



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ

Тина П. Андрејевић

**СТРУКТУРА И АНТИМИКРОБНА АКТИВНОСТ
КОМПЛЕКСА БАКРА(II), ЦИНКА(II) И СРЕБРА(I)
СА ЛИГАНДИМА КОЈИ САДРЖЕ ПИРИДИН**

докторска дисертација

Крагујевац, 2024



UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC

FACULTY OF SCIENCE

Tina P. Andrejević

**STRUCTURE AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF
COPPER(II), ZINC(II) AND SILVER(I) COMPLEXES
WITH PYRIDINE-CONTAINING LIGANDS**

Doctoral Dissertation

Kragujevac, 2024

Идентификациона страница докторске дисертације

Аутор	
Име и презиме: Тина Андрејевић	
Датум и место рођења: <i>22. август 1993. године, Крагујевац</i>	
Садашње запослење: <i>Истраживач сарадник на Природно-математичком факултету Универзитета у Крагујевцу</i>	
Докторска дисертација	
Наслов: Структура и антимикробна активност комплекса бакра(II), цинка(II) и сребра(I) са лигандима који садрже пиридин	
Број страница: <i>139</i>	
Број слика: <i>88</i>	
Број библиографских података: <i>333</i>	
Установа и место где је рад израђен: <i>Природно-математички факултет, Универзитет у Крагујевцу</i>	
Научна област (УДК): <i>Хемија (54)</i>	
Ментор: <i>др Биљана Ђ. Глишић, ванредни професор, Природно-математички факултет, Универзитет у Крагујевцу</i>	
Оцена и одбрана	
Датум пријаве теме: <i>9. септембар 2020. године</i>	
Број одлуке и датум прихватања теме докторске дисертације: <i>број: IV-01-920/8 датум: 9. децембар 2020. године</i>	
Комисија за оцену научне заснованости теме и испуњености услова кандидата:	
<ol style="list-style-type: none"><i>1. др Милош И. Ђуран, редовни професор у пензији и дописни члан САНУ, Универзитет у Крагујевцу, Природно-математички факултет; ужа научна област: Неорганска хемија, председник</i><i>2. др Изток Турел, редовни професор, Универзитет у Љубљани, Факултет за хемију и хемијску технологију, ужа научна област: Неорганска хемија, члан</i><i>3. др Јасмина Никодиновић-Рунић, научни саветник, Универзитет у Београду, Институт за молекуларну генетику и генетичко инжењерство; ужа научна област: Молекуларна биологија, члан</i><i>4. др Зоран Матовић, редовни професор, Универзитет у Крагујевцу, Природно-математички факултет, ужа научна област: Неорганска хемија, члан</i><i>5. др Биљана Ђ. Глишић, доцент, Универзитет у Крагујевац, Природно-математички факултет, ужа научна област: Неорганска хемија, ментор</i>	
Комисија за оцену и одбрану докторске дисертације:	
<ol style="list-style-type: none"><i>1. Академик Милош И. Ђуран, редовни професор у пензији, Универзитет у Крагујевцу, Природно-математички факултет; ужа научна област: Неорганска хемија, председник</i><i>2. др Изток Турел, редовни професор, Универзитет у Љубљани, Факултет за хемију и хемијску технологију, ужа научна област: Неорганска хемија, члан</i><i>3. др Јасмина Никодиновић-Рунић, научни саветник, Универзитет у Београду, Институт за молекуларну генетику и генетичко инжењерство; ужа научна област: Молекуларна биологија, члан</i><i>4. др Јована Богојески, ванредни професор, Универзитет у Крагујевцу, Природно-математички факултет, ужа научна област: Неорганска хемија, члан</i><i>5. др Дарко Ашанин, научни сарадник, Универзитет у Крагујевцу, Институт за информационе технологије Крагујевац, научна област: Хемија, члан</i>	
Датум одбране дисертације:	

Породици

Захвалница

Ова докторска дисертација је рађена на Институту за хемију, Природно-математичког факултета, Универзитета у Крагујевцу, под менторством ванредног професора др Биљане Ђ. Глишић. Неизмерну захвалност у досадашњем истраживачком раду, изради и писању докторске дисертације дугујем свом ментору на указаном поверењу и прилици да радим са њом и да учим од ње, као и на несебичној помоћи, саветима, подрици и на безграничном разумевању. Имала сам велику срећу да ми она буде ментор и надам се да ћемо још дуго радити заједно.

Велику захвалност дугујем професору др Милошу И. Ђурану, председнику комисије за оцену и одбрану ове докторске дисертације, на позиву да се придружим његовој истраживачкој групи, што је била једна од мојих најбољих одлука. Захваљујем се професору на корисним саветима и сугестијама, као и на дискусијама из којих сам много научила.

Захваљујем се др Изтоку Турелу, редовном професору на Факултету за хемију и хемијску технологију, Универзитета у Љубљани, др Јасмини Никодиновић-Рунић, научном саветнику Института за молекуларну генетику и генетичко инжењерство, Универзитета у Београду, и др Јована Богојески, ванредном професору Природно-математичког факултета, Универзитета у Крагујевцу, на корисним саветима и сугестијама у току израде и писања докторске дисертације.

Посебну захвалност дугујем др Дарку Ашанину, научном сараднику на Институту за информационе технологије Крагујевац, Универзитета у Крагујевцу на саветима, који су ми много помогли у експерименталном раду, али и на великом стрпљењу приликом одговарања на моја бројна питања.

Захвалност на помоћи, разумевању и подрици дугујем и својим сарадницима из лабораторије са којима сам радила и са којима још увек радим, Нади, Соњи, Невени, Ивани, Јелени и Бојани. Сви заједно смо се трудили да радна атмосфера увек буде пријатна, пуна смеха и позитивног расположења.

Захваљујем се својим пријатељима који су ме бодрили, били уз мене и веровали да ће једног дана присуствовати одбрани моје докторске дисертације.

Безграничну захвалност дугујем оцу, мајци, сестри Нини, зету и мојим сестрићима Матији и Дамјану на подрици, која ми је много значила. Захваљујући мајци и њеној помоћи нисам правила велике паузе у експерименталном раду у периоду породилског одсуства, због чега сам постигла велики број резултата.

Највећу захвалност дугујем свом супругу Николи на подрици од самог почетка. Он је веровао у мене и није ми дозволио да одустанем, када ми је било најтеже. Овај успех има за мене посебну вредност, јер су ме на овом путу пратила моја деца, син Павле и ћерка Петра. Хвала Вам на свему и ово је НАШ успех.

Тина Андрејевић

Апстракт

У оквиру ове докторске дисертације, синтетисани су комплекси бакра(II), цинка(II) и сребра(I) са лигандима који садрже пиридин као потенцијални антимикуробни агенси. Синтетисани комплекси су структурно окарактерисани применом спектроскопских, електрохемијских и кристалографских метода. Испитивана је њихова антимикуробна активност на различитим бактеријским и гљивичним врстама. Поред тога, испитивана је и антипролиферативна активност синтетисаних комплекса на здравој ћелијској линији фибробласта плућа (MRC-5) у циљу одређивања њихове евентуалне цитотоксичности, то јест терапеутског профила.

Структурне особине и антимикуробна активност синтетисаних комплекса бакра(II), цинка(II) и сребра(I) су поређене са одговарајућим особинама структурно сличних комплекса, као и са лековима који се примењују у терапији инфекција изазваних микроорганизмима.

У првом делу докторске дисертације описан је проблем развоја резистентности микроорганизама на клинички коришћене лекове, који представљају деривате органских једињења. Поред тога, приказан је значај једињења на бази јона метала, која су још од давних времена показала ефекте у терапији инфекција изазваних микроорганизмима и других болести. Дат је преглед комплекса бакра(II), цинка(II) и сребра(I) са ароматичним хетероцикличним лигандима који садрже донорски атом азота и који су показали антимикуробну активност. У другом делу дисертације, описани су поступци за синтезу комплекса бакра(II), цинка(II) и сребра(I), методе коришћене за њихову структурну карактеризацију, испитивање њихове антимикуробне активности, као и за испитивање њихове реактивности према биолошки значајним молекулима. У трећем делу приказани су резултати спектроскопске карактеризације и рендгенске структурне анализе синтетисаних комплекса, резултати испитивања њихове антимикуробне и цитотоксичне активности, као и резултати интеракција синтетисаних комплекса са биомолекулима.

Кључне речи

- Комплекси бакра(II)
- Комплекси цинка(II)
- Комплекси сребра(I)
- Диметил-пиридиндикарбоксилатни естри
- Ароматична *N*-хетероциклична једињења
- Спектроскопска карактеризација
- Рендгенска структурна анализа
- DFT прорачуни
- Антимикуробна активност
- Цитотоксичност
- Биофилм
- Каталитичка активност
- DNA/BSA интеракције
- Синергизам

Abstract

In this doctoral dissertation, copper(II), zinc(II) and silver(I) complexes with pyridine-containing ligands have been synthesized and evaluated as potential antimicrobial agents. The synthesized complexes were structurally characterized by spectroscopic, electrochemical, and crystallographic methods. Their antimicrobial activity was evaluated against different bacterial and fungal species. Besides that, antiproliferative activity of the synthesized complexes on the healthy human lung fibroblast cell line (MRC-5) has been studied to determine their potential cytotoxicity in order to determine their therapeutic profile.

The structural properties and antimicrobial activity of the synthesized copper(II), zinc(II) and silver(I) complexes have been compared with the corresponding properties of the structurally similar complexes and clinically used antimicrobial agents.

In the first part of the doctoral dissertation, development of the resistance of microorganisms to the clinically used drugs, which are derivatives of organic compounds, is described. Moreover, the importance of metal-based compounds, which have shown effectiveness in the treatment of infections caused by microorganisms and other diseases from ancient times, is also presented. An overview of the copper(II), zinc(II) and silver(I) complexes with aromatic nitrogen-containing heterocyclic ligands that have shown antimicrobial activity is given. In the second part of the doctoral dissertation, procedures for the synthesis of copper(II), zinc(II) and silver(I) complexes are described, as well as methods used for their structural characterization, antimicrobial evaluation and their reactivity towards biologically significant molecules. In the third part, the results of the spectroscopic and single-crystal X-ray diffraction analysis of the synthesized copper(II), zinc(II) and silver(I) complexes have been presented, the results obtained by evaluation of their antimicrobial and cytotoxic activity, as well as the results of their interactions with biomolecules.

Keywords

- Copper(II) complexes
- Zinc(II) complexes
- Silver(I) complexes
- Dimethyl pyridinedicarboxylate esters
- Aromatic *N*-heterocycles
- Spectroscopic characterization
- Single-crystal X-ray diffraction analysis
- DFT calculations
- Antimicrobial activity
- Cytotoxicity
- Biofilm
- Catalytic activity
- DNA/BSA interactions
- Synergistic activity

САДРЖАЈ

1. ОПШТИ ДЕО	1
1.1. Резистентност микроорганизама на антимикуробне лекове	2
1.2. Комплекси метала као антимикуробни агенси	5
1.3. Бакар.....	8
1.3.1. Бакар као микроелемент	8
1.3.2. Физичко-хемијске карактеристике бакра	10
1.3.3. Антимикуробна активност бакар(II) комплекса	11
1.4. Цинк	16
1.4.1. Цинк као микроелемент	16
1.4.2. Физичко-хемијске карактеристике цинка	18
1.4.3. Антимикуробна активност цинк(II) комплекса	19
1.5. Сребро	22
1.5.1. Примена сребра и његових једињења у медицини	22
1.5.2. Физичко-хемијске карактеристике сребра	25
1.5.3. Антимикуробна активност сребро(I) комплекса	26
2. ПРЕДМЕТ ИСТРАЖИВАЊА	31
3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО	34
3.1. Хемикалије и реагенси	35
3.2. Синтезе.....	35
3.2.1. Синтеза диметил-пиридин-дикарбоксилатних естара	35
3.2.2. Синтеза комплекса 1 – 5	35
3.2.3. Синтеза комплекса 6 и 7	36
3.2.4. Синтеза комплекса 8 – 10	37
3.2.5. Синтеза комплекса 11 и 12	37
3.2.6. Синтеза комплекса 13 – 17	38
3.2.7. Синтеза комплекса 18 и 19	39
3.3. Кристалографски подаци и рендгенска структурна анализа.....	40
3.3.1. Основни кристалографски подаци и рендгенска структурна анализа комплекса 1 – 5	40
3.3.2. Основни кристалографски подаци и рендгенска структурна анализа комплекса 6 и 7	43
3.3.3. Основни кристалографски подаци и рендгенска структурна анализа комплекса 8 – 10	44
3.3.4. Основни кристалографски подаци и рендгенска структурна анализа комплекса 11 и 12	45

3.3.5. Основни кристалографски подаци и рендгенска структурна анализа комплекса 13 – 17	46
3.3.6. Основни кристалографски подаци и рендгенска структурна анализа комплекса 18 и 19	48
3.4. Физичка мерења	49
3.4.1. Елементална микроанализа	49
3.4.2. ESI-HRMS мерења	50
3.4.3. IR мерења	50
3.4.4. NMR мерења.....	50
3.4.5. UV-Vis мерења	50
3.4.6. Мерење моларне проводљивости.....	50
3.4.7. Волтаметријска мерења	50
3.4.8. Испитивање стабилности комплекса	50
3.4.9. Квантно-механички прорачуни.....	51
3.5. Биолошка испитивања	51
3.5.1. Припрема хранљивих подлога	51
<i>Luria Bertani</i> подлога (LB-течна подлога).....	51
<i>Luria Bertani</i> подлога (LA-чврста подлога).....	51
<i>Sabourand dextrose</i> подлога (SAB)	51
RPMI подлога.....	51
Spider подлога.....	51
Tryptic soy broth подлога (TSB)	52
3.5.2. Испитивање антимикробне активности комплекса	52
3.5.3. Испитивање цитотоксичности	52
3.5.4. Инхибиција активности комплекса на формирање хифа код <i>C. albicans</i>	53
3.5.5. Инхибиција активности комплекса на формирање биофилма код <i>C. albicans</i>	53
3.5.6. Стварање реактивних кисеоничних врста (ROS) код <i>C. albicans</i>	54
3.5.7. Адхезиони тест код <i>C. albicans</i>	54
3.5.8. Тест деполаризације мембране <i>S. aureus</i>	54
3.5.9. Тест преживљавања <i>Caenorhabditis elegans</i>	54
3.5.10. Синергистичко деловања комплекса са нистатином	55
3.5.11. Испитивање утицаја комплекса на међубактеријску комуникацију (<i>quorum sensing</i> , QS).....	55
3.5.12. Статистички прорачуни	55
3.6. Интеракције са биомолекулима.....	55
3.6.1. Флуоресцентна емисиона спектроскопија.....	55
3.6.2. Гел електрофореза	56
3.7. Липофилност	56

3.8. Каталитичка активност комплекса бакара(II) са диметил-6-(пиразин-2-ил)пиридин-3,4-дикарбоксилатом	56
4. ДИСКУСИЈА РЕЗУЛТАТА	58
4.1. Синтеза, структурна карактеризација и антимикуробна активност бакара(II) комплекса са диметил-пиридин-4,5-дикарбоксилатним естрима	59
4.1.1. <i>Опис кристалних структура</i>	60
4.1.2. <i>Спектроскопска карактеризација</i>	62
4.1.3. <i>Стабилност комплекса у раствору</i>	62
4.1.4. <i>Биолошка активност</i>	64
<i>Антимикуробна и цитотоксична активност</i>	64
<i>Инхибиција филаментнације и формирања биофилма код <i>C. albicans</i> соја</i>	65
<i>Адхезиони тест</i>	66
4.1.5. <i>Интеракције са BSA</i>	67
4.1.6. <i>Липофилност</i>	68
4.1.7. <i>Интеракције са DNA</i>	68
<i>Гел електрофореза</i>	68
<i>Флуоресцентна емисиона спектроскопија</i>	69
4.2. Синтеза, структурна карактеризација и антимикуробна активност бакара(II) комплекса са диметил-6-(пиразин-2-ил)пиридин-3,4-дикарбоксилатом	70
4.2.1. <i>Опис кристалних структура</i>	71
4.2.2. <i>Спектроскопска карактеризација</i>	72
4.2.3. <i>Стабилност комплекса у раствору</i>	73
4.2.4. <i>DFT проручани</i>	74
4.2.5. <i>Биолошка активност</i>	74
<i>Антимикуробна и цитотоксична активност</i>	74
<i>Инхибиција филаментнације и формирања биофилма</i>	75
<i>Испитивање анти-QS активности</i>	76
4.2.6. <i>Интеракције са BSA</i>	76
4.2.7. <i>Липофилност</i>	77
4.2.8. <i>Интеракције са DNA</i>	77
4.2.9. <i>Каталитичка активност</i>	78
4.3. Синтеза, структурна карактеризација и антимикуробна активност цинка(II) комплекса са ароматичним <i>N</i> -хетероцикличним једињењима.....	79
4.3.1. <i>Опис кристалних структура</i>	80
4.3.2. <i>Спектроскопска карактеризација</i>	84
4.3.3. <i>Стабилност комплекса у раствору</i>	85
4.3.4. <i>Биолошка активност</i>	85
<i>Антимикуробна активност</i>	85

Ефекат комплекса 10 на инхибицију филаментног раста <i>C. albicans</i>	86
Цитотоксичност и адхезиони тест комплекса 10	87
Синергистички ефекат комплекса 10 са нистатином	88
4.4. Синтеза, структурна карактеризација и антимикуробна активност цинк(II) комплекса са диметил-2,2'-бипиридин-4,5-дикарбоксилатом	89
4.4.1. Опис кристалних структура	89
4.4.2. Спектроскопска карактеризација	90
4.4.3. Стабилност комплекса у раствору	91
4.4.4. Биолошка активност	92
Антимикуробна и цитотоксична активност	92
Ефекат комплекса на филаментацију и формирања биофилма <i>C. albicans</i> соја	92
4.4.5. Интеракције са BSA	93
4.4.6. Интеракције са DNA	94
Флуоресцентна емисиона спектроскопија	94
Гел електрофореза	95
4.5. Синтеза, структурна карактеризација и антимикуробна активност сребро(I) комплекса са диметил-пиридин-4,5-дикарбоксилатним естрима	95
4.5.1. Опис кристалних структура	96
4.5.2. Спектроскопска карактеризација	98
4.5.3. Стабилност комплекса у раствору	98
4.5.4. Биолошка активност	100
Антимикуробна и цитотоксична активност	100
Нарушавање мембранског потенцијала и активност према биофилму <i>S. aureus</i>	102
Формирање ROS код <i>C. albicans</i>	103
Инхибиција филаментације и формирања биофилма код <i>C. albicans</i>	104
4.6. Синтеза, структурна карактеризација и антимикуробна активност сребро(I) комплекса са диметил-6-(пиразин-2-ил)пиридин-3,4-дикарбоксилатом	105
4.6.1. Опис кристалних структура	106
4.6.2. Спектроскопска карактеризација	106
4.6.3. Стабилност комплекса у раствору	107
4.6.4. DFT проручани	108
4.6.5. Биолошка активност	109
Антимикуробна и цитотоксична активност	109
Инхибиција филаментације и формирања биофилма	110
Испитивање анти-QS активности	110
4.6.6. Интеракције са BSA	111
4.6.7. Липофилност	112

4.6.8. <i>Интеракције са DNA</i>	112
5. ЗАКЉУЧАК	113
6. ЛИТЕРАТУРА	116
7. ПРИЛОГ	129
<i>ЛИСТА СКРАЋЕНИЦА И ТЕРМИНА КОРИШЋЕНИХ У ТЕКСТУ</i>	130
<i>СПИСАК СЛИКА</i>	133
<i>СПИСАК ТАБЕЛА</i>	137
<i>Биографија са подацима о досадашњем раду</i>	139

1. ОПШТИ ДЕО

1.1. Резистентност микроорганизама на антимикуробне лекове

Антимикуробни лекови се примењују у терапији различитих инфекција, које могу да изазову микроорганизми, попут бактерија, гљивица, вируса и паразита. Међутим, због њихове честе и неадекватне примене, микроорганизми развијају резистентност на једињења која улазе у састав ових лекова. Управо због тога, данас је веома тешко, некада чак и немогуће, излечити инфекције изазване патогеним микроорганизмима.¹ Поред тога, ове инфекције су један од главних узрочника који доводе до компликација и смрти пацијената оболелих од разних врста тумора.²

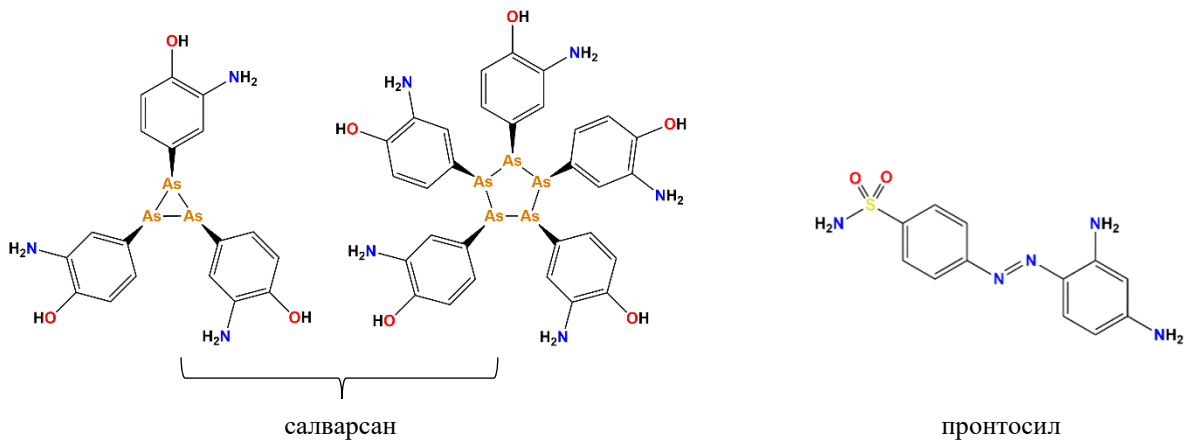
Светска здравствена организација (*World Health Organization, WHO*) у свом последњем извештају из 2022. године указује на висок ниво антимикуробне резистентности (*antimicrobial resistance, AMR*), као један од најсложенијих проблема, који угрожава здравље људи широм света. Истраживања у оквиру овог извештаја су показала да је AMR одговорна за смрт 4,95 милиона људи у 2019. години, при чему су, од тога, 1,27 милиона смртних случајева директна последица развоја резистентности микроорганизама на лекове који се примењују у терапији микробних инфекција.³ Такође, предвиђа се да ће тај број, у случају непредузимања неопходних мера, порастати и до 10 милиона до 2050. године, што је упоредиво са стопом смртности од туморских обољења у 2020. години.¹ Ово је глобални проблем који представља ризик за све земље, а посебно за оне са ниским стандардом и неадекватном здравственом заштитом и хигијенским условима. На основу истраживања о броју умрлих услед развоја AMR по континентима у 2019. години, Мареј (*Murray*) и његови сарадници су закључили да је највећа стопа смртности уочена у Африци и Јужној Азији.^{3,4}

Од 1,27 милиона забележених смртних случајева који су последица развоја AMR, код 929.000 уочена је појава резистентности шест бактерија, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* и *Pseudomonas aeruginosa*.³ Забележене су и компликације услед развоја резистентности *S. aureus* на клинички коришћен метицилин, које су се завршиле смртним исходом више од 100.000 људи у 2019. години, док су *E. coli* и *K. pneumoniae* постале отпорне на трећу генерацију цефалоспорина. После цефалоспорина, у највећем проценту резистентност на *E. coli* развијају флуорохинолони, група антибиотика широког спектра деловања, као што су ципрофлоксацин, левофлоксацин и офлоксацин.³

У клиничким испитивањима из децембра 2020. године, налазила су се 43 нова једињења као кандидати за антибиотике.⁵ Међутим, овај број није охрабрујући, ако се наведе чињеница да је америчка фармацеутска индустрија две године раније развила преко 1100 лекова и вакцина за лечење рака, од којих су сви у клиничким испитивањима, при чему неки од њих чекају на процену Америчке управе за храну и лекове (*U.S. Food & Drug Administration, FDA*).⁶ Од укупно 43 клинички испитиваних једињења, само 11 једињења (25%) представљају нове структурне класе антибиотика, док су преосталих 32 (75%), деривати већ познатих антибиотика, који се клинички примењују у терапији бактеријских инфекција, због чега постоји ризик да ће бактерије временом развити резистентност и на њих.⁵ Већина антибиотика, који се данас налазе у клиничким или претклиничким испитивањима, заправо су органска једињења.⁷ Посебно интересантну групу органских једињења представљају хетероциклична једињења која садрже азот у прстену (*N*-хетероциклична једињења), због своје разноврсне биолошке активности.⁸

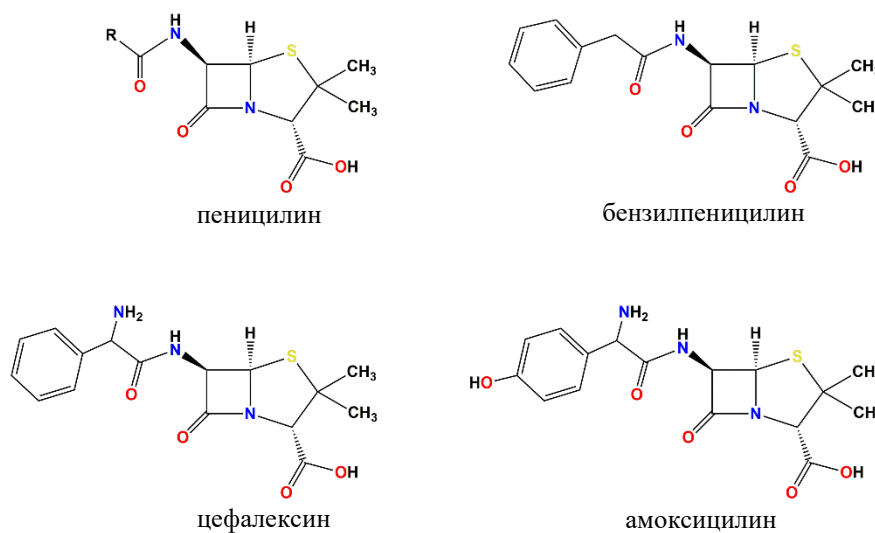
Први антибиотик примењен 1910. године за лечење сифилиса познат је под називом салварсан или арсфенамин (Слика 1). То је једињење на бази арсена, које је открио Пол Ерлих (*Paul Ehrlich*).⁹ Међутим, због своје високе токсичности, врло брзо је

замењен антибиотиком из групе сулфонамида, пронтосилом (Слика 1). Сулфонамиди су показали значајну ефикасност према великом броју бактерија, због чега се и данас примењују.¹⁰



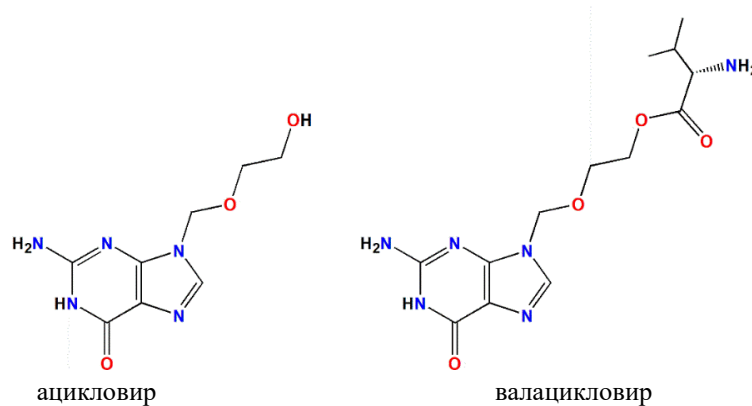
Слика 1. Структурне формуле првобитно коришћених антибиотика, салварсана (смеша тримерне и пентамерне форме) и пронтосила

Шкотски бактериолог Александар Флеминг (*Alexander Fleming*) је 1928. године приметио да се на дну Петријеве шоље појавила буђ и уништила бактерију, стафилококу (*S. aureus*), коју је узгајао.^{11,12} Затим је из буђи изоловао једињење, које је назвао пеницилин, по фамилији којој припада гљивица.¹³ Структура пеницилина је одређена 1945. године (Слика 2), што је омогућило развој нових деривата овог антибиотика у циљу спречавања појаве резистентности код лечења бактеријских инфекција.¹⁴ Након десет година напорног рада истраживачке групе са Универзитета у Оксфорду, било је познато неколико деривата пеницилина, од којих је бензилпеницилин показао најбољу активност за лечење озбиљнијих бактеријских инфекција (Слика 2).¹³ Амоксицилин и цефалексин су антибиотици широког спектра деловања из ове групе, који се примењују за лечење бактеријских инфекција грла, плућа, коже и уринарног тракта (Слика 2).¹⁵



Слика 2. Структурне формуле антибиотика из групе пеницилина

Међу клинички коришћеним антимикуробним агенсима из групе петочланих *N*-хетероцикличних једињења издваја се ацикловир (Слика 3), чију је примену 1981. године одобрила FDA за лечење инфекција коже изазваних вирусом *Herpes simplex*, као и за заустављање раста вируса који узрокује овчије богиње и шигелу.^{13,16} Поред тога, за лечење ових вирусних инфекција примењује се валацикловир (Слика 3), који се може синтетисати естерификацијом ацикловира са L-валином.¹⁷



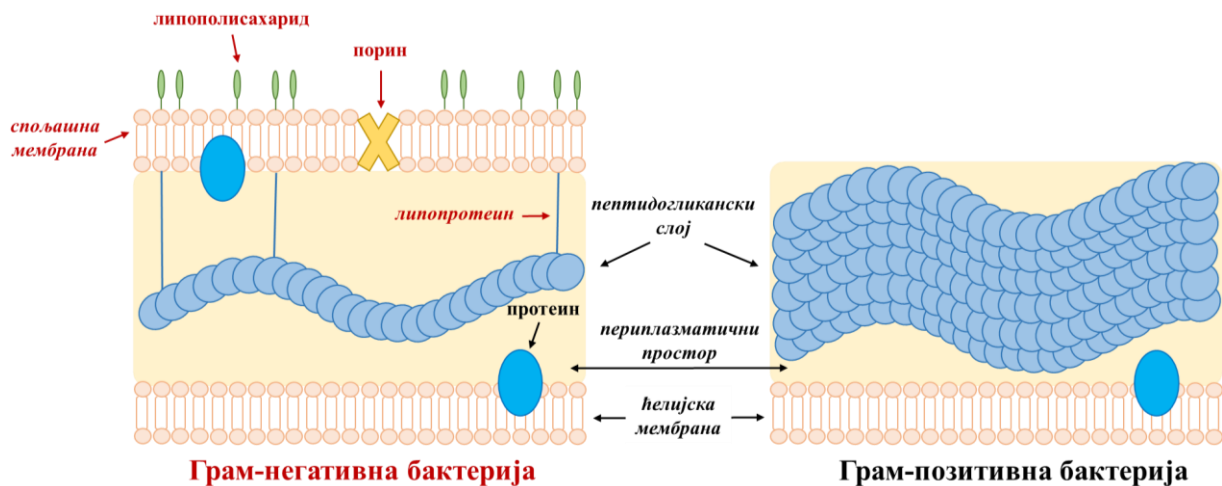
Слика 3. Структурне формуле антивиروتика, ацикловира и валацикловира

Антимикуробни лекови испољавају деловање у терапији инфекција преко једног од четири могућа механизма или истовременом комбинацијом ових механизма:

1. спречавање формирања ћелијског зида бактерије,
2. инхибиције синтезе протеина,
3. инхибиције синтезе нуклеинских киселина, и
4. ометање метаболичког пута бактерије.¹⁸

Антибиотици из групе пеницилина делују на тај начин што се везују за транспептидазе, ензиме потребне за синтезу пептидогликанског слоја у ћелијском зиду, и на тај начин инхибирају формирање ћелијског зида бактерије. За разлику од ове групе лекова, непеницилински антибиотик хлорамфеникол, који се користи у терапији бактеријских инфекција очигу, инхибира синтезу протеина.^{18,19}

Грађа ћелијског зида Грам-негативних бактерија се у великој мери разликује у односу на Грам-позитивне бактерије (Слика 4).²⁰ Пептидогликански слој Грам-негативних бактерија је тањи него код Грам-позитивних бактерија. Поред тога, Грам-негативне бактерије поседују додатну мембрану са спољашње стране у односу на пептидогликански слој, између којих постоји периплазматични простор. Дуж спољашње мембране налазе се поре, које се називају порини. Порини пропуштају мале хидрофилне молекуле, попут аминокликозида, који даље улазе у периплазматични простор. Њихов даљи транспорт захтева енергију, трансфер електрона и присуство кисеоника, и ако ови услови нису испуњени, бактерија постаје резистентна на антибиотике овог типа.²¹ Такође, порини су веома малих димензија да би се одвијао пролазак великих молекула, као што је ванкомицин, због чега су Грам-негативне бактерије резистентне на овај антибиотик. Иако у састав спољашње мембране улазе молекули липополисахарида, они су доста збијени чинећи мембрану у извесној мери хидрофилном, тако да је липофилнији бензилпеницилин мање активан на Грам-негативне бактерије него мање липофилан амоксицилин.^{22,23} Поред овог начина, бактерије могу да развију резистентност на антимикуробне лекове путем мутације или селекције, као и добијањем генетских информација од других бактерија које кодирају резистенцију.²⁴



Слика 4. Структура ћелијског зида Грам-негативне и Грам-позитивне бактерије²⁰

1.2. Комплекси метала као антимикуробни агенси

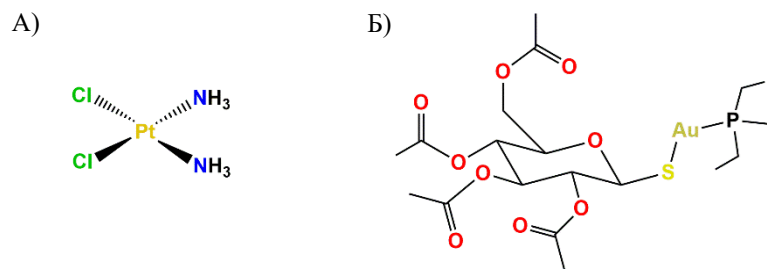
На основу свега до сада наведеног о клинички коришћеним антибиотицима, може се закључити да се ова једињења релативно лако могу синтетисати различитим хемијским реакцијама, као и да се једноставно могу даље хемијски модификовати. Основни недостатак антибиотика је у томе што бактерије све лакше развијају резистентност, услед њихове једно- или дводимензионалне структуре.²⁵

Проблем све чешће појаве антимикуробне резистентности на дејство антибиотика је иницирао рад на синтези и испитивању нових једињења као потенцијалних лекова, међу којима су и једињења у чији састав улазе јони метала. Када се спомену метали, у већини случајева помисли се на њихову велику токсичност и евентуално на њихову примену у каталитичке сврхе или за производњу различитих материјала. С друге стране, познато је да су неки прелазни метали, попут гвожђа и бабра, у облику различитих ензима, неопходни за редокс процесе у организму.²⁵ Тродимензионална структура једињења метала омогућава њихову разноврсну биолошку активност, коју је некад врло тешко објаснити услед њихове сложене геометрије.^{26,27} Управо та сложена структура даје предност комплексима метала са органским молекулима у односу на клинички коришћена органска једињења. Комплекси метала могу да антимикуробно делују на више начина, као што је ослобађање или супституција лиганда, и производња реактивних кисеоничних врста (*reactive oxygen species*, ROS), које даље оштећују ћелију. Јон метала, такође, одређује структуру и геометрију комплексног једињења, а може имати и улогу носача активног лиганда.²⁸

Дизајн нових лекова на бази комплекса метала је област истраживања која се интензивно развија последњих педесетак година (*медицинска неорганска хемија*), и овај убрзани развој је подржан врло ефикасним лечењем многих болести помоћу једињења у чији састав улазе метали.²⁹ Свакако, један од већих доприноса развоју медицинске неорганске хемије је Розенбергово (*Rosenberg*) откриће антитуморске активности цисплатине, *cis*-[Pt(NH₃)₂Cl₂], која се још увек примењује у терапији великог броја туморских обољења (Слика 5А). Један од механизма деловања цисплатине заснива се на његовој интеракцији са деоксирибонуклеинском киселином (DNA) блокирајући на тај начин њену транскрипцију и репликацију, што даље доводи до смрти туморске ћелије (апоптоза). Такође, у лечењу туморских болести примењују се и други хемотерапеутици на бази платине.³⁰ Међутим, због њихових озбиљних нежељених ефеката, испитују се и други комплекси метала као потенцијални антитуморски агенси.

Антитуморску активност на одређене туморске ћелије показали су комплекси рутенијума, осмијума, титана, иридијума, паладијума, галијума и др.³⁰

Комплекси злата(III) заузимају значајно место у испитивањима антитуморске активности, због чињенице да су изоструктурни и изоелектронски комплексима платине(II).³¹ Значај злата у савременој медицини потиче још од 1890. године, када је Роберт Кох (*Robert Koch*) открио да калијум-дицијанидоаурат(I), $K[Au(CN)_2]$, инхибира раст *Mycobacterium tuberculosis*, због чега је овај комплекс нашао примену у лечењу туберкулозе.³² Терапија комплексима злата(I) је утицала на смањивање бола код пацијената, што је навело француског лекара Форестиера (*Forestier*) да примени тиолатозлато(I) комплекс за лечење реуматоидног артритиса. После 45 година примене, овај комплекс је замењен фосфинским комплексом злата(I) (ауранофин; Слика 5Б), који се показао ефикаснијим у лечењу реуматоидног артритиса са мање токсичним ефектима.³³



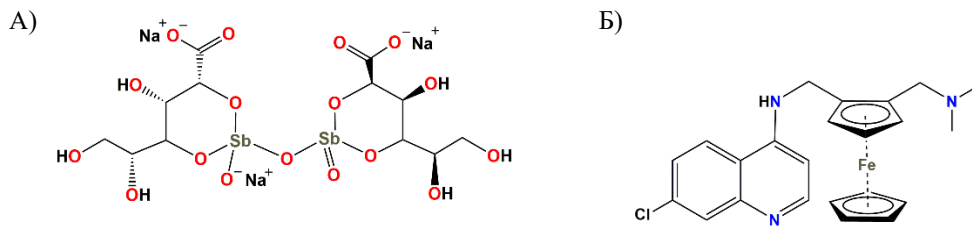
Слика 5. Структурне формуле цисплатине (А) и ауранофина (Б)

У односу на огроман број публикованих радова у којима се испитује антитуморска активност комплекса метала, број радова који се односи на њихову антимикуробну активност је знатно мањи. Овај податак је прилично изненађујући, с обзиром да су антибактеријска својства неких метала, као што је сребро, позната од давнина. У прилог овоме је и чињеница да је арсен био први елемент (металоид), чије је једињење нашло примену у медицини за лечење бактеријских инфекција. Токсична својства овог елемента нису спречила да се његово једињење, арсен(III)-оксид (As_2O_3), још увек примењује као инјекција (Trisenox[®]) у терапији акутне мијелоцитне левкемије, при чему је његова примена одобрена 2003. године од стране FDA.^{9,34} Такође, токсична жива је нашла примену као антисептик, меркурохром, и конзерванс вакцине, тиомерсал.²⁹

Ефикасна су и једињења антимона са оксидационим стањем +5, као што је натријум-стибоглюконат (пентостам; Слика 6А), у терапији лајшманиозе.³⁵ То је болест коју преноси паразит из рода *Leishmania*, а највише је распрострањена у тропским пределима. Механизам деловања овог једињења на бази антимона није у потпуности објашњен, али су досадашња истраживања показала да је за његову активност одговоран Sb(III) јон који настаје услед редукције. С друге стране, за метаболизам *Leishmania* паразита неопходна је трипанотионин редуктаза, чију активност инхибира Sb(III) јон, координујући се за два редокс активна остатка цистеина, треонина и хистидина.³⁵

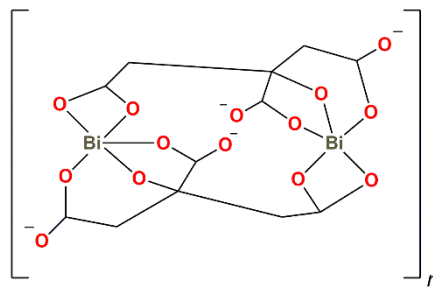
Паразит из рода *Plasmodium* је одговоран за појаву тропске болести познате као маларија, од које годишње преко 2 милиона људи широм света изгуби живот.³⁶ Најчешће коришћен лек у терапији ове болести је хлорокин, који се акумулира унутар паразита инхибирајући његову функцију.³⁷ С обзиром на чињеницу да је број оболелих у порасту, паразит је развио резистентност на овај лек.³⁵ Проблем резистентности је успешно решен увођењем фероцена у структуру хлорокина, при чему је добијен ферокин (Слика 6Б), који је ушао у другу фазу клиничких испитивања. Верује се да је

механизам његовог деловања заснован на производњи ROS, које убијају паразите отпорне на хлорокин.^{38,39}



Слика 6. Структурне формуле комплексних једињења натријум-стибоглуконата (А) и фεροкина (Б) која показују антипаразитску активност

Док се арсен и антимон сврставају у групу токсичних елемената, бизмут не делује токсично на људске организме, али су врло мале концентрације овог метала токсичне за бактерије.⁴⁰ Једињења бизмута(III) су се одавно користила за лечење поремећаја гастроинтестиналног тракта, захваљујући његовом врло ефикасном деловању на бактерију *Helicobacter pylori*. Инфекције изазване овом бактеријом могу да узрокују озбиљне компликације, као што су гастритис, чир на желуцу или рак желуца. За лечење ових инфекција, најпре се примењивао антибиотик кларитромицин, на који је бактерија развијала резистентност, што се делимично превазишло комбинованом терапијом овог антибиотика са бизмут-субцитратом (Слика 7) или ранитидин-бизмут-цитратом.⁴¹ Поред тога, кристалографска испитивања су указала на способност Bi(III) јона да супституише један од Zn(II) јона у активном центру метало- β -лактамазе, ензима који се сматра одговорним за развој резистентности бактерија на β -лактамске антибиотике. Захваљујући овим резултатима, бизмут-субцитрат је, у комбинованој терапији са меропенемом, у знатној мери успорио даљи развој резистенције *E. coli*.⁴² Поред бизмута, сребро је, такође, имало широку примену у прошлости за лечење инфекција и у третману рана, али о његовим антибактеријским својствима биће речи касније.⁴³



Слика 7. Структурна формула бизмут-субцитрата. Нису приказани сви атоми ради јаснијег приказа структуре комплекса

Најновија истраживања указују и на антимикуробну активност комплекса Ga(III) јона, због његове сличности са Fe(III) јоном. Претпоставља се да Ga(III) јон омета метаболизам гвожђа код бактерија, инхибирајући ензиме у чијем се активном центру налази Fe(III) јон.⁴⁴ Тако је синтетисан галијум(III)-дефероксамин (GaDFO), који је показао активност на *P. aeruginosa*, као и синергистички ефекат са антибиотиком ванкомицином.⁴⁵ За разлику од мононуклеарног комплекса рутенијума(II) са 1,10-фенантролином (1,10-phen), [Ru(1,10-phen)₃]²⁺, који није био антибактеријски активан, комплекс [Ru(Me₄-1,10-phen)₃]²⁺ (Me₄-1,10-phen је 3,4,7,8-тетраметил-1,10-фенантролин), показао је знатно већу активност, нарочито према Грам-позитивним бактеријама, услед увођења метил група у структуру 1,10-phen лиганда.⁴⁶

1.3. Бакар

1.3.1. Бакар као микроелемент

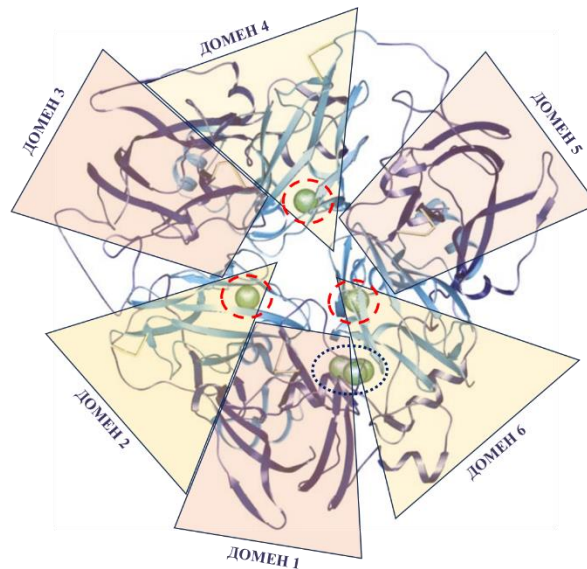
Бакар је есенцијални метал неопходан за нормално функционисање многих процеса у људском организму, попут ћелијског дисања, оксидације гвожђа, синтезе пигмената, антиоксидативне заштите, формирања везивног ткива, као и за развој централног нервног система. Међутим, овај метал може имати и токсична својства, у случају поремећаја његовог метаболизма.⁴⁷ Истраживања су показала да његов недостатак у трудноћи може изазвати неуродегенеративне поремећаје код плода.⁴⁸ У људском организму, бакар се налази у оксидованом (Cu^{2+}) и редукованом (Cu^+) стању у структури многобројних ензима (Табела 1), а прелаз између ова два оксидациона стања је основа ензимских реакција горе поменутих метаболичких процеса.⁴⁹

Табела 1. Ензими бакра у људском организму и њихове функције

Ензими	Функција
цитохром <i>c</i> оксидаза	транспорт електрона
супероксид дисмутаза	диспропорционисање супероксида
катехол оксидаза	синтеза меланина
протеин-лизин 6-оксидаза	унакрсно повезивање колагена и еластина
церулоплазмин	фероксидаза
амин оксидазе	деаминација примарних амина
допамин- β -монооксидаза	претварање допамина у норадреналин
пептидилглицин монооксидаза	α -амидација неуропептида

Хомеостаза бакра се одржава његовом равнотежом између апсорпције и излучивања. Просечан дневни унос бакра путем хране код одраслих особа се креће од 0,6 до 1,6 mg, а главни извор су житарице, цигерица, шкољке, ораси и пасуљ. Око 50% бакра унетог путем хране се апсорбује у танком цреву, а затим се транспортује у јетру, одакле се редистрибуира на сва околна ткива и органе.⁵⁰ Крвна плазма представља главну биолошку течност којом се бакар транспортује, и то углавном чврсто везан за церулоплазмин. Поред церулоплазмина, бакар се у мањој мери и знатно слабије везује за албумин и аминокиселине, што омогућава његово лакше продирање кроз мождану баријеру.⁵¹ Након тога, вишак бакра се враћа у јетру ради излучивања из организма преко жучи, што представља главни пут елиминације вишка овог метала.⁵⁰

Церулоплазмин је гликопротеин који се синтетише у јетри, а притом везује 95% бакра присутног у крвној плазми.⁵² У својој структури садржи шест $\text{Cu}(\text{II})$ јона, који су распоређени у шест домена. Домени 2, 4 и 6 везују три $\text{Cu}(\text{II})$ јона типа 1. Овај тип је одговоран за плаву боју церулоплазмина. За сваки центар овог типа координују се два молекула хистидина и један молекул цистеина. У координационој сфери $\text{Cu}(\text{II})$ јона у домену 4 и 6 налази се остатак метионина, који је у домену 2 замењен леуцином. Преостала три $\text{Cu}(\text{II})$ јона са осам молекула хистидина формирају тринуклеарни кластер између првог и шестог домена, од којих је један $\text{Cu}(\text{II})$ јон типа 2, а два су типа 3 (Слика 8). Овај кластер показује каталитичку активност при оксидацији $\text{Fe}(\text{II})$ до $\text{Fe}(\text{III})$ јона, који се даље везује за трансферин. Поред активности фероксидазе зависне од бакра, тринуклеарни кластер, такође, доприноси стабилности церулоплазмина.⁵³



Слика 8. Кристална структура хуманог церулоплазмине са положајима бакра у шест домена

У случају недостатка бакра, као последица мутације гена за церулоплазмин или његовог недовољног уношења у организам, синтетише се апоцерулоплазмин, који више нема фероксидазну активност, што даље доводи до преоптерећења ткива гвожђем, односно до развоја ацерулоплазминемije. То је аутозомно рецесивни поремећај метаболизма гвожђа, који се манифестује неуродегенеративним променама мрежњаче и базалних ганглија.⁵⁴

С друге стране, поремећај метаболизма бакра узрокован мутацијом АТР7В гена, одговораног за транспорт бакра, доводи до развоја Вилсонове болести.⁵⁵ Услед овог поремећаја долази до нагомилавања бакра у јетри, тако да терапија подразумева примену хелатних лиганата, као и дијету са ограниченим уносом бакра. У супротном, болест се манифестује цирозом јетре.^{55,56}

Такође, Менкенсонова болест је последица поремећаја метаболизма бакра. Овај поремећај настаје услед мутације АТР7А гена, што је даље праћено таложењем великих количина овог метала у ендотелним ћелијама крвно-моздане баријере. Због овога се болест карактерише озбиљним неуролошким оштећењима.⁵⁷ Такође, болест доводи до поремећаја функције ензима бакра услед његове смањене апсорпције из гастроинтестиналног тракта. Тако је, на пример, оштећење функције цитохром *c* оксидазе праћено смањеном производњом аденозин-трифосфата (АТР), што се манифестује мањком енергије, док промене у функцији тирозиназе узрокују хиперпигментацију. Активност супероксид дисмутазе је исто смањена, због чега долази до оксидативног стреса.⁵⁸

Недавна истраживања су указала на чињеницу да низ метала, међу којима је и бакар, услед нарушене равнотеже, могу допринети развоју Алцхајмерове болести. То је данас најчешћи облик деменције који настаје одумирањем мозданих ћелија, али чији се тачан узрок још увек не зна. Утицај бакра на развој ове болести се објашњава различитим механизмима, а један од највише прихваћених се заснива на великом афинитету везивања овог метала за β -амилоидне пептиде, услед чега долази до производње реактивних кисеоничних врста. Такође, долази до стварања амилоидних плакова у којима се складишти вишак бакра, који заједно са реактивним кисеоничним врстама, временом доводе до одумирања мозданих ћелија.⁵⁸

1.3.2. Физичко-хемијске карактеристике бакра

Бакар је метал познат од давнина, и открићем његове легуре са калајем (*бронза*) означен је почетак нове ере људске цивилизације (*бронзано доба*).⁵⁹ Алхемичари су повезивали овај метал са женственошћу, коју је симболизовала богиња Венера, због чега је ознака ♀ позната као алхемијски симбол бакра.⁶⁰ Најчешће се налази у виду руда, као што су *халкопирит* ($\text{Cu}_2\text{S}\cdot\text{FeS}_2$) и *халкозин* (Cu_2S).⁶¹ Једно од највећих налазишта руде овог метала било је на острву Кипар, због чега се из латинског назива *surgium aes*, што значи кипарски метал, изводи и латински назив за бакар (*cuprum*), као и његов хемијски симбол (Cu).⁶⁰ У Периодном систему елемената, бакар се налази у 11. групи и 4. периоди.

Боја бакра варира у зависности од чистоће, али је углавном црвенкасто-браон. Овај метал се одликује и великом отпорношћу на корозију, воду и ваздух, што омогућава његову примену за складиштење воде. Међутим, дужим стајањем на ваздуху превлачи се танким слојем зелене патине, коју чине базне соли бакра. Због позитивног редокс потенцијала, бакар се не раствара у разблаженим киселинама (изузев разблажене азотне киселине), већ само у киселинама које имају оксидациона својства. У природи се јављају два стабилна изотопа: ⁶³Cu и ⁶⁵Cu. Познати су и други радиоактивни изотопи са масеним бројем од 58 до 73, од којих је ⁶⁷Cu најстабилнији са временом полураспада од 2,58 дана, док се ⁶⁴Cu примењивао у медицини за дијагностику Вилсонове болести.⁶²

Бакар може да гради једињења са оксидационим стањима +1, +2, +3 и +4, али су најчешћа једињења овог метала са оксидационим стањима +1 и +2. С друге стране, једињења бакра са оксидационим бројем +3 и +4 су врло ретка и нестабилна. Једињења бакра са оксидационим стањем +2 (купри-једињења) стабилнија су од његових једињења са оксидационим стањем +1 (купро-једињења), што се објашњава енергијом јонизације и енергијом хидратације. Наиме, вредност прве енергије јонизације за добијање Cu(I) јона износи 7,72 eV, док је за добијање гасовитог Cu(II) јона потребно утрошити 20,30 eV више него за добијање гасовитог Cu(I) јона, односно укупно 28,02 eV. Гасовити јони се у воденом раствору хидратишу, уз ослобађање енергије хидратације (за Cu(I) јон износи 8,75 eV, односно за Cu(II) јон 28,40 eV). Разлика између утрошене и ослобођене енергије је мања код Cu(II) јона (28,40 – 28,02 = 0,38 eV) него код Cu(I) јона (8,75 – 7,72 = 1,03 eV), из чега произилази већа стабилност Cu(II) јона у воденом раствору, као и његових једињења.⁶³

Најчешће оксидационо стање бакра у комплексним једињењима је +2. Бакар(II) јон, у односу на Cu(I) јон, отпушта још један електрон из 3d орбитале, тако да је његов јонски радијус мањи, а количина позитивног наелектрисања већа. Због овога Cu(II) јон је мање поларизабилан, па се понаша као тврђа Луисова (*Lewis*) киселина у поређењу са Cu(I) јоном.⁶⁴ Заправо, Cu(II) јон је на граници између меких и тврђих Луисова киселина, тако да показује велики афинитет према лигандима који садрже атоме азота и кисеоника као донорске атоме, односно умерени афинитет према сумпор-донорским и хлоридо лигандима.⁶⁵ Могуће геометрије комплекса бакра(II) у зависности од вредности његовог координационог броја су дате у табели 2. Као што се из табеле може видети, комплекси овог јона са координационим бројем 4, могу имати тетраедарску или квадратно-планарну геометрију, или геометрију између ове две са одређеним степеном дисторзије.⁶⁴

Табела 2. Могуће геометрије бакар(II) комплекса

Оксидационо стање и <i>d</i> електронска конфигурација	Координациони број	Геометрија
Cu(II), <i>d</i> ⁹	4	дисторгована тетраедарска квадратно-планарна
	5	тригонално-бипирамидална квадратно-пирамидална
	6	дисторгована октаедарска октаедарска

Бакар(II) јон са координационим бројем 5 врло ретко гради комплексе правилне геометрије, што се може објаснити неједнаком попуњеношћу *d* орбитала, као на пример у пентахлоридокупрат(II) јону где су аксијалне везе краће од екваторијалних. Такође, код [Cu(eddp)(H₂O)] комплекса (eddp је етилендиамин-*N,N'*-ди-3-пропионат), у коме атоми азота и кисеоника eddp лиганда заузимају екваторијалне положаје, а молекул воде аксијални положај, долази до тригоналне деформације квадратне пирамиде са процентом дисторзије од 22,7%. Одступање настаје због тога што шесточлани карбоксилатни прстенови лиганда издижу Cu(II) јон изнад основе квадратне пирамиде и на тај начин деформишу њену квадратно-пирамидалну геометрију.⁶⁶ Геометрија комплекса у којима је координациони број Cu(II) јона 6, углавном одступа од правилне октаедарске, што се може објаснити Јан-Телеровим (*Jahn-Teller*) ефектом, као последица неједнако попуњених *d* орбитала.⁶⁴

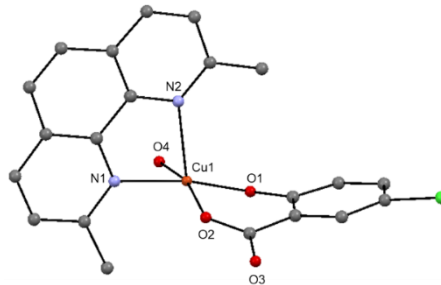
1.3.3. Антимикробна активност бакар(II) комплекса

Досадашња истраживања комплекса бакра(II) и њихове потенцијалне биолошке активности су показала да ови комплекси могу имати антибактеријска,⁶⁷ антифунгална,⁶⁸ антиоксидативна⁶⁹ и антитуморска својства.⁷⁰ Такође, бакар(II) комплекси су се показали врло ефикасни и код запаљенских процеса.⁷¹ У принципу, биолошка активност бакар(II) комплекса зависи од врсте лиганда и његовог начина координације, затим од геометрије комплекса, као и од електрохемијског понашања и липофилног карактера комплекса.²⁸

Соли моно- и поликарбоксилних киселина (карбоксилати), због свог различитог начина координације за јон метала, представљају веома интересантну групу лиганата. Ова једињења се могу понашати као неутрални и ањонски лиганди, који се могу координовати монодентатно, бидентатно или мостно.⁷² За салицилну киселину и њене деривате карактеристична су два могућа начина хелатне координације: карбоксилатна (преко два атома кисеоника карбоксилатне групе) и карбоксилато-фенолатна (преко једног карбоксилатног и једног фенолатног атома кисеоника).⁷³ Важну улогу има хидроксилна група на бензеновом прстену ових лиганата, која учествује у водоничним везама, доприносећи стабилности синтетисаних комплекса.⁷⁴ Одавно је познато да салицилна киселина и њени деривати (као што је аспирин) поседују аналгетичка, антипиретичка и антиинфламаторна својства,⁷² али увођењем Cu(II) јона постиже се њихова већа активност, као што је у случају салицилатобакар(II) комплекса, који је око 30 пута ефикаснији у односу на клинички коришћени аспирин.⁷⁵ Поред тога, утврђено је да се активност салицилатних бакра(II) комплекса повећава додатном координацијом *N*-хетероцикличних лиганата.^{76,77}

Недавно је синтетисан бакар(II) комплекс са 5-хлорсалицилном киселином (5-Cl-Sal) и 2,9-диметил-1,10-фенантролином (неокуприн, Neo), [Cu(5-Cl-Sal)(Neo)(H₂O)].⁷⁶

У синтетисаном мононуклеарном комплексу, Cu(II) јон има дисторговану квадратно-пирамидалну геометрију (Слика 9). Нео лиганд је бидентатно координован за Cu(II) јон преко два атома азота, при чему се један атом азота налази у екваторијалном положају, док је други атом азота аксијално везан за централни јон метала. У координационој сфери Cu(II) јона налазе се и фенолатни и карбоксилатни атоми кисеоника 5-Cl-Sal лиганда, док преостало координационо место заузима молекул воде (Слика 9). Координовани молекул воде успоставља међумолекулске интеракције са фенолатним и карбоксилатним атомима кисеоника 5-Cl-Sal лиганда, што додатно доприноси стабилизацији комплекса у кристалном стању.⁷⁶



Слика 9. Кристална структура [Cu(5-Cl-Sal)(Neo)(H₂O)] комплекса⁷⁶

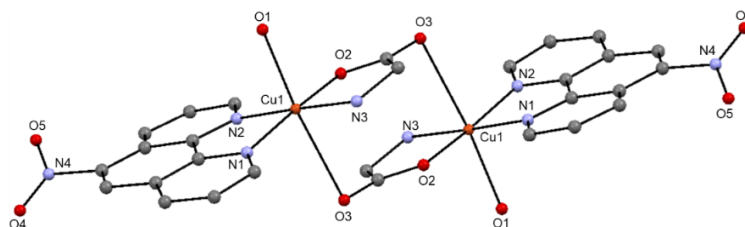
Утврђено је да [Cu(5-Cl-Sal)(Neo)(H₂O)] комплекс, у присуству H₂O₂, производи ROS, које изазивају раскидање фосфодиестарских веза у DNA, што се може повезати са могућим механизмом његовог биолошког деловања.⁷⁶ Ова нуклеазна активност је последица интеракције фенантролинског дела синтетисаног комплекса са поменутиим биомолекулом. На основу тога, може се закључити да је присуство деривата салицилне киселине у бакар(II) комплексима одговорно за производњу ROS, док даљу активност повећавају *N*-хетероциклични лиганди својом интеракцијом са DNA.⁷⁶

Испитивана је и антимикробна активност [Cu(5-Cl-Sal)(Neo)(H₂O)] комплекса на *Saccharomyces cerevisiae* и *E. coli*, која је упоређивана са активношћу динуклеарног [Cu(1,10-phen)(5-Cl-Sal)(5-Cl-SalH₂)]₂ комплекса.⁷⁷ Резултати испитивања антифунгалне активности су показали да [Cu(5-Cl-Sal)(Neo)(H₂O)] комплекс при концентрацији од 0,04 mM у потпуности инхибира раст ћелија *S. cerevisiae*, док се у случају [Cu(1,10-phen)(5-Cl-Sal)(5-Cl-SalH₂)]₂ комплекса, сличан ефекат инхибиције постиже при много већим концентрацијама од 0,20 и 0,50 mM. Антифунгална активност [Cu(1,10-phen)(5-Cl-Sal)(5-Cl-SalH₂)]₂ комплекса се, при истим концентрацијама, не разликује значајно у односу на некоординовани 1,10-phen. Поред тога, инхибиторни ефекат [Cu(5-Cl-Sal)(Neo)(H₂O)] комплекса је упоређиван са ефектом некоординованог Нео лиганда, при чему је уочено да овај лиганд, при истој концентрацији, у знатно мањој мери утиче на раст ћелија гљивице, што може бити последица интеракције фенантролинског лиганда са DNA. Динуклеарни [Cu(1,10-phen)(5-Cl-Sal)(5-Cl-SalH₂)]₂ комплекс показује сличну активност и на ћелијама бактерије *E. coli* при истим концентрацијама, док је мононуклеарни [Cu(5-Cl-Sal)(Neo)(H₂O)] комплекс мање активан према тестираној бактерији у односу на гљивицу. Ова разлика у антибактеријској и антифунгалној активности [Cu(H₂O)(5-Cl-Sal)(Neo)] комплекса може се објаснити различитим механизмима његовог деловања.⁷⁷

Испитиван је могући механизам антимикробне активности [Cu(1,10-phen)₂]Cl₂·6H₂O, [Cu(1,10-phen)(Gly)(H₂O)]Cl·3H₂O и [Cu(1,10-phen)(L-Ser)(H₂O)Cl] комплекса (Gly је глицин и L-Ser је L-серин) на *E. coli*.⁷⁸ Поред синтетисаних комплекса, тестирана је и со, бакар(II)-хлорид дихидрат,

коришћена у њиховој синтези. Добијени резултати су показали да сви комплекси инхибирају раст *E. coli* бактерије, али да је најактивнији $[\text{Cu}(1,10\text{-phen})(\text{Gly})(\text{H}_2\text{O})]\text{Cl}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ комплекс ($\text{IC}_{50} = 7,5 \text{ mg/L}$; IC_{50} представља концентрацију једињења која инхибира раст ћелије за 50%), док је активност преостала два комплекса умерена. За разлику од комплекса, $\text{CuCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ показује активност тек при IC_{50} вредностима већим од 120 mg/L . Утврђено је да на антибактеријску активност испитиваних комплекса главни утицај има њихова интеракција са DNA.⁷⁸

Супституисани деривати 1,10-фенантролина као бидентатни *N*-хетероциклични лиганди показују велики афинитет према $\text{Cu}(\text{II})$ јону.⁷⁹ Поред тога, њихов планарни ароматични карактер омогућава интеракције са DNA, интеркалативним или другим начином везивања.⁷⁹ С друге стране, за људски организам су врло важне аминокиселине, јер улазе у састав протеина неопходних за многе биохемијске процесе.⁸⁰ С обзиром на ове чињенице, синтетисана су два $[\text{Cu}(\text{nphen})(\text{Gly})(\text{H}_2\text{O})_2(\text{NO}_3)_2]$ и $[\text{Cu}(\text{dmphen})(\text{Gly})(\text{NO}_3)(\text{H}_2\text{O})]$ комплекса (*nphen* је 5-нитро-1,10-фенантролин и *dmphen* је 4,7-диметил-1,10-фенантролин).⁸¹ У реакцији са *nphen* лигандом, добијен је динуклеарни $[\text{Cu}(\text{nphen})(\text{Gly})(\text{H}_2\text{O})_2(\text{NO}_3)_2]$ комплекс тригонално-бипирамидалне геометрије, у коме су два $\text{Cu}(\text{II})$ јона мостно повезана преко два глицинато лиганата (Слика 10). Координациону сферу $\text{Cu}(\text{II})$ јона у асиметричној јединици чине два атома азота *nphen* лиганата, карбоксилатни атом кисеоника и амински атом азота *Gly* лиганата, и молекул воде (Слика 10). У случају $[\text{Cu}(\text{dmphen})(\text{Gly})(\text{NO}_3)(\text{H}_2\text{O})]$, координациони број $\text{Cu}(\text{II})$ јона је 6, тако да преостало координационо место заузима нитрат, док је геометрија комплекса октаедарска.⁸¹



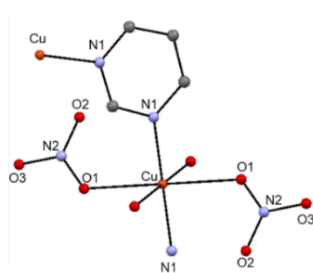
Слика 10. Кристална структура комплексног катјона $[\text{Cu}(\text{nphen})(\text{Gly})(\text{H}_2\text{O})]_2^{2+}$ у $[\text{Cu}(\text{nphen})(\text{Gly})(\text{H}_2\text{O})]_2(\text{NO}_3)_2$ комплексу⁸¹

Координација *Gly* лиганата за $\text{Cu}(\text{II})$ јон потврђена је и снимањем IR спектра синтетисаних $[\text{Cu}(\text{nphen})(\text{Gly})(\text{H}_2\text{O})]_2(\text{NO}_3)_2$ и $[\text{Cu}(\text{dmphen})(\text{Gly})(\text{NO}_3)(\text{H}_2\text{O})]$ комплекса, у којима је присутна интензивна трака на око 1600 cm^{-1} , која потиче од асиметричних валенционих вибрација карбоксилатне групе, док се на приближно 3300 cm^{-1} јавља трака која се приписује вибрацијама *N-H* групе.⁸¹ Поред тога, широка трака на око 3400 cm^{-1} потврђује координацију молекула воде за јон метала, док интензивна трака на 1390 cm^{-1} потиче од асиметричних валенционих вибрација нитратног јона.⁸¹

Испитиване су и интеракције синтетисаних $[\text{Cu}(\text{nphen})(\text{Gly})(\text{H}_2\text{O})]_2(\text{NO}_3)_2$ и $[\text{Cu}(\text{dmphen})(\text{Gly})(\text{NO}_3)(\text{H}_2\text{O})]$ комплекса са биомолекулима (DNA и говеђи серум албумин, BSA), при чему се већа вредност константе везивања $[\text{Cu}(\text{nphen})(\text{Gly})(\text{H}_2\text{O})]_2(\text{NO}_3)_2$ комплекса за DNA објашњава синергистичким ефектом два $\text{Cu}(\text{II})$ јона, који доводи до разлагања веза у овом биомолекулу. Испитивани комплекси су, такође, показали афинитет везивања за BSA, доводећи до статичког механизма гашења флуоресценције триптофана (Trp) у овом протеину. Поред тога, испитивана је антибактеријска активност синтетисаних комплекса мерењем пречника зоне инхибиције бактеријске ћелије (дифузиона метода). Уочена је већа активност

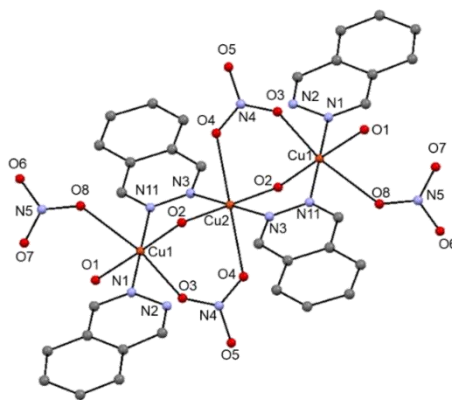
динуклеарног $[\text{Cu}(\text{nphen})(\text{Gly})(\text{H}_2\text{O})_2(\text{NO}_3)_2]$ у односу на мононуклеарни $[\text{Cu}(\text{dmphen})(\text{Gly})(\text{NO}_3)(\text{H}_2\text{O})]$ комплекс. Испитивани комплекси су, у већини случајева, били активнији у односу на некоординоване лиганде.⁸¹

Ароматична *N*-хетероциклична једињења су коришћена за синтезу комплекса, $[\text{Cu}(\text{NO}_3)_2(\text{H}_2\text{O})_2(\text{pm})]_n$, $[\text{Cu}(\text{CF}_3\text{SO}_3)(\text{H}_2\text{O})(\text{pz})_4]\text{CF}_3\text{SO}_3$, $[\text{Cu}(\text{NO}_3)_2(\text{H}_2\text{O})_2(\text{qz})_2]$, $[\text{Cu}(\text{NO}_3)_2(\text{H}_2\text{O})(\text{qz})_2] \cdot 0,5\text{CH}_3\text{CN}$ и $[\text{Cu}_3(\text{NO}_3)_2(\text{OH})_2(\text{H}_2\text{O})_2(\text{phtz})_4](\text{NO}_3)_2$ (*pm* је пиримидин, *pz* је пиразин, *qz* је хиназолин и *phtz* је фталазин), чије су кристалне структуре одређене применом рендгенске структурне анализе.⁸² У екваторијалним положајима $[\text{Cu}(\text{NO}_3)_2(\text{H}_2\text{O})_2(\text{pm})]_n$ комплекса, налазе се два *pm* лиганда и два молекула воде, док су у аксијалним положајима за $\text{Cu}(\text{II})$ јон координовани нитратни јони преко атома кисеоника. Као последица Јан-Телеровог ефекта, аксијалне везе су знатно дуже од екваторијалних, тако да овај комплекс има геометрију издуженог октаедра (Слика 11).⁸² У реакцији $\text{Cu}(\text{CF}_3\text{SO}_3)_2$ са *pz*, добијен је мононуклеарни $[\text{Cu}(\text{CF}_3\text{SO}_3)(\text{H}_2\text{O})(\text{pz})_4]\text{CF}_3\text{SO}_3$ комплекс са четири координована *pz* лиганда у квадратно-планарној равни, док су аксијално координовани CF_3SO_3^- јон и H_2O . Овај комплекс је, такође, октаедарске геометрије са израженом тетрагоналном дисторзијом.⁸²



Слика 11. Кристална структура $[\text{Cu}(\text{NO}_3)_2(\text{H}_2\text{O})_2(\text{pm})]_n$ комплекса. Нису приказани сви атоми ради јаснијег приказа структуре комплекса⁸²

Хиназолин се монодентатно координује за $\text{Cu}(\text{II})$ јон у $[\text{Cu}(\text{NO}_3)_2(\text{H}_2\text{O})_2(\text{qz})_2]$ и $[\text{Cu}(\text{NO}_3)_2(\text{H}_2\text{O})(\text{qz})_2] \cdot 0,5\text{CH}_3\text{CN}$ комплексима, при чему $[\text{Cu}(\text{NO}_3)_2(\text{H}_2\text{O})_2(\text{qz})_2]$ има дисторговану октаедарску геометрију, док је геометрија $[\text{Cu}(\text{NO}_3)_2(\text{H}_2\text{O})(\text{qz})_2] \cdot 0,5\text{CH}_3\text{CN}$ комплекса између тригонално-бипирамидалне и квадратно-пирамидалне.⁸² Фталазин у реакцији са еквимоларном количином $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ гради тринуклеарни $[\text{Cu}_3(\text{NO}_3)_2(\text{OH})_2(\text{H}_2\text{O})_2(\text{phtz})_4](\text{NO}_3)_2$ комплекс, у коме су $\text{Cu}(\text{II})$ јони повезани преко *phtz* лиганда, нитрато и хидроксидо лиганата. Координациону сферу $\text{Cu}(\text{II})$ јона чини и монодентатно координовани *phtz* и молекул воде, тако да овај јон има приближно идеалну квадратно-пирамидалну геометрију (Слика 12).⁸²



Слика 12. Кристална структура $[\text{Cu}_3(\text{NO}_3)_2(\text{OH})_2(\text{H}_2\text{O})_2(\text{phtz})_4](\text{NO}_3)_2$ комплекса⁸²

Испитивана је антимикуробна активност $[\text{Cu}(\text{NO}_3)_2(\text{H}_2\text{O})_2(\text{pm})]_n$, $[\text{Cu}(\text{CF}_3\text{SO}_3)(\text{H}_2\text{O})(\text{pz})_4]\text{CF}_3\text{SO}_3$, $[\text{Cu}(\text{NO}_3)_2(\text{H}_2\text{O})_2(\text{qz})_2]$, $[\text{Cu}(\text{NO}_3)_2(\text{H}_2\text{O})(\text{qz})_2] \cdot 0,5\text{CH}_3\text{CN}$ и $[\text{Cu}_3(\text{NO}_3)_2(\text{OH})_2(\text{H}_2\text{O})_2(\text{phtz})_4](\text{NO}_3)_2$ комплекса.⁸² Добијени резултати су показали да испитивани бакар(II) комплекси немају значајну активност инхибиције раста микробних ћелија. У складу са тим, даље је испитиван анти-QS (*quorum sensing*) ефекат синтетисаних комплекса,⁸² јер је познато да се патогеност неких бактерија заснива на процесима формирања вирулентних фактора као сигналних молекула, који омогућавају међубактеријску комуникацију (QS).⁸³ У ову сврху коришћен је *Chromobacterium violaceum* CV026 за праћење утицаја синтетисаних комплекса на формирање љубичастог пигмента, виолацеина. На основу добијених резултата, могло се закључити да до инхибиције формирања овог пигмента доводе комплекси, са променом активности у складу са следећим редоследом, $[\text{Cu}_3(\text{NO}_3)_2(\text{OH})_2(\text{H}_2\text{O})_2(\text{phtz})_4](\text{NO}_3)_2 > [\text{Cu}(\text{NO}_3)_2(\text{H}_2\text{O})_2(\text{pm})]_n > [\text{Cu}(\text{NO}_3)_2(\text{H}_2\text{O})(\text{qz})_2] \cdot 0,5\text{CH}_3\text{CN} \geq [\text{Cu}(\text{NO}_3)_2(\text{H}_2\text{O})_2(\text{qz})_2]$, док $[\text{Cu}(\text{CF}_3\text{SO}_3)(\text{H}_2\text{O})(\text{pz})_4]\text{CF}_3\text{SO}_3$ комплекс није показао анти-QS активност. Интересантно је напоменути да $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ одмах доводи до формирања зоне инхибиције синтезе виолацеина, док то није случај код $\text{Cu}(\text{CF}_3\text{SO}_3)_2$.⁸² Такође, синтетисани бакар(II) комплекси су се показали као инхибитори формирања биофилма *P. aeruginosa* PAO1 бактерије, што може бити од великог значаја за развој нових антивирусних лекова, који спречавајући комуникацију међу бактеријама, смањујући ризик од развоја резистентности. Пошто је утврђена анти-QS активност бакар(II) комплекса, даље је испитиван њихов синергистички ефекат са клинички коришћеним антибиотицима, пиперацилином и цефтазидимом, који су резистенти на клинички изолат *P. aeruginosa* DM-18. Комплекс $[\text{Cu}(\text{NO}_3)_2(\text{H}_2\text{O})_2(\text{pm})]_n$ при концентрацији од 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ снижава минималну инхибиторну концентрацију (MIC) пиперацилина два пута, односно четири пута при два пута већој концентрацији комплекса (1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$). У случају цефтазидима, $[\text{Cu}(\text{NO}_3)_2(\text{H}_2\text{O})_2(\text{pm})]_n$ комплекс је појачавао његов ефекат, док је $[\text{Cu}(\text{NO}_3)_2(\text{H}_2\text{O})_2(\text{qz})_2]$ комплекс био неактиван.⁸²

Још једну интересантну групу лиганата представљају триазолопиримидински деривати, због својих сличности са пуринским базама,⁸⁴ па је тако 5,7-диметил-1,2,4-триазол[1,5-*a*]пиридин (dntp) коришћен за синтезу бакар(II) комплекса, $[\text{Cu}(2,2'\text{-bipy})(\text{dntp})_2(\text{H}_2\text{O})](\text{ClO}_4)_2 \cdot \text{dntp}$ и $[\text{Cu}(1,10\text{-phen})(\text{dntp})_2(\text{H}_2\text{O})](\text{ClO}_4)_2 \cdot \text{dntp}$ (2,2'-*bipy* је 2,2'-бипиридин).⁸⁵ Резултати рендгенске структурне анализе су показали да синтетисани комплекси имају квадратно-пирамидалну геометрију. У екваторијалним положајима су за $\text{Cu}(\text{II})$ јон координована два dntp лиганда и један *N*-хетероциклични лиганд, док се у спољашњој координационој сфери налази један dntp лиганд и перхлорат као контра-анјон.⁸⁵ Поред антитуморске активности ових комплекса, испитивана је и њихова антимикуробна активност на две Грам-негативне бактерије (*E. coli* и *P. aeruginosa*) и две Грам-позитивне бактерије (*S. aureus* ATCC 25853 и MRSA 388). Синтетисани комплекси показују знатно бољу активност према тестираним ћелијским линијама у односу на триазолопиримидински лиганд. Комплекс $[\text{Cu}(1,10\text{-phen})(\text{dntp})_2(\text{H}_2\text{O})](\text{ClO}_4)_2 \cdot \text{dntp}$ је показао највећу антибактеријску активност са MIC вредностима у опсегу од 0,02 до 0,34 mM,⁸⁵ а посебно је значајна његова активност према MRSA 388 бактерији, која је један од најчешћих узрочника инфекције крвотока.⁸⁶

1.4. Цинк

1.4.1. Цинк као микроелемент

Цинк је метал који је откривен још у 18. веку, али је, тек након више од 200 година од његовог открића, утврђено да је овај метал есенцијалан за људе и животиње. Цинк је у људском организму присутан у траговима (2,3 g) и улази у састав великог броја ензима који учествују у многим биохемијским процесима.⁸⁷ Цинк(II) јон је безбојан и не показује магнетне особине, што отежава његово праћење применом већине спектроскопских метода⁸⁸ и утврђивање његове физиолошке улоге.

Данас је познато преко 200 тродимензионалних структура ензима цинка из свих шест група, међу којима су супероксид дисмутаза (SOD), угљена анхидраза, карбоксипептидаза и алкохол дехидрогеназа. Три основне функције протеина и ензима цинка јесу структурна, каталитичка и ко-каталитичка, а најзаступљеније аминокиселине у овим молекулима јесу хистидин, глутамин, аспарагинска киселина и цистеин.⁸⁹ У координационој сфери Zn(II) јона обично су присутне четири аминокиселине, од којих је најчешће заступљен цистеин. Вода је увек координована за Zn(II) у активном центру каталитичких ензимима, у којима је доминантна аминокиселина хистидин, док се у ко-каталитичким центрима налазе два или три јона овог метала у непосредној близини.⁸⁹

Цинк је неопходан за правилан раст и развој организма, а такође има кључну улогу у ћелијским процесима, као што су пролиферација, диференцијација и апоптоза.⁹⁰ Цинк има способност да прихвати одређене домене протеина формирајући ткз. *zinc-finger* протеине (ZNFs), који даље ступају у интеракције са DNA, и на тај начин, као транскрипциони фактори, регулишу експресију гена. Ови фактори се састоје од Zn(II) јона за које су тетраедарско координовани цистеин и остаци хистидина (ZnS₂N₂), и управо је оваква координација кључна за њихову улогу, као и за одржавање структурног мотива ZNF протеина.^{91,92}

Доказано је да је цинк неопходан и за нормално функционисање централног нервног система. Многи ензими овог метала учествује у неуротрансмисији. У овом процесу, цинк регулише глутамат и γ -аминобутерну киселину, као ексцитаторни и инхибиторни неуротрансмитери у хипокампусу, и на тај начин омогућава нормалне когнитивне функције. Због ове активности верује се да цинк има антидепресивно дејство, које је испитивано и примећено на моделу глодара.⁹³ С друге стране, нижи ниво цинка у крви уочен је код пацијената оболелих од Алцхајмерове и Паркинсонове болести, али још увек није разјашњен његов ефекат у развоју ових болести.⁹⁴ Такође, недостатак цинка у трудноћи доводи до превременог порођаја, урођених аномалија, мале телесне тежине или, у најтежем случају, до смртног исхода новорођенчета.⁹⁵

Познато је да се цинк складишти и лучи из панкреаса заједно са инсулином,⁹⁶ као и да је овај есенцијални метал веома важан за синтезу инсулина, стварање његових резерви, појачавање дејства овог хормона и спречавање његове разградње.⁹⁷ Ова чињеница је подстакла испитивање инсулинско-миметичке и антидијабетичке активности цинка. Први извештај из 1980. године је показао да цинк у облику орално примењеног ZnCl₂ може опонашати инсулин, на тај начин што стимулише липогенезу у адипоцитима пацова. Међутим, његова биорасположивост је била веома мала, због чега су истраживања усмерена ка синтези комплекса цинка(II).⁹⁸ Генерално, смањење нивоа цинка умањује способност бета ћелија Лангерхансових острваца панкреаса да производе инсулин, који је одговоран за транспорт шећера из крви у ћелију. Пошто услед смањеног лучења овог хормона долази до повећане концентрације шећера у крви, терапија дијабетес мелитуса захтева примену препарата на бази цинка.⁹⁹

Све ово указује на велики утицај цинка на здравље људи. До његовог недостатка у организму долази услед поремећаја метаболизма или неадекватне исхране, који се манифестује губитком апетита, мањком енергије, губитком телесне тежине, остеопорозом, дијарејом, дерматитисом, губитком косе, поремећајима имуно и кардиоваскуларног система.¹⁰⁰ Храна богата цинком током варења ослобађа овај метал у облику јона, који се затим транспортују до танког црева. Велику улогу у транспорту ослобођених јона цинка имају металотионени. То су протеини који садрже велики број остатака цистеина и који имају велики афинитет према Zn(II) јонима. Значајна количина цинка се ослобађа из организма преко жучи или урина. Дневне потребе цинка зависе од пола и узраста, док су повећане потребе за овим металом забележене код трудница и дојиља. Међутим, високе дозе цинка услед његове дуготрајне суплементације могу довести до акутног тровања, које је праћено главобољама, мучнинама, повраћањем и грчевима у стомаку.¹⁰¹

Цинк је, такође, есенцијалан елемент за микроорганизме, будући да при мањим концентрацијама делује као структурни и каталитички кофактор многих бактеријских металопротеина, као што су алкохол дехидрогеназа изолована из *Bacillus subtilis* и *H. pylori*, као и фосфолипаза C у *Bacillus cereus*.¹⁰² Међутим, веће концентрације овог метала заустављају раст ћелија бактерија, попут *E. coli* и *Streptococcus faecalis*.^{102,103} Због деловања цинка на микроорганизме, једињења овог метала су нашла примену као антимикуробни агенси. На пример, $Zn(CH_3COO)_2$ је показао бољу активност према *S. aureus* и *Staphylococcus epidermidis* него према *P. aeruginosa*.¹⁰⁴ На ћелије бактерија *S. aureus* и *P. aeruginosa*, активност је показао и ZnO, док је у води растворан $ZnCl_2$ активан на *E. coli*.¹⁰⁵ Антибактеријску активност показале су и наночестице цинк(II)-оксида (ZnONps), која се смањује са смањењем величине ових честица.¹⁰⁶ Поред антибактеријске активности, ZnONps су показале завидну способност инхибиције раста *Candida* соја у односу на клинички коришћену антифунгалну крему.¹⁰⁷ Механизам антибактеријског деловања зависи од растворљивости једињења цинка. Код цинк(II) једињења, која се растварају у води, постоје два могућа механизма деловања, при чему се први заснива на интеракцији између Zn(II) јона и ћелијске мембране, доводећи до њене дестабилизације и повећања пермеабилности, док у другом случају, услед интеракција овог јона са нуклеинским киселинама, долази до нарушавања функције респираторних ензима.^{108,109} С друге стране, нерастворна једињења, као што је ZnO, могу да делују, изазивајући производњу ROS, директним оштећењем ћелијске мембране или цитотоксично.^{105,106,108,109}

Једињења цинка су се показала нарочито ефикасним у третману акни, захваљујући својој способности да смањују запаљење њихових лезија и инхибирају производњу себума. У ове сврхе орално се примењују соли цинка, као што су сулфат и глуколат. Терапија сулфатом праћена је малом биорасположивошћу, док се глуколат боље апсорбује. Пошто оралну примену прате нежељени ефекти, једињења цинка се, чешће, примењује локално у облику крема. У састав тих крема ретко улази сулфат, због могућности да изазове иритацију коже. Најчешће у састав крема против акни улази ZnO, који испољава антиинфламаторно деловање слично сулфату.¹¹⁰ Примена једињења цинка као антиинфламаторних агенаса је заправо последица њихове антиоксидативне активности. Наиме, Zn(II) јон инхибира никотинамид аденин динуклеотид фосфат (NADPH) оксидазу, при чему се смањује производња ROS, као што су супероксидни анјон радикал ($\cdot O_2^-$), водоник-пероксид (H_2O_2) и хидроксил радикал ($\cdot OH$). Такође, цинк као кофактор SOD ензима индиректно доприноси диспропорционисању $\cdot O_2^-$, што резултира производњом H_2O_2 , који се даље под дејством каталазе разлаже до воде и кисеоника.^{111,112} Цинк, такође, инхибира азот-моноксид синтазу (iNOS) и на тај начин смањује производњу NO, као инфламаторног медијатора.¹¹³ Поред оксида, цинк(II)

комплекс са 2-пиролидин-5-карбоксилатом (ZnPCA) се показао погодним за кожу склону акнама, јер, поред антимикробног, поседује и адстрингентно деловање.¹¹⁴

1.4.2. Физичко-хемијске карактеристике цинка

Иако је цинк откривен средином 18. века, његова примена почиње много раније. Наиме, у праисторијским рушевинама Трансилваније пронађен је најстарији комад цинка, познат као *идол*, који се састојао од 87% чистог метала. Грци су правили наруквице од сребра са шупљинама испуњеним цинком, и такве наруквице пронађене су на острву Родос. Пре открића да је цинк есенцијалан, алхемичари су користили руду *каламин* (нечист цинк(II)-карбонат) за проблеме на кожи, док су у третману очију примењивали $ZnSO_4$.¹¹⁵

Заступљеност цинка у Земљиној кори износи око 75 ppm, у облику минерала *сфалерит* (ZnS), *смитсонит* ($ZnCO_3$) и *вилемит* ($Zn_2SiO_4 \cdot H_2O$). Руда сфалерит се најчешће користи за добијање цинка, тако што се најпре пржи до ZnO , а затим се добијени оксид редукује коксом. Добијени цинк је у гасовитом стању, јер је температура на којој се одвија редукција већа од температуре кључања цинка. Недостаци ове методе су недовољна чистоћа и велики губитак метала, због чега се чешће примењује електролитички поступак. У овом поступку, претходно добијени ZnO се раствара у сумпорној киселини, а затим се цинк издваја на оловној аноди. Међутим, на аноди прво долази до издвајања нечистоћа, због чега је потребно претходно пречишћавање, што овај поступак чини скупљим.⁶³

Свеже добијен цинк је сјајан метал плавичасте боје, али стајањем на влажном ваздуху брзо потамни, јер се превлачи танким слојем оксида и базног карбоната, који га штити од даље корозије. Због негативног редокс потенцијала ($-0,76 V$), цинк се раствара у киселинама градећи соли. Цинк се, такође, раствара и у базама, тако да је овај метал амфотеран. Растварањем настаје безбојни $Zn(II)$ јон, који лако хидролизује као $[Zn(H_2O)_4]^{2+}$. Цинк се у природи састоји од пет стабилних изотопа: ^{64}Zn (48,89%), ^{66}Zn (27,81%), ^{67}Zn (4,07%), ^{68}Zn (18,61%) и ^{70}Zn (0,62%).^{61,63} Остали познати изотопи цинка су радиоактивни, од којих је ^{65}Zn нашао примену за праћење карактеристика дизел мотора и подводних седимената.¹¹⁶

Са атомским бројем 30, цинк заузима место у 12. групи и 4. периоди Периодног система елемената. Имајући у виду његову електронску конфигурацију $[Ar]3d^{10}4s^2$, доминантан оксидациони број цинка у једињењима је +2.¹¹⁷ Једињења цинка(II) имају разноврсну примену од давнина. Поред раније поменуте примене у медицини, ZnO се примењује и као пигмент у производњи боја (ткз. цинково белило). Ова боја је погоднија од оловног белила, јер на ваздуху у присуству H_2S не тамни. У реакцији са $ZnCl_2$ и водом настаје цинк(II)-хидрохлорид, који се користи за израду пломби. Позната је још једна боја овог метала, литопон, која се најчешће добија мешањем цинк(II)-сулфида са баријум-сулфатом. Иначе, цинк(II)-сулфид онечишћен са манганом и бавром, под дејством радиоактивног зрачења флуоресцира.⁶³

Електронска конфигурација $Zn(II)$ јона ($[Ar]3d^{10}$) указује на чињеницу да овај јон при грађењу координационих једињења располаже са спољашњим орбиталама ($4s$, $4p$ и $4d$), тако да су могући различити типови хибридизације, односно координациони бројеви централног јона, као и геометрије насталих комплексних јона. У свим случајевима координације, цинк(II) јон се може прилагодити свим степенима дисторзије од идеалне геометрије (Табела 3).¹¹⁸ Према Пирсоновој (*Pearson*) теорији, овај јон се може посматрати и као тврда и мека Луисова киселина, без посебног афинитета за координацију са азот-, кисеоник- и сумпор-донорским лигандима.¹¹⁹

Табела 3. Могуће геометрије комплекса цинка са оксидационим стањем +2

Оксидационо стање и <i>d</i> електронска конфигурација	Координациони број	Геометрија
Zn(II), <i>d</i> ¹⁰	4	дисторгована тетраедарска
	5	тригонално-бипирамидална квадратно-пирамидална
	6	октаедарска тригонално-призматична

1.4.3. Антимикробна активност цинк(II) комплекса

Поред претходно поменутих једињења цинка која су показала биолошку активност, примену у терапеутске сврхе, нашао је и његов комплекс са пиридинтионом (пиритион), ZPT, чија је структурна формула приказана на слици 13. Овај комплекс је показао активност према гљивици из рода *Malassezia*, која изазива појаву перути на кожи главе, због чега се овај комплекс примењује у облику шампона против перути.^{113,114,120} Његова слаба растворљивост у води обезбеђује дуже деловање након испирања.¹²¹ Утврђено је да делује на ћелијску мембрану, тако што је деполаризује, спречавајући транспорт кроз њу.^{122a,122b} Поред антифунгалног деловања ZPT комплекса, недавно је утврђено да овај комплекс делује и на SARS-CoV-2 вирус, инхибирајући катепсин L ензиме, неопходне за његов улазак и репликацију, што комерцијално доступан ZPT чини потенцијално активним терапеутским агенсом у терапији COVID-19.¹²³

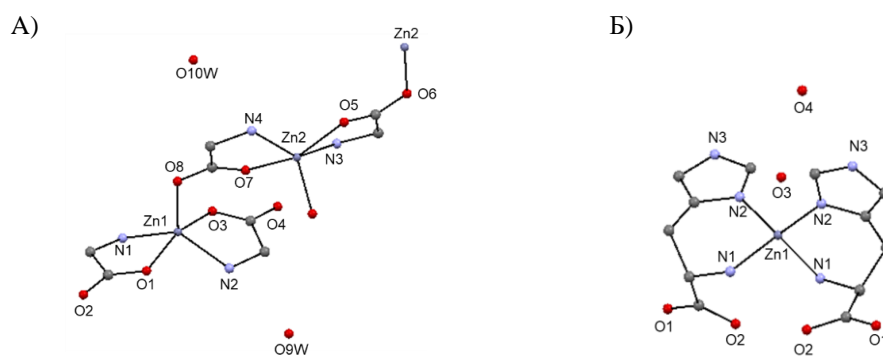


Слика 13. Структурна формула *bis*(пиритион) цинк(II) комплекса (ZPT)¹²³

Недавна истраживања су показала да суплементација цинком смањује инфекције изазване *Candida* сојевима код пацијената са дуготрајном терапијом антибиотцима широког спектра деловања.¹¹¹ Имајући све ово у виду, истраживања се данас заснивају на синтези нових комплекса цинка(II) као потенцијалних антимикробних агенаса.

Комплекс цинка са глицином, [Zn(Gly)₂], показао се ефикасним за заштиту од сунца, као и против пигментације, што се може приписати његовој антиоксидативној активности.¹²⁴ У складу са овим, синтетисани су и други комплекси овог јона метала са аминокиселинама.¹²⁵ Недавно је испитивана антимикробна активност цинк(II) комплекса, [Zn(Gly)₂], [Zn(L-Glu)₂]·H₂O, [Zn(L-His)₂]·2H₂O, [Zn(L-Pro)₂], [Zn(L-Met)₂]·0,5H₂O и [Zn(L-Trp)₂] (L-Glu је L-глутаминска киселина, L-His је L-хистидин, L-Pro је L-пролин и L-Met је L-метионин) на три Грам-позитивне (*S. aureus*, *S. epidermidis* и *S. pyogenes*) и две Грам-негативне бактерије (*E. coli* и *P. aeruginosa*).¹²⁵ Добијени резултати су упоређивани са одговарајућим резултатима за клинички коришћен ZnPCA. Комплекси цинка(II) са аминокиселинама су показали већу антибактеријску активност у односу на ZnPCA. Комплекс [Zn(Gly)₂] је, при концентрацији од 200 mg/L, спречио раст ћелије *S. aureus* за 60%, док је раст ћелије *S. pyogenes*, при истим концентрацијама комплекса, инхибиран за 90%. Нешто мања активност према *S. aureus* уочена је за [Zn(L-Met)₂], док су МИС вредности овог комплекса (100 mg/L за *S. epidermidis* и 200 mg/L за *S. pyogenes*) биле мање од одговарајућих вредности за ZnPCA.¹²⁵

Као што се може видети са слике 14А, $[\text{Zn}(\text{Gly})_2]$ комплекс има дводимензионалну полинуклеарну структуру, која је додатно стабилизована водоничним везама. Свака асиметрична јединица се састоји од два $\text{Zn}(\text{II})$ јона и четири моноанјонска Gly лиганда и два молекула воде. Глицинато лиганд је координован за $\text{Zn}(\text{II})$ јон преко једног атома азота амино групе и једног атома кисеоника карбоксилатне групе, док атом кисеоника карбонилне групе остварује везу са другим $\text{Zn}(\text{II})$ јоном. Хелатно координовани Gly лиганда су у *trans*-положају. Сваки $\text{Zn}(\text{II})$ јон има геометрију између квадратно-пирамидалне и тригонално-бипирамидалне, што се може закључити на основу индекса тригоналности (τ) од 0,458 за Zn1 , односно 0,326 за Zn2 .¹²⁵ Индекс тригоналности код идеалне квадратно-пирамидалне геометрије износи 0, односно 1 у случају тригонално-бипирамидалне геометрије.¹²⁶



Слика 14. Кристалне структуре $[\text{Zn}(\text{Gly})_2]$ (А) и $[\text{Zn}(\text{L-His})_2] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Б) комплекса¹²⁵

Аминокиселина L-хистидин се координује за $\text{Zn}(\text{II})$ јон преко N2 атома азота имидазолског прстена и атома азота терминалне амино групе, при чему је геометрија $[\text{Zn}(\text{L-His})_2] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ комплекса дисторгована тетраедарска (Слика 14Б). У случају комплекса $[\text{Zn}(\text{L-Pro})_2]$, координациони број $\text{Zn}(\text{II})$ јона је 5, са геометријом између квадратно-пирамидалне и тригонално-бипирамидалне.¹²⁵

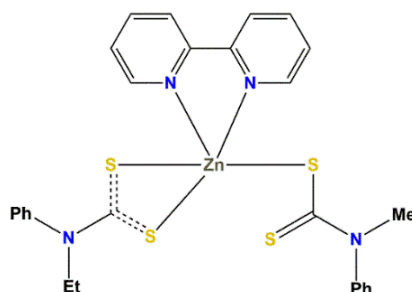
Синтетисани су цинк(II) комплекси, који поред аминокиселине, садрже и *N*-хетероциклично једињење, $[\text{Zn}(2,2'\text{-bipy})(\text{Gly})]\text{NO}_3$ и $[\text{Zn}(1,10\text{-phen})(\text{Gly})]\text{NO}_3$.¹²⁷ Ови комплекси су растворни у води, што представља први предуслов за њихову евентуалну примену у терапеутске сврхе. У складу са тим, синтетисани комплекси и *N*-хетероциклични лиганди су испитивани на две Грам-позитивне (*S. aureus* и *E. faecalis*) и две Грам-негативне (*E. coli* и *P. aeruginosa*) бактерије. Комплекси су показали бољу активност у односу на *N*-хетероцикличне лиганде, при чему је $[\text{Zn}(1,10\text{-phen})(\text{Gly})]\text{NO}_3$ комплекс незнатно активнији од $[\text{Zn}(2,2'\text{-bipy})(\text{Gly})]\text{NO}_3$.¹²⁷ Разлика у активности између комплекса и некоординованих лиганда је последица смањења поларизабилности јона метала услед координације лиганда и повећања делокализације π -електрона унутар хелатног прстена. Ове промене доводе до повећања њихове липосолубилности и пермеабилности кроз липидни слој ћелијске мембране.^{128,129} Активност оба испитивана комплекса према Грам-негативним бактеријама је већа у односу на Грам-позитивне бактерије, што је последица различите структуре ћелијског зида ових бактерија. Као што је већ поменуто, ћелијски зид Грам-негативних бактерија, поред пептидогликанског слоја, чини и спољашна мембрана са липополисахаридима и протеинима, који доприносе поларности зида ових бактерија. Већа поларност ћелијског зида и наелектрисање комплекса олакшава њихово продирање кроз ћелијску мембрану.¹³⁰

У циљу одређивања потенцијалног механизма антимикуробног деловања $[\text{Zn}(2,2'\text{-bipy})(\text{Gly})]\text{NO}_3$ и $[\text{Zn}(1,10\text{-phen})(\text{Gly})]\text{NO}_3$ комплекса, испитиване су њихове

интеракције са DNA (у присуству етидијум-бромида, EthBr) и хуманим серум албумином (HSA) применом флуоресцентне емисионе спектроскопије.¹²⁷ Након додавања испитиваних комплекса у DNA-EthBr систем, долази до смањења интензитета емисије, али израчунате вредности константи везивања указују да се комплекси не понашају као интеркалирајући агенси.¹²⁷ С друге стране, утврђено је да, услед интеракције синтетисаних комплекса са HSA, долази до промена у микроокружењу триптофана.¹²⁷ Да би се потврдило место везивања комплекса за протеин, изведен је конкуритивни експеримент заснован на конкуренцији између комплекса и маркера специфичних за домен I (варфарин) и домен II (диазепам).¹³¹ Вредност Стерн-Волмерове константе (K_{sv}) комплекса се значајно смањила у случају диазепама, што указује на везивање испитиваних комплекса за домен II у HSA протеину.¹²⁷

Ароматична *N*-хетероциклична једињења су, такође, коришћена за синтезу нових цинк(II) комплекса који садрже и дитиокарбамато (dtc) лиганде.¹³² Дитиокарбамати представљају фармакофоре многих биолошко активних молекула, као што је антифунгални лек тетраметилтиурам дисулфид (тирам).¹³³ Ова једињења су, такође, интересантна због свог нуклеофилног карактера и редокс потенцијала атома сумпора, али и због афинитета координације за јоне метала.¹³⁴ У складу са тим, синтетисани су мононуклеарни $[ZnL^1L^2py]$, $[ZnL^1L^2(2,2'-bipy)]$ и $[ZnL^1L^2(1,10-phen)]$ комплекси, L^1 је *N*-метил-*N*-фенил-дитиокарбамат, L^2 је *N*-етил-*N*-фенил-дитиокарбамат и *py* је пиридин.¹³² У овим комплексима, одговарајући *N*-хетероциклични лиганд је бидентатно координанан за Zn(II) јон, при чему у координацији учествују и два дитиокарбамато лиганда (три од укупно четири атома сумпора из два dtc). Геометрија комплекса је дисторгована квадратно-пирамидална (Слика 15).

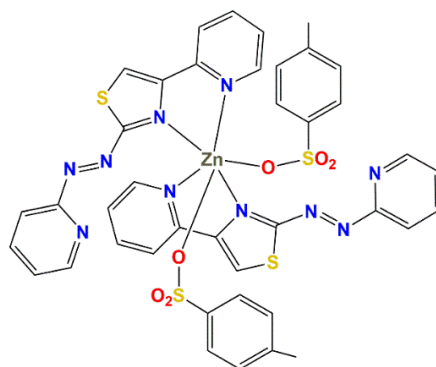
Антимикробна активност $[ZnL^1L^2py]$, $[ZnL^1L^2(2,2'-bipy)]$ и $[ZnL^1L^2(1,10-phen)]$ комплекса је испитивана на шест бактеријских ћелија (*E. coli*, *Klebsiella oxytoca*, *B. cereus*, *P. aeruginosa*, *Salmonella typhi* и *S. aureus*) и две гљивице (*Aspergillus flavus* и *Fusarium oxysporum*).¹³² Испитивани комплекси су при концентрацији од 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ показали умерену антибактеријску активност, али је уочено да су дитиокарбаматоцинк(II) комплекси коришћени као прекурсори у њиховој синтези били активнији.¹³² Ово се може објаснити чињеницом да антимикробна активност комплекса опада са порастом моларне масе, што утиче на њихову пермеабилност кроз ћелијску зид бактерије.¹³⁵



Слика 15. Претпостављена структурна формула $[ZnL^1L^2(2,2'-bipy)]$ комплекса¹³²

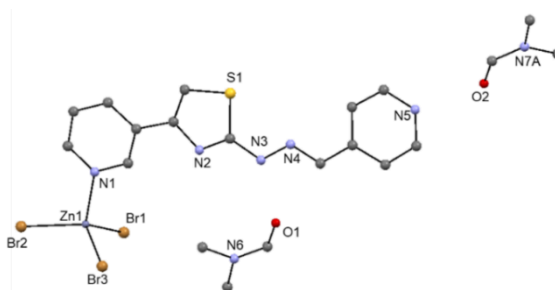
Током последњих деценија посебно интересантну групу лиганата представљају пиридин-тиазолни деривати, који су коришћени за синтезу цинк(II) комплекса, $[Zn(L1)_2(TsO)_2]$ и $[Zn(HL2)Br_3] \cdot 2DMF$, $L1$ је 4-(пиридин-2-ил)-2-(2-(пиридин-2-илметил)хидразинил)тизол, $L2$ је 4-(пиридин-3-ил)-2-(2-(пиридин-4-илметил)хидразинил)тизол, TsO је *p*-толуенсулфонат и DMF је диметил-формаид.¹³⁶ Применом рендгенске структурне анализе је утврђено да су оба синтетисана комплекса мононуклеарна. Координациону сферу Zn(II) јона у $[Zn(L1)_2(TsO)_2]$ комплексу чине два

пиридин-тиазолна и два *p*-толуенсулфонато лиганда, тако да комплекс има очекивану октаедарску геометрију (Слика 16).



Слика 16. Структурна формула $[Zn(L1)_2(TsO)_2]$ комплекса¹³⁶

Супротно томе, $[Zn(HL2)Br_3] \cdot 2DMF$ комплекс има дисторговану тетраедарску геометрију, при чему се један пиридин-тиазолни лиганд монодентатно координује за јон метала преко пиридинског атома азота, а преостала три координациона места заузимају бромидо лиганди (Слика 17).¹³⁶ У кристалној решетки комплекса присутан је и DMF, али се он не координује за централни јон метала, већ његов атома кисеоника успоставља интрамолекуларске водоничне везе са атомом азота хидразонског дела лиганда.



Слика 17. Кристална структура $[Zn(HL2)Br_3] \cdot 2DMF$ комплекса¹³⁶

Комплекси $[Zn(L1)_2(TsO)_2]$ и $[Zn(HL2)Br_3] \cdot 2DMF$ су стабилни у раствору, због чега су биолошки испитивани на седам бактеријских ћелија, *E. coli*, *S. aureus*, *S. typhimurium*, *B. subtilis*, *Shigella flexneri*, *Vibrio parahaemolyticus* и *P. aeruginosa*.¹³⁶ Ови комплекси су показали већу активност према тестираним бактеријским ћелијама у односу на некоординоване лиганде. Највећу антибактеријску активност показује $[Zn(HL2)Br_3] \cdot 2DMF$ комплекс према *E. coli* и *Sh. flexneri* (MIC = 3,13 mg/mL). Важно је истаћи да је овај комплекс скоро четири пута активнији на *E. coli* у односу на клинички коришћен ципрофлоксацин. С друге стране, комплекс $[Zn(L1)_2(TsO)_2]$ је, у највећој мери, инхибирао раст бактерије *B. subtilis*.¹³⁶

1.5. Сребро

1.5.1. Примена сребра и његових једињења у медицини

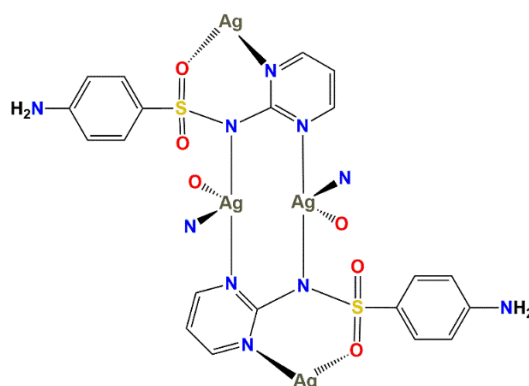
Сребро је метал који се од давнина примењивао у третману рана и лечењу инфекција.¹³⁷ За разлику од бабра и цинка, сребро не припада групи есенцијалних елемената, што његову примену у медицини чини још интересантнијом. У инертној

атмосфери сребро нема утицај на микроорганизме, али у присуство кисеоника испољава широк спектар антимикуробне активности, која се приписује Ag(I) јону. Међутим, механизам деловања овог јона је веома сложен и још увек није у потпуности разјашњен, а претпоставка је да се заснива на оштећењима ћелије микроорганизама од стране Ag(I) јона.¹³⁷ Могући начини антимикуробног деловања Ag(I) јона подразумевају следеће:

- 1) Ag(I) јони инхибирају улаз фостата у ћелију, због чега се услед његове акумулације подстиче ослобађање јона калијума, што за последицу има ћелијску смрт.¹³⁷
- 2) Ag(I) јони имају афинитет везивања за нуклеинске киселине, што доводи до поремећаја процеса репликације.¹³⁷
- 3) Координација многих функционалних група за Ag(I) јон води формирању комплекса, који даље могу да интерагују са протеинима и ензимима. Услед овога, долази до денатурације протеина и инактивације ензима, као последица промене у њиховој структури. Утврђено је да се након координације карбоксилатне групе аспирина за Ag(I) јон формира комплекс, који се даље може везати за липоксигеназу, што инхибира дејство овог ензима и узрокује апоптозу.¹³⁸ С друге стране, утврђено је да сребро(I) комплекси са *N*-хетероцикличним карбенима (NHC) инхибирају селеноензим тиоредоксин редуктазу.¹³⁹
- 4) Интеракција Ag(I) јона са ћелијским зидом бактерије доводи до структурне модификације ћелијске мембране. На пример, протеини који се налазе на површини ћелије се координују за Ag(I) јон преко тиолних група, узрокујући дестабилизацију ћелијске мембране.¹⁴⁰
- 5) Верује се да Ag(I) јони ослобођени из соли или наночестица (AgNPs) могу да допринесу ткз. VBNC (*the viable but non-culturable state*) стању бактерија. У овом стању, бактерије нису мртве, већ су живе и метаболички активне, само даље не расту. Улазак у ово стање сматра се једним начином преживљавања бактерија, као њихов одговор на неповољне услове животне средине (температура, pH вредност, зрачење). Ово стање се, такође, сматра реверзибилним, јер је могући повратак бактерије у првобитно стање при одговарајућим условима.¹³⁷ Испитиван је утицај Ag(I) јона из AgNO₃ и AgNPs на VBNC стање код *P. aeruginosa*, применом различитих метода, као што су одређивање количине рибозомалне рибонуклеинске киселине (rRNA), као индикатора за производњу протеина, и одређивање концентрације АТФ молекула, као индикатора енергетског статуса ћелије.¹⁴¹ Резултати овог истраживања су показали да Ag(I) јони нису изазвали смрт ћелија, већ су оне ушле у VBNC стање, јер је количина rRNA остала иста као код контроле, само се садржај АТФ молекула смањио за око 75%.¹⁴¹
- 6) Још један могући механизам антимикуробног деловања Ag(I) јона објашњава се ткз. зомби ефектом, односно бактерије чија је смрт наступила услед дејства овог јона метала могу да изазову смрт живих бактерија. Овај ефекат је потврђен експериментима изведеним на *P. aeruginosa*, на коју је деловано Ag(I) јонима из AgNO₃. Ћелије *P. aeruginosa*, код којих је наступила смрт, добро су испране, а затим нанете на нову културу са живим бактеријама. У новој култури уочен је значајан антибактеријски ефекат, за који је утврђено да потиче од мртвих ћелија *P. aeruginosa*, које су посматране као складиште Ag(I) јона. На основу тога, може се закључити да Ag(I) јони након што испоље своје токсично деловање, не губе активност, при чему своју бактерицидну активност даље манифестују везани за разне протеине ћелијске мембране, а само се мали део редукује у AgNPs.¹⁴²

Захваљујући различитим механизмима деловања Ag(I) јона који отежавају развој антимикробне резистентности, могућа је примена многих његових једињења у терапеутске сврхе.¹³⁷ Због свог антимикробног деловања, сребро се примењивало приликом израде посуђа за чување хране и воде за пиће. Сребрни новчић је додаван у посуду са водом, ради спречавања развоја микроорганизама. Ова метода је, такође, примењивана за чување млека у циљу спречавања његовог кварења. Код старих Македонаца забележена је примена сребрних плоча за брже зарастање рана. Примена сребрних жица за ушивање рана приликом хирушких интервенција, смањила је могућност појаве сепсе. Такође, многа једињења сребра(I) су нашла примену у превенцији и лечењу различитих бактеријских инфекција.¹⁴³ На пример, AgNO₃ се први пут применио у 19. веку, у облику 1% раствора за укапавање у очи беба након рођења, ради спречавања преноса гонореје са мајке на дете приликом порођаја.¹⁴⁴ Сребро(I)-нитрат се показао ефикасним и код лечења чирева на желуцу и у третману опекотина.¹⁴³ Након позитивног деловања арсфенамина (Слика 1) у терапији сифилиса, почетком 20. века забележена је примена сребро(I)-арсфенамина за лечење ове болести.¹³⁷ Међутим, његова примена није дуго трајала, јер је брзо дошло до открића пеницилина. Сребро(I)-ацетат се, због своје способности да у контакту са димом развије метални укус у устима, примењивао у жвакама и спрејевима за одвикавање од пушења.¹³⁷ Једињењима сребра(I) се, такође, облажу пластични катетери, што се показало врло ефикасно у заштити пацијената од бактеријских инфекција, током њиховог боравка у болници. Сребро је, такође, имало и примену у медицини захваљујући открићу да кристали сребро(I)-халогенида активирају X-зраке.¹⁴³

Као што је већ речено, откриће пеницилина је, у великој мери, смањило примену једињења сребра(I) у медицинске сврхе. Међутим, један врло редак пример једињења сребра(I), чија је примена ипак успела да опстане поред открића великог броја антибиотика, јесте сребро(I)-сулфадиазин, AgSD (Слика 18). Ово једињење се примењује у облику креме под називом силвадин у Сједињеним Америчким Државама, док се у Великој Британији, Канади и европским државама продаје под комерцијалним називом фламазин. Крема у свом саставу садржи 1% AgSD и 2% хлорхексидин-диглуконата, а примењује у третману тешких опекотина захваљујући свом антимикробном деловању. Због своје ефикасности, недавно је започета инкорпорација AgSD у завоје који се користе за лечење опекотина на површини коже.¹⁴⁵



Слика 18. Структурна формула сребро(I)-сулфадиазина (AgSD). Нису приказани сви атоми ради јаснијег приказа структуре комплекса¹⁴⁵

Сребро се, још увек, у великој мери користи за пречишћавање воде за пиће, при чему се у ову сврху примењују сребро-бакар филтери.¹⁴⁶ Просечан ниво сребра у природним водама је око 0,2 mg/L. Међу храном која представља извор сребра убраја се

брашно (0,3 ppm), мекиње (1 ppm), риба (10 ppm), месо (40 ppm) и млеко (50 ppm).¹⁴⁷ Апсорпција сребра кроз кожу или гастроинтестинални тракт зависи од јонизације његовог извора и доступности слободног Ag(I) јона.¹⁴⁷ Неке процене указују да само око 10% од укупно унетог сребра доспева у циркулацију где се везује за протеине, док се остатак највећим делом излучује преко урина или фекалним путем.

Највеће концентрације сребра након интравенозне примене детектоване су у органима ретикулоендотелног система, као што су јетра, слезина, плућа, коштана срж, мишићи и ткива коже, а може и проћи кроз крвно-мождану баријеру и акумулирати у неуронима.¹³⁷

Људи су највише били изложени сребру преко зубних амалгама, који су се састојали од приближно 35% елементарног сребра и 50% елементарне живе. Ова примена сребра није имала озбиљне нежељене ефекте по здравље људи.¹⁴⁵ Међутим, након дужег излагања сребру, може доћи до испољавања његових токсичних ефеката. Аргирија и аргироза представљају, најчешће, уочљиве промене повезане са продуженом применом сребра и његових једињења. Ове промене настају као последица иреверзибилног таложења сребро(I)-селенида и сребро(I)-сулфида у кожи (аргирија) и очима (аргироза), због чега та подручја постају плавичасто-сиво обојена, док се у присуству сунчеве светлости тај ефекат појачава.¹⁴⁸ У току једног истраживања спроведеног на пацијенту са аргиријом, коју је добио након дуже терапије против пушења сребро(I)-ацетатом, процењено је укупно оптерећење тела са око 6,4 g сребра са високим нивоом у кожи подлактице изложеној сунчевом зрачењу.¹⁴⁹ Такође, повишена концентрација сребра у крви је примећена код радника, који су током много година рада били изложени овом металу и његовим једињењима. Међутим, ове промене нису опасне по живот људи, али код тешких случајева промена боје коже може изазвати психичку узнемиреност, јер се не може лако уклонити хемијским средствима или хирушким путем. Смртни исходи код пацијената са аргиријом приписују се већ постојећим здравственим проблемима, који нису повезани са овом променом. Данас је ризик од појаве аргирије сведен на минимум, јер је доста препарата на бази сребра за оралну и гастроинтестиналну примену повучено са тржишта.¹⁴⁷

1.5.2. Физичко-хемијске карактеристике сребра

У природи се сребро врло ретко налази у елементарном стању, а чешће је присутно у облику руде, *аргентит* (Ag₂S) и као примеса у оловним и бакарним рудама, које се користе за његово добијање.⁶³ Сребро је беличастосив метал, који је у чистом стању врло мек и лако растегљив, што му омогућава извлачење у танке листове и жице.⁶¹ Међутим, чисто сребро је превише мекано за израду предмета, због чега се за примену у те сврхе легира са другим металима. Пример је легура сребра са 92,5% чистог метала, позната као сребро 925 (*sterling silver 925*). Преостали састав ове легуре углавном чини бакар, али и други елементи као што су платина, цинк или германијум, који чине сребро мање мекшим и отпорнијим.¹⁴⁴ Сребро је врло сјајан метал, који је због те особине нашао примену у оптици и за израду огледала. Најважнија особина сребра је његова електрична и топлотна проводљивост, која је у односу на друге метале највећа.⁶¹

Име овог метала потиче од старе англосаксонске речи *seolfor*, док је његов хемијски симбол (Ag) изведен из латинске речи *argentum*, која у преводу значи бео и сјајан.¹⁴⁴ Сребро има редни број 47 и релативну атомску масу 107,9. У природи се налази у облику два стабилна изотопа: ¹⁰⁷Ag (51,35%) и ¹⁰⁹Ag (48,65%), а познати су и радиоактивни изотопи.⁶¹

Могућа оксидациона стања сребра у једињењима су од +1 до +3, али су најзаступљенија једињења са оксидационим стањем +1, јер су најстабилнија.⁶³ На собној температури, сребро се понаша као слабо редуцијско средство. Међутим, након дужег излагања кисеонику, при вишој температури и притиску, долази до његове оксидације у сребро(II)-оксид (Ag_2O), а због присуства H_2S у ваздуху гради се Ag_2S , који је одговоран за тамне наслаге на предметима од сребра. Оксид сребра(II) се примењује за израду батерија у електричним уређајима. Сребро се у напонском низу метала налази десно од водоника, због чега се сврстава у племените метале, који се растварају само у киселинама са јаким оксидационим дејством, као што је азотна киселина.⁶¹ Једињења сребра(II) са посебним практичним значајем јесу халогениди, због своје способности да се у присуству светлости разлажу на елементе.

Заправо се на овој реакцији, заснива примена сребра за израду црно-белих фотографија, при чему су места са највећом количином елементарног сребра најтамнија. Док је сребро(II)-флуорид (AgF) растворљив у води, растворљивост осталих халогенида опада са порастом атомске масе халогена ($\text{AgCl} > \text{AgBr} > \text{AgI}$).¹¹⁷ Сребро(II)-хлорид је бео сираст талог нерастворан у води, али се раствара у воденом раствору амонијака градећи диамминсребро(II)-хлорид, $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]\text{Cl}$.⁶¹ Овим редоследом сребро(II)-халогенида се такође мења и њихова боја од беле преко бледожуте до жуте.¹¹⁷

Сребро, као прелазан метал, гради комплексна једињења, од којих су најстабилнији сребро(II) комплекси са координационим бројем 2 и 4 (Табела 4).¹¹⁷

Табела 4. Најчешће геометрије комплекса сребра са оксидационим стањем +1

Оксидационо стање и <i>d</i> електронска конфигурација	Координациони број	Геометрија
Ag(II), d^{10}	2	линеарна
	3	тригонална
	4	тетраедарска

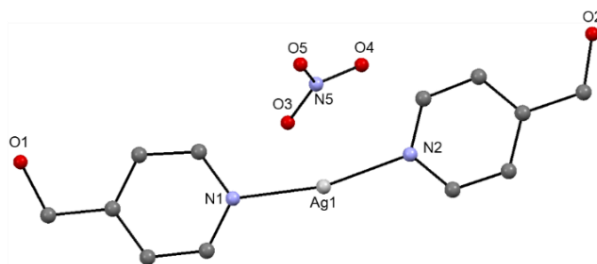
Сребро(II) јон са електронском конфигурацијом $[\text{Ar}]4d^{10}$ се понаша као мека Луисова киселина и показује велики афинитет према лигандима који садрже меке донорске атома (сумпор, фосфор, селен и арсен), као и умерен афинитет према азот-донорским лигандима.¹⁵⁰ Истраживања су показала да избор лиганда који се координује за $\text{Ag}(\text{II})$ јон, у највећој мери, утиче на антимикуробну активност одговарајућих комплекса.⁹⁰ На пример, сребро(II) комплекси са *N*- и *O*-донорским лигандима показали су шири спектар антимикуробне активности, него комплекси са лигандима који садрже сумпор као донорски атом.^{151,152} Већа активност комплекса у којима су лиганди координовани за $\text{Ag}(\text{II})$ јон преко атома азота и кисеоника је последица слабих Ag-N и Ag-O веза, тако да се њиховим раскидањем омогућава реакција $\text{Ag}(\text{II})$ јона са различитим биомолекулима.⁹⁰ Поред тога, активност сребро(II) комплекса зависи од њихове растворљивости, стабилности у раствору, електрохемијског понашања и липофилности.¹³⁷

1.5.3. Антимикуробна активност сребро(II) комплекса

До сада су добру активност према различитим микроорганизмима показали сребро(II) комплекси са различитим типом лиганда, као што су *NHC* и фосфини.¹⁵³ Поред тога, интересантну групу лиганда у синтези сребро(II) комплекса као потенцијалних антимикуробних агенаса представљају ароматична *N*-хетероциклична једињења. Посебно важну улогу у многим физиолошким процесима имају једињења

која у својој структури садрже пиридин. На пример, пиридин-3-карбоксилна киселина (никотинска киселина) подиже ниво доброг холестерола у крви, због чега се примењује у терапији хиперлипидемије у циљу смањења ризика од кардиоваскуларних болести.^{154,155}

Дериват пиридина, 4-(хидроксиметил)пиридин (4-CH₂ОНру), коришћен је за синтезу сребро(I) комплекса, [Ag(4-CH₂ОНру)₂]NO₃, чија је структура одређена применом рендгенске структурне анализе (Слика 19).¹⁵⁶ Асиметричну јединицу овог комплекса чини Ag(I) јон са два координована 4-CH₂ОНру лиганда преко пиридинског атома азота, док се у спољашњој координационој сфери налази нитрат као контра-анјон. Комплекс има дисторговану линеарну геометрију са N1–Ag1–N2 углом од 167,22(4)°. Хидроксилна група 4-CH₂ОНру лиганда учествује у водоничним везама.¹⁵⁶ Испитивана је *in vitro* антибактеријска и антифунгална активност синтетисаног [Ag(4-CH₂ОНру)₂]NO₃ комплекса и некоординованог 4-CH₂ОНру лиганда на *S. aureus*, *S. epidermidis* и *C. albicans*.¹⁵⁶ Добијени резултати су упоређени са одговарајућим резултатима за AgSD, као најчешће коришћен антимикуробни агенс на бази сребра. Утврђено је да некоординовани лиганд не показује антимикуробну активност при концентрацији од 500 mg/L. С друге стране, синтетисани сребро(I) комплекс показује бољу антифунгалну него антибактеријску активност. Инхибиција раста *C. albicans* се постиже при концентрацији комплекса од 20 mg/L, што је једнако МИС вредности за AgSD. Испитивани комплекс је показао и антибактеријску активност према тестираним бактеријама, али при концентрацији од 40 mg/L, при чему је уочена боља активност комплекса на *S. aureus* у односу на AgSD.¹⁵⁶

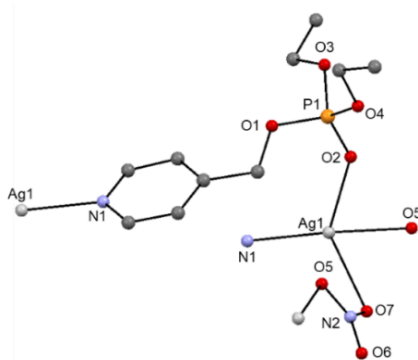


Слика 19. Кристална структура [Ag(4-CH₂ОНру)₂]NO₃ комплекса¹⁵⁶

Синтетисан је и сребро(I) комплекс са фосфатним дериватом пиридина, диетил(пиридин-4-илметил)фосфатом (4-руОре), {[Ag(4-руОре)]NO₃}_n.¹⁵⁷ Резултати X-ray анализе су показали да је синтетисани комплекс полинуклеаран, при чему се у асиметричној јединици налази тетраедарски Ag(I) јон, за који су координована два атома азота из два нитратна јона, један атом кисеоника фосфатне групе, и атом азота пиридинског прстена 4-руОре лиганда (Слика 20). Када се асиметрична јединица прошири кроз центар инверзије, добије се прстенасти мотив, који је додатно стабилизован π-π интеракцијама између два паралелна пиридинска прстена.¹⁵⁷

Поред тога, испитивана је *in vitro* антимикуробна активност {[Ag(4-руОре)]NO₃}_n комплекса и некоординованог 4-руОре лиганда на шест Грам-позитивних и Грам-негативних бактерија (*S. aureus* ATCC 6538, *S. aureus* ZMF MM3, *S. aureus* ZMF KSK, *S. epidermidis* ZMF 12, *E. coli* ATCC 8739 и *P. aeruginosa* ATCC 27853) и два соја гљивица (*C. albicans* ATCC 10231 и *C. albicans* ZMF4).¹⁵⁷ Лиганд 4-руОре није показао способност инхибиције раста тестираних микроорганизама. С друге стране, {[Ag(4-руОре)]NO₃}_n комплекс је показао бољу антифунгалну активност на тестираним *C. albicans* сојевима (MIC = 18,8 μM) у односу на AgNO₃ (MIC = 23,0 μM) и AgSD (MIC = 10,9 – 21,9 μM у зависности од соја). Највећа антибактеријска активност

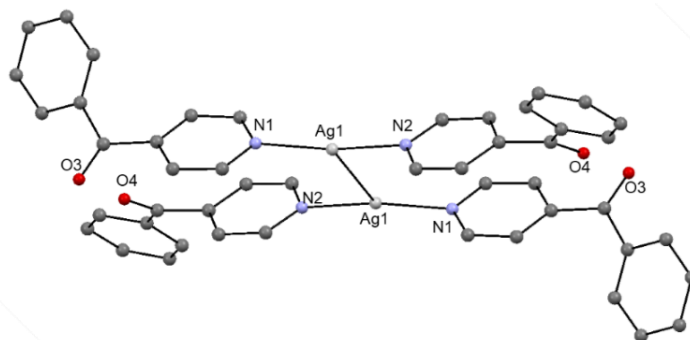
$\{[\text{Ag}(4\text{-pyOpe})]\text{NO}_3\}_n$ комплекса је уочена према *E. coli* и *P. aeruginosa* са MIC од 37,6 μM , док је у случају *S. aureus*, комплекс показао способност инхибиције раста при MIC од 75,3 μM .¹⁵⁷



Слика 20. Кристална структура $\{[\text{Ag}(4\text{-pyOpe})]\text{NO}_3\}_n$ комплекса. Нису приказани сви атоми ради јаснијег приказа структуре комплекса¹⁵⁷

За синтезу сребро(I) комплекса коришћени су и деривати пиридина, 3-цијанопиридин (3CNpy) и 4-бензоилпиридин (4Bzpy), који су реаговали са AgCF_3COO .¹⁵⁸ У реакцији са 3CNpy, добијен је полинуклеарни $\{[\text{Ag}(3\text{CNpy})_2(\text{CF}_3\text{COO})]\}_n$ комплекс. Координациони број Ag(I) јона у овом комплексу је 6, тако да се у његовој координациони сфери, поред два атома азота из 3CNpy лиганда, налазе и четири атома кисеоника из три различита CF_3COO^- анјона, при чему је један бидентатно координован за Ag(I) јон и има улогу мостног лиганда између два Ag(I) јона. У случају реакције са 4Bzpy, добијен је динуклеарни комплекс $[\text{Ag}(4\text{Bzpy})_2]_2(\text{CF}_3\text{COO})_2$ дисторговане линеарне геометрије, са трифлатом као контра-анјоном (Слика 21).¹⁵⁸

Антимикробни потенцијал синтетисаних $\{[\text{Ag}(3\text{CNpy})_2(\text{CF}_3\text{COO})]\}_n$ и $[\text{Ag}(4\text{Bzpy})_2]_2(\text{CF}_3\text{COO})_2$ комплекса и одговарајућих лиганата на различитим патогеним микроорганизмима је одређен дифузионом и дилуционом методом.¹⁵⁸ За разлику од 3CNpy лиганда, који није био активан на тестираним микроорганизмима, полинуклеарни $\{[\text{Ag}(3\text{CNpy})_2(\text{CF}_3\text{COO})]\}_n$ комплекс је показао антибактеријску активност са пречником зоне инхибиције од 11 – 15 mm код Грам-позитивних бактерија (*S. aureus* и *B. subtilis*), односно 11 – 16 mm код Грам-негативних бактерија (*E. coli* и *P. vulgaris*). Лиганд 4Bzpy није био активан према Грам-негативним бактеријама, док је $[\text{Ag}(4\text{Bzpy})_2]_2(\text{CF}_3\text{COO})_2$ комплекс инхибирао раст ових бактерија у пречнику од 12 mm код *E. coli*, односно 16 mm код *P. vulgaris*. Комплекс $[\text{Ag}(4\text{Bzpy})_2]_2(\text{CF}_3\text{COO})_2$ је најактивнији на гљивици *A. fumigatus* при MIC вредностима од 9,7 $\mu\text{g}/\text{mL}$.¹⁵⁸



Слика 21. Кристална структура $[\text{Ag}(4\text{Bzpy})_2]_2^{2+}$ катјона¹⁵⁸

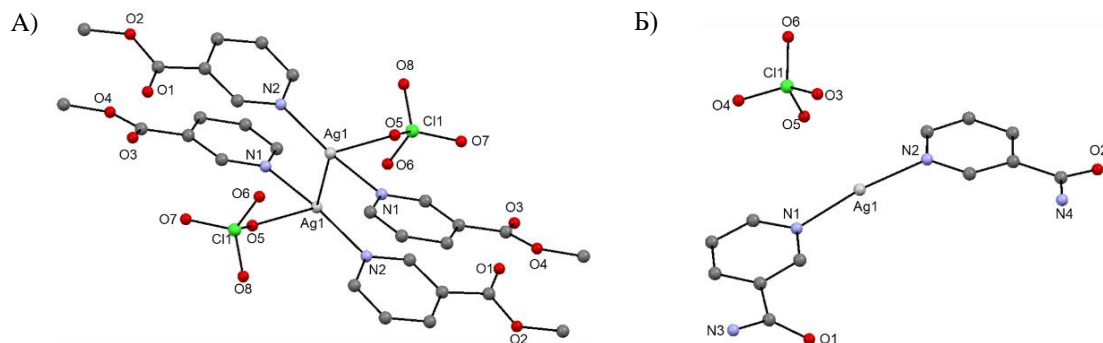
Поред сулфонамида који се користе као антибиотици, као ефикасни агенси у заустављању раста бактерија показали су се и комплекси метала са њиховим дериватима, као што је већ поменут AgSD .¹⁴⁵ Пиридин-2-сулфонат (py-2-SO_3) коришћен је као лиганд за синтезу полинуклеарног сребро(I) комплекса, $\{[\text{Ag}(\text{py-2-SO}_3)]\}_n$.¹⁵⁹ Применом рендгенске структурне анализе утврђено је да је лиганд py-2-SO_3 бидентатно координован за Ag(I) јон преко атома азота пиридинског прстена и атома кисеоника сулфонатне групе, формирајући петочлани хелатни прстен. Поред тога што се понаша као хелатни лиганд, py-2-SO_3 , такође, повезује два Ag(I) јона.¹⁵⁹ Синтетисани $\{[\text{Ag}(\text{py-2-SO}_3)]\}_n$ комплекс је показао највећу активност према Грам-позитивној бактерији *S. aureus* у поређењу са клинички коришћеним AgSD комплексом и AgNO_3 , који је коришћен у синтези комплекса.¹⁵⁹ Поред тога, $\{[\text{Ag}(\text{py-2-SO}_3)]\}_n$ комплекс показује бољу антифунгалну активност према *C. parapsilosis* у односу на AgSD . Применом UV-Vis спектрофотометрије и флуоресцентне емисионе спектроскопије испитиване су интеракције $\{[\text{Ag}(\text{py-2-SO}_3)]\}_n$ комплекса са DNA.¹⁵⁹ На основу резултата који су добијени компетитивним експериментима са EthBr и Hoechst 33258 (2'-(4-хидроксифенил)-5-[5-(4-метилпиперазин-1-ил)бензимидазо-2-ил]-бензимидазол), може се извести закључак о двоструком начину везивања испитиваног сребро(I) комплекса за овај биомолекул, који укључује интеркалативно везивање и везивање преко малог жлеба.

Познато је да се карбоксилне киселине и њени деривати примењују као антимикробни агенси.¹⁶⁰ На пример, натријум-бензоат се користи за чување хране у циљу заустављања раста бактерија.¹⁶⁰ Поред њих, пиридин-карбоксилне киселине представљају значајне биомолекуле, као што је раније описана примена никотинске киселине у терапеутске сврхе.^{154,155} Структурни изомер никотинске киселине, пиридин-2-карбоксилна киселина или пиколинска киселина, значајна је за људски организам, јер има способност да хелатно координује јоне метала, попут хрома(III), цинка(II), мангана(II), бакра(II), гвожђа(II/III) и молибдена(IV).¹⁶¹ Због ове особине, пиколинска киселина се примењује у дијететским адитивима као носач за Zn(II) јоне.¹⁶² Пиридин-карбоксилне киселине су значајне и у координационој хемији као лиганди са азот- и кисеоник-донорским атомима.¹⁶³ У складу са овим чињеницама, испитивана је антимикробна активност пиридинкарбоксилатосребро(I) комплекса, Agpic (pic је пиколинска киселина), Agnic (nic је никотинска киселина) и $[\text{Ag}(\text{Ndipic})] \cdot 0,75\text{H}_2\text{O}$ (Ndipic је дипиколинска киселина).¹⁶³ Добијени резултати су показали да је раст Грам-позитивне *S. aureus* и Грам-негативне *E. coli* бактерије у присуству испитиваних комплекса сузбијен за 50%. Потпуна инхибиција раста *S. aureus* постиже се при концентрацији комплекса од 0,05 mM, док се у случају *E. coli* потпуно зауставља раст при пет пута нижој концентарцији комплекса (0,01 mM). Такође, примећена је активност синтетисаних пиридинкарбоксилатосребро(I) комплекса на раст гљивице *C. parapsilosis*.¹⁶³

Деривати никотинске киселине, метилникотинат (Menic) и никотин-амид (na), коришћени су као лиганди за синтезу сребро(I) комплекса у реакцији са AgClO_4 .¹⁶⁴ Синтетисани су $[\text{Ag}(\text{Menic})_2(\text{ClO}_4)]_2$ и $[\text{Ag}(\text{na})_2]\text{ClO}_4$ комплекси, у којима су одговарајући деривати никотинске киселине монодентатно координовани за Ag(I) јон. У динуклеарном $[\text{Ag}(\text{Menic})_2(\text{ClO}_4)]_2$ комплексу, утврђена је координација перхлоратног ањона за Ag(I) јон преко атома кисеоника (Слика 22А), док се у мононуклеарном $[\text{Ag}(\text{na})_2]\text{ClO}_4$ комплексу, ClO_4^- налази у спољашњој координационој сфери (Слика 22Б).¹⁶⁴

Комплекс $[\text{Ag}(\text{Menic})_2(\text{ClO}_4)]_2$ има Т-облик геометрије, док је геометрија $[\text{Ag}(\text{na})_2]\text{ClO}_4$ комплекса линеарна са N1-Ag-N2 углом од $172,85(5)^\circ$. Одступање од идеалне линеарне геометрије је последица слабих интеракција између Ag(I) јона и

атома кисеоника из перхлората. Међутим, дужине тих веза су у опсегу 2,875 – 3,032 Å, што потврђује улогу перхлората као контра-анјона.¹⁶⁵ Комплекси $[\text{Ag}(\text{Menic})_2(\text{ClO}_4)]_2$ и $[\text{Ag}(\text{na})_2]\text{ClO}_4$ су показали добру антимикуробну активност према тестираним ћелијама микроорганизама, с тим што је $[\text{Ag}(\text{na})_2]\text{ClO}_4$ комплекс показао незнатно бољу антифунгалну активност у односу на $[\text{Ag}(\text{Menic})_2(\text{ClO}_4)]_2$ комплекс.¹⁶⁴ С друге стране, динуклеарни $[\text{Ag}(\text{Menic})_2(\text{ClO}_4)]_2$ комплекс је имао већи антибактеријски ефекат у поређењу са $[\text{Ag}(\text{na})_2]\text{ClO}_4$ комплексом.¹⁶⁴



Слика 22. Кристалне структуре $[\text{Ag}(\text{Menic})_2(\text{ClO}_4)]_2$ (А) и $[\text{Ag}(\text{na})_2]\text{ClO}_4$ (Б) комплекса¹⁶⁴

2. ПРЕДМЕТ ИСТРАЖИВАЊА

С обзиром да велики проблем у лечењу инфекција изазваних различитим сојевима бактерија и гљивица представља развој резистентности ових микроорганизама на клинички коришћене лекове, данас се посебна пажња посвећује синтези нових једињења као потенцијално новим антимикробним агенсима. Поред тога, због чињенице да лекови, који се примењују у терапији инфекција изазваних микроорганизама, представљају органске молекуле, истраживања су усмерена ка синтези структурно различитих једињења, у циљу смањивања могућности развоја антимикробне резистентности.¹⁻²⁵

Потенцијално нову класу ефикасних антимикробних агенаса за лечење инвазивних бактеријских и гљивичних инфекција представљају комплекси метала са органским једињењима, било да су она биолошки активна или не, захваљујући физичко-хемијским и биолошким особинама комплексних једињења. Поред тога, интересовање за комплексима метала као ефикасним агенсима за потенцијалну примену у терапији микробних инфекција, оправдава и значајан број раније синтетисаних комплексних једињења, која се већ дуже време примењују у лечењу многих болести. С обзиром да биолошка активност комплекса метала у великој мери зависи од избора органског лиганда, познати су комплекси метала са различитим типовима ових једињења, која у својој структури садрже један или више истих или различитих донорских атома. Досадашња истраживања су показала да комплекси прелазних метала са азот-донорским лигандима показују антимикробно деловање, које ова једињења могу да испољавају на различите начине.²⁶⁻⁴⁶

У складу са претходно наведеним чињеницама, циљ ове докторске дисертације је био синтеза комплекса бакра(II), цинка(II) и сребра(I) са одабраним ароматичним *N*-хетероцикличним једињењима која у структури садрже пиридин. Синтетисани комплекси су структурно окарактерисани применом различитих спектроскопских и електрохемијских метода, а њихове структуре су одређене применом рендгенске структурне анализе. Поред тога, праћена је њихова стабилност у раствору применом спектроскопских метода и мерењем моларне проводљивости, а у случају комплекса бакра(II) и сребра(I) коришћена је и циклична волтаметрија.

Испитивана је антимикробна активност свих синтетисаних комплекса према различитим бактеријским и гљивичним врстама, које су врло чести узрочници микробних инфекција, као и према изолатима из млека крава оболелих од маститиса (сребро(I) комплекси). У циљу одређивања терапеутског потенцијала синтетисаних комплекса, испитивана је њихова цитотоксична активност према здравој ћелијској линији фибробласта плућа (MRC-5). Поред тога, за комплексе, који су показали активност на раст гљивица, испитиван је ефекат на формирање хифа и биофилма код ћелија *C. albicans* сојева. Испитивана је способност синтетисаних комплекса да иницирају стварање реактивних кисеоничних врста, као и да инхибирају међубактеријску комуникацију. За комплексе цинка(II) испитиван је синергистички ефекат са клинички коришћеним нистатином. У циљу утврђивања афинитета везивања синтетисаних комплекса за нуклеинске киселине и протеине, испитиване су њихове интеракције са DNA и говеђим серум албумином (BSA).

Основни циљ истраживања у оквиру ове докторске дисертације је био испитивање утицаја органских лиганда на структурне особине и биолошку активност синтетисаних комплекса метала. Добијени резултати су поређени са одговарајућим резултатима за структурно сличне комплексе, као и за клинички коришћене антимикробне агенсе.

Резултати постигнути у току израде ове докторске дисертације могу бити од значаја за даљи развој медицинске неорганске хемије. Поред тога, резултати ове докторске дисертације могу бити од значаја за развој нових антимикробних лекова на

бази комплекса метала. Оправдано је очекивати да би се применом ових једињења у клиничкој пракси могао превазићи проблем резистенције микроорганизама, а самим тим и ефикасније лечење инвазивних бактеријских и гљивичних инфекција.

3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО

3.1. Хемикалије и реагенси

Бакар(II)-нитрат трихидрат ($\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$), бакар(II)-хлорид дихидрат ($\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), бакар(II)-трифлат ($\text{Cu}(\text{CF}_3\text{SO}_3)_2$), цинк(II)-хлорид (ZnCl_2), цинк(II)-бромид (ZnBr_2), сребро(I)-нитрат (AgNO_3), сребро(I)-тетрафлуороборат (AgBF_4), сребро(I)-хексафлуорофосфат (AgPF_6), сребро(I)-сулфадиазин (AgSD), хиназолин (qz), 1,5-нафтиридин (1,5-naph), 4,7-фенантролин (4,7-phen), етанол, ацетонитрил, метанол, ацетон, фосфатни пуфер (PBS), албумин говеђег серума (BSA), DNA изолован из тимуса телета (ct-DNA), етидијум бромид (EthBr), *n*-октанол, 3,5-ди-*tert*-бутилкатехол (3,5-DTBC), *o*-аминофенол (OAP), диметилсулфоксид (DMSO), деутеро диметилсулфоксид ($\text{DMSO-}d_6$), деутеријум-оксид (D_2O) набављени су од произвођача Sigma-Aldrich. Остале употребљене хемикалије су комерцијални производи аналитичког степена чистоће, које су коришћене без даљег пречишћавања.

3.2. Синтезе

3.2.1. Синтеза диметил-пиридин-дикарбоксилатних естара

Диметил-пиридин-дикарбоксилатни естри, диметил-2-(тиазол-2-ил)пиридин-4,5-дикарбоксилат (py-2tz), диметил-2-(4-метилтиазол-2-ил)пиридин-4,5-дикарбоксилат (py-2metz), диметил-2,2'-бипиридин-4,5-дикарбоксилат (py-2py) и диметил-6-(пиразин-2-ил)пиридин-3,4-дикарбоксилат (py-2pz), који су коришћени као лиганди за синтезу комплекса бабра(II), цинка(II) и сребра(I), припремљени су по раније описаној методи у литератури полазећи од различитих метилкетона.¹⁶⁵ Чистоћа диметил-пиридин-дикарбоксилатних естара је потврђена применом елементарне микроанализе и ^1H NMR спектроскопије.

3.2.2. Синтеза комплекса 1 – 5

Комплекси бабра(II) са диметил-пиридин-4,5-дикарбоксилатним естрима, $[\text{Cu}(\text{NO}_3)(\text{py-2tz})(\text{H}_2\text{O})_3]\text{NO}_3$ (**1**), $[\text{Cu}(\text{NO}_3)_2(\text{py-2metz})(\text{H}_2\text{O})]$ (**2**), $[\text{Cu}(\text{NO}_3)_2(\text{py-2py})(\text{H}_2\text{O})]\text{H}_2\text{O}$ (**3**), $[\text{CuCl}_2(\text{py-2tz})]_2$ (**4**) и $[\text{CuCl}_2(\text{py-2metz})]_n$ (**5**), синтетисани су по следећем поступку. У 5,0 mL етанола растворити 1,0 mmol бакар(II) соли (241,6 mg $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ за **1 – 3** и 170,5 mg $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ за **4** и **5**) и у тај раствор лагано додавати раствор добијен растварањем еквимоларне количине диметил-пиридин-4,5-дикарбоксилатног естра (278,3 mg py-2tz за **1** и **4**, 292,3 mg py-2metz за **2** и **5**, и 272,3 mg py-2py за **3**) у 10,0 mL етанола. Суд са реакцијом смешом оставити да се меша 3 h на собној температури. Кристали комплекса **5** су издвојени из матичног етанолног раствора након 4 дана упаравања на собној температури. Кристали преосталих бакар(II) комплекса су добијени након прекристализације талога, добијеног у реакцији, у метанолу за **1**, односно ацетонитрилу за **2 – 4**. Добијене кристале одвојити цеђењем и сушити на собној температури. Принос је 86% (447,1 mg) за **1**, 64% (318,6 mg) за **2**, 64% (317,3 mg) за **3**, 78% (331,9 mg) за **4** и 24% (102,4 mg) за **5**.

Израчунато за **1** = $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{CuN}_4\text{O}_{13}\text{S}$ ($M_r = 519,89$): C, 27,73; H, 3,10; N, 10,78. Нађено: C, 27,84; H, 2,77; N, 10,96%. IR (KBr, ν , cm^{-1}): 3421br ($\nu(\text{O-H})$), 3112w ($\nu(\text{C}_{\text{ar}}-\text{H})$), 2956w ($\nu(\text{C-H})$), 1734vs ($\nu(\text{C=O})$), 1616m, 1556m, 1501w, 1488w, 1438m ($\nu(\text{C}_{\text{ar}}=\text{C}_{\text{ar}})$ и $\nu(\text{C}_{\text{ar}}=\text{N})$), 1384s, 1330s, 1299s ($\nu_{\text{as}}(\text{NO}_3)$), 1280m ($\nu(\text{C-O})$), 795m ($\gamma(\text{C}_{\text{ar}}-\text{H})$). UV-Vis (DMSO, λ_{max} , nm): 836 ($\epsilon = 37,9 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). ESI-HRMS (CH_3CN) m/z (нађено за $[\text{Cu}+\text{L}+\text{CH}_3\text{CN}]^+$ (израчунато)): 381,9920 (381,9917). Λ_M (DMSO): $69,5 \text{ } \Omega^{-1}\text{cm}^2\text{mol}^{-1}$.

Израчунао за **2** = C₁₃H₁₄CuN₄O₁₁S ($M_r = 497,88$): C, 31,37; H, 2,84; N, 11,26. Нађено: C, 31,22; H, 3,08; N, 11,68%. IR (KBr, ν , cm⁻¹): 3368br ($\nu(\text{O-H})$), 3151w, 3026w ($\nu(\text{C}_{\text{ar}}\text{-H})$), 2963w ($\nu(\text{C-H})$), 1743s, 1730s ($\nu(\text{C=O})$), 1650w, 1614m, 1553w, 1528w, 1486m, 1457m, 1439m ($\nu(\text{C}_{\text{ar}}=\text{C}_{\text{ar}}$) и $\nu(\text{C}_{\text{ar}}=\text{N})$), 1384vs, 1342s ($\nu_{\text{as}}(\text{NO}_3)$), 1289s, 1268s ($\nu(\text{C-O})$), 768w ($\gamma(\text{C}_{\text{ar}}\text{-H})$). UV-Vis (DMSO, λ_{max} , nm): 842 ($\epsilon = 33,0 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). ESI-HRMS (CH₃CN) m/z (нађено за ([Cu+L+CH₃CN]⁺ (израчунао)): 396,0068 (396,0074). A_M (DMSO): 55,4 $\Omega^{-1}\text{cm}^2\text{mol}^{-1}$.

Израчунао за **3** = C₁₄H₁₆CuN₄O₁₂ ($M_r = 495,85$): C, 33,92; H, 3,25; N, 11,30. Нађено: C, 33,53; H, 3,32; N, 11,08%. IR (KBr, ν , cm⁻¹): 3454br ($\nu(\text{O-H})$), 3044w ($\nu(\text{C}_{\text{ar}}\text{-H})$), 2956w, 2924w, 2855w ($\nu(\text{C-H})$), 1751s, 1738vs ($\nu(\text{C=O})$), 1616m, 1565w, 1492m, 1436m ($\nu(\text{C}_{\text{ar}}=\text{C}_{\text{ar}}$) и $\nu(\text{C}_{\text{ar}}=\text{N})$), 1385vs, 1317s ($\nu_{\text{as}}(\text{NO}_3)$), 1278s, 1256s ($\nu(\text{C-O})$), 781w ($\gamma(\text{C}_{\text{ar}}\text{-H})$). UV-Vis (DMSO, λ_{max} , nm): 728 ($\epsilon = 41,9 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). ESI-HRMS (CH₃CN) m/z (нађено за ([Cu+L+CH₃CN]⁺ (израчунао)): 376,0363 (376,0353). A_M (DMSO): 54,6 $\Omega^{-1}\text{cm}^2\text{mol}^{-1}$.

Израчунао за **4** = C₂₄H₂₀Cl₄Cu₂N₄O₈S₂ ($M_r = 825,47$): C, 34,92; H, 2,44; N, 6,79. Нађено: C, 35,17; H, 2,12; N, 6,55%. IR (KBr, ν , cm⁻¹): 3108w, 3024w ($\nu(\text{C}_{\text{ar}}\text{-H})$), 2940w ($\nu(\text{C-H})$), 1737vs ($\nu(\text{C=O})$), 1615m, 1554w, 1443m, 1428m ($\nu(\text{C}_{\text{ar}}=\text{C}_{\text{ar}}$) и $\nu(\text{C}_{\text{ar}}=\text{N})$), 1296vs, 1280vs ($\nu(\text{C-O})$), 794m ($\gamma(\text{C}_{\text{ar}}\text{-H})$). UV-Vis (DMSO, λ_{max} , nm): 919 ($\epsilon = 85,3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). ESI-HRMS (CH₃CN) m/z (нађено за ([Cu+L+CH₃CN]⁺ (израчунао)): 381,9910 (381,9917). A_M (DMSO): 23,3 $\Omega^{-1}\text{cm}^2\text{mol}^{-1}$.

Израчунао за **5** = C₂₆H₂₄Cl₄Cu₂N₄O₈S₂ ($M_r = 853,49$): C, 36,59; H, 2,84; N, 6,57. Нађено: C, 36,22; H, 3,11; N, 6,84%. IR (KBr, ν , cm⁻¹): 3098w, 3076w ($\nu(\text{C}_{\text{ar}}\text{-H})$), 2951w, 2925w ($\nu(\text{C-H})$), 1729vs ($\nu(\text{C=O})$), 1614m, 1552m, 1524w, 1486w, 1452m, 1433m ($\nu(\text{C}_{\text{ar}}=\text{C}_{\text{ar}}$) и $\nu(\text{C}_{\text{ar}}=\text{N})$), 1285vs ($\nu(\text{C-O})$), 792w ($\gamma(\text{C}_{\text{ar}}\text{-H})$). UV-Vis (DMSO, λ_{max} , nm): 935 ($\epsilon = 87,9 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). ESI-HRMS (CH₃CN) m/z (нађено за ([Cu+L+CH₃CN]⁺ (израчунао)): 396,0073 (396,0079); (нађено за ([Cu+2L]⁺ (израчунао)): 647,0326 (647,0331). A_M (DMSO): 31,8 $\Omega^{-1}\text{cm}^2\text{mol}^{-1}$.

3.2.3. Синтеза комплекса **6** и **7**

У 10,0 mL етанола растворити 1,0 mmol py-2pz лиганда (273,2 mg) и тај раствор лагано уз мешање додавати раствору добијеном растварањем еквимоларне количине одговарајуће бакар(II) соли (170,5 mg CuCl₂·2H₂O за [CuCl₂(py-2pz)]₂ (**6**) и 361,7 mg Cu(CF₃SO₃)₂ за [Cu(CF₃SO₃)(H₂O)(py-2pz)]₂CF₃SO₃·2H₂O (**7**)) у 5,0 mL етанола. Суд са реакционом смешом оставити да се меша 3 h на собној температури. Кристали комплекса **6** су добијени након прекристализације талога издвојеног у реакцији у смеси метанола и воде (v/v 1 : 1). С друге стране, кристали комплекса **7** се добијају након 3 – 5 дана упаравањем матичног раствора на собној температури. Добијене кристале одвојити цеђењем и сушити на собној температури. Принос је 63% (256,8 mg) за **6** и 59% (283,9 mg) за **7**.

Израчунао за **6** = C₂₆H₂₂Cl₄Cu₂N₆O₈ ($M_r = 815,37$): C, 38,30; H, 2,72; N, 10,31. Нађено: C, 38,17; H, 2,77; N, 10,46%. IR (KBr, ν , cm⁻¹): 3085w, 3049w ($\nu(\text{C}_{\text{ar}}\text{-H})$), 2956w ($\nu(\text{C-H})$), 1749vs, 1726vs ($\nu(\text{C=O})$), 1615w, 1556m, 1438m, 1429m, 1410m, 1385m ($\nu_{\text{as}}(\text{C}_{\text{ar}}=\text{C}_{\text{ar}})$) и $\nu_{\text{as}}(\text{C}_{\text{ar}}=\text{N})$), 1306vs, 1281vs, 1270vs ($\nu(\text{C-O})$), 795m ($\gamma(\text{C}_{\text{ar}}\text{-H})$). UV-Vis (DMSO, λ_{max} , nm): 875 ($\epsilon = 1,02 \times 10^2 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). A_M (DMSO): 27,4 $\Omega^{-1}\text{cm}^2\text{mol}^{-1}$.

Израчунао за **7** = C₂₈H₂₈CuF₆N₆O₁₇S₂ ($M_r = 962,22$): C, 34,95; H, 2,93; N, 8,73. Нађено: C, 34,78; H, 3,01; N, 8,82%. IR (KBr, ν , cm⁻¹): 3475br ($\nu(\text{O-H})$), 3115w, 3093w, 3059w ($\nu(\text{C}_{\text{ar}}\text{-H})$), 2959w, 2932w ($\nu(\text{C-H})$), 1730vs ($\nu(\text{C=O})$), 1647w, 1618m, 1592w, 1560m, 1536w, 1497w, 1489w, 1440m, 1416m, 1390m ($\nu_{\text{as}}(\text{C}_{\text{ar}}=\text{C}_{\text{ar}})$) и $\nu_{\text{as}}(\text{C}_{\text{ar}}=\text{N})$), 1315s ($\nu(\text{C-O})$), 1285vs, 1255vs ($\nu_{\text{as}}(\text{SO}_3)$), 1226s ($\nu_{\text{s}}(\text{CF}_3)$), 1163s, 1107m ($\nu_{\text{as}}(\text{CF}_3)$), 1084w,

1052m, 1030s ($\nu_s(\text{SO}_3)$), 797m ($\gamma(\text{C}_{\text{ar}}\text{-H})$). UV-Vis (DMSO, λ_{max} , nm): 805 ($\epsilon = 43,8 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). A_{M} (DMSO): $84,1 \Omega^{-1}\text{cm}^2\text{mol}^{-1}$.

3.2.4. Синтеза комплекса 8 – 10

Комплекси цинка(II), $[\text{ZnCl}_2(\text{qz})_2]$ (**8**), $[\text{ZnCl}_2(1,5\text{-naph})]_n$ (**9**) и $[\text{ZnCl}_2(4,7\text{-phen})_2]$ (**10**), синтетисани су по модификованом поступку, који је раније објављен за добијање комплекса цинка(II) са фталазином.¹⁶⁶

У 5,0 mL етанола растворити 1,0 mmol ZnCl_2 (136,3 mg) и у тај раствор лагано додавати раствор добијен растварањем 2,0 mmol одговарајућег *N*-хетероцикличног лиганда (260,3 mg qz и 1,5-naph за **8** и **9**, и 360,4 mg 4,7-phen за **10**) у 5,0 mL етанола. Суд са реакционом смешом оставити да се меша 3 – 4 h на собној температури. Након тога, добијене растворе оставити у фрижидеру. Безбојни кристали комплекса **8 – 10** издвајају се након 3 – 4 дана. Добијене кристале одвојити цеђењем и сушити на ваздуху на собној температури. Принос је 77% (305,4 mg) за **8**, 62% (165,2 mg) за **9** и 68% (337,7 mg) за **10**.

Израчунато за **8** = $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{ZnCl}_2\text{N}_4$ ($M_r = 396,57$): C, 48,46; H, 3,05; N, 14,13. Нађено: C, 48,23; H, 3,14; N, 14,02%. ^1H NMR (200 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 7,79$ (ddd, $J = 8,1, 5,2, 2,9$ Hz, H6), 8,05 (m, H5 и H7), 8,18 (d, $J = 8,1$ Hz, H8), 9,31 (s, H4), 9,63 (s, H2) ppm. ^{13}C NMR (50 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 126,2$ (C8a), 127,7 (C6), 127,8 (C8), 128,1 (C7), 134,6 (C5), 149,2 (C4a), 155,0 (C4), 160,6 (C2) ppm. IR (KBr, ν , cm^{-1}): 3067w, 2925w ($\nu(\text{C}_{\text{ar}}\text{-H})$), 1622vs, 1603m, 1592s, 1574m, 1489s ($\nu(\text{C}_{\text{ar}}=\text{C}_{\text{ar}})$ и $\nu(\text{C}_{\text{ar}}=\text{N})$), 1241w, 1213m ($\nu(\text{C}_{\text{ar}}\text{-N})$), 845w, 635s ($\gamma(\text{C}_{\text{ar}}\text{-H})$). UV-Vis (DMSO, λ_{max} , nm): 304 ($\epsilon = 5,1 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). A_{M} (DMSO): $6,2 \Omega^{-1}\text{cm}^2\text{mol}^{-1}$.

Израчунато за **9** = $\text{C}_8\text{H}_6\text{ZnCl}_2\text{N}_2$ ($M_r = 266,43$): C, 36,06; H, 2,27; N, 10,51. Нађено: C, 36,17; H, 2,38; N, 10,88%. ^1H NMR (200 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 7,81$ (dd, $J = 8,5, 4,1$ Hz, H3 и H7), 8,45 (dd, $J = 8,1, 1,4$ Hz, H4 и H8), 9,02 (dd, $J = 4,1, 1,6$ Hz, H2 и H6) ppm. ^{13}C NMR (50 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 124,8$ (C3 и C7), 136,9 (C4 и C8), 143,3 (C4a и C8a), 151,3 (C2 и C6) ppm. IR (KBr, ν , cm^{-1}): 3054w, 3034w, 2992w, 2969w, 2919w ($\nu(\text{C}_{\text{ar}}\text{-H})$), 1623w, 1589w, 1514vs ($\nu(\text{C}_{\text{ar}}=\text{C}_{\text{ar}})$ и $\nu(\text{C}_{\text{ar}}=\text{N})$), 1248m, 1227s ($\nu(\text{C}_{\text{ar}}\text{-N})$), 831vs, 656m, 641s ($\gamma(\text{C}_{\text{ar}}\text{-H})$). UV-Vis (DMSO, λ_{max} , nm): 308 ($\epsilon = 9,8 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). A_{M} (DMSO): $5,9 \Omega^{-1}\text{cm}^2\text{mol}^{-1}$.

Израчунато за **10** = $\text{C}_{24}\text{H}_{16}\text{ZnCl}_2\text{N}_4$ ($M_r = 496,68$): C, 58,03; H, 3,25; N, 11,28. Нађено: C, 58,29; H, 3,08; N, 11,55%. ^1H NMR (200 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 7,79$ (dd, $J = 8,4, 4,4$ Hz, H1 и H10), 8,20 (s, H5 и H6), 9,04 (dd, $J = 4,4, 1,5$ Hz, H2 и H9), 9,32 (dd, $J = 8,4, 1,5$ Hz, H3 и H8) ppm. ^{13}C NMR (50 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 122,3$ (C1 и C10), 124,6 (C1a и C10a), 131,7 (C5 и C6, C3 и C8), 146,9 (C4a и C6a), 150,6 (C2 и C9) ppm. IR (KBr, ν , cm^{-1}): 3082w, 3056w, 3010w, 2926w ($\nu(\text{C}_{\text{ar}}\text{-H})$), 1617w, 1589m, 1579m, 1498s ($\nu(\text{C}_{\text{ar}}=\text{C}_{\text{ar}})$ и $\nu(\text{C}_{\text{ar}}=\text{N})$), 1257w, 1242w ($\nu(\text{C}_{\text{ar}}\text{-N})$), 835vs, 795s, 777m ($\gamma(\text{C}_{\text{ar}}\text{-H})$). UV-Vis (DMSO, λ_{max} , nm): 271 ($\epsilon = 4,8 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). A_{M} (DMSO): $4,4 \Omega^{-1}\text{cm}^2\text{mol}^{-1}$.

3.2.5. Синтеза комплекса 11 и 12

У 5,0 mL етанола растворити 1,0 mmol цинк(II) соли (136,3 mg ZnCl_2 за $[\text{Zn}(\text{py-2py})\text{Cl}_2]$ (**11**) и 225,2 mg ZnBr_2 за $[\text{Zn}(\text{py-2py})\text{Br}_2]$ (**12**)) и у тај раствор лагано додавати раствор добијен растварањем еквимоларне количине py-2py лиганда (272,3 mg) у 5,0 mL етанола. Суд са реакционом смешом оставити да се меша 3 h на собној температури. У току мешања долази до стварања талога беле боје, који се затим цеди и суши. Након тога, добијени талог прекристалисати у 5,0 mL ацетонитрила. Добијене растворе оставити на собној температури да се упаравају. Након 3 – 5 дана, издвајају се

безбојни кристали комплекса **11** и **12**. Добијене кристале одвојити цеђењем и сушити на ваздуху на собној температури. Принос је 61% (249,2 mg) за **11** и 55% (273,6 mg) за **12**.

Израчунао за **11** = C₁₄H₁₂ZnCl₂N₂O₄ (*M_r* = 408,53): C, 41,16; H, 2,96; N, 6,86. Нађено: C, 40,79; H, 2,79; N, 6,99%. IR (KBr, ν , cm⁻¹): 3123w, 3103w, 3067w, 3024w (ν (C_{ar}-H)), 2962w (ν (C-H)), 1742vs, 1724vs (ν (C=O)), 1616m, 1600m, 1572w, 1558m, 1497w, 1480w, 1441s, 1434s (ν (C_{ar}=C_{ar}) и ν (C_{ar}=N)), 1383s (ν _s(C=O)), 1318m, 1297m, 1277s, 1251m (ν (C-O)), 785m (γ (C_{ar}-H)). ¹H NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 3,91 (*t*, *J* = 3,0 Hz, 6H, Ar-COOCH₃), 7,62 (*d*, *J* = 0,9 Hz, 1H, H4'), 8,29 (*d*, *J* = 0,7 Hz, 1H, H5'), 8,48 (*d*, *J* = 7,8 Hz, 1H, H3'), 8,63 (*s*, 1H, H3), 9,05 (*d*, *J* = 0,7 Hz, 1H, H6), 9,14 (*s*, 1H, H6') ppm. UV-Vis (DMSO, λ_{\max} , nm): 306 (ϵ = 9,1 × 10⁴ M⁻¹cm⁻¹). *A_M* (DMSO): 5,0 Ω⁻¹cm²mol⁻¹.

Израчунао за **12** = C₁₄H₁₂ZnBr₂N₂O₄ (*M_r* = 497,45): C, 33,80; H, 2,43; N, 5,63. Нађено: C, 33,69; H, 2,52; N, 5,49%. IR (KBr, ν , cm⁻¹): 3123w, 3101w, 3066w (ν (C_{ar}-H)), 2960w, 2937w, (ν (C-H)), 1742vs, 1724vs (ν (C=O)), 1615m, 1599w, 1557w, 1495w, 1480w, 1440m, 1432w (ν (C_{ar}=C_{ar}) и ν (C_{ar}=N)), 1382m (ν _s(C=O)), 1317m, 1296w, 1275s, 1250m (ν (C-O)), 784m (γ (C_{ar}-H)). ¹H NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 3,90 (*t*, *J* = 3,8 Hz, 6H, Ar-COOCH₃), 7,61 (*d*, *J* = 7,3 Hz, 1H, H4'), 8,27 (*s*, 1H, H5'), 8,51 (*d*, *J* = 7,3 Hz, 1H, H3'), 8,66 (*s*, 1H, H3), 9,03 (*s*, 1H, H6), 9,14 (*s*, 1H, H6') ppm. UV-Vis (DMSO, λ_{\max} , nm): 300 (ϵ = 1,6 × 10⁴ M⁻¹cm⁻¹). *A_M* (DMSO): 30,1 Ω⁻¹cm²mol⁻¹.

3.2.6. Синтеза комплекса **13** – **17**

Комплекси сребра(I) са диметил-пиридин-4,5-дикарбоксилатним естрима, [Ag(NO₃)(py-2py)]_{*n*} (**13**), [Ag(NO₃)(py-2metz)]_{*n*} (**14**), [Ag(CH₃CN)(py-2py)]BF₄ (**15**), [Ag(py-2tz)₂]BF₄ (**16**) и [Ag(py-2metz)₂]BF₄ (**17**), синтетисани су по модификованом поступку за добијање сребро(I) комплекса са диазанафталенима.¹⁵²

У 5,0 mL етанола растворити 1,0 mmol сребро(I) соли (169,9 mg AgNO₃ за **13** и **14**, односно 194,7 mg AgBF₄ за **15** – **17**) и у тај раствор лагано уз мешање додавати раствор добијен растварањем еквимоларне количине одговарајућег диметил-пиридин-4,5-дикарбоксилатног естра (272,3 mg py-2py за **13** и **15**, 278,3 mg py-2tz за **16** и 292,3 mg py-2metz за **14** и **17**) у 10,0 mL етанола. Суд са реакционом смешом оставити да се меша 3 h у мраку на собној температури. Добијене растворе оставити да се лагано упаравају на собној температури. Након 2 – 3 дана, издвајају се безбојни кристали комплекса **13**, **14**, **16**, и **17**. С друге стране, кристали комплекса **15** су добијени након што је бели талог, издвојен у реакцији, растворен у 10,0 mL ацетонитрила. Добијене кристале одвојити цеђењем и сушити на собној температури у мраку. Принос је 71% (313,9 mg) за **13**, 52% (240,3 mg) за **14**, 64% (325,1 mg) за **15**, 40% (150,2 mg) за **16** и 40% (155,9 mg) за **17**.

Израчунао за **13** = C₁₄H₁₂AgN₃O₇ (*M_r* = 442,13): C, 38,04; H, 2,74; N, 9,51. Нађено: C, 37,70; H, 2,54; N, 9,36%. IR (KBr, ν , cm⁻¹): 3102w, 3014w (ν (C_{ar}-H)), 2954w, 2850w (ν (C-H)), 1745vs, 1726vs (ν (C=O)), 1600w, 1592w, 1575w, 1559w, 1432s (ν (C_{ar}=C_{ar})) и (ν (C_{ar}=N)), 1370vs (ν _{as}(NO₃)), 1299vs, 1263vs (ν (C-O)), 785s (γ (C_{ar}-H)). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 3,92 (*d*, *J* = 7,7 Hz, 6H, Ar-COOCH₃), 7,61 (*ddd*, *J* = 7,6, 4,8, 1,2 Hz, 1H, H4'), 8,06 (*td*, *J* = 7,8, 1,8 Hz, 1H, H5'), 8,49 (*dt*, *J* = 8,0, 1,1 Hz, 1H, H3'), 8,63 (*d*, *J* = 0,8 Hz, 1H, H3), 8,78 (*ddd*, *J* = 4,8, 1,8, 0,9 Hz, 1H, H6), 9,14 (*d*, *J* = 0,8 Hz, 1H, H6') ppm. UV-Vis (DMSO, λ_{\max} , nm): 300 (ϵ = 1,0 × 10⁴ M⁻¹cm⁻¹). ESI-HRMS (CH₃CN) *m/z* (нађено за ([M+CH₃CN-NO₃]⁺) (израчунао)): 420,0110 (420,0108). *A_M* (DMSO): 22,2 Ω⁻¹cm²mol⁻¹.

Израчунао за **14** = C₁₃H₁₂AgN₃O₇S (*M_r* = 462,18): C, 33,79; H, 2,62; N, 9,09. Нађено: C, 33,89; H, 2,54; N, 8,97%. IR (KBr, ν , cm⁻¹): 3098m (ν (C_{ar}-H)), 2956w,

2925w ($\nu(\text{C-H})$), 1737vs, 1716vs ($\nu(\text{C=O})$), 1589w, 1553m, 1517w, 1487w, 1447m, 1439m, 1426w ($\nu(\text{C}_{\text{ar}}=\text{C}_{\text{ar}})$) и ($\nu(\text{C}_{\text{ar}}=\text{N})$), 1384vs, 1312s ($\nu_{\text{as}}(\text{NO}_3)$), 1297s, 1274s ($\nu(\text{C-O})$), 771m ($\gamma(\text{C}_{\text{ar}}-\text{H})$). $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 2,49$ (d , $J = 1,0$ Hz, 3H, CH_3), 3,90 (d , $J = 8,8$ Hz, 6H, Ar-COOCH₃), 7,62 (d , $J = 1,1$ Hz, 1H, H5'), 8,30 (d , $J = 0,8$ Hz, 1H, H3), 9,05 (d , $J = 0,8$ Hz, 1H, H6) ppm. UV-Vis (DMSO, λ_{max} , nm): 337 ($\epsilon = 1,2 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). ESI-HRMS (CH_3CN) m/z Није детектован сигнал. A_M (DMSO): $24,2 \Omega^{-1}\text{cm}^2\text{mol}^{-1}$.

Израчунао за **15** = $\text{C}_{32}\text{H}_{30}\text{Ag}_2\text{B}_2\text{F}_8\text{N}_6\text{O}_8$ ($M_r = 1015,98$): C, 37,83; H, 2,98; N, 8,27. Нађено: C, 37,68; H, 2,93; N, 8,19%. IR (KBr, ν , cm^{-1}): 3120w ($\nu(\text{C}_{\text{ar}}-\text{H})$), 2961w, 2852w ($\nu(\text{C-H})$), 2136br ($\nu(\text{C}\equiv\text{N})$), 1727vs ($\nu(\text{C=O})$), 1604m, 1575w, 1557w, 1436s ($\nu(\text{C}_{\text{ar}}=\text{C}_{\text{ar}})$) и ($\nu(\text{C}_{\text{ar}}=\text{N})$), 1376m ($\delta(\text{CH}_3)$), 1298s, 1273s ($\nu(\text{C-O})$), 1056vs ($\nu(\text{BF}_4)$), 783m ($\gamma(\text{C}_{\text{ar}}-\text{H})$). $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 2,08$ (s , 3H, CH_3CN), 3,92 (d , $J = 7,6$ Hz, 6H, Ar-COOCH₃), 7,61 (ddd , $J = 7,6, 4,8, 1,2$ Hz, 1H, H4'), 8,07 (td , $J = 7,7, 1,8$ Hz, 1H, H5'), 8,49 (dt , $J = 7,9, 1,1$ Hz, 1H, H3'), 8,64 (d , $J = 0,8$ Hz, 1H, H3), 8,78 (ddd , $J = 4,7, 1,8, 1,0$ Hz, 1H, H6), 9,14 (d , $J = 0,8$ Hz, 1H, H6') ppm. UV-Vis (DMSO, λ_{max} , nm): 300 ($\epsilon = 1,9 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). ESI-HRMS (CH_3CN) m/z (нађено за $([\text{M}-\text{BF}_4]^+)$ (израчунао)): 420,0107 (420,0108). A_M (DMSO): $41,0 \Omega^{-1}\text{cm}^2\text{mol}^{-1}$.

Израчунао за **16** = $\text{C}_{24}\text{H}_{20}\text{AgN}_4\text{O}_8\text{S}_2\text{BF}_4$ ($M_r = 751,24$): C, 38,37; H, 2,68; N, 7,46. Нађено: C, 38,22; H, 2,61; N, 7,53%. IR (KBr, ν , cm^{-1}): 3138w ($\nu(\text{C}_{\text{ar}}-\text{H})$), 2926m ($\nu(\text{C-H})$), 1725vs ($\nu(\text{C=O})$), 1602m, 1551w, 1442m, 1414w ($\nu(\text{C}_{\text{ar}}=\text{C}_{\text{ar}})$) и ($\nu(\text{C}_{\text{ar}}=\text{N})$), 1296s, 1266m ($\nu(\text{C-O})$), 1088vs, 1033vs ($\nu(\text{BF}_4)$), 765m ($\gamma(\text{C}_{\text{ar}}-\text{H})$). $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 3,91$ (d , $J = 7,8$ Hz, 6H, Ar-COOCH₃), 8,06 (d , $J = 3,1$ Hz, 1H, H5'), 8,12 (d , $J = 3,1$ Hz, 1H, H4'), 8,34 (d , $J = 0,8$ Hz, 1H, H3), 9,07 (d , $J = 0,8$ Hz, 1H, H6) ppm. UV-Vis (DMSO, λ_{max} , nm): 326 ($\epsilon = 5,4 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). ESI-HRMS (CH_3CN) m/z (нађено за $([\text{M}-\text{BF}_4]^+)$ (израчунао)): 662,9766 (662,9768); (нађено за $([\text{Ag}+\text{NN}+\text{MeCN}]^+)$ (израчунао)): 425,9668 (425,9672); (нађено за $([\text{Ag}+\text{NN}]^+)$ (израчунао)): 384,9403 (384,9407). A_M (DMSO): $22,4 \Omega^{-1}\text{cm}^2\text{mol}^{-1}$.

Израчунао за **17** = $\text{C}_{26}\text{H}_{24}\text{AgN}_4\text{O}_8\text{S}_2\text{BF}_4$ ($M_r = 779,29$): C, 40,07; H, 3,11; N, 7,19. Нађено: C, 39,96; H, 2,79; N, 7,12%. IR (KBr, ν , cm^{-1}): 3175w, 3120m, 3020w ($\nu(\text{C}_{\text{ar}}-\text{H})$), 2956w, 2939w, 2856w ($\nu(\text{C-H})$), 1742vs, 1728vs ($\nu(\text{C=O})$), 1600m, 1556m, 1516w, 1483w, 1444s ($\nu(\text{C}_{\text{ar}}=\text{C}_{\text{ar}})$) и ($\nu(\text{C}_{\text{ar}}=\text{N})$), 1343m ($\delta(\text{CH}_3)$), 1299vs, 1283vs ($\nu(\text{C-O})$), 1084vs, 1061vs, 1037vs ($\nu(\text{BF}_4)$), 796m ($\gamma(\text{C}_{\text{ar}}-\text{H})$). $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 2,48$ (d , $J = 1,0$ Hz, 3H, CH_3), 3,90 (d , $J = 9,0$ Hz, 6H, Ar-COOCH₃), 7,62 (d , $J = 1,1$ Hz, 1H, H5'), 8,29 (d , $J = 0,8$ Hz, 1H, H3), 9,05 (d , $J = 0,8$ Hz, 1H, H6) ppm. UV-Vis (DMSO, λ_{max} , nm): 337 ($\epsilon = 2,9 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). ESI-HRMS (CH_3CN) m/z (нађено за $([\text{M}+\text{H}]^+)$ (израчунао)): 691,0086 (691,0081). A_M (DMSO): $29,7 \Omega^{-1}\text{cm}^2\text{mol}^{-1}$.

3.2.7. Синтеза комплекса **18** и **19**

У 10,0 mL етанола растворити 1,0 mmol (273,2 mg) ру-2рз лиганда и раствор лагано уз мешање додавати раствору добијеном растварањем еквимоларне количине одговарајуће сребро(I) соли (252,8 mg AgPF₆ за **18** и 169,8 mg AgNO₃ за **19**) у 5,0 mL етанола. Суд са реакционом смешом оставити да се меша 3 h на собној температури у одсуству светлости. Кристали комплекса **18** се издвајају након прекристализације издвојеног талога у ацетону, док су кристали комплекса **19** добијени упаравањем матичног раствора на собној температури у мраку. Добијене кристале одвојити цеђењем и сушити на собној температури. Принос је 71% (283,8 mg) за **18** и 57% (252,6 mg) за **19**.

Израчунато за **18** = C₂₆H₂₂AgN₆F₆O₈P ($M_r = 799,33$): C, 39,07; H, 2,77; N, 10,51. Нађено: C, 39,25; H, 2,72; N, 10,58%. IR (KBr, ν , cm⁻¹): 3109w (ν (C_{ar}-H)), 2963w, 2932w (ν (C-H)), 1733vs (ν (C=O)), 1607m, 1562w, 1552w, 1489w, 1441m, 1412w, 1375w (ν_{as} (C_{ar}=C_{ar}) и ν_{as} (C_{ar}=N)), 1314s, 1301s, 1279s, 1250m (ν (C-O)), 839vs (ν (P-F)), 796m (γ (C_{ar}-H)). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 3,92$ (*d*, $J = 6,1$ Hz, 6H, Ar-COOCH₃), 8,58 (*d*, $J = 0,6$ Hz, 1H, H5), 8,84 (*m*, 2H, H5' и H6'), 9,17 (*d*, $J = 0,7$ Hz, 1H, H2), 9,60 (*d*, $J = 0,9$ Hz, 1H, H3') ppm. UV-Vis (DMSO, λ_{max} , nm): 296 ($\epsilon = 3,3 \times 10^4$ M⁻¹cm⁻¹). A_M (DMSO): 30,9 Ω^{-1} cm²mol⁻¹.

Израчунато за **19** = C₁₃H₁₂AgN₄O_{7,5} ($M_r = 452,14$): C, 34,53; H, 2,68; N, 12,39. Нађено: C, 34,72; H, 2,58; N, 12,46%. IR (KBr, ν , cm⁻¹): 3072w, 3034w, 3009w (ν (C_{ar}-H)), 2957m, 2929m (ν (C-H)), 1733vs, 1720vs (ν (C=O)), 1660w, 1636w, 1623w, 1598m, 1556m, 1439m (ν_{as} (C_{ar}=C_{ar}) и ν_{as} (C_{ar}=N)), 1384s, 1368s (ν_{as} (NO₃)), 1332s, 1315m, 1291vs, 1280vs, 1263s (ν (C-O)), 798m (γ (C_{ar}-H)). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 3,92$ (*d*, $J = 6,1$ Hz, 6H, Ar-COOCH₃), 8,58 (*d*, $J = 0,6$ Hz, 1H, H5), 8,84 (*s*, 2H, H5' и H6'), 9,18 (*d*, $J = 0,6$ Hz, 1H, H2), 9,60 (*d*, $J = 2,6$ Hz, 1H, H3') ppm. UV-Vis (DMSO, λ_{max} , nm): 296 ($\epsilon = 1,6 \times 10^4$ M⁻¹cm⁻¹). A_M (DMSO): 37,6 Ω^{-1} cm²mol⁻¹.

3.3. Кристалографски подаци и рендгенска структурна анализа

3.3.1. Основни кристалографски подаци и рендгенска структурна анализа комплекса 1 – 5

За анализу рендгенске структуре, монокристали [Cu(NO₃)(py-2tz)(H₂O)₃]NO₃ (**1**), [Cu(NO₃)₂(py-2metz)(H₂O)] (**2**), [Cu(NO₃)₂(py-2py)(H₂O)]·H₂O (**3**), [CuCl₂(py-2tz)]₂ (**4**) и [CuCl₂(py-2metz)]_n (**5**) комплекса су премазани силиконском машћу, постављени на врх стаклене игле и пренети на главу гониометра у течном азоту на 150(2) K. Снимања су вршена помоћу SuperNova дифрактометра опремљеним са Atlas детектором користећи CrysAlis софтвер, или применом монохроматског Mo K α ($\lambda = 0,71073$ Å), односно Cu K α зрачења ($\lambda = 1,54184$ Å).¹⁶⁷ Структуре су решене у Olex2 графичком програму¹⁶⁸ применом директних метода коришћењем SHELXT програма, док је утачњавање извршено применом методе најмањих квадрата на бази F² коришћењем SHELXL програма.^{168,169} Сви атоми тежи од водоника су утачњавани анизотропно. Положаји атома водоника су израчунати на стандарним растојањима и утачњавани применом „riding” модела. Координате за атоме водоника у води су израчунате на основу разлика Фуријеове (*Fourier*) мапе, и даље утачњавани применом ограничења одговарајућих растојања. За представљање кристалних структура коришћен је MERCURY програм.¹⁷⁰ Подаци о експерименталним мерењима, резултати рендгенске структурне анализе и други релевантни подаци за дате комплексе су приказани у табели 5.

Табела 5. Подаци о експерименталним мерењима, резултати рендгенске структурне анализе и други релевантни подаци за кристале комплекса **1 – 5**

	1	2
Емпиријска формула	C ₁₂ H ₁₆ CuN ₄ O ₁₃ S	C ₁₃ H ₁₄ CuN ₄ O ₁₁ S
Моларна маса (g/mol)	519,89	497,88
Температура (К)	150(2)	150(2)
Кристални систем	триклинични	моноклинични
Просторна група	<i>P</i> 1	<i>P</i> 2 ₁ / <i>c</i>
Параметри јединичне ћелије		
<i>a</i> (Å)	7,8810(3)	9,1313(6)
<i>b</i> (Å)	12,4005(4)	24,6456(11)
<i>c</i> (Å)	20,9376(6)	8,5875(5)
α (°)	79,593(3)	90
β (°)	88,991(2)	106,946(7)
γ (°)	88,486(3)	90
<i>V</i> (Å ³)	2011,66(12)	1848,67(19)
<i>Z</i>	4	4
ρ (g/cm ³)	1,717	1,789
μ (mm ⁻¹)	1,265	1,364
<i>F</i> (000)	1060	1012
Димензије кристала (mm ³)	0,5 × 0,3 × 0,05	0,35 × 0,10 × 0,10
Извор зрачења (Å)	Мо К α ($\lambda = 0,71073$)	Мо К α ($\lambda = 0,71073$)
2 Θ опсег за прикупљене податке (°)	4,696 – 60,912	5,228 – 60,76
Опсег индекса	-11 ≤ <i>h</i> ≤ 11, -17 ≤ <i>k</i> ≤ 17, -29 ≤ <i>l</i> ≤ 29	-6 ≤ <i>h</i> ≤ 12, -34 ≤ <i>k</i> ≤ 21, -12 ≤ <i>l</i> ≤ 9
Број прикупљених рефлексија	25294	10122
Број независних рефлексија	10742	4849
Подаци/ограничења/параметри	[<i>R</i> _{int} = 0,0300, <i>R</i> _{sigma} = 0,0389]	[<i>R</i> _{int} = 0,0299, <i>R</i> _{sigma} = 0,0521]
Метода утачавања структуре	Метода најмањих квадрата на бази <i>F</i> ² (пуна матрица)	
Коначни <i>R</i> индекси [<i>I</i> > 2 σ (<i>I</i>)]	<i>R</i> ₁ = 0,0378, <i>wR</i> ₂ = 0,0961	<i>R</i> ₁ = 0,0382, <i>wR</i> ₂ = 0,0769
Коначни <i>R</i> индекси [сви подаци]	<i>R</i> ₁ = 0,0473, <i>wR</i> ₂ = 0,1029	<i>R</i> ₁ = 0,0556, <i>wR</i> ₂ = 0,0846
$\Delta\rho_{\max}$ (e/Å ³)	1,135	0,484
$\Delta\rho_{\min}$ (e/Å ³)	-0,872	-0,463

	3	4
Емпиријска формула	$C_{14}H_{16}CuN_4O_{12}$	$C_{24}H_{20}Cl_4Cu_2N_4O_8S_2$
Моларна маса (g/mol)	495,85	825,44
Температура (K)	150(2)	150(2)
Кристалини систем	моноклинични	триклинични
Просторна група	Cc	P1
Параметри јединичне ћелије		
a (Å)	10,3255(6)	7,7848(5)
b (Å)	22,7235(11)	9,0261(6)
c (Å)	8,0546(5)	11,9040(5)
α (°)	90	101,778(4)
β (°)	101,849(6)	100,435(4)
γ (°)	90	109,621(6)
V (Å ³)	1849,59(19)	742,48(8)
Z	4	1
ρ (g/cm ³)	1,781	1,846
μ (mm ⁻¹)	1,259	6,887
$F(000)$	1012	414
Димензије кристала (mm ³)	0,30 × 0,05 × 0,05	0,15 × 0,10 × 0,02
Извор зрачења (Å)	Mo K α ($\lambda = 0,71073$)	Cu K α ($\lambda = 1,54184$)
2 θ опсег за прикупљене податке (°)	6,134 – 60,586	7,882 – 150,492
Опсег индекса	-14 ≤ h ≤ 9, -32 ≤ k ≤ 21, -11 ≤ l ≤ 11	-9 ≤ h ≤ 9, -11 ≤ k ≤ 10, -14 ≤ l ≤ 12
Број прикупљених рефлексија	5050	7240
Број независних рефлексија	3279	3047
Подаци/ограничења/параметри	[R _{int} = 0,0284, R _{sigma} = 0,0494]	[R _{int} = 0,0347, R _{sigma} = 0,0420]
Метода утачавања структуре	Метода најмањих квадрата на бази F ² (пуна матрица)	
Коначни R индекси [I > 2σ(I)]	R ₁ = 0,0336, wR ₂ = 0,0714	R ₁ = 0,0400, wR ₂ = 0,1044
Коначни R индекси [сви подаци]	R ₁ = 0,0391, wR ₂ = 0,0745	R ₁ = 0,0465, wR ₂ = 0,1108
$\Delta\rho_{\max}$ (e/Å ³)	0,501	0,772
$\Delta\rho_{\min}$ (e/Å ³)	-0,369	-0,835

5	
Емпиријска формула	$C_{26}H_{24}Cl_4Cu_2N_4O_8S_2$
Моларна маса (g/mol)	853,49
Температура (К)	150(2)
Кристални систем	моноклинични
Просторна група	$P2_1/c$
Параметри јединичне ћелије	
a (Å)	12,0032(7)
b (Å)	17,3134(8)
c (Å)	7,6901(4)
β (°)	99,719(5)
V (Å ³)	1575,19(14)
Z	2
ρ (g/cm ³)	1,799
μ (mm ⁻¹)	1,878
$F(000)$	860
Димензије кристала (mm ³)	0,1 × 0,1 × 0,05
Извор зрачења (Å)	Mo K α ($\lambda = 0,71073$)
2 Θ опсег за прикупљене податке (°)	4,706 – 54,962
Опсег индекса	-15 ≤ h ≤ 11, -22 ≤ k ≤ 22, -9 ≤ l ≤ 9
Број прикупљених рефлексија	8104
Број независних рефлексија	3608
Подаци/ограничења/параметри	[$R_{int} = 0,0277$, $R_{sigma} = 0,0374$] 3608/0/211
Метода утачњавања структуре	Метода најмањих квадрата на бази F^2 (пуна матрица)
Коначни R индекси [$I > 2\sigma(I)$]	$R_1 = 0,0315$, $wR_2 = 0,0732$
Коначни R индекси [сви подаци]	$R_1 = 0,0400$, $wR_2 = 0,0787$
$\Delta\rho_{max}$ (e/Å ³)	0,55
$\Delta\rho_{min}$ (e/Å ³)	-0,46

3.3.2. Основни кристалографски подаци и рендгенска структурна анализа комплекса **6** и **7**

Рендгенска структурна анализа за кристале комплекса $[CuCl_2(py-2pz)]_2$ (**6**) и $[Cu(CF_3SO_3)(H_2O)(py-2pz)_2]CF_3SO_3 \cdot 2H_2O$ (**7**) урађена је на 150(2) К помоћу Oxford Diffraction SuperNova дифрактометра. Структуре су решене у Olex² графичком програму¹⁶⁸ применом директних метода коришћењем SHELXT програма, док је утачњавање извршено применом методе најмањих квадрата на бази F^2 коришћењем SHELXL програма.¹⁶⁹ Сви атоми тежи од водоника су утачњавани анизотропно. Положаји атома водоника су израчунати на стандардним растојањима и утачњавани применом „riding” модела. Резултати рендгенске структурне анализе и други релевантни подаци за комплексе **6** и **7** су приказани у табели 6.

Табела 6. Подаци о експерименталним мерењима, резултати рендгенске структурне анализе и други релевантни подаци за кристале комплекса **6** и **7**

	6	7 (растварач)	7 (трифлат)
Емпиријска формула	C ₂₆ H ₂₂ Cl ₄ Cu ₂ N ₆ O ₈	C ₂₇ H ₂₆ CuF ₃ N ₆ O ₁₃ S	C ₂₈ H ₂₈ CuF ₆ N ₆ O ₁₇ S ₂
Моларна маса (g/mol)	815,37	795,14	962,22
Температура (К)	149,5(8)	150,05(10)	150,05(10)
Кристални систем	триклинични	триклинични	триклинични
Просторна група	<i>P</i> $\bar{1}$	<i>P</i> $\bar{1}$	<i>P</i> $\bar{1}$
Параметри јединичне ћелије			
<i>a</i> (Å)	7,7916(6)	8,2856(3)	8,2856(3)
<i>b</i> (Å)	8,9848(6)	12,1191(5)	12,1191(5)
<i>c</i> (Å)	11,9955(7)	19,2393(6)	19,2393(6)
α (°)	104,394(6)	82,105(3)	82,105(3)
β (°)	106,396(6)	86,220(3)	86,220(3)
γ (°)	104,368(6)	77,071(3)	77,071(3)
<i>V</i> (Å ³)	733,10(9)	1863,83(12)	1863,83(12)
<i>Z</i>	1	2	2
ρ (g/cm ³)	1,847	1,417	1,715
μ (mm ⁻¹)	1,877	0,723	0,812
<i>F</i> (000)	410	812	978
Димензије кристала (mm ³)	0,2 × 0,05 × 0,05	0,2 × 0,15 × 0,1	0,2 × 0,15 × 0,1
Извор зрачења (Å)	Мо К α ($\lambda = 0,71073$)	Мо К α ($\lambda = 0,71073$)	Мо К α ($\lambda = 0,71073$)
2 Θ опсег за прикупљене податке (°)	4,982 – 54,952	5,162 – 58,918	5,162 – 58,918
Опсег индекса	-10 ≤ <i>h</i> ≤ 10, -11 ≤ <i>k</i> ≤ 11, -15 ≤ <i>l</i> ≤ 11	-10 ≤ <i>h</i> ≤ 11, -15 ≤ <i>k</i> ≤ 15, -26 ≤ <i>l</i> ≤ 25	-10 ≤ <i>h</i> ≤ 11, -15 ≤ <i>k</i> ≤ 15, -26 ≤ <i>l</i> ≤ 25
Број прикупљених рефлексија	6360	14431	14431
Број независних рефлексија	3355	8653	8653
Подаци/ограничења/параметри	[<i>R</i> _{int} = 0,0270, <i>R</i> _{sigma} = 0,0520]	[<i>R</i> _{int} = 0,0272, <i>R</i> _{sigma} = 0,0516]	[<i>R</i> _{int} = 0,0272, <i>R</i> _{sigma} = 0,0516]
Метода утачњавања структуре	3355/0/210	8653/0/468	8653/0/534
Метода најмањих квадрата на бази <i>F</i> ² (пуна матрица)			
Коначни <i>R</i> индекси [<i>I</i> > 2 σ (<i>I</i>)]	<i>R</i> ₁ = 0,0339, <i>wR</i> ₂ = 0,0676	<i>R</i> ₁ = 0,0390, <i>wR</i> ₂ = 0,0861	<i>R</i> ₁ = 0,1091, <i>wR</i> ₂ = 0,2941
Коначни <i>R</i> индекси [сви подаци]	<i>R</i> ₁ = 0,0457, <i>wR</i> ₂ = 0,0748	<i>R</i> ₁ = 0,0508, <i>wR</i> ₂ = 0,0916	<i>R</i> ₁ = 0,1249, <i>wR</i> ₂ = 0,3109
$\Delta\rho_{\max}$ (e/Å ³)	0,41	0,40	9,72
$\Delta\rho_{\min}$ (e/Å ³)	-0,42	-0,43	-2,38

3.3.3. Основни кристалографски подаци и рендгенска структурна анализа комплекса **8** – **10**

Рендгенска структурна анализа комплекса [ZnCl₂(qz)₂] (**8**), [ZnCl₂(1,5-naph)]_{*n*} (**9**) и [ZnCl₂(4,7-phen)₂] (**10**) вршена је применом Мо К α радијације ($\lambda = 0,71073$ Å) помоћу Xcalibur карпа-геометри дифрактометра користећи CrysAlisPro софтвер.¹⁷¹ Структуре су решене применом директних метода коришћењем SHELXT програма, док је утачњавање извршено применом методе најмањих квадрата на бази *F*² коришћењем SHELXL из SHELXL-2014 пакета.^{172,173} Вредности интензитета су кориговане за ефекте апсорпције. Сви атоми тежи од водоника су утачњавани анизотропно. Атоми водоника који су везани за атоме угљеника су позиционирани на израчунатим растојањима (ароматични C–H = 0,93 Å). Приликом утачњавања, вредности изотропских фактора за

атома водоника су 20% веће у односу на вредности изотропских фактора одговарајућег атома угљеника. Положаји атома водоника су утачњавани применом „riding” модела. За представљање кристалних структура коришћен је MERCURY програм.¹⁷⁰ Резултати рендгенске структурне анализе и други релевантни подаци за комплексе **8** – **10** су приказани у табели 7.

Табела 7. Подаци о експерименталним мерењима, резултати рендгенске структурне анализе и други релевантни подаци за комплексе **8** – **10**

	8	9	10
Емпиријска формула	C ₁₆ H ₁₂ ZnCl ₂ N ₄	[ZnCl ₂ (C ₈ H ₆ N ₂) _n] _n	C ₂₄ H ₁₆ ZnCl ₂ N ₄
Моларна маса (g/mol)	396,57	266,43	496,68
Кристални систем	моноклинични	моноклинични	моноклинични
Просторна група	<i>P</i> 2 ₁ / <i>n</i>	<i>C</i> 2/ <i>c</i>	<i>P</i> 2 ₁ / <i>c</i>
Параметри јединичне ћелије			
<i>a</i> (Å)	5,3347(2)	6,8667(4)	10,7857(2)
<i>b</i> (Å)	11,8360(3)	11,6886(3)	15,2011(2)
<i>c</i> (Å)	26,2989(8)	11,7981(4)	12,8570(2)
β (°)	90,930(3)	102,445(4)	90,710(2)
<i>V</i> (Å ³)	1660,33(9)	924,69(7)	2107,80(6)
<i>Z</i>	4	4	4
ρ (g/cm ³)	1,586	1,914	1,565
μ (mm ⁻¹)	1,80	3,18	1,44
Димензије кристала (mm)	0,40 × 0,10 × 0,03	0,37 × 0,01 × 0,01	0,50 × 0,20 × 0,08
<i>T</i> _{min}	0,972	0,952	0,685
<i>T</i> _{max}	1,000	1,000	1,000
Број измерених рефлексија	6042	12919	44087
Број независних рефлексија	2930	1121	3710
Број употребљених рефлексија [<i>I</i> > 2σ(<i>I</i>)]	2254	871	3179
<i>R</i> _{int}	0,025	0,052	0,032
(<i>sin</i> θ/λ) _{max} (Å ⁻¹)	0,595	0,676	0,595
<i>R</i> [<i>F</i> ² > 2σ(<i>F</i> ²)]	0,039	0,049	0,026
<i>wR</i> (<i>F</i> ²)	0,084	0,112	0,065
<i>S</i>	1,04	1,04	1,03
Број рефлексија	2930	1121	3710
Број параметара	208	60	280
Δρ _{max} (e/Å ³)	0,42	1,08	0,23
Δρ _{min} (e/Å ³)	-0,27	-0,29	-0,25

3.3.4. Основни кристалографски подаци и рендгенска структурна анализа комплекса **11** и **12**

Рендгенска структурна анализа за кристале комплекса [Zn(пу-2пу)Cl₂] (**11**) и [Zn(пу-2пу)Br₂] (**12**) вршена је на 150 К помоћу SuperNova дифрактометра, који је опремљен Atlas детектором, а подаци су обрађивани применом CrysAlis софтвера (верзија 1.171.40.68a).¹⁷⁴ Структуре су решене у Olex2 графичком програму применом директних метода коришћењем SHELXT програма.¹⁶⁸ Сви атоми тежи од водоника су утачњавани анизотропно применом методе најмањих квадрата на бази *F*² коришћењем

Olex2 или SHELXL-2018/3 програма.^{168,175} Положаји водоникових атома су израчунати на стандардним растојањима и утачњавани применом „riding” модела. За представљање кристалних структура коришћен је MERCURY програм.¹⁷⁰ Подаци о експерименталним мерењима, резултати рендгенске структурне анализе и други релевантни подаци за комплексе **11** и **12** су приказани у табели 8.

Табела 8. Подаци о експерименталним мерењима, резултати рендгенске структурне анализе и други релевантни подаци за комплексе **11** и **12**

	11	12
Емпиријска формула	C ₁₄ H ₁₂ Cl ₂ N ₂ O ₄ Zn	C ₁₄ H ₁₂ Br ₂ N ₂ O ₄ Zn
Моларна маса (g/mol)	408,53	497,45
Температура (К)	150(10)	150(10)
Кристални систем	моноклинични	моноклинични
Просторна група	<i>I2/a</i>	<i>I2/a</i>
Параметри јединичне ћелије		
<i>a</i> (Å)	16,9633(5)	17,3072(6)
<i>b</i> (Å)	5,1483(2)	5,1940(2)
<i>c</i> (Å)	35,7066(9)	36,0564(12)
β (°)	90,557(2)	90,665(3)
<i>V</i> (Å ³)	3118,19(17)	3241,0(2)
<i>Z</i>	8	8
ρ (g/cm ³)	1,740	2,039
μ (mm ⁻¹)	1,938	6,467
<i>F</i> (000)	1648	1936
Димензије кристала (mm ³)	0,5 × 0,5 × 0,3	0,3 × 0,3 × 0,03
Извор зрачења (Å)	Мо K α (λ = 0,71073)	Мо K α (λ = 0,71073)
2 θ опсег за прикупљене податке (°)	5,338 – 54,964	4,708 – 58,68
Опсег индекса	-22 ≤ <i>h</i> ≤ 20, -6 ≤ <i>k</i> ≤ 5, -45 ≤ <i>l</i> ≤ 46	-23 ≤ <i>h</i> ≤ 16, -5 ≤ <i>k</i> ≤ 6, -49 ≤ <i>l</i> ≤ 47
Број прикупљених рефлексија	10560	10656
Број независних рефлексија	3569	3881
Подаци/ограничења/параметри	[R _{int} = 0,0187, R _{sigma} = 0,0185]	[R _{int} = 0,0542, R _{sigma} = 0,0543]
Метода утачњавања структуре	Метода најмањих квадрата на бази F ² (пуна матрица)	
Коначни R индекси [<i>I</i> > 2 σ (<i>I</i>)]	R ₁ = 0,0216, wR ₂ = 0,0559	R ₁ = 0,0383, wR ₂ = 0,0879
Коначни R индекси [сви подаци]	R ₁ = 0,0240, wR ₂ = 0,0570	R ₁ = 0,0522, wR ₂ = 0,0955
$\Delta\rho_{\max}$ (e/Å ³)	0,36	0,98
$\Delta\rho_{\min}$ (e/Å ³)	-0,24	-0,73

3.3.5. Основни кристалографски подаци и рендгенска структурна анализа комплекса **13** – **17**

Рендгенско-структурно испитивање комплекса [Ag(NO₃)(py-2py)]_n (**13**), [Ag(NO₃)(py-2metz)]_n (**14**), [Ag(CH₃CN)(py-2py)]BF₄ (**15**), [Ag(py-2tz)₂]BF₄ (**16**) и [Ag(py-2metz)₂]BF₄ (**17**) вршено је на 150 К помоћу Oxford Diffraction SuperNova дифрактометра. Структуре су решене у Olex² графичком програму¹⁶⁸ применом директних метода коришћењем SHELXT програма, док је утачњавање извршено

применом методе најмањих квадрата на бази F^2 коришћењем SHELXL програма.¹⁶⁹ Сви атоми тежи од водоника су утачњавани анизотропно. Положаји водоникових атома су израчунати на стандарним растојањима и утачњавани применом „riding” модела. Резултати рендгенске структурне анализе за комплексе **13** – **17** су приказани у табели 9.

Табела 9. Подаци о експерименталним мерењима, резултати рендгенске структурне анализе и други релевантни подаци за комплексе **13** – **17**

	13	14
Емпиријска формула	$C_{14}H_{12}AgN_3O_7$	$C_{13}H_{12}AgN_3O_7S$
Моларна маса (g/mol)	442,14	462,19
Температура (К)	150(10)	150(10)
Кристални систем	моноклинични	моноклинични
Просторна група	$P2_1/c$	$P2_1/c$
Параметри јединичне ћелије		
a (Å)	12,3460(6)	11,8454(6)
b (Å)	7,4026(4)	7,2758(4)
c (Å)	16,9382(7)	18,8865(10)
β (°)	104,169(4)	107,701(5)
V (Å ³)	1500,93(13)	1550,67(15)
Z	4	4
ρ (g/cm ³)	1,957	1,980
μ (mm ⁻¹)	1,390	1,479
F (000)	880	920
Димензије кристала (mm ³)	$0,1 \times 0,1 \times 0,03$	$0,2 \times 0,1 \times 0,1$
Извор зрачења (Å)	Mo K α ($\lambda = 0,71073$)	Mo K α ($\lambda = 0,71073$)
2θ опсег за прикупљене податке (°)	5,284 – 54,968	4,858 – 54,962
Опсег индекса	$-16 \leq h \leq 13,$ $-9 \leq k \leq 6,$ $-19 \leq l \leq 21$	$-15 \leq h \leq 11,$ $-9 \leq k \leq 6,$ $-24 \leq l \leq 24$
Број прикупљених рефлексија	7600	7288
Број независних рефлексија	3438	3560
Подаци/ограничења/параметри	[$R_{int} = 0,0261, R_{sigma} = 0,0381$]	[$R_{int} = 0,0275, R_{sigma} = 0,0400$]
Метода утачњавања структуре	Метода најмањих квадрата на бази F^2 (пуна матрица)	
Коначни R индекси [$I > 2\sigma(I)$]	$R_1 = 0,0292, wR_2 = 0,0620$	$R_1 = 0,0297, wR_2 = 0,0707$
Коначни R индекси [сви подаци]	$R_1 = 0,0400, wR_2 = 0,0694$	$R_1 = 0,0382, wR_2 = 0,0773$
$\Delta\rho_{max}$ (e/Å ³)	0,41	0,44
$\Delta\rho_{min}$ (e/Å ³)	-0,66	-1,08

	15	16	17
Емпиријска формула	C ₃₂ H ₃₀ Ag ₂ B ₂ F ₈ N ₆ O ₈	C ₂₄ H ₂₀ AgN ₄ O ₈ S ₂ BF ₄	C ₂₆ H ₂₄ AgN ₄ O ₈ S ₂ BF ₄
Моларна маса (g/mol)	1015,98	751,24	779,29
Температура (К)	150(10)	150(10)	150(10)
Кристални систем	триклинични	моноклинични	моноклинични
Просторна група	<i>P</i> 1	<i>P</i> 2 ₁ /n	<i>P</i> 2 ₁ /c
Параметри јединичне ћелије			
<i>a</i> (Å)	6,8388(6)	12,2044(5)	10,5822(5)
<i>b</i> (Å)	11,9872(9)	7,9645(3)	24,4148(8)
<i>c</i> (Å)	12,9686(9)	29,6530(9)	12,6708(5)
α (°)	113,877(7)	90	90
β (°)	93,318(6)	97,886(3)	114,002(6)
γ (°)	100,412(7)	90	90
<i>V</i> (Å ³)	945,94(14)	2855,07(18)	2990,6(2)
<i>Z</i>	1	4	4
ρ (g/cm ³)	1,783	1,748	1,731
μ (mm ⁻¹)	1,132	0,934	0,895
<i>F</i> (000)	504	1504	1568
Димензије кристала (mm ³)	0,4 × 0,1 × 0,1	0,3 × 0,1 × 0,1	0,1 × 0,1 × 0,05
Извор зрачења (Å)	Mo K α (λ = 0,71073)	Mo K α (λ = 0,71073)	Mo K α (λ = 0,71073)
2 Θ опсег за прикупљене податке (°)	6,122 – 54,968	5,3 – 54,97	4,85 – 54,958
Опсег индекса	-7 ≤ <i>h</i> ≤ 8,	-15 ≤ <i>h</i> ≤ 15,	-13 ≤ <i>h</i> ≤ 13,
	-12 ≤ <i>k</i> ≤ 15,	-10 ≤ <i>k</i> ≤ 8,	-31 ≤ <i>k</i> ≤ 23,
	-16 ≤ <i>l</i> ≤ 12	-28 ≤ <i>l</i> ≤ 38	-16 ≤ <i>l</i> ≤ 11
Број прикупљених рефлексија	6739	13853	13217
	4334	6545	6852
Број независних рефлексија	[R _{int} = 0,0195, R _{sigma} = 0,0403]	[R _{int} = 0,0235, R _{sigma} = 0,0365]	[R _{int} = 0,0260, R _{sigma} = 0,0401]
Подаци/ограничења/параметри	4334/0/293	6545/0/438	6852/0/421
Метода утачњавања структуре	Метода најмањих квадрата на бази F ² (пуна матрица)		
Коначни R индекси [<i>I</i> > 2 σ (<i>I</i>)]	R ₁ = 0,0391, wR ₂ = 0,0878	R ₁ = 0,0293, wR ₂ = 0,0641	R ₁ = 0,0325, wR ₂ = 0,0758
Коначни R индекси [сви подаци]	R ₁ = 0,0539, wR ₂ = 0,0986	R ₁ = 0,0391, wR ₂ = 0,0688	R ₁ = 0,0442, wR ₂ = 0,0832
$\Delta\rho_{\max}$ (e/Å ³)	1,02	0,40	0,63
$\Delta\rho_{\min}$ (e/Å ³)	-1,45	-0,51	-0,53

3.3.6. Основни кристалографски подаци и рендгенска структурна анализа комплекса **18** и **19**

Рендгенска структурна анализа за [Ag(py-2pz)₂]PF₆ (**18**) и {[Ag(NO₃)(py-2pz)]·0,5H₂O}_{*n*} (**19**) комплексе је вршена на 150 К помоћу Oxford Diffraction SuperNova дифрактометра. Структуре су решене у Olex² графичком програму¹⁶⁸ применом директних метода коришћењем SHELXT програма, док је утачњавање извршено применом методе најмањих квадрата на бази F² коришћењем SHELXL програма.¹⁶⁹ Сви атоми тежи од водоника су утачњавани анизотропно. Положаји атома водоника су израчунати на стандарним растојањима и утачњавани применом „riding” модела. Резултати рендгенске структурне анализе и други релевантни подаци за комплексе **18** и **19** су приказани у табели 10.

Табела 10. Подаци о експерименталним мерењима, резултати рендгенске структурне анализе и други релевантни подаци за комплексе **18** и **19**

	18	19
Емпиријска формула	C ₂₆ H ₂₂ AgN ₆ F ₆ O ₈ P	C ₁₃ H ₁₂ AgN ₄ O _{7,5}
Моларна маса (g/mol)	799,33	452,14
Температура (К)	150(10)	150(10)
Кристални систем	триклинични	моноклинични
Просторна група	<i>P</i> 1	<i>P</i> 2 ₁ / <i>n</i>
Параметри јединичне ћелије		
<i>a</i> (Å)	7,4731(4)	11,0042(12)
<i>b</i> (Å)	11,7049(4)	12,8657(8)
<i>c</i> (Å)	17,6092(8)	12,5820(12)
α (°)	97,285(4)	90
β (°)	96,617(4)	115,436(13)
γ (°)	102,781(4)	90
<i>V</i> (Å ³)	1473,58(12)	1608,6(3)
<i>Z</i>	2	4
ρ (g/cm ³)	1,801	1,867
μ (mm ⁻¹)	0,837	1,303
<i>F</i> (000)	800	900
Димензије кристала (mm ³)	0,25 × 0,1 × 0,1	0,3 × 0,3 × 0,1
Извор зрачења (Å)	Мо К α ($\lambda = 0,71073$)	Мо К α ($\lambda = 0,71073$)
2 θ опсег за прикупљене податке (°)	5,472 – 54,966	4,782 – 54,958
Опсег индекса	-8 ≤ <i>h</i> ≤ 9, -14 ≤ <i>k</i> ≤ 15, -19 ≤ <i>l</i> ≤ 22	-14 ≤ <i>h</i> ≤ 13, -16 ≤ <i>k</i> ≤ 12, -16 ≤ <i>l</i> ≤ 12
Број прикупљених рефлексија	11043	6610
Број независних рефлексија	6475	3459
Подаци/ограничења/ параметри	[<i>R</i> _{int} = 0,0302, <i>R</i> _{sigma} = 0,0524] 6475/0/456	[<i>R</i> _{int} = 0,0168, <i>R</i> _{sigma} = 0,0263] 3459/0/240
Метода утачавања структуре	Метода најмањих квадрата на бази <i>F</i> ² (пуна матрица)	
Коначни <i>R</i> индекси [<i>I</i> > 2 σ (<i>I</i>)]	<i>R</i> ₁ = 0,0370, <i>wR</i> ₂ = 0,0779	<i>R</i> ₁ = 0,0312, <i>wR</i> ₂ = 0,0729
Коначни <i>R</i> индекси [сви подаци]	<i>R</i> ₁ = 0,0528, <i>wR</i> ₂ = 0,0854	<i>R</i> ₁ = 0,0409, <i>wR</i> ₂ = 0,0788
$\Delta\rho_{\max}$ (e/Å ³)	0,60	0,93
$\Delta\rho_{\min}$ (e/Å ³)	-0,60	-0,71

3.4. Физичка мерења

3.4.1. Елементална микроанализа

Елементална микроанализа за С, Н и N атоме синтетисаних комплекса је урађена на Факултету за хемију и хемијску технологију, Универзитета у Љубљани користећи PerkinElmer 2400 Series II инструмент (CHN), и на Микроаналитичком одељењу Института за хемију, Хемијског факултета, Универзитета у Београду.

3.4.2. ESI-HRMS мерења

Масени спектри бакар(II) и сребро(I) комплекса са диметил-пиридин-4,5-дикарбоксилатним естрима су снимљени након растварања комплекса у CH_3CN на Agilent 62224 accurate масеном спектрометру.

3.4.3. IR мерења

Инфрацрвени спектри синтетисаних комплекса су снимљени применом KBr технике на PerkinElmer Spectrum One и Two FT-IR спектрометрима у опсегу таласних бројева $4000 - 450 \text{ cm}^{-1}$.

3.4.4. NMR мерења

Снимање NMR спектра је вршено у NMR киветама пречника 5 mm растварањем 5,0 mg комплекса у 0,6 mL $\text{DMSO-}d_6$. NMR спектри комплекса цинка(II) су снимљени на Varian Gemini 2000 спектрометру на 200 MHz (^1H NMR), односно на 50 MHz (^{13}C NMR). ^1H NMR спектри сребро(I) комплекса са пиридин-4,5-дикарбоксилатним естрима су снимљени на Bruker Avance III спектрометру на 500 MHz на собној температури користећи тетраметилсилан као интерни стандард. Хемијска померања, δ , изражена су у ppm, а константе купловања, J , дате су у Hz.

3.4.5. UV-Vis мерења

UV-Vis спектри су снимљени на Shimadzu double-beam спектрофотометру у опсегу таласних дужина $1100 - 200 \text{ nm}$ након растварања одговарајућег комплекса у DMSO.

3.4.6. Мерење моларне проводљивости

Моларна проводљивост комплекса је мерена на Crison Multimeter MM 41 и Hanna Edge Conductivity Meter кондуктометрима. Концентрација раствора одговарајућег комплекса у DMSO која се користила за мерење проводљивости је $1,0 \times 10^{-3} \text{ M}$.

3.4.7. Волтаметријска мерења

Циклични волтамограми су снимљени на AutoLab PGSTAT204 потенциостату/галваностату, чија је ћелија опремљена системом којег чине три електроде, стакласти угљеник (GC) као радна, zasiћена Ag/AgCl као референтна и платинска жица као помоћна електрода. Проводни електролит је тетра-*n*-бутиламонијум-хексафлуорофосфат. Концентрација раствора одговарајућег комплекса у DMSO која се користила за волтаметријска мерења је $1,0 \times 10^{-3} \text{ M}$.

3.4.8. Испитивање стабилности комплекса

Стабилност синтетисаних комплекса у раствору је праћена применом UV-Vis спектрофотометрије током 48 h. Такође, стабилност сребро(I) комплекса са диметил-пиридин-4,5-дикарбоксилатним естрима је праћена на ваздуху и светлости.¹⁷⁶ У ове сврхе, коришћени су стерилни целулозни дискови, који су импрегнирани са $5,0 \mu\text{L}$

раствора одговарајућег комплекса у DMSO концентрације 50 mg/L. Након тога, целулозни дискови су изложени ваздуху и светлости на собној температури у периоду од 48 h, при чему се визуелно прати стабилност комплекса.

3.4.9. Квантно-механички прорачуни

Сви DFT прорачуни су извршени применом ADF^{177,178} програма у Amsterdam Modeling Suite (верзија 2022.102)¹⁷⁹. За све атоме је коришћен TZP базисни скуп. Релативистички ефекти су урачунати помоћу ZORA апроксимације.¹⁸⁰⁻¹⁸² За оптимизацију геометрије комплекса коришћен је BP86-D4 функционал. Утицај DMSO растварача на геометрију комплекса је испитиван помоћу COSMO солватационог модела.^{183,184} Електронске енергије коришћене за израчунавање Гибсове (*Gibbs*) слободне енергије су одређене применом M06-2X мета-хибридног функционала на ZORA-BP86-D4/TZP-COSMO (DMSO) оптимизованим геометријама.^{185,186}

3.5. Биолошка испитивања

3.5.1. Припрема хранљивих подлога

Luria Bertani подлога (LB течна подлога)

Триптон (10,0 g), екстракт квасца (5,0 g) и натријум-хлорид (10,0 g) додати у 1,0 L дејонизоване воде и мешати док се ове супстанце у потпуности не растворе. Добијен раствор стерилисати у аутоклаву 20 min на 15 psi.

Luria Bertani подлога (LA чврста подлога)

Триптон (10,0 g), екстракт квасца (5,0 g), натријум-хлорид (10,0 g) и агар (14,2 g) додати у 1,0 L дејонизоване воде и мешати док се ове супстанце у потпуности не растворе. Добијени раствор стерилисати у аутоклаву 20 min на 15 psi.

Sabouraud dextrose подлога (SAB)

Глукозу (40,0 g), пептон (10,0 g) и агар (15,0 g) додати у 0,95 L дејонизоване воде и подесити рН вредност раствора у опсегу 5,0 – 6,0. Добијени раствор разблажити водом до 1,0 L, а затим стерилисати у аутоклаву 20 min на 15 psi.

RPMI подлога

RPMI (10,4 g) и MOPS (3-(*N*-морфолин)пропансулфонска киселина; 34,5 g) додати у 0,90 L аутоклавиране воде и подесити рН вредност раствора на приближно 7,0 помоћу 1,0 M раствора NaOH. Добијени раствор разблажити водом до 1,0 L, а затим стерилисати и чувати на 4 °C.

Spider подлога

Манитол (10,0 g), калијум-фосфат (2,0 g) и агар (13,5 g) додати у 0,95 L дејонизоване воде и подесити рН вредност раствора у опсегу 5,0 – 6,0. Добијени раствор разблажити водом до 1,0 L и стерилисати у аутоклаву 20 min на 15 psi.

Tryptic soy broth подлога (TSB)

У 1,0 L дејонизоване воде додати 30,0 g чврсте подлоге у праху, а затим вршити стерилизацију аутоклавирањем 15 min на 121 °C.

3.5.2. Испитивање антимикробне активности комплекса

Вредности минималних инхибиторних концентрација (MIC) за синтетисане комплексе **1 – 19**, као и за лиганде и соли метала коришћене у њиховој синтези, одређене су стандардном микродилутационом методом, која је препоручена од стране Америчког националног удружења за клиничке лабораторијске стандарде (M07-A8) и Института за клиничке и лабораторијске стандарде (M07-A10) за антибактеријска испитивања, односно према стандардима Европског удружења антимикробних тестова (верзија 7.3.1.) и Института за клиничке и лабораторијске стандарде (M27-A3 и M27-S4) за антифунгална испитивања.

За антимикробна испитивања коришћени су бактеријски сојеви и сојеви гљивица, који су набављени из NCTC (*National Collection of Type Cultures*) и ATCC (*American Type Culture Collection*) колекција. Они укључују Грам-негативне (*Pseudomonas aeruginosa* NCTC 10332 и *Escherichia coli* NCTC 9001) и Грам-позитивне (*Staphylococcus aureus* NCTC 6571, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 и *Listeria monocytogenes* NCTC 11994) бактерије, док су за испитивање антифунгалне активности коришћени различити *Candida* сојеви (*C. albicans* ATCC 10231, *C. albicans*-RFP (црвени флуоресцентни протеин), *C. albicans* SC5314-GFP (зелени флуоресцентни протеин), *C. parapsilosis* ATCC 22019, *C. glabrata* ATCC 2001 и *C. krusei* ATCC 6258).

Клинички сојеви, коришћени за испитивање антибактеријске активности комплекса сребра(I) са диметил-пиридин-4,5-дикарбоксилатним естрима, претходно су изоловани из узорака млека, који су испоручени ветеринарској лабораторији „VetLab” у Београду, где су даље идентификовани биохемијским методама (BBL Crystal enteric/nonfermenter ID kit).

Бактеријске културе су гајене у LB подлози до оптичке густине од 5×10^5 cfu/mL, док су *Candida* сојеви гајени у RPMI 1640 подлози са 2% глукозе и разблажени до 1×10^5 cfu/mL оптичке густине. Раствори испитиваних једињења се припремају растварањем у DMSO при концентрацији од 50 mg/mL. Највећа концентрација испитиваних једињења која је коришћена за антимикробне тестове је 500 µg/mL (водећи рачуна да је коначна концентрација растварача мања од 1%, v/v). Тестови су извођени у микротитарским плочама са 96 бунарића коришћењем серије двоструких разблажења испитиваних једињења у течној подлози. MIC вредности испитиваних једињења представљају најмање концентрације њихових раствора, при којима се зауставља видљив раст микроорганизама након 24 h инкубације на 37 °C, а одређене су применом Tecan Infinite 200 Pro multiplate инструмента.

3.5.3. Испитивање цитотоксичности

Цитотоксичност једињења је испитивана стандардним колориметријским МТТ тестом,¹⁸⁷ који се заснива на способности метаболички активних ћелија да у присуству сукцинат дехидрогеназе редукују жути 3-(4,5-диметил(тиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолијум-бромид (МТТ) у формазан љубичасте боје. Кристали формазана се даље растварају у одговарајућем растварачу (DMSO), а интензитет љубичасте боје се

одређује спектрофотометријски мерењем апсорбанце на 540 nm и пропорционалан је броју метаболички активних ћелија.

In vitro цитотоксичност синтетисаних комплекса је одређена као антипролиферативна активност на ћелијама хуманих фибробласта плућа (MRC-5), које су инкубирани у RPMI 1640 подлози суплементираној са испитиваним једињењима, у влажној атмосфери од 95% ваздуха и 5% CO₂ на 37 °C током 48 h. Након инкубације, измерен је степен редукције МТТ једињења коришћењем Tecan Infinite 200 Pro multiplate инструмента. Цитотоксичност је изражена као концентрација једињења која инхибира раст ћелије за 50% (IC₅₀).

3.5.4. Испитивање активности комплекса на формирање хифа код *C. albicans*

Испитивано је формирање хифа код *C. albicans* ATCC 10231 и *C. albicans*-RFP сојева у присуству субминималних инхибиторних концентрација испитиваних једињења. За раст *C. albicans* соја коришћене су чврста Spider¹⁸⁸ и течна RPMI 1640 (са додатком 2% (v/v) глукозе) подлоге. Ћелије *C. albicans* ATCC 10231 су прво узгајане у SAB подлози преко ноћи на 30 °C и испране са стерилним раствором фосфатног пуфера (PBS). Након тога, културе су засејане у RPMI 1640 подлози до коначне концентрације од 1 × 10⁶ ћелија/mL и инкубирани на 37 °C на ротационом шејкеру са 180 rpm. Ћелије третиране DMSO растварачем су коришћене као контрола. На крају, ћелије су пелетиране на 3000×g, концентроване 10 пута у свежем раствору PBS, а формирање хифа је праћено коришћењем микроскопа са светлим пољем (Olympus BX51) са увећањем од 20 пута.

3.5.5. Испитивање активности комплекса на формирање биофилма код *C. albicans*

Испитиван је ефекат комплекса на формирање биофилма код *C. albicans* ATCC 10231 соја по модификованој методи која је раније описана у литератури.¹⁸⁹ Почетни инокулум *C. albicans* ATCC 10231 за тест инхибиције биофилма је био 1 × 10⁶ cfu/mL.

Поред тога, испитивана је способност комплекса да инхибира формирање биофилма клиничког изолата *C. albicans* 1b помоћу микротитарске плоче са 96 бунарића и равним дном, као што је претходно описано.¹⁹⁰ За овај тест, ћелије су сакупљане из култура узгајаних преко ноћи (SAB, 30 °C, 180 rpm) центрифугирањем (5000×g, 5 min, 4 °C), а затим испране два пута стерилним раствором PBS. После тога, ћелије су ресуспендоване у RPMI 1640 подлози која садржи 2% глукозе (v/v) до коначне концентрације 2 × 10⁶ ћелија/mL.

На сличан начин, изведен је и тест инхибиције формирања биофилмова код изолата *S. aureus* 0661.¹⁹¹ У овом случају, ћелије су прво гајене у TSB подлози преко ноћи на 37 °C и при 180 rpm, а затим су центрифугиране (5000×g, 5 min, 4 °C) и разблажене помоћу стерилне TSB до коначне концентрације 1,5 × 10⁸ cfu/mL. Ова суспензија је даље разблажена 100 пута са TSB и суплементирана са 2% (w/v) глукозе и 2% (w/v) NaCl. У сваки од шест паралелних редова микротитарске плоче са 96 бунарића пренето је 100 μL суспензије.

Најмања концентрација испитиваних комплекса која је инхибирала формирање биофилма одређена је након 48 h на 37 °C. Раст биофилма је праћен кристално љубичастим бојењем адхерентних ћелија и мерењем апсорбанце на 590 nm помоћу Tecan Infinite 200 Pro multiplate инструмента. Експеримент је поновљен три пута.

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

Стварање интрацелуларних реактивних кисеоничних врста је праћено помоћу флуоресцентне боје, 2',7'-дихлорфлуоресцин-диацетата (DCFH-DA).¹⁹⁰ *C. albicans*-RFP ћелије су гајене у SAB подлози до разблажења од 10^7 ћелија/mL, а затим инкубирани 2 h на 30 °C и 200 rpm са MIC вредностима комплекса. Позитивна контрола је третирана са амфотерицином В. Након бојења са 10 μ M DCFH-DA на 30 °C током 30 min, ћелије су сакупљене, испране са раствором PBS и кратко изложене ултрасонификацији, у циљу обезбеђивања хомогене популације. Интензитети флуоресценције (ексцитација на 488 nm и емисија на 540 nm) испитиваних ћелија су одређени са CyFlow Space Partec проточним цитометром помоћу Partec FloMax софтвера.

3.5.7. Адхезиони тест код *C. albicans*

Способност *C. albicans* SC5314-GFP (зелени флуоресцентни протеин) да инфицира ћелије карцинома плућа A549 (добојене из ATCC колекције) је проучавана адхезионим тестом у присуству субминималних инхибиторних концентрација испитиваних једињења.¹⁹² Укратко, конфлуентни монослојеви A549 на стакленим предметима су коинкубирани са ћелијама *C. albicans* у плочама са 6 бунарића током 1 h у RPMI 1640 подлози, на 37 °C и 5% CO₂. Адхерентне ћелије *C. albicans* су визуелно одређене помоћу флуоресцентног микроскопа (Olympus BX51) са увећањем од 20 пута.

3.5.8. Тест деполаризације мембране *S. aureus*

Деполаризација мембране *S. aureus* је одређена помоћу флуоресцентне боје, 3,3'-диетилкарбоцијанин-јодида (DiOC₂(3)), која је осетљива на потенцијал мембране.¹⁹³ Културе *S. aureus* 0661, изоловане из контаминираног млека, гајене су у LB подлози до оптичке густине OD₆₂₅ од 0,3, а затим испране раствором PBS и ресуспендоване у PBS који садржи 1% (w/v) глукозе (10^8 ћелија/mL). Бактерије су инкубирани на 37 °C током 15 min, а затим је инкубација вршена са 3 μ M DiOC₂(3) при истим условима. Након инкубације, бактерије су пренете у микротитарску плочу са 96 бунарића (100 μ L по бунарићу) и третиране испитиваним једињењима. Као позитивна контрола, коришћен је карбонил цијанид *m*-хлорфенил-хидразон (CCCP-1; 0,25 μ M). Промена флуоресценције (ексцитација на 485 nm, емисија на 525 и 630 nm) измерена је одмах након додавања једињења помоћу Tecan Infinite 200 Pro multiplate инструмента.

3.5.9. Тест преживљавања *Caenorhabditis elegans*

За испитивање токсичности синтетисаних једињења *in vivo* коришћен је *Caenorhabditis elegans* AU37 (*glp-4; sek-1*), у складу са модификованом поступку који је раније описан у литератури,^{194,195} а који се заснива на праћењу преживљавања нематоде у подлози, која користи *E. coli* OP50 као извор хране.¹⁹⁶ Укратко, црви (L4 стадијум) суспендовани су у подлози која садржи 95% M9 пуфера (3,0 g KH₂PO₄, 6,0 g Na₂HPO₄, 5,0 g NaCl и 1,0 mL 1,0 M MgSO₄·7H₂O у 1,0 L воде), 5% LB и 10,0 μ g холестерола по mL. Експеримент је изведен у микротитарским плочама са 96 бунарића и равним дном при запремини од 100 μ L по бунарићу. Суспензија нематоде (25 μ L што одговара 25 – 35 нематоде) пребачена је у бунариће, у које је претходно додато 50 μ L медијума. Након тога, 25 μ L испитиваног једињења (0 – 200 μ g/mL) додато је у бунариће. Као контрола, коришћен је DMSO (водећи рачуна да је коначна концентрација растварача мања од 0,05% (v/v)). Плоче су, затим, инкубирани на 25 °C током 2 дана.

Процент умрлих црва је израчунат након 48 h, као однос броја умрлих црва и укупног број црва у сваком бунарићу, користећи стереомикроскоп (SMZ143-N2GG). Испитивана једињења су тестирана најмање три пута у сваком тесту и сваки тест је поновљен најмање два пута ($n \geq 6$). Вредности LC_{50} представљају концентрације испитиваних једињења, које узрокују 50% смртности.

3.5.10. Синергистичко деловање комплекса са нистатином

Синергистичко деловање комплекса цинка(II) и клинички коришћеног лека нистатина је одређено на *C. albicans* ATCC 10231 соју применом микродилутационе методе.¹⁹⁷ Раст култура је праћен током 48 h и одређен спектрофотометријски на 600 nm помоћу Tecan Infinite 200 Pro multiplate инструмента.

3.5.11. Испитивање утицаја комплекса на међубактеријску комуникацију (*quorum sensing, QS*)

За испитивање анти-QS активности комплекса коришћени су биосензорски сојеви *Chromobacterium violaceum* CV026,¹⁹⁸ за производњу љубичастог пигмента виолацеина, и *Serratia marcescens* ATCC 27117, за производњу продигиозина.¹⁹⁹

Производња виолацеина код *C. violaceum* CV026 је праћена према претходно описаној методи.¹⁹⁸ Овај сој је гајен у LB подлози са одговарајућим антибиотиком преко ноћи на 30 °C и 180 rpm на ротационом шејкеру, а затим разливен у Петријеве шоље. У полуврсти LB агар (0,3%, w/v, 5,0 mL), додато је 50 μ L бактеријске културе и *N*-хексаноил-L-хомосерин лактона до коначне концентрације 5 μ M. *N*-хексаноил-L-хомосерин лактон индукује производњу виолацеина. Након очвршћавања агара, стављени су стерилни дискови на површину подлоге, и на њих додавани комплекси у концентрацијама од 500 и 250 μ g/диску. Петријеве шоље су инкубирани на 30 °C у усправном положају.

Код теста са *S. marcescens* ATCC 27117, коришћена је иста метода као и код *C. violaceum* CV026, само у овом случају није било потребе за додавањем једињења које индукује производњу виолацеина.¹⁹⁹ Инхибитарно деловање испитиваних комплекса је утврђено као зона, у којој не долази до синтезе пигмената, мерено у mm.

3.5.12. Статистички прорачуни

Резултати су представљени у облику средњих вредности \pm стандардне девијације (SD). Разлике између експерименталних и контролних група поређене су применом Студентског *t*-теста помоћу SPSS 20 софтвера.

3.6. Интеракције са биомолекулима

3.6.1. Флуоресцентна емисиона спектроскопија

Интеракције синтетисаних комплекса са албумином говеђег серума (BSA) и DNA изолованим из тимуса телета (ct-DNA) испитиване су применом емисионе флуоресцентне спектроскопије на Jasco FP-6600 спектрофлуориметру.

Флуоресцентни емисиони спектри BSA-комплекс система су снимљени у опсегу таласних дужина 295 – 500 nm са ексцитацијом на 290 nm, односно у опсегу таласних дужина 300 – 500 nm са ексцитацијом на 295 nm. Концентрација BSA је била

константна и износила је 5 μM , док је концентрација раствора комплекса била у опсегу 0 – 130 μM .

Флуоресцентни емисиони спектри ct-DNA-EthBr-комплекс система су снимљени у опсегу таласних дужина 525 – 750 nm са ексцитацијом на 520 nm, односно у опсегу таласних дужина 550 – 750 nm са ексцитацијом на 545 nm при чему је $[\text{ct-DNA}]/[\text{EthBr}] = 5 - 10$, док је концентрација раствора комплекса била у опсегу 0 – 180 μM .

Коришћењем једначине:

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

израчуната је Стерн-Волмерова константа формирања комплекса са биомолекулом (K_{sv}),²⁰⁰ при чему F_0 и F представљају интензитет флуоресценције пре и после додатка комплекса, K_q је биомолекулска константа гашења, τ_0 је време живота флуорофоре у одсуству комплекса ($\tau_0 = 10^{-8}$ s) и $[Q]$ је концентрација комплекса. Константа везивања (K_A) и број везујућих места (n) за макромолекул се може израчунати коришћењем следеће једначине:²⁰¹

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

Добијени резултати су приказивани графички као зависност $\log(F_0 - F)/F$ од $[Q]$. Вредност K_A се може добити из пресека праве $\log(F_0 - F)/F = f(\log[Q])$ са ординатом, а број везујућих места n из нагиба праве.

3.6.2. Гел електрофореза

DNA интеракције са комерцијално доступном λDNA (300 ng) испитиване су у складу са модификованим поступком који је раније описан,²⁰² коришћењем електрофорезног агарозног гела. Коначна концентрација λDNA од 20 ng/ μL је инкубирана са 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ комплекса, 2, 4 и 24 h на 37 $^\circ\text{C}$. Након инкубације, раствор је нанет на 1% (w/v) агарозни гел, који садржи 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ EthBr у ТАЕ пуферу (40 mM Tris ацетат/1 mM EDTA, pH = 7,4) на 70 V током 2 h. Као контрола коришћен је DNA раствор третиран са DMSO и инкубиран у истом временском периоду. Гел је анализиран коришћењем Gel Doc EZ система и Image LabTM софтвера.

У другом случају, раствор је нанет на 0,8% агарозни гел са EthBr (HiperLadderTM 1 kb DNK Ladder plus) на 60 V током 1 h,²⁰³ а гел је сликан и анализиран помоћу Biometra Gel Imaging система са BioDocAnalyze 2.2 софтвером.

3.7. Липофилност

Липофилност синтетисаних комплекса је одређена применом методе која је раније описана у литератури.²⁰⁴ Комплекс је прво растворен у DMSO, а затим додат у вода/ n -октанол систем и мешан 1 h на собној температури. Након тога, систем се остави да стоји 24 h у циљу раздвајања две течне фазе. Након успостављања равнотеже и раздвајања слојева растварача, одређује се концентрација комплекса у обе фазе мерењем апсорбанце помоћу претходно добијене калибрационе криве. Подеони коефицијент ($\log P$) је израчунат коришћењем једначине:

$$\log P = \log(c_0/c_w)$$

где су c_0 и c_w концентрације комплекса у n -октанолној и воденој фази.

3.8. Каталитичка активност комплекса бакра(II) са диметил-6-(пиразин-2-ил)пиридин-3,4-дикарбоксилатом

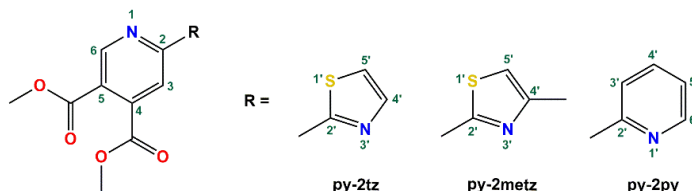
Каталитичка активност комплекса бакра(II) са диметил-6-(пиразин-2-ил)пиридин-3,4-дикарбоксилатом (py-2pz) испитивана је применом

3,5-ди-*tert*-бутилкатохола (3,5-ДТВС) и *o*-аминофенола (ОАР) као супстрата. Раствори 3,5-ДТВС и ОАР су припремљени у DMSO, док су комплекси растворени у DMSO/H₂O (*v/v* 1 : 9). Редокс реакција је испитивана применом UV-Vis спектрофотометрије праћењем апсорбанце на 400 nm ($\epsilon = 1,9 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) за 3,5-ДТВС,²⁰⁵ односно на 435 nm ($\epsilon = 9,095 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) за ОАР у функцији времена.²⁰⁶

4. ДИСКУСИЈА РЕЗУЛТАТА

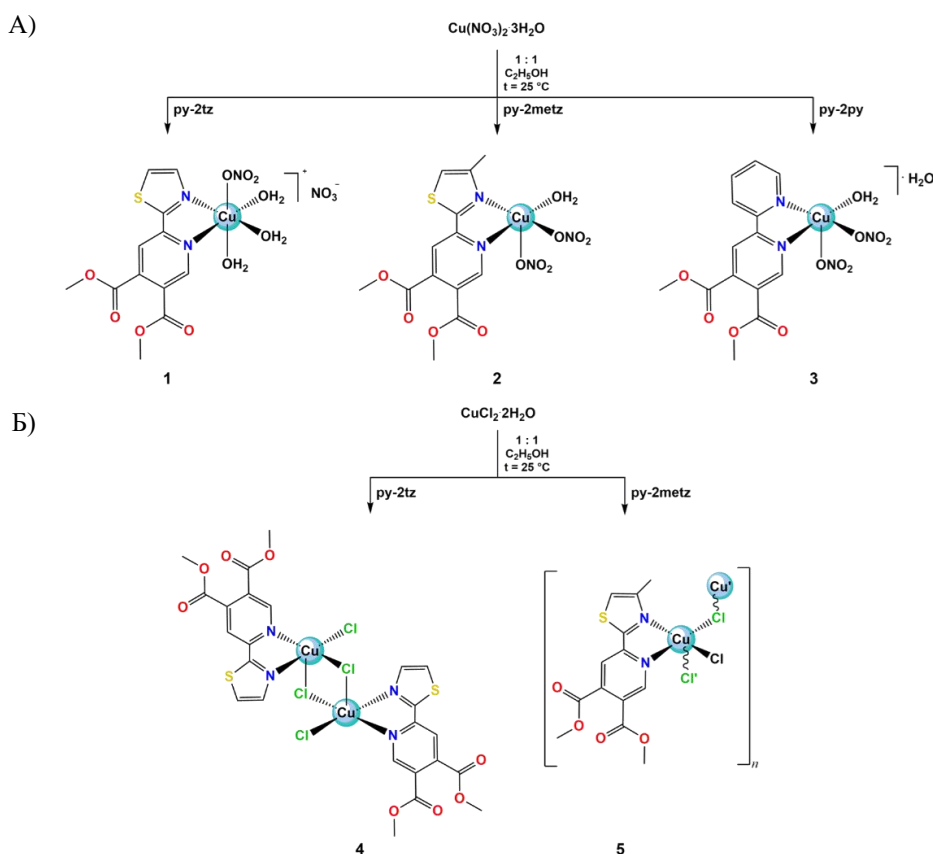
4.1. Синтеза, структурна карактеризација и антимикуробна активност бакар(II) комплекса са диметил-пиридин-4,5-дикарбоксилатним естрима¹

За синтезу бакар(II) комплекса коришћени су диметил-пиридин-4,5-дикарбоксилатни естри, диметил-2-(тиазол-2-ил)пиридин-4,5-дикарбоксилат (py-2tz), диметил-2-(4-метилтиазол-2-ил)пиридин-4,5-дикарбоксилат (py-2metz) и диметил-2,2'-бипиридин-4,5-дикарбоксилат (py-2py), чије су структурне формуле приказане на слици 23.²⁰⁷



Слика 23. Структурне формуле диметил-пиридин-4,5-дикарбоксилатних естера

Реакције бакар(II) соли, CuX_2 ($\text{X} = \text{NO}_3^-$ и Cl^-), са одговарајућим диметил-пиридин-4,5-дикарбоксилатним лигандима су изведене у еквимоларном односу у етанолу на собној температури, при чему се добијају $[\text{Cu}(\text{NO}_3)(\text{py-2tz})(\text{H}_2\text{O})_3]\text{NO}_3$ (**1**), $[\text{Cu}(\text{NO}_3)_2(\text{py-2metz})(\text{H}_2\text{O})]$ (**2**), $[\text{Cu}(\text{NO}_3)_2(\text{py-2py})(\text{H}_2\text{O})]\cdot\text{H}_2\text{O}$ (**3**), $[\text{CuCl}_2(\text{py-2tz})]_2$ (**4**) и $[\text{CuCl}_2(\text{py-2metz})]_n$ (**5**) комплекси (Слика 24).



Слика 24. Шематски приказ реакција за синтезу комплекса **1** – **3** (А) и **4** и **5** (Б)

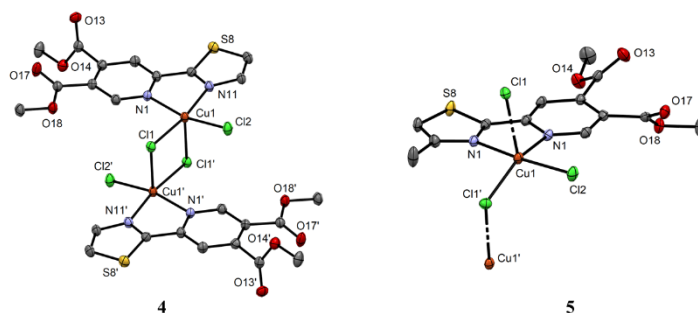
¹ Резултати овог истраживања су објављени у раду Т. Р. Andrejević et al., *Dalton Trans.* **50** (2021) 2627 (Реф. 207).

бипирамидалне геометрије износи 1.²⁰⁸ На основу вредности τ_5 параметра за комплексе **2** и **3** може се закључити да је њихова геометрија ближа квадратно-пирамидалној.²⁰⁸ Дужине Cu–N веза у комплексима **1** – **3** су у складу са дужинама веза за раније објављене комплексе бабра(II) са ароматичним *N*-хетероцикличним лигандима.⁸²

Табела 11. Одабране дужине веза (Å) у комплексима **1** – **3**

	1	2	3
Cu1–N1	2,039(2)	2,059(2)	1,988(3)
Cu1–N7			2,018(4)
Cu1–N11	1,977(2)	2,000(2)	
Cu1–O20	1,974(2)		
Cu1–O21	1,999(2)	2,235(2)	2,270(3)
Cu1–O22	2,253(2)		
Cu1–O23		2,765(2)	
Cu1–O25		1,949(2)	2,047(3)
Cu1–O26	2,448(2)		
Cu1–O27		2,739(2)	2,648(3)
Cu1–O29		2,001(2)	1,935(3)

Када су ру-2tz и ру-2metz реаговали са CuCl₂·2H₂O добијени су динуклеарни комплекс **4** и полинуклеарни комплекс **5** (Слика 26).²⁰⁷ У оба случаја, хлоридо анјон има улогу μ^2 -мостног лиганда између два Cu(II) јона. Као што се може видети са слике 26, у комплексу **4** постоје два таква моста која доводе до формирања Cu₂Cl₂ мотива, док Cu(II) јон у комплексу **5** гради само један мост са хлоридо лигандом, формирајући цик-цак ланце. Комплекси **4** и **5** су електронеутрални, јер се други Cl[–] анјон, такође, координује за Cu(II) јон.



Слика 26. Кристалне структуре комплекса **4** и **5**. Елипсоиди су дати са 50% вероватноће. Атоми водоника су изостављени ради јаснијег приказа кристалних структура²⁰⁷

Пошто вредности τ_5 индекса за комплексе **4** и **5** износе 0,08 и 0,26, геометрија ових комплекса одговара квадратно-пирамидалној са малим степеном дисторзије.²⁰⁸ У складу са овом чињеницом су и дужине Cu–N веза приказане у табели 12.

Табела 12. Одабране дужине веза (Å) у комплексима **4** и **5**

	4	5
Cu1–N1	2,062(2)	2,061(2)
Cu1–N11	2,007(2)	2,066(2)
Cu1–Cl1	2,266(1)	2,266(1)
Cu1–Cl1'	2,664(1)	2,626(1)
Cu1–Cl2	2,230(1)	2,262(1)

4.1.2. Спектроскопска карактеризација

Инфрацрвени спектри бакар(II) комплекса са диметил-пиридин-4,5-дикарбоксилатним естрима су снимљени у опсегу од 4000 до 450 cm^{-1} . У табели 13 приказане су одговарајуће вредности фреквенција валенционих вибрација у IR спектрима комплекса **1** – **5**. У IR спектрима комплекса **1** – **5** присутне су траке које потичу од валенционих вибрација карбонилне групе и које су померене у односу на одговарајуће траке некоординованих лиганата, што потврђује њихову координацију за Cu(II) јон.²⁰⁷ Широка трака од вибрација O–H групе на 3421, 3368 и 3454 cm^{-1} у IR спектрима комплекса **1** – **3**, респективно, потврђује присуство координоване и кристалне воде у овим комплексима.⁸² У IR спектру комплекса **1** долази до цепања траке која потиче од асиметричних валенционих вибрација нитратног јона, на две траке на 1384 и 1330 cm^{-1} , што је у складу са координацијом нитрата за Cu(II) јон, док трака на 1299 cm^{-1} указује на присуство овог јона у спољашњој координационој сфери.^{209,210} Ови спектроскопски подаци су у складу са раније публикованим вредностима за тринуклеарни комплекс бакра(II) са фталазином, који садржи два мостно координована нитрата и два нитрата у спољашњој координационој сфери.⁸² С друге стране, траке на 1384 и 1342 cm^{-1} у IR спектру комплекса **2**, односно на 1385 и 1317 cm^{-1} у спектру комплекса **3**, потичу од координованог нитратног јона.²⁰⁹

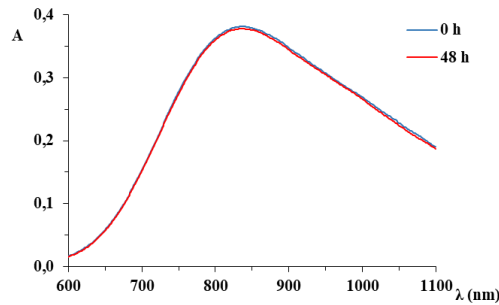
Табела 13. Положаји фреквенција карактеристичних валенционих вибрација у комплексима **1** – **5** (ν , cm^{-1})

	1	2	3	4	5
$\nu(\text{O-H})$	3421	3368	3454		
$\nu(\text{C=O})$	1734	1743, 1730	1751, 1738	1737	1729
$\nu(\text{C-O})$	1280	1289, 1268	1278, 1256	1396, 1280	1285
$\nu_{\text{as}}(\text{NO}_3)$	1384, 1330, 1299	1384, 1342	1385, 1317		

У експерименталном делу (3.2.2.) приказане су вредности таласних дужина апсорпционих максимума (λ_{max} , nm) и моларних екстинкционих коефицијената (ϵ , $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) за комплексе **1** – **5**, који су снимљени одмах након њиховог растварања у DMSO. Концентрација раствора комплекса **1** – **5** која је употребљена за снимање UV-Vis спектра износи $1,0 \times 10^{-2}$ M. У UV-Vis спектарима ових комплекса, присутан је широки апсорпциони максимум у видљивом делу,²¹¹ који потиче од d_z^2 , d_{xy} , d_{xz} , $d_{yz} \rightarrow d_x^2 - y^2$ прелаза из $d_x^2 - y^2$ основног стања.²¹² Ово је у складу са раније поменути тринуклеарним бакар(II) комплексом са фталазином.⁸²

4.1.3. Стабилност комплекса у раствору

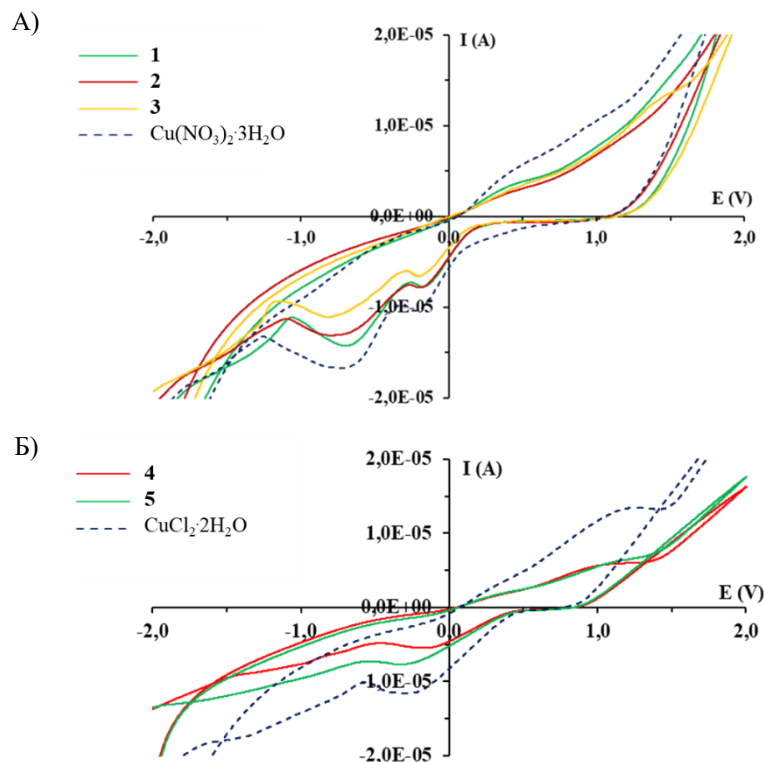
Стабилност комплекса **1** – **5** у раствору је испитивана снимањем UV-Vis спектра одмах након њиховог растварања у DMSO, као и након 24 и 48 h, на собној температури.²⁰⁷ Наиме, потребно је да једињења буду стабилна у том временском периоду, јер је 48 h максимално време инкубације ових једињења приликом испитивања њихове биолошке активности. Пошто током времена нема значајних промена у интензитету и положају апсорпционог максимума за комплексе **1** – **5**, може се закључити да одговарајући диметил-пиридин-4,5-дикарбоксилатни естар остаје координован за Cu(II) јон у раствору у испитиваном временском периоду (Слика 27).



Слика 27. Стабилност комплекса **1** у DMSO праћена током 48 h применом UV-Vis спектрофотометрије на 25 °C

Испитивање стабилности комплекса **1** – **5** у раствору је, такође, вршено мерењем моларне проводљивости. Моларна проводљивост у DMSO за неелектролите има вредности мање од $50 \Omega^{-1}\text{cm}^2\text{mol}^{-1}$, а за електролите је преко $50 \Omega^{-1}\text{cm}^2\text{mol}^{-1}$.^{213,214} Измерена вредност моларне проводљивости за комплекс **1** је у складу са одређеном кристалном структуром овог комплекса, који је 1 : 1 тип електролита у DMSO.^{213,214} Међутим, вредност моларне проводљивости комплекса **2** и **3** је приближно $50 \Omega^{-1}\text{cm}^2\text{mol}^{-1}$, тако да се не може поуздано тврдити да долази до ослобађања нитрато лиганда из координационе сфере Cu(II) јона.^{213,214} С друге стране, комплекси **4** и **5** се понашају као неелектролити у раствору, што потврђују њихове ниске вредности моларних проводљивости.^{213,214}

С обзиром да је електрохемијско понашање комплекса метала значајно, за боље разумевање њихове стабилности у раствору, као и биолошке активности,²¹⁵ снимљени су циклични волтамограми комплекса **1** – **5** и бакар(II) соли коришћених у њиховој синтези, у опсегу потенцијала од $-2,0 \text{ V}$ до $+2,0 \text{ V}$ и брзини од 50 mV/s (Слика 28).



Слика 28. Циклични волтамограми комплекса **1** – **3** (А) и **4** и **5** (Б), у поређењу са одговарајућим CuX_2 солима ($\text{X} = \text{NO}_3^-$ и Cl^-) снимљени на GC електроди у DMSO у присуству $0,1 \text{ M}$ ТВАНР при брзини скенирања 50 mV/s

У цикличним волтамограмима комплекса **1** – **3** јављају се два пика у катодном смеру на приближно $-0,2$ и $-0,8$ V, који потичу од редукције $\text{Cu(II)} \rightarrow \text{Cu(I)}$ и $\text{Cu(I)} \rightarrow \text{Cu(0)}$.^{216,217} С друге стране, код комплекса **4** и **5** уочен је само један редукциони пик на $-0,2$ и $-0,3$ V, респективно, који потиче од редукције Cu(II) до Cu(I) јона, што указује на њихову већу стабилност у односу на комплексе **1** – **3**. На основу слике 28 се, такође, може закључити да су синтетисани бакар(II) комплекси стабилнији у односу на соли бакар(II).²¹⁶

4.1.4. Биолошка активност

Антимикробна и цитотоксична активност

Испитивана је антимикробна активност комплекса **1** – **5** на две бактеријске (*P. aeruginosa* и *S. aureus*) и две гљивичне врсте (*C. albicans* и *C. parapsilosis*), а добијени резултати су приказани као МИС вредности у табели 14.²⁰⁷ Као што из табеле може видети, комплекси **1** – **5** немају утицај на раст тестираних бактерија при испитиваним условима. С друге стране, ови комплекси су показали умерену антифунгалну активност, нарочито у случају *C. albicans*. Најбоља антифунгална активност је уочена за комплексе **2** и **5** са ру-2metz (МИС = $31,25 \mu\text{g/mL}$), док су други испитивани комплекси у мањој мери инхибирали раст ћелије ове гљивице. За разлику од комплекса **1** – **5**, коришћени диметил-пиридин-4,5-дикарбоксилатни лиганди нису били активни према тестираним бактеријама и гљивицама у концентрацији већој од $500 \mu\text{g/mL}$.²¹⁸ Поред тога, раније је одређена МИС вредност за $\text{Cu(NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, која у случају *P. aeruginosa*, *S. aureus* и *C. albicans* износи $500 \mu\text{g/mL}$.⁸²

Поред антимикробне активности комплекса **1** – **5**, одређена је и њихова токсичност на здравим ћелијама фибробласта плућа (MRC-5). У табели 14, плавом бојом су приказане IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) вредности комплекса **1** – **5**. Од комплекса **2** и **5** који су показали највећу активност према *C. albicans*, комплекс **5** је мање токсичан према здравој ћелији.

Табела 14. Антимикробна (МИС, $\mu\text{g/mL}$) и цитотоксична (IC_{50} , $\mu\text{g/mL}$) активност комплекса **1** – **5**

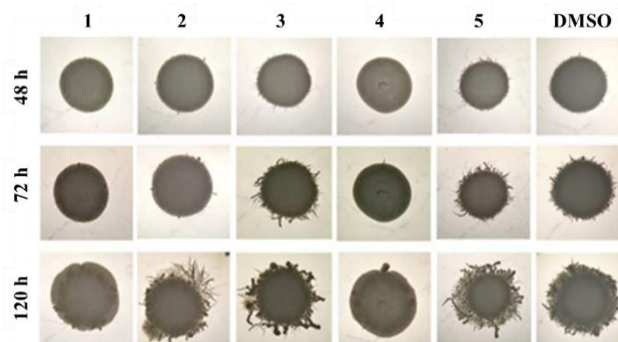
	1	2	3	4	5
<i>P. aeruginosa</i> NCTC 10332	>500	>500	>500	>500	>500
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	>500	>500	>500	>500	500
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	62,5	31,25	62,5	125	31,25
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	500	>500	>500	500	250
MRC-5	75 ± 5	50 ± 2	60 ± 4	35 ± 2	70 ± 5

Као што је у Општем делу докторске дисертације наведено, различити бакар(II) комплекси показују антимикробну активност.^{77,78,82,85,86} Поред комплекса описаних у Општем делу, антимикробну активност показују и бакар(II) комплекси са никотинском киселином и 2-супституисаним дериватима пиридина (2-хидроксипиридин, 2-аминопиридин и пиридин-2-карбоксилна киселина), који у потпуности заустављају раст Грам-позитивне бактерије *B. subtilis* ATCC 6633 при МИС од $256 \mu\text{g/mL}$.²¹⁹ Поред тога, њихова антифунгална активност према *C. albicans* ATCC 90028 је умерена (МИС = $128 - 256 \mu\text{g/mL}$).²¹⁹ Фунгицидну активност према тестираним изолатима *Candida* соја са МИС вредностима у опсегу од 31 до $125 \mu\text{g/mL}$ показао је бакар(II)

комплекс са тиюрацил лигандом, $[\text{Cu}(2,2'\text{-bipy})\text{Cl}_2(\text{тиоурацил})]$, а најосетљивија гљивица на дејство овог комплекса је била *C. krusei*.²²⁰

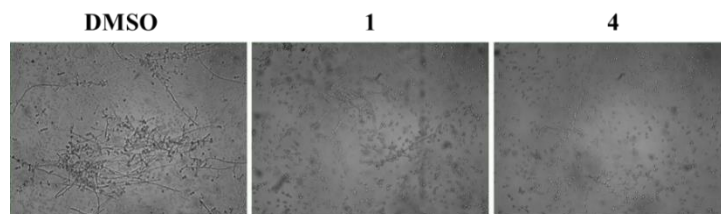
Инхибиција филаментације и формирања биофилма код *C. albicans* соја

Пошто је за синтетисане комплексе **1** – **5** уочена само антифунгална активност, испитиван је њихов ефекат на формирање хифа и биофилма код *C. albicans* у циљу утврђивања могућег механизма антифунгалног деловања ових комплекса.²⁰⁷ Важно је напоменути да трансформација гљивица из облика квасца у хифе омогућава формирање њиховог биофилма, што доводи до развоја гљивичне инфекције.^{221,222} У складу са тим, ћелије *C. albicans* ATCC 10231 су третиране са субинхибиторним концентрацијама комплекса **1** – **5**, а добијени резултати су приказани на слици 29 са увећањем од 20 пута. Интересантно је да комплекси **1**, **2** и **4**, који су у мањој мери утицали на раст ове гљивице, скоро потпуно инхибирају стварање хифа након 72 h инкубације, док су комплекси **1** и **4** били ефикасни чак и након 120 h. Поред тога, комплекс **2** има већи инхибиторни ефекат на филаментацију у односу на **5**, иако су оба комплекса показали највећу антифунгалну активност (MIC = 31,25 µg/mL; Табела 14).



Слика 29. Формирање хифа код *C. albicans* ATCC 10231 у присуству субинхибиторних концентрација ($0,5 \times \text{MIC}$) комплекса **1** – **5** на Spider подлози

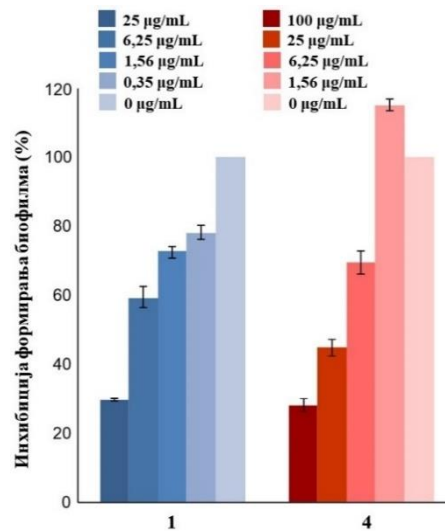
Комплекси **1** и **4**, који не доводе до формирања хифа чак и после 120 h, показали се су активни и у течной (RPMI) подлози у поређењу са DMSO, који је коришћен као контрола (Слика 30).



Слика 30. Филаментација код *C. albicans* ATCC 10231 у присуству субинхибиторних концентрација ($0,5 \times \text{MIC}$) комплекса **1** и **4** у течной RPMI подлози

С обзиром да су комплекси **1** и **4** у највећој мери инхибирали филаментацију код *C. albicans*, испитивана је њихова способност да утичу на формирање биофилма овог соја (Слика 31).²⁰⁷ Када је испитивање вршено са субинхибиторном концентрацијом комплекса **1** и **4** од 25 µg/mL, уочено је да комплекс **1** инхибира формирање биофилма за приближно 70%, док је ефекат комплекса **4** био мањи (50%). Комплекс **1** и **4** у већој

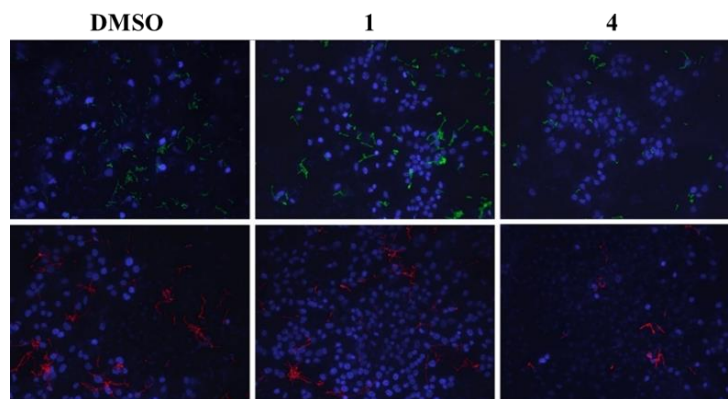
мери инхибирају формирање биофилма у односу на $[\text{Cu}(2,2'\text{-bipy})\text{Cl}_2(\text{тиоурацил})]$, који инхибира формирање биофилма *C. krusei* и *C. glabrata* сојева за приближно 10%.²²⁰



Слика 31. Утицај субинхибиторних концентрација комплекса 1 и 4 на формирање биофилма код *C. albicans* соја

Адхезиони тест

Поред до сада поменутих могућих начина развоја гљивичне инфекције изазване *C. albicans* сојем, ова гљивица може да делује инвазијом, односно продирањем и оштећењем епителних ћелија.²²³ У овом раду, праћена је флуоресценција зеленог и црвеног протеина *C. albicans* у присуству МИС комплекса 1 и 4, као резултата њиховог ефекта на адхезију ове гљивице на А549 ћелија карцинома плућа (Слика 32).²⁰⁷ Као што је приказано на слици, у случају комплекса 4, уочена је мања флуоресценција обојена протеина у односу на контролу, што указује на његов већи ефекат на сузбијање адхезије *C. albicans* у поређењу са комплексом 1 при истим испитиваним условима. Добијени резултати за комплекс 4 су у сагласности са добијеним резултатима инхибиције филаментације, односно способности овог комплекса да инхибира формирање хифа може бити резултат његовог ефекта на адхезију испитиване гљивице.



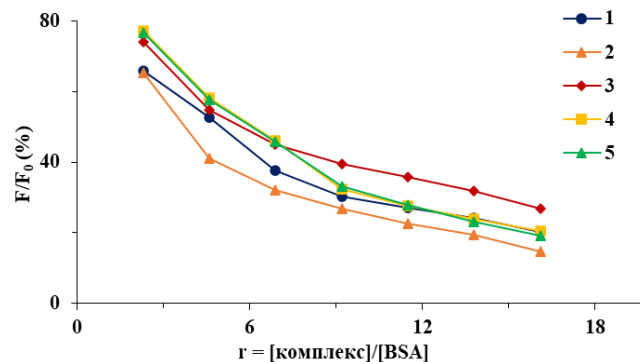
Слика 32. Ефекат МИС комплекса 1 и 4 на адхезију *C. albicans* SC5314-GFP (горњи ред) и *C. albicans* SC5314-RFP (доњи ред) на А549 ћелије карцинома плућа (100× увећање).

DAPI (2-(4-амидинофенил)-6-индолкарбамадин дихидрохлорид) обојене ћелије су плаве, док су зелена и црвена из *C. albicans* ћелија

4.1.5. Интеракције са BSA

Да би се објаснио механизам уноса, транспорта, метаболизма и токсичности једињења као потенцијално нових терапеутских агенаса, потребно је испитати њихове интеракције са протеинима.²²⁴ Најзаступљенији протеин у крвној плазми је серум албумин, чија је основна улога транспорт активних једињења до одговарајуће ћелије. Када активно једињење везано за протеин доспе до ћелије, протеин раскида везу са активним једињењем, како би оно даље испољило своју активност. Интеракције једињења се испитују са хуманим серум албумином (HSA), као и са његовим структурним аналогом, говеђим серум албумином (BSA).²²⁵ За испитивање интеракција једињења са протеинима, најчешће, се примењује флуоресцентна емисиона спектроскопија, јер су у структури овог протеина присутне три флуорофоре: триптофан (Trp), тирозин (Tyr) и фенилаланин (Phe), при чему Trp, у највећој мери, доприноси флуоресценцији протеина. Када испитивано једињење интерагује са протеином, долази до гашења емисије, као последица формирања стабилног система протеина са једињењем, промене у конформацији протеина или његове денатурације.²²⁴

Имајући у виду претходно наведено, у овој докторској дисертацији испитиване су интеракције комплекса **1** – **5** са BSA снимањем флуоресцентних емисионих спектра раствора BSA константне концентрације (5 μM) у присуству ових комплекса растућих концентрација (0 – 70 μM).²⁰⁷ Емисиони спектри су снимљени у фосфатном пуферу (PBS) у опсегу таласне дужине од 295 до 500 nm, са ексцитацијом протеина на 290 nm. Као што се може видети са слике 33, у присуству испитиваних комплекса уочено је гашење емисије, што је последица везивања комплекса за испитивани протеин.²²⁶



Слика 33. График зависности релативног интензитета флуоресценције (F/F_0 , %) од r ($r = [\text{комплекс}]/[\text{BSA}]$) за комплексе **1** – **5** у PBS пуферу (pH = 7,4)

Помоћу једначина приказаних у Експерименталном делу дисертације (3.6.1), добијене су вредности Стерн-Волмерове константе (K_{sv}), константе гашења емисије (K_q), константе везивања (K_A) и броја везујућих места (Хилов коефицијент, n), које су приказане у табели 15. На основу вредности K_q , које су веће од $2,0 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ за комплексе **1** – **5**, може се закључити да ови комплекси доводе до статичког механизма гашења емисије Trp у BSA.²²⁷ У складу са овом чињеницом је и релативно висок проценат хипохромизма (преко 80%). Вредности K_A константи за испитиване комплексе указују на њихову способност да се везују за BSA и на тај начин транспортују до ћелије, а затим раскину везу са овим биомолекулом.²²⁶ Сличне K_A вредности су показали и раније синтетисани бакар(II) комплекси са нестероидним антиинфламаторним лековима (толфенамик, меклофенамик, мефенамик, нифлумска киселина) и различитим ароматичним азот-донорским лигандима (2,2'-бипиридин, 1,10-фенантролин, 2,2'-бипиридиламин, пиридин).²²⁸⁻²³⁰ Хилов коефицијент за

испитиване комплексе је у опсегу од 1,07 до 1,38, указујући на њихово везивање за једно место у овом протеину.

Табела 15. Вредности везујућих константи комплекса **1 – 5** за BSA

Комплекс	$K_{sv} (M^{-1})$	Хипохромизам (%)	$K_q (M^{-1}s^{-1})$	$K_A (M^{-1})$	n
1	$(7,03 \pm 0,10) \times 10^4$	82,2	$7,03 \times 10^{12}$	$1,14 \times 10^5$	1,07
2	$(1,26 \pm 0,02) \times 10^5$	85,3	$1,26 \times 10^{13}$	$3,53 \times 10^5$	1,16
3	$(6,00 \pm 0,80) \times 10^4$	85,7	$6,00 \times 10^{12}$	$6,93 \times 10^4$	1,06
4	$(2,88 \pm 0,02) \times 10^5$	86,9	$2,88 \times 10^{13}$	$1,81 \times 10^6$	1,36
5	$(4,98 \pm 0,02) \times 10^5$	86,3	$4,98 \times 10^{13}$	$2,43 \times 10^6$	1,38

4.1.6. Липофилност

Досадашња истраживања су показала да унос потенцијално биолошки активног једињења у ћелију зависи од његове липофилности, при чему се са повећањем ћелијског уноса једињења повећава и његова биолошка активност.²³¹ Што је липофилност неког једињења већа, оно лакше и у већој мери дифундује кроз ћелијску мембрану, због чега је његов ћелијски унос већи.²³¹ Партициони коефицијент ($\log P$), који представља однос концентрације једињења у n -октанолној и воденој фази, представља меру липофилности и способности једињења да се транспортује кроз ћелијску мембрану. За одређивање $\log P$ вредности може се применити ткз. метода мућкања, заснована на прерасподели једињења између две течне фазе, које се међусобно не мешају, односно хидрофобне n -октанолне и хидрофилне водене фазе.²³² С обзиром да липофилност представља врло важну физичко-хемијску карактеристику једињења за његову потенцијалну примену у терапеутске сврхе,^{204,233} $\log P$ вредности израчунате применом ове методе треба да буду у интервалу од $-0,4$ до $5,6$.²³⁴

Вредности партиционих коефицијената за комплексе **1 – 5** су у идеалном опсегу, $0 \leq \log P \leq 2,30$.²⁰⁷ Комплекси **1**, **4** и **5** имају веће $\log P$ вредности у односу на **2** и **3**, што указује да су ова три комплекса, у највећој мери, дистрибуирана у n -октанолној фази, као и да је њихов ћелијски унос највећи.

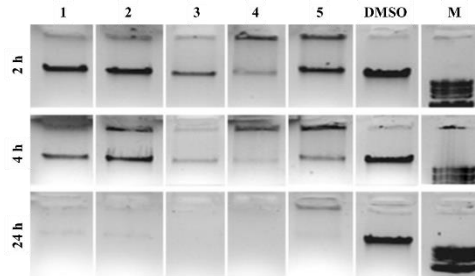
4.1.7. Интеракције са DNA

Веома важну улогу у механизму антимикубног деловања комплекса метала могу имати њихове интеракције са DNA.²³⁵ Постоје четири типа нековалентног везивања комплекса метала за овај биомолекул: интеркалација између суседних парова база DNA, везивање за мали (*minor groove binding*) или велики жлеб (*major groove binding*) и електростатичка интеракција са негативно наелектрисаним фосфатним остацима DNA. Поред тога, утврђено је иреверзибилно ковалентно везивање, које инхибира функцију овог биомолекула. За испитивање *in vitro* интеракција комплекса метала са DNA могу се примењивати: гел електрофореза, UV-Vis спектрофотометрија, флуоресцентна емисиона спектроскопија, циклична волтаметрија, вискозиметрија и многе друге методе.²³⁶

Гел електрофореза

У овој докторској дисертацији, испитивана је *in vitro* интеракција комплекса **1 – 5** са DNA применом гел електрофорезе (Слика 34).²⁰⁷ За ово испитивање коришћен

је λ DNA, који је инкубиран 2, 4 и 24 h са 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ комплекса на 37 $^{\circ}\text{C}$, а затим је вршено наношење на агарозни гел који садржи EthBr. Овај молекул садржи фенантролински прстен, чија планарност омогућава његово интеркалативно везивање између суседних парова база DNA.²³⁶ Као што се са слике 34 може видети, након 2 h инкубације, мањи интензитет DNA траке је уочен за комплексе **3** и **4** у односу на DMSO контролу, што указује на њихову већу способност да спрече интеркалативно везивање EthBr за овај биомолекул. Поред тога, активност комплекса **1** – **5** расте у току времена инкубације, тако да су након 24 h, сви комплекси у потпуности спречавали интеркалацију EthBr.

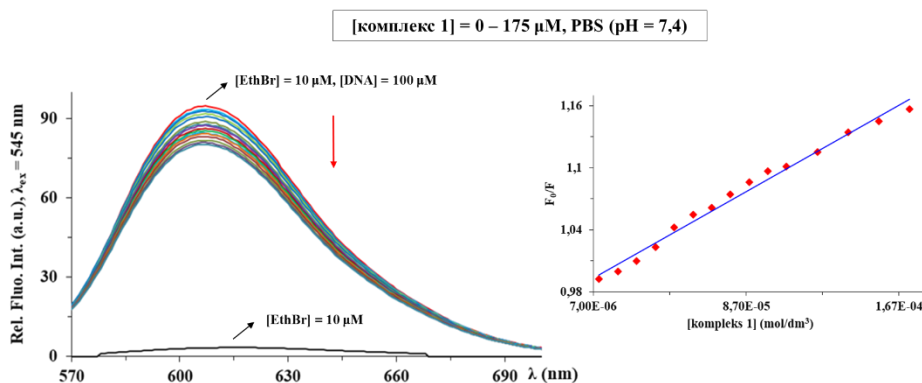


Слика 34. *In vitro* интеракција комплекса **1** – **5** са λ DNA применом гел електрофорезе током времена. 20 $\mu\text{g}/\text{L}$ λ DNA је третирано са 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ комплекса у 10 mM Tris-Cl пуферу (pH = 8,5). M = молекуларни маркер reqGOLD 1 kb DNA-Ladder Plus

Флуоресцентна емисиона спектроскопија

Афинитет везивања комплекса **1** – **5** за ct-DNA је испитиван применом флуоресцентне емисионе спектроскопије, при чему је праћен интензитет емисије EthBr везаног за ct-DNA након додавања комплекса.²⁰⁰ Познато је да EthBr флуоресцира у малом степену, али након његовог везивања за ct-DNA долази до формирања EthBr-ct-DNA система, који има интензивну флуоресценцију.^{224,236} Међутим, након додавања комплекса метала који може да супституише EthBr у EthBr-ct-DNA систему или да се везује за овај систем, долази до смањења интензитета флуоресценције.²³⁷

Снимљени су емисиони спектри EthBr-ct-DNA система ($[\text{ct-DNA}]/[\text{EthBr}] = 10$) у присуству комплекса **1** – **5** растуће концентрације (0 – 175 μM) (Слика 35).²⁰⁷ У свим случајевима, након додавања комплекса, уочено је смањење интензитета флуоресценције, што указује на њихову интеракцију са EthBr-ct-DNA системом.²³⁸



Слика 35. Флуоресцентни емисиони спектри EthBr-ct-DNA система у PBS у присуству комплекса **1** растуће концентрације. Инсертована слика приказује Стерн-Волмеров дијаграм

Вредности константе K_A (Табела 16) за испитиване комплексе су много мање у односу на K_A вредности за EthBr ($K_A = 2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$),²²⁷ као и од вредности за бакар(II) комплексе са фенолатима и изоникотинамидом, за које је предложен интеркалативни начин везивања за ct-DNA.²²⁸ С обзиром на то, смањење интензитета емисије EthBr-ct-DNA система у присуству комплекса **1** – **5** је последица везивања комплекса за овај систем, што доводи до формирања EthBr-ct-DNA-комплекс система који није флуоресцентан. Чињеницу да комплекси **1** – **5** нису интеркалирајући агенси потврђују и вредности процента хипохромизма, које су много мање у односу на одговарајуће вредности за интеркалирајуће агенсе.²²⁷ Вредности константи гашења (K_q) за испитиване комплексе за ct-DNA указују да њихово везивање доводи до статичког механизма гашења емисије.²²⁷

Табела 16. Вредности везујућих константи комплекса **1** – **5** за ct-DNA

Комплекс	$K_{sv} (\text{M}^{-1})$	Хипохромизам (%)	$K_q (\text{M}^{-1}\text{s}^{-1})$	$K_A (\text{M}^{-1})$	n
1	$(1,06 \pm 0,01) \times 10^3$	15,6	$1,06 \times 10^{11}$	$8,75 \times 10^2$	0,97
2	$(8,15 \pm 0,40) \times 10^2$	12,0	$8,15 \times 10^{10}$	$8,51 \times 10^2$	0,99
3	$(9,66 \pm 0,15) \times 10^2$	15,4	$9,66 \times 10^{10}$	$1,12 \times 10^2$	0,75
4	$(1,22 \pm 0,03) \times 10^3$	17,1	$1,22 \times 10^{11}$	$7,09 \times 10^2$	0,93
5	$(1,01 \pm 0,04) \times 10^3$	15,5	$1,01 \times 10^{11}$	$3,55 \times 10^2$	0,86

4.2. Синтеза, структурна карактеризација и антимикуробна активност комплекса бакар(II) са диметил-6-(пиразин-2-ил)пиридин-3,4-дикарбоксилатом²

У реакцијама диметил-6-(пиразин-2-ил)пиридин-3,4-дикарбоксилатног естра (py-2pz) са еквимоларном количином одговарајуће бакар(II) соли, CuX_2 ($\text{X} = \text{Cl}^-$ и CF_3SO_3^-) у етанолу на собној температури, добијени су $[\text{CuCl}_2(\text{py-2pz})]_2$ (**6**) и $[\text{Cu}(\text{CF}_3\text{SO}_3)(\text{H}_2\text{O})(\text{py-2pz})_2]\text{CF}_3\text{SO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (**7**) комплекси (Слика 36).²³⁹ Синтетисани комплекси су окарактерисани применом елементарне микроанализе, спектроскопских (IR и UV-Vis), и електрохемијских (циклична волтаметрија) метода, као и мерењем моларне проводљивости, док је њихова кристална структура одређена применом рендгенске структурне анализе. У циљу објашњавања структуре комплекса **6** и **7** у раствору, изведени су DFT прорачуни. Антимикуробна активност комплекса **6** и **7** је испитивана на две бактеријске (*P. aeruginosa* и *S. aureus*) и две гљивичне врсте (*C. albicans* и *C. parapsilosis*), као и њихова токсичност на нормалној ћелијској линији фибробласта плућа (MRC-5). Поред тога, испитиван је утицај комплекса **6** и **7** на формирање хифа и биофилма код *C. albicans*. У циљу одређивања афинитета везивања комплекса **6** и **7** за BSA и ct-DNA примењена је флуоресцентна емисиона спектроскопија. Поред тога, испитивана је каталитичка активност комплекса **6** и **7** применом UV-Vis спектрофотометрије коришћењем 3,5-ди-*tert*-бутилкатехола (3,5-DTBC) и *o*-аминофенола (OAP) као супстрата.

² Резултати овог истраживања су објављени у раду Т. Р. Andrejević et al., *RSC Adv.* **13** (2023) 4376. (Реф. 239).

Табела 17. Одабране дужине веза (Å) у комплексима **6** и **7**

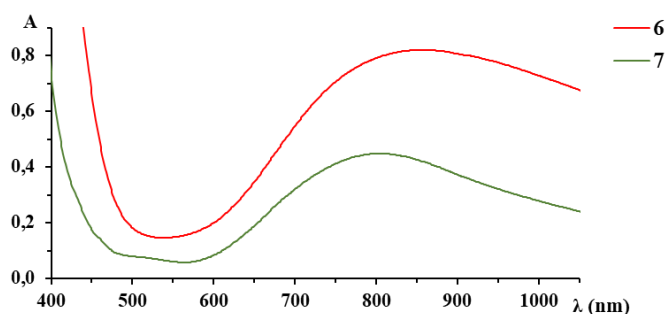
	6	7
Cu1–N1A	2,038(3)	1,999(4)
Cu1–N7A	2,032(3)	2,018(5)
Cu1–Cl1	2,2261(9)	2,000(2)
Cu1–Cl1	2,2261(9)	
Cu1–Cl2 _(екваторијална)	2,2675(8)	
Cu1–Cl2 _(аксијална)	2,6639(7)	
Cu1–N1B		2,022(4)
Cu1–N7B		2,262(6)
Cu1–O1D		2,388(5)
Cu1–O1C		1,981(4)

Мононуклеарни комплекс **7** садржи два бидентатно координована *py-2pz* лиганда, један молекул воде и један монодентатно координован CF_3SO_3^- анјон (Слика 37). Овај комплекс је позитивно наелектрисан, при чему се у спољашњој координационој сфери налази CF_3SO_3^- као контра-анјон, као и два молекула воде, који успостављају водоничне везе са координованим молекулом воде. Услед Јан-Телеровог ефекта у комплексу **7**, долази до продужења аксијалних Cu1–N7B и Cu1–O1D веза (2,262(6) и 2,388(5) Å, респективно), због чега овај комплекс има издужену октаедарску геометрију.

4.2.2. Спектроскопска карактеризација

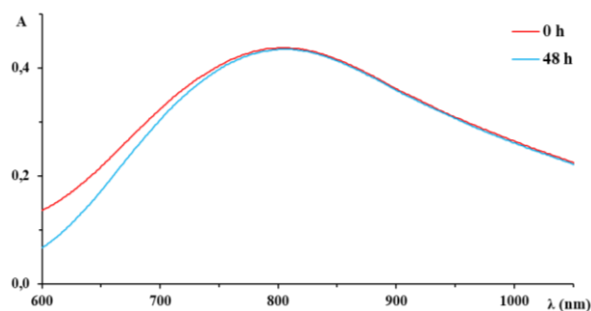
Инфрацрвени спектри комплекса **6** и **7**, у опсегу $4000 - 450 \text{ cm}^{-1}$, у складу су са њиховим структурама које су одређене применом рендгенске структурне анализе.²³⁹ У IR спектрима комплекса **6** и **7** померање трака које потичу од валенционих вибрација *py-2pz* у односу на одговарајуће траке некоординованог лиганда потвђује његову координацију за Cu(II) јон. Интензивна трака на приближно 1730 cm^{-1} потиче од валенционих вибрација карбонилне групе. Од асиметричних и симетричних валенционих вибрација CF_3^- и SO_3^- група трифлатног јона, присутног у структури комплекса **7**, као монодентатни лиганд и као контра-анјон, јављају се неколико интензивних трака у области од 1300 до 1000 cm^{-1} .⁸² С обзиром на чињеницу да је комплекс **7** кристалисао са два молекула воде у спољашњој координационој сфери и једним молекулом воде координованим за Cu(II) јон, у његовом IR спектру присутна је широка трака на 3475 cm^{-1} од O–H групе.²¹²

UV-Vis спектри комплекса **6** и **7** су снимљени у DMSO на собној температури (Слика 38, $c = 1,0 \times 10^{-2} \text{ M}$). У овим спектрима, јавља се широк апсорпциони максимум на 875 nm за комплекс **6**, односно на 805 nm у случају комплекса **7**, који потичу од *d-d* прелаза.²¹¹

Слика 38. UV-Vis спектри комплекса **6** и **7** снимљени у DMSO раствору на $25 \text{ }^\circ\text{C}$

4.2.3. Стабилност комплекса у раствору

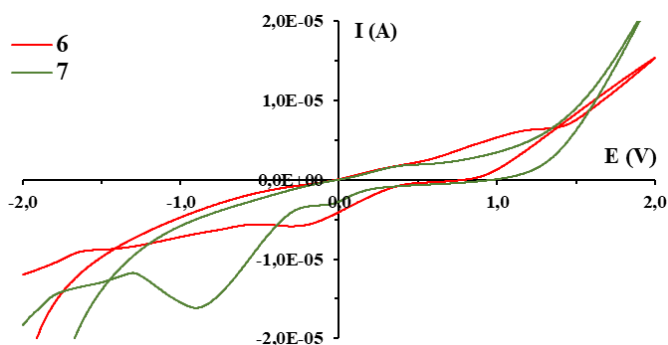
Стабилност комплекса **6** и **7** у раствору је праћена применом UV-Vis спектрофотометрије у периоду од 48 h.²³⁹ Раствори ових комплекса су припремљени у DMSO, који је коришћен као растварач за испитивање антимикробне и цитотоксичне активности, као и у смеси DMSO/PBS (v/v 2 : 1), која је коришћена за испитивање интеракција са биомолекулима. С обзиром да у UV-Vis спектрима комплекса **6** и **7** који су снимљени након 24 и 48 h, нису уочене значајне промене у интензитету апсорпције и положају апсорпционог максимума у односу на спектре снимљене одмах по њиховом растварању, може се закључити да током испитиваног временског периода ови комплекси задржавају своју структуру у раствору (Слика 39).



Слика 39. Стабилност комплекса **7** у DMSO праћена током 48 h применом UV-Vis спектрофотометрије на 25 °C

У циљу потврде да ру-2pz лиганд остаје координан за Cu(II) јон у раствору, вршена су и мерења моларне проводљивости, чије су вредности у складу са чињеницом да је комплекс **6** неелектролит, а да се комплекс **7** понаша као 1 : 1 тип електролита.²⁴⁰

Биолошка активност комплекса метала, као и њихове интеракције са биомолекулима, у великој мери, зависе од њихове редокс стабилности.^{215,241} У складу са тим, у овој дисертацији испитивано је електрохемијско понашање комплекса **6** и **7** применом цикличне волтаметрије.²³⁹ Циклични волтамограми раствора ових комплекса у DMSO снимљени су на GC електроди у присуству 0,1 М ТВАНР као помоћног електролита, у опсегу потенцијала од -2,0 до +2,0 V при брзини од 50 mV/s (Слика 40). Важно је напоменути да ру-2pz лиганд није редокс активан. С друге стране, у цикличном волтамограму комплекса **6**, јавља се један редукциони пик на -0,27 V, који потиче од Cu(II) → Cu(I) процеса. За комплекс **7**, поред редукције Cu(II) до Cu(I) јона ($E = -0,05$ V), присутан је још један редукциони пик на -0,89 V, који је последица редукције Cu(I) јона до Cu(0).



Слика 40. Циклични волтамограми комплекса **6** и **7** на GC електроди у DMSO у присуству 0,1 М ТВАНР, при брзини скенирања 50 mV/s

Слично електрохемијско понашање уочено је и за наведене комплексе **1** – **5**, као и за комплексе бакар(II) са *N,N*-донорским лигандима и тиосемикарбазонима.^{207,216,217} Одуство другог редукционог пика у цикличном волтамограму комплекса **6** указује на његову већу стабилност у раствору у односу на комплекс **7**.

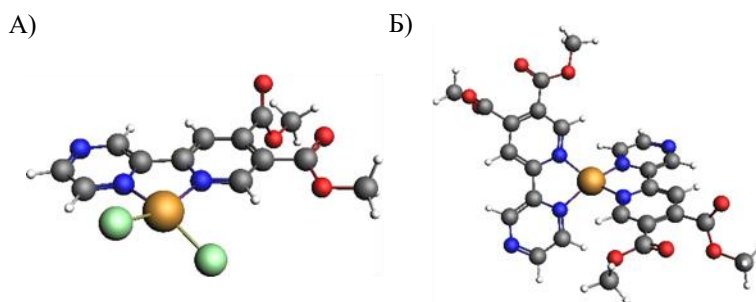
4.2.4. DFT прорачуни

У циљу објашњавања структуре комплекса **6** и **7** у раствору вршени су DFT прорачуни, помоћу података добијених применом рендгенске структурне анализе.^{239,242} У табели 18, приказане су израчунате вредности промене слободне Гибсове енергије ($\Delta_r G$) за комплексе **6** и **7** у DMSO на 298 К.

Табела 18. Промене слободне Гибсове енергије ($\Delta_r G$, kcal/mol) добијене на ZORA-M06-2X/TZP-COSMO(DMSO)//ZORA-BP86-D4/TZP-COSMO(DMSO) нивоу теорије за формирање бакар(II) комплекса **6** и **7**

Реакције	$\Delta_r G$ (T = 298 K)
$[\text{CuCl}_2(\text{py-2pz})]_2$ (6) \rightleftharpoons 2 $[\text{CuCl}_2(\text{py-2pz})]$	-3,75
$[\text{Cu}(\text{CF}_3\text{SO}_3)(\text{H}_2\text{O})(\text{py-2pz})_2]^+$ (7) \rightleftharpoons $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})(\text{py-2pz})_2]^{2+} + \text{CF}_3\text{SO}_3^-$	-2,01
$[\text{Cu}(\text{CF}_3\text{SO}_3)(\text{H}_2\text{O})(\text{py-2pz})_2]^+$ (7) \rightleftharpoons $[\text{Cu}(\text{CF}_3\text{SO}_3)(\text{py-2pz})_2]^+ + \text{H}_2\text{O}$	-3,58
$[\text{Cu}(\text{CF}_3\text{SO}_3)(\text{H}_2\text{O})(\text{py-2pz})_2]^+$ (7) \rightleftharpoons $[\text{Cu}(\text{py-2pz})_2]^{2+} + \text{CF}_3\text{SO}_3^- + \text{H}_2\text{O}$	-4,86

У случају реакције CuCl_2 са *py-2pz* фаворизовано је формирање мононуклеарног $[\text{CuCl}_2(\text{py-2pz})]$ комплекса, у коме $\text{Cu}(\text{II})$ јон има координациони број 4 (Слика 41А). У овом комплексу, два $\text{Cu}(\text{II})$ јон су врло мало феромагнетички спрегнута, са израчунатом константом купловања *J* од $0,3 \text{ cm}^{-1}$ на ZORA-M06-2X/TZP//X-гау нивоу теорије. Неспарени електрони се налазе у локализованим $d_{x^2-y^2}$ орбиталама, а густина спина се углавном налази у екваторијалној равни субјединица које су паралелно померене. Код комплекса **7** долази до његове дисоцијације уз издвајање CF_3SO_3^- јона и молекула воде, што је праћено формирањем $[\text{Cu}(\text{py-2pz})_2]^{2+}$ јона (Слика 41Б).



Слика 41. Структуре $[\text{CuCl}_2(\text{py-2pz})]$ (А) и $[\text{Cu}(\text{py-2pz})_2]^{2+}$ (Б) комплекса оптимизоване на ZORA-M06-2X/TZP-COSMO(DMSO) нивоу теорије

4.2.5. Биолошка активност

Антимикробна и цитотоксична активност

Испитивана је антибактеријска активност комплекса **6** и **7** и *py-2pz* лиганда према Грам-позитивној (*S. aureus* ATCC 25923) и Грам-негативној бактеријској врсти (*P. aeruginosa* PAO1), као и њихова антифунгална активност на два *Candida* соја (*C. albicans* ATCC 10231 и *C. parapsilosis* ATCC 22019).²³⁹ С друге стране,

антимикробна активност бакар(II) соли је раније одређена на истим сојевима бактерија и гљивица, при чему су добијени резултати показали да ове соли нису активне.²¹² У табели 19 приказане су МИС вредности (μM и $\mu\text{g/mL}$) за комплексе **6** и **7** и ру-2pz.

Табела 19. Антимикробна активност комплекса **6** и **7** и ру-2pz лиганда (МИС, μM ($\mu\text{g/mL}$)) у поређењу са њиховом антипролиферативном активношћу на нормалној MRC-5 ћелијској линији фибробласта плућа (IC_{50} , μM ($\mu\text{g/mL}$))

	6	7	ру-2pz
<i>S. aureus</i>	> 613,2 (> 500)	> 519,6 (> 500)	>1830 (> 500)
<i>P. aeruginosa</i>	153,3 (125)	259,8 (250)	>1830 (> 500)
<i>C. albicans</i>	613,2 (> 500)	> 519,6 (> 500)	>1830 (> 500)
<i>C. parapsilosis</i>	613,2 (> 500)	519,6 (500)	>1830 (> 500)
MRC-5	85,8 (70)	129,9 (125)	439,2 (120)

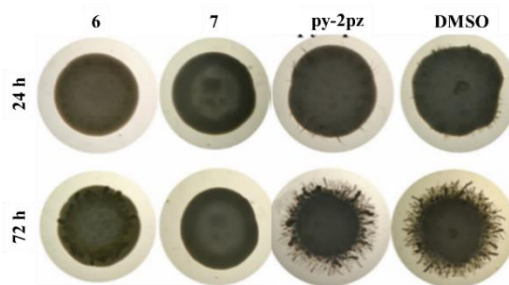
^aРезултати су приказани као средња вредност три мерења са стандардном грешком 1 – 3%.

Као што се из табеле 19 може видети, ру-2pz лиганд није утицао на раст тестираних сојева микроорганизама, чак ни при концентрацији од 500 $\mu\text{g/mL}$. С друге стране, комплекси **6** и **7** су показали умерену антибактеријску активност на *P. aeruginosa*. Супротно комплексима **1** – **5**,²⁰⁷ комплекси **6** и **7** нису утицали на раст *Candida* сојева.²¹⁸

У циљу одређивања терпеутског профила комплекса **6** и **7**, одређена је њихова антипролиферативна активност према нормалној MRC-5 ћелијској линији (IC_{50}). Комплекс **7** је мање токсичан у односу на **6** и ру-2pz (Табела 19). Сличне IC_{50} вредности (24,0 – 289,0 μM) на истој ћелијској линији одређене су и за бакар(II) комплексе са ароматичним *N*-хетероцикличним лигандима.⁸² Супротно томе, бакар(II) комплекси опште формуле $[\text{Cu}(\text{L}-\text{N},\text{N}')(\text{X}-\text{N},\text{O})]\text{NO}_3$ и $[\text{Cu}(\text{L}-\text{N},\text{N}')(\text{Y}-\text{O},\text{O}')]\text{NO}_3$, (L је 2,2'-бипиридин, 1,10-фенантролин или њихови супституисани деривати, X је есенцијална аминокиселина или пептид, Y је ацетилацетонат или салицилалдехидат)²⁴³⁻²⁴⁷ и бакар(II) комплекси са 2,2':6',2''-терпиридином (terpy) или његовим 4'-супституисаним дериватима²⁴⁸⁻²⁵² показали су завидну антипролиферативну активност на неколико ћелијских линија.

Инхибиција филаментације и формирања биофилма

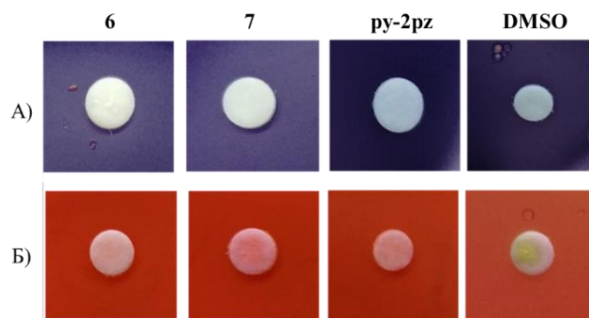
С обзиром на чињеницу да комплекси Cu(II) јона показују активност у инхибицији различитих процеса код *C. albicans* соја,²⁵³ испитиван је утицај комплекса **6** и **7** на филаментацију код *C. albicans* соја на чврстој Spider подлози у присуству 0,5 × МИС вредности ових комплекса (Слика 42).²³⁹ При овим концентрацијама комплекси **6** и **7** су потпуно инхибирали формирање хифа након 72 h, док ру-2pz лиганд није показао такву активност у истом временском периоду.



Слика 42. Утицај субинхибиторне концентрације ($0,5 \times \text{MIC}$) комплекса **6** и **7** и py-2pz у односу на DMSO контролу на формирање хифа код *C. albicans* на Spider подлози после 24 и 72 h

Испитивање анти-QS активности

Због чињенице да су раније синтетисани бакар(II) комплекси са ароматичним *N*-хетероцикличним једињењима (пиримидин, пиразин, хиनाзолин и фталазин)⁸² и диаминима (1,3-пропандиамин, 2,2-диметил-1,3-пропандиамин и (\pm)-1,3-пентадиамин)²⁵⁴ показали ефикасност у инхибицији QS активности код бактерија, у овој дисертацији је испитивана способност комплекса **6** и **7** да инхибирају QS²³⁹ и да на тај начин утичу на вируленцију бактерија.²⁵⁵ Дискови са бактеријама *S. violaceum* CV026 и *S. marcescens* третирани су са 100 μg комплекса **6** и **7**, при чему није уочена њихова анти-QS активност (Слика 43).

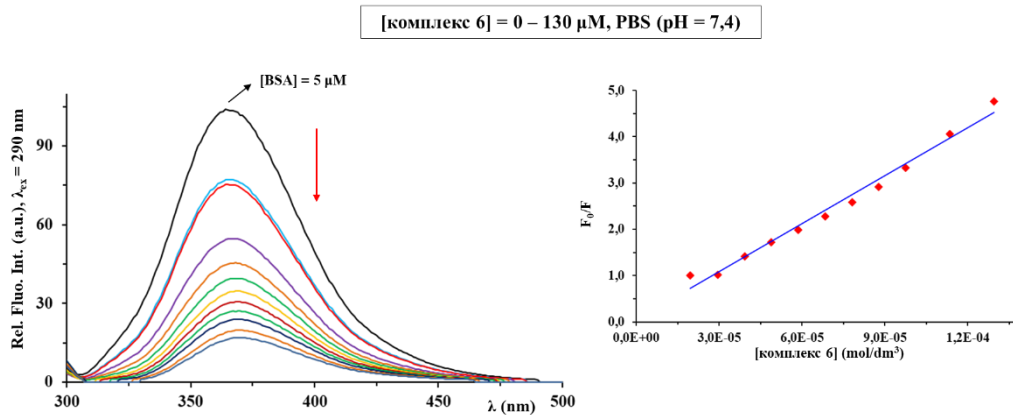


Слика 43. Инхибиција производње виолацеина (А) и продигиозина (Б) у присуству 100 μg комплекса **6** и **7** и py-2pz лиганда. DMSO је коришћен као контрола

4.2.6. Интеракције са BSA

Интеракције комплекса **6** и **7** са BSA су испитиване снимањем флуоресцентних емисионих спектра у опсегу од 295 до 500 nm, са ексцитацијом протеина на 290 nm.²³⁹ На слици 44 приказани су емисиони спектри BSA у присуству комплекса **6** растуће концентрације. Након додавања комплекса **6** и **7** раствору BSA константне концентрације (5 μM), долази до смањења интензитета флуоресценције на 365 nm, због њиховог везивања за овај биомолекул.²²⁶

Одговарајуће константе везивања комплекса **6** и **7** за BSA су приказане у табели 20. Вредности K_{sv} константе су мање за комплекс **7** у односу на **6**, што указује на мањи афинитет везивања комплекса **7** за овај биомолекул. Процент хипохромизма комплекса **6** и **7** је 84,4%, а вредности K_q су у складу са статичким механизмом гашења емисије Trp у BSA.²²⁷



Слика 44. Флуоресцентни емисиони спектри BSA у присуству комплекса **6** растуће концентрације. Инсертована слика представља Стерн-Волмеров дијаграм

Већи афинитет везивања комплекса **6** за BSA потврђује и његова K_A вредност, али су K_A вредности за оба испитивана комплекса довољно велике да омогуће њихово везивање за овај протеин и да се на тај начин транспортују до циљане ћелије. С друге стране, K_A вредности комплекса **6** и **7** су доста мање у односу на одговарајуће вредности за најјачу ковалентну интеракцију ($\sim 10^{15} \text{ M}^{-1}$),²⁵⁶ што указује да долази до њиховог реверзibilног везивања за BSA. Вредности Хиловог коефицијента за комплексе **6** и **7** потврђују њихово везивање за једно место у протеину.

Табела 20. Вредности везујућих константи комплекса **6** и **7** за BSA

Комплекс	$K_{sv} (\text{M}^{-1})$	Хипохромизам (%)	$K_q (\text{M}^{-1}\text{s}^{-1})$	$K_A (\text{M}^{-1})$	n
6	$(8,74 \pm 0,13) \times 10^5$	84,4	$8,74 \times 10^{13}$	$6,03 \times 10^6$	1,55
7	$(2,28 \pm 0,06) \times 10^5$	84,4	$2,28 \times 10^{13}$	$5,81 \times 10^5$	1,17

4.2.7. Липофилност

Партициони коефицијенти за комплексе **6** и **7**, који су одређени већ претходно описаном методом мућкања, износе 0,86 и 1,19²³⁹ и налазе се у опсегу за клиничке коришћене лекове (-0,4 до 5,6).²³⁴ Поред $\log P$ вредности, за потенцијалну примену новог терапеутског агенса важна је и његова моларна маса, која не би требало да прелази 500 g/mol, на основу правила Липинског.²⁵⁷ Моларна маса комплекса **6** и **7** је већа од 500 g/mol. Ипак, то није ограничавајући фактор за њихову потенцијалну примену, јер постоји много примера једињења значајно веће моларне масе, која се могу успешно транспортовати у ћелију.²⁵⁸ Поред тога, комплекси метала који се клинички примењују обично нису у складу са правилом Липинског, при чему у њиховом случају у обзир треба узети моларну запремину уместо моларне масе.²⁵⁹

4.2.8. Интеракције са DNA

Интеракције комплекса **6** и **7** са ct-DNA су испитиване применом флуоресцентне емисионе спектроскопије у присуству EthBr, снимањем спектра EthBr-ct-DNA система ($[\text{ct-DNA}]/[\text{EthBr}] = 10$) у присуству комплекса растуће концентрације (0 – 190 μM).²³⁹ Након додавања ових комплекса долази до смањења интензитета флуоресценције, што указује на њихову интеракцију са EthBr-ct-DNA системом.²²⁷ Вредности одговарајућих

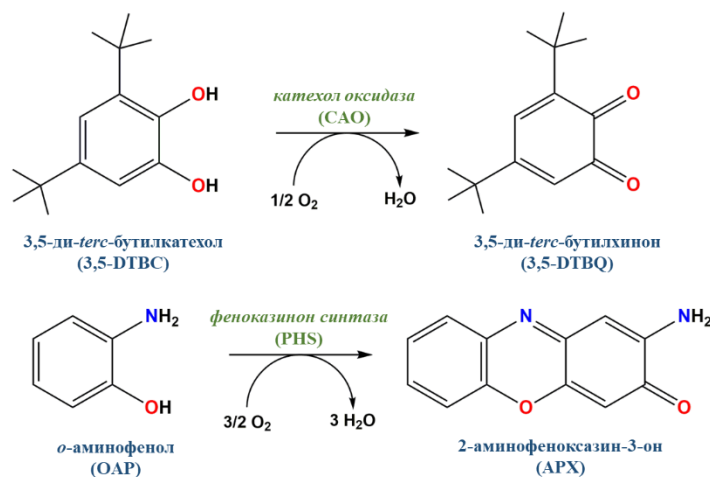
константи везивања комплекса **6** и **7** за ct-DNA су приказане у табели 21. Вредности константи K_A за ове комплексе су много мање у односу на одговарајућу вредност за EthBr. Поред тога, проценат хипохромизма за интеракције оба комплекса је мањи од 30%, док је у случају интеркалирајућег агенса, луцигенина, та вредност приближно 50%.²⁶⁰ За интеракције комплекса **6** и **7** са ct-DNA доминантан је статички механизам гашења флуоресценције, што потврђују вредности K_{sv} , које су веће од $2,0 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$.

Табела 21. Вредности везујућих константи комплекса **6** и **7** за ct-DNA

Комплекс	$K_{sv} (\text{M}^{-1})$	Хипохромизам (%)	$K_q (\text{M}^{-1}\text{s}^{-1})$	$K_A (\text{M}^{-1})$	n
6	$(1,67 \pm 0,01) \times 10^3$	28,2	$1,67 \times 10^{11}$	$3,67 \times 10^2$	0,80
7	$(2,63 \pm 0,01) \times 10^2$	5,4	$2,63 \times 10^{10}$	$4,22 \times 10^1$	0,50

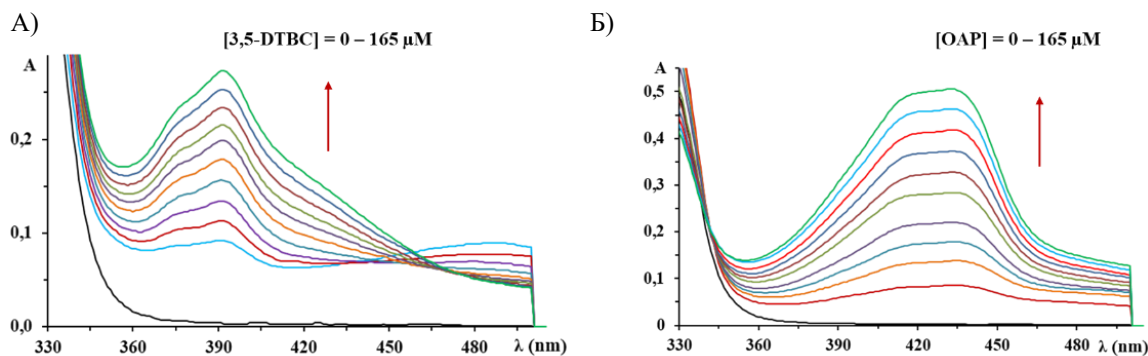
4.2.9. Каталичка активност

Као што је описано у Општем делу ове дисертације (1.2.1), бакар представља један од есенцијалних елемената, који улази у састав многих металопротеина и ензима, неопходних за нормално функционисање многих процеса у организму. Улога бакра као активног центра многих металопротеина се заснива на редокс процесима. Један од главних ензима бакра је катехол оксидаза (CAO), која катализује аеробну реакцију оксидације катехола до одговарајућих хинона. Настали хинони су веома реактивна једињења, која се даље аутополимеризују, стварајући смеђи пигмент меланин.²⁶¹ Овај процес је врло важан за заштиту оштећених ткива биљака од инсеката.²⁶¹ Поред CAO, један од важних ензима бакра је феноксазиносинтаза (PHS). Овај ензим, који се налази у бактерији *Streptomyces antibioticus*,^{262,263} остварује каталичку активност у процесу купловања *o*-аминофенола, доводећи до стварања феноксазиносин хромофора. Овај процес је важан за биосинтезу актиномицина D, који је познат антитуморски агенс.²⁶⁴ Шема реакција које катализују ова два ензима је приказана на слици 45. Структура активног места ових ензима, као и њихов значај, подстакла је синтезу нових бакра(II) комплекса који би могли да опонашају њихову каталичку активност. До сада је испитивано неколико различитих динуклеарних, као и моноклеарних бакра(II) комплекса, који су показали оксидативну активност, што је од великог значаја за развој нових биокатализатора.²⁶⁵⁻²⁶⁷



Слика 45. Шема реакција које катализују ензими бакра, катехол оксидаза (CAO) и феноксазиносинтаза (PHS)

Имајући ове чињенице у виду, испитивана је способност комплекса **6** и **7** да опонашају активност катехол оксидазе и феноксазинон синтазе применом UV-Vis спектрофотометрије, коришћењем 3,5-ди-*tert*-бутилкатехол (3,5-DTBC) и *o*-аминофенола (OAP) као супстрата.²³⁹ 3,5-DTBC садржи волуминозне *tert*-бутил групе, које спречавају отварање прстена, и апсорбује на 400 nm услед формирања 3,5-ди-*tert*-бутилхинона (3,5-DTBQ).²⁶⁷ У складу са тим, испитивана је реакција оксидације метанолног раствора 3,5-DTBC у присуству комплекса **6** и **7** у смеси DMSO/метанол (*v/v* 1 : 9) растварача при аеробним условима на собној температури. Као што се са слике 46 може видети, постепено повећање интензитета апсорпције на 400 nm је у складу са оксидацијом 3,5-DTBC у 3,5-DTBQ. Поред тога, комплекси **6** и **7** опонашају активност PHS ензима, и катализују оксидацију OAP до 2-аминофеноксазин-3-она (APX). Наиме, у UV-Vis спектрима уочено је повећање апсорпције на 435 nm у присуству оба комплекса, што потврђује њихову каталитичку активност (Слика 46).²⁶⁸ Важно је напоменути да је изведен и експеримент у одсуству комплекса **6** и **7** при истим експерименталним условима, и да је количина оксидованих производа 3,5-DTBQ и APX занемарљива у односу на ону која настаје у присуству ових комплекса.

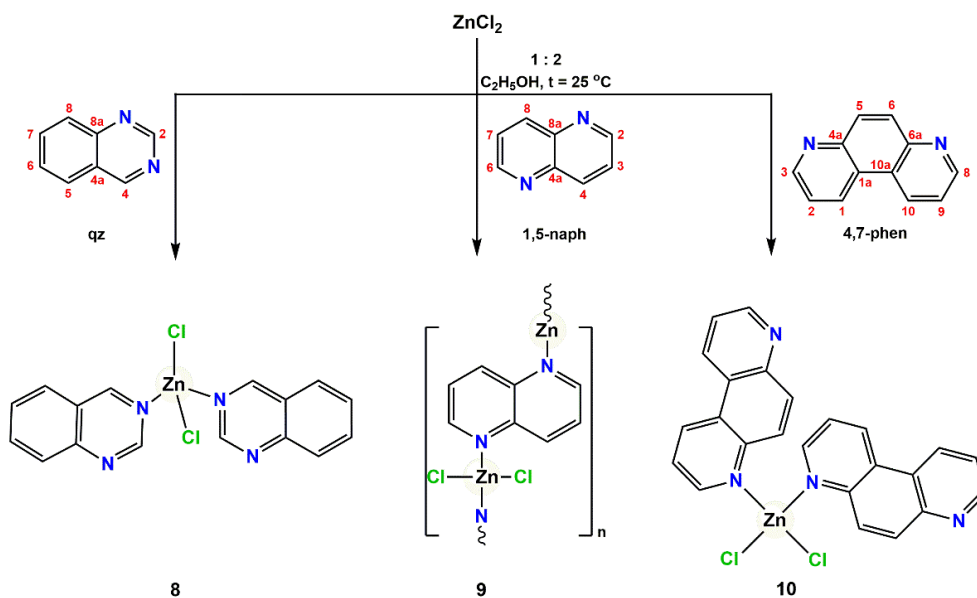


Слика 46. UV-Vis спектри за реакције комплекса **7** (1,0 mM, DMSO/метанол (*v/v* 1 : 9)) са 3,5-DTBC (A) и OAP (B) супстратима растућих концентрација (0 – 165 μM) у метанолу на собној температури. Стрелица показује промену интензитета апсорпције након додавања супстрата растућих концентрација

4.3. Синтеза, структурна карактеризација и антимикуробна активност цинк(II) комплекса са ароматичним *N*-хетероцикличним једињењима³

Ароматична *N*-хетероциклична једињења, хиназолин (qz), 1,5-нафтиридин (1,5-naph) и 4,7-фенантролин (4,7-phen), коришћена су као лиганди за синтезу цинк(II) комплекса.²⁶⁹ У реакцији ZnCl_2 са овим лигандима у 1 : 2 молском односу у етанолу на собној температури, добијени су $[\text{ZnCl}_2(\text{qz})_2]$ (**8**), $[\text{ZnCl}_2(1,5\text{-naph})_n]$ (**9**) и $[\text{ZnCl}_2(4,7\text{-phen})_2]$ (**10**) комплекси (Слика 47). Комплекси **8** – **10** су окарактерисани применом елементалне микроанализе и спектроскопских метода (^1H и ^{13}C NMR, IR и UV-Vis), док је њихова кристална структура одређена помоћу рендгенске структурне анализе. Испитивана је *in vitro* антимикуробна активност синтетисаних комплекса, као и њихова антипролиферативна активност на MRC-5 ћелијској линији. За комплекс **10**, који је показао најбољу активност према *Candida* сојевима, испитиван је његов утицај на инхибицију процеса филаментације код *S. albicans*, као и синергистични ефекат са клинички коришћеним антифунгалним агенсом, нистатином.

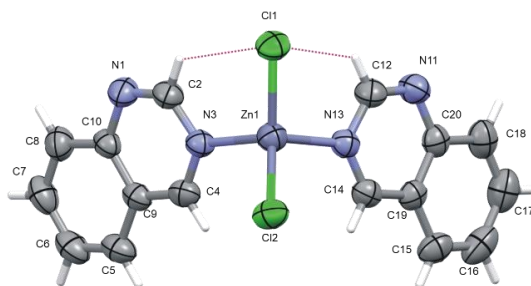
³ Резултати овог истраживања су објављени у раду Т. Р. Andrejević et al., *J. Inorg. Biochem.* **208** (2020) 111089 (Реф. 269).



Слика 47. Шематски приказ реакција за синтезу комплекса **8** – **10**. Нумерација атома угљеника у *N*-хетероцикличним лигандима је у складу са IUPAC номенклатуром и коришћена за NMR карактеризацију комплекса

4.3.1. Опис кристалних структура

Кристална структура комплекса **8** је приказана на слици 48.²⁶⁹ Координациони број $Zn(II)$ јона у овом комплексу је 4, а његову координациону сферу чине два атома азота из два различита qz лигананда, који су монодентатно координовани за јон метала, и два хлоридна анјона. Наиме, у Кембричкој структурној бази података (CSD) познато је 20 комплекса различитих јона метала ($Ag(I)$, $Cu(I)$, $Cu(II)$, $Cd(II)$, $Ru(II)$, $Mn(II)$ и $Pt(IV)$ јона) са овим лигандом, од којих у седам комплекса $Ag(I)$, $Cu(I)$ и $Cu(II)$, qz има улогу мостног лиганда.^{270,271}



Слика 48. Кристална структура комплекса **8**. Елипсоиди су дати са 50% вероватноће, а испрекиданим линијама су приказане интрамолекулске $C-H \cdots Cl$ водоничне везе²⁶⁹

Координационо окружење $Zn(II)$ јона се може објаснити квантитативним параметром, τ_4 индексом.²⁷² Вредност овог индекса се добија када се од 360° одузме збир два највећа угла која укључују јоне метала и та вредност подели са 141° . Вредност τ_4 индекса може бити у опсегу од 0 код идеалне квадратно-планарне до 1 у случају идеалне тетраедарске геометрије комплекса.²⁷² У мононуклеарном комплексу **8**, вредност τ_4 износи 0,92, што указује на скоро идеалну тетраедарску геометрију $Zn(II)$ јона (Табела 22). Два qz лигананда формирају угао од $80,4^\circ$. Супротно томе, у комплексима са фталазином (phtz) и хиноксалином (qx), који су изомерни хиназолину,

[ZnCl₂(phtz)₂] и [ZnCl₂(qx)₂], бензодиазински прстенови формирају углове 4,4 и 64,8°, респективно.^{273,274} С друге стране, диедарски угао између равни два phtz лиганда у [ZnBr₂(phtz)₂] комплексу износи 73,9°. Дужине Zn–N и Zn–Cl веза (Табела 22) су у очекиваном опсегу.

Табела 22. Одабране дужине веза (Å) и углови између веза (°) у комплексу **8**

Дужина везе (Å)		Угао између веза (°)	
Zn1–N3	2,050(2)	Cl1–Zn1–Cl2	122,12(4)
Zn1–N13	2,056(3)	Cl1–Zn1–N3	106,28(7)
Zn1–Cl1	2,2115(9)	Cl1–Zn1–N13	105,12(7)
Zn1–Cl2	2,2152(9)	Cl2–Zn1–N3	107,47(7)
		Cl2–Zn1–N13	108,24(7)
		N3–Zn1–N13	106,7(1)

Молекул комплекса **8** је стабилизован са две интрамолекулске C–H \cdots Cl водоничне везе (Слика 48), док су у његовој кристалној структури присутне и интермолекулске C–H \cdots N и C–H \cdots Cl интеракције (Табела 23). Хлоридни анјон и један од два некоординована атома азота учествују у slabим водоничним везама са C_{ar}–H донорима, доводећи до формирања центросиметричних димера, који су стабиловани са четири водоничне везе. Други хлоридни јон, окружен са четири суседна ароматична N-хетероциклична прстена из три различита комплекса, укључен је у неколико C–H \cdots Cl интеракција, али су све слабе, што је утврђено на основу геометријских параметара веза (најкраће интеракције овог типа су приказане у табели 23).

Табела 23. Геометријски параметри који описују најкраће интра- и интермолекулске водоничне везе у кристалима комплекса **8** – **10**

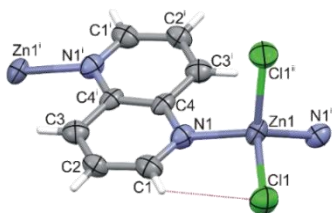
D–H \cdots A	D–H (Å)	H \cdots A (Å)	D \cdots A (Å)	D–H \cdots A (°)
8				
C2–H2 \cdots Cl1	0,93	2,86	3,493(3)	126,1
C2–H2 \cdots N1 ⁱ	0,93	2,65	3,380(4)	135,3
C12–H12 \cdots Cl1	0,93	2,83	3,460(3)	126,1
C18–H18 \cdots Cl2 ⁱⁱ	0,93	2,83	3,701(4)	155,9
C8–H8 \cdots Cl1 ⁱ	0,93	2,79	3,699(4)	166,5
9				
C1–H1 \cdots Cl1	0,93	2,81	3,450(5)	127,1
C1–H1 \cdots Cl1 ⁱⁱⁱ	0,93	2,95	3,710(5)	140,3
10				
C25–H25 \cdots Cl2	0,93	2,83	3,551(2)	134,9
C3–H3 \cdots Cl2	0,93	2,88	3,516(2)	126,9
C5–H5 \cdots Cl1	0,93	2,79	3,583(2)	144,0
C23–H23 \cdots Cl1	0,93	2,87	3,514(2)	127,0
C22–H22 \cdots N7 ^{iv}	0,93	2,54	3,367(3)	148,1
C8–H8 \cdots N27 ^v	0,93	2,50	3,421(3)	170,3

Симетријске трансформације: (i) $-x+1, -y, -z+1$; (ii) $-x+1/2, y-1/2, -z+3/2$; (iii) $-x, y, -z+1/2$; (iv) $-x, -y+1, -z+1$; (v) $x, y, z+1$.

Израчуната густина кристала комплекса **8** износи 1,586 g/cm³, што је мање у односу на вредности за комплексе, [ZnCl₂(phtz)₂] (1,638 g/cm³) и [ZnCl₂(qx)₂] (1,619 g/cm³), чије су структуре, такође, одређене на собној температури.^{273,274} Израчунат је и ткз. Китајгородски индекс паковања (К.Р.И.) применом програма

PLATON имплементираног у WINGX систему програма,²⁷⁵ који указује на проценат попуњеног простора у кристалу. Вредност овог индекса за комплекс **8** износи 68,9%, док код $[\text{ZnCl}_2(\text{phtz})_2]$ и $[\text{ZnCl}_2(\text{qx})_2]$ комплекса, има вредност од 71,4 и 70,4%, респективно. Слично кристалима комплекса **8**, структура $[\text{ZnCl}_2(\text{phtz})_2]$ је углавном стабилизована $\text{C}-\text{H}\cdots\text{Cl}$ водоничним везама, док су $\text{C}-\text{H}\cdots\text{N}$ интеракције мање повољне. С друге стране, у кристалима $[\text{ZnCl}_2(\text{qx})_2]$ су присутне π -интеракције, јер оба некоординована атома азота као акцептори водоничних веза у много мањој мери ометају те интеракције него што је то случај у комплексима **8** и $[\text{ZnCl}_2(\text{phtz})_2]$. На основу тога, може се извести закључак да не постоји јасна веза између густине кристала и индекса паковања са присутним интермолекулским интеракцијама.

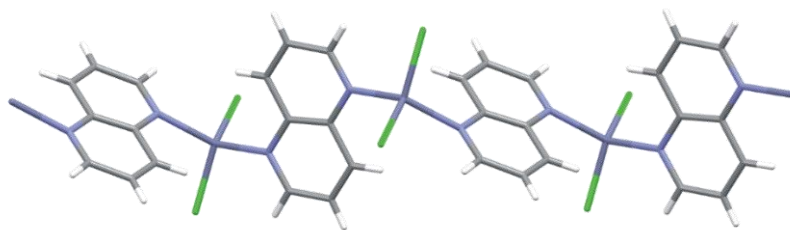
Основна јединица 1D координационог полинуклеарног комплекса **9** је приказана на слици 49.²⁶⁹ За $\text{Zn}(\text{II})$ јон координована су два атома азота из два 1,5-*parh* и два хлоридо лиганата. У комплексу **9** дужина $\text{Zn}-\text{N}$ везе износи 2,087(4) Å, док је дужина $\text{Zn}-\text{Cl}$ везе 2,2096(13) Å, при чему је $\text{Zn}-\text{N}$ веза у овом комплексу најдужа у серији структура **8** – **10**. Два координована 1,5-*parh* лиганда формирају угао од 82,3°. Вредност τ_4 индекса износи 0,89, што указује да је геометрија комплекса **9** дисторгована тетраедарска.



Слика 49. Основна јединица 1D координационог полинуклеарног комплекса **9**.

Елипсоиди су дати са 50% вероватноће, а испрекиданим линијама су приказане интрамолекуларске $\text{C}-\text{H}\cdots\text{Cl}$ водоничне везе. Симетријске трансформације: (i) 1-*x*, 1-*y*, 1-*z*; (ii) 1-*x*, *y*, $\frac{1}{2}$ -*z*²⁶⁹

Бесконачни ланци дуж *c*-правца у кристалу овог комплекса су међусобно повезани $\text{Cl}\cdots\pi$ интеракцијама, које се простиру у три димензије (Слика 50). С обзиром да је дужина $\text{Cl}\cdots\text{C}_g$ интеракције (C_g је центар гравитације ароматичног шесточланог *N*-хетероцикличног прстена) 3,499 Å,²⁷⁶ може се закључити да су те интеракције слабе, али с друге стране оне укључују све хлоридне анјоне, што је неопходно за стабилизацију структуре овог комплекса. Хлоридни анјони се налазе изнад центара *N*-хетероцикличних прстенова, а $\text{Zn}-\text{Cl}\cdots\text{C}_g$ угао износи 169,0°. Израчуната густина кристала је 1,914 g/cm³, док К.Р.И. индекс паковања износи 74,3%.

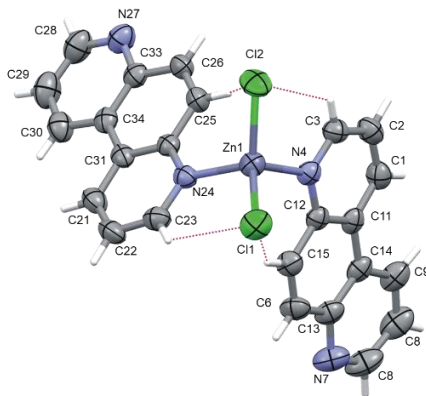


Слика 50. 1D координациони полимер **9** дуж *c*-правца²⁶⁹

Претрагом CSD базе података,^{270,271} нађено је да постоје три кристалне структуре комплекса који садрже 1,5-*parh* координован за јон метала и у свим случајевима ово једињење се понаша као мостни лиганд између два јона метала формирајући

1D координационе полимере.²⁷⁷⁻²⁷⁹ Бидентатни начин координације 1,5-naph је, такође, присутан у $[\text{Ag}(\text{X})(1,5\text{-naph})]_n$ комплексу ($\text{X} = \text{NO}_3^-$, CF_3COO^- и CF_3SO_3^-).¹⁹⁰ Поред тога, 1,5-Naph⁺ катјон може имати улогу у грађењу водоничних веза, што је случај у 1,5-naph, *trans*-диаквabis(оксалато)хромат(III) дихидрату, у коме *N*-донорски лиганд није координован за Cr(III) јон.²⁸⁰

У кристалној структури комплекса **10**, 4,7-phen лиганд се монодентатно координује за Zn(II) јон (Слика 51).²⁶⁹

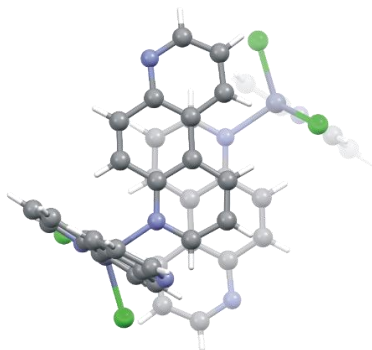


Слика 51. Кристална структура комплекса **10**. Елипсоиди су дати са 50% вероватноће, а испрекиданим линијама су приказане интрамолекулске C–H···Cl водоничне везе²⁶⁹

Поред монодентатног начина координације, 4,7-phen може имати улогу и мостног лиганда, што је утврђено претрагом CSD базе података.^{270,271} Бидентатном координацијом 4,7-phen за јон метала формирају се динуклеарни или полинуклеарни комплекси. Раније је синтетисан полинуклеарни комплекс цинка(II) са 4,7-phen, $[\text{Zn}(\text{NO}_3)_2(4,7\text{-phen})(\text{H}_2\text{O})]_\infty$,²⁸¹ који је добијен у реакцији $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ у ацетонитрилу са еквимоларном количином овог лиганда у метилен-хлориду,²⁸¹ као и $\{[\text{Zn}(\eta^2\text{-}4,7\text{-phen})\text{X}_2] \cdot \text{CH}_3\text{CN}\}_n$ ($\text{X} = \text{Br}^-$ и I^-) комплекси добијени у реакцији ZnBr_2 и ZnI_2 са 4,7-phen у 1 : 1 молском односу у смеси ацетонитрила и метанола.²⁸² Поред тога, 4,7-phen може формирати водоничне везе, као у ко-кристалима $\{[\text{Zn}(\text{NO}_3)_2(\text{H}_2\text{O})_4] \cdot (4,7\text{-phen})_2\}$, у којима азот-донорски лиганд није координован за Zn(II) јон.²⁸³

Као што се са слике 51 може видети, два 4,7-phen лиганда су монодентатно координована за Zn(II) јон, док преостала два координациона места заузимају хлоридо лиганди. Дужине Zn–N веза су 2,0747(16) Å, односно 2,0821(16) Å, док дужине Zn–Cl веза износе 2,2260(6) и 2,2207(6) Å. Два 4,7-phen лиганда формирају угао од 85,3°, а молекуларна структура комплекса је стабилизована са четири интрамолекулске C–H···Cl водоничне везе (Слика 51 и Табела 23). Вредност τ_4 индекса износи 0,96, што указује на скоро идеалну тетраедарску геометрију овог комплекса. Густина кристала комплекса **10** је много мања (1,565 g/cm³) у поређењу са $[\text{ZnCl}_2(1,10\text{-phen})_2]$ комплексом, чија је густина 1,742 g/cm³ на собној температури. Вредност К.Р.И. за комплекс **10** је 70%, док за $[\text{ZnCl}_2(1,10\text{-phen})_2]$ комплекс износи 72,1%.²⁸⁴

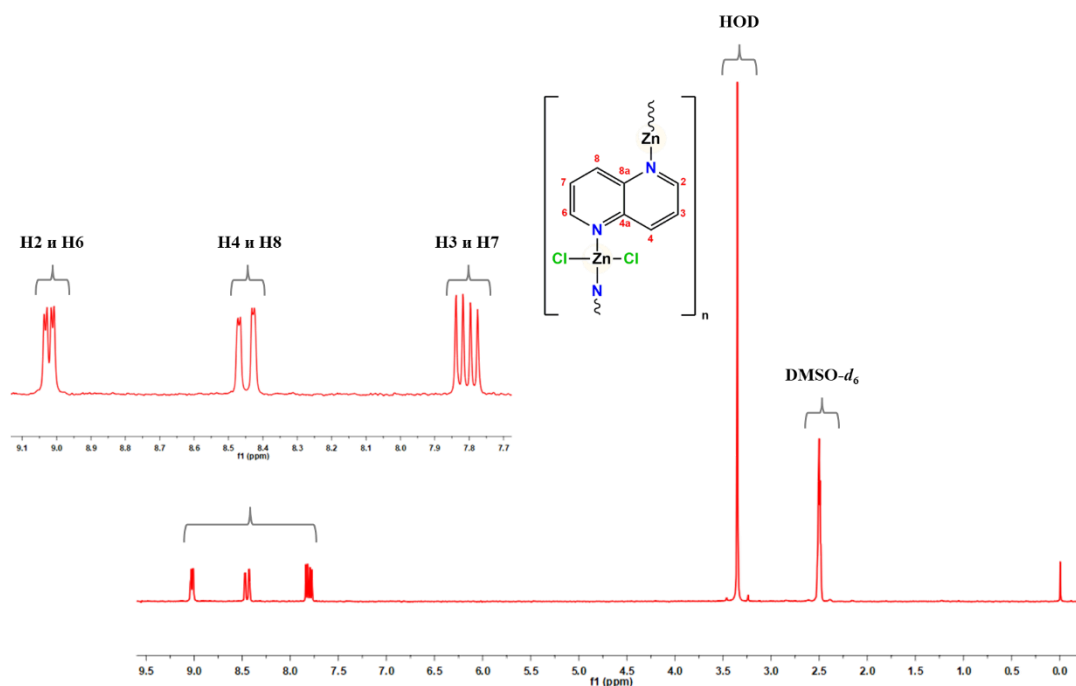
У кристалима комплекса **10**, π -интеракције укључују два од три фенантролинска прстена, односно централни прстен и прстен који садржи координовани атом азота. Преклапање ова два прстена је веома слично преклапању између слојева у графиту (Слика 52), док је паралелност равни у складу са симетријом комплекса. Растојање $\text{C}_g \cdots \text{C}_g$ износи 3,752(3) Å, а растојање равн··равн, дефинисано као растојање између центра једног прстена и равни суседног прстена, износи 3,492(3) Å (у просеку за два независна мерења).

Слика 52. π -интеракције у комплексу **10**²⁶⁹

4.3.2. Спектроскопска карактеризација

Инфрацрвени спектри комплекса **8** – **10** су у складу са њиховом структуром одређеном рендгенском структурном анализом.²⁶⁹ Карактеристичне вибрације ароматичног прстена, $\nu(\text{C}_{\text{ar}}=\text{C}_{\text{ar}})$ и $\nu(\text{C}_{\text{ar}}=\text{N})$, налазе се у очекиваном опсегу ($1625 - 1480 \text{ cm}^{-1}$), потврђујући на тај начин координацију одговарајућег *N*-хетероцикличног лиганда за $\text{Zn}(\text{II})$ јон.

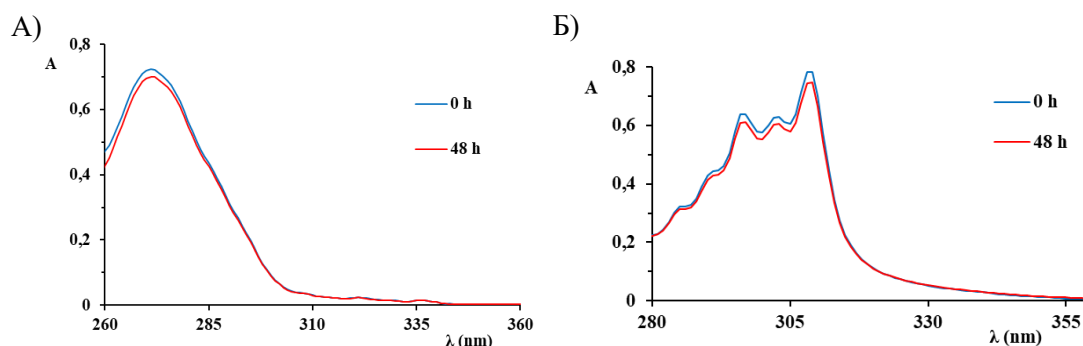
У циљу потврђивања координације одговарајућег *N*-хетероцикличног лиганда за $\text{Zn}(\text{II})$ јон у раствору снимљени су NMR (^1H и ^{13}C) спектри комплекса **8** – **10** у $\text{DMSO-}d_6$ (на слици 53 приказан је ^1H NMR спектар за **9**). У њиховим NMR спектрима присутни су сигнали који потичу од *N*-хетероцикличног лиганда, при чему су они незнатно померени у односу на одговарајућа померања некоординованих лиганда, што је у складу са спектроскопским понашањем раније синтетисаних комплекса цинка(II) са структурно сличним лигандима.^{285,286} Поред тога, снимањем ^1H NMR спектра комплекса **9** у $\text{DMSO-}d_6/\text{D}_2\text{O}$ (v/v 1 : 9) утврђено је да овај комплекс задржава своју структуру у присуству воде као растварача.

Слика 53. ^1H NMR спектар комплекса **9** у $\text{DMSO-}d_6$

Снимљени су UV-Vis спектри комплекса **8** – **10** у DMSO на собној температури ($c = 1,5 \times 10^{-4}$, $8,0 \times 10^{-5}$ и $1,5 \times 10^{-5}$ М, респективно), који су поређени са одговарајућим спектрима некоординованих *N*-хетероцикличних лиганата.²⁶⁹ Апсорпциони максимуми на 304, 308 и 271 nm у UV-Vis спектрима комплекса **8** – **10** потичу од карактеристичног $\pi \rightarrow \pi^*$ прелаза у лиганду.^{152,287,288}

4.3.3. Стабилност комплекса у раствору

Стабилност комплекса **8** – **10** у раствору је испитивана применом UV-Vis и NMR спектроскопије, као и мерењем моларне проводљивости.²⁶⁹ С обзиром да су NMR спектри комплекса снимљени одмах након њиховог растварања и након 48 h скоро идентични, закључено је да одговарајући *N*-хетероциклични лиганди остају координовани за Zn(II) јон током испитиваног временског периода, као и да не долази до координације DMSO. Поред тога, у UV-Vis спектрима комплекса **8** – **10** долази до смањења интензитета апсорпционог максимума након 48 h за 15, 5 и 3%, респективно, у односу на интензитет непосредно након њиховог растварања комплекса, али се положај апсорпционог максимума и облик спектра не мења (Слика 54). Вредности моларне проводљивости комплекса **8** – **10** у DMSO су много мање од $50 \Omega^{-1}\text{cm}^2\text{mol}^{-1}$, што потврђује да су ови комплекси неелектролити, односно да задржавају своју структуру у раствору.²¹⁴



Слика 54. Стабилност комплекса **9** (А) и **10** (Б) у DMSO праћена током 48 h применом UV-Vis спектрофотометрије на 25 °C

4.3.4. Биолошка активност

Антимикробна активност

Антимикробна активност комплекса **8** – **10**, одговарајућих *N*-хетероцикличних лиганата и ZnCl₂, испитивана је на две Грам-позитивне (*S. aureus* и *L. monocytogenes*), на две Грам-негативне (*P. aeruginosa* и *E. coli*) бактеријске врсте и на два *Candida* соја (*C. albicans* и *C. parapsilosis*) применом дифузионе методе (концентрација једињења је 500 $\mu\text{g/mL}$).²⁶⁹ Као што се из табеле 24 може видети, значајније зоне инхибиције за комплексе **8** – **10** уочене су само у случају *Candida* сојева. Поред комплекса, 4,7-phen и ZnCl₂ инхибирају раст тестираних гљивица, али не утичу на раст тестираних бактерија. Раст *P. aeruginosa* није инхибиран присуством ниједног испитиваног једињења. Умерена инхибиторна активност комплекса **8** – **10** је примећена на *S. aureus*, при чему је комплекс **10** најактивнији. Поред тога, једино је комплекс **10** инхибирао раст *L. monocytogenes*. У табели 24 нису приказане вредности зоне инхибиције за qz и 1,5-*naph* лиганде, јер нису били активни према тестираним микроорганизмима.

Табела 24. Антимикробна активност комплекса **8** – **10**, 4,7-phen и ZnCl₂, изражена као зона инхибиције раста (mm) на дисковима који садрже 500 µg/mL једињења

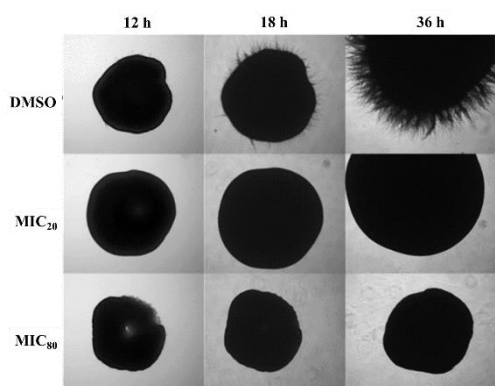
	8	9	10	ZnCl ₂	4,7-phen
<i>S. aureus</i>	1,5	1,5	3	–	–
<i>P. aeruginosa</i>	–	–	–	–	–
<i>E. coli</i>	–	1,5	3	–	–
<i>L. monocytogenes</i>	–	–	1,5	–	–
<i>C. albicans</i>	2	2	3	4	6
<i>C. parapsilosis</i>	8	6,5	7	5	6

– = није уочена зона

За разлику од комплекса **8** који садржи qz лиганд, полинуклеарни комплекси сребра(I) са истим лигандом, {[Ag(CF₃SO₃)(qz)]₂}_n, {[Ag(qz)][BF₄]}_n и [Ag(NO₃)(qz)]_n, показали су значајну активност према Грам-негативној бактерији *P. aeruginosa*.^{152,287} С друге стране, полинуклеарни комплекси сребра(I) са 1,5-naph, опште формуле [Ag(X)(1,5-naph)]_n (X = NO₃⁻, CF₃COO⁻ и CF₃SO₃⁻), активни су према *Candida* сојевима.¹⁹⁰ Поред тога, полинуклеарни комплекси сребра(I) са 4,7-phen, [Ag(NO₃)(4,7-phen)]_n и [Ag(CF₃COO)(4,7-phen)]_n, показали су активност на *C. albicans* при *in vivo* испитивањима.²⁸⁸ Међутим, комплекси **8** – **10** су мање токсични према MRC-5 ћелијској линији у односу на полинуклеарне комплексе сребра(I) са истим *N*-хетероцикличним лигандима.^{152,190,287}

Ефекат комплекса **10** на инхибицију филаментног раста *C. albicans*

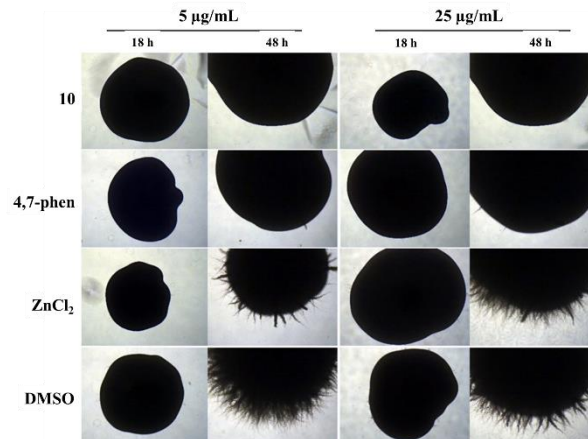
С обзиром да је комплекс **10** показао најбољу анти-*Candida* активност, испитиван је његов утицај на формирање хифа применом две субинхибиторне концентрације, 20 и 80% од МИС вредности (МИС₂₀ и МИС₈₀) у поређењу са DMSO као контролом (Слика 55). Обе субинхибиторне концентрације комплекса су у потпуности инхибирале формирање хифа после 12 h. Овај ефекат комплекса **10** је сличан ефекту комплекса сребра(I) са 4,7-phen и 1,5-naph, који су, такође, показали активност при субинхибиторним концентрацијама.^{190,288}



Слика 55. Ефекат комплекса **10** на раст хифа код *C. albicans* (МИС₂₀ и МИС₈₀, односно 50 и 200 µg/mL)

Ефекат комплекса **10** је даље испитиван смањењем његове концентрације и поређењем овог ефекта са ефектом одговарајућег лиганда и ZnCl₂ (Слика 56). Комплекс **10** при 25 µg/mL потпуно инхибира филаментацију, што је уочено и код 4,7-phen лиганда при истој концентрацији, док је ефекат Zn(II) соли знатно мањи.

Даљим смањењем концентрације комплекса **10** на 5 $\mu\text{g/mL}$, задржава се његово ефикасно деловање (Слика 56).



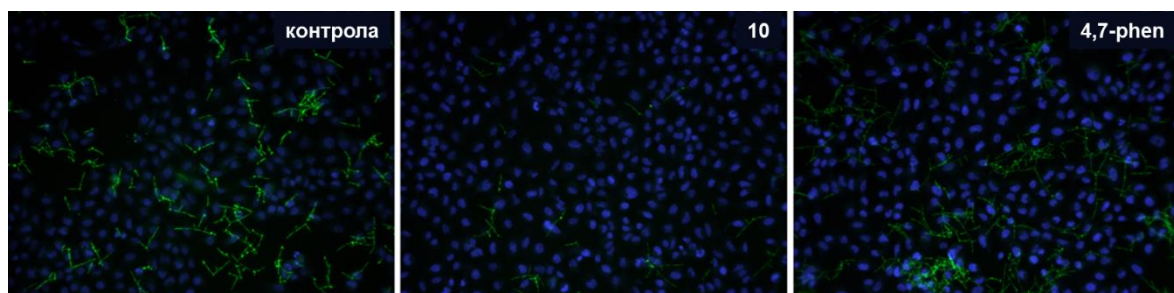
Слика 56. Ефекат комплекса **10**, 4,7-phen и ZnCl_2 на раст хифа код *C. albicans* при 5 и 25 $\mu\text{g/mL}$

Ефекат Zn(II) јона на раст *C. albicans* је примећен још 1975. године, када је утврђено да је при концентрацијима овог јона већим од 10 μM инхибиран раст гљивице.²⁸⁹ Претпостављено је да Zn(II) јони немају ефекат на метаболизам протеина и DNA, већ да учествују у метаболизму RNA код *C. albicans* (Zn(II) јон је неопходан за синтезу и спречавање деградације овог биомолекула). Овај ефекат је даље проучаван *in vitro*, а поред концентрације Zn(II) јона, утврђено је да температура у великој мери утиче на раст *C. albicans*.^{290,291}

Цитотоксичност и адхезиони тест комплекса **10**

Да би се комплекси **8** – **10** даље разматрали као потенцијални антифунгални агенси, било је неопходно испитати њихову цитотоксичност на нормалној ћелијској линији фибробласта плућа (MRC-5).²⁶⁹ Комплекс **10** је показао најмању токсичност на MRC-5 ћелијској линији са IC_{50} од 60 $\mu\text{g/mL}$, у поређењу са комплексима **8** и **9** чије IC_{50} вредности износе 35 и 40 $\mu\text{g/mL}$. Токсични ефекат 4,7-phen лиганда на MRC-5 ћелијској линији је раније испитиван ($\text{IC}_{50} = 12,5 \mu\text{g/mL}$).²⁸⁸

Комплекс **10** је, при концентрацији која одговара 20% од IC_{50} вредности, ефикасно спречио адхезију *C. albicans* на A549 ћелије карцинома плућа (Слика 57).²⁶⁹ Овај комплекс је ефикаснији у сузбијању адхезије у односу на контролу и 4,7-phen, што указује на његову потенцијалну улогу у спречавању колонизације *C. albicans*.

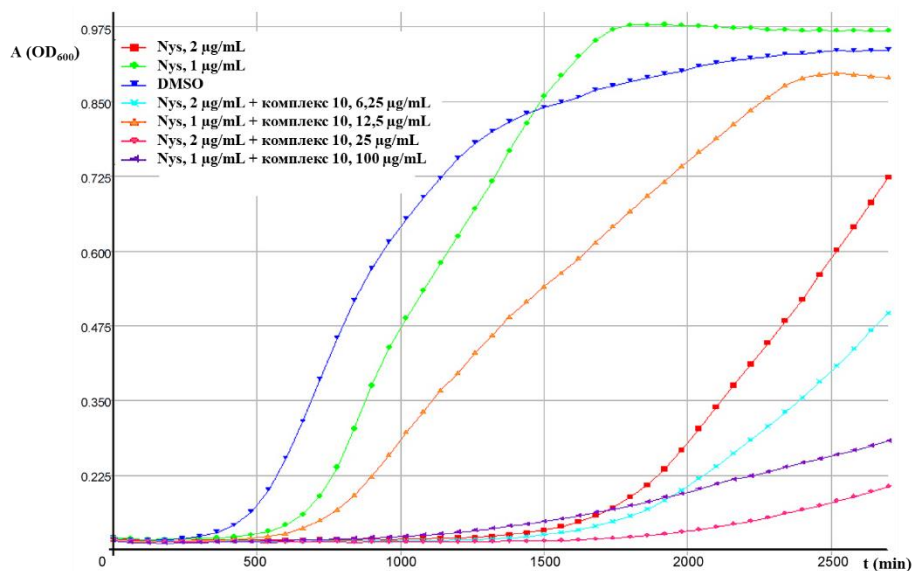


Слика 57. Ефекат комплекса **10** и 4,7-phen (20% од IC_{50} вредности, 12,5 и 2,5 $\mu\text{g/mL}$ за **10** и 4,7-phen лиганд, респективно) на адхезију *C. albicans* на A549 ћелије карцинома плућа (20 \times увећање)

Синергистички ефекат комплекса **10** са нистатином

У складу са антифунгалном активношћу комплекса **10**, испитиван је синергистички ефекат овог комплекса са клинички коришћеним антимикотиком нистатином (MIC_{80} и MIC_{40} , 2 и 1 $\mu\text{g/mL}$, респективно).²⁶⁹ Ефекат комплекса **10** на раст *C. albicans* је праћен током 48 h, а за поређење коришћене су културе гљивица третиране са DMSO (Слика 58). Обе субинхибиторне концентрације нистатина су успориле раст *C. albicans*, с тим што је гљивица третирана са 1 $\mu\text{g/mL}$ (MIC_{40}) нистатина у току 48 h потпуно порасла, као и у случају контроле, док је гљивица третирана са 2 $\mu\text{g/mL}$ нистатина (MIC_{80}) постигла 80% раста. С друге стране, додавањем комплекса **10** сузбијен је раст *C. albicans* у испитиваном временском периоду. Када се 25 $\mu\text{g/mL}$ комплекса **10** дода MIC_{80} концентрацијама нистатина, раст *C. albicans* је инхибиран у довољној мери, као и у присуству комплекса у концентрацији 100 $\mu\text{g/mL}$, док се додавањем комплекса **10** при 6,25 $\mu\text{g/mL}$ постиже снажан фунгистатски ефекат, односно раст гљивице је смањен 50% у односу на контролу.

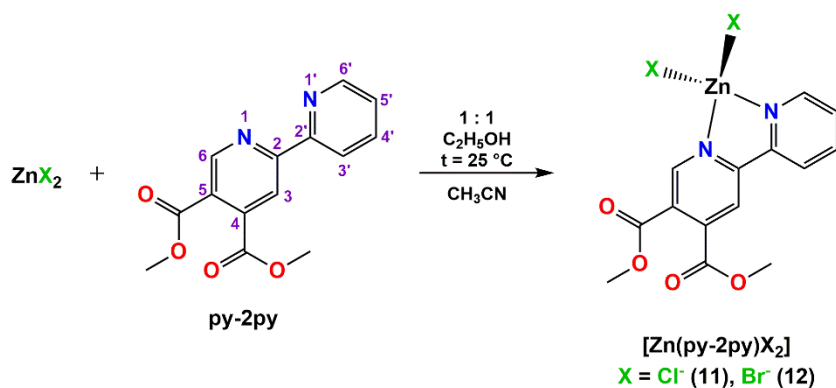
На основу ових резултата, може се закључити да комплекс **10** има синергистички ефекат, односно да поспешује дејство нистатина. Тај ефекат се може приписати комбинацији два различита механизма деловања, на чему се и заснива комбинована антифунгална терапија.²⁹² С обзиром на појаву антифунгалне резистентности, као и недостатак лекова за лечење гљивичних инфекција, уочена активност комплекса **10** је од великог значаја, јер се смањењем дозе нистатина у присуству овог комплекса постиже позитиван ефекат на њихову токсичности, као и на отежану појаву резистентности.



Слика 58. Ефекат субинхибиторних концентрација комплекса **10** на антифунгалну активност нистатина (Nys). Раст *C. albicans* је праћен мерењем оптичке густине (OD_{600}) у односу на DMSO контролу. $MIC_{Nys} = 2,5 \mu\text{g/mL}$

4.4. Синтеза, структурна карактеризација и антимикуробна активност цинк(II) комплекса са диметил-2,2'-бипиридин-4,5-дикарбоксилатом⁴

Реакције ZnX_2 ($X = Cl^-$ и Br^-) са диметил-2,2'-бипиридин-4,5-дикарбоксилатом (py-2py) изведене су у еквимоларном односу у етанолу на собној температури, при чему су добијени мононуклеарни $[Zn(py-2py)X_2]$, $X = Cl^-$ (**11**) и Br^- (**12**), комплекси (Слика 59).²⁹³ Ови комплекси су окарактерисани применом елементалне микроанализе, IR, 1H NMR, UV-Vis спектроскопије и кондуктометрије, док је њихова кристална структура одређена применом рендгенске структурне анализе. Испитивана је *in vitro* антимикуробна активност комплекса **11** и **12** на две бактеријске (*P. aeruginosa* и *S. aureus*) и две гљивичне врсте (*C. albicans* и *C. parapsilosis*), као и *in vivo* токсичност на моделу *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*). Поред тога, испитиван је њихов утицај на филаментацију и формирање биофилма код *C. albicans* соја, као и интеракције са BSA и ct-DNA.

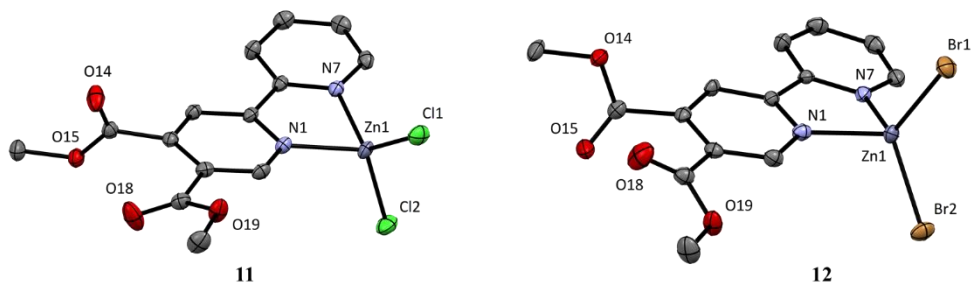


Слика 59. Шематски приказ реакције за синтезу комплекса **11** и **12**. Нумерација атома у лиганду је коришћена за NMR карактеризацију комплекса

4.4.1. Опис кристалних структура

Молекулске структуре комплекса **11** и **12** су приказане на слици 60. Лиганд py-2py је бидентатно координован за $Zn(II)$ јон преко пиридинских атома азота, док преостала два координациона места заузимају халогенидо лиганди, формирајући електронеутралне комплексе.²⁹³ Ови комплекси су изоструктурни и кристалишу у моноклиничној просторној групи $I2/a$. Координацијом већег бромидо лиганда за $Zn(II)$ јон у комплексу **12** долази до очекиваног повећавања запремине, као што је приказано у табели 8 у Експерименталном делу дисертације (3.3.4.). Дужине веза и углови између веза су у очекиваном опсегу (Табела 25).

⁴ Резултати овог истраживања су објављени у раду Т. Р. Andrejević et al., *Inorganics* **10** (2022) 71. (Реф. 293).



Слика 60. Кристалне структуре комплекса **11** и **12**. Елипсоиди су дати са 50% вероватноће. Атоми водоника су изостављени²⁹³

Табела 25. Одабране дужине везе (Å), углови између веза (°) и структурни параметри комплекса **11** и **12**

	11	12
Zn–N1 (Å)	2,071(1)	2,069(3)
^a Zn–N1' (Å)	2,069(1)	2,062(3)
Zn–X1 (Å)	2,2099(7)	2,3369(9)
Zn–X2 (Å)	2,2017(8)	2,3399(7)
X–Zn–X (°)	114,58(2)	113,35(2)
^b φ (°)	81,15	80,02
^b τ ₄ ²⁷²	0,85	0,83
^b τ' ₄ ^{294,295}	0,82	0,80

^aкристалографска ознака за N1' атом у молекулској структури је N7; ^b φ = угао између равни које су дефинисане ZnNN и ZnXX атомима. ^bτ₄ = [360° – (α + β)/(360° – 2θ)]; τ'₄ = [(β – α)/(360° – 2θ)] + [(180° – β)/(360° – θ)]; α и β су два највећа валентна угла координационог центра; θ је тетраедарски угао од 109,471°

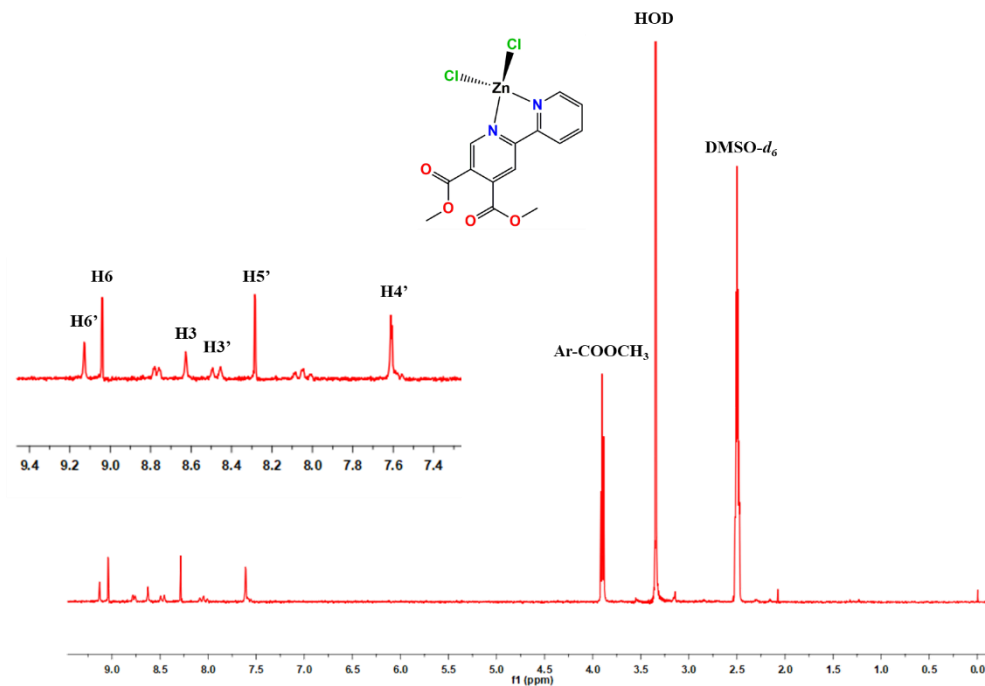
Оба комплекса имају дисторговану тетраедарску геометрију са вредностима тетраедарских индекса τ₄ и τ'₄ у опсегу од 0,80 до 0,85 (Табела 25). Ове вредности се значајно разликују од τ₄ и τ'₄ вредности за идеалну квадратно-планарну геометрију (τ₄ = 0 и τ'₄ = 0),²⁷² а приближније су вредностима за идеалну тетраедарску геометрију (τ₄ = 1 и τ'₄ = 1).^{294,295} Дисторзији тетраедарске геометрије доприносе π-π интеракције, као и слабе C–H...X водоничне везе, које доводе до благог нагиба ZnXX ка ZnNN равни, одступајући од идеалног угла од 90°.

4.4.2. Спектроскопска карактеризација

У IR спектрима комплекса **11** и **12** присутне су интензивне траке на приближно 1740 и 1380 cm⁻¹, које потичу од асиметричних и симетричних валенционих вибрација, респективно, карбоксилатне групе ру-2ру лиганда.²⁹³

Протонски NMR спектри комплекса **11** и **12** су снимљени у DMSO-*d*₆ (спектар за комплекс **11** је приказан на слици 61), и поређени са спектром некоординованог лиганда. Број сигнала у ¹H NMR спектрима комплекса је исти као и у спектру ру-2ру лиганда. У ароматичној област јављају се сигнали који одговарају протонима из пиридинских прстенова, који су услед координације ру-2ру за Zn(II) јон, у већини случајева, незнатно померени ка већој вредности хемијског померања. Највеће хемијско померање у ¹H NMR спектрима комплекса **11** и **12** је уочено за H6 и H5' протоне, што је и очекивано, с обзиром да се они налазе у непосредној близини атома азота пиридинских прстенова, који се координују за Zn(II) јон. Поред протона у ароматичној

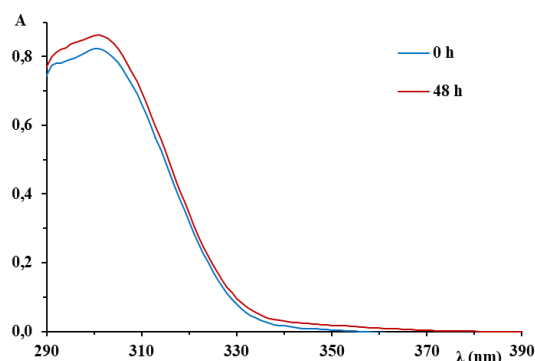
области, у ^1H NMR спектрима комплекса **11** и **12** јавља се сигнал на приближно 3,90 ppm који потиче од алифатичних CH_3 протона естарске групе.²⁹³



Слика 61. ^1H NMR спектар комплекса **11** у $\text{DMSO-}d_6$

4.4.3. Стабилност комплекса у раствору

Стабилност комплекса **11** и **12** у раствору је праћена снимањем њихових UV-Vis спектра одмах након растварања у DMSO , као и након 24 и 48 h.²⁹³ Пошто током овог периода нису уочене значајне промене у интензитету и положају апсорпционог максимума комплекса, може се закључити да ру-2ру лиганд остаје координован за Zn(II) јон у раствору (Слика 62).



Слика 62. Стабилност комплекса **12** у DMSO праћена током 48 h применом UV-Vis спектрофотометрије на $25\text{ }^\circ\text{C}$

Додатно, стабилност комплекса **11** и **12** у раствору је потврђена мерењем моларне проводљивости, чије су вредности у складу са чињеницом да су ови комплекси у DMSO неелектролити. Наиме, вредности моларне проводљивости мање од $50\ \Omega^{-1}\text{cm}^2\text{mol}^{-1}$ указују да не долази до супституције координованог хлоридо лиганда DMSO растварачем.²¹⁴

4.4.4. Биолошка активност

Антимикробна и цитотоксична активност

Антимикробна активност комплекса **11** и **12**, ру-2ру лиганда и ZnX_2 соли ($X = Cl^-$ и Br^-) испитивана је према бактеријама *P. aeruginosa* и *S. aureus*, и *Candida* сојевима, *C. albicans* и *C. parapsilosis* (Табела 26).²⁹³ Као што из табеле 26 може видети, само комплекс **11** показује активност према *Candida* сојевима са МИС од 62,5 $\mu\text{g/mL}$, док комплекс **12**, ру-2ру лиганд и ZnX_2 не показују активност према тестираним сојевима бактерија и гљивица. Поред тога, испитивана је *in vitro* цитотоксичност једињења на MRC-5 ћелијској линији, при чему су IC_{50} вредности у опсегу од 22 $\mu\text{g/mL}$ за $ZnBr_2$ до 120 $\mu\text{g/mL}$ за ру-2ру (Табела 26). Мања IC_{50} вредност за комплекс **11** указује на његову већу цитотоксичност у односу на комплекс **12**.

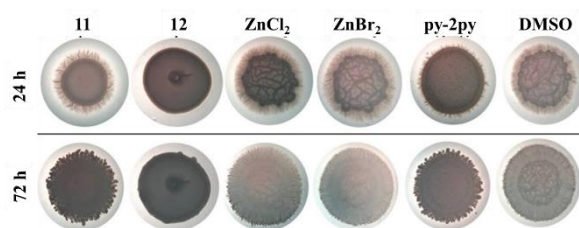
Табела 26. Антимикробна активност (МИС, $\mu\text{g/mL}$) и цитотоксичност (IC_{50} , $\mu\text{g/mL}$) комплекса **11** и **12**, ру-2ру лиганда и ZnX_2 соли ($X = Cl^-$ и Br^-)

	11	12	ру-2ру	$ZnCl_2$	$ZnBr_2$
<i>P. aeruginosa</i> PAO1	>500	>500	>500	>500	>500
<i>S. aureus</i> 25923	500	>500	>500	500	500
<i>C. albicans</i> 10231	62,5	>500	>500	>500	>500
<i>C. parapsilosis</i> 22019	62,5	>500	>500	>500	>500
MRC-5	33 ± 1	75 ± 2	120 ± 4	36 ± 1	22 ± 1

Поред *in vitro* испитивања, токсичност једињења је испитивана и *in vivo* коришћењем црва *C. elegans* као модел организма, који се показао врло погодним за биолошка тестирања због својих особина, као што су димензија око 1 mm, брзи циклус размножавања до 3 дана, кратки животни век од 2 до 3 недеље и велика подударност резултата са одговарајућим резултатима добијеним за експерименталне животиње.²⁹⁶ Сви црви су преживели, чак и у присуству највише концентрације комплекса **11** и **12** од 500 $\mu\text{g/mL}$, током инкубације од 72 h.

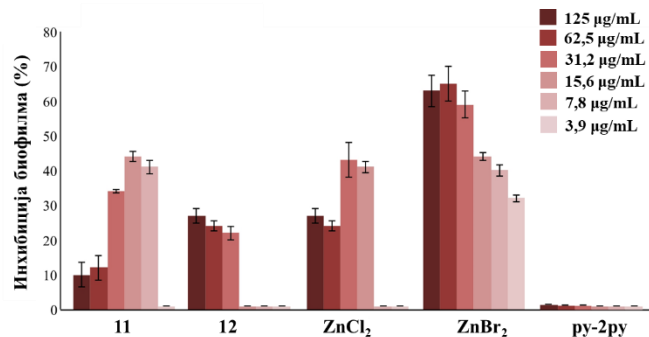
Ефекат комплекса на филаментацију и формирање биофилма *C. albicans* соја

Испитиван је ефекат комплекса **11** и **12** на процесе важне за патогенезу, укључујући филаментацију и формирање биофилма, код *C. albicans*.^{297,298} Инхибиција филаментације *C. albicans* гљивице је праћена при концентрацији комплекса од 50 $\mu\text{g/mL}$, при чему само комплекс **12** инхибира формирање хифа, чак и након 72 h инкубације (Слика 63).



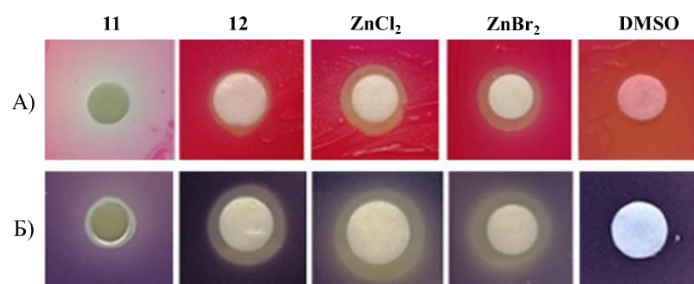
Слика 63. Ефекат комплекса **11** и **12**, ру-2ру лиганда и ZnX_2 соли ($X = Cl^-$ и Br^-) (50 $\mu\text{g/mL}$) на процес филаментације код *C. albicans* на чврстој подлози. DMSO је коришћен као контрола

Као што је већ напоменуто, филаментација представља предуслов за формирање биофилма код *S. albicans*, због чега је испитиван утицај комплекса **11** и **12**, одговарајућих соли и ру-2ру лиганда на инхибицију овог процеса (Слика 64).²⁹³ Комплекс **11** је показао умерени инхибиторни ефекат на формирање биофилма, односно концентрације овог комплекса од 7,8 до 31,2 $\mu\text{g/mL}$ инхибирају овај процес за 30 – 45%. Комплекс **12** је показао мању активност у односу на **11**, при чему овај комплекс при 125 $\mu\text{g/mL}$ инхибира формирање биофилма за 25%. С друге стране, ZnBr_2 је показао највећу активност од свих испитиваних једињења, док ру-2ру лиганд није показао инхибиторни ефекат (Слика 64).



Слика 64. Инхибиција формирања биофилма код *S. albicans* ATCC 10231 у присуству комплекса **11** и **12**, одговарајућих цинк(II) соли и ру-2ру лиганда

Испитивана је и анти-QS активност комплекса **11** и **12**, одговарајућих соли и ру-2ру лиганда, на инхибицију продукције продигиозина помоћу *S. marcescens* и виолацеина коришћењем *S. violaceum* CV026.²⁹³ Дискови са овим бактеријским сојевима су третирани са 500 μg испитиваног једињења, при чему је само комплекс **11** показао умерену инхибиторну активност на продукцију продигиозина са измереном зоном инхибиције од 8 mm (Слика 65). Поред тога, овај комплекс **11**, у извесној мери, инхибира продукцију биопигмента код *S. violaceum* CV026.

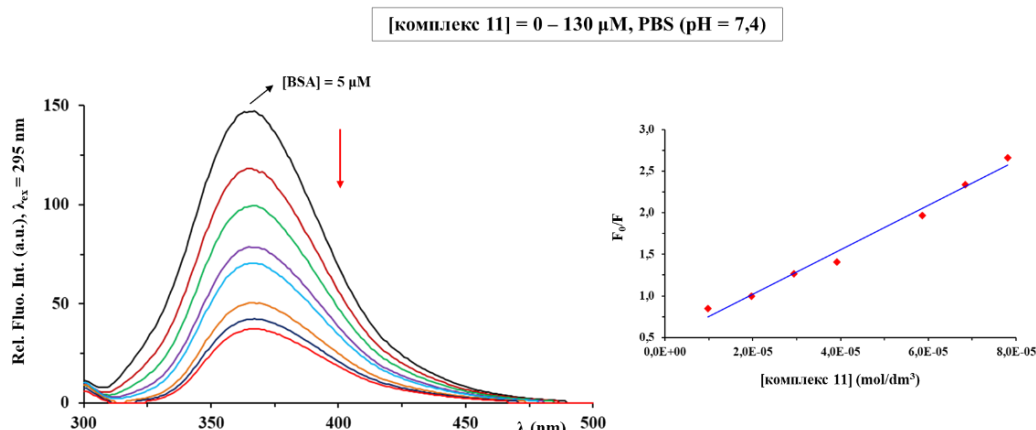


Слика 65. Инхибиција продукције продигиозина код *S. marcescens* (А) и виолацеина код *S. violaceum* CV026 (Б) у присуству 500 μg комплекса **11** и **12**, одговарајућих соли и ру-2ру лиганда по диску

4.4.5. Интеракције са BSA

Могућност транспорта комплекса **11** и **12** до циљане ћелије је одређена испитивањем њихових интеракција са BSA у фосфатном пуферу применом флуоресцентне емисионе спектроскопије.²⁹³ На слици 66 приказани су емисиони спектри BSA константне концентрације (5 μM) у присуству комплекса **11** растуће

концентрације (0 – 130 μM), при чему долази до смањења интензитета флуоресценције, као последица везивања комплекса за BSA.



Слика 66. Флуоресцентни емисиони спектри BSA у присуству комплекса **11** растуће концентрације. Инсертована слика представља Стерн-Волмеров дијаграм

Везивање комплекса **11** и **12** за BSA доводи до статичког механизма гашења флуоресценције, што потврђују K_q вредности, које су веће од $2,0 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (Табела 27). Поред тога, n вредност за ове комплексе је 1,07 и 1,19, респективно, указујући на то да се транспорт комплекса до циљане ћелије остварује њиховим везивањем за једно место у протеину.

Табела 27. Вредности везујућих константи комплекса **11** и **12** за BSA

Комплекс	$K_{sv} (\text{M}^{-1})$	Хипохромизам (%)	$K_q (\text{M}^{-1}\text{s}^{-1})$	$K_A (\text{M}^{-1})$	n
11	$(5,33 \pm 0,07) \times 10^4$	74,7	$5,23 \times 10^{12}$	$2,20 \times 10^5$	1,19
12	$(1,78 \pm 0,05) \times 10^4$	45,6	$1,78 \times 10^{12}$	$3,17 \times 10^4$	1,07

4.4.6. Интеракције са DNA

Флуоресцентна емисиона спектроскопија

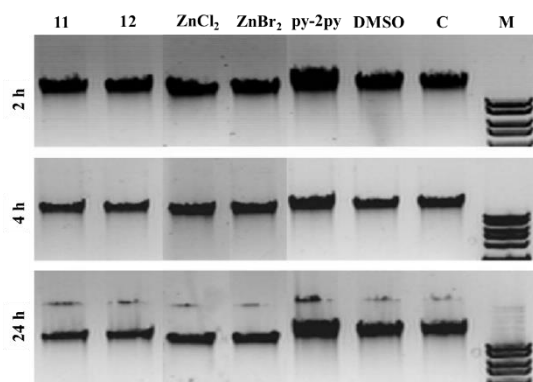
Афинитет везивања комплекса за **11** и **12** за EthBr-ct-DNA систем је испитиван применом флуоресцентне емисионе спектроскопије. Додавањем испитиваних комплекса у EthBr-ct-DNA систем уочава се смањење интензитета флуоресценције, што указује да комплекси интерагују са овим системом.²⁸⁸ На основу вредности константе везивања (K_A ; Табела 28) за комплексе **11** и **12**, које су много мање од K_A вредности за интеркалирајуће агенсе, може се закључити да ови комплекси нису интеркалирајући агенси.²²⁷ Овај закључак је у складу са вредностима процента хипохромизма, које су, такође, мање од 50%.²⁶⁰ Комплекс **12** показује већи афинитет везивања за EthBr-ct-DNA систем у односу на **11**, услед брже хидролизе Zn–Br у односу на Zn–Cl везу, што је последица разлике у величини бромидо и хлоридо лиганата. Ово је, такође, омогућено чињеницом да Zn(II) јон може да се понаша и као тврда и као мека Луисова киселина, а Br⁻ анион као мека Луисова база, док је Cl⁻ на граници између меке и тврде базе.²⁹⁹ Већи афинитет везивања комплекса **12** за EthBr-ct-DNA потврђују и већа n вредност за овај комплекс (Табела 28). Вредности константи K_q за оба комплекса су у складу са статичким механизмом гашења флуоресценције (Табела 28).²²⁷

Табела 28. Вредности везујућих константи комплекса **11** и **12** за ct-DNA

Комплекс	$K_{sv} (M^{-1})$	Хипохромизам (%)	$K_q (M^{-1}s^{-1})$	$K_A (M^{-1})$	n
11	$(9,28 \pm 0,01) \times 10^2$	14,8	$9,28 \times 10^{10}$	14,2	0,49
12	$(1,73 \pm 0,01) \times 10^3$	14,4	$1,73 \times 10^{11}$	$7,77 \times 10^4$	1,45

Гел електрофореза

Интеракције комплекса **11** и **12**, одговарајућих соли и py-2py лиганда са DNA су, такође, испитиване применом гел електрофорезе.²⁹³ У ову сврху, коришћен је λ DNA биомолекул, који је третиран са 500 $\mu\text{g/mL}$ испитиваног једињења и инкубиран на 37 °C. Након инкубације за време од 2, 4 и 24 h, узорци су обојени са EthBr, стављени у бунариће и изведена је електрофореза (Слика 67). Као контрола коришћен је DMSO, чији утицај на λ DNA није уочен. Поред тога, није примећен ефекат воде и py-2py лиганда. С друге стране, у присуству комплекса **11** и **12** и ZnX_2 соли ($X = \text{Cl}^-$ и Br^-) смањен је интензитет обојења EthBr, при чему се закључује да су комплекси активни и након 4 h инкубације (Слика 67).



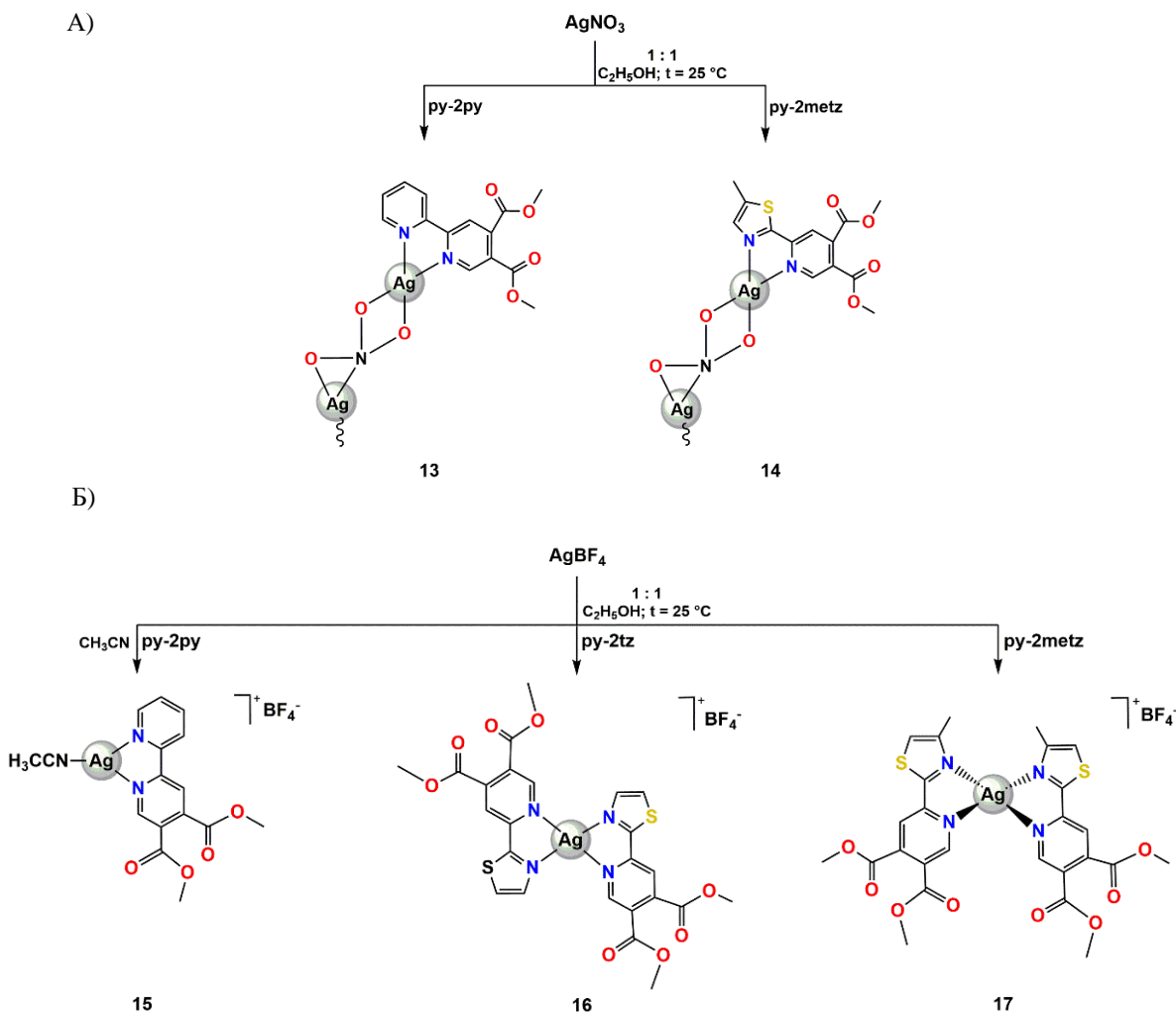
Слика 67. Интеракција комплекса **11** и **12**, одговарајућих соли и py-2py лиганда са λ DNA праћена гел електрофорезом у поређењу са DMSO и H_2O (C) након 2, 4 и 24 h инкубације. M = молекуларни маркер reqGOLD 1 kb DNA-Ladder Plus

4.5. Синтеза, структурна карактеризација и антимикуробна активност сребро(I) комплекса са диметил-пиридин-4,5-дикарбоксилатним естрима⁵

У реакцији диметил-2,2'-бипиридин-4,5-дикарбоксилата (py-2py), диметил-2-(4-метилтиазол-2-ил)пиридин-4,5-дикарбоксилата (py-2metz) и диметил-2-(тиазол-2-ил)пиридин-4,5-дикарбоксилата (py-2tz) (Слика 23) са AgX солима ($X = \text{NO}_3^-$ и BF_4^-) у 1 : 1 молском односу у етанолу на собној температури, добијени су $[\text{Ag}(\text{NO}_3)(\text{py-2py})]_n$ (**13**), $[\text{Ag}(\text{NO}_3)(\text{py-2metz})]_n$ (**14**), $[\text{Ag}(\text{CH}_3\text{CN})(\text{py-2py})]\text{BF}_4$ (**15**), $[\text{Ag}(\text{py-2tz})_2]\text{BF}_4$ (**16**) и $[\text{Ag}(\text{py-2metz})_2]\text{BF}_4$ (**17**) комплекси (Слика 68).²¹⁸ За карактеризацију ових комплекса примењене су следеће методе: елементална микроанализа, ^1H NMR, UV-Vis и IR спектроскопија, масена спектрометрија и циклична волтаметрија, док је њихова структура одређена применом рендгенске структурне анализе. Испитивана је *in vitro* антимикуробна активност комплекса **13** – **17** и лиганда коришћених за њихову синтезу према различитим микроорганизмима, укључујући и клиничке изолате из узорака млека

⁵ Резултати овог истраживања су објављени у раду Т. Р. Andrejević et al., *Dalton Trans.* **49** (2020) 6084 (Реф. 218).

крава оболелих од маститиса. Такође, одређена је њихова *in vivo* токсичност на моделу *C. elegans*.



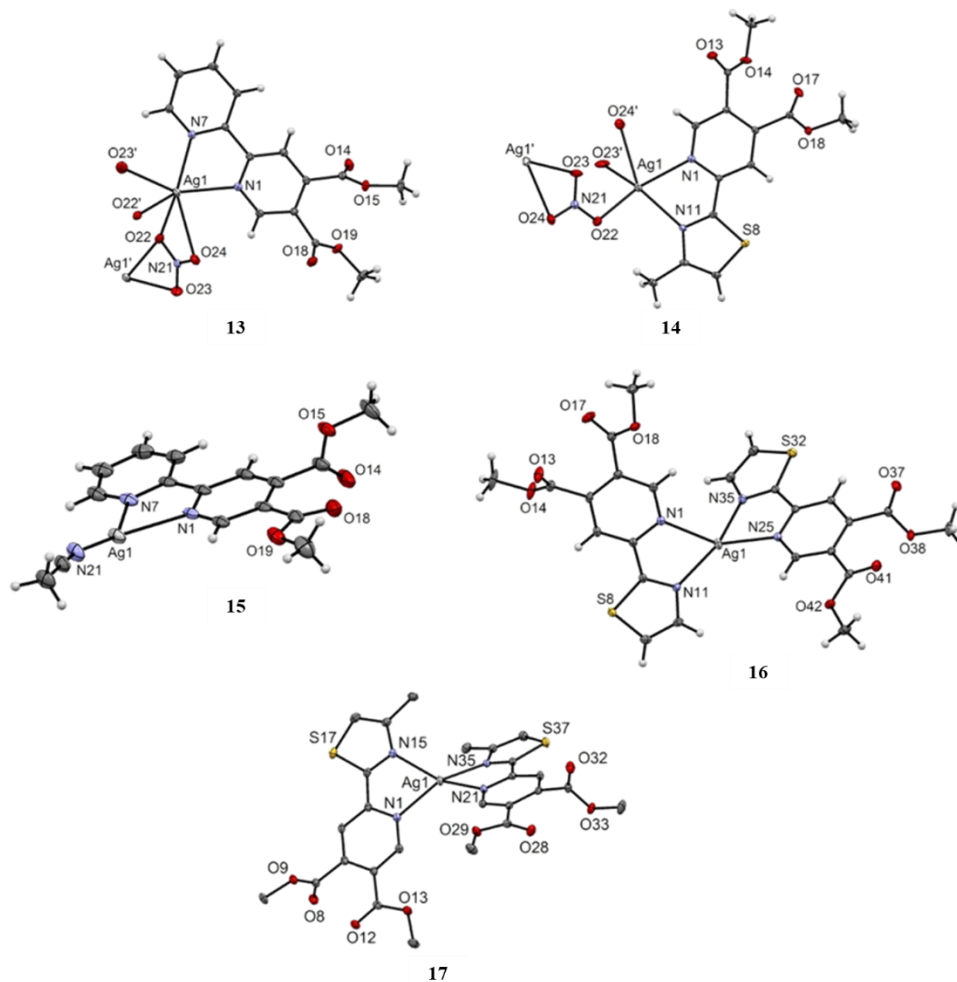
Слика 68. Шематски приказ реакција синтезе сребро(I) комплекса **13** и **14** (A) и **15** – **17** (B)

4.5.1. Опис кристалних структура

Кристалне структуре комплекса **13** – **17** приказане су на слици 69, а одговарајуће дужине веза дате су у табели 29.²¹⁸ Диметил-пиридин-4,5-дикарбоксилатни естри су, у свим случајевима, бидентатно координовани за Ag(I) јон преко атома азота хетероцикличних прстенова. Комплекси **13** и **14** су полимерни, и у њиховим структурама нитратни анјон има улогу мостног лиганда између два Ag(I) јона. Нитратни анјон је у комплексу **13** бидентатно координован за два Ag(I) јона, преко кисеоника O22 као мостног атома. С друге стране, у структури комплекса **14**, нитратни анјон је незнатно ротиран и гради везу са другим Ag(I) јоном. Координациони број Ag(I) јона у комплексу **13** је 6, док овај јон у комплексу **14** има вредности координационог броја 5 и 6.

У реакцији диметил-пиридин-4,5-дикарбоксилатних естара са AgBF₄, долази до грађења мононуклеарних комплекса **15** – **17** (Слика 69).²¹⁸ Ови комплекси су позитивно наелектрисани, и у њиховој спољашњој координационој сфери се налази BF₄⁻ анјон. За Ag(I) јон у комплексу **15** се координује један ру-2ру лиганд, док се код комплекса **16**

и **17** два диметил-пиридин-4,5-дикарбоксилатна естра (py-2tz за **16** и py-2metz за **17**) координују за јон метала. У координационој сфери Ag(I) јона у комплексу **15** налази се и ацетонитрил, који је коришћен као растварач за прекристализацију, а што је у складу са раније утврђеном способношћу различитих растварача да се координују за Ag(I) јон.³⁰⁰ Комплекс **15** има дисторговану тригонално-планарну геометрију са угловима између веза N1–Ag1–N21 и N7–Ag1–N21 који износе 131,5(1) и 150,2(1)°. Вредности τ_4 параметра износе 0,60 за комплекс **16**, односно 0,42 за комплекс **17** (τ_4 вредност за идеалну квадратно-планарну геометрију износи 0, а за тетраедарску 1).²⁷²



Слика 69. Кристалне структуре комплекса **13** – **17**. У катјонским комплексима **15** – **17** изостављен је BF_4^- анијон ради јаснијег приказа кристалних структура. Елипсоиди су дати са 25% вероватноће, а водоникови атоми су приказани као мале сфере произвољног полупречника²¹⁸

Дужине веза између Ag(I) јона и атома азота координованог диметил-пиридин-4,5-дикарбоксилатног естра, дате у табели 29, у опсегу су од 2,221 до 2,453 Å, што је у сагласности са дужинама Ag–N веза у комплексима сребра(I) са пиридинским лигандима.³⁰¹ Интересантно је напоменути да је веза између Ag(I) јона и атома азота координованог ацетонитрила (Ag1–N21 = 2,131(3) Å) у комплексу **15** краћа од веза са пиридинским атомима азота (Ag1–N1 = 2,376(3) и Ag1–N7 = 2,262(3) Å) и одговара опсегу за дужину Ag–N(CH₃CN) везе (2,10 – 2,33 Å).³⁰² Нитратни јон, услед координације за Ag(I), условљава полимеризацију комплекса **13** и **14**, при чему су вредности за дужине Ag–O веза сличне раније објављеним за комплексе сребра(I) са

1,3-*bis*(1-метилтиоимидазол)пропаном.³⁰³ Поред тога, атом кисеоника O22 у комплексу **13** успоставља везу са два Ag(I) јона, која износи 2,486(2) Å, што је за 0,124 Å дуже него у комплексу **14**, у коме O22 остварује везу са једном Ag(I) јоном (Табела 29).

Табела 29. Одабране дужине веза (Å) у комплексима **13** – **17**

	13	14	15	16	17
Ag1–N1	2,400(2)	2,400(2)	2,376(3)	2,453(2)	2,318(2)
Ag1–N7	2,353(2)		2,262(3)		
Ag1–N11		2,403(2)		2,221(2)	
Ag1–N15					2,324(2)
Ag1–N21			2,131(3)		2,406(2)
Ag1–N25				2,285(2)	
Ag1–N35				2,343(2)	2,262(2)
Ag1–O22	2,486(2)	2,362(2)			
Ag1–O23'	2,560(2)	2,507(2)			
Ag1–O24	2,714(2)				
Ag1–O24'		2,678(2)			

4.5.2. Спектроскопска карактеризација

Инфрацрвени спектри комплекса **13** – **17** су у сагласности са њиховим кристалним структурама.²¹⁸ Траке које потичу од валенционих вибрација карбонилне групе су, у IR спектрима комплекса, померене у односу на одговарајуће траке у спектрима некоординованих лиганда, што потврђује њихову координацију за Ag(I) јон. Поред тога, присуство трака које потичу од асиметричних валенционих вибрација NO₃⁻ у спектрима комплекса **13** и **14** потврђују координацију овог јона за Ag(I). С друге стране, интензивна трака на приближно 1050 cm⁻¹ указује на чињеницу да се BF₄⁻ налази у спољашњој координационој сфери комплекса **15** – **17**.^{209,304}

Положаји апсорпционих максимума за комплексе **13** – **17** у UV-Vis спектрима у DMSO идентични су онима за одговарајуће лиганде ($\lambda_{\max} = 300$ nm за ру-2ру, $\lambda_{\max} = 337$ nm за ру-2metz, $\lambda_{\max} = 326$ nm за ру-2tz), што указује на чињеницу да апсорпциони максимуми комплекса потичу од π - π^* прелаза у одговарајућем диметилпиридин-4,5-дикарбоксилатном естру.³⁰⁵

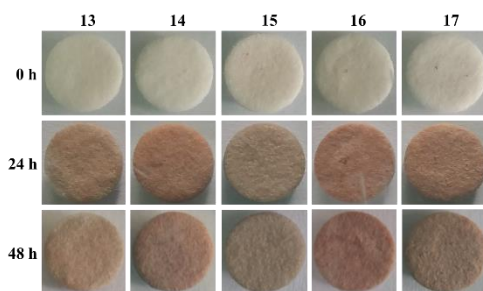
¹H NMR спектри комплекса **13** – **17** у DMSO-*d*₆ су поређени са спектрима одговарајућих некоординованих лиганда.²¹⁸ У случају комплекса **15**, синглет на 2,08 ppm потврђује координацију ацетонитрила за Ag(I) јон.³⁰⁶ С друге стране, број сигнала у ¹H NMR спектрима осталих комплекса је идентичан броју сигнала у спектрима одговарајућих лиганда, указујући на њихову бидентатну координацију за Ag(I) јон. Координација лиганда за Ag(I) јон узрокује незнатно померање већине сигнала ка већој вредности хемијског померања, што је спектроскопска карактеристика комплекса сребра(I) у раствору.¹⁷⁶

4.5.3. Стабилност комплекса у раствору

Стабилност комплекса **13** – **17** у DMSO је испитивана применом UV-Vis и ¹H NMR спектроскопије, као и мерењем моларне проводљивости, током 48 h на собној температури.²¹⁸ У UV-Vis спектрима комплекса **13** – **17** у смеши DMSO/PBS (v/v 1 : 9), одмах по њиховом растварању и након 48 h, нису уочене значајне разлике у интензитету и положају апсорпционог максимума, што указује на чињеницу да комплекси задржавају своју структуру у раствору. Поред тога, нису видљиве промене у

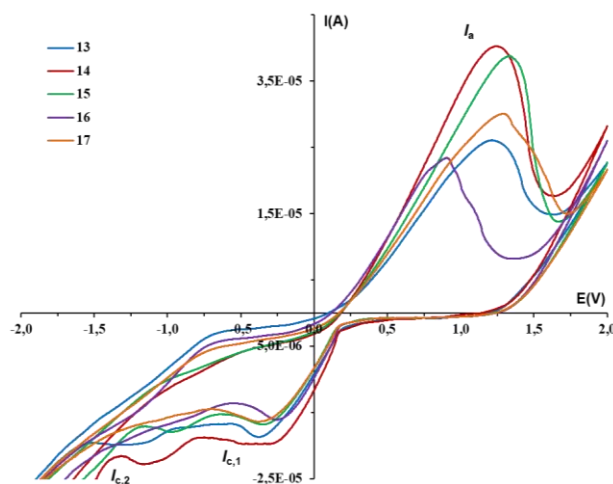
^1H NMR спектрима комплекса **13** – **17**, који су снимљени одмах по њиховом растварању у $\text{DMSO-}d_6$, као и након 48 h, што додатно потврђује да одговарајући диметил-пиридин-4,5-дикарбоксилатни естар остаје бидентатно координован за Ag(I) јон у испитиваном временском периоду. Вредности моларне проводљивости комплекса **13** и **14** су у складу са присуством јонских врста у раствору, које су настале као последица брзог ослобађања нитрато лиганда из координационе сфере Ag(I) јона. Поред тога, вредности моларне проводљивости показују да се комплекси **15** – **17** понашају као 1 : 1 тип електролита.³⁰⁷

У циљу испитивања стабилности комплекса **13** – **17** на ваздуху и светлости, на стерилне целулозне дискове су нанети раствори комплекса у DMSO ($c = 50 \text{ mg/mL}$), а након тога, дискови су изложени ваздуху и светлости током 48 h (Слика 70).¹⁷⁶ У свим случајевима, целулозни дискови постају тамнији у току испитиваног времена, при чему ова промена боје указује да долази до фотохемијске редукције Ag(I) јона.²¹⁸ Комплекс **13** при испитиваним условима показује нешто већу стабилност у односу на остале испитиване комплексе сребра(I).



Слика 70. Фотохемијска редукција комплекса **13** – **17** на ваздуху и светлости током 48 h

Електрохемијско понашање комплекса **13** – **17** испитивано је применом цикличне волтаметрије у DMSO у присуству 0,1 М ТВАНР као помоћног електролита у опсегу потенцијала од $-2,0$ до $+2,0 \text{ V}$ и при брзини од 50 mV/s (Слика 71).²¹⁸ Као што се може видети са слике, уочава се само један широк оксидациони пик који потиче од оксидације Ag(I) до Ag(II) јона.^{308,309} У катодном смеру се уочавају два редукциона пика за комплексе **13** – **15**, при чему се $I_{c,1}$ може приписати процесу редукције $\text{Ag(II)} \rightarrow \text{Ag(I)}$, док $I_{c,2}$ потиче од редукције Ag(I) јона до Ag(0) .³⁰⁸



Слика 71. Циклични волтамограми комплекса **13** – **17** снимљени на GC електроди у DMSO у присуству 0,1 М ТВАНР при брзини скенирања од 50 mV/s

С друге стране, за комплексе **16** и **17** није уочен редукциони пик који се јавља услед редукције Ag(I) јона до Ag(0), указујући да ови комплекси имају већу стабилност у односу на остале испитиване комплексе, што се може објаснити присуством два бидентатно координована диметил-пиридин-4,5-дикарбоксилато лиганда у овим комплексима.

Иако су комплекси **13** – **17** показали задовољавајућу стабилност у DMSO и DMSO/PBS (*v/v* 1 : 9) током 48 h, претпоставља се да биолошки активну врсту представља Ag(I) јон, који настаје дисоцијацијом комплекса при физиолошким условима у присуству различитих биомолекула, пре свега протеина и ензима који садрже тиолну функционалну групу.¹³⁷

4.5.4. Биолошка активност

Антимикробна и цитотоксична активност

Активност комплекса **13** – **17** и одговарајућих лиганда је испитивана према две Грам-негативне (*P. aeruginosa* и *E. coli*) и две Грам-позитивне бактеријске врсте (*S. aureus* и *E. faecalis*), као и четири *Candida* соја (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei* и *C. parapsilosis*). Поред тога, њихова активност је испитивана на шест изолата из млека краве оболеле од маститиса (Табела 30).²¹⁸ Маститис је најраспрострањенија болест крава, која представља запаљење паренхима млечне жлезде, односно вимена.³¹⁰ Ово инфективно обољење доводи до промена квалитета млека, нарушавања здравља крава, али и људи који конзумирају контаминирано млеко, што даље изазива велике економске губитке због смањене производње млека.^{311,312} Узрочници маститиса могу бити различити патогени, као што су бактерије, гљивице и алге.³¹³⁻³¹⁵ Најчешћи узрочници бактеријског маститиса су *Streptococcus agalactiae*, *S. aureus* и *Mycoplasma bovis*, као и *Streptococcus dysgalactiae*, *Staphylococcus epidermidis* и MRSA. Поред тога, често је изолована *P. aeruginosa* из контаминираног млека,³¹⁴ као и гљивице, као што су *Aspergillus fumigatus* и *C. albicans*. Краве оболеле од маститиса могу бити заражене патогенима из групе алги, као што су *Prototheca* сојеви.³¹⁵ Сви ови патогени формирају биофилм на уређајима које се користе за мужу, као и на површини и унутар вимена.^{316,317} Маститис се лечи антибиотцима за парентералну и интраамарну примену,³¹⁸ а испитују су и нове методе лечења, као што је терапија вакцинама, биљна терапија, хомеопатија, и терапија помоћу наночестица сребра и бакра.³¹⁹

Антимикробна активност испитиваних једињења (MIC, µg/mL) поређена је са одговарајућом активношћу амфотерицина В (AmB) и канамицина, који се примењују као антимикробни агенси (Табела 30). Диметил-пиридин-4,5-дикарбоксилати лиганди нису показали активност на тестираним микроорганизмима при концентрацијама од 500 µg/mL, док је антимикробна активност AgX соли раније испитивана.¹⁵² Иако ове соли показују активност, услед њихове брзе дисоцијације при физиолошким условима долази до таложења AgCl, због чега највећи део Ag(I) јона не доспева до заражених ткива.¹³⁷ С друге стране, комплекси **13** – **17** показују веома добру антифунгалну активност, нарочито према *C. parapsilosis*, са MIC вредношћу 1,56 µg/mL. Важно је напоменути да су комплекси **13** – **17** показали много бољу активност према клиничким изолатима са 3 до 30 пута мањим MIC вредностима према изолатима *P. aeruginosa* и *S. aureus* у односу на ове бактеријске врсте из NCTC панела. Комплекси **13** – **17** су, такође, показали антибактеријску активност према изолату *S. agalactiae* са MIC вредностима у опсегу од 1,56 до 16 mg/mL. Активност комплекса према изолатима *C. albicans* и *Prototheca* је била већа у односу на бактеријске изолате, са MIC вредностима од 1,56 до 4 mg/mL у случају *Prototheca* изолата, док је раст изолата

C. albicans заустављен при концентрацијама од 0,12 µg/mL комплекса **14** и 0,25 µg/mL комплекса **17**. Поред тога, може се закључити да су комплекси **13** – **17** активнији према изолатима од амфотерицина В и канамицина (Табела 30).

У циљу одређивања терапеутског потенцијала комплекса **13** – **17**, одређена је њихова *in vitro* токсичност на нормалној MRC-5 ћелијској линији и *in vivo* токсичност према нематодама *C. elegans*, која је изражена као IC₅₀ вредност (µg/mL). Комплекси **13** – **17** су показали већу токсичност према MRC-5 ћелијској линији у поређењу са одговарајућим лигандима (IC₅₀ = 120, 110 и 100 µg/mL за py-2py, py-2metz и py-2tz, респективно). Међутим, комплекси **13** – **17** су приближно 3 пута мање токсични *in vivo* према *C. elegans* са IC₅₀ вредностима од 12 до 55,5 µg/mL (Табела 30).

Активност комплекса **13** – **17** према *C. parapsilosis* је слична одговарајућој активности раније синтетисаних сребро(I) комплекса са пиридинкарбоксилатима (пиколинат, никотинат и дипиколинат; MIC = 5,00 µM).³²⁰ Поред тога, полимерни комплекси сребра(I) са пиридин-2-сулфонатом¹⁵⁹ и пиридин-3,5-дикарбоксилатом³²¹ су показали сличан ефекат на *C. parapsilosis*, *S. aureus* и *E. coli*. С друге стране, [Ag(Menic)₂(ClO₄)₂] комплекс (Menic је метилникотинат), у великој мери, утиче на раст различитих бактеријских врста и *C. albicans* са MIC вредностима од 4,50 до 7,50 µM.³²²

Болдиране вредности у табели 30 указују да комплекси **14** и **17** имају најбољи терапеутски профил са индексом селективности (SI) у односу на *C. elegans* од 420 и 222 у случају изолата *C. albicans* 1b. Повољнији терапеутски профил ових комплекса у односу на остале се може објаснити разликом у њиховој структури. Наиме, комплекси **14** и **17**, поред пиридинског прстена, садрже 2'-метил супституисан тиазолни прстен, док је код комплекса **13** и **15** присутан додатни пиридински, односно тиазолни прстен код комплекса **16**. С обзиром на најбољи терапеутски профил и значајну активност према тестираним изолатима из контаминираног млека, комплекси **14** и **17** су одабрани за даља биолошка тестирања.

Табела 30. Антимикробна активност комплекса **13** – **17** (MIC, µg/mL) у поређењу са њиховом токсичношћу према нормалној ћелијској линији фибробласта плућа (MRC-5) и *C. elegans* (IC₅₀, µg/mL). Приказане су MIC вредности за амфотерицин В (AmB) и канамицин

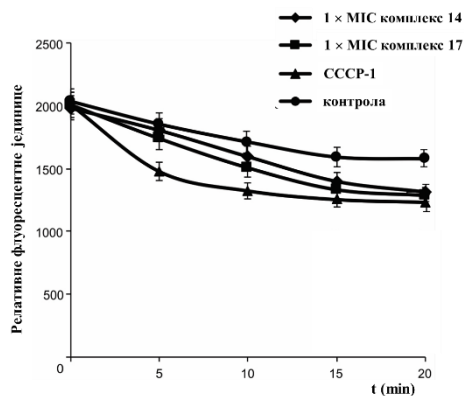
	13	14	15	16	17	AmB	Канамицин
<i>P. aeruginosa</i>	25 ^a	25	50	50	50		105
<i>E. coli</i>	12,5	12,5	12,5	6,25	25		25
<i>E. faecalis</i>	50	50	50	50	100		50
<i>S. aureus</i>	50	25	50	50	100		25
<i>C. albicans</i>	3,1	6,25	8	8	12,5	0,25	
<i>C. glabrata</i>	6,25	6,25	4^b	4	6,25	1	
<i>C. krusei</i>	3,1	6,25	4	4	12,5	2	
<i>C. parapsilosis</i>	1,56	1,56	1,56	1,56	1,56	0,5	
<i>P. aeruginosa</i> 2a	7,5	3,25	3,25	3,25	7,5		50
<i>S. aureus</i> 0661	15,5	3,25	7,5	7,5	7,5		25
<i>S. agalactiae</i> 4a	3,25	1,56	3,25	3,25	3,25		6,25
<i>S. agalactiae</i> 4c	4	4	8	16	8		25
<i>Prototheca</i> 208	1,56	1,56	4	1,56	1,56	12,5	50
<i>C. albicans</i> 1b	0,5	0,12	0,5	0,5	0,25	1	
MRC-5	3,1	18	15,5	12,5	22		
<i>C. elegans</i>	12	50,5	40,5	35	55,5		

^aРезултати су дати као средња вредност три независна мерења са стандардном грешком 1 – 3%;

^bУ случају болдираних вредности SI > 10 (у односу на *C. elegans*)

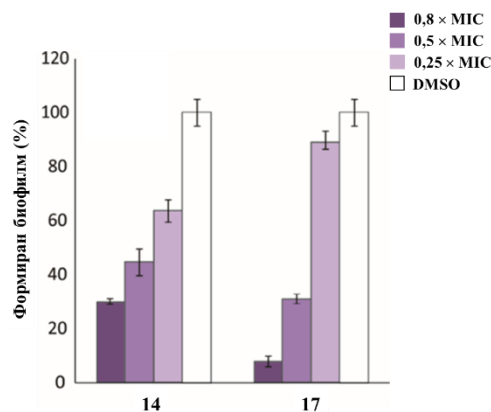
Нарушавање мембранског потенцијала и активност према биофилму *S. aureus*

Приликом утврђивања механизма деловања нових антимикробних агенаса, веома је важно испитати њихов ефекат на деполаризацију ћелијске мембране (промену мембранског потенцијала), који доводи до нарушавања физиолошких процеса у бактерији и до њене смрти.³²³ Када су ћелије *S. aureus* третиране MIC вредностима комплекса **14** и **17** долази до нарушавања мембранског потенцијала ових ћелија у истој мери, али спорије у односу на СССР-1 (карбонил цијанид *m*-хлорфенил хидразон), који је коришћен као позитивна контрола (Слика 72).²¹⁸ Пошто је промена мембранског потенцијала у присуству испитиваних комплекса уочена при високим нивоима инокулума тестиране бактерије, може се закључити да је њихова бактерицидна активност последица иницијалног нарушавања мембранског потенцијала, које повећава пропустљивост ћелијске мембране. Сличан ефекат су показали и динуклеарни полипиридилрутенијум(II) комплекси који су показали значајну антибактеријску активност.³²⁴



Слика 72. Деполаризација мембране *S. aureus* у присуству комплекса **14** и **17**. СССР-1 је коришћен као позитивна контрола

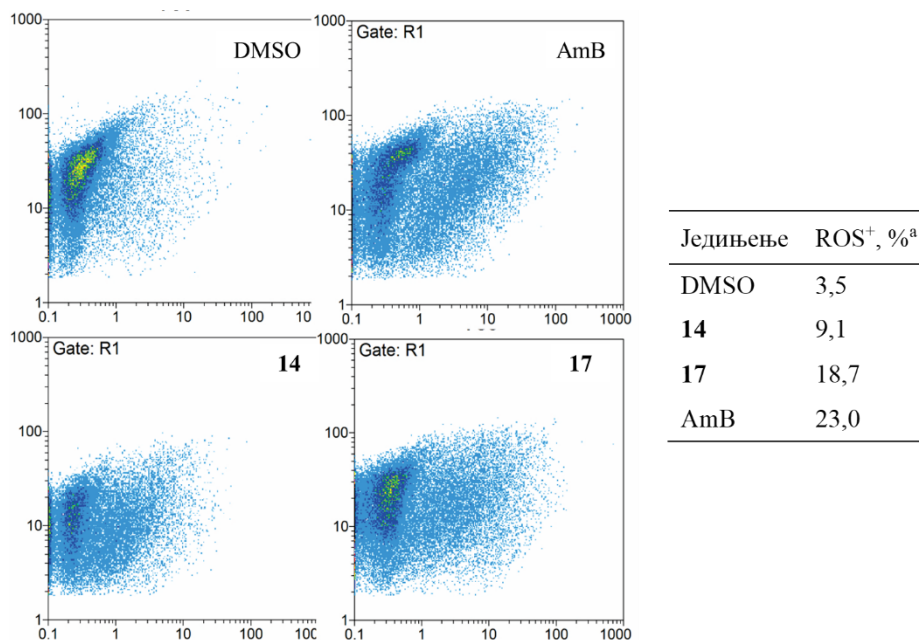
Поред утицаја на мембрански потенцијал *S. aureus*, комплекси **14** и **17** инхибирају формирање биофилма ове бактерије.²¹⁸ Када су ћелије *S. aureus* третиране субинхибиторним концентрацијама ових комплекса ($0,8 \times$ и $0,5 \times$ MIC), долази до инхибиције формирања биофилма за 50 до 80% у односу на DMSO контролу (Слика 73).



Слика 73. Утицај субинхибиторних концентрација комплекса **14** и **17** на формирање биофилма *S. aureus* током 24 h. Количина DMSO је била 0,1% (v/v)

Формирање ROS код *C. albicans*

Раније је утврђено да се бактерицидни ефекат антибиотика, као што су хинолони, β -лактами и аминогликозиди, заснива на њиховој способности да формирају ROS.³²⁵ Поред тога, повећана способност једињења да производе ROS је повезана са њиховом антифунгалном активношћу.^{326,327} У складу са тим, испитивана је способност комплекса **14** и **17** да изазову формирање ROS унутар ћелија *C. albicans*. За бојење ћелија *C. albicans* коришћен је 2',7'-дихлорфлуоресцин-диацетат (DCFH-DA), који дифундује кроз њихову ћелијску мембрану. Након тога, ово једињење хидролизује, а у случају формирања ROS прелази у дихлорфлуоресцеин (DCF), који флуоресцира за разлику од DCFH-DA, што се користи за квантификацију производње ROS применом проточне цитометрије.³²⁷ На слици 74 приказани су резултати испитивања након 2 h инкубације ћелија *C. albicans* у присуству MIC вредности комплекса **14** и **17**, при чему се може закључити да је флуоресценција DCF већа у присуству комплекса **17** у односу на **14**.²¹⁸ Формирање ROS код *C. albicans* у присуству комплекса **14** је два пута мања у односу на **17** (Слика 74), што значи да већа токсичност комплекса **14** на MRC-5 ћелијама није последица формирања ROS (Табела 30). Ово се може објаснити различитим структурама ова два комплекса у којима је за Ag(I) јон координан исти лиганд (py-2metz), али је комплекс **14** полимеран са једним лигандом у мономерној јединици, док је комплекс **17** мононуклеаран и садржи два лиганда координана за Ag(I) јон.

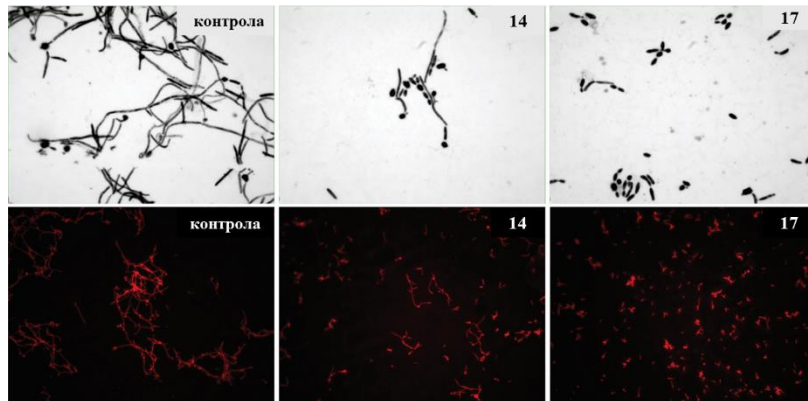


Слика 74. Формирање ROS код ћелија *C. albicans* у присуству MIC вредности комплекса **14** и **17**, и AmB након 2 h инкубације. Као контрола коришћене су *C. albicans* ћелије третиране DMSO. ^aПроцент ROS⁺ ћелија је одређен помоћу Partec FloMax софтвера, при чему је базна линија нула (позадински ниво флуоресценције) постављена на основу максималне вредности контроле без индикатора ROS. Процент ROS⁺ ћелија је одређен бројањем ћелија са већим ROS нивоом у односу на позадински ниво

Комплекс **17** и AmB у сличној мери доводе до формирања ROS, што изазива апоптозу ћелија (Слика 74). У складу са тим, антифунгална активност испитиваних комплекса сребра(I), нарочито комплекса **17**, може бити резултат формирања ROS, као што је раније утврђено за мононуклеарне комплексе сребра(I) са 1,7-фенантролином.²⁰³

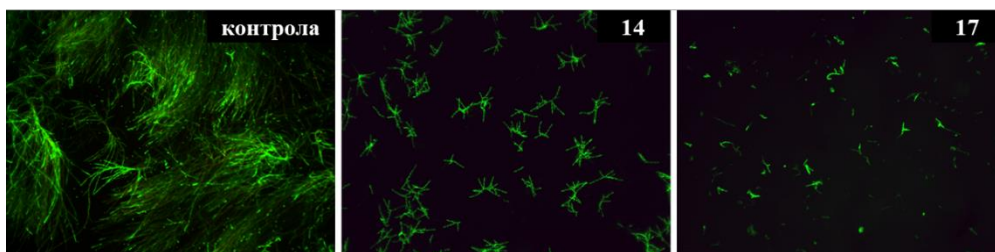
Инхибиција филаментације и формирања биофилма код *C. albicans*

У циљу утврђивања потенцијалног механизма антифунгалног деловања комплекса **14** и **17**, испитиван је њихов ефекат на формирање хифа и биофилма код *C. albicans* применом флуоресцентне микроскопије.²²³ На слици 75 приказана је филаментација код *C. albicans*-RFP након третмана са МИС вредностима комплекса ($0,8 \times \text{MIC}$), при чему се може закључити да оба комплекса изазивају смањење броја хифа у односу на контролу. Такође, утврђено је да се дужина хифа смањује са 67 ± 5 nm, колико је измерено код контроле, на 38 ± 4 nm у присуству комплекса **14**, док у присуству комплекса **17** филаменти готово нису видљиви.



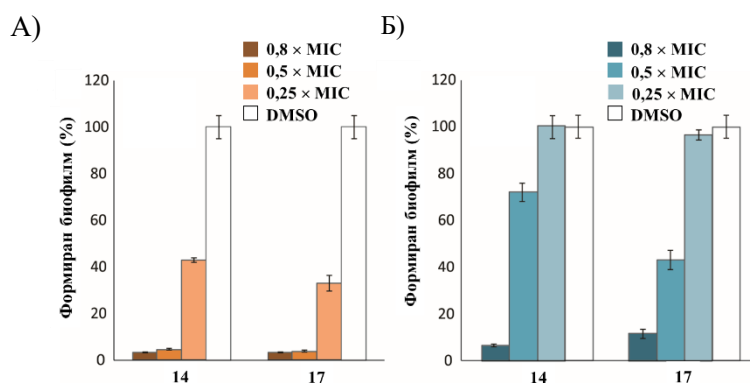
Слика 75. Филаментација код *C. albicans*-RFP у присуству $0,8 \times \text{MIC}$ вредности комплекса **14** и **17**. Ћелије третиране DMSO су коришћене као контрола ($20\times$ увећање)

У присуству комплекса **17**, ћелије *C. albicans* остају овалне, што указује на чињеницу да ово комплексно једињење смањује вируленцију и спречава инфекције изазване овим сојем. Ово је, такође, потврђено и њиховим ефектом на формирање биофилма код *C. albicans* изолата (Слика 76).²¹⁸ Наиме, субинхибиторне концентрације комплекса **14** и **17** инхибирају формирање биофилма код *C. albicans* за 60 до 90% након 24 до 48 h (Слика 77). С друге стране, ови комплекси не разарају већ формиране биофилмове, чак ни при $10 \times \text{MIC}$ вредностима.



Слика 76. Утицај комплекса **14** и **17** ($0,8 \times \text{MIC}$) на формирање биофилма *C. albicans* изолат. Ћелије третиране DMSO су коришћене као контрола ($20\times$ увећање)

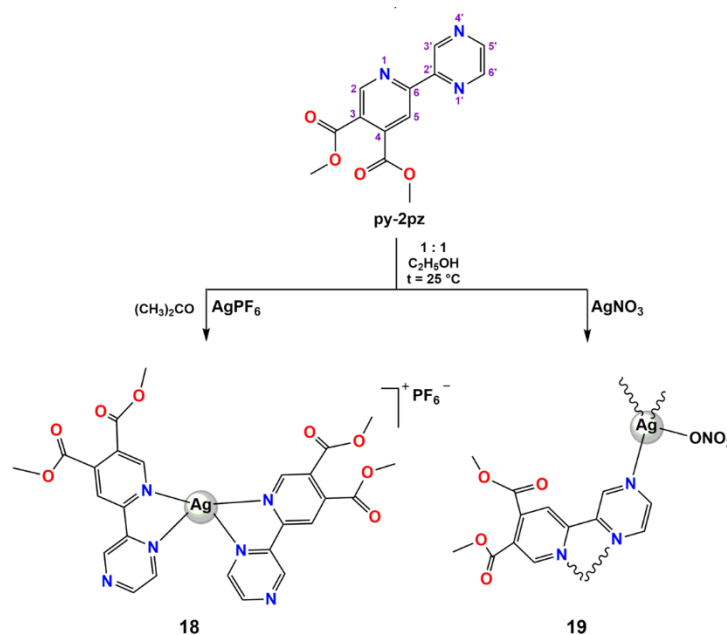
Пошто комплекс **17**, поред формирања ROS, показује и значајну инхибицију формирања биофилмова, његово антифунгално деловање се може објаснити комбинацијом ова два процеса. Од антимикуробних лекова који се данас примењују у лечењу гљивичних инфекција, миконазол, ехинокандини и липозомалне формулације амфотерицина В, инхибирају формирање биофилмова код гљивица, и индукују ROS,³²⁷ на основу чега се закључује да се комплекс **17** може даље испитивати као антифунгални агенс.



Слика 77. Утицај субинхибиторних концентрација комплекса **14** и **17** на формирање биофилма код *C. albicans* након 24 (А) и 48 h (Б). Количина DMSO је била 0,1% (v/v)

4.6. Синтеза, структурна карактеризација и антимикуробна активност сребро(I) комплекса са диметил-6-(пиразин-2-ил)пиридин-3,4-дикарбоксилатом⁶

У реакцији диметил-6-(пиразин-2-ил)пиридин-3,4-дикарбоксилатног естра (py-2pz) са еквимоларном количином AgX соли (X = PF₆⁻ и NO₃⁻) у етанолу на собној температури, добијени су [Ag(py-2pz)₂]PF₆ (**18**) и {[Ag(NO₃)(py-2pz)]·0,5H₂O}_n (**19**) комплекси (Слика 78), који су окарактерисани применом елементалне микроанализе, мерењем моларне проводљивости, IR, UV-Vis и ¹H NMR спектроскопије, и цикличне волтаметрије.²³⁹ Кристална структура синтетисаних комплекса је одређена применом рендгенске структурне анализе, док су DFT прорачуни коришћени у циљу објашњавања њихових структура у раствору. Антимикуробна активност комплекса **18** и **19** је испитивана на две бактеријске (*P. aeruginosa* и *S. aureus*) и две *Candida* врсте (*C. albicans* и *C. parapsilosis*), док је њихова токсичност одређена на MRC-5 ћелијској линији.



Слика 78. Шематски приказ реакција за синтезу комплекса **18** и **19**. Нумерација атома у лиганду је коришћена за ¹H NMR карактеризацију комплекса

⁶ Резултати овог истраживања су објављени у раду Т. Р. Andrejević et al., *RSC Adv.* **13** (2023) 4376. (Реф. 239).

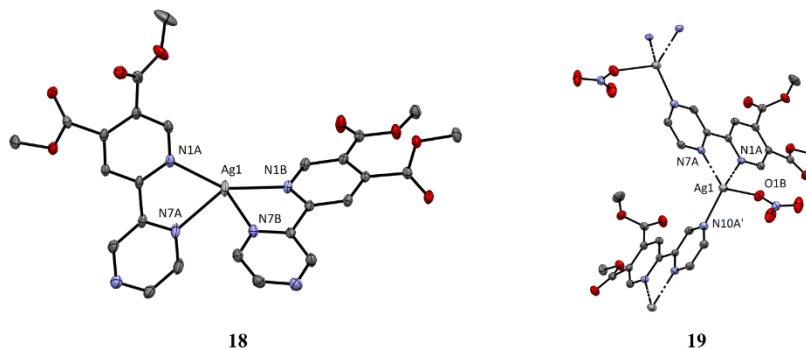
4.6.1. Опис кристалних структура

Кристали мононуклеарног комплекса **18**, погодни за рендгенску анализу, добијени су прекристализацијом у ацетону.²³⁹ У табели 31 приказане су одабране дужине веза у комплексима **18** и **19**. У комплексу **18**, за Ag(I) јон координована су два ру-2pz лиганда преко атома азота из пиридинског и пиазинског прстена (Слика 79), тако да је овај комплекс позитивно наелектрисан и садржи PF₆⁻ као контра-анјон. На основу τ_4/τ'_4 вредности од 0,51/0,47, може се закључити да је геометрија комплекса између квадратно-планарне и тетраедарске.²⁷²

Табела 31. Одабране дужине веза (Å) у комплексима **18** и **19**

	18	19
Ag1–N1A	2,307(2)	2,392(4)
Ag1–N7A	2,342(2)	2,303(2)
Ag1–N1B	2,260(2)	
Ag1–N7B	2,484(2)	
Ag1–N10A		2,239(2)
Ag1–O1B		2,397(3)

На слици 79, приказана је и кристална структура комплекса **19**, у коме је, поред ру-2pz лиганда, за Ag(I) јон монодентатно координован нитрато лиганд. Пиазински прстен има улогу мостног лиганда између два Ag(I) јона. Геометрија јона метала у комплексу **19** је дисторгована тетраедарска ($\tau_4/\tau'_4 = 0,76/0,73$).²⁷²

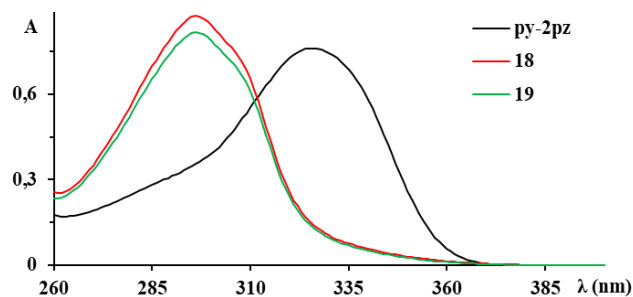


Слика 79. Кристалне структуре комплекса **18** и **19**. Елипсоиди су дати са 30% вероватноће. Атоми водоника и PF₆⁻ анјон у комплексу **18** изостављени су ради јаснијег приказа²³⁹

4.6.2. Спектроскопска карактеризација

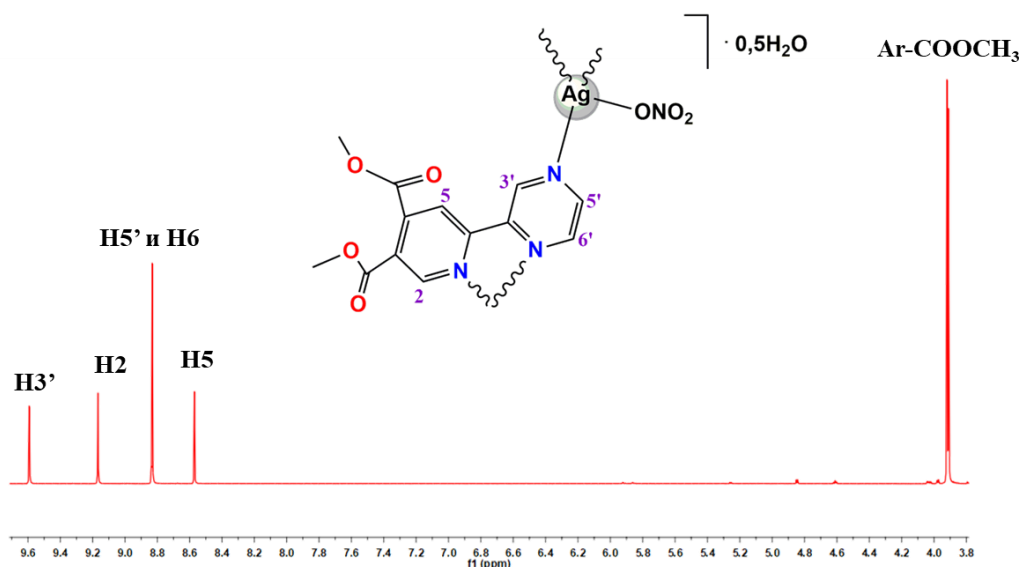
Поред трака које потичу од координованог ру-2pz лиганда,²³⁹ у IR спектру комплекса **18**, присутна је врло интензивна трака на 839 cm⁻¹, која потиче од вибрација P–F везе.^{328,329} Код комплекса **19**, две траке (1384 и 1368 cm⁻¹) које потичу од асиметричних валенционих вибрација NO₃⁻ јона са $\Delta\nu = 16$ cm⁻¹ одговарају његовој монодентатној координацији.²⁰⁹

UV-Vis спектри комплекса **18** и **19** су снимљени у DMSO на собној температури (Слика 80).²³⁹ Апсорпциони максимум комплекса на 296 nm потиче од π - π^* прелаза унутар лиганда.³⁰⁵ Апсорпциони максимуми комплекса су хипсохромно померени (плаво померање) у односу на апсорпциони максимум некоординованог лиганда ($\lambda_{\text{max}} = 326$ nm).



Слика 80. UV-Vis спектри комплекса **18** и **19** у односу на py-2pz лиганд у DMSO на 25 °C

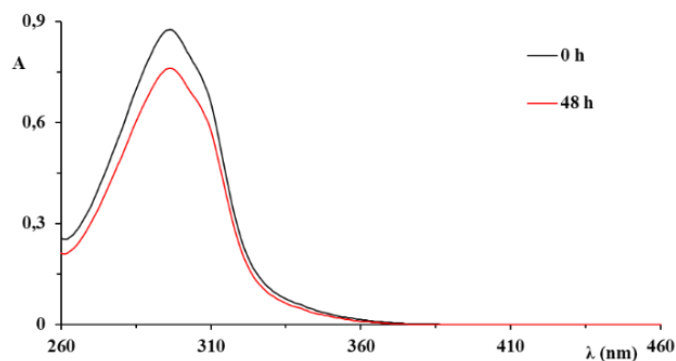
Протонски NMR спектри комплекса **18** и **19** у DMSO- d_6 поређени су са одговарајућим спектром некоординованог лиганда, при чему идентичан број сигнала указује да се py-2pz бидентатно координује за Ag(I) јон.²³⁹ Поред сигнала у ароматичној области, јавља се дублет на 3,92 ppm који одговара алифатичним CH₃ протонима (Слика 81). У случају свих сигнала од протона комплекса уочава се врло мало померање ка већој вредности хемијског померања у односу на сигнале протона лиганда, што је, као што је већ наведено, карактеристично спектроскопско понашање комплекса сребра(I) у раствору.¹⁷⁶



Слика 81. ¹H NMR спектар комплекса **19** у DMSO- d_6

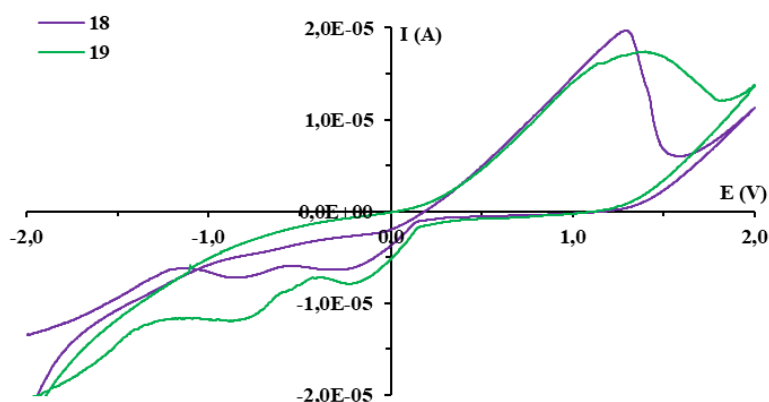
4.6.3. Стабилност комплекса у раствору

Применом UV-Vis спектрофотометрије, праћена је стабилност комплекса **18** и **19** у DMSO и у смеси DMSO/PBS током 48 h.²³⁹ С обзиром да у UV-Vis спектрима снимљеним одмах по растварању комплекса **18** и **19**, као и након 24 и 48 h, нису уочене значајне промене у интензитету и положају апсорпционог максимума, може се закључити да током испитиваног временског периода, лиганд остаје координован за Ag(I) јон (Слика 82). Поред тога, вредности моларне проводљивости комплекса **18** и **19**, указују на присуство јонских врста у раствору.²¹⁴



Слика 82. Стабилност комплекса **18** у DMSO током 48 h на 25 °C

Циклични волтамограми комплекса **18** и **19** су снимљени на GC електроди у присуству 0,1 М ТВАНР као помоћног електролита, у опсегу потенцијала од $-2,0$ до $+2,0$ V при брзини скенирања од 50 mV/s.²³⁹ Важно је напоменути да py-2pz није редокс активан. У цикличном волтамограму комплекса **18** и **19** присутан је један пик у анодном смеру, који потиче од процеса оксидације Ag(I) до Ag(II) јона (Слика 83), док се у катодном смеру, уочавају два редукциона пика од Ag(II) \rightarrow Ag(I) и Ag(I) \rightarrow Ag(0) процеса.^{218,308,309,330}



Слика 83. Циклични волтамограми комплекса **18** и **19** снимљени на GC електроди у DMSO у присуству 0,1 М ТВАНР при брзини скенирања од 50 mV/s

4.6.4. DFT прорачуни

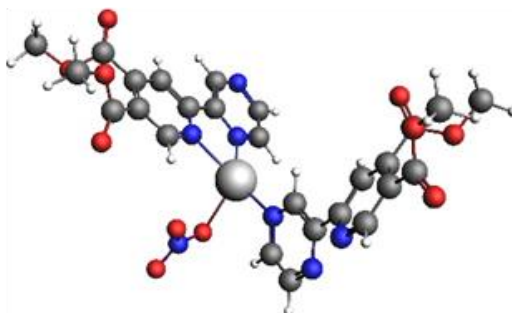
Структуре комплекса **18** и **19** у раствору су, такође, испитиване DFT прорачунима.²³⁹ Структура комплекса **18** у раствору је у складу са структуром у чврстом стању и садржи два бидентатно координована py-2pz лиганда (Табела 32).

Табела 32. Промена слободне Гибсове енергије ($\Delta_r G$, kcal/mol) добијене на ZORA-M06-2X/TZP-COSMO(DMSO)//ZORA-BP86-D4/TZP-COSMO(DMSO) нивоу теорије за формирање комплекса **18** и **19**

Реакције	$\Delta_r G$ (T = 298 K)
$[\text{Ag}(\text{py-2pz-}N,N')_2]^+ (\mathbf{18}) \rightleftharpoons [\text{Ag}(\text{py-2pz-}N,N')(\text{py-2pz-}N)]^+$	+11,26
$[\text{Ag}(\text{NO}_3)(\text{py-2pz-}N,N')(\text{py-2pz-}N)] (\mathbf{19}) \rightleftharpoons [\text{Ag}(\text{py-2pz-}N,N')(\text{py-2pz-}N)]^+ + \text{NO}_3^-$	+4,04

С друге стране, за полинуклеаран комплекс **19**, испитиван је модел $[\text{Ag}(\text{NO}_3)(\text{py-2pz-}N,N')(\text{py-2pz-}N)]$ изведен из структуре добијене применом рендгенске

структурне анализе. У овом моделу, један ру-2pz лиганд је бидентатно координован, док је други координован монодентатно (Слика 84). Позитивна Δ_rG вредност за процес приказан у табели 32 указује да је дисоцијација монодентатно координованог нитрато лиганда у овом комплексу енергетски неповољна.



Слика 84. Структура $[Ag(NO_3)(ru-2pz-N,N')(ru-2pz-N)]$ комплекса оптимизована на ZORA-M06-2X/TZP-COSMO(DMSO) нивоу теорије²³⁹

4.6.5. Биолошка активност

Антимикробна и цитотоксична активност

У табели 33 приказане су МИС вредности за комплексе **18** и **19** према једној Грам-позитивној (*S. aureus* ATCC 25923) и једној Грам-негативној бактеријској (*P. aeruginosa* PAO1), и две *Candida* врсте (*C. albicans* ATCC 10231 и *C. parapsilosis* ATCC 22019).²³⁹ На истим бактеријским и гљивичним врстама је, такође, испитивана активност ру-2pz лиганда, који није активан при концентрацијама до 500 $\mu\text{g/mL}$,²¹⁸ док је раније одређена антимикробна активност AgX соли које су коришћене за синтезу комплекса.¹⁵²

Табела 33. Антимикробна активност комплекса **18** и **19**, као и AgSD (МИС, μM ($\mu\text{g/mL}$)) у поређењу са њиховом антипролиферативном активношћу према нормалној MRC-5 ћелијској линији (IC₅₀, μM ($\mu\text{g/mL}$)). Резултати су приказани као средња вредност три мерења са стандардном грешком 1 – 3%

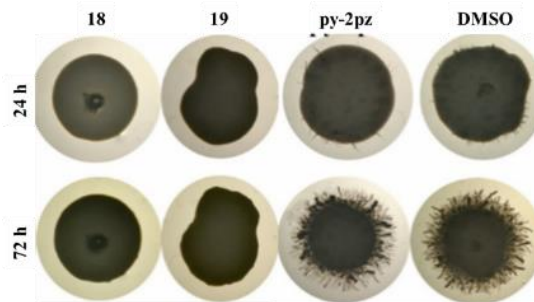
	18	19	AgSD
<i>S. aureus</i>	39,0 (31,2)	34,5 (15,6)	75 (26,8)
<i>P. aeruginosa</i>	19,5 (15,6)	8,6 (3,9)	25 (8,9)
<i>C. albicans</i>	4,9 (3,9)	8,6 (3,9)	10 (3,6)
<i>C. parapsilosis</i>	4,9 (3,9)	8,6 (3,9)	2,5 (0,89)
MRC-5	31,3 (25)	16,6 (7,5)	10 (3,6)

Комплекси **18** и **19** показују добру антифунгалну активност према тестираним *Candida* сојевима са МИС од 4,9 μM за комплекс **18** и 8,6 μM за комплекс **19**, која је већа у односу на одговарајућу активност клинички коришћеног AgSD комплекса (Слика 18). С друге стране, већу антибактеријску активност је показао комплекс **19**, и то према *P. aeruginosa*, што потврђује његова МИС вредност (8,6 μM), док је активност комплекса **18** мања (МИС = 19,5 μM према *P. aeruginosa*). Сличне МИС вредности су добијене за полимерне сребро(I) комплексе са пиридин-3,5-дикарбоксилатом³²¹ и пиридин-2-сулфонатом¹⁵⁹ према *C. parapsilosis* и *S. aureus*, док су за комплексе са пиридинкарбоксилатима (пиколинат, никотинат и дипиколинат) добијене мање МИС вредности према *C. parapsilosis* (5 μM) и *S. aureus* (10 μM).³²⁰

Комплекси **18** и **19** су мање токсични на нормалној MRC-5 ћелијској линији у односу на AgSD, и то приближно 3,1 и 1,7 пута, респективно (Табела 33). Комплекси **18** и **19** имају позитивне вредности индекса селективности, при чему комплекс **18** показује најбољи терапеутски профил у случају *Candida* сојева (SI = 6,4).

Инхибиција филаментације и формирања биофилма

Испитиван је ефекат субинхибиторних концентрација комплекса **18** и **19** на филаментацију код *C. albicans* соја,²³⁹ при чему ови комплекси у потпуности спречавају формирање хифа након 72 h (Слика 85).



Слика 85. Утицај субинхибиторних концентрација ($0,5 \times \text{MIC}$) комплекса **18** и **19** и py-2pz лиганда у односу на DMSO контролу на формирање хифа код *C. albicans* на Spider подлози после 24 и 72 h инкубације

Поред тога, испитивана је способност комплекса **18** и **19** да инхибирају формирање биофилма, који су одговорни за развој резистентности гљивица на антифунгалне лекове (Табела 34).³²⁹ MIC вредности комплекса **18** и **19** инхибирају формирање биофилма код *C. albicans* за 51 и 62%, респективно, при чему комплекс **18** остаје активан у истој мери и при смањењу концентрације два пута. С друге стране, комплекс **19** није активан при концентрацијама нижим од $3,5 \mu\text{g/mL}$ (Табела 34).

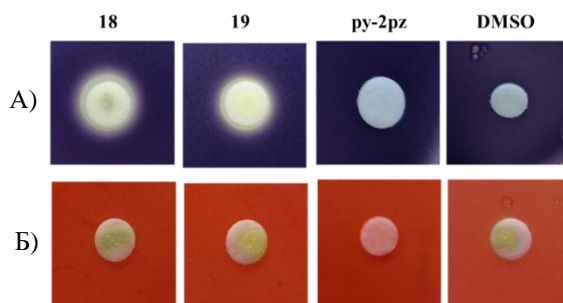
Табела 34. Инхибиција формирања биофилма код *C. albicans* ATCC 10321 (%) у присуству комплекса **18** и **19**

Концентрација ($\mu\text{g/mL}$)	18	19
3,50	51 ± 5	62 ± 4
1,75	51 ± 7	–
0,87	36 ± 3	–
0,44	32 ± 5	–

– = није уочена зона

Испитивање анти-QS активности

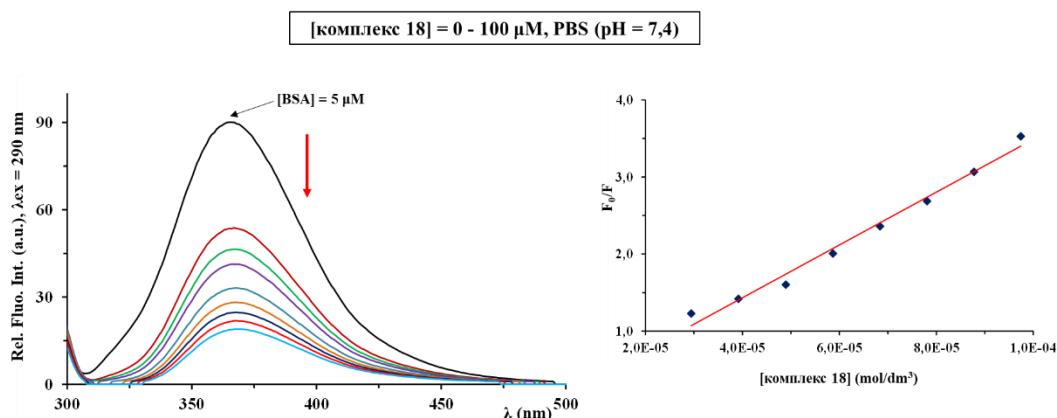
Због чињенице да су AgNPs³³¹⁻³³³ показали способност да спрече међубактеријску комуникацију, у овој докторској дисертацији испитивана је анти-QS активност комплекса **18** и **19**.³²⁹ У ову сврху, дискови са бактеријама *C. violaceum* CV026 и *S. marcescens* су третирани са $100 \mu\text{g}$ ових комплекса, при чему је уочено само смањење производње плавог пигмента виолацеина са зоном инхибиције од 5 mm (Слика 86).



Слика 86. Инхибиција производње виолацеина (А) и продигиозина (Б) у присуству 100 μg комплекса **18** и **19** и py-2pz лиганда. DMSO је коришћен као контрола

4.6.6. Интеракције са BSA

Интеракције комплекса **18** и **19** са BSA су испитиване снимањем флуоресцентних емисионих спектра у опсегу таласне дужине од 295 до 500 nm, са ексцитацијом на 290 nm.²³⁹ На слици 87 приказани су емисиони спектри BSA у присуству комплекса **18** растуће концентрације.



Слика 87. Флуоресцентни емисиони спектри BSA у присуству комплекса **18** растуће концентрације. Инсертована слика представља Стерн-Волмеров дијаграм

Постепеним додавањем комплекса **18** и **19** у раствор BSA константне концентрације (5 μM), долази до смањења интензитета флуоресценције на 365 nm, као последица њиховог везивања за овај биомолекул, што потврђују и израчунате вредности константе K_A (Табела 35).²²⁶ С друге стране, K_A вредности за ове комплексе су много мање од 10^{15} M^{-1} ,²⁵⁶ што указује да након транспорта комплекса до циљане ћелије долази до раскидања њихове везе са транспортним протеином. Везивање комплекса **18** и **19** за једно место у испитиваном протеину потврђује и вредност Хиловог коефицијента. Процент хипохромизма за комплексе **18** и **19** је 79,4 и 60,5, респективно, а вредности K_q су у складу са статичким механизмом гашења емисије Trp у BSA.²²⁷

Табела 35. Вредности везујућих константи комплекса **18** и **19** за BSA

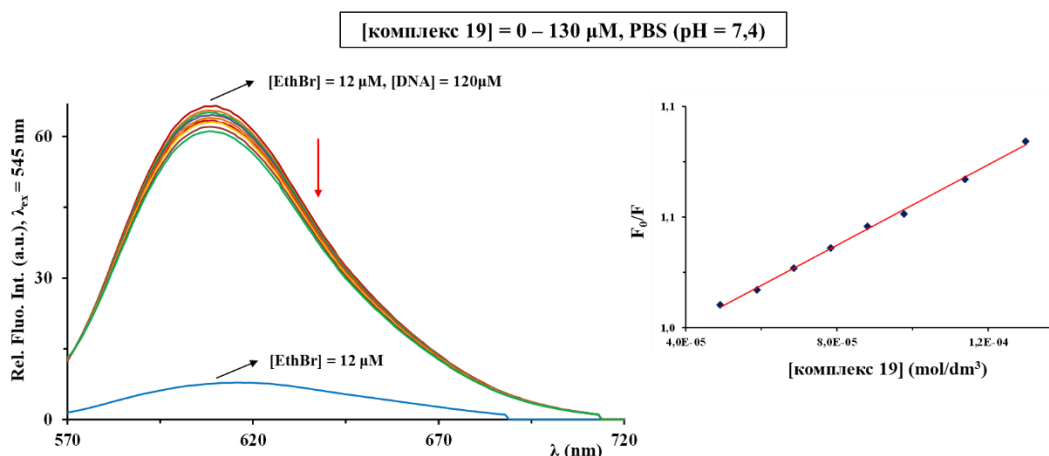
Комплекс	$K_{sv} (\text{M}^{-1})$	Хипохромизам (%)	$K_q (\text{M}^{-1}\text{s}^{-1})$	$K_A (\text{M}^{-1})$	n
18	$(5,41 \pm 0,11) \times 10^5$	79,4	$5,41 \times 10^{13}$	$3,08 \times 10^6$	1,48
19	$(2,10 \pm 0,02) \times 10^4$	60,5	$2,10 \times 10^{12}$	$2,15 \times 10^4$	1,02

4.6.7. Липофилност

Применом методе мућкања, одређена је липофилност комплекса **18** и **19** и изражена као вредност партиционог коефицијента, која износи 2,28 и 1,70, респективно.²³⁹ Већа $\log P$ вредност за комплекс **18** указују на његову бољу дистрибуцију у октанолној фази, и већи ћелијски унос. Моларна маса комплекса **19** је 452,14 g/mol, док је за **18** већа од 500 g/mol, што није ограничавајући фактор за његову потенцијалну примену, као што је раније објашњено.^{258,259}

4.6.8. Интеракције са DNA

Интеракције комплекса **18** и **19** са EthBr-ct-DNA ($[ct-DNA]/[EthBr] = 10$) системом су испитане применом флуоресцентне емисионе спектроскопије.²³⁹ Флуоресцентни емисиони спектри EthBr-ct-DNA система у присуству комплекса **19** растуће концентрације (0 – 190 μM) приказани су на слици 88. Након додавања испитиваних комплекса у EthBr-ct-DNA систем, долази до смањења интензитета флуоресценције, што указује на њихову интеракцију са овим системом. Вредности K_A константи за комплексе **18** и **19** су много мање у односу на одговарајућу K_A вредност за EthBr (Табела 36), што указује да ови комплекси нису интеркалирајући агенси. У складу са овом чињеницом је и проценат хипохромизма, који је мањи од 30%.²⁶⁰



Слика 88. Флуоресцентни емисиони спектри EthBr-ct-DNA система у присуству комплекса **19** растуће концентрације. Инсертована слика представља Стерн-Волмеров дијаграм

Вредности K_q константе за комплексе **18** и **19** су у складу са статичким механизмом гашења флуоресценције, док су вредности Хиловог коефицијента 0,99 и 1,06, респективно.

Табела 36. Вредности везујућих константи комплекса **18** и **19** за ct-DNA

Комплекс	$K_{sv} (M^{-1})$	Хипохромизам (%)	$K_q (M^{-1}s^{-1})$	$K_A (M^{-1})$	n
18	$(1,50 \pm 0,01) \times 10^3$	17,9	$1,50 \times 10^{11}$	$1,37 \times 10^3$	0,99
19	$(1,14 \pm 0,01) \times 10^3$	15,4	$1,14 \times 10^{11}$	$2,00 \times 10^3$	1,06

5. ЗАКЉУЧАК

У оквиру ове докторске дисертације, приказани су резултати, који се односе на синтезу, структурну карактеризацију и антимикуробну активност комплекса бакар(II), цинка(II) и сребра(I) са различитим дериватима пиридина као лигандима.

У реакцијама ових јона метала са диметил-пиридин-дикарбоксилатним естрима синтетисано је шеснаест комплекса: $[\text{Cu}(\text{NO}_3)(\text{py}-2\text{tz})(\text{H}_2\text{O})_3]\text{NO}_3$ (**1**), $[\text{Cu}(\text{NO}_3)_2(\text{py}-2\text{metz})(\text{H}_2\text{O})]$ (**2**), $[\text{Cu}(\text{NO}_3)_2(\text{py}-2\text{py})(\text{H}_2\text{O})]\cdot\text{H}_2\text{O}$ (**3**), $[\text{CuCl}_2(\text{py}-2\text{tz})]_2$ (**4**), $[\text{CuCl}_2(\text{py}-2\text{metz})]_n$ (**5**), $[\text{CuCl}_2(\text{py}-2\text{pz})]_2$ (**6**), $[\text{Cu}(\text{CF}_3\text{SO}_3)(\text{H}_2\text{O})(\text{py}-2\text{pz})_2]\text{CF}_3\text{SO}_3\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (**7**), $[\text{Zn}(\text{py}-2\text{py})\text{Cl}_2]$ (**11**), $[\text{Zn}(\text{py}-2\text{py})\text{Br}_2]$ (**12**), $[\text{Ag}(\text{NO}_3)(\text{py}-2\text{py})]_n$ (**13**), $[\text{Ag}(\text{NO}_3)(\text{py}-2\text{metz})]_n$ (**14**), $[\text{Ag}(\text{CH}_3\text{CN})(\text{py}-2\text{py})]\text{BF}_4$ (**15**), $[\text{Ag}(\text{py}-2\text{tz})_2]\text{BF}_4$ (**16**), $[\text{Ag}(\text{py}-2\text{metz})_2]\text{BF}_4$ (**17**), $[\text{Ag}(\text{py}-2\text{pz})_2]\text{PF}_6$ (**18**) и $\{[\text{Ag}(\text{NO}_3)(\text{py}-2\text{pz})]\cdot 0,5\text{H}_2\text{O}\}_n$ (**19**). Сви комплекси садрже одговарајући диметил-пиридин-дикарбоксилатни естар, бидентатно координован преко атома азота хетероцикличних прстенова, али се структура ових комплекса разликује у зависности од анјона соли метала коришћених за њихову синтезу. У бакар(II) комплексима, нитрат и трифлат се понашају као монодентатни лиганди и контра-анјони, док хлоридни анјон у овим комплексима има улогу мостног лиганда. Халогенидни анјон је координован за Zn(II) јон у комплексима **11** и **12**, док нитрат у комплексима **13** и **14** повезује два Ag(I) јона, међутим у комплексу **19** овај анјон има улогу монодентатно координованог лиганда. С друге стране, BF_4^- и PF_6^- се налазе у спољашњој координационој сфери Ag(I) јона у комплексима **15** – **18**. У складу са овим, геометрија синтетисаних комплекса се разликује, што је потврђено резултатима рендгенске структурне анализе, који су у сагласности са резултатима добијеним на бази спектроскопских метода. Поред диметил-пиридин-дикарбоксилатних естара, ароматична N-хетероциклична једињења, хиначолин (qz), 1,5-нафтиридин (1,5-naph) и 4,7-фенантролин (4,7-phen), коришћени су као лиганди за синтезу $[\text{ZnCl}_2(\text{qz})_2]$ (**8**), $[\text{ZnCl}_2(1,5\text{-naph})]_n$ (**9**) и $[\text{ZnCl}_2(4,7\text{-phen})_2]$ (**10**) комплекса. Наведени комплекси имају очекивану тетраедарску геометрију са незнатним степеном дисторзије. Сви комплекси су показали добру стабилност у раствору током 48 h, што је омогућило испитивање њихове антимикуробне и цитотоксичне активности.

На основу резултата биолошких испитивања, може се закључити да бакар(II) комплекси **1** – **5** показују умерену антифунгалну активност, нарочито према *C. albicans*, а најмање MIC вредности су добијене за комплексе **2** и **5**, при чему је комплекс **5** мање токсичан према здравој MRC-5 ћелијској линији у односу на комплекс **2**. У циљу утврђивања могућег механизма антифунгалног деловања ових комплекса, испитиван је њихов ефекат на формирање хифа и биофилмова код *C. albicans*, при чему су комплекси **1** и **4** скоро потпуно инхибирали формирање хифа, што је у сагласности са њиховим ефектом на адхезију ове гљивице на A549 ћелијску линију карцинома плућа. С друге стране, комплекси **6** и **7** нису утицали на раст ћелија *Candida* сојева, већ су показали умерену антибактеријску активност према *P. aeruginosa*, али није уочена анти-QS активност. Применом флуоресцентне емисионе спектроскопије испитиване су интеракције бакар(II) комплекса **1** – **7** са BSA и ct-DNA, при чему добијени резултати указују да се ови комплекси интеракцијом са протеином могу транспортовати до циљане ћелије. Поред тога, вредности константи везивања комплекса **1** – **7** за ct-DNA указују на њихову интеракцију са EthBr-ct-DNA системом.

За цинк(II) комплексе **8** – **10**, уочена је значајнија зона инхибиције раста у случају *Candida* сојева, при чему је комплекс **10** инхибирао раст већине тестираних бактеријских врста. Поред тога, комплекс **10**, при субинхибиторним концентрацијама, потпуно инхибира филаментацију, и показује најмању токсичност на здравој ћелијској линији. У складу са овим, испитиван је синергистички ефекат овог комплекса са нистатином, при чему је уочено да се при повећању концентрације комплекса значајно сузбија раст гљивице у односу на контролну пробу. С друге стране, MIC вредности

добијене за цинк(II) комплексе **11** и **12** указују да само комплекс **11** показује активност према *Candida* сојевима, док је комплекс **12** показао мању цитотоксичност према здравој MRC-5 ћелијској линији. Комплекс **12** значајно инхибира филаментацију, али показује мању активност на формирање биофилма у односу на комплекс **11**. Испитивањем анти-QS активности комплекса **11** и **12** утврђено је да комплекс **11** инхибира продукцију пигмената продигиозина и виолацеина, спречавајући на тај начин међубактеријску комуникацију. Испитивањем интеракција комплекса **11** и **12** са ct-DNA утврђен је већи афинитет везивања комплекса **12** за EthBr-ct-DNA систем, као последица брже хидролизе Zn–Br у односу на Zn–Cl везу.

Поред активности сребро(I) комплекса **13** – **17** према бактеријским и гљивичним врстама из NCTC и ATCC панела, испитана је њихова активност према клиничким изолатима из млека крава оболелих од маститиса. На основу MIC вредности за испитиване комплексе може се закључити да су они показали веома добру антифунгалну активност, нарочито према *C. parapsilosis*, при чему је значајнија антимикуробна активност према клиничким изолатима (посебно према изолатима *C. albicans* и *Prototheca*). Утврђено је да при MIC вредностима комплекса **14** и **17**, који имају најбољи терапеутски профил, долази до нарушавања мембранског потенцијала ћелија *S. aureus*, као и до инхибиције формирања биофилмова ове бактерије. Комплекси **18** и **19** показују бољу активност према тестираним *Candida* сојевима, а мању токсичност према здравој MRC-5 ћелијској линији у односу на AgSD. Закључено је да антифунгална активност ових комплекса може бити последица њиховог инхибиторног ефекта на формирање хифа и биофилма. Резултати интеракција комплекса **18** и **19** са BSA и ct-DNA указују на њихову способност везивања за транспортни протеин, као и да ови комплекси нису интеркалирајући агенси.

На основу свих приказаних резултата за комплексе бакра(II), цинка(II) и сребра(I) са лигандима који садрже пиридин, може се издвојити одређен број комплекса који би се могли даље тестирати у циљу евентуалне примене у терапији инфекција изазваних микроорганизмима. У ту групу се могу уврстити сребро(I) комплекси са пиридин-4,5-дикарбоксилатним естрима, због своје велике активности према микроорганизмима, који изазивају маститис код крава, болести која доводи до великих економских губитака. Предност овим комплексима за даља биолошка тестирања даје и њихова боља активност у поређењу са клинички коришћеним антимикуробним лековима, као и њихов индекс селективности. Поред комплекса сребра(I), потенцијалан кандидат за даља клиничка испитивања би био цинк(II) комплекс са 4,7-фенантролином због свог синергистичког ефекта са клинички коришћеним нистатином, чиме би се отежала појава резистентности гљивице према овом леку.

Резултати добијени у оквиру ове докторске дисертације су од значаја за дизајн и синтезу нових комплекса метала за потенцијалну примену у клиничкој пракси за ефикасно лечење микробних инфекција и за превазилажење проблема антимикуробне резистентности.

6. ЛИТЕРАТУРА

1. J. O'Neill, *Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations*, Government of the United Kingdom (2016).
2. M. Cruciani, R. Rampazzo, M. Malena, L. Lazzarini, G. Todeschini, A. Messori, E. Concia, *Clin. Infect. Dis.* **23** (1996) 795.
3. C. J. L. Murray, *Lancet* **399** (2022) 629.
4. J. O'Neill, *Antimicrobial resistance: tackling a crisis for the health and wealth of nations*, London: Review on Antimicrobial Resistance (2014).
5. <https://www.pewtrusts.org/en/research-and-analysis/datavisualizations/2014/antibiotics-currently-in-clinicaldevelopment>, преузето 17.07.2023.
6. List of 2018 Medicines in Development for Cancer | PhRMA, преузето 17.07.2023.
7. A. Frei, *Antibiotics* **9** (2020) 90.
8. G. Brahmachari, *Green synthetic approaches for biologically relevant heterocycles*, Elsevier (2015).
9. S. Gibaud, G. Jaouen, *Medicinal Organometallic Chemistry*, ed. G. Jaouen and N. Metzler-Nolte, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg (2010).
10. H. Otten, *J. Antimicrob. Chemother.* **17** (1986) 689.
11. I. D. Vellar, T. B. Hugh, H. Florey, *Med. J. Aust.* **177** (2002) 52.
12. R. Cruickshank, *Nature* **175** (1955) 663.
13. J. Fischer, C. R. Ganellin, *Analogue-based Drug Discovery*, John Wiley & Sons (2006).
14. D. C. Hodgkin, *Adv. Sci.* **6** (1949) 85.
15. M. M. Heravi, V. Zadsirjan, *RSC Adv.* **10** (2020) 44247.
16. P. I. Rafailidis, M. N. Mavros, A. Kapaskelis, M. E. Falagas, *J. Clin. Virol.* **49** (2010) 151.
17. E. P. Acosta, C. V. Fletcher, *Ann. Pharmacother.* **31** (1997) 185.
18. H. C. Neu, *Science* **257** (1992) 1064.
19. M. C. McManus, *Am. J. Health Syst. Pharm.* **54** (1997) 1420.
20. L. O. Gentry, *Orthop. Clin. North Am.* **22** (1991) 379.
21. L. E. Bryan, *J. Antimicrob. Chemother.* **22** (1988) 1.
22. H. Nikaido, *Science* **264** (1994) 382.
23. T. Nakae, *CRC Crit. Rev. Microbiol.* **13** (1986) 1.
24. F. C. Tenover, *Am. J. Med.* **119** (2006) S3.
25. R. H. Holm, P. Kennepohl, E. I. Solomon, *Chem. Rev.* **96** (1996) 2239.
26. F. Lovering, J. Bikker, C. Humblet, *J. Med. Chem.* **52** (2009) 6752.
27. F. Lovering, *MedChemComm* **4** (2013) 515.
28. G. Gasser, N. Metzler-Nolte, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **16** (2012) 84.
29. G. Gasser, *Chimia* **69** (2015) 442.
30. V. Fernández-Moreira, R. P. Herrera, M. C. Gimeno, *Bioinorganic Medicinal Chemistry*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA (2011).
31. R. J. Puddephatt, *The Chemistry of Gold*, Elsevier, Amsterdam (1978).
32. C. Orvig, M. J. Abrams, *Chem. Rev.* **99** (1999) 2201.
33. N. L. Gottlieb, *J. Rheumatol. Suppl.* **8** (1982) 99.
34. M. Patra, G. Gasser, N. Metzler-Nolte, *Dalton Trans.* **41** (2012) 6350.
35. P. Baiocco, G. Colotti, S. Franceschini, A. Ilari, *J. Med. Chem.* **52** (2009) 2603.
36. N. J. White, *J. Clin. Invest.* **113** (2004) 1084.
37. W. C. Reeves, J. L. Hardy, W. K. Reisen, M. M. Milby, *J. Med. Entomol.* **31** (1994) 323.
38. F. Dubar, T. J. Egan, B. Pradines, D. Kuter, K. K. Ncokazi, D. Forge, J.-F. Paul, C. Pierrot, H. Kalamou, J. Khalife, E. Buisine, C. Rogier, H. Vezin, I. Forfar,

- C. Slomianny, X. Trivelli, S. Kapishnikov, L. Leiserowitz, D. Dive, C. Biot, *ACS Chem. Biol.* **6** (2012) 275.
39. F. Dubar, C. Slomianny, J. Khalife, D. Dive, H. Kalamou, Y. Guérardel, P. Grellier, C. Biot, *Angew. Chem. Int. Ed.* **52** (2013) 7690.
40. H. Sun, *Biological Chemistry of Arsenic, Antimony and Bismuth*, Wiley: Weinheim, Germany (2010).
41. M. J. R. Janssen, L. Hendrikse, S. Y. de Boer, R. Bosboom, W. A. De Boer, R. J. F. Laheij, J. B. M. Jansen, *J. Neth. J. Med.* **64** (2006) 191.
42. R. Wang, T.-P. Lai, P. Gao, H. Zhang, P.-L. Ho, P. C.-Y. Woo, G. Ma, R. Y.-T. Kao, H. Li, H. Sun, *Nat. Comm.* **9** (2018) 439.
43. S. Eckhardt, P. S. Brunetto, J. Gagnon, M. Priebe, B. Giese, K. M. Fromm, *Chem. Rev.* **113** (2013) 4708.
44. C. Bonchi, F. Imperi, F. Minandri, P. Visca, E. Frangipani, *BioFactors* **40** (2014) 303.
45. E. Banin, M. L. Vasil, E. P. Greenberg, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102** (2005) 11076.
46. F. Li, J. G. Collins, F. R. Keene, *Chem. Soc. Rev.* **44** (2015) 2529.
47. E. Madsen, J. D. Gitlin, *Annu. Rev. Neurosci.* **30** (2007) 317.
48. C. L. Keen, J. Y. Uriu-Hare, S. N. Hawk, M. A. Jankowski, G. P. Daston, C. L. Kwik-Urbe, R. B. Rucker, *Am. J. Clin. Nutr.* **67** (1998) 1003S.
49. P. deBie, P. Muller, C. Wijmenga, L. W. J. Klomp, *J. Med. Genet.* **44** (2009) 673.
50. N. Horn, Z. Tümer, *J. Trace Elem. Exp. Med.* **12** (1999) 297.
51. S. J. Bhatena, *Med. Sci. Res.* **17** (1989) 537.
52. Z. L. Harris, J. D. Gitlin, *Am. J. Clin. Nutr.* **63** (1996) 836S.
53. L. Calabrese, M. Carbonaro, G. Musci, *J. Biol. Chem.* **264** (1989) 6183.
54. H. Shim, Z. L. Harris, *J. Nutr.* **133** (2003) 1527S.
55. G. J. Brewer, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **7** (2003) 207.
56. T. Müller, C. Langner, A. Fuchsbichler, P. Heinz-Erian, H. Ellemunter, B. Schlenck, A. R. Bavdekar, A. M. Pradhan, A. Pandit, J. Müller-Höcker, M. Melter, K. Kobayashi, H. Nagasaka, H. Kikuta, W. Müller, M. S. Tanner, I. Sternlieb, K. Zatloukal, H. Denk, *Hepatology* **39** (2004) 963.
57. M. A. Cater, J. F. B. Mercer, in *Topics in Current Genetics* (eds. M. Tamás and E. Martinoia), Springer, Berlin/Heidelberg (2006) 101.
58. R. Squitti, *Front. Biosci.* **17** (2012b) 451.
59. R. R. Conry, *Copper: Inorganic & Coordination Chemistry*, Colby College, Waterville, ME, USA (2011).
60. M. E. Weeks, *Discovery of the Elements*, 6th edn., Journal of Chemical Education, Easton, PA (1960).
61. С. Р. Арсенијевић, *Хемија општа и неорганска* (петнаесто издање), Научна књига, Београд (1998).
62. M. J. O'Neil, *The Merck Index*, 13th edn., Merck, Whitehouse Station, NJ (2001).
63. И. Филиповић, С. Липановић, *Опћа и аорганска кемија* (II део), Школска књига, Загреб (1985).
64. Н. Б. Милић, *Неорганска комплексна и кластерна једињења*, Школска књига, Крагујевац (1998).
65. M. A. Halcrow, *Dalton Trans.* (2003) 4375.
66. Z. D. Matović, G. Pelosi, S. Ianelli, G. Ponticelli, D. D. Radanović, D. J. Radanović, *Inorg. Chim. Acta.* **268** (1998) 221.
67. M. L. Beeton, J. R. Aldrich-Wright and A. Bolhuis, *J. Inorg. Biochem.* **140** (2014) 167.
68. K. Alomar, A. Landreau, M. Allain, G. Bouet, G. Larcher, *J. Inorg. Biochem.* **126** (2013) 76.

69. C. Tolia, A. N. Papadopoulos, C. P. Raptopoulou, V. Psycharis, C. Garino, L. Salassa, G. Psomas, *J. Inorg. Biochem.* **123** (2013) 53.
70. W. C. Zhang, X. Tang, X. Lu, *J. Inorg. Biochem.* **156** (2016) 105.
71. J. E. Weder, C. T. Dillon, T. V. Hambley, B. J. Kennedy, P. A. Lay, J. R. Biffin, H. L. Regtop, N. M. Davies, *Coord. Chem. Rev.* **232** (2002) 95.
72. M. Rizzotto, *Metal complexes as antimicrobial agents. In A Search for Antibacterial Agents*, V. Bobbarala, Ed.; InTech: Rijeka, Croatia (2012).
73. N. I. Jakab, Z. Vasková, J. Moncol, B. Gyurcsik, J. Šima, M. Koman, D. Valigura, *Polyhedron* **29** (2010) 2262.
74. N. Palanisami, G. Prabusankar, R. Murugavel, *Inorg. Chem. Commun.* **9** (2006) 1002.
75. J. R. J. Sorenson, *J. Med. Chem.* **19** (1976) 135.
76. L. Kucková, K. Jomová, A. Švorcová, M. Valko, P. Segľa, J. Moncol, J. Kožíšek, *Molecules* **20** (2015) 2115.
77. A. Čongrádyová, K. Jomová, L. Kucková, J. Kožíšek, J. Moncol, M. Valko, *J. Microbiol. Biotech. Food Sci.* **3** (2014) 67.
78. X. Liu, X. Li, Z. Zhang, Y. Dong, P. Liu, C. Zhang, *Biol. Trace Elem. Res.* **154** (2013) 150.
79. M. Chikira, Y. Tomizawa, D. Fukita, T. Sugizaki, N. Sugawara, T. Yamazaki, A. Sasano, H. Shindo, M. Palaniandavar, W. E. Antholine, *J. Inorg. Biochem.* **89** (2002) 163.
80. K. Asemave, S. G. Yiase, S. O. Adejo, B. A. Anhwange, *Int. J. Inorg. Bioinorg. Chem.* **2** (2011) 11.
81. D. İnci, R. Aydın, Ö. Vatan, T. Sevgi, D. Yılmaz, Y. Zorlu, Y. Yerli, B. Çoşut, E. Demirkan, N. Çinkılıç, *Biol. Inorg. Chem.* **22** (2017) 61.
82. B. Đ. Glišić, I. Aleksic, P. Comba, H. Wadepohl, T. Ilic-Tomic, J. Nikodinovic-Runic, M. I. Djuran, *RSC Adv.* **6** (2016) 86695.
83. T. Morohoshi, M. Kato, K. Fukamachi, N. Kato, T. Ikeda, *FEMS Microbiol. Lett.* **279** (2008) 124.
84. S. Pinheiro, E. M. C. Pinheiro, E. M. F. Muri, J. C. Pessôa, M. A. Cadorini, S. J. Greco, *Med. Chem. Res.* **29** (2020) 1751.
85. L. L. Ruta, I. C. Farcasanu, M. Bacalum, M. Raileanu, A. M. Rostas, C. Daniliuc, M. C. Chifiriuc, L. Măruțescu, M. Popa, M. Badea, E. E. Iorgulescu, R. Olar, *Molecules* **26** (2021) 6772.
86. European Centre for Disease Prevention and Control, *Antimicrobial Resistance in the EU/EEA (EARS-Net)—Annual Epidemiological Report 2019*, ECDPC: Stockholm, Sweden (2020).
87. E. J. Underwood, *Trace Elements in Human and Animal Nutrition*, 4th ed., Academic Press (1977).
88. B. L. Vallee, K. H. Falchuk, *Physiol. Rev.* **73** (1993) 79.
89. D. S. Auld, *BioMetals* **14** (2001) 271.
90. N. J. Farrer, P. J. Sadler, *Medicinal Inorganic Chemistry: State of the Art, New Trends, and a Vision of the Future, in Bioinorganic Medicinal Chemistry*, ed. E. Alessio, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim (2011).
91. N. V. Bhagavan, C.-E. Ha, *Essentials of Medical Biochemistry*, 2nd Edition, Elsevier (2015).
92. T. Ravasi, T. Huber, M. Zavolan, A. Forrest, T. Gaasterland, S. Grimmond, *Genome Res.* **13** (2003) 1430.
93. G. Nowak, B. Szewczyk, A. Pilc, *Pharmacol. Rep.* **57** (2005) 713.
94. G. J. Brewer, S. H. Kanzer, E. A. Zimmerman, E. S. Molho, D. F. Celmins, S. M. Heckman, R. Dick, *Am. J. Alzheimer's Dis. Other Demen.* **25** (2010) 572.

95. P. Pathak, U. Kapil, *Indian J. Pediatr.* **71** (2004) 1003.
96. S. L. Howell, D. A. Young, P. E. Lacy, *J. Cell Biol.* **41** (1969) 167.
97. A. B. Chausmer, *J. Am. Coll. Nutr.* **17** (1998) 109.
98. L. Coulston, P. Dandona, *Diabetes* **29** (1980) 665.
99. J. Jansen, W. Karges, L. Rink, *J. Nutr. Biochem.* **20** (2009) 399.
100. A. S. Prasad, *Met. Ions Biol. Syst.* **41** (2004) 103.
101. N. Roohani, R. Hurrell, R. Kelishadi, R. Schulin, *J. Res. Med. Sci.* **18** (2013) 144.
102. E. Szunyogová, D. Mudroňová, K. Györyová, R. Nemcová, J. Kovářová, L. Píknová-Findoráková, *J. Therm. Anal. Calorim.* **88** (2007) 355.
103. M. P. Cuajungco, M. S. Ramirez, M. E. Tolmasky, *Biomedicines* **9** (2021) 208.
104. S. Atmaca, K. Gul, R. Clcek, *Tr. J. Med. Sci.* **28** (1998) 595.
105. J. Pasquet, Y. Chevalier, J. Pelletier, E. Couval, D. Bouvier, M.-A. Bolzinger, *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects.* **457** (2014) 263.
106. K. R. Raghupathi, R. T. Koodali, A. C. Manna, *Langmuir* **27** (2011) 4020.
107. S. Sonia, J. K. H. Linda, K. Ruckmani, M. Sivakumar, *Mater. Sci. Eng. C* **79** (2017) 581.
108. L. Zhang, Y. Jiang, Y. Ding, M. Povey, D. York, *J. Nanopart. Res.* **9** (2007) 479.
109. T. Xia, M. Kovoichich, M. Liong, L. Mädler, B. Gilbert, H. Shi, J. I. Yeh, J. I. Zink, A. E. Nel, *ACS Nano* **2** (2008) 2121.
110. M. Abendrot, U. Kalinowska-Lis, *Int. J. Cosmet. Sci.* **40** (2018) 319.
111. A. S. Prasad, *Front. Nutr.* **1** (2014) 1.
112. A. A. Dayem, M. K. Hossain, S. B. Lee, K. Kim, S. K. Saha, G.-M. Yang, H. Y. Choi, S.-G. Cho, *Int. J. Mol. Sci.* **18** (2017) 120.
113. M. Gupta, V. K. Mahajan, K. S. Mehta, P. S. Chauhan, *Dermatol. Res. Pract.* **2014** (2014).
114. A. Frydrych, J. Arcf, K. Kasiura, *J. Appl. Cosmetol.* **22** (2004) 1.
115. P. A. Cox, *The Elements: Their Origin, Abundance, and Distribution*, Oxford University Press (1989).
116. J. Burgess, R. H. Prince, *Zinc: Inorganic & Coordination Chemistry, Encyclopedia of Inorganic and Bioinorganic Chemistry*, John Wiley & Sons, Ltd. (2006).
117. Д. Полети, *Општа хемија II, Хемија елемената*, Треће издање, Школска књига, Београд (2011).
118. M. Enamullah, M. A. Quddus, M. A. Halim, M. K. Islam, V. Vasylyeva, C. Janiak, *Inorg. Chim. Acta* **427** (2015) 103.
119. B. Modéc, *Crystals* **8** (2018) 52.
120. N. L. Reeder, J. Xu, R. S. Youngquist, R. C. Rust, C. W. Saunders, *Br. J. Dermatol.* **165** (2011) 9.
121. G. Chen, M. Miao, M. Hoptroff, X. Fei, L. Z. Collins, A. Jones, H.-G. Jansee, *J. Chromatogr. B* **1003** (2015) 22.
122. а) E. Ermolayeva, D. Sanders, *Appl. Environ. Microbiol.* **61** (1995) 3385;
б) C. J. Chandler, I. H. Segel, *Antimicrob. Agents Chemother.* **14** (1978) 60.
123. J. Kladnik, A. Dolinar, J. Kljun, D. Perea, J. Grau-Expósito, M. Genescà, M. Novinec, M. J. Buzon, I. Turel, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **37** (2022) 2158.
124. H. Masaki, Y. Ochiai, Y. Okano, A. Yagami, H. Akamatsu, K. Matsunaga, H. Sakurai, K. Suzuki, *J. Dermatol. Sci.* **45** (2007) 73.
125. M. Abendrot, L. Chęcińska, J. Kusz, K. Lisowska, K. Zawadzka, A. Felczak, U. Kalinowska-Lis, *Molecules* **25** (2020) 951.
126. A. W. Addison, T. N. Rao, J. Reedijk, J. van Rijn, G. C. Verschoor, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* (1984) 1349.

127. H. Mansouri-Torshizi, F. Khosravi, A. Ghahghaei, S. Shahraki, S. Zareian-Jahromi, *J. Biomol. Struc. Dyn.* **36** (2018) 2713.
128. N. Ndosiri, A. Ondoh, P. Gambie, N. Teke, D. Yufanyi, A. Colette, *Res. J. Pharm. Biol. Chem. Sci.* **4** (2013) 386.
129. I. P. Ejidike, P. A. Ajibade, *Molecules* **20** (2015) 9788.
130. M. Agwara, P. Ndifon, N. Ndosiri, A. Paboudam, D. Yufanyi, A. Mohamadou, *Bull. Chem. Soc. Ethiop.* **24** (2010) 383.
131. A. T. Buddanavar, S. T. Nandibewoor, *J. Pharm. Anal.* **7** (2017) 148.
132. D. C. Onwudiwe, Y. B. Nthwane, A. C. Ekennia, E. Hosten, *Inorg. Chim. Acta* **447** (2016) 134.
133. O. H. J. Szolar, *Anal. Chim. Acta* **582** (2007) 191.
134. L. Nand, *Chem. Biol. Interf.* **4** (2014) 321.
135. P. J. Rani, S. Thirumaran, *Eur. J. Med. Chem.* **62** (2013) 139.
136. Z. Xun-Zhong, F. An-Sheng, Z. Fu-Ran, L. Min-Cheng, L. Yan-Zhi, M. Meng, L. Yu, *Bioinorg. Chem. Appl.* **2020** (2020) 8852470.
137. S. Medici, M. Peana, V. M. Nurchi, M. A. Zoroddu, *J. Med. Chem.* **62** (2019) 5923.
138. C. N. Banti, A. D. Giannoulis, N. Kourkoumelis, A. M. Owczarzak, M. Poyraz, M. Kubicki, K. Charalabopoulos, S. K. Hadjikakou, *Metallomics* **4** (2012) 545.
139. M. Pellei, V. Gandin, M. Marinelli, C. Marzano, M. Yousufuddin, H. V. Dias, C. Santini, *Inorg. Chem.* **51** (2012) 9873.
140. P. Dibrov, J. Dzioba, K. K. Gosink, C. C. Hase, *Antimicrob. Agents Chemother.* **46** (2002) 2668.
141. A. M. Konigs, H. C. Flemming, J. Wingender, *Front. Microbiol.* **6** (2015) 395.
142. R. B. Wakshlak, R. Pedahzur, D. Avnir, *Sci. Rep.* **5** (2015) 9555.
143. J. W. Alexander, *Surg. Infect.* **10** (2009) 289.
144. K. M. Fromm, *Nat. Chem.* **3** (2011) 178.
145. S. Silver, *FEMS Microbiol. Rev.* **27** (2003) 341.
146. A. Hambidge, *Health Estate*, **55** (2001) 23.
147. A. B. G. Lansdown, in *Metal Ions in Toxicology*, ed. A. Sigel, H. Sigel, R. K. O. Sigel, *The Royal Society of Chemistry* **8** (2010) 187.
148. K. Mijnenonckx, N. Leys, J. Mahillon, S. Silver, R. V. Houdt, *Biometals* **26** (2013) 609.
149. B. W. East, K. Boddy, E. D. Williams, D. Macintyre, A. L. Mclay, *Clin. Exp. Dermatol.* **5** (1980) 305.
150. R. G. Pearson, *J. Am. Chem. Soc.* **85** (1963) 3533.
151. N. C. Kasuga, A. Sugie, K. Nomiya, *Dalton Trans.* (2004) 3732.
152. B. Glišić, L. Senerovic, P. Comba, H. Wadepohl, A. Veselinovic, D. R. Milivojevic, M. I. Djuran, J. Nikodinović-Runic, *J. Inorg. Biochem.* **155** (2016) 115.
153. S. Medici, M. Peana, G. Crisponi, V. M. Nurchi, J. I. Lachowicz, M. Remelli, M. A. Zoroddu, *Coord. Chem. Rev.* **327** (2016) 349.
154. E. T. Bodor, S. Offermanns, *Br. J. Pharmacol.* **153** (2008) S68.
155. B. G. Brown, X. Q. Zhao, *Am. J. Cardiol.* **101** (2008) B58.
156. U. Kalinowska-Lis, A. Felczak, L. Chęcińska, K. Lisowska, J. Ochocki, *J. Organomet. Chem.* **749** (2014) 394.
157. U. Kalinowska-Lis, E. M. Szewczyk, L. Chęcińska, J. M. Wojciechowski, W. M. Wolf, J. Ochocki, *ChemMedChem* **9** (2014) 169.
158. M. A. El-Naggar, M. A. M. Abu-Youssef, S. M. Soliman, M. Haukka, A. M. Al-Majid, A. Barakat, A. M. A. Badr, *J. Mol. Struc.* **1264** (2022) 133210.
159. M. Rendošová, Z. Vargová, D. Sabolová, N. Imrichová, D. Hudecová, R. Gyepes, B. Lakatoš, K. Elefantová, *J. Inorg. Biochem.* **186** (2018) 206.

160. H. A. Krebs, D. Wiggins, M. Stubbs, A. Sols, F. Bedoya, *Biochem. J.* **214** (1983) 657.
161. P. J. Aggett, P. K. Fenwick, H. Kirk, *J. Nutr.* **119** (1989) 1432.
162. C. Dazzi, G. Candiano, S. Massazza, A. Ponzetto, L. Varesio, *J. Chromatogr. B* **751** (2001) 61.
163. Z. Vargová, M. Almáši, D. Hudecová, D. Titková, I. Rostášová, V. Zeleňák, K. Györyová, *J. Coord. Chem.* **47** (2014) 1002.
164. S. M. Soliman, S. E. Elsilk, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **187** (2018) 48.
165. J. Bezenšek, B. Prek, U. Grošelj, M. Kasunič, J. Svete, B. Stanovnik, *Tetrahedron* **68** (2012) 4719.
166. V. V. Kovalev, Y. E. Gorbunova, S. A. Kozyukhin, Y. V. Kokunov, *Russ. J. Inorg. Chem.* **61** (2016) 583.
167. CrysAlis PRO, Oxford Diffraction Ltd, Yarnton, Oxfordshire, England (2011).
168. O. V. Dolomanov, L. J. Bourhis, R. J. Gildea, J. A. K. Howard, H. Puschmann, *J. Appl. Crystallogr.* **42** (2009) 339.
169. G. M. Sheldrick, *Acta Crystallogr. Sect. A: Found. Adv.* **71** (2015) 3.
170. 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.
171. CrysAlisPro, Version 1.171, Rigaku Oxford Diffraction (2018).
172. G. Sheldrick, *Acta Crystallogr. Sect. A: Found. Crystallogr.* **71** (2015) 3.
173. G. Sheldrick, *Acta Crystallogr. Sect. C: Cryst. Struct. Commun.* **71** (2015) 3.
174. Oxford Diffraction Ltd. CrysAlis PRO; Agilent Technologies: Yarnton, UK (2011).
175. G. M. Sheldrick, SHELXL2018/3, University of Göttingen, Germany (2018).
176. U. Kalinowska-Lis, A. Felczak, L. Chęcińska, K. Zawadzka, E. Patyna, K. Lisowska, J. Ochocki, *Dalton Trans.* **44** (2015) 8178.
177. 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.
178. E. J. Baerends, T. Ziegler, A. J. Atkins, J. Autschbach, D. Bashford, O. Baseggio, A. Bérces, F. M. Bickelhaupt, C. Bo, P. M. Boerritger, L. Cavallo, C. Daul, D. P. Chong, D. v Chulhai, L. Deng, R. M. Dickson, J. M. Dieterich, D. E. Ellis, M. van Faassen, A. Ghysels, A. Giammona, S. J. A. van Gisbergen, A. Goetz, A. W. Götz, S. Gusarov, F. E. Harris, P. van den Hoek, Z. Hu, C. R. Jacob, H. Jacobsen, L. Jensen, L. Joubert, J. W. Kaminski, G. van Kessel, C. König, F. Kootstra, A. Kovalenko, M. Krykunov, E. van Lenthe, D. A. McCormack, A. Michalak, M. Mitoraj, S. M. Morton, J. Neugebauer, V. P. Nicu, L. Noodleman, V. P. Osinga, S. Patchkovskii, M. Pavanello, C. A. Peebles, P. H. T. Philipsen, D. Post, C. C. Pye, H. Ramanantoanina, P. Ramos, W. Ravenek, J. I. Rodríguez, P. Ros, R. Rüger, P. R. T. Schipper, D. Schlüns, H. van Schoot, G. Schreckenbach, J. S. Seldenthuis, M. Seth, J. G. Snijders, M. Solà, M. Stener, M. Swart, D. Swerhone, V. Tognetti, G. te Velde, P. Vernooijs, L. Versluis, L. Visscher, O. Visser, F. Wang, T. A. Wesolowski, E. M. van Wezenbeek, G. Wiesenekker, S. K. Wolff, T. K. Woo, A. L. Yakovlev, ADF 2022.1, SCM, Theoretical Chemistry, Vrije Universiteit, Amsterdam, The Netherlands, <https://www.scm.com>.
179. R. Rüger, M. Franchini, T. Trnka, A. Yakovlev, E. van Lenthe, P. Philipsen, T. van Vuren, B. Klumpers, T. Soini, AMS 2022.1, SCM, Theoretical Chemistry, Vrije Universiteit, Amsterdam, The Netherlands, <http://www.scm.com>.
180. E. van Lenthe, E. J. Baerends, J. G. Snijders, *J. Chem. Phys.* **99** (1993) 4597.
181. E. van Lenthe, E. J. Baerends, J. G. Snijders, *J. Chem. Phys.* **101** (1994) 9783.
182. C. van Wüllen, *J. Chem. Phys.* **109** (1998) 392.
183. A. Klamt, G. Schoermann, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* (1993) 799.
184. A. Klamt, *J. Phys. Chem.* **99** (1995) 2224.

185. Y. Zhao, D. G. Truhlar, *J. Chem. Phys.* **125** (2006) 194101.
186. Y. Zhao, D. G. Truhlar, *Theor. Chem. Acc.* **120** (2008) 215.
187. M. B. Hansen, S. E. Nielsen, K. Berg, *J. Immunol. Methods* **119** (1989) 203.
188. B. S. R. Mohamed, M. Subramanian, K. P. Shunmugiah, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **98** (2014) 6775.
189. 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.
190. S. Đurić, S. Vojnovic, A. Pavic, M. Mojicevic, H. Wadepohl, N. D. Savić, M. Popsavin, J. Nikodinovic-Runic, M. I. Djuran, B. Đ. Glišić, *J. Inorg. Biochem.* **203** (2020) 110872.
191. W. F. Elkhatib, A. S. Khairalla, H. M. Ashour, *Future Microbiol.* **9** (2014) 725.
192. Á. Jakab, S. Mogavero, T. M. Forster, M. Pekmezovic, N. Jablonowski, V. Dombrádi, I. Pócsi, B. Hube, *Microbiology* **162** (2016) 2116.
193. D. L. Higgins, R. Chang, D. V. Debabov, J. Leung, T. Wu, K. M. Krause, E. Sandvik, J. M. Hubbard, K. Kaniga, D. E. Schmidt Jr., Q. Gao, R. T. Cass, D. E. Karr, B. M. Benton, P. P. Humphrey, *Antimicrob. Agents Chemother.* **49** (2005) 1127.
194. V. C. Scoffone, L. R. Chiarelli, V. Makarov, G. Brackman, A. Israyilova, A. Azzalin, F. Forneris, O. Riabova, S. Savina, T. Coenye, G. Riccardi, S. Buroni, *Sci. Rep.* **6** (2016) 32487.
195. G. Brackman, P. Cos, L. Maes, H. J. Nelis, T. Coenye, *Antimicrob. Agents Chemother.* **55** (2011) 2655.
196. T. Stiernagle, *Maintenance of C. elegans*, WormBook (2006) 1.
197. F. C. Odds, *J. Antimicrob. Chemother.* **52** (2003) 1.
198. K. H. McClean, M. K. Winson, L. Fish, A. Taylor, S. R. Chhabra, M. Camara, M. Daykin, J. H. Lamb, S. Swift, B. W. Bycroft, G. S. A. B. Stewart, P. Williams, *Microbiology* **143** (1997) 3703.
199. I. Aleksić, S. Šegan, F. Andrić, M. Zlatović, I. Moric, D. M. Opsenica, L. Senerovic, *ACS Chem. Biol.* **12** (2017) 1425.
200. P. Smoleński, C. Pettinari, F. Marchetti, M. F. C. Guedes da Silva, G. Lupidi, G. V. B. Patzmay, D. Petrelli, L. A. Vitali, A. J. L. Pomberio, *Inorg. Chem.* **54** (2015) 434.
201. A. Wolfe, G. H. Shimer Jr., T. Meehan, *Biochemistry* **26** (1987) 6392.
202. V. T. Yilmaz, E. Gocmen, C. Iysel, M. Cengiz, S. Y. Susluer, O. Buyukgungor, *J. Photochem. Photobiol. B* **131** (2014) 31.
203. N. D. Savić, S. Vojnovic, B. Đ. Glišić, A. Crochet, A. Pavic, G. M. Janjić, M. Pekmezović, I. M. Opsenica, K. M. Fromm, J. Nikodinovic-Runic, M. I. Djuran, *Eur. J. Med. Chem.* **156** (2018) 760.
204. C. A. Puckett, J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.* **129** (2007) 46.
205. J. Reim, B. Krebs, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* (1997) 3793.
206. A. C. Sousa, M. C. Oliveira, L. O. Martins, M. P. Robalo, *Green Chem.* **16** (2014) 4127.
207. 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.
208. A. W. Addison, T. N. Rao, J. Reedijk, J. van Rijn, G. C. Verschoor, *Dalton Trans.* (1984) 1349.
209. A. S. Potapov, E. A. Nudnova, A. I. Khlebnikov, V. D. Ogorodnikov, T. V. Petrenko, *Inorg. Chem. Commun.* **53** (2015) 72.
210. A. B. P. Lever, E. Mantovani, B. S. Ramaswamy, *Can. J. Chem.* **49** (1971) 1957.

211. B. J. Hathaway, in *Comprehensive Coordination Chemistry*, ed. G. Wilkinson, R. D. Gillard and J. A. McCleverty, vol. 5, Pergamon, Oxford, 1987.
212. N. Lj. Stevanović, T. P. Andrejević, A. Crochet, T. Ilic-Tomic, N. S. Drašković, J. Nikodinovic-Runic, K. M. Fromm, M. I. Djuran, B. Đ. Glišić, *Polyhedron* **173** (2019) 114112.
213. I. Ali, W. A. Wani, K. Saleem, *Synth. React. Inorg. Met.* **43** (2013) 1162.
214. W. J. Geary, *Coord. Chem. Rev.* **7** (1971) 81.
215. J. M. S. Cardoso, I. Correia, A. M. Galvão, F. Marques, M. F. N. N. Carvalho, *J. Inorg. Biochem.* **166** (2017) 55.
216. A. P. Sandoval-Rojas, L. Ibarra, M. T. Cortés, M. A. Macías, L. Suescun, J. Hurtado, *J. Electroanal. Chem.* **805** (2017) 60.
217. E. Franco, E. Lopez-Torres, A. Mendiola, T. Sevilla, *Polyhedron* **19** (2000) 441.
218. 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.
219. T. Suksrichavalit, S. Prachayasittikul, C. Nantasenamat, C. Isarankura-Na-Ayudhya, V. Prachayasittikul, *Eur. J. Med. Chem.* **44** (2009) 3259.
220. F. G. da Silva Dantas, A. A. de Almeida-Apolonio, R. P. de Araújo, L. R. V. Favarin, P. F. de Castilho, F. de Oliveira Galvão, T. I. E. Svidzinski, G. A. Casagrande, K. M. P. de Oliveira, *Molecules* **23** (2018) 1856.
221. 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.
222. L. Sun, K. Liao, C. Hang, D. Wang, *PLoS One* **12** (2017) e0172228.
223. B. Wächtler, F. Citiulo, N. Jablonowski, S. Förster, F. Dalle, M. Schaller, D. Wilson, B. Hube, *PLoS One* **7** (2012) e36952.
224. J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Plenum Press, New York, 3rd edn (2006).
225. Y.-Q. Wang, H.-M. Zhang, G.-C. Zhang, W.-H. Tao, S.-H. Tang, *J. Lumin.* **126** (2007) 211.
226. V. Rajendiran, R. Karthik, M. Palaniandavar, H. Stoeckli-Evans, V. S. Periasamy, M. A. Akbarsha, B. S. Srinag, H. Krishnamurthy, *Inorg. Chem.* **46** (2007) 8208.
227. Y. Shi, C. Guo, Y. Sun, Z. Liu, F. Xu, Y. Zhang, Z. Wen, Z. Li, *Biomacromolecules* **12** (2011) 797.
228. F. Jozefíková, S. Perontsis, M. Šimunková, Z. Barbieriková, Ľ. Švorc, M. Valko, G. Psomas, J. Moncol', *New J. Chem.* **44** (2020) 12827.
229. R. P. Sharma, S. Kumar, P. Venugopalan, V. Ferretti, A. Tarushi, G. Psomas, M. Witwicki, *RSC Adv.* **6** (2016) 88546.
230. F. Dimiza, S. Fountoulaki, A. N. Papadopoulos, C. A. Kontogiorgis, V. Tangoulis, C. P. Raptopoulou, V. Psycharis, A. Terzis, D. P. Kessissoglou, G. Psomas, *Dalton Trans.* **40** (2011) 8555.
231. S. Mehanna, N. Mansour, H. Audi, K. Bodman-Smith, M. A. Mroueh, R. I. Taleb, C. F. Daher, R. S. Khnayzer, *RSC Adv.* **9** (2019) 17254.
232. L. Fetzer, B. Boff, M. Ali, M. Xiangjun, J.-P. Collin, C. Sirlin, C. Gaiddon, M. Pfeffer, *Dalton Trans.* **40** (2011) 8869.
233. A. Ghezzi, M. Aceto, C. Cassino, E. Gabano, D. Osella, *J. Inorg. Biochem.* **98** (2004) 73.
234. A. K. Ghose, V. N. Viswanadhan, J. J. Wendoloski, *J. Comb. Chem.* **1** (1999) 55.
235. I. Turel, J. Kljun, *Curr. Top. Med. Chem.* **11** (2011) 2661.

236. A. M. Godin, W. C. Ferreira, L. T. S. Rocha, J. G. T. Seniuk, A. L. L. Paiva, L. A. Merlo, E. B. Nascimento Jr., L. F. S. Bastos, M. M. Coelho, *Pharmacol. Biochem. Behav.* **99** (2011) 782.
237. R. F. Pasternack, M. Cacca, B. Keogh, T. A. Stephenson, A. P. Williams, F. J. Gibbs, *J. Am. Chem. Soc.* **113** (1991) 6835.
238. J.-B. Lepecq, C. Paoletti, *J. Mol. Biol.* **27** (1967) 87.
239. 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.
240. J. A. Dean, *Lange's Hand Book of Chemistry*, fourteenthed, Megraw-Hill, New York, (1992) 35.
241. M. Sirajuddin, S. Ali, A. Badshah, *J. Photochem. Photobiol. B* **124** (2013) 1.
242. N. Stevanović, M. Zlatar, I. Novaković, A. Pevec, D. Radanović, I. Z. Matić, M. Đorđić Crnogorac, T. Stanojković, M. Vujčić, M. Gruden, D. Sladić, K. Anđelković, I. Turel, B. Čobeljić, *Dalton Trans.* **51** (2021) 185.
243. J. Serment-Guerrero, P. Cano-Sanchez, E. Reyes-Perez, F. Velazquez-Garcia, M. E. Bravo-Gomez, L. Ruiz-Azuara, *Toxicol. In Vitro* **25** (2011) 1376.
244. R. Galindo-Murillo, J. C. García-Ramos, L. Ruiz-Azuara, T. E. Cheatham III, F. Cortés-Guzmán, *Nucleic Acids Res.* **43** (2015) 5364.
245. J. Serment-Guerrero, M. E. Bravo-Gomez, E. Lara-Rivera, L. Ruiz-Azuara, *J. Inorg. Biochem.* **166** (2017) 68.
246. J. C. García-Ramos, A. G. Gutiérrez, A. Vázquez-Aguirre, Y. Toledano-Magaña, A. L. Alonso-Sáenz, V. Gómez-Vidales, M. Flores-Alamo, C. Mejía, L. Ruiz-Azuara, *BioMetals* **30** (2017) 43.
247. A. G. Gutiérrez, A. Vázquez-Aguirre, J. C. García-Ramos, M. Flores-Alamo, E. Hernández-Lemus, L. Ruiz-Azuara, C. Mejía, *J. Inorg. Biochem.* **126** (2013) 17.
248. S. Roy, S. Saha, R. Majumdar, R. R. Dighe, A. R. Chakravarty, *Polyhedron* **29** (2010) 2787.
249. V. M. Manikandamathavan, V. Rajapandian, A. J. Freddy, T. Weyhermüller, V. Subramanian, B. U. Nair, *Eur. J. Med. Chem.* **57** (2012) 449.
250. J. Grau, R. F. Brissos, J. Salinas-Uber, A. B. Caballero, A. Caubet, O. Roubeau, L. Korrodi-Gregório, R. Pérez-Tomás and P. Gamez, *Dalton Trans.* **44** (2015) 16061.
251. V. M. Manikandamathavan, M. Thangaraj, T. Weyhermuller, R. P. Parameswari, V. Punitha, N. N. Murthy, B. U. Nair, *Eur. J. Med. Chem.* **135** (2017) 434.
252. B. Đ. Glišić, J. Nikodinovic-Runic, T. Ilic-Tomic, H. Wadepohl, A. Veselinović, I. M. Opsenica, M. I. Djuran, *Polyhedron* **139** (2018) 313.
253. 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.
254. I. M. Stanojević, I. Aleksić, N. S. Drašković, B. Đ. Glišić, S. Vojnović, J. Nikodinović-Runić, *J. Serb. Chem. Soc.* **82** (2017) 1357.
255. F. Imperi, F. Massai, C. R. Pillai, F. Longo, E. Zennaro, G. Rampioni, P. Visca, L. Leoni, *Antimicrob. Agents Chemother.* **57** (2013) 996.
256. O. H. Laitinen, V. P. Hytönen, H. R. Nordlund, M. S. Kulomaa, *Cell. Mol. Life Sci.* **63** (2006) 2992.
257. C. A. Lipinski, F. Lombardo, B. W. Dominy, P. J. Feeney, *Adv. Drug Delivery Rev.* **64** (2012) 4.
258. S. Neidle, *Therapeutic Applications of Quadruplex Nucleic Acids*, Academic Press (2012).

259. 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.
260. H.-L. Wu, W.-Y. Li, X.-W. He, K. Miao, H. Liang, *Anal. Bioanal. Chem.* **373** (2002) 163.
261. I. A. Koval, P. Gamez, C. Belle, K. Selmeczi, J. Reedijk, *Chem. Soc. Rev.* **35** (2006) 814.
262. A. W. Smith, A. Camara-Artigas, M. Wang, J. P. Allen, W. A. Francisco, *Biochemistry* **45** (2006) 4378.
263. C. E. Barry, P. G. Nayar, T. P. Begley, *Biochemistry* **28** (1989) 6323.
264. X. Mu, L. Song, Q. Li, R. Yin, X. Zhao, D. Wang, *Int. J. Gynecol. Obstet.* **143** (2018) 225.
265. M. Shyamal, T. K. Mandal, A. Panja, A. Saha, *RSC Adv.* **4** (2014) 53520.
266. A. E.-M. M. Ramadan, S. Y. Shaban, M. M. Ibrahim, S. A. Sallam, F. I. El-Shami, S. Al-Juaid, *J. Mater. Sci.* **55** (2020) 6457.
267. K. S. Banu, M. Mukherjee, A. Guha, S. Bhattacharya, E. Zangrando, D. Das, *Polyhedron* **45** (2012) 245.
268. N. Ch. Jana, P. Brandão, A. Frontera, A. Panja, *Dalton Trans.* **49** (2020) 14216.
269. T. P. Andrejević, B. Waržajtis, B. Đ. Glišić, S. Vojnovic, M. Mojicevic, N. Lj. Stevanović, J. Nikodinovic-Runic, U. Rychlewska, M. I. Djuran, *J. Inorg. Biochem.* **208** (2020) 111089.
270. Cambridge Structural Database, Version 5.41 (2019).
271. C. R. Groom, I. J. Bruno, M. P. Lightfoot, S. C. Ward, *Acta Crystallogr. Sect. B: Struct. Sci.* **72** (2016) 171.
272. L. Yang, D. R. Powell, R. P. Houser, *Dalton Trans.* (2007) 955.
273. Ö. Celik, S. Ide, M. Kurt, S. Yurdakul, *Acta Cryst. E* **60** (2004) m1134.
274. B. M. E. Markowitz, M. M. Turnbulla, F. F. Awwadi, *Acta Cryst. E* **62** (2006) m1278.
275. L. J. Farrugia, *J. Appl. Crystallogr.* **45** (2012) 849.
276. A. Frontera, P. Gamez, M. Mascal, T. J. Mooibroek, J. Reedijk, *Angew. Chem. Int. Ed.* **50** (2011) 9564.
277. S. Takamizawa, E. Nakata, T. Saito, *Inorg. Chem. Commun.* **7** (2004) 1.
278. P.-J. Huang, Y. Natori, Y. Kitagawa, Y. Sekine, W. Kosaka, H. Miyasaka, *Inorg. Chem.* **57** (2018) 5371.
279. H. Araki, K. Tsuge, Y. Sasaki, S. Ishizaka, N. Kitamura, *Inorg. Chem.* **44** (2005) 9667.
280. R. Dridi, C. Dhieb, S. N. Cherni, N. C. Boudjada, N. S. Zouaoui, M. F. Zid, *J. Mol. Struct.* **1152** (2018) 294.
281. S. A. Barnett, A. J. Blake, N. R. Champness, C. Wilson, *Dalton Trans.* (2003) 2387.
282. R. Alizadeh, V. Amani, A. Alemohammad, Z. Shahbazi, K. Harms, *Russ. J. Inorg. Chem.* **64** (2019) 450.
283. S. A. Barnett, A. J. Blake, N. R. Champness, C. Wilson, *J. Supramol. Chem.* **2** (2002) 17.
284. C. M. Fitchett, P. J. Steel, *Polyhedron* **26** (2007) 400.
285. A. Zianna, G. Psomas, A. Hatzidimitriou, E. Coutouli-Argyropoulou, M. Lalia-Kantouri, *J. Inorg. Biochem.* **127** (2013) 116.
286. A. Tarushi, X. Totta, A. Papadopoulos, J. Kljun, I. Turel, D. P. Kessissoglou, G. Psomas, *Eur. J. Med. Chem.* **74** (2014) 187.
287. N. D. Savić, B. Đ. Glišić, H. Wadepohl, A. Pavic, L. Senerovic, J. Nikodinovic-Runic, M. I. Djuran, *Med. Chem. Commun.* **7** (2016) 282.

288. A. Pavic, N. D. Savić, B. Đ. Glišić, A. Crochet, S. Vojnovic, A. Kurutos, D. M. Stanković, K. M. Fromm, J. Nikodinovic-Runic, M. I. Djuran, *J. Inorg. Biochem.* **195** (2019) 149.
289. H. Yamaguchi, *J. Gen. Microbiol.* **86** (1975) 370.
290. G. W. Bedell, D. R. Soll, *Infect. Immun.* **26** (1979) 348.
291. D. R. Soll, *Curr. Top. Med. Mycol.* **1** (1985) 258.
292. J. W. Baddley, P. G. Pappas, *Drugs* **65** (2005) 1461.
293. T. P. Andrejević, I. Aleksic, J. Kljun, B. V. Pantović, D. Milivojevic, S. Vojnovic, I. Turel, M. I. Djuran, B. Đ. Glišić, *Inorganics* **10** (2022) 71.
294. A. Okuniewski, D. Rosiak, J. Chojnacki, B. Becker, *Polyhedron* **90** (2015) 47.
295. D. Rosiak, A. Okuniewski, J. Chojnacki, *Polyhedron* **146** (2018) 35.
296. B. Squiban, C. L. Kurz, *Curr. Drug Targets* **17** (2011) 967.
297. H. Liu, J. Köhler, G. R. Fink, *Science* **266** (1994) 1723.
298. 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.
299. R. G. Pearson, *Coord. Chem. Rev.* **100** (1990) 403.
300. C. W. Kim, J. Ahn, S. M. Kim, T. H. Noh, O.-S. Jung, *Transit. Met. Chem.* **36** (2011) 545.
301. X.-H. Bu, H. Liu, M. Du, K. M.-C. Wong, V. W.-W. Yam, M. Shionoya, *Inorg. Chem.* **40** (2001) 4143.
302. M. Vetrichelvan, Y.-H. Lai, K. F. Mok, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2004** (2004) 2086.
303. S. Soleymani-Babadi, A. Beheshti, M. Bahrani-Pour, P. Mayer, H. Motamedi, D. Trzybiński, K. Wozniak, *Cryst. Growth Des.* **19** (2019) 4934.
304. A. M. Petrosyan, *Vib. Spectrosc.* **43** (2007) 284.
305. Y. Jiang, C.-F. Zhu, Z. Zheng, J.-B. He, Y. Wang, *Inorg. Chim. Acta* **451** (2016) 143.
306. I. Stanojević, N. D. Savić, A. Crochet, K. M. Fromm, M. I. Djuran, B. Đ. Glišić, *J. Serb. Chem. Soc.* **84** (2019) 689.
307. P. E. Aranha, M. P. dos Santos, S. Romera, E. R. Dockal, *Polyhedron* **26** (2007) 1373.
308. 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.
309. P. Połczynski, R. Jurczakowski, W. Grochala, *J. Phys. Chem. C* **117** (2013) 20689.
310. P. Constable, K. W. Hinchcliff, S. Done, W. Gruenberg, *Veterinary Medicine: A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats*, Elsevier, 11th edn, (2016).
311. FAO, *Impact of mastitis in small scale dairy production systems*, Animal Production and Health Working Paper, no. 13, Rome (2014).
312. H. Hogeveen, W. Steeneveld, C. A. Wolf, *Annu. Rev. Resour. Econ.* **11** (2019) 289.
313. M. Shaheen, H. A. Tantary, S. U. Nabi, *J. Adv. Dairy Res.* **4** (2016) 150.
314. O. M. Keane, *J. Dairy Sci.* **102** (2019) 4713.
315. R. Kano, *Mycopathologia* **185** (2020) 747.
316. F. Gomes, M. J. Saavedra, M. Henriques, *Pathog. Dis.* **74** (2016) ftw006.
317. S. Schönborn, N. Wentte, J.-H. Paduch, V. Krömker, *J. Dairy Res.* **84** (2017) 198.
318. E. Royster, S. Wagner, *Vet. Clin. North Am.: Large Anim. Pract.* **31** (2015) 17.
319. V. Krömker, S. Leimbach, *Reprod. Domest. Anim.* **52** (2017) 21.
320. Z. Vargová, M. Almáši, D. Hudecová, D. Titková, I. Rostášová, V. Zeleňák, K. Györyová, *J. Coord. Chem.* **67** (2014) 1002.
321. S. H. Alisir, S. Demir, B. Sariboga, O. Buyukgungor, *J. Coord. Chem.* **68** (2015) 155.
322. S. M. Soliman, S. E. Elsilk, *J. Photochem. Photobiol. B* **187** (2018) 48.
323. D. Novo, N. G. Perlmutter, R. H. Hunt, H. M. Shapiro, *Cytometry* **35** (1999) 55.

324. F. Li, M. Feterl, J. M. Warner, F. R. Keene, J. G. Collins, *J. Antimicrob. Chemother.* **68** (2013) 2825.
325. M. A. Kohanski, D. J. Dwyer, B. Hayete, C. A. Lawrence, J. J. Collins, *Cell* **130** (2007) 797.
326. A. J. Phillips, I. Sudbery, M. Ramsdale, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100** (2003) 14327.
327. N. Delattin, B. P. Cammue, K. Thevissen, *Future Med. Chem.* **6** (2014) 77.
328. H. W. Yang, K. J. Hwang, H. C. Kwon, H. S. Kim, K. W. Choi, K. S. Oh, *Hum. Reprod.* **13** (1998) 998.
329. H. El Hamdani, M. El Amane, C. Duhayon, *J. Mol. Struct.* **1155** (2018) 79.
330. D. P. Ašanin, S. Skaro Bogojevic, F. Perđih, T. P. Andrejević, D. Milivojevic, I. Aleksic, J. Nikodinovic-Runic, B. Đ. Glišić, I. Turel, M. I. Djuran, *Molecules* **26** (2021) 1871.
331. A. Mohanty, C. H. Tan, B. Cao, *Environ. Sci.: Nano* **3** (2016) 351.
332. B. R. Singh, B. N. Singh, A. Singh, W. Khan, A. H. Naqvi, H. B. Singh, *Sci. Rep.* **5** (2015) 13719.
333. K. Naik, M. Kowshik, *J. Appl. Microbiol.* **117** (2014) 972.

7. ПРИЛОГ

ЛИСТА СКРАЋЕНИЦА И ТЕРМИНА КОРИШЋЕНИХ У ТЕКСТУ

WHO	Светска здравствена организација (енгл. <i>World Health Organization</i>)
AMR	антимикробна резистентност (енгл. <i>antimicrobial resistance</i>)
FDA	Америчка управа за храну и лекове (енгл. <i>U.S. Food & Drug Administration</i>)
<i>N</i> -хетероциклична једињења	ароматична хетероциклична једињења која садрже азот у прстену
ROS	реактивне кисеоничне врсте (енгл. <i>reactive oxygen species</i>)
DNA	деоксирибонуклеинска киселина
GaDFO	галијум(III)-дефероксамин
1,10-phen	1,10-фенантролин
Me ₄ -1,10-phen	3,4,7,8-тетраметил-1,10-фенантролин
ATP	аденозин-трифосфат
eddp	етилендиамин- <i>N,N'</i> -ди-3-пропионат
5-Cl-Sal	5-хлорсалицилна киселина
Neo	2,9-диметил-1,10-фенантролин (неокуприн)
Gly	глицин
L-Ser	L-серин
IC ₅₀	концентрација једињења која инхибира раст ћелије за 50%
nphen	5-нитро-1,10-фенантролин
dmphen	4,7-диметил-1,10-фенантролин
BSA	говеђи серум албумин
Trp	триптофан
pm	пиримидин
pz	пиразин
qz	хиназолин
phtz	фталазин
QS	међубактеријска комуникација (енгл. <i>quorum sensing</i>)
MIC	минимална инхибиторна концентарција
dmp	5,7-диметил-1,2,4-триазол[1,5- <i>a</i>]пиридин
2,2'-bipy	2,2'-бипиридин
MRSA	метицилин-резистентна <i>Staphylococcus aureus</i>
SOD	супероксид дисмутаза
ZNFs	<i>zinc-finger</i> протеини
ZnONps	наночестице цинк(II)-оксида
NADPH	никотинамид аденин динуклеотид фосфат
iNOS	азот-моноксид синтаза
ZnPCA	цинк(II) са 2-пиролидин-5-карбоксилат
ZPT	<i>bis</i> (пиритион)цинк(II) комплекс
SARS-CoV-2	тешки акутни респираторни синдром коронавирус (енгл. <i>Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2</i>)
L-Glu	L-глутаминска киселина
L-His	L-хистидин
L-Pro	L-пролин
L-Met	L-метионин
EthBr	етидијум-бромид
HSA	хумани серум албумин
<i>K_{sv}</i>	Стерн-Волмерова константа

dtc	дитиокарбамато лиганди
L ¹	<i>N</i> -метил- <i>N</i> -фенил-дитиокарбамат
L ²	<i>N</i> -етил- <i>N</i> -фенил-дитиокарбамат
py	пиридин
L1	4-(пиридин-2-ил)-2-(2-(пиридин-2-илметилен)хидразинил)тизол
L2	4-(пиридин-3-ил)-2-(2-(пиридин-4-илметилен)хидразинил)тизол
TsO	<i>p</i> -толуенсулфонат
DMF	диметил-формаид
NHC	<i>N</i> -хетероциклични карбени
AgNPs	наночестице сребра
VBNC	<i>the viable but non-culturable state</i>
rRNA	рибозомална рибонуклеинска киселина
AgSD	сребро(I)-сулфадиазин
4-CH ₂ OHpy	4-(хидроксиметил)пиридин
4-pyOpe	диетил(пиридин-4-илметил)фосфат
3CNpy	3-цијанопиридин
4Bzpy	4-бензоилпиридин
py-2-SO ₃	пиридин-2-сулфонат
Hoechst 33258	2'-(4-хидроксифенил)-5-[5-(4-метилпиперазин-1-ил)бензимидазо-2-ил]-бензимидазол
pic	пиколинска киселина
nic	никотинска киселина
Hdipic	дипиколинска киселина
Menic	метилникотинат
na	никотин-амид
MRC-5	здраве ћелије фибробласта плућа
1,5-naph	1,5-нафтиридин
4,7-phen	4,7-фенантролин
PBS	фосфатни пуфер
ct-DNA	DNA изолован из тимуса телета
3,5-DTBC	3,5-ди- <i>tert</i> -бутилкатехол
OAP	<i>o</i> -аминофенол
DMSO	диметилсулфоксид
DMSO- <i>d</i> ₆	деутеро диметилсулфоксид
D ₂ O	деутеријум оксид
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
py-2pz	диметил-6-(пиразин-2-ил)пиридин-3,4-дикарбоксилат
ε	моларни екстинкциони коефицијент
ESI-HRMS	електроспреј-јонизациона масена спектрометрија
IR	инфрацрвена спектроскопија
¹ H NMR	протонска нуклеарна магнетна резонанца
¹³ C NMR	угљеник-13 нуклеарна магнетна резонанца
UV-Vis	ултраљубичаста-видљива спектрофотометрија
GC	стакласти угљеник
DFT	теорија функционала густине (енгл. <i>Density-functional theory</i>)

RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SAB	<i>Sabouraud dextrose</i> подлога
MOPS	(3-(<i>N</i> -морфолин)пропансулфонска киселина
TSB	<i>Tryptic soy broth</i> подлога
NCTC	<i>National Collection of Type Cultures</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
RFP	црвени флуоресцентни протеин
GFP	зелени флуоресцентни протеин
A549	ћелијска линија тумора плућа
MTT	3-(4,5-диметил(тиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолијум-бромид
DCFH-DA	2',7'-дихлорфлуоресцин-диацетат
DiOC ₂ (3)	3,3'-диетилксакарбоцијанин-јодид
CCCP-1	карбонил цијанид <i>m</i> -хлорфенил-хидразон
LC ₅₀	концентрација једињења која изазива смрт 50% испитиваних ћелија
SD	стандардна девијација
F ₀	интензитет флуоресценције пре додатка комплекса
F	интензитет флуоресценције после додатка комплекса
K _q	биомолекулска константа гашења
τ ₀	време живота флуорофоре у одсуству комплекса
K _A	константа везивања
<i>n</i>	број везујућих места
ТАЕ пуфер	40 mM Tris ацетат/1 mM EDTA
log <i>P</i>	подеони коефицијент
c ₀	концентрације комплекса у <i>n</i> -октанолној фази
c _w	концентрације комплекса у воденој фази
τ ₅	параметар који указује на дисторзију квадратно-пирамидалне геометрије
ТВАНП	тетра- <i>n</i> -бутиламонијум-хексафлуорофосфат
DAPI	2-(4-амидинофенил)-6-индолкарбамадин дихидрохлорид
Tyr	тирозин
Phe	фенилаланин
Δ _r G	промена слободне Гибсове енергије
terpy	2,2':6',2''-терпиридин
CAO	катехол оксидаза
PHS	феноксазинон синтаза
3,5-DTBQ	3,5-ди- <i>terc</i> -бутилхинон
APX	2-аминофеноксазин-3он
CSD	Кембричка структурна база
τ ₄	параметар који указује на дисторзију тетраедарске геометрије
qx	хиноксалин
K.P.I.	Китајгородски индекс паковања
Nys	нистатин
AmB	амфотерицин В
SI	индекс селективности
DCF	дихлорфлуоресцеин

СПИСАК СЛИКА

Ред. бр. слике	Назив слике	Стр.
Слика 1.	Структурне формуле првобитно коришћених антибиотика, салварсана (смеша тримерне и пентамерне форме) и пронтосила	3
Слика 2.	Структурне формуле антибиотика из групе пеницилина	3
Слика 3.	Структурне формуле антивиrotика, ацикловира и валацикловира	4
Слика 4.	Структура ћелијског зида Грам-негативне и Грам-позитивне бактерије	5
Слика 5.	Структурне формуле цисплатине (А) и ауранофина (Б)	6
Слика 6.	Структурне формуле комплексних једињења натријум-стибоглуконата (А) и фeroкина (Б) која показују антипаразитску активност	7
Слика 7.	Структурна формула бизмут-субцитрата. Нису приказани сви атоми ради јаснијег приказа структуре комплекса	7
Слика 8.	Кристална структура хуманог церулоплазмина са положајима бакра у шест домена	9
Слика 9.	Кристална структура $[\text{Cu}(5\text{-Cl-Sal})(\text{Neo})(\text{H}_2\text{O})]$ комплекса ⁷⁶	12
Слика 10.	Кристална структура комплексног катјона $[\text{Cu}(\text{nphen})(\text{Gly})(\text{H}_2\text{O})]_2^{2+}$ у $[\text{Cu}(\text{nphen})(\text{Gly})(\text{H}_2\text{O})]_2(\text{NO}_3)_2$ комплексу ⁸¹	13
Слика 11.	Кристална структура $[\text{Cu}(\text{NO}_3)_2(\text{H}_2\text{O})_2(\text{pm})]_n$ комплекса. Нису приказани сви атоми ради јаснијег приказа структуре комплекса ⁸²	14
Слика 12.	Кристална структура $[\text{Cu}_3(\text{NO}_3)_2(\text{OH})_2(\text{H}_2\text{O})_2(\text{phtz})_4](\text{NO}_3)_2$ комплекса ⁸²	14
Слика 13.	Структурна формула <i>bis</i> (пиритион)цинк(II) комплекса (ZPT)	19
Слика 14.	Кристалне структуре $[\text{Zn}(\text{Gly})_2]$ (А) и $[\text{Zn}(\text{L-His})_2] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Б) комплекса ¹²⁵	20
Слика 15.	Претпостављена структурна формула $[\text{ZnL}^1\text{L}^2(2,2'\text{-bipy})]$ комплекса ¹³²	21
Слика 16.	Структурна формула $[\text{Zn}(\text{L1})_2(\text{TsO})_2]$ комплекса ¹³⁶	22
Слика 17.	Кристална структура $[\text{Zn}(\text{HL2})\text{Br}_3] \cdot 2\text{DMF}$ комплекса ¹³⁶	22
Слика 18.	Структурна формула сребро(I)-сулфадиазина (AgSD). Нису приказани сви атоми ради јаснијег приказа структуре комплекса ¹⁴⁵	24
Слика 19.	Кристална структура $[\text{Ag}(4\text{-CH}_2\text{OHpy})_2]\text{NO}_3$ комплекса ¹⁵⁶	27
Слика 20.	Кристална структура $\{[\text{Ag}(4\text{-pyOpe})]\text{NO}_3\}_n$ комплекса. Нису приказани сви атоми ради јаснијег приказа структуре комплекса ¹⁵⁷	28
Слика 21.	Кристална структура $[\text{Ag}(4\text{Bzpy})_2]_2^{2+}$ катјона ¹⁵⁸	28
Слика 22.	Кристалне структуре $[\text{Ag}(\text{Menic})_2(\text{ClO}_4)]_2$ (А) и $[\text{Ag}(\text{na})_2]\text{ClO}_4$ (Б) комплекса ¹⁶⁴	30
Слика 23.	Структурне формуле диметил-пиридин-4,5-дикарбоксилатних естара	59
Слика 24.	Шематски приказ реакција за синтезу комплекса 1 – 3 (А) и 4 и 5 (Б)	59
Слика 25.	Кристалне структуре бакар(II) комплекса 1 – 3 . Елипсоиди су приказани са 50% вероватноће. Атоми водоника и некоординовани молекула растворача у комплексу 3 су изостављени ради јаснијег приказа кристалних структура ²⁰⁷	60
Слика 26.	Кристалне структуре комплекса 4 и 5 . Елипсоиди су дати са 50% вероватноће. Атоми водоника су изостављени ради јаснијег приказа кристалних структура ²⁰⁷	61
Слика 27.	Стабилност комплекса 1 у DMSO праћена током 48 h применом UV-Vis спектрофотометрије на 25 °C	63
Слика 28.	Циклични волтамограми комплекса 1 – 3 (А) и 4 и 5 (Б), у поређењу са одговарајућим CuX_2 солима ($\text{X} = \text{NO}_3^-$ и Cl^-) снимљени на GC електроди у DMSO у присуству 0,1 М ТВАНР при брзини скенирања 50 mV/s	63
Слика 29.	Формирање хифа код <i>S. albicans</i> ATCC 10231 у присуству субинхибиторних концентрација ($0,5 \times \text{MIC}$) комплекса 1 – 5 на Spider подлози	65
Слика 30.	Филаментација код <i>S. albicans</i> ATCC 10231 у присуству субинхибиторних	65

- концентрација ($0,5 \times \text{MIC}$) комплекса **1** и **4** у течној RPMI подлози
- Слика 31.** Утицај субинхибиторних концентрација комплекса **1** и **4** на формирање биофилма код *C. albicans* соја 66
- Слика 32.** Ефекат MIC комплекса **1** и **4** на адхезију *C. albicans* SC5314-GFP (горњи ред) и *C. albicans* SC5314-RFP (доњи ред) на A549 ћелије карцинома плућа ($100\times$ увећање). DAPI (2-(4-амидинофенил)-6-индолкарбамадин дихидрохлорид) обојене ћелије су плаве, док су зелена и црвена из *C. albicans* ћелија 66
- Слика 33.** График зависности релативног интензитета флуоресценције (F/F_0 , %) од r ($r = [\text{комплекс}]/[\text{BSA}]$) за комплексе **1** – **5** у PBS пуферу (pH = 7,4) 67
- Слика 34.** *In vitro* интеракција комплекса **1** – **5** са λ DNA применом гел електрофорезе током времена. $20 \mu\text{g/L}$ λ DNA је третирано са $500 \mu\text{g/mL}$ комплекса у 10 mM Tris-Cl пуферу. (pH = 8,5) M = молекуларни маркер reqGOLD 1 kb DNA-Ladder Plus 69
- Слика 35.** Флуоресцентни емисиони спектри EthBr-ct-DNA система у PBS у присуству комплекса **1** растуће концентрације. Инсертована слика приказује Стерн-Волмеров дијаграм 69
- Слика 36.** Шематски приказ реакција за синтезу комплекса **6** и **7** 71
- Слика 37.** Кристалне структуре комплекса **6** и **7**. Елипсоиди су приказани са 30% вероватноће. Атоми водоника су изостављени ради јаснијег приказа²³⁹ 71
- Слика 38.** UV-Vis спектри комплекса **6** и **7** снимљени у DMSO раствору на 25°C 72
- Слика 39.** Стабилност комплекса **7** у DMSO праћена током 48 h применом UV-Vis спектрофотометрије на 25°C 73
- Слика 40.** Циклични волтамограми комплекса **6** и **7** на GC електроди у DMSO у присуству $0,1 \text{ M}$ ТВАНП, при брзини скенирања 50 mV/s 73
- Слика 41.** Структуре $[\text{CuCl}_2(\text{py}-2\text{pz})]$ (A) и $[\text{Cu}(\text{py}-2\text{pz})_2]^{2+}$ (B) комплекса оптимизоване на ZORA-M06-2X/TZP-COSMO(DMSO) нивоу теорије 74
- Слика 42.** Утицај субинхибиторне концентрације ($0,5 \times \text{MIC}$) комплекса **6** и **7** и py-2pz у односу на DMSO контролу на формирање хифа код *C. albicans* на Spider подлози после 24 и 72 h 76
- Слика 43.** Инхибиција производње виолацеина (A) и продигиозина (B) у присуству $100 \mu\text{g}$ комплекса **6** и **7** и py-2pz лиганда. DMSO је коришћен као контрола 76
- Слика 44.** Флуоресцентни емисиони спектри BSA у присуству комплекса **6** растуће концентрације. Инсертована слика представља Стерн-Волмеров дијаграм 77
- Слика 45.** Шема реакција које катализују ензими бабра, катехол оксидаза (CAO) и феноксазинон синтаза (PHS) 78
- Слика 46.** UV-Vis спектри за реакције комплекса **7** ($1,0 \text{ mM}$, DMSO/метанол (v/v 1 : 9)) са 3,5-DTBC (A) и OAP (B) супстратима растућих концентрација ($0 - 165 \mu\text{M}$) у метанолу на собној температури. Стрелица показује промену интензитета апсорпције након додавања супстрата растућих концентрација 79
- Слика 47.** Шематски приказ реакција за синтезу комплекса **8** – **10**. Нумерација атома угљеника у *N*-хетероцикличним лигандима је у складу са IUPAC номенклатуром и коришћена за NMR карактеризацију комплекса 80
- Слика 48.** Кристална структура комплекса **8**. Елипсоиди су дати са 50% вероватноће, а испрекиданим линијама су приказане интрамолекулске C–H \cdots Cl водоничне везе²⁶⁹ 80
- Слика 49.** Основна јединица 1D координационог полинуклеарног комплекса **9**. Елипсоиди су дати са 50% вероватноће, а испрекиданим линијама су приказане интрамолекулске C–H \cdots Cl водоничне везе. Симетријске трансформације: (i) 1-x, 1-y, 1-z; (ii) 1-x, y, $\frac{1}{2}$ -z²⁶⁹ 82
- Слика 50.** 1D координациони полимер **9** дуж *c*-правца²⁶⁹ 82

Слика 51.	Кристална структура комплекса 10 . Елипсоиди су дати са 50% вероватноће, а испрекиданим линијама су приказане интрамолекуларне C–H···Cl водоничне везе ²⁶⁹	83
Слика 52.	π -интеракције у комплексу 10 ²⁶⁹	84
Слика 53.	¹ H NMR спектар комплекса 9 у DMSO- <i>d</i> ₆	84
Слика 54.	Стабилност комплекса 9 (А) и 10 (Б) у DMSO праћена током 48 h применом UV-Vis спектрофотометрије на 25 °C	85
Слика 55.	Ефекат комплекса 10 на раст хифа код <i>C. albicans</i> (MIC ₂₀ и MIC ₈₀ , односно 50 и 200 μ g/mL)	86
Слика 56.	Ефекат комплекса 10 , 4,7-phen и ZnCl ₂ на раст хифа код <i>C. albicans</i> при 5 и 25 μ g/mL	87
Слика 57.	Ефекат комплекса 10 и 4,7-phen (20% од IC ₅₀ вредности, 12,5 и 2,5 μ g/mL за 10 и 4,7-phen лиганд, респективно) на адхезију <i>C. albicans</i> на A549 ћелије карцинома плућа (20× увећање)	87
Слика 58.	Ефекат субинхибиторних концентрација комплекса 10 на антифунгалну активност нистатина (Nys). Раст <i>C. albicans</i> је праћен мерењем оптичке густине (OD ₆₀₀) у односу на DMSO контролу. MIC _{NYS} = 2,5 μ g/mL	88
Слика 59.	Шематски приказ реакције за синтезу комплекса 11 и 12 . Нумерација атома у лиганду је коришћена за NMR карактеризацију комплекса	89
Слика 60.	Кристалне структуре комплекса 11 и 12 . Елипсоиди су дати са 50% вероватноће. Атоми водоника су изостављени ²⁹³	90
Слика 61.	¹ H NMR спектар комплекса 11 у DMSO- <i>d</i> ₆	91
Слика 62.	Стабилност комплекса 12 у DMSO праћена током 48 h применом UV-Vis спектрофотометрије на 25 °C	91
Слика 63.	Ефекат комплекса 11 и 12 , ру-2ру лиганда и ZnX ₂ соли (X = Cl ⁻ и Br ⁻) (50 μ g/mL) на процес филаментације код <i>C. albicans</i> на чврстој подлози. DMSO је коришћен као контрола	92
Слика 64.	Инхибиција формирања биофилма код <i>C. albicans</i> ATCC 10231 у присуству комплекса 11 и 12 , одговарајући цинк(II) соли и ру-2ру лиганда	93
Слика 65.	Инхибиција продукције продигиозина код <i>S. marcescens</i> (А) и виолацеина код <i>C. violaceum</i> CV026 (Б) у присуству 500 μ g комплекса 11 и 12 , одговарајућих соли и ру-2ру лиганда по диску	93
Слика 66.	Флуоресцентни емисиони спектри BSA у присуству комплекса 11 растуће концентрације Инсертована слика представља Стерн-Волмеров дијаграм	94
Слика 67.	Интеракција комплекса 11 и 12 , одговарајућих соли и ру-2ру лиганда са λ DNA праћена применом гел електрофорезе у поређењу са DMSO и H ₂ O (C) након 2, 4 и 24 h инкубације. M = молекуларни маркер reqGOLD 1 kb DNA-Ladder Plus	95
Слика 68.	Шематски приказ реакција за синтезу сребро(I) комплекса 13 и 14 (А) и 15 – 17 (Б)	96
Слика 69.	Кристалне структуре комплекса 13 – 17 . У комплексима 15 – 17 изостављен је BF ₄ ⁻ јон ради јаснијег приказа кристалних структура. Елипсоиди су дати са 25% вероватноће, а водоникови атоми су приказани као мале сфере произвољног полупречника ²¹⁸	97
Слика 70.	Фотохемијска редукција комплекса 13 – 17 на ваздуху и светлости током 48 h	99
Слика 71.	Циклични волтамограми комплекса 13 – 17 снимљени на GC електроди у DMSO у присуству 0,1 М ТВАНР при брзини скенирања од 50 mV/s	99
Слика 72.	Деполаризација мембране <i>S. aureus</i> у присуству комплекса 14 и 17 . СССР-1 је коришћен као позитивна контрола	102
Слика 73.	Утицај субинхибиторних концентрација комплекса 14 и 17 на формирање биофилма <i>S. aureus</i> током 24 h. Количина DMSO је била 0,1% (v/v)	102

- Слика 74.** Формирање ROS код ћелија *C. albicans* у присуству MIC вредности комплекса **14** и **17**, и AmB након 2 h инкубације. Као контрола коришћене су *C. albicans* ћелије третиране DMSO. ^aПроцент ROS⁺ ћелија је одређен помоћу Partec FloMax софтвера, при чему је базна линија нула (позадински ниво флуоресценције) постављена на основу максималне вредности контроле без индикатора ROS. Процент ROS⁺ ћелија је одређен бројањем ћелија са већим ROS нивоом у односу на позадински ниво 103
- Слика 75.** Филаментација код *C. albicans*-RFP у присуству $0,8 \times$ MIC вредности комплекса **14** и **17**. Ћелије третиране DMSO су коришћене као контрола (20 \times увећање) 104
- Слика 76.** Утицај комплекса **14** и **17** ($0,8 \times$ MIC) на формирање биофилма *C. albicans* изолат. Ћелије третиране DMSO су коришћене као контрола (20 \times увећање) 104
- Слика 77.** Утицај субинхибиторних концентрација комплекса **14** и **17** на формирање биофилма код *C. albicans* након 24 (А) и 48 h (Б). Количина DMSO је била 0,1% (v/v) 105
- Слика 78.** Шематски приказ реакција за синтезу комплекса **18** и **19**. Нумерација атома у лиганду је коришћена за ¹H NMR карактеризацију комплекса 105
- Слика 79.** Кристалне структуре комплекса **18** и **19**. Елипсоиди су дати са 30% вероватноће. Атоми водоника и PF₆⁻ ањон у комплексу **18** изостављени су ради јаснијег приказа²³⁹ 106
- Слика 80.** UV-Vis спектри комплекса **18** и **19** у односу на ру-2pz лиганд у DMSO на 25 °C 107
- Слика 81.** ¹H NMR спектар комплекса **19** у DMSO-*d*₆ 107
- Слика 82.** Стабилност комплекса **18** у DMSO током 48 h на 25 °C 108
- Слика 83.** Циклични волтамограми комплекса **18** и **19** снимљени на GC електроди у DMSO у присуству 0,1 М ТВАНП при брзини скенирања од 50 mV/s 108
- Слика 84.** Структура [Ag(NO₃)(ру-2pz-*N,N'*)(ру-2pz-*N*)] комплекса оптимизоване на ZORA-M06-2X/TZP-COSMO(DMSO) нивоу теорије²³⁹ 109
- Слика 85.** Утицај субинхибиторних концентрација ($0,5 \times$ MIC) комплекса **18** и **19** и ру-2pz лиганда у односу на DMSO контролу на формирање хифа код *C. albicans* на Spider подлози после 24 и 72 h инкубације 110
- Слика 86.** Инхибиција производње виолацеина (А) и продигиозина (Б) у присуству 100 μ g комплекса **18** и **19** и ру-2pz лиганда. DMSO је коришћен као контрола 111
- Слика 87.** Флуоресцентни емисиони спектри BSA у присуству комплекса **18** растуће концентрације Инсертована слика приказује Стерн-Волмеров дијаграм 111
- Слика 88.** Флуоресцентни емисиони спектри EthBr-ct-DNA система у присуству комплекса **19** растуће концентрације. Инсертована слика приказује Стерн-Волмеров дијаграм 112

СПИСАК ТАБЕЛА

Ред. бр. табеле	Назив табеле	Стр.
Табела 1.	Ензими бакра у људском организму и њихове функције	8
Табела 2.	Могуће геометрије бакар(II) комплекса	11
Табела 3.	Могуће геометрије комплекса цинка са оксидационим стањем +2	19
Табела 4.	Најчешће геометрије комплекса сребра са оксидационим стањем +1	26
Табела 5.	Подаци о експерименталним мерењима, резултати рендгенске структурне анализе и други релевантни подаци за кристале комплекса 1 – 5	41
Табела 6.	Подаци о експерименталним мерењима, резултати рендгенске структурне анализе и други релевантни подаци за кристале комплекса 6 и 7	44
Табела 7.	Подаци о експерименталним мерењима, резултати рендгенске структурне анализе и други релевантни подаци за комплексе 8 – 10	45
Табела 8.	Подаци о експерименталним мерењима, резултати рендгенске структурне анализе и други релевантни подаци за комплексе 11 и 12	46
Табела 9.	Подаци о експерименталним мерењима, резултати рендгенске структурне анализе и други релевантни подаци за комплексе 13 – 17	47
Табела 10.	Подаци о експерименталним мерењима, резултати рендгенске структурне анализе и други релевантни подаци за комплексе 18 и 19	49
Табела 11.	Одабране дужине веза (Å) у комплексима 1 – 3	61
Табела 12.	Одабране дужине веза (Å) у комплексима 4 и 5	61
Табела 13.	Положаји фреквенција карактеристичних валенционих вибрација у комплексима 1 – 5 (ν , cm^{-1})	62
Табела 14.	Антимикробна (MIC, $\mu\text{g/mL}$) и цитотоксична (IC_{50} , $\mu\text{g/mL}$) активност комплекса 1 – 5	64
Табела 15.	Вредности везујућих константи комплекса 1 – 5 за BSA	68
Табела 16.	Вредности везујућих константи комплекса 1 – 5 за ct-DNA	70
Табела 17.	Одабране дужине веза (Å) у комплексима 6 и 7	72
Табела 18.	Промене слободне Гибсове енергије ($\Delta_r G$, kcal/mol) добијене на ZORA-M06-2X/TZP-COSMO(DMSO)//ZORA-BP86-D4/TZP-COSMO(DMSO) нивоу теорије за формирање комплекса 6 и 7	74
Табела 19.	Антимикробна активност комплекса 6 и 7 и ру-2pz лиганда (MIC, μM ($\mu\text{g/mL}$)) у поређењу са њиховом антипролиферативном активношћу на нормалној MRC-5 ћелијској линији фибробласта плућа (IC_{50} , μM ($\mu\text{g/mL}$))	75
Табела 20.	Вредности везујућих константи комплекса 6 и 7 за BSA	77
Табела 21.	Вредности везујућих константи комплекса 6 и 7 за ct-DNA	78
Табела 22.	Одабране дужине веза (Å) и углови између веза ($^\circ$) у комплексу 8	81
Табела 23.	Геометријски параметри који описују најкраће интра- и интермолекулске водоничне везе у кристалима комплекса 8 – 10	81
Табела 24.	Антимикробна активност комплекса 8 – 10 , 4,7-phen и ZnCl_2 , изражена као зона инхибиције раста (mm) на дисковима који садрже 500 $\mu\text{g/mL}$ једињења	86
Табела 25.	Одабране дужине везе (Å), углови између веза ($^\circ$) и структурни параметри комплекса 11 и 12	90
Табела 26.	Антимикробна активност (MIC, $\mu\text{g/mL}$) и цитотоксичност (IC_{50} , $\mu\text{g/mL}$) комплекса 11 и 12 , ру-2ру лиганда и ZnX_2 соли ($\text{X} = \text{Cl}^-$ и Br^-)	92
Табела 27.	Вредности везујућих константи комплекса 11 и 12 за BSA	94
Табела 28.	Вредности везујућих константи комплекса 11 и 12 за ct-DNA	95
Табела 29.	Одабране дужине везе (Å) у комплексима 13 – 17	98
Табела 30.	Антимикробна активност комплекса 13 – 17 (MIC, $\mu\text{g/mL}$) у поређењу са њиховом	101

токсичношћу према нормалној ћелијској линији фибробласта плућа (MRC-5) и *C. elegans* (IC_{50} , $\mu\text{g/mL}$). Приказане су MIC вредности за амфотерицин В (AmB) и канамицин

Табела 31.	Одабране дужине веза (\AA) у комплексима 18 и 19	106
Табела 32.	Промена слободне Гибсове енергије ($\Delta_r G$, kcal/mol) добијене на ZORA-M06-2X/TZP-COSMO(DMSO)//ZORA-BP86-D4/TZP-COSMO(DMSO) нивоу теорије за формирање комплекса 18 и 19	108
Табела 33.	Антимикробна активност комплекса 18 и 19 , као и AgSD (MIC, μM ($\mu\text{g/mL}$)) у поређењу са њиховом антипролиферативном активношћу према нормалној MRC-5 ћелијској линији (IC_{50} , μM ($\mu\text{g/mL}$)). Резултати су приказани као средња вредност три мерења са стандардном грешком 1 – 3%	109
Табела 34.	Инхибиција формирање биофилма код <i>C. albicans</i> ATCC 10321 (%) у присуству комплекса 18 и 19	110
Табела 35.	Вредности везујућих константи комплекса 18 и 19 за BSA	111
Табела 36.	Вредности везујућих константи комплекса 18 и 19 за ct-DNA	112

Биографија са подацима о досадашњем раду



Тина Андрејевић је рођена 22. августа 1993. године у Крагујевцу од оца Предрага и мајке Тање. Основну школу „Вук Стефановић Караџић” и средњу медицинску школу са домом ученика „Сестре Нинковић” завршила је у Крагујевцу. На Природно-математички факултет Универзитета у Крагујевцу, студијски програм хемија, смер истраживање и развој, уписала се школске 2012/13. године, где је дипломирала септембра 2016. године са просечном оценом у току студија 9,26. Школске 2016/17. године уписала је мастер академске студије, смер истраживање и развој, на Природно-математичком факултету у Крагујевцу, где је јула 2017. године одбранила мастер рад из области неорганске хемије.

Докторске академске студије, модул неорганска хемија, уписала је школске 2017/18. године на Природно-математичком факултету Универзитета у Крагујевцу. Од 2018. године ангажована је као истраживач приправник на пројекту Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије „Синтеза нових комплекса метала и испитивање њихових реакција са пептидима” (бр. пројекта: 172036), а 2021. године изабрана је у звање истраживач сарадник на Институту за хемију, Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу. Тренутно је ангажована на пројекту Фонда за науку Републике Србије у оквиру програма ИДЕЈЕ „Value-added biologics through eco-sustainable routes” (бр. пројекта: 7730810; 2022 – 2024) и на билатералном пројекту Србија – Словенија „Развој нових терапеутика на бази комплекса метала са азолима за лечење гљивичних инфекција” од 2023. до 2025. године. Активно учествује у раду са студентима биологије, екологије и хемије Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу, изводећи вежбе из предмета: Основи хемије (основне академске студије биологије, прва година), Одабрана поглавља хемије за екологе (основне академске студије екологије, прва година) и Стандарди у области заштите животне средине (основне академске студије хемије, смер заштита животне средине, четврта година). Учествовала је у организационом одбору 57. Саветовања Српског хемијског друштва, које се одржало 18. и 19. јуна 2021. године на Природно-математичком факултету Универзитета у Крагујевцу. Члан је Српског хемијског друштва, Клуба младих хемичара Србије и Српског кристалографског друштва. Од децембра 2023. године, члан је Извршног одбора Клуба младих хемичара Србије.

Бави се научноистраживачким радом у области координационе и медицинске неорганске хемије. Предмет њеног истраживања је синтеза и карактеризација комплекса метала применом различитих спектроскопских и електрохемијских метода, као и рендгенске структурне анализе, испитивање њихових реакција са биолошки значајним молекулима, пептидима, протеинима и нуклеинским киселинама, као и испитивање њихове антимицробне и анти туморске активности. До сада је објавила 16 научних радова у међународним научним часописима (један **M21a**, четири **M21**, девет **M22**, један **M23** и један **M24** категорије), 2 научна рада у националним научним часописима (један **M51** и један **M53** категорије) и 39 саопштења на међународним и националним научним конференцијама (једанаест **M33**, девет **M34** и деветнаест **M64** категорије).

Cite this: *Dalton Trans.*, 2021, **50**, 2627Tailoring copper(II) complexes with pyridine-4,5-dicarboxylate esters for anti-*Candida* activity†Tina P. Andrejević, ^a Ivana Aleksic, ^b Marta Počkaj, ^c Jakob Kljun, ^c Dusan Milivojevic, ^b Nevena Lj. Stevanović, ^a Jasmina Nikodinovic-Runic, ^{*b} Iztok Turel, ^{*c} Miloš I. Djuran ^{*d} and Biljana Đ. Glišić ^{*a}

Five novel copper(II) complexes with pyridine-4,5-dicarboxylate esters as ligands, [Cu(NO₃)(py-2tz)(H₂O)₃]NO₃ (**1**), [Cu(NO₃)₂(py-2metz)(H₂O)] (**2**), [Cu(NO₃)₂(py-2py)(H₂O)]·H₂O (**3**), [CuCl₂(py-2tz)₂] (**4**) and [CuCl₂(py-2metz)]_n (**5**) (py-2tz is dimethyl 2-(thiazol-2-yl)pyridine-4,5-dicarboxylate, py-2metz is dimethyl 2-(4-methylthiazol-2-yl)pyridine-4,5-dicarboxylate and py-2py is dimethyl 2,2'-bipyridine-4,5-dicarboxylate), were synthesized and structurally characterized by different spectroscopic and electrochemical methods. The structure of these complexes was determined by single-crystal X-ray diffraction analysis, confirming the bidentate coordination mode of the corresponding pyridine-4,5-dicarboxylate ester to the Cu(II) ion through the nitrogen atoms. The antimicrobial potential of copper(II) complexes **1–5** was assessed against two bacterial and two *Candida* species. These complexes showed better growth inhibiting activity against *Candida* spp. with respect to the tested bacterial species, also being moderately toxic towards normal human lung fibroblast cells (MRC-5). Complexes **1** and **4** showed the greatest ability to inhibit the filamentation of *C. albicans*, which is an important process during fungal infection, and these two complexes efficiently inhibited the biofilm formation of *C. albicans* at subinhibitory concentrations. Complex **4** also successfully prevented the adhesion of *C. albicans* in an *in vitro* epithelial cell model. The mechanism of the antifungal activity of copper(II) complexes **1–5** was studied through their interaction with ct-DNA, as one of the possible target biomolecules, by fluorescence spectroscopy and gel electrophoresis. Finally, the ability of these complexes to bind to bovine serum albumin (BSA) was studied by fluorescence emission spectroscopy.

Received 27th November 2020,
Accepted 18th January 2021

DOI: 10.1039/d0dt04061d

rsc.li/dalton

Introduction

In the last few decades, medicinal chemistry has seen an impressive advance, with special interest in the study of metal complexes, which have found a wide range of applications in medicine for the treatment of numerous diseases. In this context, medicinal inorganic chemistry has directed special attention to the synthesis of complexes of essential metal ions.¹ One of the most important essential metals for living

organisms is copper, which can be found in the active sites of different metalloproteins and enzymes, including superoxide dismutase, cytochrome c oxidase and tyrosinase.² The significant role of copper in the human body is confirmed by the fact that the deficiency of this metal can result in anaemia, as a consequence of lower activity of copper ferroxidase.³ On the other hand, the reduced ability of the organism to excrete an excess of copper can result in Wilson's disease, an autosomal recessive genetic disorder.⁴

Many copper(II) complexes have shown to be effective as superoxide scavenging⁵ and anti-inflammatory agents.⁶ For example, copper(II) salicylate was found to be approximately 30 times more effective in comparison with aspirin.⁷ In addition to the anti-inflammatory activity, copper(II) complexes have remarkable antibacterial,⁸ antifungal,⁹ antioxidant¹⁰ and anticancer¹¹ activities, which takes precedence and makes copper(II) complexes attractive in metal-based drug design. In general, the biological activity of metal complexes depends on the oxidation state of metal ions, number and types of ligands, redox behaviour, hydro- and lipophilicity and coordination geometry.¹ Moreover, a change of the substituent on the co-

^aUniversity of Kragujevac, Faculty of Science, Department of Chemistry, R. Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Serbia. E-mail: biljana.glisic@pmf.kg.ac.rs

^bInstitute of Molecular Genetics and Genetic Engineering, University of Belgrade, Vojvode Stepe 444a, 11042 Belgrade, Serbia. E-mail: jasmina.nikodinovic@imgge.bg.ac.rs

^cUniversity of Ljubljana, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, Večna pot 113, SI-1000 Ljubljana, Slovenia. E-mail: Iztok.Turel@fkkt.uni-lj.si

^dSerbian 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–S3 and Tables S1–S2. CCDC 2041819–2041823. For ESI and crystallographic data in CIF or other electronic format see DOI: 10.1039/d0dt04061d


 Cite this: *RSC Adv.*, 2023, 13, 4376

Copper(II) and silver(I) complexes with dimethyl 6-(pyrazine-2-yl)pyridine-3,4-dicarboxylate (py-2pz): the influence of the metal ion on the antimicrobial potential of the complex†

 Tina P. Andrejević, ^a Ivana Aleksic, ^b Jakob Kljun, ^c Marta Počkaj, ^c Matija Zlatař, ^d Sandra Vojnovic, ^b Jasmina Nikodinovic-Runic, ^b Iztok Turel, ^{*c} Miloš I. Djuran ^{id} ^{*e} and Biljana Đ. Glišić ^{id} ^{*a}

Dimethyl 6-(pyrazine-2-yl)pyridine-3,4-dicarboxylate (py-2pz) was used as a ligand for the synthesis of new copper(II) and silver(I) complexes, $[\text{CuCl}_2(\text{py-2pz})]_2$ (**1**), $[\text{Cu}(\text{CF}_3\text{SO}_3)(\text{H}_2\text{O})(\text{py-2pz})_2]\text{CF}_3\text{SO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (**2**), $[\text{Ag}(\text{py-2pz})_2]\text{PF}_6$ (**3**) and $\{[\text{Ag}(\text{NO}_3)(\text{py-2pz})] \cdot 0.5\text{H}_2\text{O}\}_n$ (**4**). The complexes were characterized by spectroscopic and electrochemical methods, while their structures were determined by single crystal X-ray diffraction analysis. The X-ray analysis revealed the bidentate coordination mode of py-2pz to the corresponding metal ion via its pyridine and pyrazine nitrogen atoms in all complexes, while in polynuclear complex **4**, the heterocyclic pyrazine ring of one py-2pz additionally behaves as a bridging ligand between two Ag(I) ions. DFT calculations were performed to elucidate the structures of the investigated complexes in solution. The antimicrobial potential of the complexes **1–4** was evaluated against two bacterial (*Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*) and two *Candida* (*C. albicans* and *C. parapsilosis*) species. Silver(I) complexes **3** and **4** have shown good antibacterial and antifungal properties with minimal inhibitory concentration (MIC) values ranging from 4.9 to 39.0 μM (3.9–31.2 $\mu\text{g mL}^{-1}$). All complexes inhibited the filamentation of *C. albicans* and hyphae formation, while silver(I) complexes **3** and **4** had also the ability to inhibit the biofilm formation process of this fungus. The binding affinity of the complexes **1–4** with calf thymus DNA (ct-DNA) and bovine serum albumin (BSA) was studied by fluorescence emission spectroscopy to clarify the mode of their antimicrobial activity. Catechol oxidase biomimetic catalytic activity of copper(II) complexes **1** and **2** was additionally investigated by using 3,5-di-*tert*-butylcatechol (3,5-DTBC) and *o*-aminophenol (OAP) as substrates.

 Received 21st November 2022
 Accepted 19th January 2023

DOI: 10.1039/d2ra07401j

rsc.li/rsc-advances

Introduction

Antimicrobial resistance to the currently used antimicrobials has become a global problem, which significantly influences the ability of humans to prevent and treat an enormously increasing

number of bacterial and fungal infections and affects the success of cancer chemotherapy.¹ Infections that are caused by multidrug resistant pathogens are associated with longer hospital stays and worse clinical outcomes, such as morbidity and mortality in the infected patients and increased costs on the healthcare system.² In the Review on Antimicrobial Resistance, commissioned by the UK Government, it is estimated that antimicrobial resistance will lead to the death of 10 million people per year by 2050.³ Although this report has been criticized regarding the estimated quantification of morbidity and mortality,⁴ there is no doubt that the spread of antimicrobial resistance is an urgent concern, which requires a global and coordinated action plan, including the development of new antimicrobials with different and more effective mechanisms of action.^{5,6}

A major problem in the field of development of new antimicrobial agents is the fact that approximately 25% of the compounds currently in clinical trials are entirely new structural classes, while the remaining 75% are derivatives of the

^aDepartment of Chemistry, Faculty of Science, University of Kragujevac, R. Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Serbia. E-mail: biljana.glisic@pmf.kg.ac.rs

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

^cFaculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana, Večna Pot 113, Ljubljana, SI-1000, Slovenia. E-mail: Iztok.Turel@fkkt.uni-lj.si

^dDepartment of Chemistry, University of Belgrade-Institute of Chemistry, Technology and Metallurgy, Njegoševa 12, 11000 Belgrade, Serbia

^eSerbian Academy of Sciences and Arts, Knez Mihailova 35, 11000 Belgrade, Serbia. E-mail: milos.djuran@pmf.kg.ac.rs

† Electronic supplementary information (ESI) available: ¹H NMR spectra for py-2pz, **3** and **4**, Fig. S1–S6, Scheme S1, Tables S1–S3 and Cartesian coordinates of all DFT optimized structures. CCDC 2220146–2220150. For ESI and crystallographic data in CIF or other electronic format see DOI: <https://doi.org/10.1039/d2ra07401j>





Zinc(II) complexes with aromatic nitrogen-containing heterocycles as antifungal agents: Synergistic activity with clinically used drug nystatin

Tina P. Andrejević^a, Beata Warzajtis^b, Biljana Đ. Glišić^a, Sandra Vojnović^c, Marija Mojicević^c, Nevena Lj. Stevanović^a, Jasmina Nikodinovic-Runic^{c,*}, Urszula Rychlewska^{b,*}, Miloš I. Djuran^{d,*}

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

^b Faculty of Chemistry, Adam Mickiewicz University, ul. Uniwersytetu Poznańskiego 8, 61-614 Poznań, Poland

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

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

ARTICLE INFO

Keywords:

Zinc(II) complexes
N-heterocycles
Anti-*Candida* activity
Filamentation inhibition
Cytotoxicity
Synergy

ABSTRACT

Three novel Zn(II) complexes, [ZnCl₂(qz)₂] (**1**), [ZnCl₂(1,5-naph)]_n (**2**) and [ZnCl₂(4,7-phen)₂] (**3**), where qz is quinazoline, 1,5-naph is 1,5-naphthyridine and 4,7-phen is 4,7-phenanthroline, were synthesized by the reactions of ZnCl₂ and the corresponding N-heterocyclic ligand in 1:2 molar ratio in ethanol at ambient temperature. The characterization of these complexes was done by NMR, IR and UV-Vis spectroscopy, and their crystal structures were determined by single-crystal X-ray diffraction analysis. Complexes **1** and **3** are mononuclear species, in which Zn(II) ion is tetrahedrally coordinated by two nitrogen atoms belonging to two qz or 4,7-phen ligands, respectively, and by two chloride anions, while complex **2** is a 1D coordination polymer that contains 1,5-naph as bridging ligand between two metal ions. In agar disc-diffusion assay, complexes **1–3** manifested good inhibitory activity against two investigated *Candida* strains (*C. albicans* and *C. parapsilosis*), while not inducing toxic effects on the healthy human fibroblast cell line (MRC-5). This activity was not fungicidal, as revealed by the broth microdilution assay, however complex **3** showed the ability to modulate *Candida* hyphae formation, which is an important process during infection and showed significant synergistic effect with clinically used antifungal polyene nystatin.

1. Introduction

Zinc appears to be one of the most important and most abundant metals in biological systems, being essential for the functions of different metalloproteins, having catalytic, co-catalytic and structural roles [1–3]. The zinc-containing proteins are involved in important cellular processes, such as differentiation, proliferation and apoptosis [4]. It is estimated that as much as 10% of eukaryotic proteins are zinc metalloproteins [5,6]. Zinc(II) ion occurs in each of the six Enzyme Commission classes of enzymes, with alcohol dehydrogenase, carboxypeptidase A, alkaline phosphatase and metallothionein playing a crucial role in mammalian metabolism [7]. The functions of Zn(II) ion in DNA and RNA polymerases are structural catalytic and regulatory [7], while many of the transcription factors, DNA-binding proteins, contain zinc finger motifs consisting of Zn(II) ion tetrahedrally coordinated by cysteine and histidine residues [8]. The latter coordination is essential in maintaining the structure of the zinc finger motif, as well as functional gene regulation, while the removal of zinc(II) ion from

these proteins leads to the loss of DNA-binding ability [7]. The fundamental requirement of Zn(II) ions for the function is evident not only in mammals, but also in bacteria and fungi [5,9]. The lack of essential metals, including Zn(II), triggers the expression of virulence factors that play central role in the infection process. Fungal pathogens, in particular, depend on the efficient metal acquisition mechanisms for full virulence [10,11]. Classical example is co-regulation of zinc assimilation in *Candida albicans* with key virulence determinants, such as adhesion, hyphae morphogenesis and biofilm maturation [12,13].

The behavior of zinc in biological environment is mainly regulated by its coordination chemistry and unique properties [14]. Thus, in living organisms, zinc exists in only one oxidation state, namely +2, and, as a consequence of a filled d subshell (*d*¹⁰ electronic configuration), it lacks any redox activity making it an ideal cofactor for the processes that require a redox-inactive center [15]. The second important consequence of the *d*¹⁰ electronic configuration of Zn(II) ion is its ligand-field stabilization energy which amounts zero in all coordination environments [16]. This metal ion is highly versatile in the

* Corresponding authors.

E-mail addresses: jasmina.nikodinovic@imgg.bg.ac.rs (J. Nikodinovic-Runic), urszular@amu.edu.pl (U. Rychlewska), milos.djuran@pmf.kg.ac.rs (M.I. Djuran).

<https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2020.111089>

Received 11 March 2020; Received in revised form 13 April 2020; Accepted 19 April 2020

Available online 06 May 2020

0162-0134/ © 2020 Elsevier Inc. All rights reserved.

Article

Zinc(II) Complexes with Dimethyl 2,2'-Bipyridine-4,5-dicarboxylate: Structure, Antimicrobial Activity and DNA/BSA Binding Study

Tina P. Andrejević ¹, Ivana Aleksic ², Jakob Kljun ³, Bojana V. Pantović ¹, Dusan Milivojevic ², Sandra Vojnovic ², Iztok Turel ^{3,*}, Miloš I. Djuran ⁴ and Biljana Đ. Glišić ^{1,*}

- ¹ Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Kragujevac, R. Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Serbia; tina.andrejevic@pmf.kg.ac.rs (T.P.A.); pantovic.bojana@pmf.kg.ac.rs (B.V.P.)
- ² Institute of Molecular Genetics and Genetic Engineering, University of Belgrade, Vojvode Stepe 444a, 11042 Belgrade, Serbia; ivana_aleksic@imgge.bg.ac.rs (I.A.); dusan.milivojevic@imgge.bg.ac.rs (D.M.); sandravojnovic@imgge.bg.ac.rs (S.V.)
- ³ Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana, Večna Pot 113, SI-1000 Ljubljana, Slovenia; jakob.kljun@fkkt.uni-lj.si
- ⁴ Serbian Academy of Sciences and Arts, Knez Mihailova 35, 11000 Belgrade, Serbia; milos.djuran@pmf.kg.ac.rs
- * Correspondence: iztok.turel@fkkt.uni-lj.si (I.T.); biljana.glicic@pmf.kg.ac.rs (B.Đ.G.); Tel.: +386-1-47-98-525 (I.T.); +381-34-336-223 (B.Đ.G.)

Abstract: Two zinc(II) complexes with dimethyl 2,2'-bipyridine-4,5-dicarboxylate (py-2py) of the general formula $[Zn(py-2py)X_2]$, $X = Cl^-$ (**1**) and Br^- (**2**) were synthesized and characterized by NMR, IR and UV-Vis spectroscopy and single-crystal X-ray diffraction analysis. Complexes **1** and **2** are isostructural and adopt a slightly distorted tetrahedral geometry with values of tetrahedral indices τ_4 and τ'_4 in the range of 0.80–0.85. The complexes were evaluated for their in vitro antimicrobial activity against two bacterial (*Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*) and two fungal strains (*Candida albicans* and *Candida parapsilosis*), while their cytotoxicity was tested on the normal human lung fibroblast cell line (MRC-5) and the model organism *Caenorhabditis elegans*. Complex **1** showed moderate activity against both *Candida* strains. However, this complex was twofold more cytotoxic compared to complex **2**. The complexes tested had no effect on the survival rate of *C. elegans*. Complex **2** showed the ability to inhibit filamentation of *C. albicans*, while complex **1** was more effective than complex **2** in inhibiting biofilm formation. The interactions of complexes **1** and **2** with calf thymus DNA (ct-DNA) and bovine serum albumin (BSA) were studied to evaluate their binding affinity toward these biomolecules.

Keywords: zinc(II) complexes; pyridine-4,5-dicarboxylate esters; antimicrobial activity; cytotoxicity; anti-biofilm activity; DNA/BSA interaction



Citation: Andrejević, T.P.; Aleksic, I.; Kljun, J.; Pantović, B.V.; Milivojevic, D.; Vojnovic, S.; Turel, I.; Djuran, M.I.; Glišić, B.Đ. Zinc(II) Complexes with Dimethyl 2,2'-Bipyridine-4,5-dicarboxylate: Structure, Antimicrobial Activity and DNA/BSA Binding Study. *Inorganics* **2022**, *10*, 71. <https://doi.org/10.3390/inorganics10060071>

Academic Editor: Graeme Hogarth

Received: 16 April 2022

Accepted: 24 May 2022

Published: 26 May 2022

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



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Zinc is the second most abundant trace element in the human body with the highest concentrations in the prostate and parts of the eye [1]. Its presence has been estimated in different enzymes, which have a structural and a catalytic or co-catalytic role [2]. For instance, it is incorporated in the active center of superoxide dismutase (SOD), carbonic anhydrase, carboxypeptidase, and alcohol dehydrogenase [3,4]. This metal plays an essential role in the development and maintenance of the immune system, wound healing, protein syntheses, and cell division [1,5,6]. Besides that, it is essential for DNA synthesis, and repair processes have an important role in the transcription factor function and a key role in monitoring the cell's metabolism and in their protection against oxidation stress [7,8]. Zinc(II) is also required for the sense of taste and smell and for normal growth and development during pregnancy, childhood, and adolescence [1]. Due to its antioxidant properties, this metal ion protects the organism against accelerated aging and can speed up the healing after an injury [1]. Besides that, zinc(II) has a key role in synaptic plasticity and learning, as well

Cite this: *Dalton Trans.*, 2020, **49**, 6084

Silver(I) complexes with different pyridine-4,5-dicarboxylate ligands as efficient agents for the control of cow mastitis associated pathogens†

Tina P. Andrejević,^a Dusan Milivojevic,^b Biljana Đ. Glišić,^a Jakob Kljun,^c Nevena Lj. Stevanović,^a Sandra Vojnovic,^b Strahinja Medic,^d Jasmina Nikodinovic-Runic,^{*b} Iztok Turel^{id} ^{*c} and Miloš I. Djuran^{id} ^{*e}

Infections of the cow udder leading to mastitis and lower milk quality are one of the biggest problems in the dairy industry worldwide. Unfortunately, therapeutic options for the treatment of cow mastitis are limited as a consequence of the development of pathogens that are resistant to conventionally used antibiotics. In the search for agents that will be active against cow mastitis associated pathogens, in the present study, five new silver(I) complexes with different chelating pyridine-4,5-dicarboxylate types of ligands, [Ag(NO₃)(py-2py)]_n (**1**), [Ag(NO₃)(py-2metz)]_n (**2**), [Ag(CH₃CN)(py-2py)]BF₄ (**3**), [Ag(py-2tz)₂]BF₄ (**4**) and [Ag(py-2metz)₂]BF₄ (**5**), py-2py is dimethyl 2,2'-bipyridine-4,5-dicarboxylate, py-2metz is dimethyl 2-(4-methylthiazol-2-yl)pyridine-4,5-dicarboxylate and py-2tz is dimethyl 2-(thiazol-2-yl)pyridine-4,5-dicarboxylate, were synthesized, structurally characterized and assessed for *in vitro* antimicrobial activity using both standard bioassay and clinical isolates from a contaminated milk sample obtained from a cow with mastitis. These complexes showed remarkable activity against the standard panel of microorganisms and a selection of clinical isolates from the milk of the cow diagnosed with mastitis. With the aim of determining the therapeutic potential of silver(I) complexes, their toxicity *in vivo* against the model organism, *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*), was investigated. The complexes that had the best therapeutic profile, **2** and **5**, induced bacterial membrane depolarization and the production of reactive oxygen species (ROS) in *Candida albicans* cells and inhibited the hyphae as well as the biofilm formation. Taken together, the presented data suggest that the silver(I) complexes with pyridine ligands could be considered for the treatment of microbial pathogens, which are causative agents of cow mastitis.

Received 12th February 2020,
Accepted 1st April 2020

DOI: 10.1039/d0dt00518e

rsc.li/dalton

Introduction

Mastitis is a multi-etiological and complex disease, which is defined as the inflammation of the parenchyma of mammary glands or udders.¹ It is also the most widespread infectious

disease in dairy cattle, and, from an economic aspect, the most damaging.^{2,3} Mastitis represents a global problem as it adversely affects animal health, the quality of milk, food waste, the economics of milk production, and consumer health. An additional troubling aspect of mastitis is its recurrent nature.^{4,5}

Mastitis is primarily caused by bacterial intramammary infection, with more than 150 bacterial species isolated from bovine mastitic udders. Based on the pathogens involved, the disease is broadly classified into bacterial, mycotic/fungal/algal, mycoplasmal and nocardial.^{6,7} The major bacterial pathogens associated with mastitis are *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus* and *Mycoplasma bovis*. Moreover, *Streptococcus dysgalactiae*, *Staphylococcus epidermidis* and methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) have also been detected. *Pseudomonas aeruginosa* is often isolated as part of a mixed infection of bovine udders and is often found resistant to several antibiotic generations.⁷ Fungal invasion of bovine mammary tissue often occurs as a mixed infection, but

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

^bInstitute of Molecular Genetics and Genetic Engineering, University of Belgrade, Vojvode Stepe 444a, 11042 Belgrade, Serbia.
E-mail: jasmina.nikodinovic@imgge.bg.ac.rs

^cUniversity of Ljubljana, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, Večna pot 113, SI-1000 Ljubljana, Slovenia. E-mail: Iztok.Turel@fktk.uni-lj.si

^dVetlab d.o.o., Bulevar Franše D' Eperea 8, 11000 Belgrade, Serbia

^eSerbian Academy of Sciences and Arts, Knez Mihailova 35, 11000 Belgrade, Serbia.

E-mail: milos.djuran@pmf.kg.ac.rs

† Electronic supplementary information (ESI) available: Fig. S1–S3 and Tables S1 and S2. CCDC 1980742–1980746 contains the supplementary crystallographic data for this paper. For ESI and crystallographic data in CIF or other electronic format see DOI: 10.1039/D0DT00518E

ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Изјављујем да докторска дисертација под насловом:

Структура и антимикуробна активност комплекса бакра(II), цинка(II) и сребра(I) са лигандима који садрже пиридин

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. јануар 2024. године,

Тина Андрејевић

потпис аутора

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

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

Структура и антимикуробна активност комплекса бакра(II), цинка(II) и сребра(I) са
лигандима који садрже пиридин
истоветне.

У Крагујевцу, 23. јануар 2024. године,

Лина Анђелић

потпис аутора

ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Тина Андрејевић,

дозвољавам

не дозвољавам

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

Структура и антимикуробна активност комплекса бакра(II), цинка(II) и сребра(I) са лигандима који садрже пиридин

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

Овом Изјавом такође

дозвољавам

не дозвољавам¹

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

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

- 1) Ауторство
- ② Ауторство - делити под истим условима
- 3) Ауторство - без прерада
- 4) Ауторство - некомерцијално
- 5) Ауторство - некомерцијално - делити под истим условима
- 6) Ауторство - некомерцијално - без прерада²

У Крагујевцу, 23. јануар 2024. године,

Тина Андријевић

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/>