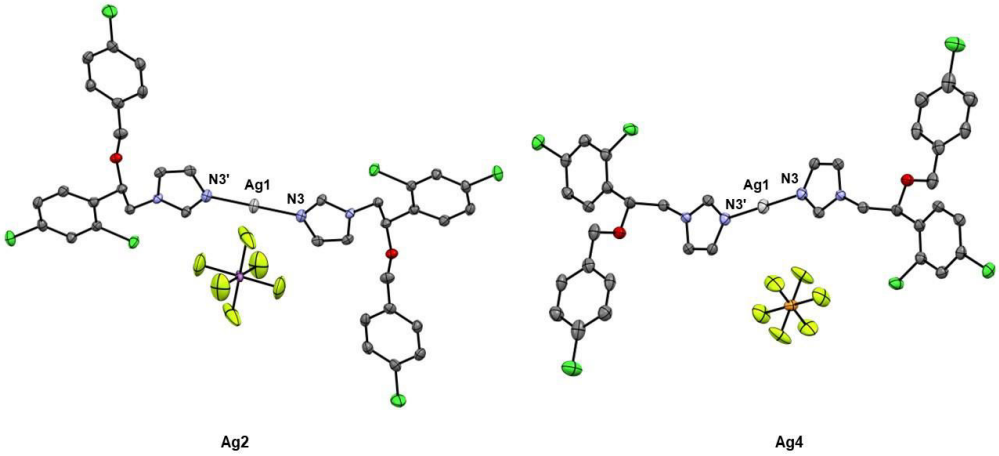


Слика 26. Шематски приказ реакције за синтезу комплекса **Ag2** – **Ag4**. Нумерација атома у еконазолу је коришћена за ^{1}H NMR спектроскопску карактеризацију комплекса

4.2.1. Опис кристалних структура

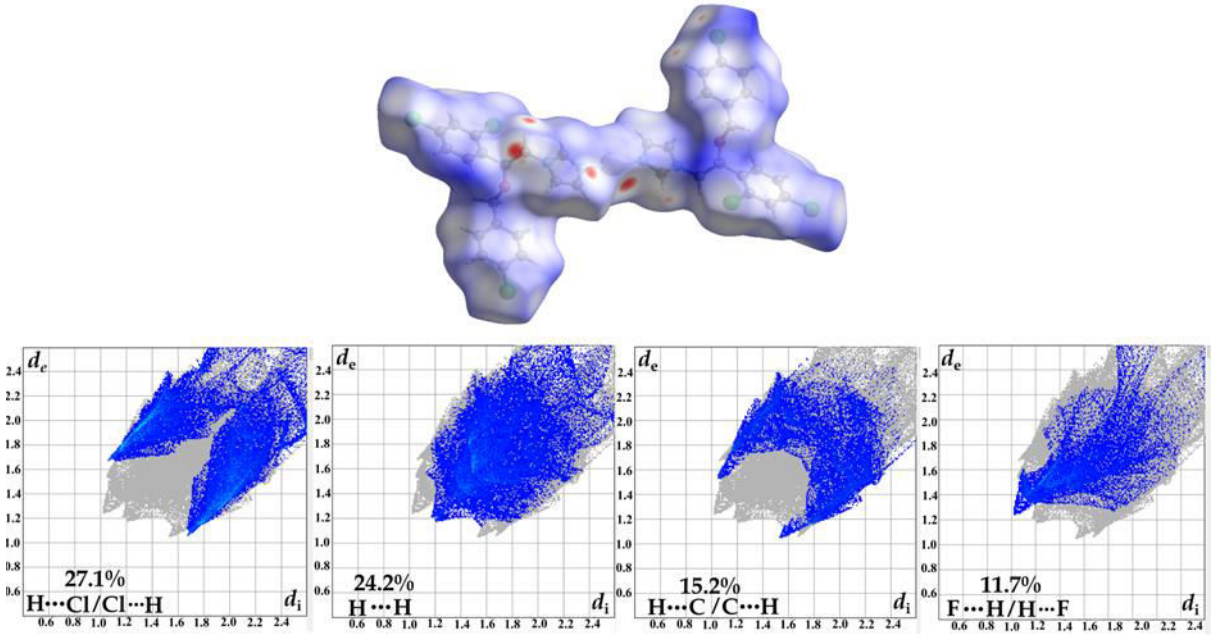
У комплексима **Ag2** и **Ag4**, два ecz лиганда су координована монодентатно за јон сребра(I) преко имидазоловог атома азота N3, формирајући $[Ag(ecz)_2]^+$ комплексни катјон (Слика 27).[118,120] У спољашњој координационој сфери **Ag2** налази се SbF_6^- контра-анјон, док је PF_6^- уграђен у кристалну решетку **Ag4** комплекса. Два атома азота из два ecz лиганда су подједнако удаљена од јона сребра(I), (*d*(Ag1–N3) = 2,089(4) Å за **Ag2** и *d*(Ag1–N3) = 2,083(4) Å за **Ag4**), који има идеалну линеарну геометрију (N3−Ag1−N3' = 180°).

[2]Резултати овог истраживања су објављени у радовима M. Stanković et al., Dalton Trans., 53 (2024) 2218-2230. и M. Stanković et al., J. Mol. Struct., 1321 (2025) 140118.



Слика 27. Кристалне структуре комплекса **Ag2** и **Ag4**. Термички елипсоиди су дати на нивоу вероватноће од 50%. Због јаснијег представљања нису приказани атоми водоника

Анализа Хиршфилдових површина је урађена у циљу квантификације интеракција које доприносе укупној стабилности кристалне структуре **Ag4** комплекса.[120] Резултати нормализоване удаљености (d_{norm}) заједно са 2D графика „отиска прста" за овај комплекс приказани су на слици 28. Црвене области одговарају краћим интеракцијама између атома акцептора и донора, које су окарактерисане негативном d_{norm} вредношћу, која означава растојање краће од ван дер Валсових (*van der Waals*; vdW) пречника. С друге стране, плаве области одговарају интеракцијама које су дуже од збира ван дер Валсових пречника и имају позитивну d_{norm} вредност. Беле области означавају контакте где су растојања једнака збиру ван дер Валсових пречника и имају d_{norm} вредност нула.



Слика 28. 3D Хиршфилдове површине и 2D графици „отиска прста" са процентуалном заступљеношћу интеракција у кристалној структури **Ag4** комплекса

Један од примарних фактора одговорних за стабилизацију кристалне структуре **Ag4** комплекса је присуство H···H, H···Cl и C···H интеракција. На стабилизацију кристалног паковања овог комплекса значајно утичу H···Cl/Cl···H интеракције (27,1%; Слика 28). Интеракције H···H имају важну улогу у одржавању стабилности кристалног паковања комплекса (24,2%), док C···H/H···C интеракције доприносе 15,2%. Поред тога, максимуми 2D графика „отиска прста" су благо заобљени због ефекта хиперконјугације. Примећено је и присуство F···H/H···F интеракција (11,7%), док се минимални утицај нековалентних C···C интеракција може приписати недостатку нековалентних π-π интеракција који стабилизују структуру.

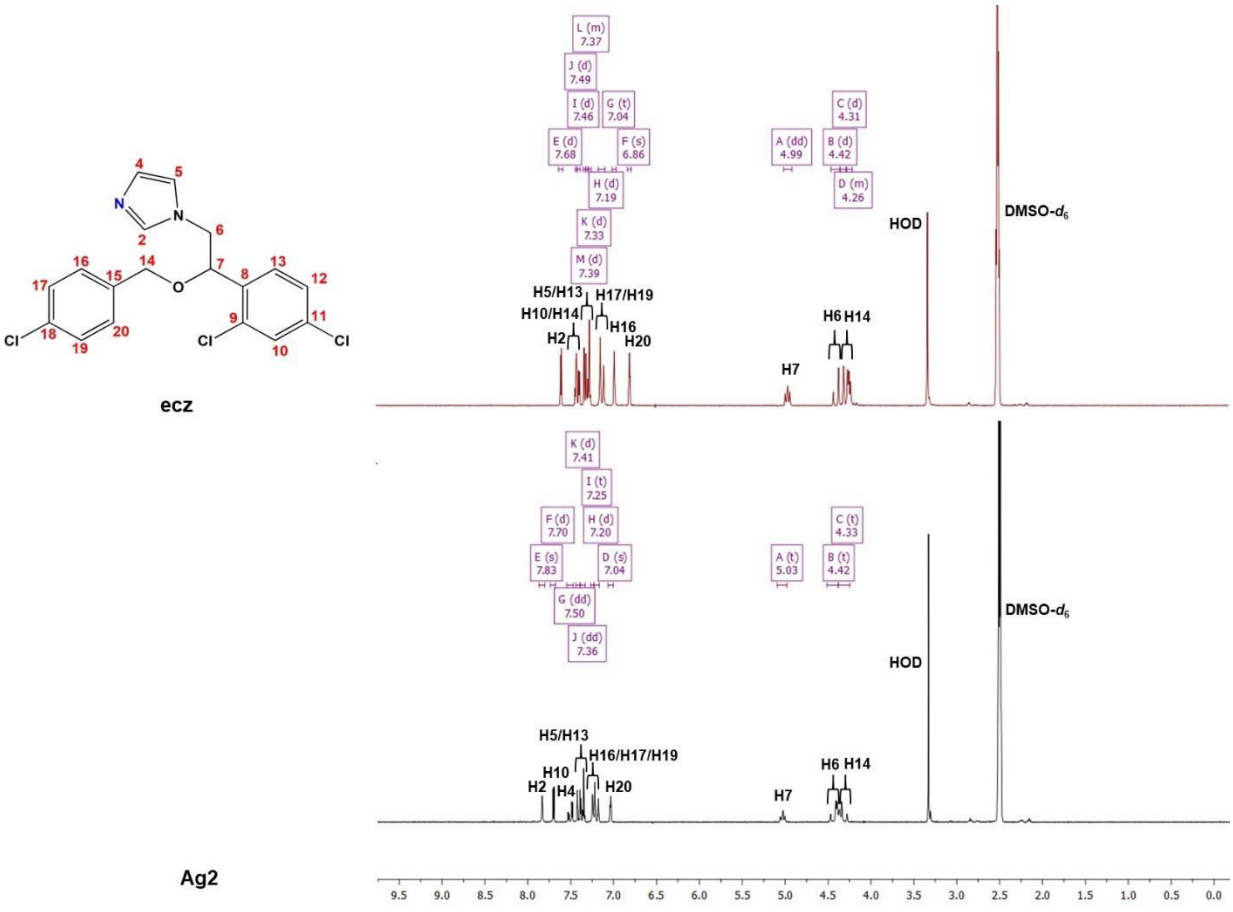
4.2.2. Спектроскопска карактеризација

У IR спектрима комплекса **Ag2** – **Ag4** уочавају се траке од вибрација координованог еконазола[199] и одговарајућег контра-анјона.[171,200-202] У IR спектру **Ag2** комплекса уочава се веома интензивна трака на 656 cm^{-1}, што је у складу са чињеницом да се SbF_6^- анјон налази у спољашњој координационој сфери комплекса.[171] Такође, веома интензивне траке које потичу од асиметричних и симетричних валенционих вибрација – SO_3 група трифлата присутне су на 1262 и 1032 cm^{-1} у IR спектру комплекса **Ag3**, што потврђује присуство овог анјона у спољашњој координационој сфери комплекса.[200,201] За комплекс **Ag4**, може се видети веома интензивна трака на 831 cm^{-1} која потиче од валенционих вибрација PF_6^- контра-анјона, што је у складу са IR спектроскопским подацима за динуклеарни $[Ag_2(1,8\text{-naph})_2(H_2O)_{1,2}](PF_6)_2$ комплекс (1,8-naph је 1,8-нафтиридин).[201]

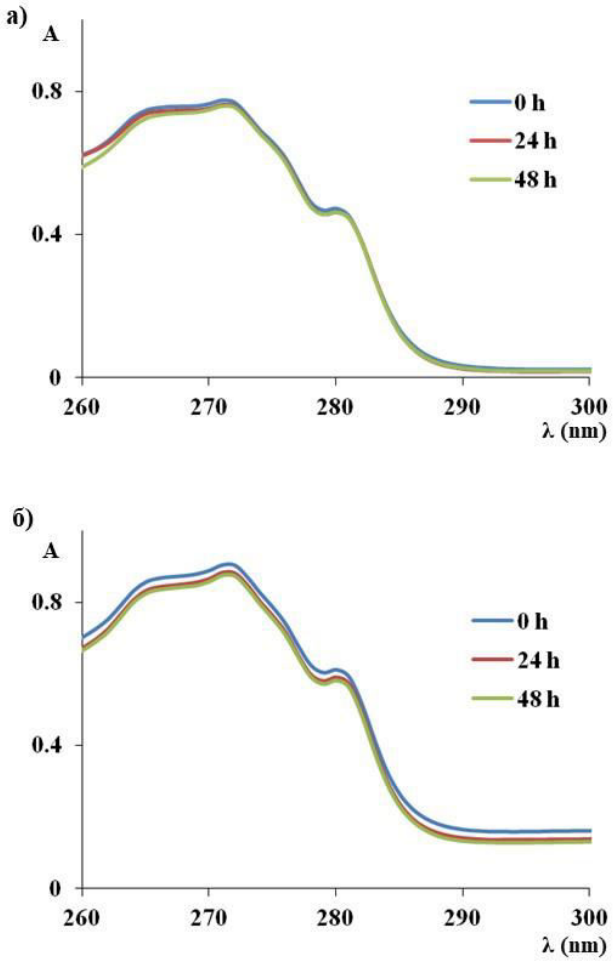
Упоредни ^{1}H NMR спектри **Ag2** комплекса и ecz лиганда, снимљени у DMSO-d_6 на собној температури, приказани су на слици 29, док су одговарајући ^{1}H NMR спектроскопски подаци наведени у Експерименталном делу дисертације (поглавље 3.3.2).[118,120] У већини случајева, ^{1}H NMR сигнали за координовани ecz у комплексима **Ag2** – **Ag4** померени су ка нижем пољу у односу на одговарајуће сигнале за слободни лиганд. Најзначајније померање од +0,18 ppm (за **Ag2**) и +0,20 ppm (за **Ag3** и **Ag4**) уочено је за C4H протон који је везан за атом угљеника из имидазоловог прстена имидазола који је суседан N3 координованом атому азота.

DMSO је коришћен као растварач за снимање UV-Vis спектара комплекса **Ag2** – **Ag4** на собној температури одмах након растварања, као и након 24 и 48 h (Слика 30).[118,120] Као што је напред наведено за **Ag1** комплекс, апсорпциони максимум на λ_{max} = 271 nm је последица преноса електрона унутар азола и показује батохромно померање у односу на некоординовани еконазол (λ_{max} = 255 nm). На слици 30 приказани су UV-Vis спектри **Ag2** комплекса у DMSO и смеши DMSO/PBS (*v*/*v* 7 : 3) на собној температури у различитим временским интервалима. За све комплексе, може се приметити незнатно смањење интензитета апсорпције, што указује да они задржавају структуру у DMSO раствору, тј. да еконазол остаје координован за јон сребра(I) током испитиваног временског периода.

Вредности *m*/*z* за сигнале у масеним спектрима комплекса сребра(I) у CH_3CN су у складу са израчунатим вредностима за $[Ag(ecz)_2]^+$, што указује да је овај комплексни катјон присутан у раствору.



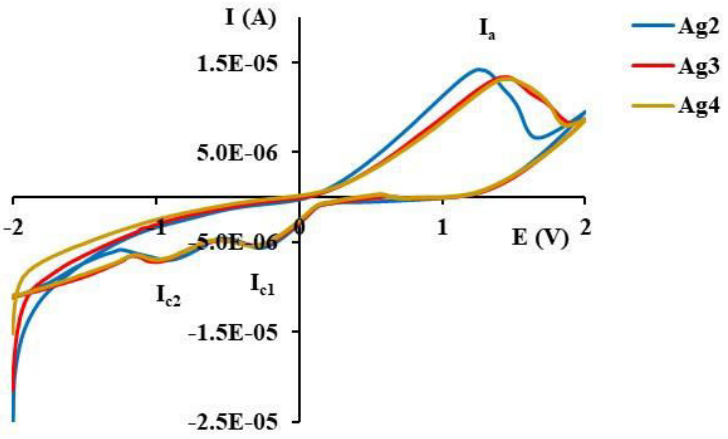
Слика 29. ^{1}H NMR спектри **Ag2** комплекса и еконазола у DMSO-d_6 на собној температури (200 MHz)



Слика 30. UV-Vis спектри комплекса **Ag2** у DMSO (**а**) и DMSO/PBS (*v/v* 7 : 3, **б**) на собној температури у различитим временским интервалима

4.2.3. Електрохемијско понашање

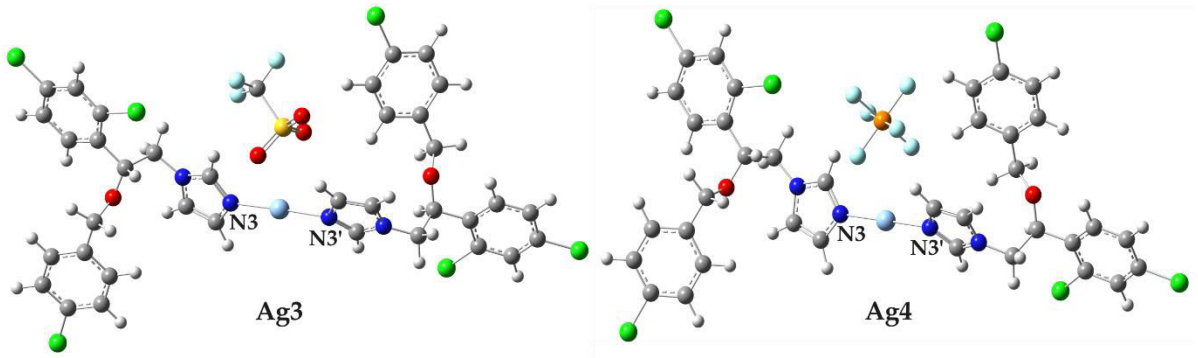
Циклични волтамограми за комплексе **Ag2** – **Ag4** снимљени су помоћу GC електроде у DMSO и 0,1 M TBAHP као помоћног електролита при $E_{почетно}$ = -2,0 V, $E_{крајње}$ = 2,0 V, и при брзини скенирања = 50 mV/s. (Слика 31).[118,120] Као што се може видети са слике 31, у анодном смеру је присутан један оксидациони пик I_a на 1,27 V (за **Ag2**) и 1,45 V (за **Ag3** и **Ag4**), који се може приписати Ag(I) → Ag(II) оксидационом процесу.[102,181,182] С друге стране, у катодном смеру, присутна су два редукциона пика $I_{c,1}$ и $I_{c,2}$ на -0,28 и -0,92 V (за **Ag2**) и -0,41 и -0,95 V (за **Ag3** и **Ag4**) која потичу од редукционих процеса Ag(II) → Ag(I) и Ag(I) → Ag(0), респективно.[102,181,182]



Слика 31. Циклични волтамограми за **Ag2 – Ag4** комплексе снимљени на GC електроди у DMSO и 0,1 M TBAHP са брзином скенирања од 50 mV/s

4.2.4. DTF прорачуни

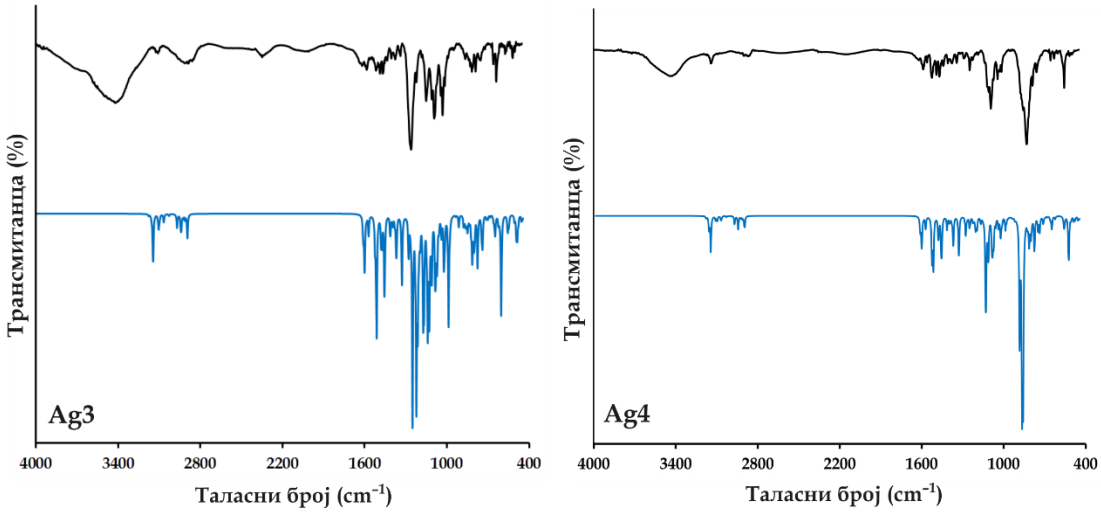
Оптимизоване геометрије **Ag3** и **Ag4** комплекса у гасовитој фази приказане су на слици 32. За оба комплекса, дужине Ag–N веза (Ag1–N3 = 2,240 Å и Ag1–N3' = 2,242 Å за **Ag3**; Ag2–N3 = 2,210 Å и Ag2–N3' = 2,212 Å за **Ag4**) оптимизованих структура у складу су са експериментално одређеним дужинама веза за **Ag4** комплекс. Уочено је незнатно одступање N3−Ag1−N3' угла од идеалне линеарне геометрије за оба комплекса (177° за **Ag3** и 176° за **Ag4**).[120]



Слика 32. Геометрије **Ag3** и **Ag4** комплекса у гасовитој фази оптимизоване применом M06-2X функционала и 6-311+G(d,p) базисног скупа за све атоме, осим за атом сребра за који се користи LANL2TZ(*f*) базни сет. Легенда: C (сива), H (бела), O (црвена), N (плава), Cl (зелена) и Ag (светло плава)

Симулирани IR спектри **Ag3** и **Ag4** комплекса, израчунати на основу оптимизованих геометрија, приказани су на слици 33 заједно са одговарајућим експерименталним спектрима.[120] Ради смањења одступања која произилазе из систематских грешака у теоријском прорачуну вибрационих фреквенција, примењен је фактор скалирања. Вредност фактора скалирања одређена је на основу поређења експерименталних и теоријских вредности таласних бројева и износи 0,95501. Такође, важно је истаћи да теоријски IR спектри, у складу са принципима квантнохемијских прорачуна, садрже знатно већи број вибрационих трака у поређењу са експерименталним

вредностима, што је последица математички идеализованог модела молекула без интеракција које постоје у реалном систему.



Слика 33. Експерементални (црно обојени) и теоријски израчунати (плаво обојени) IR спектри **Ag3** и **Ag4** комплекса

Када се анализирају IR спектри, уобичајено је да се пружи свеобухватан преглед са нагласком на идентификацију и тумачење карактеристичних вибрација. У експерименталним и симулираним IR спектрима комплекса **Ag3** и **Ag4** уочене су три јасно дефинисане спектралне области (Слика 33). Прва област, која обухвата спектрални опсег од 4000 – 2800 cm^{-1}, одговара вибрацијама истезања C–H веза. У овом делу спектра присутне су карактеристичне траке имидазоловог прстена, које се у експерименталним спектрима јављају на 3138 cm^{-1} за **Ag3** и 3176 cm^{-1} за **Ag4**. Теоријски прорачун ове траке позиционира у веома уском и добро дефинисаном интервалу, 3156 – 3123 cm^{-1} за **Ag3** и 3178 – 3160 cm^{-1} за **Ag4**, са доминантним уделом (>97%) чистих C–H истежућих вибрација прстена. Вибрације истезања C–H веза ароматичних прстенова супституисаних хлором, конкретно 2,4-дихлоро- и 4-хлоро-деривата, у експерименталним спектрима јављају се на 3123 cm^{-1} за комплекс **Ag3**, док се код комплекса **Ag4** уочавају две траке на 3142 и 3090 cm^{-1}. Теоријски IR спектри показују да ове траке имају знатно ширу расподелу, што је последица већег броја нормалних вибрација добијених квантнохемијским прорачуном. Тако се за **Ag3** ове C–H вибрације јављају у интервалу од 3310 до 3086 cm^{-1}, док су код **Ag4** у опсегу 3116 – 3073 cm^{-1}, при чему свака трака носи доминантан удео вибрација истезања C–H, већи од 97%. Додатне C–H вибрације истезања у експерименталним спектрима уочене су на 2948/2919 cm^{-1} за **Ag3** и 2924/2900 cm^{-1} за **Ag4**. У теоријским прорачунима се ове траке налазе у области више енергије, па се код комплекса **Ag3** јављају у опсегу 3032 – 2904 cm^{-1}, а код **Ag4** у интервалу 3030 – 2949 cm^{-1}. Иако ове траке не потичу искључиво од једне врсте C–H вибрација, већ представљају комбинацију више доприноса, све садрже више од 30% учешћа вибрација истезања C–H веза, што омогућава јасно повезивање симулираних и експерименталних трака.

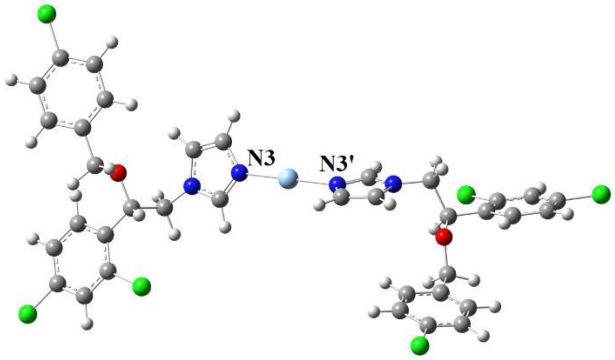
Средњи део спектра, од 1600 до 1000 cm^{-1}, углавном је дефинисан вибрацијама истезања C–C и C–N веза, као и савијањем ароматичних прстенова, што је у складу са структурним карактеристикама ових комплекса. У овом региону посебно се истиче трака на 1262 cm^{-1} за **Ag3**, која потиче од истезања S–O веза и која је доследно репродукована у симулираном спектру, где се јавља на 1288 cm^{-1} са доминантним уделом од 91%. Вибрације C–F веза такође показују добру поклапање теоријских и експерименталних

резултата: експерименталне траке на 1153 и 1110 cm^{-1} прате симулиране вредности на 1197 и 1175 cm^{-1}. Слично томе, C–Cl истежуће вибрације, уочене на 1094 cm^{-1} у експерименталним спектрима, потврђене су у теоријским прорачунима, који их смештају на 1092/1089 cm^{-1} за **Ag3**, односно на 1079/1077 cm^{-1} за **Ag4**.

Трећи део IR спектра, који обухвата области испод 1000 cm^{-1}, углавном одражава комплексне торзионе и деформационе вибрације, укључујући H–C–C–H, C–C–C–H, H–C–N–C, H–C–C–Cl и H–C–N–Ag вибрације. У овој области нарочито је препознатљива вибрација истезања F–P везе код комплекса **Ag4**: експериментална трака на 831 cm^{-1} има јасну корелацију са симулираним спектром, у којем се јављају две траке на 882 и 873 cm^{-1}. Добра сагласност између теоријских и експерименталних података у свим наведеним областима указује да примењени теоријски модел адекватно описује структуру и вибрациона својства комплекса, као и да оптимизоване геометрије представљају поуздану основу за тумачење њихових спектроскопских карактеристика.

4.2.5. Стабилност у раствору

Структуре комплекса **Ag3** и **Ag4**, након иницијалне оптимизације у гасовитој фази, поново су оптимизоване у раствору применом истог теоријског нивоа, при чему је диелектрично окружење моделовано имплицитним CPCM поступком са DMSO као растварачем.[120] Поред тога, извршена је и оптимизација система у којем су анјони $CF_3SO_3^-$ и PF_6^- уклоњени, како би се испитивало понашање координационог језгра у одсуству јонских парова (Слика 34). Оптимизоване геометрије у раствору показују благо скраћење дужина Ag–N веза (Ag–N3 = 2,201 Å и Ag–N3' = 2,200 Å) у односу на структуре оптимизоване у гасу, што је у складу са очекиваним стабилизујућим ефектом поларног растварача. Истовремено, угао N3–Ag1–N3' износи 179°, што представља готово идеалну линеарну координацију и указује на то да растварач не нарушава основну геометрију комплекса, већ је додатно стабилизује.



Слика 34. Оптимизована геометрија линеарног катјонског комплекса $[Ag(ecz)_2]^+$ у DMSO коришћењем M06-2X функционала у комбинацији са 6-311+G(d,p) базисним скупом за све атоме осим за атом сребра за који се користи LANL2TZ(*f*) базни сет. Легенда: C (сива), H (бела), O (црвена), N (плава), Cl (зелена) и Ag (светло плава)

У табели 7 приказане су вредности ΔG_f које се односе на формирање **Ag3** и **Ag4** у реакцијама соли $AgCF_3SO_3$ и $AgPF_6$ са ecz. Високе ендергонске вредности ΔG_f (>50,7 kJ/mol) и вредности K_f ниже од 1, сугеришу да је формирање **Ag3** и **Ag4** у DMSO термодинамички неповољно. Супротно томе, када су анјони $CF_3SO_3^-$ и PF_6^- удаљени од координационог језгра, повећава се вероватноћа формирања линеарног катјонског комплекса $[Ag(ecz)_2]^+$. Овај закључак произилази из негативних вредности ΔG_f (< –4,2 kJ/mol), као и K_f вредности већих од 1, што указује да је настанак овог катјона у поларном

растварачу термодинамички повољан. Поред тога, испитани су и процеси дисоцијације $[Ag(ecz)_2]^+$ катјона у присуству DMSO. Ендергонска вредност $\Delta G_d°$ од 33,1 kJ/mol, као и вредност константе дисоцијације K_d од $6{,}24 \times 10^5$, сугеришу да је формирани катјонски комплекс стабилан у датом растварачу, и да не постоји значајна тенденција његовог разлагања у раствору. Ови резултати су у складу са истраживањима, у којима је дисоцијација комплекса **Ag2** у DMSO испитана ZORA-MN15/TZ2P-COSMO(DMSO) моделом, такође показала ендергонску природу процеса (ΔG = 39,7 kJ/mol).[118] Таква сагласност потврђује да примењени теоријски модел поуздано описује термодинамичко понашање испитиваних комплекса сребра(I) у поларном растварачу.

Табела 7. Промена слободне Гибсове (Gibbs) енергије (T = 298,15 K, kJ/mol) формирања (ΔG_f^0)/дисоцијације (ΔG_d^0) као и константе формирања (K_f)/дисоцијације (K_d) испитиваних комплекса **Ag3** и **Ag4** израчунате помоћу M06-2X функционала у комбинацији са 6-311+G(d,p) базним сетом за све атоме, осим за атом сребра за који се користио LANL2TZ(*f*) базни сет

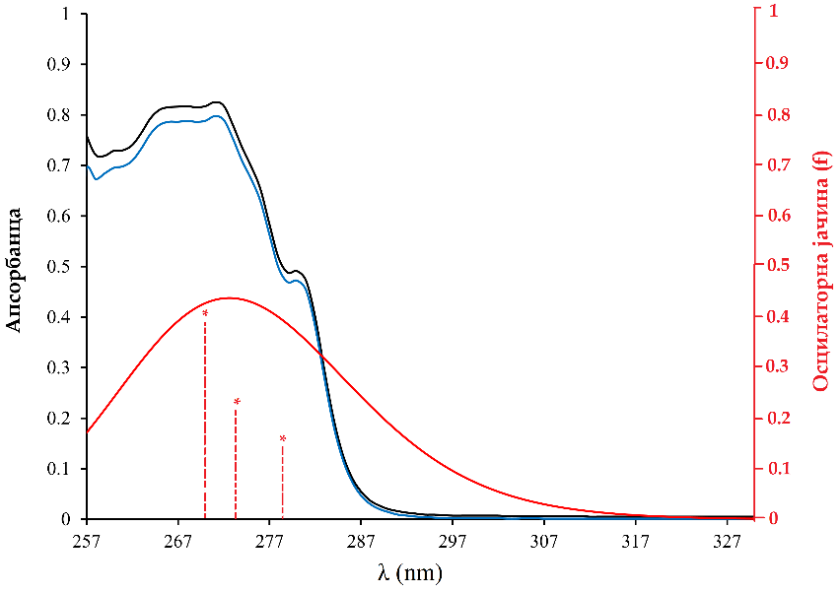
Комплекс	Реакције формирања/дисоцијације комплекса	$\Delta G_f^0/\Delta G_d^0$	K_f/K_d
Ag3	$AgCF_3SO_3 + 2ecz \rightleftharpoons [Ag(ecz)_2]CF_3SO_3$	54,4	$2{,}90 \times 10^{-10}$
	$AgCF_3SO_3 + 2ecz \rightleftharpoons [Ag(ecz)_2]^+ + CF_3SO_3^-$	-16,7	$8{,}29 \times 10^2$
Ag4	$AgPF_6 + 2ecz \rightleftharpoons [Ag(ecz)_2]PF_6$	50,7	$1{,}34 \times 10^{-9}$
	$AgPF_6 + 2ecz \rightleftharpoons [Ag(ecz)_2]^+ + PF_6^-$	-4,2	$5{,}49 \times 10^0$
Ag3/Ag4	$[Ag(ecz)_2]^+ + 2DMSO \rightleftharpoons [Ag(DMSO)_2]^+ + 2ecz$	33,1	$6{,}24 \times 10^5$

Линеарна геометрија катјона $[Ag(ecz)_2]^+$ у DMSO потврђена је поређењем експерименталних и симулираних хемијских померања у NMR спектрима, при чему је тетраметилсилан (TMS) коришћен као интерни стандард.[120] Резултати процењених хемијских померања приказани су у табели 8. Висок степен корелације између експерименталних и теоријских вредности (R = 0,992), као и ниска вредност средње апсолутне грешке (MAE < 0,151 ppm), снажно указују да примењени теоријски модел адекватно описује структуру комплекса у раствору и подржава претпоставку о његовој линеарној геометрији. ^{1}H NMR спектри додатно потврђују структурне карактеристике комплексног катјона. Уочене су две јасно раздвојене групе сигнала. Прва група, која се јавља при нижим хемијским померањима, потиче од протона метиленске групе. Они се налазе у интервалу од 4,31 до 5,03 ppm у експерименталном спектру, док се теоријски добијене вредности крећу од 4,23 до 4,70 ppm, што показује добру подударност. Друга група сигнала обухвата ароматичне протоне, који се у експерименталном спектру налазе између 7,03 и 7,83 ppm, док се теоријски моделом добијају вредности у нешто вишем интервалу, од 7,30 до 7,96 ppm. Уочена разлика од приближно 0,30 ppm између експерименталних и теоријских хемијских померања може се приписати употреби имплицитног модела растварача, који не обухвата специфичне интеракције између комплекса и молекула DMSO. Ипак, упркос овом ограничењу, значајан проценат слагања између два скупа података пружа додатну потврду прецизности примењеног теоријског приступа у описивању структуре комплекса у раствору.

Табела 8. Експериментална и теоријска хемијска померања (M06-2X функционал у комбинацији са 6-311+G(d,p) основни сет за све атоме, осим за атом сребра за који се користи LANL2TZ(*f*) основни сет) у ^{1}H NMR спектру **Ag3** и **Ag4** комплекса

Протон	Експериментални, δ (ppm)		Теоријски, δ (ppm)
	Ag3	**Ag4**	
H14	4,33	4,31	4,23
H6	4,42	4,42	4,39
H7	5,03	5,03	4,70
H20	7,04	7,03	7,30
H16	7,20	7,18	7,35
H19	7,20	7,22	7,39
H17	7,25	7,24	7,38
H12	7,36	7,35	7,37
H13	7,36	7,39	7,85
H5	7,41	7,41	7,32
H10	7,50	7,50	7,49
H4	7,70	7,70	7,66
H2	7,83	7,83	7,96
R	0,992	0,992	/
MAE	0,149	0,151	/

Поређење експерименталних и симулираних UV-Vis спектара пружа додатне доказе који подржавају присуство комплексног катјона $[Ag(ecz)_2]^+$ у раствору DMSO.[120] На слици 35 приказани су комбиновани UV-Vis спектри, где су експериментални подаци за комплексе **Ag3** (црна линија) и **Ag4** (плава линија) упоређени са теоријски добијеним спектром (црвена линија). Одговарајуће таласне дужине и најзначајнији електронски прелази, пре свега они који укључују HOMO (*Highest Occupied Molecular Orbital*) и LUMO (*Lowest Unoccupied Molecular Orbital*), приказани су у табели 9. Овакво поређење омогућава да се директно оцени усклађеност експерименталних апсорпционих опсега са теоријским предвиђањима, што је од кључног значаја за поуздану верификацију електронске структуре и стабилности комплексног катјона у раствору.

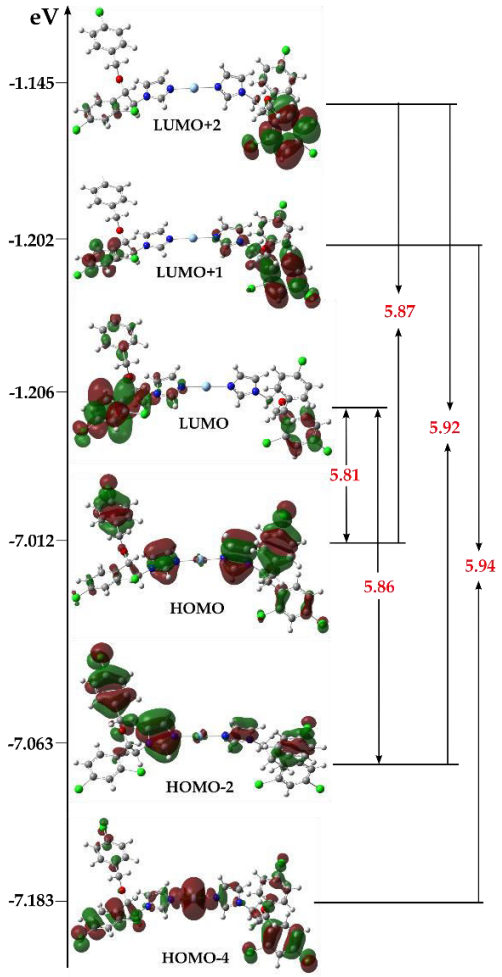


Слика 35. Експериментални (**Ag3** – црна линија и **Ag4** – плава линија) и теоријски (M06-2X функционал у комбинацији са 6-311+G(d,p) основним сетом за све атоме, осим за атом сребра за који се користи LANL2TZ(*f*) основни сет) UV-Vis спектри за $[Ag(ecz)_2]^+$. Симбол звездице * се користи као ознака за представљање интезитета осцилаторне јачине

Табела 9. Експерименталне и теоријске вредности таласних дужина (λ_{max}), осцилаторне јачине (*f*), и хемијских прелаза за $[Ag(ecz)_2]^+$

Експерименталне вредности	Теоријске вредности		
	λ(nm)	*f*	Прелаз електрона
271	269	0,398	HOMO → LUMO (21%)
			HOMO–2 → LUMO (46%)
	273	0,213	HOMO → LUMO+2 (35%)
			HOMO–2 → LUMO+2 (37%)
	279	0,135	HOMO–4 → LUMO+1 (34%)

На слици 36 приказане су HOMO и LUMO молекулске орбитале које доприносе најзначајнијим електронским прелазима и тиме одређују положај апсорпционих максимума у UV-Vis спектрима. Заједно са визуелним приказом орбитала, дата је и енергетска разлика између њихових нивоа, односно HOMO–LUMO јаз, који представља кључни параметар у разумевању електронске структуре и оптичких својстава комплекса. Ови подаци омогућавају директно повезивање експериментално уочених апсорпционих опсега са специфичним електронским прелазима који се јављају унутар $[Ag(ecz)_2]^+$ комплекса.



Слика 36. Енергетски профил HOMO и LUMO молекулских орбитала укључених у главне електронске прелазе за $[Ag(ecz)_2]^+$ комплекс са вредностима орбиталне енергије (црна боја, eV) и енергетског јаза (црвена боја, eV)

Као што је напред наведено, у експерименталном UV-Vis спектру комплекса **Ag3** и **Ag4** уочен је интензиван апсорпциони максимум на 271 nm, док симулирани спектар за $[Ag(ecz)_2]^+$ комплекс показује три значајна побуђена стања на 269, 273 и 279 nm. Ова побуђена стања представљају резултат више електронских прелаза, при чему се може сматрати да експерименталном максимуму на 271 nm одговарају прва два побуђена стања. Прво побуђено стање, које има највећи интензитет осцилације (f = 0,398), доминантно је одређено електронским прелазима HOMO–2 → LUMO (46%) и HOMO → LUMO (21%). Другом побуђеном стању, са нешто мањим интензитетом осцилације (f = 0,213), одговарају прелази HOMO → LUMO+2 (35%) и HOMO–2 → LUMO+2 (37%). Превој у експерименталном спектру у области око 280 nm одговара трећем побуђеном стању симулираног спектра на 279 nm, који се приписује прелазу HOMO–4 → LUMO+1 (34%). Висок проценат слагања између експерименталних и теоријски предвиђених апсорпционих опсега, као и доследност додељених електронских прелаза, у сагласности је са закључком да је у раствору DMSO комплексни катјон $[Ag(ecz)_2]^+$ доминантна врста.

4.2.6. Испитивање биолошке активности комплекса Ag2 – Ag4

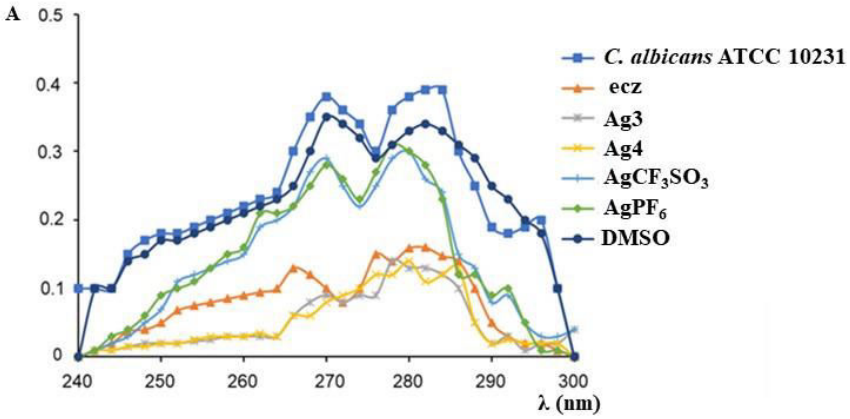
Антимикробна активност комплекса **Ag2** – **Ag4** поређена је са активношћу лиганда ecz и соли сребра(I), AgX (X = SbF_6^-, $CF_3SO_3^-$ и PF_6^-).[118,120] Испитивање је обухватало четири клинички важна *Candida* соја (*C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* и *C. glabrata*), две Грам-позитивне (*S. aureus* и *L. monocytogenes*) и две Грам-негативне бактерије (*E. coli* и *P. aeruginosa*). Резултати су изражени као MIC вредности (μM) и приказани су у табели 10. У већини случајева, у односу на ecz, сва три комплекса су показала значајно побољшану антигљивичну активност, што је било нарочито изражено код сојева *C. parapsilosis* и *C. glabrata*, где је забележено повећање активности до 6,4 пута. Комплекс **Ag4** се издвојио као најактивнији, показујући 1,8 пута већу активност према *C. albicans* и 1,1 пут већу активност према *C. krusei* у поређењу са еконазолом. Одговарајуће AgX соли, коришћене у синтези комплекса **Ag3** и **Ag4**, такође су показале значајну анти-*Candida* активност, у појединим случајевима чак и већу од еконазола (Табела 10). Ипак, њихова директна примена као антимикробних агенаса остаје ограничена услед брзе дисоцијације и таложења AgCl, што доводи до губитка биолошке ефикасности.[177]

Табела 10. Антимикробна активност (MIC, μM) комплекса **Ag2** – **Ag4**, одговарајућих AgX соли (X = SbF_6^-, $CF_3SO_3^-$ и PF_6^-) и еконазола (ecz) према сојевима *Candida* и одабраним бактеријским сојевима, уз поређење са њиховим цитотоксичним деловањем на здраве хумане фибробласте MRC-5 (IC_{50}, μM). Стандардна девијација за све вредности износила је 0 – 2%

	Ag2	**Ag3**	**Ag4**	$AgSbF_6$	$AgCF_3SO_3$	$AgPF_6$	ecz
C. albicans	2,25	10,07	3,84	3,64	2,41	2,45	7,0
C. parapsilosis	2,25	1,67	0,61	0,09	0,12	0,24	3,9
C. krusei	27,10	40,32	12,30	4,66	0,12	0,63	14,1
C. glabrata	11,29	16,80	12,30	2,33	6,23	6,33	56,2
P. aeruginosa	22,6	33,61	49,2	36,38	10,51	10,68	>500
E. coli	11,3	16,75	12,3	18,19	10,51	10,68	>500
S. aureus	2,71	3,98	3,07	36,38	24,32	24,72	225
L. monocytogenes	22,6	33,61	24,60	36,38	48,65	49,44	>500
MRC-5	10	19	11	18,3	43	29	10

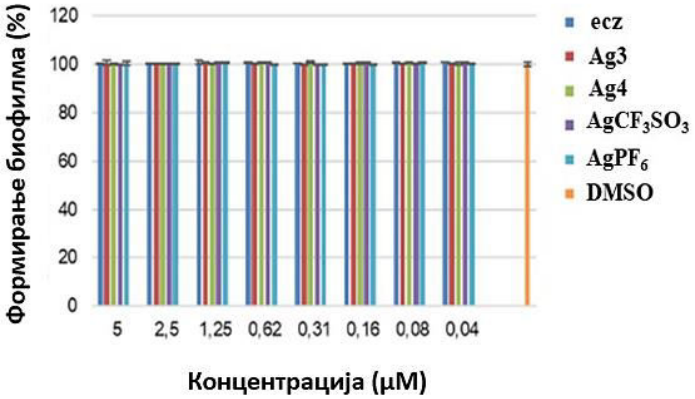
Испитивани комплекса сребра(I) су показала исту или незнатно мању цитотоксичност на MRC-5 ћелије у односу на ecz (Табела 10). Индекс SI је израчунат као количник IC_{50} и одговарајуће MIC вредности. Добијене SI вредности кретале су се од најповољнијих 18 за комплекс **Ag4** према *C. parapsilosis* до 0,4 за комплекс **Ag2** према *C. krusei*.

Имајући у виду општи механизам деловања антигљивичних азола,[203] испитиван је утицај комплекса **Ag3** и **Ag4** на биосинтезу ергостерола (Слика 37). Оба комплекса су довела до значајног смањења нивоа ергостерола при концентрацији од 0,5 × MIC, у поређењу са нетретираним контролним пробама (*C. albicans* ATCC 10231 и DMSO), као и са еконазолом. Овакво смањење сугерише да се механизам деловања комплекса сребра(I) бар делимично може повезати са инхибицијом синтезе ергостерола или потенцијалном интеракцијом са самим стеролом.[118,120]



Слика 37. UV спектрофотометријски профили ергостерола у опсегу 240–300 nm за културе *C. albicans* при концентрацијама од 0,5 × MIC комплекса **Ag3** и **Ag4**, одговарајућих AgX соли и еконазола

Специфична карактеристика вируленције соја *C. albicans* јесте способност формирања биофилма, структуре која је изразито резистентна на клинички коришћене антимикотике. У складу са тим, испитиван је ефекат комплекса **Ag3** и **Ag4**, одговарајућих AgX соли, као и ecz, на инхибицију формирања биофилма соја *C. parapsilosis* ATCC 22019.[120] Резултати су показали да испитивана једињења не показују значајну активност у спречавању формирања биофилма (Слика 38).

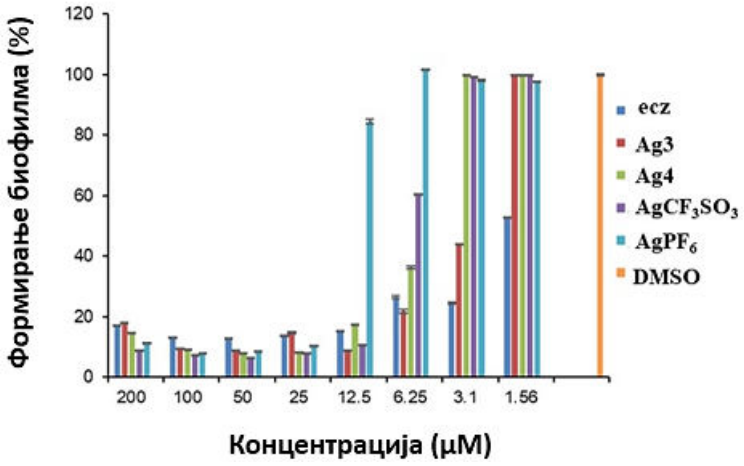


Слика 38. Инхибиција формирања биофилма *C. parapsilosis* ATCC 22019 у присуству комплекса **Ag3** и **Ag4**, одговарајућих AgX соли, као и еконазола (ecz). DMSO је коришћен као негативна контрола

Поред израженог анти-*Candida* потенцијала, комплекси **Ag3** и **Ag4** показали су и значајну антибактеријску активност, нарочито према Грам-позитивном соју *S. aureus* (Табела 10).[120] Координација ecz за јон сребра(I), која доводи до стварања **Ag3** и **Ag4** комплекса, има за резултат значајно побољшање његовог антибактеријског потенцијала. Најизраженији ефекат уочен је према соју *S. aureus* ATCC 25923, где је активност ecz побољшана 56 пута у случају комплекса **Ag3** и чак 73 пута код комплекса **Ag4**. Обе AgX соли су, такође, показале приметну антибактеријску активност (Табела 10), што јасно указује да је јон сребра(I) главни носилац биолошке активности. Ипак, уочена је занимљива расподела активности: AgX соли биле су активније од комплекса према Грам-негативним сојевима, док су **Ag3** и **Ag4** комплекси показали значајну активност према Грам-позитивним бактеријама. Различите дебљине и састав ћелијских зидова Грам-

позитивних и Грам-негативних бактерија могу бити разлог за уочену разлику у активности између комплекса сребра(I) и соли. Ова разлика може се објаснити структурним особинама ћелијског зида бактерија. Грам-позитивне бактерије поседују дебљи слој пептидогликана, који носи негативно наелектрисања и може задржати слободне јоне сребра(I), ограничавајући деловање простих AgX соли.[204,205] Супротно томе, **Ag3** и **Ag4** комплекси, као неутралне или мање наелектрисане врсте са специфичним липофилним карактеристикама, вероватније могу да превазиђу баријеру пептидогликанског слоја, што резултује њиховом побољшаном активношћу према *S. aureus*. Побољшана антибактеријска активност комплекса **Ag3** и **Ag4,** нарочито према *S. aureus*, указује да ове комплексне врсте имају потенцијал да ефикасније продру у ћелијски зид Грам-позитивних бактерија у односу на једноставне соли сребра(I). Ови резултати су у складу са нашим претходним истраживањима, која су показала да комплексирање еконазола са јонима злата(III) доводи до повећане антибактеријске ефикасности.[174]

Формирање биофилма значајно повећава отпорност бактерија, чинећи их нарочито резистентним на деловање антибиотика. Стога је испитиван утицај комплекса **Ag3** и **Ag4** на формирање и дисперзију биофилма соја *S. aureus* (Слике 39 и 40).[120]



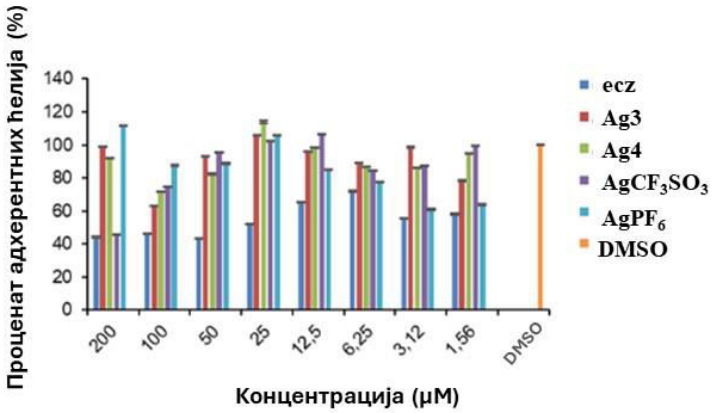
Слика 39. Инхибиција формирања биофилма *S. aureus* ATCC 25923 у присуству комплекса **Ag3** и **Ag4**, одговарајућих AgX соли и еконазола. DMSO је коришћен као негативна контрола

Комплекси **Ag3** и **Ag4** показали су изразито јаку активност инхибиције формирања биофилма, у распону од 80 – 90% при концентрацијама од 12,5 до 200 μM. У поређењу са ecz и AgX солима, ови комплекси су показали сличну активност, што се највероватније може приписати деловању јона сребра(I). Након уласка у ћелију, јони сребра(I) могу да ометају виталне ћелијске функције путем везивања за више циљних протеина и ензима,[206,207] што доводи до значајног смањења способности бактерија да формирају биофилм.

Ипак, иако су комплекси **Ag3** и **Ag4** ефикасно инхибирали иницијално формирање биофилма, нису успели да разложе већ формирани биофилм (Слика 40). Објашњење се, највероватније, заснива на чињеници да зрела матрица биофилма представља физичку и хемијску баријеру која значајно ограничава дифузију активних једињења и пружа високи степен отпорности.[208]

Сагледавајући механизам деловања, добијени резултати указују да комплекси сребра(I) са еконазолом, **Ag3** и **Ag4**, припадају групи једињења која ефективно

инхибирају формирање биофилма у раним фазама, али немају способност да наруше већ формирани биофилм.



Слика 40. Дисперзија биофилма *S. aureus* ATCC 25923 у присуству комплекса **Ag3** и **Ag4**, одговарајућих AgX соли и еконазола. DMSO је коришћен као негативна контрола

4.2.7. Молекулски докинг

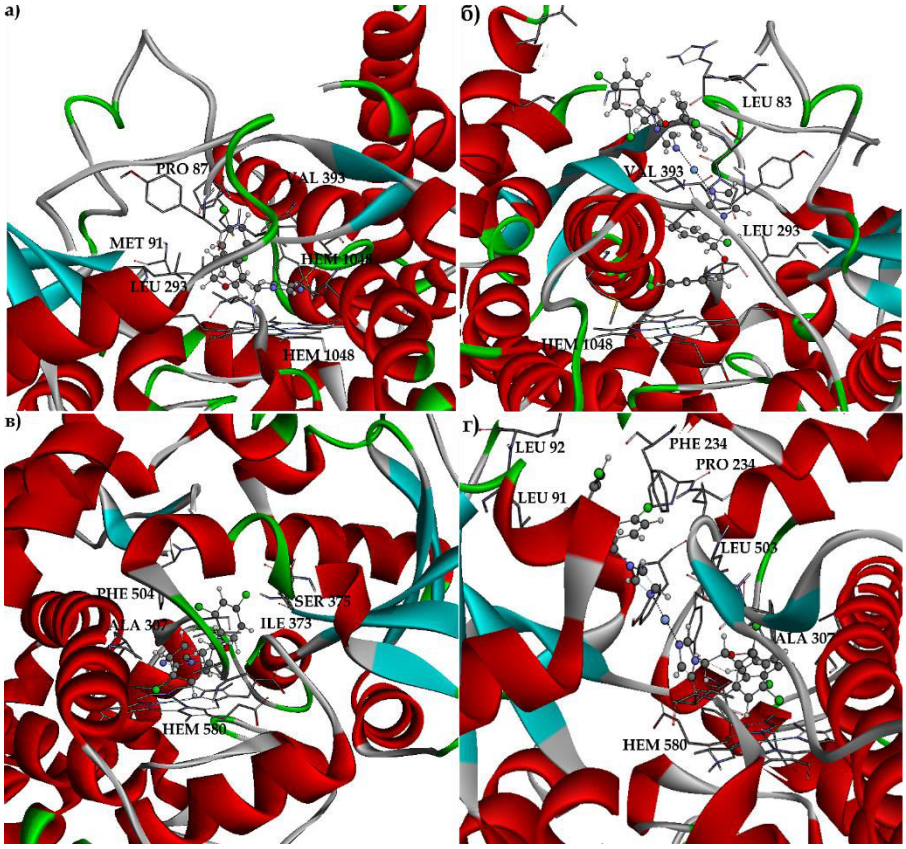
Да би се разјаснио могући механизам антигљивичног деловања синтетисаних комплекса сребра(I) и еконазола, методом молекулског докинга испитивана је њихова интеракција са цитохромом P450 51B (CYP51B), кључним ензимом у биосинтези ергостерола. Инхибиција овог ензима доводи до смањења нивоа ергостерола, што за последицу има дестабилизацију гљивичне ћелијске мембране, повећање њене пермеабилности и поремећај рада мембрански везаних ензима, као и акумулацију токсичног фекостерола.[209,210] Поред CYP51B ензима, инхибиторно дејство испитиваних једињења анализирано је и према ензиму CYP130, за који је познато да са еконазолом гради кристалну структуру, што је омогућило поуздану валидацију модела доковања. Приликом молекулског докинга, коришћен је комплексни $[Ag(ecz)_2]^+$ (**Ag**) катјон, јер је експериментално потврђено да управо ова врста доминира у поларним срединама, и да представља активни облик **Ag3** и **Ag4** комплекса.[120]

Резултати приказани у табели 11 указују да $[Ag(ecz)_2]^+$ комплексни катјон испољава израженије инхибиторно дејство у односу на сам ecz, како према CYP130, тако и према CYP51B, што је у сагласности са експерименталним разултатима (Слика 37). Поред тога, овај закључак је у складу са вредностима кључних термодинамичких параметара, посебно слободне енергије везивања (ΔG_{bind}) и константе инхибиције (K_i), које указују на стабилније везивање комплексног катјона у односу на лиганд. Укупна реактивност испитиваних система према ензимима опада у следећем редоследу: CYP51B–**Ag** > CYP130–**Ag** > CYP51B–ecz > CYP130–ecz што показује да координација ecz за јон сребра(I) значајно појачава његов инхибиторни капацитет, посебно према примарној молекулској мети, ензиму CYP51B.

Табела 11. Вредности релевантних енергетских параметара (kcal/mol) добијених молекулским докингом за најповољније конформације комплексног $[Ag(ecz)_2]^+$ катјона (**Ag**) и еконазола у активном месту CYP130 и CYP51B ензима

Конформације	ΔG_{bind}	K_i (μM)	ΔG_{inter}	$\Delta G_{vdw+hbond+desolv}$	ΔG_{elec}	ΔG_{total}	ΔG_{tor}	ΔG_{unb}
CYP130–**Ag**	-9,60	$9,24\times10^{-2}$	-13,44	-13,49	0,05	-2,84	3,84	-2,84
CYP130–ecz	-8,94	$2,79\times10^{-1}$	-10,59	-10,59	0,00	-1,66	1,65	-1,66
CYP51B–**Ag**	-14,76	$1,52\times10^{-5}$	-18,60	-18,55	-0,05	-2,09	3,84	-2,09
CYP51B–ecz	-9,59	$9,42\times10^{-2}$	-11,23	-11,24	0,01	-1,53	1,65	-1,53

Термодинамички најповољније место везивања $[Ag(ecz)_2]^+$ комплексног катјона у складу је са активним местом комерцијалног лека еконазола (Слика 41). Ово активно место обухвата аминокиселинске остатке у непосредној близини хем групе HEM1048 (CYP130) и HEM580 (CYP51B), који имају кључну улогу у везивању супстрата и катализи ензимских реакција. Повећана инхибиторна активност $[Ag(ecz)_2]^+$ комплекса може се приписати његовој структури, као и улози јона сребра(I) као централног јона метала. Према резултатима докинг испитивања, један молекул ecz у комплексу формира директне интеракције са аминокиселинским остацима у активном месту ензима, док се други молекул стабилизује путем π–π интеракција са порфиринским прстеном хем групе HEM1048 (CYP130) и HEM580 (CYP51B), у зависности од оријентације лиганда у активном месту.

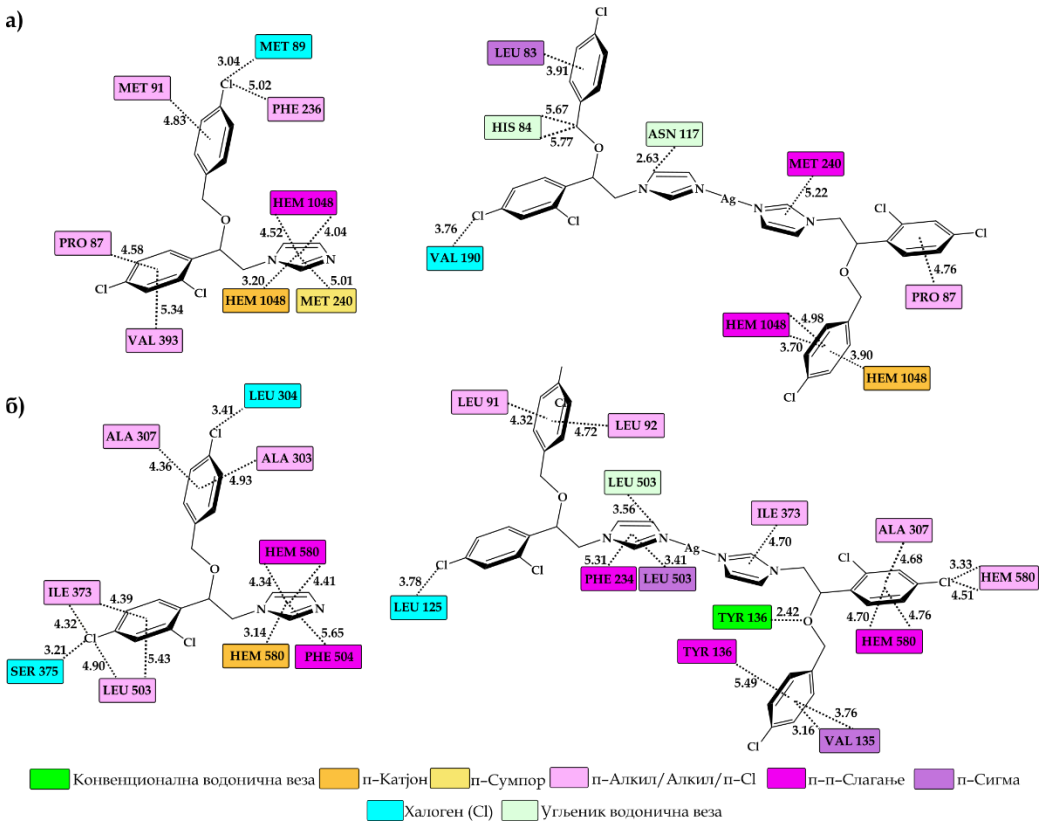


Слика 41. Најповољније докинг оријентације еконазола (ecz, лево) и комплексног $[Ag(ecz)_2]^+$ катјона (десно) у активном месту цитохрома P450 CYP130 (PDB код: 2UVN; (**а**) и (**б**)) и цитохрома P450 стерол 14α-деметилазе CYP51B (PDB код: 4UYM; (**в**) и (**г**)). Лиганди су приказани у облику штапића, при чему су различити атоми означени стандардним бојама: C (сива), N (тамноплава), O (црвена), F (светлоплава) и Ag (плава). Ради јасније визуелизације, преостали делови структуре протеина су уклоњени

Резултати молекулског докинга указују да хидрофобне интеракције имају кључну улогу у стабилизацији испитиваних једињења у активном месту CYP130 (Слика 42а). Имидазолов прстен еконазола и 4-хлор-супституисани ароматични прстенови комплекса сребра(I) учествују у више π–π интеракција са порфиринским системом хем групе HEM1048. Поред π–π интеракција, комплекси су додатно стабилизовани кроз алкил-, π–алкил- и π–хлоридне интеракције са следећим аминокиселинским остацима: PRO87, MET91, PHE236 и VAL393. Истовремено, хем група HEM1048 остварује π–катјонске интеракције са ароматичним имидазоловим прстеном еконазола (3,20 Å), као и са 4-хлор-супституисаним ароматичним прстеновима комплекса сребра(I) (3,90 Å), при чему централни јон сребра(I) учествује у стабилизацији овог интерактивног система. Поред тога, кисеоник карбонилне групе аминокиселине MET89 формира халогену интеракцију са 4-хлор-супституисаним прстеном еконазола на растојању од 3,04 Å. Аналогно томе, аминокиселина VAL190 остварује исту врсту интеракције са 2,4-дихлорсупституисаним ароматичним прстеном комплексног $[Ag(ecz)_2]^+$катјона, при чему је измерено растојање од 3,76 Å.

Испитивана једињења су унутар активног места ензима CYP51B примарно стабилизована хидрофобним интеракцијама (Слика 42б). Доминантни типови интеракција обухватају алкил-, π–алкил- и π–σ интеракције са следећим

аминокиселинским остацима: LEU91, LEU92, VAL135, PHE234, ALA303, ALA307, ILE373 и LEU503. Инхибиторни ефекат испитиваних једињења додатно је појачан интеракцијама ароматичних система са протопорфиринским прстеном хем групе HEM508. Интеракције π–π се успостављају између имидазолног прстена еконазола и порфиринског система, као и између 2,4-дихлорсупституисаног ароматичног прстена комплекса сребра(I) и хем групе. Аминокиселински остатак PHE504 гради π–π интеракцију са еконазолом на растојању од 5,65 Å, док PHE234 (5,31 Å) и TYR136 (5,49 Å) учествују у интеракцијама са ароматичним прстеновима комплекса сребра(I). Поред хидрофобних интеракција, додатна стабилизација у активном месту обезбеђена је халогеним интеракцијама између атома хлора еконазола и аминокиселина SER375 (3,21 Å) и LEU304 (3,41 Å), као и водоничном везом између остатка TYR136 и атома кисеоника комплекса сребра(I), при растојању од 2,42 Å.

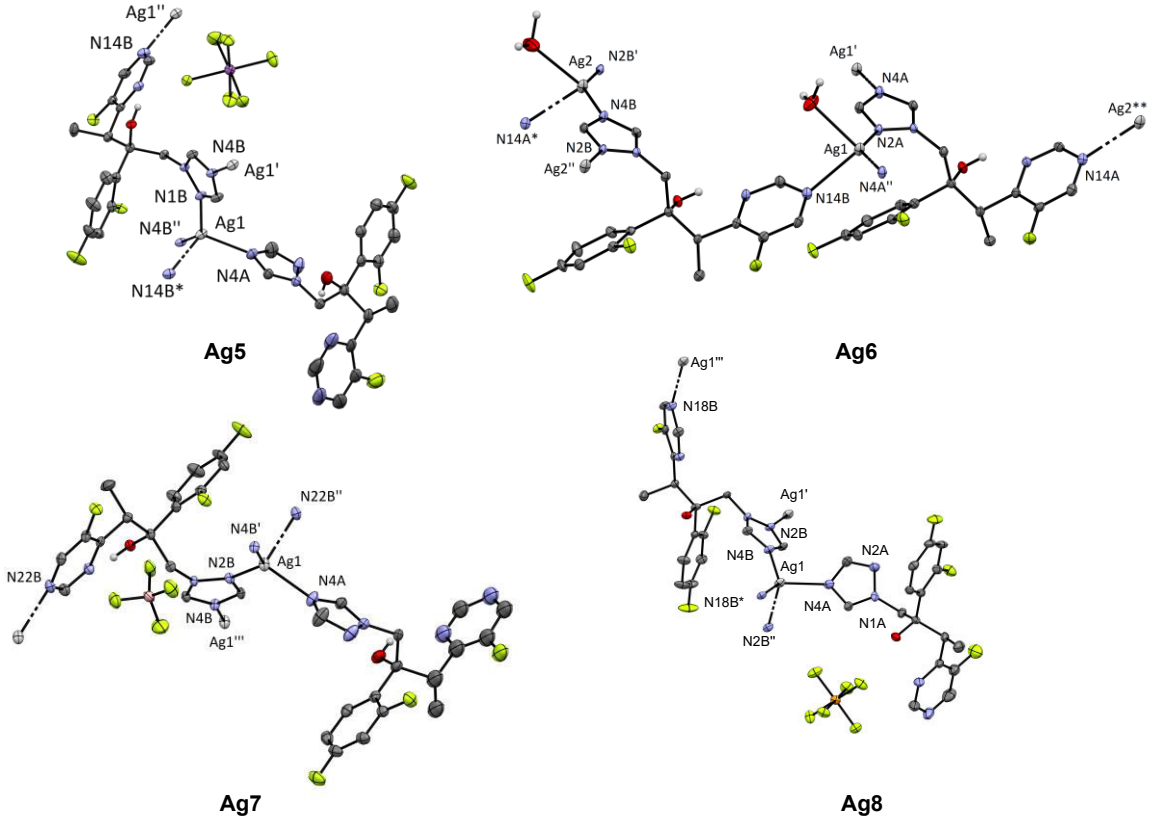


Слика 42. 2D приказ интеракција између еконазола (ecz, лево) и комплексног $[Ag(ecz)_2]^+$ катјона (десно) у активном месту цитохрома P450 CYP130 (PDB код: 2UVN; (**а**)) и цитохрома P450 стерол 14α-деметилазе CYP51B (PDB код: 4UYM; (**б**)), са приказаним међуатомским растојањима добијеним након молекулског докинга. Хем групе HEM1048 и HEM580 представљају протопорфирин IX који садржи Fe. Различите боје означавају различите типове атома

4.3. Синтеза, карактеризација и биолошка активност комплекса сребра(I) са вориконазолом

Антигљивични лек вориконазол (vcz) коришћен је као лиганд за синтезу четири нова координациона полимера сребра(I), $\{[Ag(vcz)_2]SbF_6\}_n$ (**Ag5**), $\{[Ag(vcz)(H_2O)]CH_3SO_3\}_n$ (**Ag6**), $\{[Ag(vcz)_2]BF_4\}_n$ (**Ag7**) и $\{[Ag(vcz)_2]PF_6\}_n$ (**Ag8**) (Слика 43).[118,119] Поступак синтезе ових комплекса описан је у Експерименталном делу ове

докторске дисертације. Монокристали **Ag5** комплекса добијени су прекристализацијом талога насталог током реакције у смеши ацетонитрил/етанол (*v*/*v* 1 : 1), док је у случају комплекса **Ag6** – **Ag8** коришћен ацетонитрил за прекристализацију.

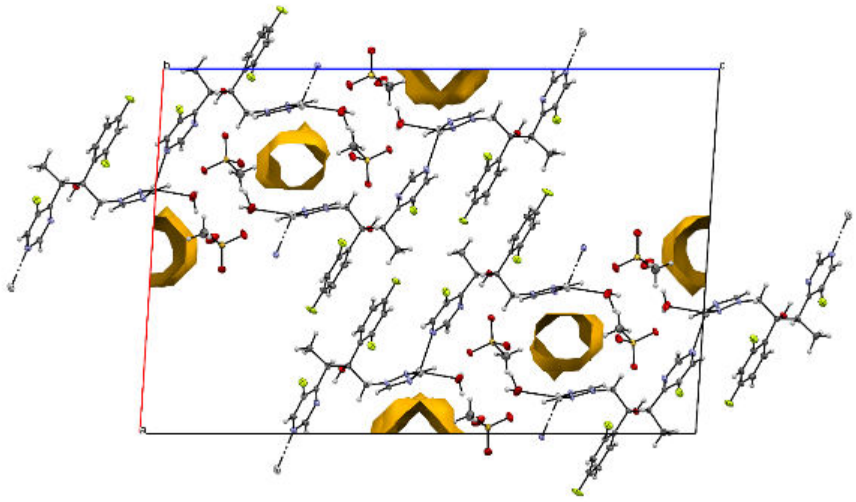


Слика 43. Кристалне структуре комплекса **Ag5 – Ag8** са одабраним означавањем хетероатома. Термички елипсоиди су приказани на нивоу вероватноће од 35%, док су атоми водоника изостављени ради боље прегледности

Структурна база података CSD садржи укупно 10 комплекса метала са вориконазолом, и то четири комплекса бакра, три комплекса сребра и по један комплекс кадмијума, кобалта и злата. Три испитивана комплекса, **Ag5**, **Ag7** и **Ag8**, изоструктурни су међусобно, као и са раније објављеним комплексом са трифлатним анјоном.[211] Атоми азота у вориконазолу који су sp^2 хибридизовани омогућавају различите начине координације са јонима сребра(I). У описаним координационим полимерима, за јон сребра(I) координована су четири атома азота, при чему овај јон има дисторговану тетраедарску геометрију (Слика 43). Полимерни ланци формирају се тако што триазолов прстен вориконазола делује као мостни лиганд између два суседна јона сребра(I). Преостала два места у координационој сфери сребро(I) јона заузимају атом азота флуоропиримидинског прстена суседног молекула, који доприноси умрежавању ланаца, као и атом азота триазоловог прстена другог (терминалног) молекула вориконазола. Оваква координација има за резултат укупни стехиометријски однос метал : vcz = 1 : 2.

У овој докторској дисертацији, утврђена је нова структура метансулфонатне соли комплекса сребра(I) са вориконазолом (**Ag6** комплекс; Слика 43).[119] У овом комплексу, стехиометријски однос метал : vcz износи 1 : 1. Иако су ланчана архитектура и образац умрежавања карактеристични за остале комплексе, у овој структури други (терминални) молекул азола замењен је молекулом воде. У кристалној структури идентификоване су

две шупљине запремина 43 Å^3 и 33 Å^3, које садрже преосталу електронску густину интегрисану на 12, односно 11 електрона. Покушаји моделовања ових шупљина молекулима воде, етанола или ацетонитрила, било са пуном или делимичном попуњеношћу, нису били успешни. Због тога је за уклањање преостале електронске густине из структурног модела примењена функција затамњења растварача (*solvent mask*) у програму Olex2. Празнине у кристалној структури **Ag6** комплекса приказане су на слици 44.

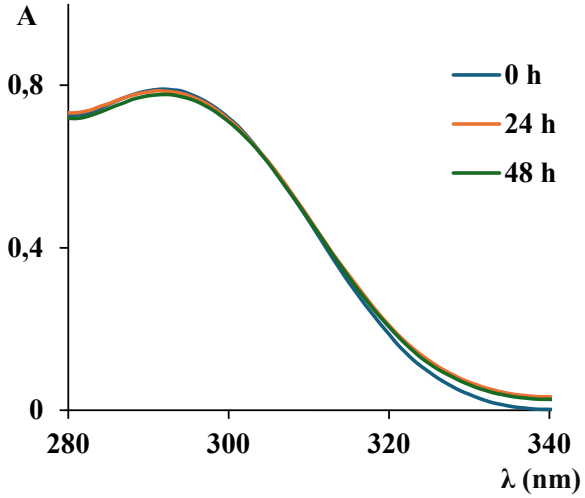


Слика 44. Празнине у кристалној структури **Ag6** комплекса посматране дуж *b* осе

Анализом IR спектара комплекса **Ag5 – Ag8** у опсегу таласних бројева од 4000 до 450 cm^{-1} уочене су карактеристичне траке које потичу од координованог вориконазола[212] и молекула воде,[173] као и траке које одговарају присутним контра-анјонима SbF_6^-, $CH_3SO_3^-$, BF_4^- и PF_6^- .[171,202,213-215] Широка апсорпциона трака у области око 3400 cm^{-1} приписује се O–H валенционим вибрацијама вориконазола код сва три комплекса, као и координованом молекулу воде у **Ag6** комплексу.[173,212] Траке у областима ~3100 – 3000 cm^{-1} и око 2900 cm^{-1} одговарају ароматичним C–H, односно алифатичним C–H валенционим вибрацијама.[173] Померање трака које потичу од вибрација шесточланих и петочланих ароматичних прстенова (ν(C_{ar}=C_{ar}) и ν(C=N)) код комплекса **Ag5 – Ag8**, у односу на некоординовани вориконазол, посматрано у интервалу 1619 – 1406 cm^{-1},[173] указује на његову координацију за јон сребра(I). Веома интензивна трака на 660 cm^{-1} у IR спектру **Ag5** комплекса одговара некоординованом SbF_6^- анјону.[171] Код комплекса **Ag6**, веома интензивне траке на 1196 и 1039 cm^{-1}, које одговарају асиметричним и симетричним валенционим вибрацијама –SO_3 групе, што је у сагласности са подацима за метансулфонску киселину.[213] За комплексе **Ag7** и **Ag8**, интензивне траке на 1059 cm^{-1} и 838 cm^{-1} потичу од BF_4^- и PF_6^- анјона.[202,214,215] Добијени IR подаци за ова два комплекса у складу су са спектроскопским карактеристикама раније окарактерисаних сребро(I) комплекса, као што су $\{[Ag(1,6\text{-naph})(H_2O)](BF_4)\}_n$ и $[Ag_2(1,8\text{-naph})_2(H_2O)_{1,2}](PF_6)_2$ (где 1,6- и 1,8-naph означавају 1,6- и 1,8-нафтиридин).[201,216]

4.3.1. Испитивање понашања комплекса Ag5 – Ag8 у раствору

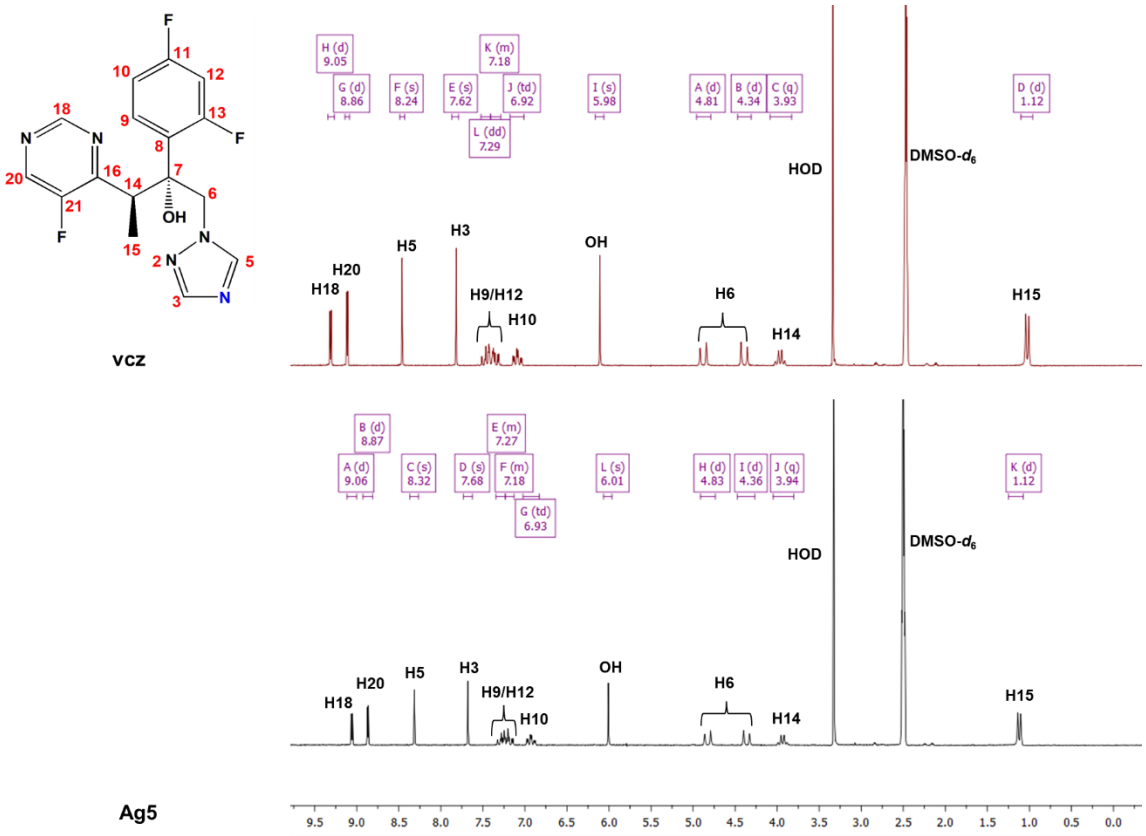
UV-Vis спектри комплекса **Ag5 – Ag8** снимљени су у DMSO на собној температури (Слика 45, **Ag5** комплекс).[118,119]Апсорпциони максимум у овим спектрима који се јавља на $\lambda_{max} \approx 290$ nm може се приписати прелазима унутар лиганда. У поређењу са апсорпционим максимумом некоординованог вориконазола (λ_{max} = 256 nm), сви комплекси сребра(I) показују изражено батохромно померање, што указује на измену електронске структуре лиганда услед његове координације за јон сребра(I). У циљу испитивања стабилности у раствору, снимање UV-Vis спектара комплекса **Ag5** – **Ag8** поновљено је након стајања одговарајућих раствора 24 и 48 h на собној температури у мраку. Како се види на слици 45, уочено је само незнатно опадање интензитета апсорпције (3 – 7%), што указује на задовољавајућу стабилност испитиваних једињења у раствору у одсуству биомолекула, као што су протеини који садрже тиолну функционалну групу. Као што је већ напоменуто, познато је да интеракције јона сребра(I) са тиолним групама у протеинима доводе до њиховог ослобађања из комплекса, што је повезано са испољавањем антимикробног дејства.[177]



Слика 45. UV-Vis спектри **Ag5** комплекса у DMSO на собној температури у различитим временским интервалима

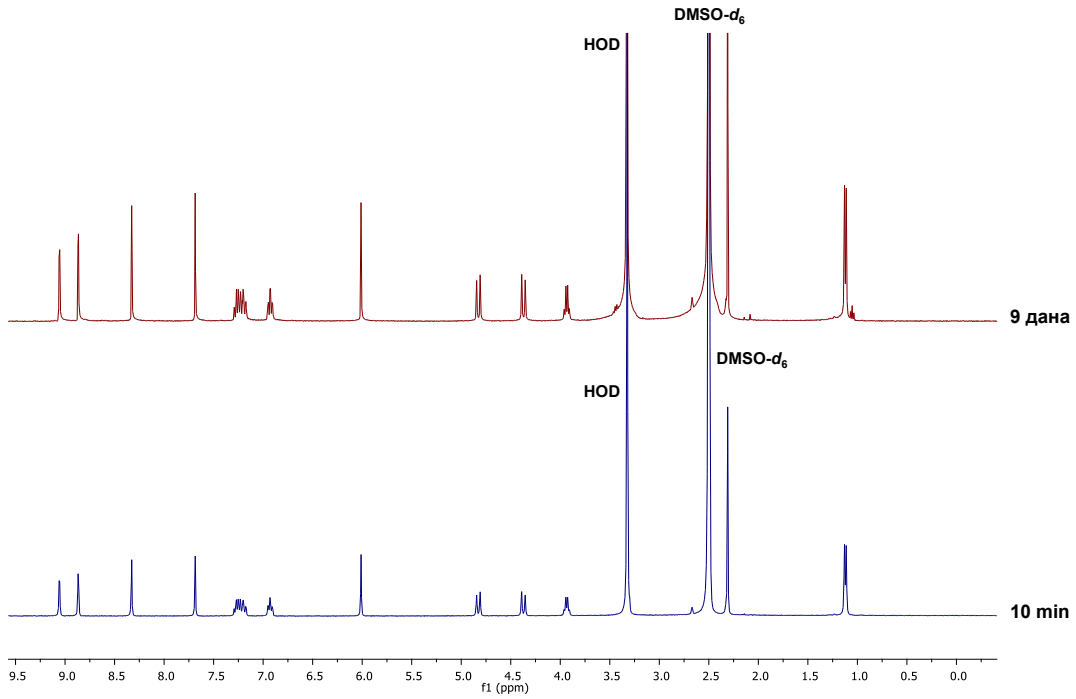
ESI-MS спектри комплекса **Ag5** – **Ag8**, снимљени у ацетонитрилу, показују доминантне сигнале на *m/z* = 497,0447 (**Ag5**), *m/z* = 456,0193 (**Ag6**), 807,1324 (**Ag7**) и 456,0188 (**Ag8**).[118,119] Ове вредности су у доброј сагласности са израчунатим *m/z* за катјоне $[Ag(vcz)]^+$ (*m/z* = 456,0201 за **Ag6** и **Ag8**), $[Ag(vcz)(CH_3CN)]^+$ (*m/z* = 497,0467 за **Ag5**), и $[Ag(vcz)_2]^+$ (*m/z* = 807,1352 за **Ag7**), што указује да су у раствору, под условима ESI-MS анализе, присутне мононуклеарне катјонске јединице.

^{1}H NMR спектри комплекса **Ag5 – Ag8** и слободног лиганда вориконазола снимљени су у DMSO-d_6 на собној температури (Слика 46, **Ag5** комплекс).[118,119] ^{1}H NMR спектри комплекса показују незнатна померања сигнала протона у односу на исте протоне некоординованог вориконазола. Најизраженија координациона померања, $\Delta\delta(^1H)_{coord}$, израчуната у односу на слободни вориконазол, износе +0,08 ppm за **Ag5**, +0,10 ppm за **Ag6**, +0,05 ppm за **Ag7** и +0,07 ppm за **Ag8** и односе се на H5 протон триазоловог прстена, који је на угљениковом атому суседном координованом атому азота.



Слика 46. ^{1}H NMR спектри **Ag5** комплекса и вориконазола у DMSO-d_6 на собној температури (200 MHz)

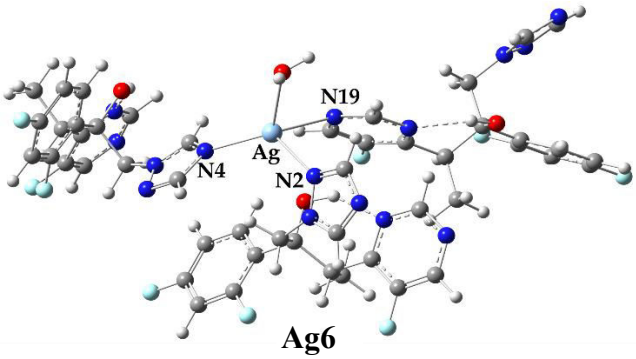
У циљу испитивања стабилности у раствору, снимања ^{1}H NMR спектара комплекса **Ag5** – **Ag8** поновљена су 9 дана након стајања одговарајућих раствора на собној температури у мраку (Слика 47, комплекс **Ag6**).[118,119] Као што се може видети, не долази до појаве нових сигнала у ^{1}H NMR спектру комплекса, на основу чега се може закључити да vcz остаје координован за јон сребра(I) у испитиваном временском периоду.



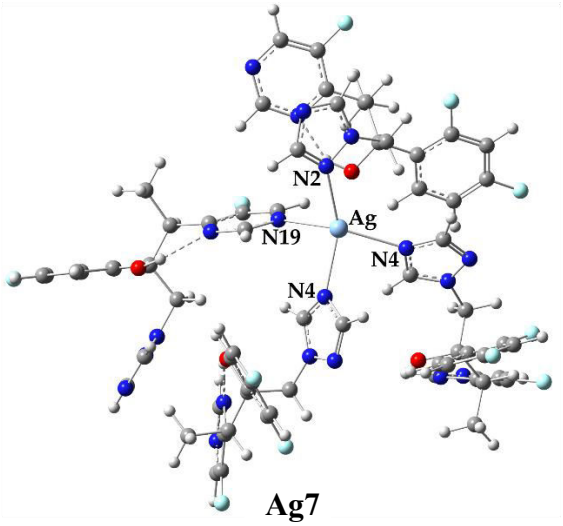
Слика 47. ^{1}H NMR спектри **Ag6** комплекса снимљени у различитим временским интервалима у DMSO-d_6 на собној температури (200 MHz)

4.3.2. DTF прорачуни

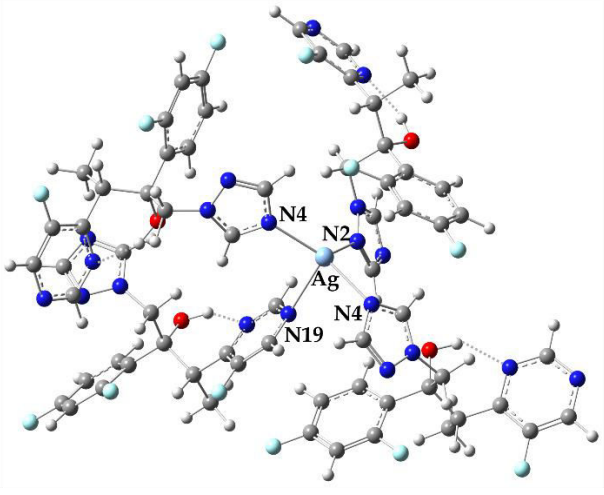
Ради свеобухватне анализе структура и особина синтетисаних комплекса сребра(I) са вориконазолом (**Ag6** – **Ag8**) у DMSO, испитана је термодинамика могућих реакција њиховог формирања и дисоцијације.[119] Оптимизоване тетраедарске геометрије испитиваних комплекса у DMSO приказане су на слици 48, док су одговарајуће линеарне геометрије приказане на слици 49.



Ag6

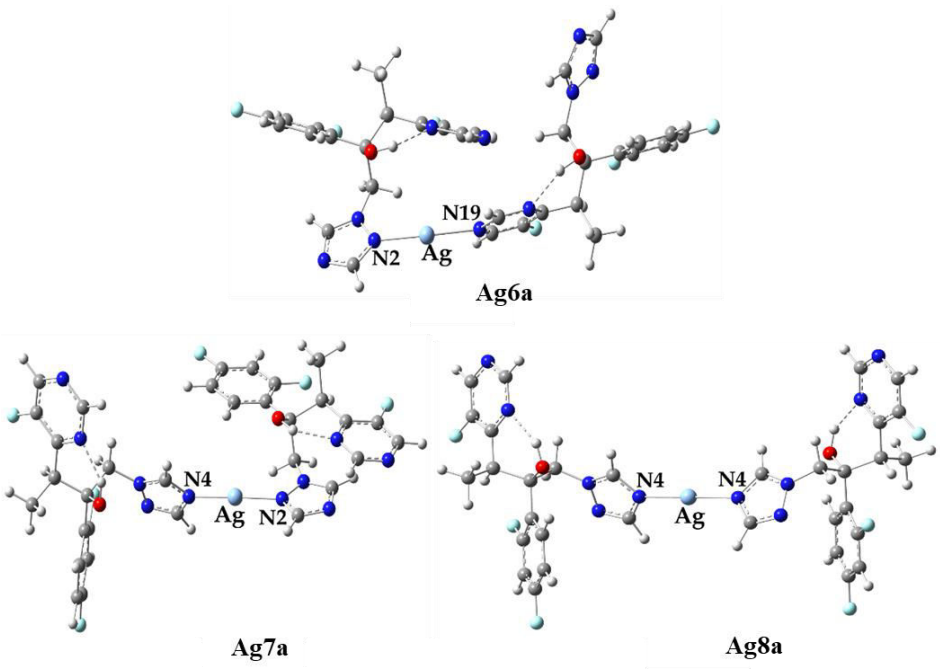


Ag7



Ag8

Слика 48. Оптимизоване тетраедарске геометрије комплекса **Ag6 – Ag8** у DMSO, добијене применом функционала M06-2X у комбинацији са базним скуповима 6-311+G(d,p) за атоме C, H, O, N и F и LANL2TZ(*f*) за Ag атом. Испрекидане линије означавају водоничне везе. Легенда: C (сива), H (бела), O (црвена), N (тамноплава), Ag (светлоплава)



Слика 49. Оптимизоване линеарне геометрије комплекса [Ag(vcz-*N2*)(vcz-*N19*)]$^+$ (**Ag6**), [Ag(vcz-*N2*)(vcz-*N4*)]$^+$ (**Ag7**) и [Ag(vcz-*N4*)$_2$]$^+$ (**Ag8**) у DMSO, добијене применом функционала M06-2X у комбинацији са базним скуповима 6-311+G(d,p) за C, H, O, N и F атоме и LANL2TZ(*f*) за Ag атом. Испрекидане линије означавају водоничне везе. Легенда: C (сива), H (бела), O (црвена), N (тамноплава), Ag (светлоплава)

Вредности Δ*G* (298 K) за реакције формирања (Δ$_f$G°) и дисоцијације (Δ$_d$G°) комплекса **Ag6 – Ag8** у DMSO израчунате су као разлика Гибсове слободне енергије између производа и реактаната, применом функционала M06-2X у комбинацији са базним скуповима 6-311+G(d,p) за све атоме осим сребра и LANL2TZ(*f*) за Ag атом (Табела 11).

Табела 12. Промена слободне Гибсове енергије (T = 298,15 K, kJ/mol) формирања (ΔG_f^0)/дисоцијације (ΔG_d^0) као и константе формирања (K_f)/дисоцијације (K_d) испитиваних комплекса **Ag6 – Ag8**, израчунате применом функционала M06-2X у комбинацији са базним скуповима 6-311+G(d,p) за атоме C, H, O, N и F и LANL2TZ(*f*) за Ag

Комплекс	Реакције формирања/дисоцијације комплекса	$\Delta G_f^0/\Delta G_d^0$	K_f/K_d
Ag6	$AgCH_3SO_3$ + 2vcz ⇌ [Ag(vcz-*N2*)(vcz-*N19*)]$^+$ (**Ag6a**) + $CH_3SO_3^-$	-32,5	$4{,}93 \times 10^5$
	[Ag(vcz-*N2*)(vcz-*N4*)(vcz-*N19*)(H_2O)]$^+$ ⇌ [Ag(vcz-*N2*)(vcz-*N19*)]$^+$ + vcz + H_2O	-44,6	$6{,}42 \times 10^7$
	[Ag(vcz-*N2*)(vcz-*N19*)]$^+$ (**Ag6a**) + 2DMSO ⇌ [Ag(DMSO)$_2$]$^+$ + 2vcz	49,9	$1{,}83 \times 10^{-9}$
Ag7	$AgBF_4$ + 2vcz ⇌ [Ag(vcz-*N2*)(vcz-*N4*)]$^+$ (**Ag7a**) + BF_4^-	-15,9	$6{,}19 \times 10^2$
	[Ag(vcz-*N2*)(vcz-*N4*)$_2$(vcz-*N19*)]$^+$ ⇌ [Ag(vcz-*N2*)(vcz-*N4*)]$^+$ (**Ag7a**) + 2vcz	-20,9	$4{,}59 \times 10^3$
	[Ag(vcz-*N2*)(vcz-*N4*)]$^+$ (**Ag7a**) + 2DMSO ⇌ [Ag(DMSO)$_2$]$^+$ + 2vcz	39,5	$1{,}83 \times 10^{-7}$
Ag8	$AgPF_6$ + 2vcz ⇌ [Ag(vcz-*N4*)$_2$]$^+$ (**Ag8a**) + PF_6^-	-14,3	$3{,}23 \times 10^2$
	[Ag(vcz-*N2*)(vcz-*N4*)$_2$(vcz-*N19*)]$^+$ ⇌ [Ag(vcz-*N4*)$_2$]$^+$ (**Ag8a**) + 2vcz	-15,9	$6{,}10 \times 10^2$
	[Ag(vcz-*N4*)$_2$]$^+$ (**Ag8a**) + 2DMSO ⇌ [Ag(DMSO)$_2$]$^+$ + 2vcz	23,0	$9{,}43 \times 10^{-5}$

Испитиване су реакције формирања комплекса **Ag6 – Ag8** између соли сребра(I) коришћених у синтези ($AgCH_3SO_3$, $AgBF_4$ и $AgPF_6$) и вориконазола у стехиометријском односу 1 : 2.[119] Добијени резултати показују да су све реакције праћене негативним вредностима промене слободне енергије ($\Delta G°_f < 0$), што указује на њихову спонтаност и термодинамичку повољност. На основу тога може се закључити да је формирање линеарних комплекса сребра(I) термодинамички фаворизовано, при чему у комплексирању учествују атоми азота из ароматичног триазоловог прстена (N2 за **Ag6**, N2 и N4 за **Ag7** и два N4 атома за **Ag7**), као и атом азота пиримидинског прстена (N19 за **Ag6**). Реакције комплексирања карактеришу високе вредности константи формирања ($K_f > 10^2$), што указује на повољно и стабилно везивање вориконазола за јон сребра(I).

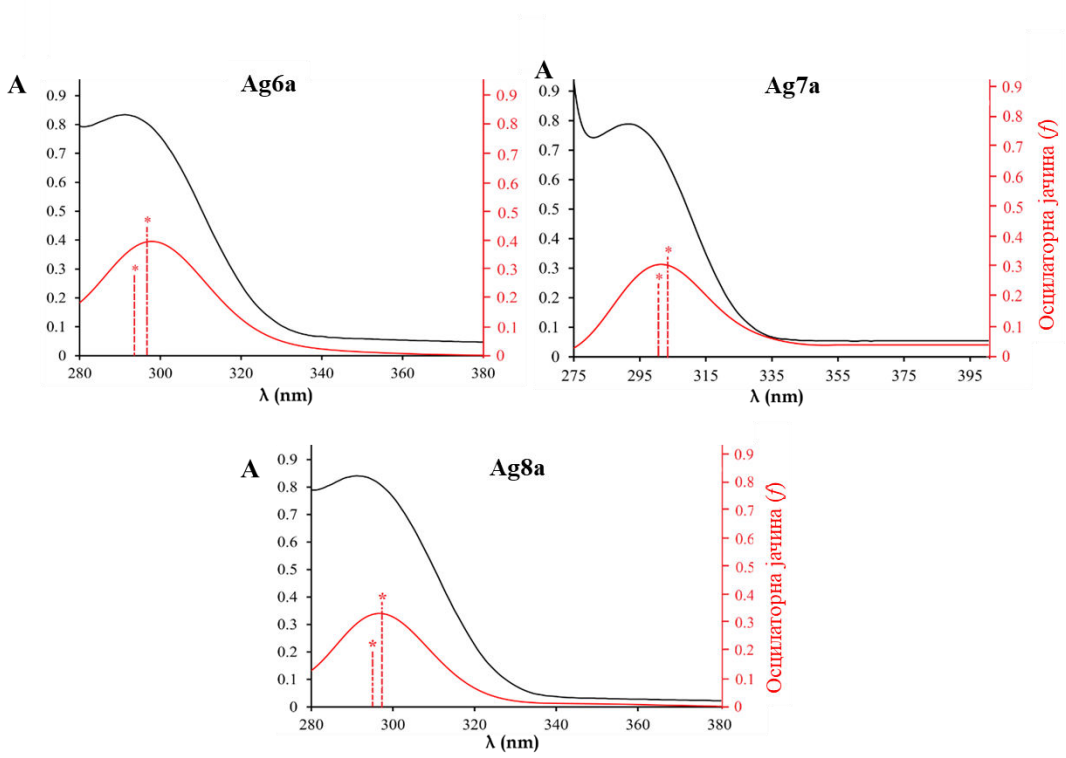
С друге стране, испитивање дисоцијације комплекса сребра(I) са вориконазолом започето је моделовањем хидролизе врста $[Ag(vcz\text{-}\textit{N2})(vcz\text{-}\textit{N4})(vcz\text{-}\textit{N19})(H_2O)]^+$ (за комплекс **Ag6**) и $[Ag(vcz\text{-}\textit{N2})(vcz\text{-}\textit{N4})_2(vcz\text{-}N19)]^+$ (за комплексе **Ag7** и **Ag8**). Термодинамика елиминације два vcz лиганда код врсте $[Ag(vcz\text{-}\textit{N2})(vcz\text{-}\textit{N4})_2(vcz\text{-}N19)]^+$, односно једног vcz лиганда и једног молекула воде код врсте $[Ag(vcz\text{-}\textit{N2})(vcz\text{-}\textit{N4})(vcz\text{-}\textit{N19})(H_2O)]^+$, резултира формирањем линеарних комплекса **Ag6a** – **Ag8a**. Ове реакције карактеришу негативне вредности промене слободне енергије ($\Delta G_d^0 < 0$) и константе дисоцијације $K_d > 1$, што указује да је процес дисоцијације тетраедарских врста и формирање линеарних комплекса термодинамички повољан. Насупрот томе, стабилност линеарних комплекса **Ag6a** – **Ag8a** у присуству DMSO карактерише позитивна вредност промене слободне енергије дисоцијације ($\Delta G°_d > 0$) и вредности $K_d < 1$, што указује на њихову термодинамичку стабилност у раствору. На основу ових резултата може се закључити да испитивани комплекси сребра(I) са вориконазолом у DMSO постоје превасходно у облику стабилних линеарних врста **Ag6a** – **Ag8a**.

Ради одређивања геометријских параметара комплекса сребра(I) са вориконазолом у DMSO, симулирана су ^{1}H NMR хемијска померања у односу на тетраметилсилан (TMS) као инертни референтни стандард (Табела 13). Висок коефицијент корелације ($R > 0,991$) између експерименталних и израчунатих хемијских померања, као и ниске вредности средње апсолутне грешке (MAE < 0,60 ppm), јасно потврђују присуство линеарних комплекса **Ag6a** – **Ag8a** у поларном растварачу DMSO. Ови резултати указују да примењени теоријски модел поуздано описује структуру синтетисаних једињења у раствору. Истовремено, употреба имплицитног модела растварача и одсуство експлицитних интеракција са молекулима растварача условљавају незнатна одступања у вредностима хемијских померања за ароматичне протоне H9, H18 и H20, што је у складу са очекивањима за овакве моделе солватације.

Табела 13. Експерименталне и израчунате вредности хемијских померања у ^{1}H NMR спектрима комплекса сребра(I) са вориконазолом, добијене применом функционала M06-2X у комбинацији са базним скуповима 6-311+G(d,p) за C, H, O, N и F атоме и LANL2TZ(*f*) за Ag атом

Протон	Експериментално, δ (ppm)			Теоријски, δ (ppm)		
	Ag6	**Ag7**	**Ag8**	**Ag6a**	**Ag7a**	**Ag8a**
H15	1,10	1,15	1,12	1,15	1,12	1,09
H14	3,93	3,93	3,91	4,73	4,38	4,68
H6	4,60	4,58	4,56	5,06	4,78	4,50
-OH	6,02	6,01	6,01	6,40	6,14	6,68
H10	6,93	6,92	6,94	7,34	7,18	7,55
H12	7,19	7,18	7,22	7,47	7,01	8,29
H9	7,26	7,27	7,22	8,39	8,48	7,85
H3	7,70	7,66	7,68	7,75	7,86	7,94
H5	8,34	8,29	8,31	8,66	9,09	9,08
H20	8,87	8,86	8,87	8,98	9,38	9,64
H18	9,06	9,05	9,06	9,75	9,80	9,90
MAE	/	/	/	0,43	0,41	0,60
R	/	/	/	0,991	0,991	0,995

Присуство комплекса **Ag6a** – **Ag8a** у DMSO додатно је потврђено поређењем експерименталних и симулираних UV-Vis спектара, приказаних на слици 50. Представљено је преклапање експерименталних (црна линија) и теоријски израчунатих (црвена линија) UV-Vis спектара, изражених као функција апсорбанције (односно осцилаторне снаге) у зависности од таласне дужине (nm). Усаглашеност положаја и интензитета апсорпционих трака указује да примењени рачунски модел успешно репродукује електронске прелазе комплекса у раствору, што додатно потврђује да комплекси у DMSO постоје у облику линеарних врста **Ag6a** – **Ag8a**.



Слика 50. Експериментални (црна линија) и теоријски UV-Vis спектри (црвена линија) комплекса сребра(I) са вориконазолом у раствору, израчунати применом функционала M06-2X и базних скупова 6-311+G(d,p) за све атоме осим сребра и LANL2TZ(*f*) за Ag атом, уз DMSO као модел растварача. Симбол * означава осцилаторне јачине електронских прелаза

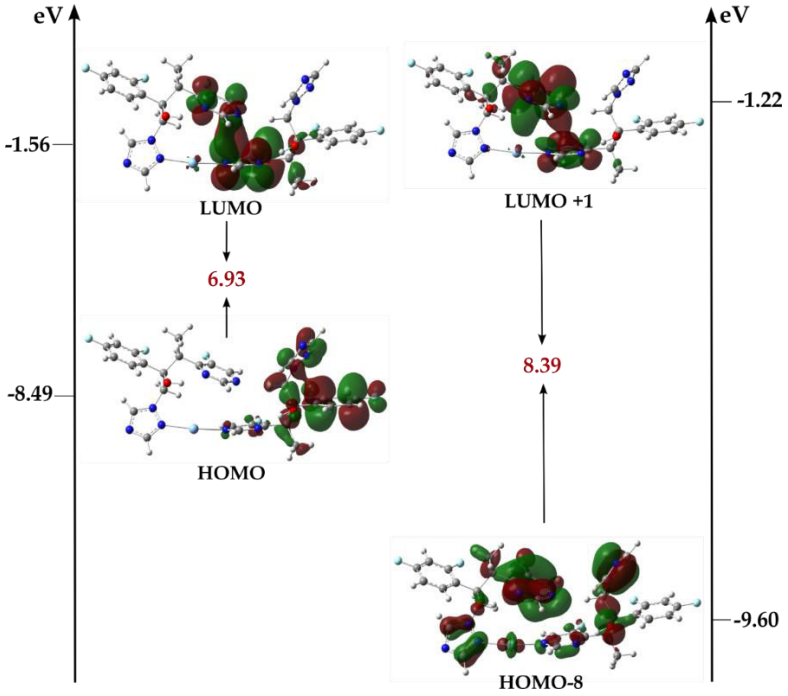
Квантитативне експерименталне и теоријске вредности најзначајнијих електронских прелаза између HOMO и LUMO орбитала приказане су у табели 14. Експериментални UV-Vis спектри комплекса сребра(I) са вориконазолом показују један доминантан апсорпциони максимум на таласним дужинама од 291 nm за комплексе **Ag6** и **Ag7** и 292 nm за комплекс **Ag8** (Табела 14).

Табела 14. Експериментални и теоријски подаци за таласне дужине максимума апсорпције (λ_{max}), осцилаторне снаге (*f*) и енергије електронских прелаза за комплексе сребра(I) са вориконазолом

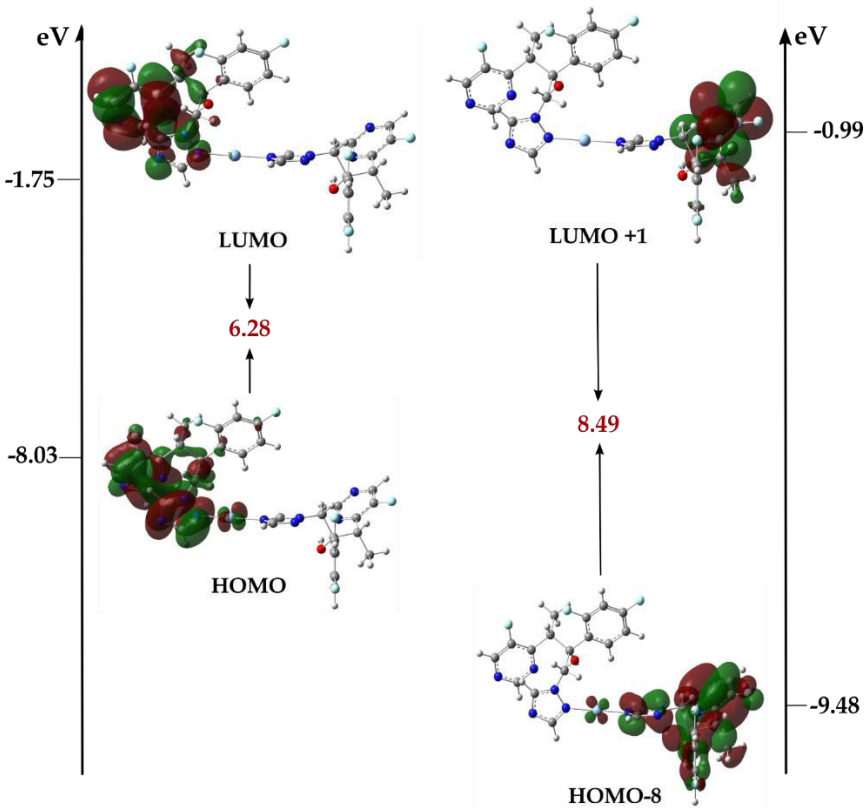
Комплекс	Експерименталне вредности (λ, nm)	Теоријске вредности		
		λ (nm)	*f*	Прелаз електрона
Ag5	291	292	0,230	HOMO–8 → LUMO+1 (60%)
		297	0,439	HOMO → LUMO (52%)
Ag6	291	298	0,115	HOMO–8 → LUMO+1 (60%)
		304	0,231	HOMO → LUMO (52%)
Ag7	292	296	0,125	HOMO–8 → LUMO+1 (60%)
		298	0,324	HOMO → LUMO (52%)

У симулираним UV-Vis спектрима уочава се доминантан апсорпциони максимум који потиче од два главна електронска прелаза. Појава пикова на таласним дужинама од

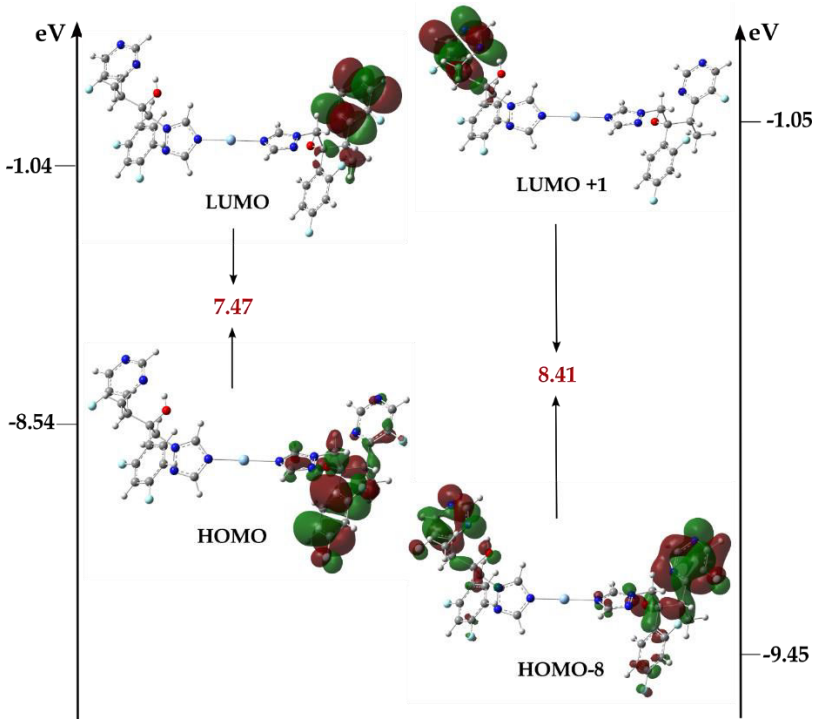
292 nm (**Ag6a**, f = 0,230), 298 nm (**Ag7a**, f = 0,115) и 295 nm (**Ag8a**, f = 0,230) у теоријским спектрима може се приписати углавном HOMO → LUMO прелазима, са учешћем од приближно 60% (Слике 51 – 53).



Слика 51. Енергетски дијаграми HOMO и LUMO молекулских орбитала укључених у главне електронске прелазе за комплекс **Ag6a** са карактеристичним вредностима енергије орбитале (црно, eV) и енергетског јаза (црвено, eV)



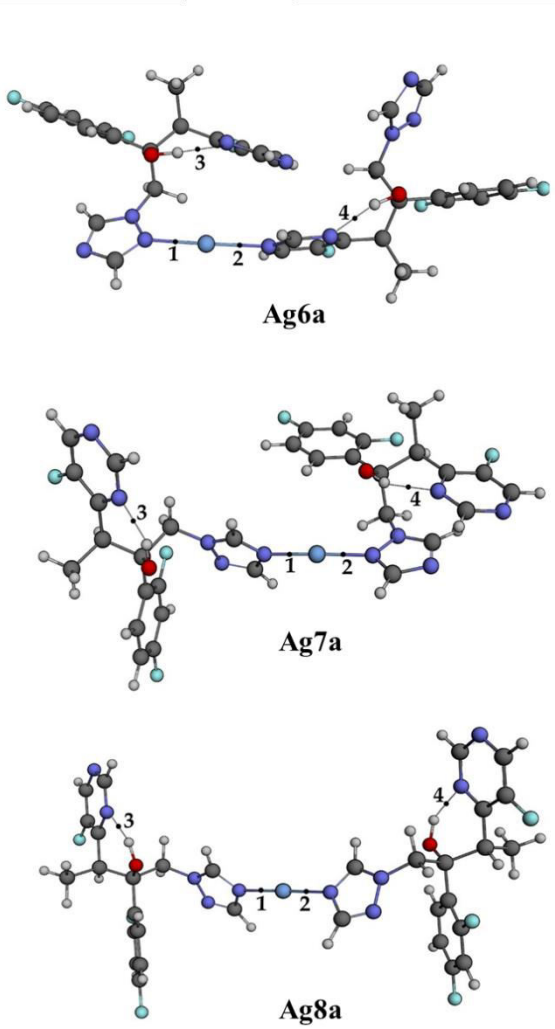
Слика 52. Енергетски дијаграми HOMO и LUMO молекулских орбитала укључених у главне електронске прелазе за комплекс **Ag7a** са карактеристичним вредностима енергије орбитале (црно, eV) и енергетског јаза (црвено, eV)



Слика 53. Енергетски дијаграми HOMO и LUMO молекулских орбитала укључених у главне електронске прелазе за комплекс **Ag8a** са карактеристичним вредностима енергије орбитале (црно, eV) и енергетског јаза (црвено, eV)

Супротно овоме, уочени пикови на нешто већим таласним дужинама: 297 (**Ag6a**, $f = 0{,}439$), 307 (**Ag7a**, $f = 0{,}231$) и 295 (**Ag8a**, $f = 0{,}230$), са већим вредностима фреквенције осциловања могу се приписати HOMO-8 и LUMO+1 прелазима (Слике 51 – 53). Разлика између експерименталних и теоријских вредности може се приписати прорачуну електронских прелаза у поларизабилном без експлицитног моделирања специфичних интеракција са молекулима растварача. Све наведено иде у прилог чињеници да испитивани комплекси поседују значајан број реактивних места која могу да успоставе снажне интермолекулске интеракције са молекулима растварача и промене положај електронског нивоа.

Применом QTAIM анализе испитиване су значајне интрамолекулске интеракције које имају значајну улогу у стабилизацији структура комплекса сребра(I) са вориконазолом у DMSO. На слици 54, могу се уочити значајне критичне тачке (*bond critical points*, BCP, **1** – **4**), док табела 15 представља квантитативне вредности значајних QTAIM параметара: електронска густина ($\rho(r)$), Лапласијанова (Laplacian) електронска густина ($\nabla^2\rho(r)$), укупна густина енергије електрона ($H(r)$), однос потенцијала ($V(r)$) и густина кинетичке енергије ($G(r)$) и енергија интеракције (E_{int}).



Слика 54. Оптимизоване геометрије комплекса **Ag6a – Ag8a** у DMSO са представљеним критичним тачкама (BCP, **1** – **4**) процењеним QTAIM анализом

Критичне тачке BCP-**1** и BCP-**2** код свих испитиваних комплекса карактеришу негативне вредности локалне енергетске густине $H(r)$, као и однос $-G(r)/V(r)$ који се налази у опсегу $0,5 < -G(r)/V(r) < 1$. Ове тачке показују повишене вредности густине електрона $\rho(r)$ и Лапласијанове густине $\nabla^2\rho(r)$, што указује да се BCP-**1** и BCP-**2** могу класификовати као координационе везе са израженим ковалентним карактером. Енергија интеракције (E_{int}, kJ/mol) повезана са овим везама креће се у интервалу од –105,4 до –222,7 kJ/mol. Насупрот томе, критичне тачке BCP-**3** и BCP-**4** одликују се нижим вредностима $\rho(r)$ и $\nabla^2\rho(r)$, уз благо негативне вредности $H(r)$ и однос $-G(r)/V(r)$ у истом опсегу ($0,5 < -G(r)/V(r) < 1$). Ови параметри указују да се уочене интеракције могу класификовати као јаке водоничне везе. Вредности енергије интеракције за ове контакте налазе се у распону од –25,6 до –31,6 kJ/mol.

Табела 15. Процењене вредности релевантних QTAIM параметара за критичне тачке везе (BCP **1–4**) код комплекса **Ag6a – Ag8a**, добијене применом функционала M06-2X у комбинацији са базним скуповима 6-311+G(d,p) за атоме C, H, O, N и F и LANL2TZ(*f*) за Ag атом

Критичне тачке	$\rho(r)$	$\nabla^2\rho(r)$ (a.u)	$G(r)$ (kJ/mol)	$V(r)$ (kJ/mol)	$H(r)$ (kJ/mol)	$-(G(r)/(V(r))$	E_{int} (kJ/mol)
Ag6a							
1	0,062	0,296	208,12	-221,95	-13,83	0,94	- 111,0
2	0,060	0,280	197,22	-210,70	-13,48	0,94	-105,4
3	0,032	0,095	62,68	-63,23	-0,55	0,99	-31,6
4	0,026	0,078	51,29	-51,27	0,02	1,00	-25,6
Ag7a							
1	0,103	0,477	375,96	-438,86	-62,90	0,86	-219,4
2	0,103	0,492	384,20	-445,36	-61,17	0,86	-222,7
3	0,041	0,122	83,84	-87,89	-4,05	0,95	-43,9
4	0,034	0,105	71,35	-73,52	-2,17	0,97	-36,8
Ag8a							
1	0,067	0,316	226,11	-244,82	-18,71	0,92	-122,4
2	0,067	0,317	226,54	-245,34	-18,80	0,92	-122,7
3	0,029	0,085	56,87	-57,79	-0,92	0,98	-28,9
4	0,029	0,085	56,75	-57,65	-0,91	0,98	-28,8

4.3.3. Испитивање антигљивичне активности комплекса Ag5 – Ag8

Ефекти комплексирања клинички коришћеног вориконазола са јоном сребра(I) и *in vitro* антигљивична активност (MIC вредности) приказани су у табели 16.[118,119] Испитивана једињења показала су изузетно изражену антигљивичну активност. У поређењу са клинички коришћеним вориконазолом, комплекси сребра(I) испољили су значајно повећану анти-*Candida* активност. Комплекс **Ag5** показао је 140 пута већу активност према *C. krusei* и 9500 пута већу активност према *C. glabrata* у односу на vcz. Комплекс **Ag6** показао је 256 пута већу активност према *C. albicans* и чак 11440 пута већу активност према *C. glabrata* у односу на vcz. Подаци за комплекс **Ag7** указују на 199 пута већу активност према *C. albicans*, 15 пута већу према *C. parapsilosis*, 11 пута већу према *C. krusei* и 9533 пута већу активност према *C. glabrata* у поређењу са vcz. Комплекс **Ag8**

такође је показао значајно побољшану анти-*Candida* активност, са 105 пута већом активношћу према *C. albicans*, 15 пута већом према *C. parapsilosis*, 11 пута већом према *C. krusei* и 545 пута већом активношћу према *C. glabrata* у односу на вориконазол.

Табела 16. Минималне инхибиторне концентрације (MIC, μM) комплекса сребра(I) **Ag5 –Ag8**, вориконазола (vcz) и одфоварајућих соли сребра(I) према *Candida* сојевима, у поређењу са њиховим IC_{50} вредностима (μM). Вредности стандардних девијација су између 0 и 2%

Испитивани сојеви Једињење	*C. albicans* ATCC 10231	*C. parapsilosis* ATCC 22019	*C. krusei* ATCC 6258	*C. glabrata* ATCC 2001	MRC-5
Ag5	0,48	0,01	0,01	0,06	36,1
$AgSbF_6$	3,64	0,09	4,66	2,33	18,3
Ag6	0,14	0,14	0,88	0,05	17
$AgCH_3SO_3$	3,05	0,15	1,23	7,88	< 6,25
Ag7	0,18	0,02	0,13	0,06	17
$AgBF_4$	3,18	0,15	0,31	8,22	> 50
Ag8	0,34	0,02	0,13	1,05	23
$AgPF_6$	2,45	0,24	0,63	6,33	29
vcz	35,8	0,30	1,4	572	859

Добијени резултати у складу су са раније објављеним за комплексе сребра(I) са вориконазолом као лигандом, као што су $\{[Ag(vcz)_2]ClO_4\}_n$ и $\{[Ag(vcz)_2]NO_3\}_n$.[217] Ово указује да комплексирање клинички коришћеног антимикотика вориконазола са јонима сребра(I) представља перспективан приступ за развој нових и ефикаснијих терапеутских стратегија у лечењу инфекција изазваних врстама из рода *Candida.*

Соли сребра(I) које су коришћене за синтезу комплекса показале су изражен анти-*Candida* потенцијал и у појединим случајевима испољиле бољу антигљивичну активност у односу на vcz, посебно према сојевима *C. albicans* и *C. glabrata* (Табела 16). Њихова анти-*Candida* активност је нешто мања у поређењу са одговарајућим комплексима сребра(I). Ипак, директна примена простих соли сребра(I) у терапији микробних инфекција значајно је ограничена услед њихове брзе дисоцијације у физиолошким условима, што доводи до формирања и таложења слабо растворног AgCl и, последично, до смањене биорасположивости и терапеутске ефикасности.[177]

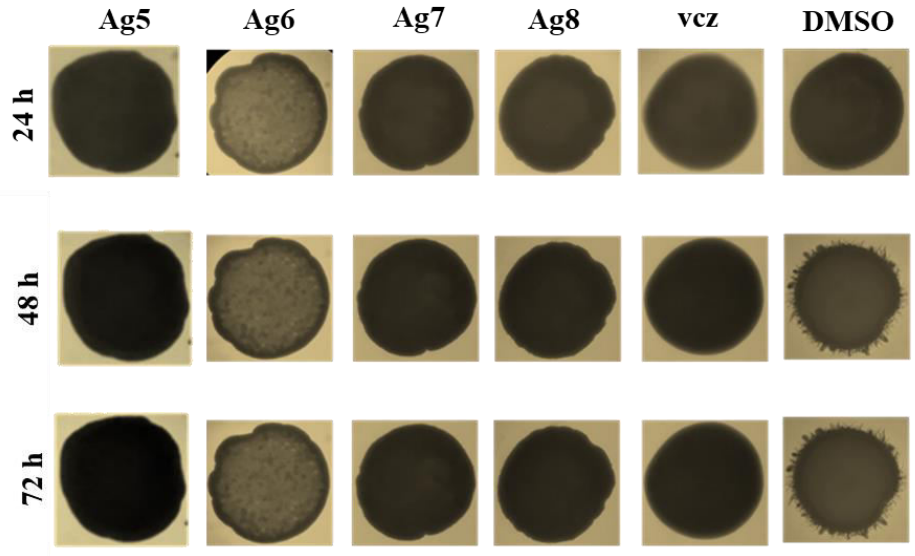
Комплекси сребра(I) **Ag5** – **Ag8** показали су израженији цитотоксични ефекат на здраве MRC-5 ћелије у поређењу са vcz, при чему су IC_{50} вредности биле значајно ниже од оних за vcz. Конкретно, цитотоксичност је била приближно 50 пута већа за комплексе **Ag6** и **Ag7**, 37 пута већа за **Ag8** и 24 пута већа за **Ag5**. Ипак, израчунате SI вредности (Табела 17) за комплексе **Ag5** – **Ag8** у односу на испитиване сојеве рода *Candida* указују на повољан однос ефикасности и цитотоксичности. SI вредности крећу се од 19,3 за комплекс **Ag6** према *C. krusei* до 3610 за комплекс **Ag5** према *C. parapsilosis* и *C. krusei*, што указује на значајан терапеутски потенцијал ових једињења.

Табела 17. Вредности индекса селективности (SI) за комплексе **Ag5** – **Ag8** и vcz према испитиваним *Candida* сојевима

Испитивани сојеви Једињење	*C. albicans* ATCC 10231	*C. parapsilosis* ATCC 22019	*C. krusei* ATCC 6258	*C. glabrata* ATCC 2001
Ag5	75,2	3610	3610	601,7
Ag6	121,4	121,4	19,3	340
Ag7	94,4	850	130,8	283,3
Ag8	67,6	1150	176,9	21,9
вориконазол (vcz)	24	2863	613,6	1,5

Узимајући у обзир изузетно изражену анти-*Candida* активност и повољан терапеутски потенцијал нових комплекса сребра(I) са вориконазолом, који имају MIC вредности у распону од 0,01 до 1,05 μM, даље је испитиван њихов терапеутски ефекат на *C. albicans*.[118,119]

Досадашња истраживања показала су да присуство одређених јона метала, као што су Ag(I), Mn(II), Cd(II), Cu(II) и Zn(II), може инхибирати ћелијску диференцијацију сојева рода *Candida*.[100,172,218] У складу са тим, утицај комплекса сребра(I), **Ag5** – **Ag8**, и vcz на формирање хифа соја *C. albicans* испитиван је микроскопском анализом (Слика 55). Анализом микроскопских снимака уочено је да сва испитивана једињења при својим MIC вредностима у потпуности спречавају филаментацију *C. albicans*. Добијени резултати у сагласности су са претходним испитивањем које показују да вориконазол ефикасно инхибира трансформацију *C. albicans* из облика квасца у инвазивне хифе.[219,220]



Слика 55. Филаментација соја *C. albicans* у присуству MIC концентрација комплекса **Ag5** – **Ag8** и вориконазола након 24, 48 и 72 h, у поређењу са DMSO контролом

Гљивица *C. albicans* веома често учествује у формирању биофилма код имунокомпромитованих и медицински компромитованих пацијената, при чему формирање биофилма представља један од кључних фактора вируленције током развоја

кандидијаза.[221] Комплекси **Ag5** – **Ag8** показали су значајну способност инхибиције формирања биофилма соја *C. albicans* ATCC 10231 при концентрацији од 0,5 × MIC, са степеном инхибиције од 87% за **Ag5,** 79% за **Ag6**, 80% за **Ag7** и 77% за **Ag8.**[118,119] У поређењу са vcz (62%) инхибиција формирања биофилма у присуству комплекса сребра(I) је већа, истичући улогу јона сребра(I). С друге стране није примећен утицај комплекса и vcz на већ формиране биофилмове *C. albicans* соја. Поред тога, комплекси **Ag5** – **Ag8** у знатно већој мери инхибирају биосинтезу ергостерола у односу на некоординовани вориконазол.

4.3.4. Молекулски докинг

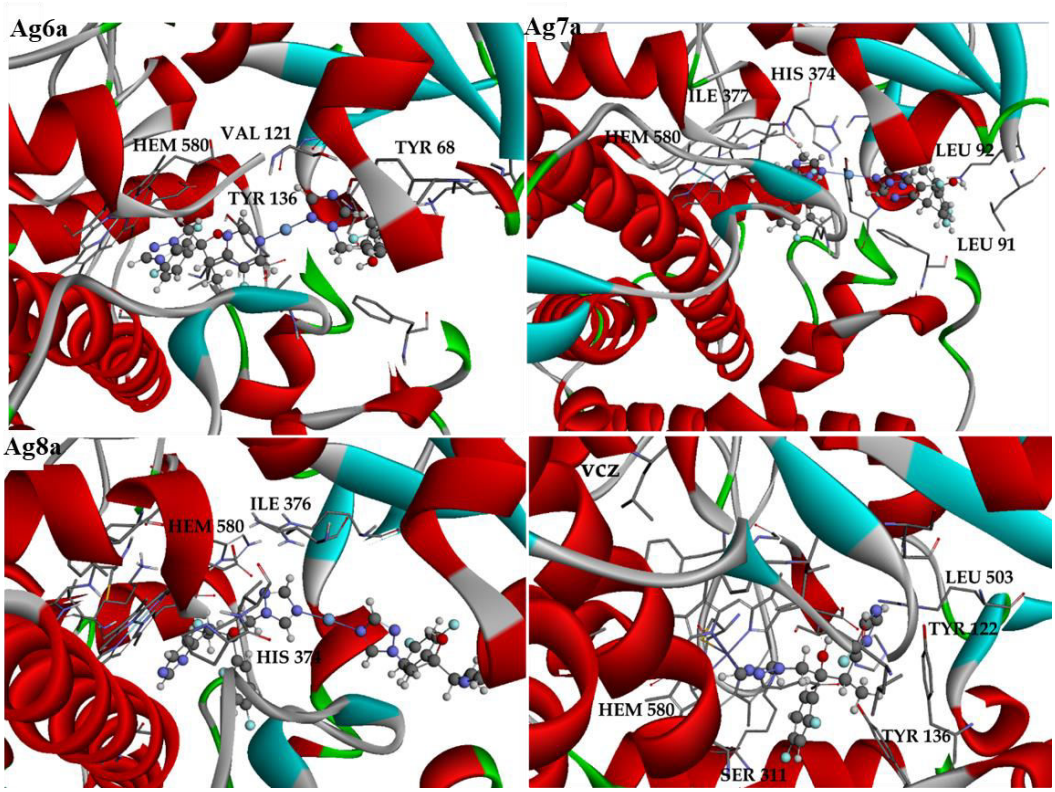
Азоли, пиридини и пиримидини испољавају инхибиторни ефекат на ензим стерол 14α-деметилазу цитохрома P450 (CYP51B, EC 1.14.13.70). Као што је већ напоменуто, овај ензим катализује низ оксидативних реакција којима се уклања 14α-метил група из циклизованих прекурсора стерола и представља кључну компоненту биосинтезе ергостерола, главног стерола присутног у ћелијским мембранама гљивица.[209] Смањење садржаја ергостерола има значајан утицај на структуру и функцију мембране, укључујући њену флуидност, пермеабилност и активност мембранских ензима. Инхибиторна активност вориконазола је повезана са његовом координацијом за гвожђе(II) јон у хем групи (HEM 580) цитохрома P450. Поред тога, слободни део молекула инхибитора успоставља додатне интеракције са протеинском компонентом ензима, које у великој мери одређују степен и стабилност инхибиције.[210,222]

Испитивање инхибиторног дејства комплекса сребра(I) са вориконазолом према ензиму CYP51B, као и његово поређење са инхибиторном активношћу некоординованог вориконазола, од изузетног је значаја за разјашњавање механизма њиховог антигљивичног деловања. У ову сврху анализирани су комплекси **Ag6a** – **Ag8a**, при чему су добијени резултати приказани у табели 18. Израчунати термодинамички параметри указују да сва испитивана једињења испољавају повећано инхибиторно дејство у односу на вориконазол, што је у сагласности са експерименталним биолошким резултатима. На основу вредности слободне енергије везивања (ΔG_{bind}) и константе инхибиције (K_{i}), реактивност испитиваних једињења опада у следећем редоследу: CYP51B–**Ag8a** > CYP51B–**Ag6a** > CYP51B–**Ag7a** > CYP51B–vcz.

Табела 18. Термодинамички параметри (ΔG_{bind} слободна енергија везе, K_{i} константа инхибиције, ΔG_{total} укупна унутрашња енергија, ΔG_{tor} торзиона слободна енергија, ΔG_{unb} невезивна енергија система, ΔG_{elec} електростатичка енергија и $\Delta G_{\text{vdw+hbond+desolv}}$ је збир дисперзије и обијања (ΔG_{vdw}), водоничне веза (ΔG_{hbond}), и дисолвационе енергије (ΔG_{desolv})) предвиђене за најповољнију конформацију комплекса **Ag6a** – **Ag8a** и vcz у активном месту CYP51B ензима

Конформације	ΔG_{bind}	K_{i} (μM)	ΔG_{inter}	$\Delta G_{\text{vdw+hbond+desolv}}$	ΔG_{elec}	ΔG_{total}	ΔG_{tor}	ΔG_{unb}
CYP51B–**Ag6a**	-9,43	0,12	-13,27	-13,21	-0,06	0,04	3,84	0,04
CYP51B–**Ag7a**	-9,37	0,13	-13,22	-13,10	-0,12	0,72	3,84	0,72
CYP51B–**Ag8a**	-10,70	0,14	-14,54	-14,42	-0,12	-3,02	3,84	-3,02
CYP51B–vcz	-7,61	2,66	-9,40	-9,34	-0,05	-1,86	1,79	-1,86

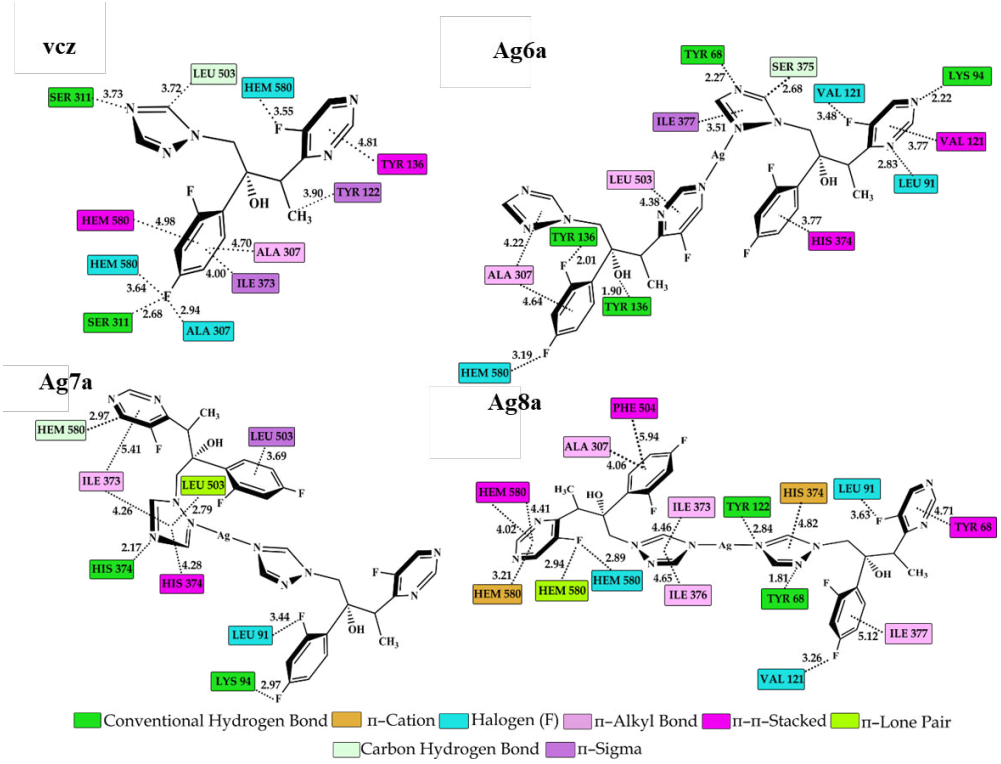
На слици 56 приказане су термодинамички најстабилније конформације испитиваних једињења у активном месту CYP51B ензима. Једињења су оријентисана тако да триазолов прстен, као и парцијално негативно наелектрисани атоми флуора ароматичног прстена, остварују интеракције са хетероцикличним протопорфиринским IX прстеном (HEM 580) и централним јоном метала кристализованим унутар структуре протеина.



Слика 56. Најповољније конформације комплекса **Ag6a** – **Ag8a** и вориконазола у активном месту CYP51B ензима (PDB код: 4UYM). Различите боје означавају различите атоме: C (сива), N (тамноплава), O (црвена), F (светлоплава) и Ag (плава). Ради боље прегледности, остатак структуре протеина је изостављен

Испитивање интеракција између проучаваних једињења и аминокиселинских остатака ензима од кључног је значаја за разумевање механизма њиховог деловања и за рационалан дизајн нових лекова. Слика 57 илуструје специфичне интеракције које доприносе стабилизацији испитиваних једињења унутар активног места ензима CYP51B. Конвенционалне водоничне везе представљају један од најзначајнијих облика интеракција који доприносе укупној стабилности комплекса и њиховој потенцијалној инхибиторној активности. Молекул vcz формира две водоничне везе са аминокиселинским остатком SER 311, на растојањима од 2,68 Å и 3,73 Å. Комплекс **Ag6a** остварује водоничне везе које укључују делимично негативно наелектрисан атом флуора ароматичног прстена (2,01 Å) и –OH групу (1,80 Å) са аминокиселинским остатком TYR136. Комплекс **Ag8a** формира водоничне везе између –OH група аминокиселинских остатака TYR68 (1,81 Å) и TYR122 (2,84 Å) и делимично позитивно наелектрисаних атома азота триазоловог прстена. Поред водоничних веза, остаци аминокиселина VAL121 и LEU91 учествују у формирању специфичних халогених интеракција, које настају између *σ*-рупе (позитивног електростатичког потенцијала) атома флуора у 5-флуорпиримидинском прстену и ароматичног система комплекса сребра(I) преко атома

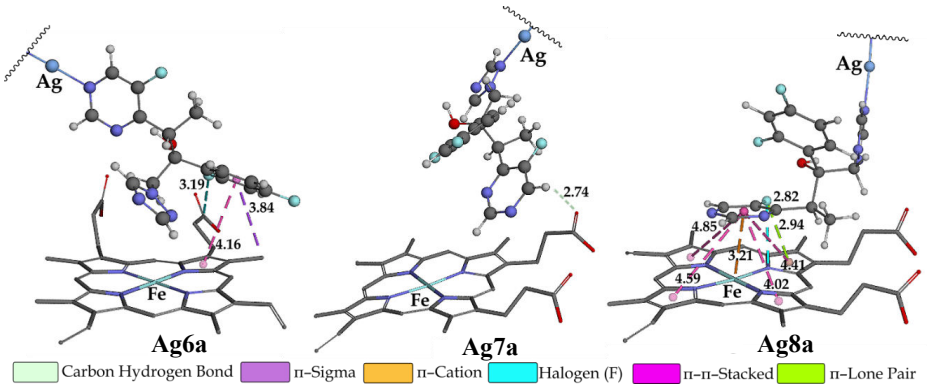
азота. Халогене интеракције су широко изучаване међумолекулске интеракције и имају значајну примену у области кристалног инжењерства и супрамолекулске хемије.[223,224] У контексту рационалног дизајна лекова, атоми халогена се често користе ради побољшања афинитета везивања, мембранске пермеабилности и метаболичке стабилности једињења.[225,226] На стабилност комплекса сребра(I) у активном месту ензима CYP51B додатно значајно утичу и хидрофобни контакти, укључујући π–σ интеракције са остацима TYR122, ILE373, ILE377 и LEU503, π–алкил интеракције са ALA307, ILE373, ILE376, ILE377 и LEU503, као и π–π интеракције са аминокиселинским остацима TYR68, VAL121, TYR136, HIS374 и PHE504.



Слика 57. 2D приказ интеракција између комплекса **Ag6a – Ag8a** и вориконазола и аминокиселинских остатака у активном месту CYP51 ензима (PDB код: 4UYM) са међуатомским растојањем добијеним након молекуског докинга. HEM580 је рекристализован протопорфирин IX који садржи Fe. Различите боје означавају различите врсте интеракција

Један део молекула испитиваних једињења остварује контакте са аминокиселинским остацима CYP51B ензима, док 5-флуорпиримидински прстен интерагује са хетероцикличним протопорфиринским IX прстеном (HEM580) који је рекристализован у структури протеина (Слика 58). Поравнање ароматичног 5-флуорпиримидинског прстена комплекса **Ag8a** са протопорфирином води формирању четири π–π интеракције са имидазоловим прстеновима HEM580. Централни јон гвожђа(II) са делимичним позитивним наелектрисањем додатно формира карактеристичну π–катјонску интеракцију са ароматичним 5-флуорпиримидинским прстеном на растојању од 3,21 Å. Комплекс **Ag8a** у активном месту CYP51B додатно је стабилизован интеракцијама са порфиринским прстеном путем π–слободан електронски пар интеракције (2,94 Å) и халогене везе (2,82 Å). Насупрот томе, комплекси **Ag6a** и **Ag7a** остварују ограничен број интеракција са HEM580, што је приказано на слици 58. Ови

резултати показују јасну корелацију са израчунатим ΔG_{bind} и K_i вредностима, указујући да комплекс **Ag8a** испољава највећу инхибиторну активност према CYP51B ензиму.



Слика 58. 3D приказ интеракција између 5-флуорпиримидинског прстена комплекса **Ag6a** – **Ag8a** и протопорфирина IX који садржи гвожђе (HEM 580). Различите боје означавају различите типове интеракција

5. ЗАКЉУЧАК

Приликом израде докторске дисертације синтетисано је осам комплекса сребра(I) са азолима (клотримазол, еконазол и вориконазол) као лигандима: $[Ag(ctz)_2]SbF_6$ (**Ag1**), $[Ag(ecz)_2]SbF_6$ (**Ag2**), $[Ag(ecz)_2]CF_3SO_3$ (**Ag3**), $[Ag(ecz)_2]PF_6$ (**Ag4**), $\{[Ag(vcz)_2]SbF_6\}_n$ (**Ag5**), $\{[Ag(vcz)(H_2O)]CH_3SO_3\}_n$ (**Ag6**), $\{[Ag(vcz)_2]BF_4\}_n$ (**Ag7**) и $\{[Ag(vcz)_2]PF_6\}_n$ (**Ag8**). Синтетисани комплекси су окарактерисани применом спектроскопских (NMR, UV-Vis, IR) и електрохемијских метода, и рендгенске структурне анализе, док је применом DFT прорачуна утврђено које комплексне врсте су термодинамички најстабилније у раствору. Применом UV-Vis спектрофотометрије утврђено је да одговарајући азол остаје координован за јон сребра(I) у раствору, чак и до 9 дана након растварања испитиваног комплекса.

Антигљивични лек клотримазол (ctz) коришћен је као лиганд за синтезу мононуклеарног сребро(I) комплекса, $[Ag(ctz)_2]SbF_6$ (**Ag1**). У овом комплексу, два ctz лиганда су координована монодентатно за јон сребра(I) преко имидазоловог атома азота, дајући комплекс линеарне геометрије. Комплекс **Ag1** показао је значајну антигљивичну активност према свим тестираним *Candida* сојевима, нарочито према *C. parapsilosis* (MIC = 0,01 μM) и *C. krusei* (MIC = 0,03 μM). Поред тога, активност овог комплекса је 9 пута (*C. glabrata*), 22 пута (*C. albicans*), 47 пута (*C. krusei*) и 1020 пута (*C. parapsilosis*) већа у поређењу са клотримазолом, док је цитоксичност комплекса на ћелијској линији фибробласта плућа 1,8 пута мања у односу на клотримазол. Присуство **Ag1** комплекса значајно смањује концентрацију ергостерола, док је клотримазол изазвао много мање смањење нивоа ергостерола у поређењу са контролним узорком. Поред тога, комплекс у потпуности инхибира формирање хифа *C. albicans* на чврстом медијуму, чак и до 72 h. Такође, овај комплекс је инхибирао формирање биофилма *C. albicans* при 0,5 × MIC за 86%, док је одговарајући азол инхибирао формирање биофилма за 79%, што указује на повољан ефекат присуства јона сребра(I).

Спектроскопски и кристалографски подаци за $[Ag(ecz)_2]X$ комплексе ($X = SbF_6^-$, $CF_3SO_3^-$ и PF_6^-; **Ag2** – **Ag4,** респективно) показали су да су у овим комплексима два ecz лиганда координована монодентатно за јон сребра(I) преко имидазоловог атома азота, формирајући линеарни $[Ag(ecz)_2]^+$ катјон, чије је наелектрисање неутралисано одговарајућим контра-анјоном. Ови комплекси су показали највећу антигљивичну активност према *C. parapsilosis*, са MIC вредностима у области од 0,61 до 2,25 μM, и били су активнији од еконазола (MIC = 3,9 μM). Поред тога, значајна активност уочена је за комплексе **Ag2** и **Ag4** према *C. albicans* (MIC = 2,25, односно 3,84 μM). Механизам деловања ових комплекса може се повезати са инхибицијом синтезе ергостерола или директном интеракцијом са овим стеролом, с обзиром на то да су ови комплекси значајно смањили садржај ергостерола при субинхибиторним концентрацијама (0,5 × MIC).

Кристалографска анализа комплекса сребра(I) са вориконазолом, $\{[Ag(vcz)_2]SbF_6\}_n$ (**Ag5**), $\{[Ag(vcz)(H_2O)]CH_3SO_3\}_n$ (**Ag6**), $\{[Ag(vcz)_2]BF_4\}_n$ (**Ag7**) и $\{[Ag(vcz)_2]PF_6\}_n$ (**Ag8**), показала је да су у чврстом стању ови комплекси полинуклеарни, при чему јони сребра(I) имају деформисане тетраедарске геометрије. Насупрот томе, DFT прорачуни су указали да су линеарне врсте $[Ag(vcz)_2]^+$ термодинамички најстабилније у раствору. Ови комплекси су показали значајну антигљивичну ефикасност, са MIC вредностима у области од 0,01 до 1,05 μM. Посебно је запажено да су били активнији од вориконазола, нарочито према *C. albicans* и *C. glabrata* сојевима. Поред тога, комплекси су у потпуности инхибирали формирање хифа код соја *C. albicans* и значајно инхибирали формирање биофилма овог соја при субинхибиторним концентрацијама. Поред инхибиције формирања биофилма, сребро(I) комплекси са вориконазолом су ефикасније инхибирали биосинтезу ергостерола у поређењу са некоординованим антимикотиком.

Може се закључити да координација антигљивичних азола за сребро(I) јон доводи до формирања комплексних једињења која показују побољшану антимикробну активност у односу на слободне азоле. Уочени синергизам између сребра(I) и антигљивичних лекова представља напредак у борби против антимикробне резистенције, која представља растући глобални здравствени проблем. Даље истраживање оваквих система има велики потенцијал за развој нове генерације антигљивичних лекова способних да превазиђу тренутна терапеутска ограничења.

6. ЛИТЕРАТУРА

1. M. D. Richardson, D. W. Warnock, *Fungal Infection: Diagnosis and Management*. Wiley, 2012.
2. A. K. Gupta, E. A. Cooper, *Mycopathol.* **166** (2008) 353.
3. M. A. Pfaller, D. J. Diekema, *Clin. Microbiol. Rev.* **20** (2007) 133.
4. M. Buckley, The Fungal Kingdom: diverse and essential roles in earth's ecosystem, 2008.
5. J. Jampilek, *Expert Opin. Drug Discov*. **11** (2015) 1.
6. G. D. Brown, D. W. Denning, N. A. R. Gow, S. M. Levitz, M. G. Netea, T. C. White, *Sci. Transl. Med.* **4** (2012) 165rv13.
7. J. R. Perfect, *Nat. Rev. Drug Discov.* **16** (2017) 603.
8. F. C. Odds, A. J. Brown, N. A. Gow, *Trends Microbiol.* **11** (2003) 272.
9. J. P. Latge, *Med. Mycol.* **47** (2009) S104.
10. N. A. R. Gow, J. P. Latge, C. A. Munro, *Microbiol. Spec.* **5** (2017) FUNK-0035.
11. D. J. Sheehan, C. A. Hitchcock, C. M. Sibley, *Clin. Microbiol. Rev*. **12** (1999) 40.
12. K. C. Howard, E. K. Dennis, D. S. Watt, S. Garneau-Tsodikova, *Chem. Soc. Rev.* **49** (2020) 2426.
13. N. H. Georgopapadakou, T. J. Walsh, *Antimicrob. Agents Chemother*. **40** (1996) 279.
14. Z. A. Kanafani, J. R. Perfect, *Clin. Infect. Dis.* **46** (2008) 120.
15. M. A. Pfaller, *Am. J. Med.* **125** (2012) S3.
16. M. A. Pfaller, D. J. Diekema, M. G. Rinaldi, R. Barnes, B. Hu, A. V. Veselov, N. Tiraboschi, E. Nagy, D. L. Gibbs, *J. Clin. Microbiol.* **43** (2005) 5848.
17. S. Wu, Y. Wang, N. Liu, G. Dong, C. Sheng, *J. Med. Chem.* **60** (2017) 2193.
18. M. C. Fisher, N. J. Hawkins, D. Sanglard, S. J. Gurr, *Science* **360** (2018) 739.
19. Y. Lee, E. Puumala, N. Robbins, L. E. Cowen, *Chem. Rev.* **121** (2021) 3390.
20. G. Aperis, E. Mylonakis, *Expert Opin. Inv. Drug*. **15** (2006) 579.
21. D. H. Ellis, S. Davis, H. Alexiou, R. Handke, R. Bartley, *Descriptions of Medical Fungi*, 2nd ed., 2007.
22. R. Laniado-Laborín, M. N. Cabrales-Vargas, *Rev. Iberoam. Micol.* **26** (2009) 223.
23. M. A. Ghannoum, L. B. Rice, *Clin. Microbiol. Rev.* **12** (1999) 501.
24. J. Brajtburg, W. G. Powderly, G. S. Kobayashi, G. Medoff, *Antimicrob. Agents Chemother.* **34** (1990) 183.
25. J. R. Wingard, M. H. White, E. Anaissie, J. Raffalli, J. Goodman, A. Arrieta, *Clin. Infect. Dis.* **31** (2000) 1155.
26. D. W. Denning, *J. Antimicrob. Chemother.* **51** (2003) 417.
27. M. Szymański, S. Chmielewska, U. Czyżewska, M. Malinowska, A. Tylicki, *Enzyme Inhib. Med. Chem.* **37** (2022) 876.
28. C. M. Douglas, *Sabouraudia* **39** (2001) 55.
29. N. S. Ryder, *Br. J. Dermatol.* **126** (1992) 2.
30. B. E. Elewski, *J. Am. Acad. Dermatol*. **28** (1993) S28.
31. H. V. Bossche*, Rev. Iberoam. Micol*. **14** (1997) 44.
32. A. Vermes, H-J. Guchelaar, J. Dankert, *J. Antimicrob. Chemother.* **46** (2000) 171.
33. R. Laxminarayan, A. Duse, C. Wattal, A. K. Zaidi, H. F. Wertheim, N. Sumpradit, O. Cars, *Lancet infect. Dis.* **13** (2013) 1057.
34. G. D. Wright, *Nat. Rev. Microbiol.* **5** (2007) 175.
35. T. Eicher, S. Hauptmann, A. Speicher, *The chemistry of heterocycles: structures, reactions, synthesis, and applications*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2013.
36. D. W. Woolley, *J. Biol. Chem.* **152** (1944) 225.

37. R. A. Fromtling, *Clin. Microbiol. Rev.* **1** (1988) 187.
38. M. Shafiei, L. Peyton, M. Hashemzadeh, A. Foroumadi, *Bioorg. Chem*. **104** (2020) 104240.
39. P. D. Crowley, H. C. Gallagher, *J. Appl. Microbiol.* **117** (2014) 611.
40. P. R. Sawyer, R. N. Brogden, R. M. Pinder, T. M. Speight, *Drugs* **9** (1975) 424.
41. L. Kasper, P. Miramon, N. Jablonowski, S. Wisgott, D. Wilson, S. Brunke, B. Hube, *J. Med. Microbiol.* **64** (2015) 14.
42. P. A. Regidor, M. Thamkhantho, C. Chayachinda, S. Palacios, *J. Obstet. Gynaecol.* **43** (2023) 2195001.
43. X. Zhang, M. Yin, L. J. Zhang, *Cells* **8** (2019) 807.
44. S. R. Jartarkar, A. Patil, Y. Y. Goldust, C. J. Cockerell, R. A. Schwartz, S. Grabbe, M. Goldust, *J. Fungi* **8** (2021) 39.152.
45. V. Fainstein, G. P. Bodey, *Ann. Intern. Med*. **93** (2013) 432.
46. D. Thienpont. J. Van Cutsem, J. M. Van Nueten, C. J. Niemegeers, R. Marsboom, *Arzneimittel-Forschung*. **25** (1975) 224.
47. Econazole Cream, FDA. Prescribing Information, Available at http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2013/205175s000lbl.pdf
48. R. C. Heel, R. N. Brogden, T. M. Speight, G. S. Avery, *Drugs* **16** (1978) 177.
49. Y.-G. Na, H. W. Huh, M.-K. Kim, J.-J. Byeon, M.-G. Han, H.-K. Lee, C.-W. Cho, *Acta Biomater.* **101** (2020) 507.
50. S. Cogswell, S. Berger, D. Waterhouse, M. B. Bally, E. K. Wasan, *Pharm. Res*. **23** (2006) 2575.
51. J. A. Maertens, *Clin. Microbiol. Infect.* **10** (2004) 1.
52. S. C. A. Chen, T. C. Sorrell, *Med. J. Aust.* **187** (2007) 404.
53. J. H. Van Tyle, *Pharmacother. J. Hum. Pharmacol. Drug Ther.* **4** (1984) 343.
54. M. Borgers, M. H. Van Den Bossche, M. D. Brabander, *Am. J. Med.* **74** (1983) 2.
55. M. T. Esclusa-Diaz, M. Guimaraens-Méndez, M. B. Pérez-Marcos, J. L. Vila-Jato, J. J. Torres-Labandeira, *Int. J. Pharm.* **143** (1996) 203.
56. J. B. Dressman, C. Reppas, *Eur. J. Pharm. Sci.* **11** (2000) S73.
57. M. Demirel, G. Yurtdaş, L. Genç, *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem*. **70** (2011) 437.
58. H. Yu, L. Zhang, M. Liu, D. Yang, G. He, B Zhang, N. Gong, Y. Lu, G. Du, *Pharmaceuticals* **16** (2023) 1349.
59. L. K. Pershing, J. Corlett, C. Jorgensen, *Antimicrob. Agents Chemother*. **38** (1994) 90.
60. S. Emami, M. Falahati, A. Banifatemi, K. Moshiri, A. Shafiee, *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem*. **7** (2002) 318.
61. J. Liu, L. Li, H. Dai, Z. Liu, J. Fang, *J. Organometal. Chem*. **691** (2006) 2686.
62. W. Wang, C. Sheng, X. Che, H. Ji, Z. Miao, J. Yao, W. Zhang, *Arch. Pharm. Chem. Life Sci*. **342** (2009) 732.
63. P. Asha, *Curr. Probl. Dermatol.* **11** (2000) 270.
64. J. H. Rex, J. E. Bennett, A. A. Sugar, *Engl. J. Med*. **331** (1994) 1325.
65. M. A. Slavin, *J. Infect. Dis*. **171** (1995) 1545.
66. T. A. Vincent, *Int. J. Antimicrob. Agents* **16** (2000) 317.
67. W. D. David, W. H. William, *Trends Microbiol*. **18** (2010) 195.
68. D. W. Denning, *Am. J. Med.* **86** (1989) 791.
69. J. Lestner, W. W. Hope, *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **9** (2013) 911.
70. A. Czyrski, M. Resztak, P. Świderski, J. Brylak, F. K. Główka, *Pharmaceutics* **13** (2021) 1961.

71. P. George, S. Anna, *Int. J. Antimicorb. Agents* **30** (2007) 108.
72. Z. Rafael, P. Javier, *Adv. Sepsis* **6** (2008) 90.
73. A. Pascual, T. Calandra, S. Bolay, *Clin. Infect. Dis*. **46** (2008) 201.
74. R. E. Lewis, *Clin. Infect. Dis*. **46** (2008) 212.
75. D. L. Zonios, J. Gea-Banacloche, R. Childs, *Clin. Infect. Dis.* **47** (2008) 7.
76. V. Nagappan, S. Deresinski, *Clin. Infec. Dis.* **45** (2007) 1610.
77. R. Courtney, E. Radwanski, J. Lim, M. Laughlin, *Antimicrob. Agents Chemother.* **48** (2004) 804.
78. R. Courtney, D. Wexler, E. Radwanski, J. Lim, M. Laughlin, *Br. J. Clin. Pharmacol.* **57** (2004) 218.
79. F. Ezzet, R. Wexler, G. Courtney, J. Lim, M. Laughlin, *Clin. Pharmacokinet.* **44** (2005) 211.
80. M. A. Zoroddu J. Aaseth, G. Crisponi, S. Medici, M. Peana, V. M. Nurchi, *J. Inorg. Biochem.* **195** (2019) 120.
81. A. Frei, *Antibiotics* **9** (2020) 90.
82. J. A. Lemire, J. J. Harrison, R. J. Turner, *Nat. Rev. Microbiol.* **11** (2013) 371.
83. F. Lovering, J. Bikker, C. Humblet, *J. Med. Chem.* **52** (2009) 6752.
84. F. Lovering, *MedChemComm* **4** (2013) 515.
85. T. K. Mahmudov, A. V. Gurbanov, F. I. Guseinov, M. F. C. Guedes da Silva, *Coord. Chem. Rev*. **387** (2019) 32.
86. G. Gasser, *Chimia* **69** (2015) 442.
87. E. Alessio, *Bioinorganic Medicinal Chemistry*, Wiley-VCH, 2011.
88. S. Ghosh, *Bioorg. Chem.* **88** (2019) 102925.
89. P. J. Loehrer, L. H. Einhorn, *Ann. Intern. Med.* **100** (1984) 704.
90. M. Morris, P. J. Eifel, J. Lu, P. W. Grigsby, C. Levenback, R. E. Stevens, M. Rotman, D. M. Gershenson, D. G. Mutch, *N. Engl. J. Med*. **340** (1999) 1137.
91. H. M. Keys, B. N. Bundy, F. B. Stehman, L. I. Muderspach, W. E. Chafe, C. L. Suggs, J. L. Walker, D. Gersell, *N. Engl. J. Med.* **340** (1999) 1154.
92. L. Kelland, *Nat. Rev. Cancer* **8** (2007) 573.
93. R. Oun, Y. E. Moussa, N. J. Wheate, *Dalton Trans*. **47** (2018) 6645.
94. E. Alessio, *Eur. J. Inorg. Chem.* **12** (2017) 1549.
95. S. J. Berners-Price, A. Filipovska, *Metallomics* **3** (2011) 863.
96. E. J. Anthony, E. M. Bolitho, H. E. Bridgewater, O. W. L. Carter, J. M. Donnelly, C. Imberti, E. C. Lant, F. Lermyte, R. J. Needham, M. Palau, P. J. Sadler, H. Shi, F.-X. Wang, W.-Y. Zhang, Z. Zhang, *Chem. Sci*. **11** (2020) 12888.
97. C. Orvig, M. J. Abrams. *Chem. Rev.* **99** (1999) 2201.
98. N. L. Gottlieb. *J. Rheumatol. Suppl.* **8** (1982) 99.
99. T. P. Andrejević, I. Aleksic, M. Počkaj, J. Kljun, D. Milivojevic, N. Lj. Stevanović, J. Nikodinovic-Runic, I. Turel, M. I. Djuran, B. Đ. Glišić, *Dalton Trans.* **50** (2021) 2627.
100. N. Lj. Stevanović, I. Aleksic, J. Kljun, S. Skaro Bogojevic, A. Veselinovic, J. Nikodinovic-Runic, I. Turel, M. I. Djuran, B. Đ. Glišić, *Pharmaceuticals* **14** (2021) 24.
101. T. P. Andrejević, B. Warżajtis, B. Đ. Glišić, S. Vojnovic, M. Mojicevic, N. Lj. Stevanović, J. Nikodinovic-Runic, U. Rychlewska, M. I. Djuran, *J. Inorg. Biochem.* **208** (2020) 111089.
102. T. P. Andrejević, D. Milivojevic, B. Đ. Glišić, J. Kljun, N. Lj. Stevanović, S. Vojnovic, S. Medic, J. Nikodinovic-Runic, I. Turel, M. I. Djuran, *Dalton Trans.* **49** (2020) 6084.

103. K. Stryjska, L. Radko, L. Chęcińska, J. Kusz, A. Posyniak, J. Ochocki, *Int. J. Mol. Sci*. **21** (2020) 3629.
104. K. Stryjska, I. Korona-Glowniak, L. Chęcińska, J. Kusz, J. Ochocki, *Int. J. Mol. Sci.* **22** (2021) 1510.
105. N. Lj. Stevanović, B. Đ. Glišić, S. Vojnovic, H. Wadepohl, T. P. Andrejević, S. Ž. Đurić, N. D. Savić, J. Nikodinovic-Runic, M. I. Djuran, A. Pavic, *J. Mol. Struct.* **1232** (2021) 130006.
106. L. Zhang, Y. Ling, M. Du, *Inorg. Chim. Acta* **360** (2007) 3182.
107. M. T. Madigan, K. S. Bender, D. H. Buckley, W. M. Sattley, D. A. Stahl, *Brock Biology of Microorganisms*, 15th ed., Pearson, 2018.
108. P. R. Murray, K. S. Rosenthal, M. A. Pfaller, *Medical Microbiology*, 10th ed., Elsevier, 2021.
109. C. L. Ventola, *P&T*, **40** (2015) 277.
110. World Health Organization (WHO), *Global Antimicrobial Resistance and Use Surveillance System (GLASS) Report 2024*. Geneva: WHO, 2024.
111. J. E. Bennett, K. J. Kwon-Chung, *Medical Mycology*, 2nd ed., Lippincott Williams & Wilkins, 2006.
112. D. Falconer, S. Olsson, J. F. Meis, *J. Clin. Microbiol.* **56** (2018) e00802.
113. L. Rollins, P. G. Pappas, *J. Infect. Dis.* **207** (2013) 345.
114. D. W. Denning, M. J. Bromley, *Science* **347** (2015) 1414.
115. J. Cardoso, E. Pinto, E. Sousa, D. I. S. P. Resende, *J. Med. Chem.* **68** (2025) 5006.
116. S. Medici, M. Peana, V. M. Nurchi, J. I. Lachowicz, G. Crisponi, M. A. Zoroddu, *Coord. Chem. Rev*. **284** (2015) 329.
117. A. Frei, A. D. Verderosa, A. G. Elliott, J. Zuegg, M. A. T. Blaskovich, *Nat. Rev. Chem.* **7** (2023) 202.
118. M. Stanković, J. Kljun, N. Lj. Stevanović, J. Lazic, S. Skaro Bogojevic, S. Vojnovic, M. Zlatar, J. Nikodinovic-Runic, I. Turel, M. I. Djuran, B. Đ. Glišić, *Dalton Trans*. **53** (2024) 2218.
119. M. Stanković, S. Skaro Bogojevic, J. Kljun, Ž. Milanović, N. Lj. Stevanović, J. Lazic, S. Vojnovic, I. Turel, M. I. Djuran, B. Đ. Glišić, *J. Inorg. Biochem.* **256** (2024) 112572.
120. M. Stanković, S. Skaro Bogojevic, J. Kljun, N. Lj. Stevanović, Ž. Milanović, J. Lazic, S. Vojnovic, I. Turel, M. I. Djuran, B. Đ. Glišić, *J. Mol. Struct*. **1321** (2025) 140118.
121. Oxford Diffraction Ltd, CrysAlis PRO, Yarnton, Oxfordshire, England, 2011.
122. O. V. Dolomanov, L. J. Bourhis, R. J. Gildea, J. A. K. Howard, H. Puschmann, *J. Appl. Crystallogr.* **42** (2009) 339.
123. G. M. Sheldrick, Shelxl 2018/3, University of Göttingen, Germany, 2018.
124. C. F. Macrae, P. R. Edgington, P. McCabe, E. Pidcock, G. P. Shields, R. Taylor, M. Towler, J. Van De Streek, *J. Appl. Crystallogr.* **39** (2006) 453.
125. T. Mosmann, *J. Immunol. Methods* **65** (1983) 55.
126. B. A. Arthington-Skaggs, H. Jradi, T. Desai and C. J. Morrison, *J. Clin. Microbiol.* **39** (1999) 3332.
127. H. Liu, J. Köhler, G. R. Fink, *Science*, 266 (1994) 1723-1726.; G. G. Zhanel, D. J. Hoban, G. K. M. Harding, *Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol*. **3** (1992) 793607.
128. 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.
129. A. Jakab, S. Mogavero, T. M. Forster, M. Pekmezovic, N. Jablonowski, V. Dombradi, I. Pocsi, B. Hube, *Microbiol.* **162** (2016) 2116.

130. B. Wächtler, D. Wilson, K. Haedicke, F. Dalle, B. Hube, *PLOS One* **6** (2011) e17046.
131. P. R. Spackman, M. J. Turner, J. J. McKinnon, S. K. Wolff, D. J. Grimwood, D. Jayatilaka, M. A. Spackman, *J. Appl. Cryst.* **54** (2021) 1006.
132. M. A. Spackman, D. Jayatilaka, *CrystEngComm* **11** (2009) 19.
133. G. te Velde, F. M. Bickelhaupt, E. J. Baerends, C. Fonseca Guerra, S. J. A. van Gisbergen, J. G. Snijders, T. Ziegler, *J. Comput. Chem.* **22** (2001) 931.
134. R. Rüger, M. Franchini, T. Trnka, A. Yakovlev, E. van Lenthe, P. Philipsen, T. van Vuren, B. Klumpers, T. Soini, AMS 2023.1, SCM, *Theor. Chem.,* Vrije Universiteit, Amsterdam, The Netherlands, https://www.scm.com.
135. E. van Lenthe, E. J. Baerends, J. G. Snijders, *J. Chem. Phys.* **99** (1993) 4597.
136. E. van Lenthe, E. J. Baerends, J. G. Snijders, *J. Chem. Phys*. **101** (1994) 9783.
137. C. van Wüllen, *J. Chem. Phys.* **109** (1998) 392.
138. A. Klamt, G. Schoermann, *J. Chem. Soc.* **2** (1993) 799.
139. A. Klamt, *J. Phys. Chem.* **99** (1995) 2224.
140. C. C. Pye, T. Ziegler, *Theor. Chem. Acc*. **101** (1999) 396.
141. A. D. Becke, *Phys. Rev. A* **38** (1998) 3098.
142. J. P. Perdew, *Phys. Rev. B: Condens. Matter Mater. Phys*. **33** (1986) 8822.
143. J. P. Perdew, *Phys. Rev. B: Condens. Matter Mater. Phys.* **34** (1986) 7406.
144. E. Caldeweyher, S. Ehlert, A. Hansen, H. Neugebauer, S. Spicher, C. Bannwarth, S. Grimme, *J. Chem. Phys*. **150** (2019) 154122.
145. Y. P. Li, J. Gomes, S. M. Sharada, A. T. Bell, M. Head-Gordon, *J. Phys. Chem. C*. **119** (2015) 1840.
146. S. Grimme, *Chem. – Eur. J.* **18** (2012) 9955.
147. H. S. Yu, X. He, S. L. Li, D. G. Truhlar, *Chem. Sci.* **7** (2016) 5032.
148. J. Tao, J. Perdew, V. Staroverov, G. Scuseria, *Phys. Rev. Lett.* **91** (2003) 146401.
149. V. N. Staroverov, G. E. Scuseria, J. Tao, J. P. Perdew, *J. Chem. Phys*. **119** (2003) 12129.
150. S. Lehtola, C. Steigemann, M. J. T. Oliveira, M. A. L. Marques, *SoftwareX*, **7** (2018) 1.
151. M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H. P. Hratchian, A. F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, J. L. Sonnenberg, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, J. Montgomery, J.E. Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J. J. Heyd, E. Brothers, K. N. Kudin, V. N. Staroverov, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J. C. Burant, S. S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, N. Rega, J. M. Millam, M. Klene, J. E. Knox, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, R. L. Martin, K. Morokuma, V. G. Zakrzewski, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, S. Dapprich, A. D. Daniels, Ö. Farkas, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, J. Cioslowski, D. J. Fox, *Gaussian* **16**, 2016.
152. M. Walker, A. J. A. Harvey, A. Sen, C. E. H. Dessent, *J. Phys. Chem. A.* **117** (2013) 12590.
153. L. E. Roy, P. J. Hay, R. L. Martin, *J. Chem. Theory Comput*. **4** (2008) 1029.
154. Y. Takano, K. N. Houk*, J. Chem. Theory Comput.* **1** (2005) 70.
155. S. Samavat, R. Ghiasi, B. Mohtat, *Inorg. Chem. Res*. **5** (2021) 257.
156. S. L. Zhang, L. Liu, Y. Fu, Q. X. Guo, *Organomet.* **26** (2007) 4546.
157. P. Atkins, J. De Paula, J. Keeler, Atkins' Physical Chemistry, Oxford University Press, 2023.
158. R. A. Munos, Yu. N. Panchenko, G. S. Koptev, N. F. Stepanov, *J. Appl. Spectrosc*. **12** (1970) 428.
159. K. Wolinski, J. F. Hinton, P. Pulay, *J. Am. Chem. Soc*. **112** (1990) 8251.

160. M. E. Casida, M. H. Rotllant, *Ann. Rev. Phys. Chem*. **63** (2012) 287.
161. T. Lu, F. Chen, *J. Comput. Chem*. **33** (2012) 580.
162. G. M. Morris, R. Huey, W. Lindstrom, M. F. Sanner, R. K. Belew, D. S. Goodsell, A. J. Olson, *J. Comput. Chem.* **30** (2009) 2785.
163. H. Ouellet, L. M. Podust, P. R. O. de Montellano, *J. Biol. Chem.* **283** (2008) 5069.
164. T. Y. Hargrove, Z. Wawrzak, D. C. Lamb, F. P. Guengerich, G. I. Lepesheva, *J. Biol. Chem.* **290** (2015) 23916.
165. D.S. Biovia, D. Systèmes, Biovia, Discovery studio modeling environment, San Diego, CA, USA: Dassault Systèmes Biovia, 2016.
166. R. Huey, G. M. Morris, A. J. Olson, D. S. Goodsell, *J. Comput. Chem*. **28** (2007) 1145.
167. G. M. Morris, D. S. Goodsell, R. S. Halliday, R. Huey, W. E. Hart, R. K. Belew, A. J. Olson, *J. Comput. Chem.* **19** (1998) 1639.
168. R. Dias, L. F. S. M. Timmers, R. A. Caceres, W. F. de Azevedo Jr., *Curr. Drug Targets* **9** (2008) 1062.
169. C. R. Groom, I. J. Bruno, M. P. Lightfoot, S. C. Ward, *Acta Crystallogr. B: Struct. Sci. Cryst. Eng. Mater*. **72** (2016) 171.
170. Y. Cortat, M. Nedyalkova, K. Schindler, P. Kadakia, G. Demirci, S. Nasiri Sovari, A. Crochet, S. Salentinig, M. Lattuada, O. M. Steiner, F. Zobi, *Antibiotics*, **12** (2023) 619.
171. Q.-L. Ren, S.-S. Zhao, L.-X. Song, S.-S. Qian, J. Qin, *J. Coord. Chem.* **69** (2016) 227.
172. N. D. Savić, S. Vojnovic, B. Đ. Glišić, A. Crochet, A. Pavic, G. V. Janjić, M. Pekmezović, I. M. Opsenica, K. M. Fromm, J. Nikodinovic-Runic, M. I. Djuran, *Eur. J. Med. Chem*. **156** (2018) 760.
173. A. B. D. Nandiyanto, R. Oktiani, R. Ragadhita, *IJoST*, **4** (2019) 97.
174. N. Lj. Stevanović, J. Kljun, I. Aleksic, S. Skaro Bogojevic, D. Milivojevic, A. Veselinovic, I. Turel, M. I. Djuran, J. Nikodinovic-Runic, B. Đ. Glišić, *Dalton Trans.* **51** (2021) 5322.
175. J.-A. Zhang, M. Pan, J.-Y. Zhang, H.-K. Zhang, Z.-J. Fan, B.-S. Kang, C.-Y. Su, *Polyhedron*, **28** (2009) 145.
176. Y. Jiang, C.-F. Zhu, Z. Zheng, J.-B. He, Y. Wang, *Inorg. Chim. Acta*, **451** (2016) 143.
177. S. Medici, M. Peana, V. M. Nurchi and M. A. Zoroddu, *J. Med. Chem*. **62** (2019) 5923.
178. W. Liu, K. Bensdorf, A. Hagenbach, U. Abram, B. Niu, A. Mariappan, R. Gust, *Eur. J. Med. Chem*. **46** (2011) 5927.
179. U. Kalinowska-Lis, A. Felczak, L. Chęcińska, M. Małecka, K. Lisowska, J. Ochocki, *New J. Chem*. **40** (2016) 694.
180. M. Baranowska, K. Suliborska, W. Chrzanowski, B. Kusznierewicz, J. Namieśnik, A. Bartoszek, *Red. Biol*. **17** (2018) 355.
181. J.-Y. Wu, Y.-L. Pan, X.-J. Zhang, T. Sun, Y.-P. Tian, J.-X. Yang, Z.-N. Chen, *Inorg. Chim. Acta* **360** (2007) 2083.
182. P. Połczyński, R. Jurczakowski, W. Grochala, *J. Phys. Chem. C*. **117** (2013) 20689.
183. K. D. Trotter, O. Owojaiye, S. P. Meredith, P. E. Keating, M. D. Spicer, J. Reglinski, C. M. Spickett, *BioMetals* **32** (2019) 627.
184. J. H. B. Nunes, D. H. Nakahata, P. P. Corbi, R. E. F. de Paiva, *Coord. Chem. Rev*. **490** (2023) 215228.
185. T. Bruna, F. Maldonado-Bravo, P. Jara, N. Caro, *Int. J. Mol. Sci.* **22** (2021) 7202.
186. D. Żyro, L. Radko, A. Śliwińska, L. Chęcińska, J. Kusz, I. Korona-Głowniak, A. Przekora, M. Wójcik, A. Posyniak, J. Ochocki, *Cancers* **14** (2022) 900.
187. N. A. Johnson, M. R. Southerland, W. J. Youngs, *Molecules* **28** (2017) 1263.
188. S. Medici, M. Peana, G. Crisponi, V. M. Nurchi, J. I. Lachowicz, M. Remelli, M. A. Zoroddu, *Coord. Chem. Rev*. **327-328** (2016) 349-359.

189. N. D. Savić, B. B. Petković, S. Vojnovic, M. Mojicevic, H. Wadepohl, K. Olaifa, E. Marsili, J. Nikodinovic-Runic, M. I. Djuran, B. Đ. Glišić, *Dalton Trans*. **49** (2020) 10880.
190. A. G. Warrilow, J. E. Parker, D. E. Kelly, S. L. Kelly, *Antimicrob. Agents Chemother.* **57** (2013) 1352.
191. J. A. Romo, C. G. Pierce, A. K. Chaturvedi, A. L. Lazzell, S. F. McHardy, S. P. Saville, J. L. Lopez-Ribot, *mBio* **8** (2017) e01991.
192. T. P. Andrejević, I. Aleksic, J. Kljun, M. Počkaj, M. Zlatar, S. Vojnovic, J. Nikodinovic-Runic, I. Turel, M. I. Djuran, B. Đ. Glišić, *RSC Adv*. **13** (2023) 4376.
193. H. T. Taff, K. F. Mitchell, J. A. Edward, D. R. Andes, *Future Microbiol*. **8** (2013) 1325.
194. F. Saleh, A. Harb, N. Soudani, H. Zaraket, *J. Infect. Public Heal.* **13** (2020) 1142.
195. A. J. Carterson, K. Höner zu Bentrup, C. M. Ott, M. S. Clarke, D. L. Pierson, C. R. Vanderburg, K. L. Buchanan, C. A. Nickerson, M. J. Schurr, *Infect. Immun.* **73** (2005) 1129.
196. K. S. dos Santos, L. T. Oliveira, M. de Lima Fontes, K. F. Migliato, A. M. Fusco-Almeida, M. J. S. M. Giannini, A. Moroz, *J. Fungi* **9** (2023) 634.
197. K. E. de Visser, A. Eichten, L. M. Coussens, *Nat. Rev. Cancer* **6** (2006) 24.
198. J. Kljun, I. E. Leon, Š. Peršič, J. F Cadavid-Vargas, S. B Etcheverry, W. He, Y. Bai, I. Turel, *J. Inorg. Biochem*. **186** (2018) 187.
199. J. Kujawski, K. Czaja, E. Jodłowska, K. Dettlaff, M. Politańska, J. Żwawiak, R. Kujawski, T. Ratajczak, M. K. Chmielewski, M. K. Bernard, *J. Mol. Struct.* **1119** (2016) 250.
200. D. H. Johnston, D. F. Shriver, *Inorg. Chem*. **32** (1993) 1045.
201. D. P. Ašanin, S. Skaro Bogojevic, F. Perdih, T. P. Andrejević, D. Milivojevic, I. Aleksic, J. Nikodinovic-Runic, B. Đ. Glišić, I. Turel, M. I. Djuran, *Molecules* **26** (2021) 1871.
202. H. El Hamdani, M. El Amane, C. Duhayon, *J. Mol. Struct*. **1155** (2018) 789.
203. D. I. Zonios, J. E. Bennett, *Semin. Respir. Crit. Care Med*. **29** (2008) 198.
204. Q. L. Feng, J. Wu, G. Q. Chen, F. Z. Cui, T. N. Kim, J. O. Kim, *J. Biomed. Mater. Res.* **52** (2000) 662.
205. T. D. Dakal, A. Kumar, R. S. Majumdar, V. Yadav, *Front. Microbiol.* **7** (2016) 1831.
206. W. K. Jung, H. C. Koo, K. W. Kim, S. Shin, S. H. Kim, Y. H. Park, *Appl. Environ. Microbiol.* **74** (2008) 2171.
207. B. Sharma, A. Saha, L. Rahaman, S. Bhattacharjee, P. Tribedi, *Adv. Microbiol.* **5** (2015) 677.
208. K. Lewis, *Antimicrob. Agents Chemother*. **45** (2001) 999.
209. G. I. Lepesheva, M. R. Waterman, *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj*. **1770** (2007) 467.
210. T. Y. Hargrove, Z. Wawrzak, P. W. Alexander, J. H. Chaplin, M. Keenan, S. A. Charman, C. J. Perez, M. R. Waterman, E. Chatelain, G. I. Lepesheva, *J. Biol. Chem*. **288** (2013) 31602.
211. Q. Li, T. Wu, J.-C. Lai, Z.-L. Fan, W.-Q. Zhang, G.-F. Zhang, D. Cui, Z.-W. Gao, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2015** (2015) 5281.
212. B. Drabińska, K. Dettlaff, K. Kossakowski, T. Ratajczak, R. Kujawski, A. Mikołajczyk, J. Kujawski, *Open Chem.* **20** (2022) 1575.
213. G. B. Andreev, N. A. Budantseva, I. G. Tananaev, B. F. Myasoedov, *Inorg. Chem. Commun*. **11** (2008) 802.
214. A. M. Petrosyan, *Vib. Spectrosc*. **43** (2007) 284.
215. Y. Nakajima, Y. Shiraishi, T. Tsuchimoto, F. Ozawa, *Chem. Commun.* **47** (2011) 6332.
216. D. P. Ašanin, T. P. Andrejević, M. Nenadovic, M. V. Rodić, S. Vojnovic, M. I. Djuran, B. Đ. Glišić, *Polyhedron* **244** (2023) 116585.
217. Y.-H. Ou, R.-K. Du, S.-P. Zhang, Y. Ling, S. Li, C.-J. Zhao, W.-Z. Zhang, L. Zhang, *J. Mol. Struct.* **1215** (2020) 128229.

218. J. Gitarić, I. M. Stanojević, M. V. Rodić, N. S. Drašković, M. Stevanović, S. Vojnović, M. I. Djuran, B. Đ. Glišić, *Polyhedron* **188** (2020) 114688.
219. M. Henriques, J. Azeredo, R. Oliveira, *Colloids Surf. B* **33** (2004) 235.
220. L. Deng, L. Zou, J. Wu, H. Liu, T. Luo, X. Zhou, W. Li, B. Ren, *Int. J. Antimicrob. Agents* **53** (2019) 805.
221. G. Wall, D. Montelongo-Jauregui, B. V. Bonifacio, J. L. Lopez-Ribot, P. Uppuluri, *Curr. Opin. Microbiol*. **52** (2019) 1.
222. P. R. O. De Montellano, Cytochrome P450: structure, mechanism, and biochemistry, vol. 3, New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2005.
223. P. Metrangolo, F. Meyer, T. Pilati, G. Resnati, G. Terraneo, *Angew. Chem. Int. Edit.* **47** (2008) 6114.
224. A. Mukherjee, S. Tothadi, G. R. Desiraju, *Acc. Chem. Res.* **47** (2014) 2514.
225. C. B. Aakeröy, N. R. Champness, C. Janiak, *CrystEngComm* **12** (2010) 22.
226. R. F. de Freitas, M. Schapira, *Med. Chem. Commun.* **8** (2017) 1970.

7. ПРИЛОГ

ЛИСТА СКРАЋЕНИЦА И ТЕРМИНА КОРИШЋЕНИХ У ТЕКСТУ

HIV	вирус хумане имунодефицијенције *(*енгл. *Human Immunodeficiency Virus)*
CYP51	ланостерол 14α-деметилаза
UDP	уридин-дифосфат
FDA	Америчка управа за храну и лекове (енгл. *U.S. Food & Drug Administration*)
DNA	деоксирибонуклеинска киселина
ROS	реактивне кисеоничне врсте (енгл. *reactive oxygen species*)
MIC	минимална инхибиторна концентарција
IC_{20}/IC_{50}	концентрација једињења која инхибира раст ћелије за 20%/50%
SI	индекс селективности
ATCC	*American Type Culture Collection*
NCTC	*National Collection of Type Cultures*
RPMI	*Roswell Park Memorial Institute*
in vitro	испитивање ван живог организма
in vivo	испитивање у живом организму
ctz	клотримазол
ecz	еконазол
mcz	миконазол
ktz	кетоконазол
icz	итраконазол
ctz	клотримазол
vcz	вориконазол
psz	посаконазол
AmB	амфотерицин B
AgSD	сребро(I)-сулфадиазин
A549	ћелијска линија тумора плућа
RFP	црвени флуоресцентни протеин
MRC-5	здраве ћелије фибробласта плућа
HepG	ћелијска линија тумора јетре
Balb/c 3T3	мишја фибробластна ћелијска линија
DMSO	диметилсулфоксид
DMSO-d_6	деутеро диметилсулфоксид
Im	имидазол
Ind	индазол
py-2tz	диметил-2-(тиазол-2-ил)пиридин-4,5-дикарбоксилат
py-2metz	диметил-2-(4-метилтиазол-2-ил)пиридин-4,5-дикарбоксилат
py-2py	диметил-2,2'-бипиридин-4,5-дикарбоксилат
qz	хиназолин
phen	фенантролин
naph	нафтиридин
P450	цитохром P450
IR спектроскопија	инфрацрвена спектроскопија
^{1}H NMR	протонска нуклеарна магнетна резонанца
UV-Vis спектрофотометрија	ултраљубичаста-видљива спектрофотометрија

DFT	теорија функционала густине (енгл. *Density Functional Theory*)
PBS	фосфатни пуфер
ESI-HRMS	електроспреј-јонизациона масена спектрометрија
GC	стакласти угљеник
CV	циклична волтаметрија
EUCAST	Европски комитет за испитивање осетљивости на антимикробне лекове
MTT	3-(4,5-диметил(тиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолијум-бромид
DAPI	2-(4-амидинофенил)-6-индолкарбамидин дихидрохлорид
HSA	Хиршфилдова анализа површина (енгл. *Hirshfeld Surface Analysis*)
CSD	Кембричка структурна база
TBAHP	тетрабутиламонијум-хексафлуорофосфат
TMS	тетраметилсилан
ppm	делови на милион
$\Delta_r G$	промена слободне Гибсове енергије
E_{int}	енергија интеракције
K_f / K_d	константа формирања / дисоцијације
QTAIM	енгл. *Quantum Theory of Atoms in Molecules*
BCP	критична тачка везе (енгл. *Bond Critical Point*)
MAE	средња апсолутна грешка (енгл. *Mean Absolute Error*)
K_i	константа инхибиције

СПИСАК СЛИКА

Редни број слике	Назив слике	Стр.
Слика 1.	Структурне формуле представника главних класа антигљивичних лекова	5
Слика 2.	Структурне формуле азола који у свом прстену садрже а) само азот, б) азот и кисеоник, и в) азот и сумпор	6
Слика 3.	Структурне формуле клинички одобрених антигљивичних лекова на бази имидазола	8
Слика 4.	Структурне формуле клинички одобрених антигљивичних лекова на бази триазола	10
Слика 5.	Структурне формуле цисплатине (а), карбоплатине (б) и оксалиплатине (в)	11
Слика 6.	Структурне формуле комплекса рутенијума(III) NAMI-A (а) и KP1019 (б)	12
Слика 7.	Структурна формула ауранофина који се примењује у терапији реуматоидног артритиса	12
Слика 8.	Структурне формуле комплекса бакра(II) који садрже диметил-пиридин-4,5-дикарбоксилатне естре као лиганде	13
Слика 9.	Структурна формула комплекса бакра(II) са флуконазолом	14
Слика 10.	Структурна формула комплекса цинка(II) са флуконазолом	14
Слика 11.	Структурне формуле комплекса цинка(II) са ароматичним *N*-хетероцикличним лигандима	15
Слика 12.	Структурне формуле комплекса сребра(I) који показују антимикробну активност	16
Слика 13.	Структурне формуле комплекса сребра(I) са миконазолом	17
Слика 14.	Структурна формула комплекса сребра(I) са итраконазолом	18
Слика 15.	Структурне формуле комплекса сребра(I) са флуконазолом	18
Слика 16.	Структурне формуле **Ag1- Ag8** комплекса	21
Слика 17.	Шематски приказ реакције за синтезу **Ag1** комплекса. Нумерација атома у клотримазолу је коришћена за ^{1}H NMR спектроскопску карактеризацију	38
Слика 18.	Кристална структура комплекса **Ag1**. Термички елипсоиди су дати на нивоу вероватноће од 35%. Атоми водоника су изостављени као и неуређеност атома хлора Cl8. Дужине веза и углови између веза (°): Ag1–N3=2,090(3) Å, N3–Ag1–N3' = 177,3°	39
Слика 19.	UV-Vis спектри **Ag1** комплекса снимљени у DMSO (**а**) и DMSO/PBS (v/v 7 : 3, **б**) на собној температури у различитим временским интервалима	40
Слика 20.	^{1}H NMR спектри комплекса **Ag1** и клотримазола у DMSO-d_6 на собној температури и 200 MHz	41
Слика 21.	Структура $[Ag(ctz)_2]^+$ комплексног катјона оптимизована на ZORA-BP86-D4/TZP-COSMO(DMSO) нивоу теорије. Промена слободне Гибсове енергије (kJ/mol) на ZORA-MN15/TZ2P-COSMO (DMSO)/ZORA-BP86-D4/TZP-COSMO(DMSO) и ZORA-TPSSh-D4/TZ2P-COSMO (DMSO)/ZORA-BP86-D4/TZP-COSMO(DMSO) нивоима теорије за реакцију супституције ctz лиганада молекулом растварача	42
Слика 22.	Циклични волтамограм за **Ag1** комплекс снимљен на GC електроди у DMSO и 0,1 M TBAHP као помоћни електролит при брзини скенирања 50 mV/s	43

Слика 23.	Количина ергостерола за сој *C. albicans* ATCC 10231 у присуству 0,5 × MIC комплекса **Ag1**, ctz и $AgSbF_6$ одређена применом UV-Vis спектрофотометрије у опсегу таласних дужина од 240 до 300 nm	45
Слика 24.	Утицај субинхибиторних концентрација (0,5 × MIC) **Ag1** комплекса, ctz и $AgSbF_6$ на формирање хифа *C. albicans* ATCC 10231 соја после 24, 48 и 72 h у поређењу са DMSO контролом	45
Слика 25.	Инфекција A549 туморских ћелија плућа (плаво обојена једра) *C. albicans* SC5314-RPF ћелијама (црвено обојење) у присуству DMSO, **Ag1** комплекса и ctz при MIC вредностима (увећање 20 пута)	46
Слика 26.	Шематски приказ реакције за синтезу комплекса **Ag2** – **Ag4**. Нумерација атома у еконазолу је коришћена за ^{1}H NMR спектроскопску карактеризацију комплекса	47
Слика 27.	Кристалне структуре комплекса **Ag2** и **Ag4**. Термички елипсоиди су дати на нивоу вероватноће од 50%. Због јаснијег представљања нису приказани атоми водоника	48
Слика 28.	3D Хиршфилдове површине и 2D графици „отиска прста" са процентуалном заступљеношћу интеракција у кристалној структури **Ag4** комплекса	48
Слика 29.	^{1}H NMR спектри **Ag2** комплекса и еконазола у DMSO-d_6 на собној температури (200 MHz)	50
Слика 30.	UV-Vis спектри комплекса **Ag2** у DMSO (**а**) и DMSO/PBS (*v/v* 7 : 3, **б**) на собној температури у различитим временским интервалима	51
Слика 31.	Циклични волтамограми за **Ag2 – Ag4** комплексе снимљени на GC електроди у DMSO и 0,1 M TBAHP са брзином скенирања од 50 mV/s	52
Слика 32.	Геометрије **Ag3** и **Ag4** комплекса у гасовитој фази оптимизоване применом M06-2X функционала и 6-311+G(d,p) базисног скупа за све атоме, осим за атом сребра за који се користи LANL2TZ(*f*) базни сет. Легенда: C (сива), H (бела), O (црвена), N (плава), Cl (зелена) и Ag (светло плава)	52
Слика 33.	Експерементални (црно обојени) и теоријски израчунати (плаво обојени) IR спектри **Ag3** и **Ag4** комплекса	53
Слика 34.	Оптимизована геометрија линеарног катјонског комплекса $[Ag(ecz)_2]^+$ у DMSO коришћењем M06-2X функционала у комбинацији са 6-311+G(d,p) базисним скупом за све атоме осим за атом сребра за који се користи LANL2TZ(*f*) базни сет. Легенда: C (сива), H (бела), O (црвена), N (плава), Cl (зелена) и Ag (светло плава)	54
Слика 35.	Експериментални (**Ag3** – црна линија и **Ag4** – плава линија) и теоријски (M06-2X функционал у комбинацији са 6-311+G(d,p) основним сетом за све атоме, осим за атом сребра за који се користи LANL2TZ(*f*) основни сет) UV-Vis спектри за $[Ag(ecz)_2]^+$. Симбол звездице * се користи као ознака за представљање интезитета осцилаторне јачине	57
Слика 36.	Енергетски профил HOMO и LUMO молекулских орбитала укључених у главне електронске прелазе за $[Ag(ecz)_2]^+$ комплекс са вредностима орбиталне енергије (црна боја, eV) и енергетског јаза (црвена боја, eV)	58
Слика 37.	UV спектрофотометријски профили ергостерола у опсегу 240–300 nm за културе *C. albicans* при концентрацијама од 0,5 × MIC комплекса **Ag3** и **Ag4**, одговарајућих AgX соли и еконазола	60
Слика 38.	Инхибиција формирања биофилма *C. parapsilosis* ATCC 22019 у присуству комплекса **Ag3** и **Ag4**, одговарајућих AgX соли, као и еконазола (ecz). DMSO је коришћен као негативна контрола	60

Слика 39.	Инхибиција формирања биофилма *S. aureus* ATCC 25923 у присуству комплекса **Ag3** и **Ag4**, одговарајућих AgX соли и еконазола. DMSO је коришћен као негативна контрола	61
Слика 40.	Дисперзија биофилма *S. aureus* ATCC 25923 у присуству комплекса **Ag3** и **Ag4**, одговарајућих AgX соли и еконазола. DMSO је коришћен као негативна контрола	62
Слика 41.	Најповољније докинг оријентације еконазола (ecz, лево) и комплексног $[Ag(ecz)_2]^+$ катјона (десно) у активном месту цитохрома P450 CYP130 (PDB код: 2UVN; (**а**) и (**б**)) и цитохрома P450 стерол 14α-деметилазе CYP51B (PDB код: 4UYM; (**в**) и (**г**)). Лиганди су приказани у облику штапића, при чему су различити атоми означени стандардним бојама: C (сива), N (тамноплава), O (црвена), F (светлоплава) и Ag (плава). Ради јасније визуелизације, преостали делови структуре протеина су уклоњени	64
Слика 42.	2D приказ интеракција између еконазола (ecz, лево) и комплексног $[Ag(ecz)_2]^+$ катјона (десно) у активном месту цитохрома P450 CYP130 (PDB код: 2UVN; (**а**)) и цитохрома P450 стерол 14α-деметилазе CYP51B (PDB код: 4UYM; (**б**)), са приказаним међуатомским растојањима добијеним након молекулског докинга. Хем групе HEM1048 и HEM580 представљају протопорфирин IX који садржи Fe. Различите боје означавају различите типове атома	65
Слика 43.	Кристалне структуре комплекса **Ag5 – Ag8** са одабраним означавањем хетероатома. Термички елипсоиди су приказани на нивоу вероватноће од 35%, док су атоми водоника изостављени ради боље прегледности	66
Слика 44.	Празнине у кристалној структури **Ag6** комплекса посматране дуж *b* осе	67
Слика 45.	UV-Vis спектри **Ag5** комплекса у DMSO на собној температури у различитим временским интервалима	68
Слика 46.	^{1}H NMR спектри **Ag5** комплекса и вориконазола у DMSO-d_6 на собној температури (200 MHz)	69
Слика 47.	^{1}H NMR спектри **Ag6** комплекса снимљени у различитим временским интервалима у DMSO-d_6 на собној температури (200 MHz)	70
Слика 48.	Оптимизоване тетраедарске геометрије комплекса **Ag6 – Ag8** у DMSO, добијене применом функционала M06-2X у комбинацији са базним скуповима 6-311+G(d,p) за атоме C, H, O, N и F и LANL2TZ(*f*) за Ag атом. Испрекидане линије означавају водоничне везе. Легенда: C (сива), H (бела), O (црвена), N (тамноплава), Ag (светлоплава)	71
Слика 49.	Оптимизоване линеарне геометрије комплекса $[Ag(vcz\text{-}N2)(vcz\text{-}N19)]^+$ (**Ag6**), $[Ag(vcz\text{-}N2)(vcz\text{-}N4)]^+$ (**Ag7**) и $[Ag(vcz\text{-}N4)_2]^+$ (**Ag8**) у DMSO, добијене применом функционала M06-2X у комбинацији са базним скуповима 6-311+G(d,p) за C, H, O, N и F атоме и LANL2TZ(*f*) за Ag атом. Испрекидане линије означавају водоничне везе. Легенда: C (сива), H (бела), O (црвена), N (тамноплава), Ag (светлоплава)	72
Слика 50.	Експериментални (црна линија) и теоријски UV-Vis спектри (црвена линија) комплекса сребра(I) са вориконазолом у раствору, израчунати применом функционала M06-2X и базних скупова 6-311+G(d,p) за све атоме осим сребра и LANL2TZ(*f*) за Ag атом, уз DMSO као модел растварача. Симбол * означава осцилаторне јачине електронских прелаза	75
Слика 51.	Енергетски дијаграми HOMO и LUMO молекулских орбитала укључених у главне електронске прелазе за комплекс **Ag6a** са карактеристичним вредностима енергије орбитале (црно, eV) и енергетског јаза (црвено, eV)	76

Слика 52.	Енергетски дијаграми HOMO и LUMO молекулских орбитала укључених у главне електронске прелазе за комплекс **Ag7a** са карактеристичним вредностима енергије орбитале (црно, eV) и енергетског јаза (црвено, eV)	77
Слика 53.	Енергетски дијаграми HOMO и LUMO молекулских орбитала укључених у главне електронске прелазе за комплекс **Ag8a** са карактеристичним вредностима енергије орбитале (црно, eV) и енергетског јаза (црвено, eV)	77
Слика 54.	Оптимизоване геометрије комплекса **Ag6a – Ag8a** у DMSO са представљеним критичним тачкама (BCP, **1** – **4**) процењеним QTAIM анализом	78
Слика 55.	Филаментација соја *C. albicans* у присуству MIC концентрација комплекса **Ag5** – **Ag8** и вориконазола након 24, 48 и 72 h, у поређењу са DMSO контролом	81
Слика 56.	Најповољније конформације комплекса **Ag6a** – **Ag8a** и вориконазола у активном месту CYP51B ензима (PDB код: 4UYM). Различите боје означавају различите атоме: C (сива), N (тамноплава), O (црвена), F (светлоплава) и Ag (плава). Ради боље прегледности, остатак структуре протеина је изостављен	83
Слика 57.	2D приказ интеракција између комплекса **Ag6a – Ag8a** и вориконазола и аминокиселинских остатака у активном месту CYP51 ензима (PDB код: 4UYM) са међуатомским растојањем добијеним након молекуског докинга. HEM580 је рекристализован протопорфирин IX који садржи Fe. Различите боје означавају различите врсте интеракција	84
Слика 58.	3D приказ интеракција између 5-флуорпиримидинског прстена комплекса **Ag6a** – **Ag8a** и протопорфирина IX који садржи гвожђе (HEM 580). Различите боје означавају различите типове интеракција	85

СПИСАК ТАБЕЛА

Редни број табеле	Назив табеле	Стр.
Табела 1.	Кристалографски подаци добијени рендгенском структурном анализом **Ag1** комплекса	28
Табела 2.	Кристалографски подаци добијени рендгенском структурном анализом комплекса **Ag2** и **Ag4**	29
Табела 3.	Кристалографски подаци добијени рендгенском структурном анализом комплекса **Ag5** и **Ag6**	30
Табела 4.	Кристалографски подаци добијени рендгенском структурном анализом комплекса **Ag7** и **Ag8**	31
Табела 5.	Антимикробна активност (MIC, μM) **Ag1** комплекса, клотримазола и $AgSbF_6$ према испитиваним *Candida* и бактеријским сојевима у поређењу са њиховом цитотоксичном активношћу (IC_{50}, μM)[a]	43
Табела 6.	Вредности индекса селективности (SI) за **Ag1** комплекс, клотримазол и $AgSbF_6$ према испитиваним *Candida* сојевима	44
Табела 7.	Промена слободне Гибсове (Gibbs) енергије (T = 298,15 K, kJ/mol) формирања (ΔG_f^0)/дисоцијације (ΔG_d^0) као и константе формирања (K_f)/дисоцијације (K_d) испитиваних комплекса **Ag3** и **Ag4** израчунате помоћу M06-2X функционала у комбинацији са 6-311+G(d,p) базним сетом за све атоме, осим за атом сребра за који се користио LANL2TZ(*f*) базни сет	55
Табела 8.	Експериментална и теоријска хемијска померања (M06-2X функционал у комбинацији са 6-311+G(d,p) основни сет за све атоме, осим за атом сребра за који се користи LANL2TZ(*f*) основни сет) у ^{1}H NMR спектру **Ag3** и **Ag4** комплекса	56
Табела 9.	Експерименталне и теоријске вредности таласних дужина (λ_{max}), осцилаторне јачине (*f*), и хемијских прелаза за $[Ag(ecz)_2]^+$	57
Табела 10.	Антимикробна активност (MIC, μM) комплекса **Ag2** – **Ag4**, одговарајућих AgX соли (X = SbF_6^-, $CF_3SO_3^-$ и PF_6^-) и еконазола (ecz) према сојевима *Candida* и одабраним бактеријским сојевима, уз поређење са њиховим цитотоксичним деловањем на здраве хумане фибробласте MRC-5 (IC_{50}, μM). Стандардна девијација за све вредности износила је 0 – 2%	59
Табела 11.	Вредности релевантних енергетских параметара (kcal/mol) добијених молекулским докингом за најповољније конформације комплексног $[Ag(ecz)_2]^+$ катјона (**Ag**) и еконазола у активном месту CYP130 и CYP51B ензима	63
Табела 12.	Промена слободне Гибсове енергије (T = 298,15 K, kJ/mol) формирања (ΔG_f^0)/дисоцијације (ΔG_d^0) као и константе формирања (K_f)/дисоцијације (K_d) испитиваних комплекса **Ag6 – Ag8**, израчунате применом функционала M06-2X у комбинацији са базним скуповима 6-311+G(d,p) за атоме C, H, O, N и F и LANL2TZ(*f*) за Ag	72
Табела 13.	Експерименталне и израчунате вредности хемијских померања у ^{1}H NMR спектрима комплекса сребра(I) са вориконазолом, добијене применом функционала M06-2X у комбинацији са базним скуповима 6-311+G(d,p) за C, H, O, N и F атоме и LANL2TZ(*f*) за Ag атом	74

Табела 14.	Експериментални и теоријски подаци за таласне дужине максимума апсорпције (λ_{max}), осцилаторне снаге (*f*) и енергије електронских прелаза за комплексе сребра(I) са вориконазолом	75
Табела 15.	Процењене вредности релевантних QTAIM параметара за критичне тачке везе (BCP **1–4**) код комплекса **Ag6a – Ag8a**, добијене применом функционала M06-2X у комбинацији са базним скуповима 6-311+G(d,p) за атоме C, H, O, N и F и LANL2TZ(*f*) за Ag атом	79
Табела 16.	Минималне инхибиторне концентрације (MIC, μM) комплекса сребра(I) **Ag5 –Ag8**, вориконазола (vcz) и одфоварајућих соли сребра(I) према *Candida* сојевима, у поређењу са њиховим IC_{50} вредностима (μM). Вредности стандардних девијација су између 0 и 2%	80
Табела 17.	Вредности индекса селективности (SI) за комплексе **Ag5** – **Ag8** и vcz према испитиваним *Candida* сојевима	81
Табела 18.	Термодинамички параметри (ΔG_{bind} слободна енергија везе, K_i константа инхибиције, ΔG_{total} укупна унутрашња енергија, ΔG_{tor} торзиона слободна енергија, ΔG_{unb} невезивна енергија система, ΔG_{elec} електростатичка енергија и $\Delta G_{vdw+hbond+desolv}$ је збир дисперзије и обијања (ΔG_{vdw}), водоничне веза (ΔG_{hbond}), и дисолвационе енергије (ΔG_{desolv})) предвиђене за најповољнију конформацију комплекса **Ag6a** – **Ag8a** и vcz у активном месту CYP51B ензима	82

Биографија са подацима о досадашњем раду

Миа Станковић је рођена 10. марта 1989. године у Сарајеву. Основну школу „Божидар Вуковић – Подгоричанин" у Подгорици завршила је са одличним успехом као добитница дипломе „Луча". Након основне школе, уписала је Средњу медицинску школу, смер фармација, коју је, такође, завршила као добитница дипломе „Луча". На Металуршко-технолошки факултет у Подгорици уписала се 2008/09 године где је завршила основне, специјалистичке и магистарске студије, смер хемијска технологија. Магистрирала је 2013. године одбранивши магистарску тезу под насловом „Природни и синтетички зеолити као средства за уклањање тешких метала из отпадних вода и воде за пиће" са просечном оценом 9,80. Докторске академске студије хемије уписала је школске 2015/16. године на Природно-математичком факултету у Крагујевцу, модул Неорганска хемија. Приправнички стаж је завршила у Институту за јавно здравље Црне Горе у лабораторији за санитарну хемију, испитивање хране, воде и предмета опште употребе 2013. године. Након тога радила је на позицијама хемијски инжењер у компанији „Данлаб доо" у Подгорици и хемијски технолог у винарији „Липовац" на Цетињу од 2014. до 2017. године. Од 2017. године запослена је на Металуршко-технолошком факултету, на Катедри за општу и неорганску хемију, као сарадник у настави.

Предмет научноистраживачког рада Мие Станковић обухвата синтезу и структурну карактеризацију комплекса сребра(I) са азолима као потенцијалним терапеутским агенсима за лечење инфекција. Објавила је пет научних радова у научним часописима од међународног значаја (један рад из категорије М21а, три рада из категорије М21 и један рад из категорије М22).

Dalton Transactions

ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY

PAPER

View Article Online
View Journal | View Issue

Open Access Article. Published on 02 January 2024. Downloaded on 2/19/2026 2:37:26 PM.
This article is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 3.0 Unported Licence.

Check for updates

Cite this: Dalton Trans., 2024, 53, 2218

Silver(I) complexes containing antifungal azoles: significant improvement of the anti-*Candida* potential of the azole drug after its coordination to the silver(I) ion†

Mia Stanković,[a] Jakob Kljun,[b] Nevena Lj. Stevanović,[a] Jelena Lazic,[c] Sanja Skaro Bogojevic,[c] Sandra Vojnovic,[c] Matija Zlatar,[d] Jasmina Nikodinovic-Runic,[c] Iztok Turel,*[b] Miloš I. Djuran*[e] and Biljana Đ. Glišić*[a]

Inspired by the emergence of resistance to currently available antifungal therapy and by the great potential of metal complexes for the treatment of various diseases, we synthesized three new silver(I) complexes containing clinically used antifungal azoles as ligands, $[Ag(ecz)_2]SbF_6$ (1, ecz is econazole), $\{[Ag(vcz)_2]SbF_6\}_n$ (2, vcz is voriconazole), and $[Ag(ctz)_2]SbF_6$ (3, ctz is clotrimazole), and investigated their antimicrobial properties. The synthesized complexes were characterized by mass spectrometry, IR, UV-vis and ^{1}H NMR spectroscopy, cyclic voltammetry, and single-crystal X-ray diffraction analysis. In the mononuclear complexes 1 and 3 with ecz and ctz, respectively, the silver(I) ion has the expected linear geometry, in which the azoles are monodentately coordinated to this metal center through the N3 imidazole nitrogen atom. In contrast, the vcz-containing complex 2 has a polymeric structure in the solid state in which the silver(I) ions are coordinated by four nitrogen atoms in a distorted tetrahedral geometry. DFT calculations were done to predict the most favorable structures of the studied complexes in DMSO solution. All the studied silver(I) complexes have shown excellent antifungal and good to moderate antibacterial activities with minimal inhibitory concentration (MIC) values in the ranges of 0.01–27.1 and 2.61–47.9 μM on the selected panel of fungi and bacteria, respectively. Importantly, the complexes 1–3 have exhibited a significantly improved antifungal activity compared to the free azoles, with the most pronounced effect observed in the case of complex 2 compared to the parent vcz against *Candida glabrata* with an increase of activity by five orders of magnitude. Moreover, the silver(I)-azole complexes 2 and 3 significantly inhibited the formation of *C. albicans* hyphae and biofilms at the subinhibitory concentration of 50% MIC. To investigate the impact of the complex 3 more thoroughly on *Candida* pathogenesis, its effect on the adherence of *C. albicans* to A549 cells (human adenocarcinoma alveolar basal epithelial cells), as an initial step of the invasion of host cells, was studied.

Received 14th September 2023,
Accepted 4th December 2023
DOI: 10.1039/d3dt03010e
rsc.li/dalton

Introduction

Fungal infections are a worldwide global health problem, affecting millions of patients per year. Many fungal species are responsible for these invasive infections, which kill about one and a half million people every year. These high mortality rates, which can exceed 50%, have been attributed to the difficulty of diagnosis, and shortcomings in the current antifungal arsenal.[1–3] More than 90% of all reported fungal-related deaths result from species that belong to one of the four genera: *Cryptococcus*, *Candida*, *Aspergillus*, and *Pneumocystis*, although diseases caused by rarer fungi are becoming more common.[4] Furthermore, it has been anticipated that global warming will bring new fungal diseases to mammals.[5]

[a]University of Kragujevac, Faculty of Science, Department of Chemistry, R. Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Serbia. E-mail: biljana.glisic@pmf.kg.ac.rs
[b]University of Ljubljana, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, Večna pot 113, SI-1000 Ljubljana, Slovenia. E-mail: Iztok.Turel@fkkt.uni-lj.si
[c]University of Belgrade, Institute of Molecular Genetics and Genetic Engineering, Vojvode Stepe 444a, 11042 Belgrade, Serbia
[d]University of Belgrade-Institute of Chemistry, Technology and Metallurgy, Department of Chemistry, Njegoševa 12, 11000 Belgrade, Serbia
[e]Serbian Academy of Sciences and Arts, Knez Mihailova 35, 11000 Belgrade, Serbia. E-mail: milos.djuran@pmf.kg.ac.rs

†Electronic supplementary information (ESI) available: Fig. S1–S12 and Tables S1–S3. CCDC 2277941–2277943. For ESI and crystallographic data in CIF or other electronic format see DOI: https://doi.org/10.1039/d3dt03010e

This journal is © The Royal Society of Chemistry 2024

Journal of Inorganic Biochemistry 256 (2024) 112572

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Inorganic Biochemistry

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

Silver(I) complexes with voriconazole as promising anti-*Candida* agents

Mia Stanković [a], Sanja Skaro Bogojevic [b], Jakob Kljun [c], Žiko Milanović [d], Nevena Lj. Stevanović [a], Jelena Lazic [b], Sandra Vojnovic [b], Iztok Turel [c,*], Miloš I. Djuran [e,*], Biljana Đ. Glišić [a,*]

[a] University of Kragujevac, Faculty of Science, Department of Chemistry, R. Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Serbia
[b] University of Belgrade, Institute of Molecular Genetics and Genetic Engineering, Vojvode Stepe 444a, 11042 Belgrade, Serbia
[c] University of Ljubljana, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, Večna pot 113, SI-1000, Ljubljana, Slovenia
[d] University of Kragujevac, Institute for Information Technologies Kragujevac, Department of Science, Jovana Cvijića bb, 34000 Kragujevac, Serbia
[e] Serbian Academy of Sciences and Arts, Knez Mihailova 35, 11000 Belgrade, Serbia

ARTICLE INFO

Keywords:
Silver(I) complexes
Voriconazole
Coordination polymers
DFT calculations
Anti-Candida activity
CYP51B

ABSTRACT

Recognizing that metal ions play an important role in modifying the pharmacological properties of known organic-based drugs, the present manuscript addresses the complexation of the antifungal agent voriconazole (vcz) with the biologically relevant silver(I) ion as a strategy for the development of new antimycotics. The synthesized silver(I) complexes with vcz were characterized by mass spectrometry, IR, UV–Vis and NMR spectroscopy and single-crystal X-ray diffraction analysis. The crystallographic results showed that complexes {[Ag(vcz)(H_2O)]CH_3SO_3}$_n$ (1), {[Ag(vcz)$_2$]BF_4}$_n$ (2) and {[Ag(vcz)$_2$]PF_6}$_n$ (3) have polymeric structures in the solid state, in which silver(I) ions have a distorted tetrahedral geometry. On the other hand, DFT calculations revealed that the investigated silver(I) complexes 1–3 in DMSO exist as linear [Ag(vcz-*N2*)(vcz-*N19*)]$^+$ (1a), [Ag(vcz-*N2*)(vcz-*N4*)]$^+$ (2a) and [Ag(vcz-*N4*)$_2$]$^+$ (3a) species, respectively. The evaluated complexes showed an enhanced anti-*Candida* activity compared to the parent drug with minimal inhibitory concentration (MIC) values in the range of 0.02–1.05 μM. In comparison with vcz, the corresponding silver(I) complexes showed better activity in prevention hyphae and biofilm formation of *C. albicans*, indicating that they could be considered as promising agents against *Candida* that significantly inhibit its virulence. Also, these complexes are much better inhibitors of ergosterol synthesis in the cell membrane of *C. albicans* at the concentration of 0.5 × MIC. This is also confirmed by a molecular docking, which revealed that complexes 1a – 3a showed better inhibitory activity than vcz against the sterol 14α-demethylase enzyme cytochrome P450 (CYP51B), which plays a crucial role in the formation of ergosterol.

1. Introduction

Fungal infections have a profound impact on global human health with incidences rising notably over the last few decades. About 1.5–2 million people die of a fungal infection each year and most of this mortality is caused by species belonging to four genera of fungi: *Aspergillus*, *Candida*, *Cryptococcus*, and *Pneumocystis* [1–3]. Moreover, it was recently reported that the incidence of fungal diseases is substantially

Abbreviations: vcz, voriconazole; IR spectroscopy, infrared spectroscopy; UV–Vis spectroscopy, ultraviolet-visible spectroscopy; NMR spectroscopy, nuclear magnetic resonance spectroscopy; DFT, density functional theory; DMSO, dimethyl sulfoxide; MIC, minimal inhibitory concentration; CYP51B, sterol 14α-demethylase enzyme cytochrome P450; MIC_{90}, the lowest concentration which inhibits 90% of growth compared to the control; DMSO-d_6, deuterated dimethyl sulfoxide; br, broad; vs, very strong; s, strong; m, medium; w, weak; δ, chemical shift; ppm, parts per million; *J*, scalar coupling; *s*, singlet; *d*, doublet; *dd*, doublet of doublets; *dt*, doublet of triplets; *t*, triplet; *td*, triplet of doublets; *q*, quartet; *m*, multiplet; ATCC, American Type Culture Collection; cfu, colony forming units; MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; RPMI, Roswell Park Memorial Institute; FBS, fetal bovine serum; IC_{50}, the concentration inhibiting cell growth by 50%; PBS, phosphate-buffered saline; CV, crystal violet; CPCM, Conductor-like Polarizable Continuum Model; GIAO, Gauge Independent Atomic Orbital; TD–DFT, Time-Dependent Density Functional Theory; BCPs, Bond Critical Points; QTAIM, Quantum Theory of Atoms in Molecules; PDB, Protein Data Bank; ADT, AutoDockTools; LGA, Lamarckian Genetic Algorithm; SD, standard deviation; LSD, Least Significant Difference; CSD, Cambridge Structural Database; MAE, mean absolute error; HOMO, Highest Occupied Molecular Orbital; LUMO, Lowest Unoccupied Molecular Orbital; SI, selectivity index; AgNPs, silver nanoparticles.

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

https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2024.112572
Received 14 February 2024; Received in revised form 9 April 2024; Accepted 19 April 2024
Available online 21 April 2024
0162-0134/© 2024 The Authors. Published by Elsevier Inc. This is an open access article under the CC BY-NC license (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).

Journal of Molecular Structure 1321 (2025) 140118

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Molecular Structure

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

Silver(I) complexes with antifungal drug econazole: Structural characterization and antimicrobial activity study

Mia Stanković [a], Sanja Skaro Bogojevic [b,*], Jakob Kljun [c], Nevena Lj. Stevanović [a], Žiko Milanović [d], Jelena Lazic [b], Sandra Vojnovic [b], Iztok Turel [c,*], Miloš I. Djuran [a,*], Biljana D. Glišić [a,*]

[a] Faculty of Science, Department of Chemistry, University of Kragujevac, Radoja Domanovića 12, Kragujevac 34000, Serbia
[b] University of Belgrade, Institute of Molecular Genetics and Genetic Engineering, Vojvode Stepe 444a, Belgrade 11042, Serbia
[c] Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana, Večna pot 113, Ljubljana SI-1000, Slovenia
[d] Department of Science, University of Kragujevac, Institute for Information Technologies Kragujevac, Jovana Cvijića bb, Kragujevac 34000, Serbia
[e] Serbian Academy of Sciences and Arts, Knez Mihailova 35, Belgrade 11000, Serbia

ARTICLE INFO

Keywords:
Silver(I) complexes
Econazole
Structural characterization
Antimicrobial activity
Theoretical calculations

ABSTRACT

Two new silver(I) complexes with the antifungal agent econazole (ecz) of the general formula $[Ag(ecz)_2]X$, X = $CF_3SO_3^-$ (Ag1) and PF_6^- (Ag2), were synthesized and structurally characterized by spectroscopic (^1H NMR, IR and UV–Vis) and electrochemical methods. The crystal structure of Ag2 was determined by single crystal X-ray diffraction analysis, confirming an ideal linear geometry of the silver(I) ion in this complex. In addition, by utilizing Hirshfeld surface analysis (HSA), it was verified that the crystal structure of Ag2 is stabilized by H···H, H···Cl, C···H, and H···F interactions. Density functional theory (DFT) calculations provided additional evidence for formation of the complexes in the solid state and their stability in solution. The coordination of ecz to the silver(I) ion endowed this agent with antibacterial activity against Gram-positive (*Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*) and Gram-negative (*Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*) bacteria. The most significant antibacterial activity of Ag1 and Ag2 was observed against *S. aureus* with 56- and 73-fold improvement, respectively, compared to the parent drug. Moreover, a study of the bacterial antibiofilm activity revealed that these complexes were able to prevent approximately 90 % of biofilm formation at their low concentrations. Also, both complexes have shown more pronounced anti-Candida activity than econazole itself, being less toxic on the human normal fibroblast cell line MRC-5. The total amount of ergosterol was reduced in the presence of the subinhibitory concentrations of Ag1 and Ag2 complexes, which was also confirmed by a molecular docking study with two isomers of cytochrome P450 sterol 14α-demethylase, CYP51B and CYP130, as target receptors.

1. Introduction

Growing antimicrobial resistance (AMR) is considered as a serious threat to human, animal, and plant health, food security and economic development [1]. Since the used antimicrobial agents are increasingly failing to treat infections, the research and development of novel antimicrobials to successfully combat AMR development are urgently needed [1]. While bacteria and viruses have been recognized as important public health problems, fungi remain underappreciated as major pathogens in terms of novel drug design [2]. Although most fungi do not cause serious human diseases, there are several hundreds of fungi that have a significant role in the development of fungal infections or other diseases, and this includes cancer [3,4]. Among others, patients with cancer and diabetes, as well as transplant, surgical, and intensive care unit patients, are most susceptible to invasive fungal infections (IFI) [3]. Recent analysis has revealed that about 1 565 000 people have a *Candida* bloodstream infection or invasive candidiasis each year, with 995 000 deaths [6]. The limited number of antifungals represents a major problem in the treatment of IFI, leading to high morbidity and mortality rates [5,6]. Overall, there are currently five classes of approved antifungals clinically used in the IFI treatment, namely azoles, polyenes, echinocandins, allylamines and antimetabolites [7]. Among

* Corresponding authors.
E-mail addresses: sanja.bogojevic@imgge.bg.ac.rs (S. Skaro Bogojević), Iztok.Turel@fkkt.uni-lj.si (I. Turel), milos.djuran@pmf.kg.ac.rs (M.I. Djuran), biljana.glisic@pmf.kg.ac.rs (B.D. Glišić).

https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2024.140118
Received 24 July 2024; Received in revised form 10 September 2024; Accepted 17 September 2024
Available online 19 September 2024
0022-2860/© 2024 Elsevier B.V. All rights are reserved, including those for text and data mining, AI training, and similar technologies.

Образац 1

ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Изјављујем да докторска дисертација под насловом:

Структура и антимикробна активност комплекса сребра(I) са неким клинички коришћеним азолима

представља *оригинално ауторско дело* настало као резултат *сопственог истраживачког рада.*

Овом Изјавом такође потврђујем:

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

У Крагујевцу, 23.02.2026. године,

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:

Структура и антимикробна активност комплекса сребра(I) са неким клинички коришћеним азолима

истоветне.

У Крагујевцу, 23.02.2026. године,

потпис аутора

Образац 3

ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Миа Станковић,

☑ дозвољавам

☐ не дозвољавам

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

Структура и антимикробна активност комплекса сребра(I) са неким клинички коришћеним азолима

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 дозвољавам[1]

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

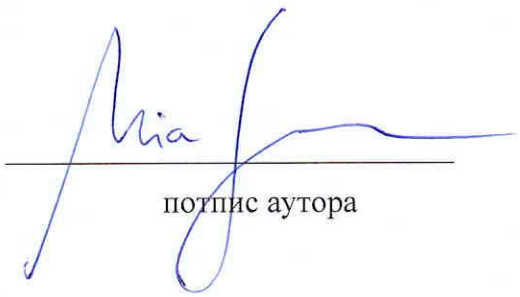
3) Ауторство - без прерада

4) Ауторство - некомерцијално

5) Ауторство - некомерцијално - делити под истим условима

6) Ауторство - некомерцијално - без прерада[2]

У Крагујевцу, 23.02.2026 године,



потпис аутора

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