MINISTERUL EDUCAȚIEI, CULTURII ȘI CERCETĂRII AL REPUBLICII MOLDOVA
UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA

Cu titlu de manuscris

C.Z.U.: 57.085.23: 615.28

GARBUZ OLGA

NOI INHIBITORI MOLECULARI ANORGANICI ŞI ORGANICI AI PROLIFERĂRII CELULELOR DE CANCER, MECANISME DE ACȚIUNE

163.02 – BIOCHIMIE

Rezumatul tezei de doctor în ştiinţe biologice

CHIȘINĂU, 2021

Teza a fost elaborată la Departamentul Chimie, LCŞ „Materiale Avansate în Biofarmaceutică şi Tehnică" al Universității de Stat din Moldova, Laboratorul Biochimie al Universității de Stat de Medicină și Farmacie „*Nicolae Testemițanu*", Institutul de Zoologie și Centrul de Cercetări Medicale al Academiei Poloneze de Științe.

Conducător ştiinţific:	academician, doctor habilitat în ştiinţe chimice, profesor
GULEA Aurelian	universitar, Om Emerit al Republicii Moldova
Consultant ştiinţific:	doctor habilitat în ştiințe medicale, profesor universitar, Om
GUDUMAC Valentin	Emerit al Republicii Moldova

Referenți oficiali:
1. **FULGA Veaceslav**, doctor habilitat în științe medicale, conferențiar universitar
2. **GLIJIN Aliona**, doctor în științe biologice, conferențiar universitar

Componența consiliului științific specializat:
1. **CRIVOI Aurelia, președinte,** doctor habilitat în științe biologice, profesor universitar
2.**BULIMAGA Valentina, secretar științific,** doctor în științe biologice, conferențiar cercetător
3. **TAGADIUC Olga**, doctor habilitat în științe medicale, profesor universitar
4. **REVA Veaceslav**, doctor habilitat în științe biologice, profesor universitar
5. **TAPCOV Victor**, doctor în științe chimice, conferențiar universitar
6. **BULIMESTRU Ion**, doctor în științe chimice, conferențiar universitar
7. **SACARA Victoria**, doctor habilitat în științe biologice**,** conferențiar universitar

Susţinerea va avea loc la 19 februarie 2021, ora 14.00 în şedinţa Consiliului ştiinţific specializat (D 163.02-50) din cadrul Universităţii de Stat din Moldova, or. Chişinău, str. A. Mateevici 60, MD-2009.
Teza de doctor şi rezumatul pot fi consultate la biblioteca Universităţii de Stat din Moldova şi pe pagina web a ANACEC (www.anacip.md).
Rezumatul a fost expediat la 14 ianuarie 2021.

Secretar ştiinţific al Consiliului ştiinţific specializat:
BULIMAGA Valentina, doctor în științe biologice, conferențiar cercetător

Conducător ştiinţific **GULEA Aurelian**
Academician, doctor habilitat în ştiinţe chimice, profesor universitar, Om Emerit al Republicii Moldova
Consultant științific **GUDUMAC Valentin**
Doctor habilitat în în științe medicale, profesor universitar, Om Emerit al Republicii Moldova
Autor: **GARBUZ Olga**

© Garbuz Olga, 2021

CUPRINS

REPERELE CONCEPTUALE ALE CERCETĂRII....4

CONȚINUTUL TEZEI....8

1. CANCERUL ȘI ASPECTELE GENERALE ALE CHIMIOTERAPIEI....8

2. CARACTERISTICILE OBIECTIVELOR DE STUDIU ȘI METODELE DE CERCETARE....8

3. ACTIVITATEA ANTIPROLIFERATIVĂ A COMPUȘILOR TESTAȚI....9

3.1. Activitatea antiproliferativă *in vitro* a compușilor testați CMT-22, CMT-67 și CMT-68 pe diferite linii de celule canceroase....9

3.2. Activitatea antiproliferativă *in vitro* a compușilor testați CMJ-23 și CMJ-33 pe diferite linii de celule canceroase....15

3.3. Capacitatea compușilor testați de a induce fragmentarea ADN-ului *in vitro*....17

4. STUDIUL MECANISMULUI DE ACȚIUNE ȘI REACȚIILE ADVERSE ALE NOILOR INHIBITORI DE CELULE CANCEROASE ORGANICI ȘI ORGANOMETALICI ASOCIATE CU STRESSUL OXIDATIV....18

4.1. Activitatea compușilor testați de înlăturare a radicalilor $ABTS^{\bullet+}$ și $DPPH^{\bullet}$....19

4.2. Capacitatea de absorbție a radicalilor de oxigen (RO) a compușilor testați....20

4.3. Activitatea antilipoxigenazică a compușilor testați....21

4.4. Impactul compușilor testați asupra formării methemoglobinei....22

4.5. Impactul compușilor testați asupra hemolizei eritrocitelor....23

4.6. Toxicitatea compușilor testați....24

CONCLUZII GENERALE....25

RECOMANDĂRI PRACTICE....26

REFERINȚE....27

LISTA LUCRĂRILOR ŞTIINŢIFICE LA TEMA TEZEI....29

ADNOTARE....32

ANNOTATION....**Ошибка! Закладка не определена.**

АННОТАЦИЯ....34

REPERELE CONCEPTUALE ALE CERCETĂRII

Actualitatea și importanța problemei abordate. Conform unui raport recent al Organizației Mondiale a Sănătății, actualmente sunt înregistrate peste 10 milioane de cazuri de cancer anual în întreaga lume. Cancerul reprezintă o diversitate de boli, caracterizate prin proliferarea necontrolată a celulelor într-o formă diferită, în raport cu complementul normal al organismului. Proliferarea continuă a celulelor canceroase se transformă în țesut tumoral și se poate răspândi în alte organe. Principala necesitate în chimioprevenția cancerului rămâne descoperirea de noi agenți terapeutici eficienți și siguri.

Este cunoscut faptul că o mare varietate de gene sunt implicate în dezvoltarea tumorilor și sunt dereglate diverse procese celulare, incluzând mecanismele pentru controlul proliferării celulare, reparării ADN-ului, stabilității cromozomilor, interacțiunilor intercelulare, celular-matriceale, angiogenezei, îmbătrânirii celulelor și apoptozei. În acest aspect, este necesar să se ia în considerație procesele celulare de bază în prescripția corectă a remediilor anticancer și înțelegerea mecanismului lor de acțiune.

S-a stabilit că multe dintre remediile antitumorale acționează datorită afectării ADN și sunt cele mai active în faza S, când are loc replicarea lui, iar taxanii perturbă mitoza, prevenind formarea unui ax. Astfel de medicamente acționează numai asupra celulelor care se divid, de aceea tumorile cu o intensitate mare de creștere sunt cele mai sensibile la chimioterapie.

Toxicitatea sistemică ridicată și rezistența la medicamente rămân o provocare majoră pentru medicina modernă în managementul cancerului, în pofida progreselor semnificative înregistrate în terapia anticancer. Chimioterapia poate produce reacții adverse severe cauzate de efectele sale citotoxice asupra celulelor normale. Aceasta limitează utilizarea lor și reprezintă o indicație pentru a reduce doza preparatului medicamentos, și chiar de a sista tratamentul. De aceea, este important ca agenții anticancer să exercite activitate antiproliferativă și citotoxică în celulele tumorale fără a afecta țesuturile normale, astfel încât necesitatea principală în chimioprevenția cancerului rămâne descoperirea de agenți noi eficienți și siguri.

În acest context, am efectuat studiul comparativ al activităților antiproliferative și antioxidante ale *N*(4)-feniltiosemicarbazonei 2-formilpiridinei (CMT-22), complexului de cupru(II) [Cu(L)Cl] cu *N*(4)-feniltiosemicarbazona 2-formilpiridinei (CMT-67), complexului de cupru(II) cu liganzi micști cloro(*N*-fenil-*N*'-[(piridin-2-il)metiliden]carbamohidrazonotioato)(4-aminobenzen-1-sulfonamidă)cupru (CMT-68), precum și CMJ-23 și complexului de cupru (CMJ-33) cu remediile anticancer doxorubicina (DOXO) și cisplatina (CDDP), aprobate de Agenția de administrare a alimentelor și medicamentelor (FDA), folosind diferite linii de celule canceroase, precum și celule normale *in vitro*. Ulterior, au fost testate *in vitro* hemoliza și formarea methemoglobinei (MetHb) în eritrocitele (RBCs) umane. De asemenea, în condiții *in vivo* a fost evaluată toxicitatea compușilor testați pe parameciului (*Paramecium caudatum*).

Scopul lucrări: elucidarea efectului noilor inhibitori moleculari pe bază de compuși organici și complecși asupra proliferării liniilor celulare ale cancerului uman în comparație cu medicamentele anticanceroase doxorubicina și *cis*-diclorodiamminplatinum; determinarea mecanismului de acțiune a inhibitorilor.

Pentru realizarea scopului propus s-au stabilit următoarele obiective:

- ✓ detectarea activității antiproliferative a substanțelor testate CMT-22, CMT-67, CMT-68, CMJ-23, CMJ-33 împotriva celulelor canceroase HeLa, BxPC-3, RD, MeW-164;

- ✓ testarea acțiuniii substanțelor investigate asupra celulelor renale epiteliale normale de linia MDCK pentru a detecta citotoxicitatea selectivă;
- ✓ stabilirea mecanismului de inhibare a proliferării celulelor canceroase de către substanțele testate;
- ✓ evaluarea *in vitro* a probabilității de dezvoltare a posibilelor efecte secundare ale substanțelor testate asociate cu hemoliza și formarea methemoglobinei în eritrocitele umane;
- ✓ determinarea toxicității substanțelor testate.

Ipoteza de cercetare.

În baza analizei literaturii de specialitate și modelare moleculară, s-a presupus că *N*(4)-feniltiosemicarbazona 2-formilpiridinei (*N*-fenil-2-(piridin-2-ilmetiliden)hidrazincarbotioamida, CMT-22), complexul de cupru(II) [Cu(L)Cl] cu ligandul CMT-22 (cloro(*N*-fenil-*N*'-[(piridin-2-il)metiliden]carbamohidrazonotioato)cupru, CMT-67), complexul de cupru(II) cu liganzi micști [Cu(Str)(L)Cl] cu CMT-22 și 4-aminobenzensulfonamidă (Str) (cloro(*N*-fenil-*N*'-[(piridin-2-il)metiliden]carbamohidrazonotioato)(4-aminobenzen-1-sulfonamidă)cupru, CMT-68), precum și compusul organic codificat CMJ-23 și complexul de cupru(II) CMJ-33 cu ligand CMJ-23 sunt inhibitori potentiali de proliferare a celulelor de cancer cu o activitate selectivă înaltă.

Sinteza metodologiei de cercetare şi justificarea metodelor de cercetare alese.

Activitatea antiproliferativă a fost testată *in vitro* prin testul MTT de proliferare celulară, testul cu rezazurină şi citometria fluorescentă de flux. Fragmentarea ADN-ului a fost studiată prin metoda electroforetică. Activitatea antioxidantă a fost determinată prin metodele $ABTS^{\bullet+}$, $DPPH^{\bullet}$, ORAC-Fl şi LOX. Hemoliza toxică a eritrocitelor *in vitro* şi formarea methemoglobinei (metHb) au fost determinate cu teste de eritrocite intacte. Metoda cu colorantul roşu neutru (NR) a fost utilizată pentru determinarea toxicităţii *in vivo* asupra culturii de *Paramecium caudatum.*

Noutatea şi originalitatea ştiinţifică:

- ✓ au fost adaptate metodele de studiu al activităţii biologice a substanţelor testate (metoda de determinare a activităţii lipoxigenazei; metoda de determinare a capacităţii antioxidante în probele biologice; procedeul de determinare a capacitatii de inducere a hemolizei; metoda de determinare *in vitro* a viabilităţii şi citotoxicităţii celulare);
- ✓ a fost determinată activitatea antiproliferativă şi antioxidantă a cinci compuşi autohtoni (tiosemicarbazone şi compuşi coordinativi ai Cu(lI) cu tiosemicarbazone);
- ✓ a fost stabilit că substanţele investigate *in vitro* nu cauzează formarea methemoglobinei şi nu măresc indicele sistemelor de hemoliză în eritrocitele umane;
- ✓ a fost elaborată o metodă nouă pentru determinarea toxicităţii directe, utilizând *Paramecium caudatum* şi evaluată toxicitatea directă a substanţelor investigate;
- ✓ a fost elucidat mecanismul efectului substanţelor asupra proliferării celulelor canceroase şi s-a stabilit că are loc apoptoza acestora, fapt confirmat prin următoarele metode de cercetare: electroforetică de separare şi detectare a fragmentelor de acizi nucleici, fluorescenţa de flux, microscopia, RMN şi difractia cu Raxe X;
- ✓ pentru prima dată a fost stabilit efectul antiproliferativ al compuşilor testaţi (*N*(4)-feniltiosemicarbazona 2-formilpiridinei (*N*-fenil-2-(piridin-2-ilmetiliden)hidrazincarbotioamida, CMT-22, HL), complexul de cupru(II) [Cu(L)Cl] cu ligandul CMT-22 (cloro(*N*-fenil-*N*'-[(piridin-2-il)metiliden]carbamohidrazonotioato)cupru,

CMT-67), complexul de cupru(II) cu liganzi micşti [Cu(Str)(L)Cl] cu CMT-22 şi 4-aminobenzensulfonamidă (Str) (cloro(*N*-fenil-*N'*-[(piridin-2-il)metiliden]carbamohidrazonotioato)(4-aminobenzen-1-sulfonamidă)cupru, CMT-68), precum şi compusul organic codificat CMJ-23 şi complexul de cupru(II) CMJ-33 cu ligand CMJ-23) mai puţin toxici şi mai eficienţi, comparativ cu DOXO şi cisplatina, ceea ce deschide perspectiva de utilizare a lor ca agenţi anticancer.

Semnificația teoretică a lucrării și valoarea aplicativă.

Au fost identificaţi noi inhibitori ai proliferării celulelor canceroase cu activitate selectivă ridicată şi toxicitate scăzută, ceea ce a făcut posibilă propunerea acestora pentru studii preclinice. A fost propusă o metodă directă de biotestare a toxicităţii pe *Paramecium cadatum,* pentru screeningul preliminar şi evaluarea toxicităţii substanţelor pentru a restrânge intervalul de concentraţii la determinarea dozelor letale pentru studiile preclinice ulterioare pe şobolani. A fost stabilit că mecanismul de acţiune a activităţii antiproliferative a compuşilor testaţi asupra celulelor este asociat cu apoptoza. În baza analizelor RMN şi Difractiei cu raze X s-a constatat că thiosemicarbazonele interacţionează cu fragmentul ADN (guanina), formând legături de hidrogen, ceea ce cauzează fragmentarea ADN şi, în final, apoptoza.

Rezultatele obţinute au semnificaţie ştiinţifică şi ştiinţifico-didactică şi pot fi utilizate la predarea cursurilor speciale de Chimie biofarmaceutică şi Biochimie.

Rezultatele ştiinţifice principale înaintate spre susţinere:

- ✓ investigarea activităţii anticancer a compuşilor sintetizaţi;
- ✓ detecţia compuşilor, care manifestă activitate antiproliferativă înaltă în celulele canceroase şi toxicitate scăzută în celulele normale;
- ✓ identificarea activităţii antioxidante a compuşilor cercetaţi;
- ✓ studiul toxicităţii compuşilor testaţi *in vitro* şi *in vivo*.

Problema ştiinţifică importantă soluţionată constă în identificarea unor inhibitori noi de proliferare a celulelor canceroase cu activitate selectivă înaltă și toxicitate mai scăzută, comparativ cu compușii anticancer de referință aprobați de FDA (DOXO și cisplatina), precum şi elucidarea mecanismului de acțiune antiproliferativă a compușilor autohtoni testați. A prezentat interes şi acţiunea antioxidativă a inhibitorilor moleculari organici şi anorganici asupra radicalilor ($ABTS^{\bullet+}$, $DPPH^{\bullet}$, $HO_2^{\bullet}$),comparativ cu standardele de referinţă, precum și evaluarea impactului compuşilor asupra indicilor sistemului de hemoliză a eritrocitelor *in vitro*, în vederea evaluării impactului lor.

Implementarea rezultatelor ştiinţifice obţinute.

A fost elaborată şi brevetată o metodă de determinare a toxicităţii directe a substanţelor, folosind *Paramecium caudatum*. Au fost brevetaţi doi inhibitori moleculari de proliferare a celulelor de cancer şi o substanţă cu activitate antioxidantă. În rezultatul modificării şi adaptării metodelor de studiu a activităţii biologice a substanţelor au fost implementate trei inovaţii. Rezultatele obţinute au semnificaţie ştiinţifico-aplicativă şi pot fi utilizate în pregătirea tinerilor specialiști în domeniul chimiei, biofarmaceuticii și biochimiei.

Aprobarea rezultatelor ştiinţifice.

Rezultatele principale ale lucrării au fost prezentate sub formă de 3 comunicări orale și 11 postere la următoarele conferințe științifice naționale și internaționale: 3rd French-Romanian Colloquium on Medicinal Chemistry, Iaşi, Roumanie, 2014; the XVIII-th International

Conference „Physical Methods in Coordination and Supramolecular Chemistry" Chişinău, Republica Moldova, 2015; Conferinţa ştiinţifică anuală a colaboratorilor şi studenţilor, Chişinău, Republica Moldova 2015; International Scientific Conference on Microbial Biotechnology (3rd edition) Chişinău, Republica Moldova, 2016; the 6th International Conference Ecological & Environmental Chemistry, Chisinau, Republic of Moldova, 2017; the 4th French-Romanian Colloquium on Medicinal Chemistry, Iasi, Romania, 2017; conferința științifică națională cu participare internațională „Integrare prin Cercetare și Inovare", USM, 2017; Simpozionul international, „Ecologia funcțională a animalelor", consacrat aniversării a 70 de ani de la nașterea academicianului Ion Toderaș, Republica Moldova, 2018; International Conference Achievements and perspectives of modern chemistry, Chisinau, Republic of Moldova, 2019.

Teza constă din: introducere, patru capitole, concluzii generale şi recomandări, 204 referințe bibliografice, 5 anexe, 130 de pagini de text de bază (până la Bibliografie), 41 de figuri, 8 scheme şi 6 tabele. Rezultatele obţinute sunt publicate în 28 de lucrări ştiinţifice (7 articole, 14 teze la conferinţe, 4 brevete de invenţie, 3 inovații).

Cuvinte-cheie: compuși anticancer, activitate antiproliferativă, celule canceroase umane, activitate selectivă, activitate antioxidantă, hemoliză.

CONȚINUTUL TEZEI

Introducerea descrie relevanța și importanța problemei abordate, identifică scopul și principalele obiective ale tezei, descrie noutatea și originalitatea științifică a rezultatelor, semnificația teoretică și practică, diseminarea și aprobarea rezultatelor cercetării, sumarul capitolelor tezei, cuvintele-cheie.

1. CANCERUL ȘI ASPECTELE GENERALE ALE CHIMIOTERAPIEI

În capitolul 1 este prezentat reviul literaturii. Capitolul respectiv este constituit din șase subcapitole principale, care descriu epidemiologia, etiologia și patogeneza cancerului, precum și utilizarea chimioterapiei, având în vedere ciclul celular în cancer, reacțiile adverse asociate cu stresul oxidativ și rezistența. În „Reviul literaturii" este prezentată caracteristica preparatelor medicamentoase antitumorale (naturale, semisintetice, sintetice) și descrierea mecanismului lor de acțiune. Analiza situației în acest domeniu a ajutat la constatarea și identificarea problemelor de cercetare. Capitolul se încheie cu șase concluzii.

2. CARACTERISTICILE OBIECTIVELOR DE STUDIU ȘI METODELE DE CERCETARE

Studiul a fost efectuat în perioada 2013-2020 în Laboratorul de Cercetări Ştiinţifice „Materiale avansate în biofarmaceutică şi tehnică" al Universității de Stat din Moldova, Laboratorul Biochimie al Universității de Stat de Medicină și Farmacie „*Nicolae Testemițanu*", Institutul de Zoologie și Centrul de Cercetări Medicale a Academiei Poloneze de Științe.

Capitolul începe cu o descriere a caracteristicilor compușilor testați. *N*(4)-feniltiosemicarbazona 2-formilpiridinei (*N*-fenil-2-(piridin-2-ilmetiliden)hidrazincarbotioamida, CMT-22, HL), complexul de cupru(II) [Cu(L)Cl] cu ligandul CMT-22 (cloro(*N*-fenil-*N*'-[(piridin-2-il)metiliden]carbamohidrazonotioato)cupru, CMT-67), complexul de cupru(II) cu liganzi micști [Cu(Str)(L)Cl] cu CMT-22 și 4-aminobenzensulfonamidă (Str) (cloro(*N*-fenil-*N*'-[(piridin-2-il)metiliden]carbamohidrazonotioato)(4-aminobenzen-1-sulfonamidă)cupru, CMT-68), precum și compusul organic codificat CMJ-23 și complexul de cupru(II) CMJ-33 cu ligand CMJ-23 au fost sintetizați în Laboratorul de Materiale Avansate în Biofarmaceutică și Tehnică al Universității de Stat din Moldova de către acad. A. Gulea și colab. Deoarece compușii CMJ-23 și CMJ-33 nu sunt brevetați, formula lor structurală nu este dezvăluită [1-3].

Tiosemicarbazona CMT-22 și complexul de cupru(II) CMT-67 au fost sintetizați în modul cum este descris în literatura de specialitate [4]. Tiosemicarbazona CMT-22 a fost caracterizată prin spectroscopia RMN (^{1}H și ^{13}C). Complexul CMT-67 a fost caracterizat prin spectroscopia electronică, FT-IR și EPR, conductibilitatea molară, susceptibilitatea magnetică și analiza elementelor. De asemenea, structura cristalină a CMT-67 a fost determinată prin analiza de difracție cu raze X pe monocristal. Punctele de topire, spectrele IR și RMN ale compușilor testați corespund cu datele din literatură [4]. Complexul de cupru(II) cu liganzi micști CMT-68 a fost sintetizat prin reacția dintre *N*(4)-feniltiosemicarbazona 2-formilpiridinei (CMT-22) cu $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ și 4-aminobenzensulfonamida [5, 6].

Activitatea biologică a compușilor testați a fost comparată cu compușii anticancer de referință aprobați de FDA: doxorubicina ((7*S*,9*S*)-7-[(2*R*,4*S*,5*S*,6*S*)-4-amino-5-hidroxi-6-metiloxan-2-il]oxi-6,9,11-trihidroxi-9-(2-hidroxiacetil)-4-metoxi-8,10-dihidro-7*H*-tetracen-5,12-

dion) [7] și cisplatina (*cis*-diclorodiamminplatina). În aplicațiile biologice sau biochimice au fost utilizați antioxidanții: trolox (acidul 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxilic) și rutin (2-(3,4-dihidroxifenil)-5,7-dihidroxi-3-[α-*L*-ramnopiranosil-(1→6)-β-*D*-glucopiranoziloxi]-4*H*-cromen-4-on).

Activitatea anticancer a compușilor testați a fost investigată pe celulele de melanom uman de linia MeW-164 în Centrul de Cercetări Medicale al Academiei Poloneze de Științe, folosind testul MTT (bromura de 3-(4,5-dimetiltiazolil-2)-2,5-difeniltetrazoliu) și metoda de citometrie fluorescentă în flux [5].

Cercetarea activității anticancer a compușilor sintetizați în raport cu celulele epiteliale ale colului uterin uman ale liniei HeLa (ATCC CCL-2), celulele adenocarcinomului pancreatic uman epitelial de linia BxPC-3 (ATCC CRL-1687), fusul muscular de rabdomiosarcom uman și celulele multinucleate mari ale liniei RD (ATCC CCL-136), precum și celulele normale epiteliale renale Madin Darby Canine de linia MDCK (ATCC CCL-34) a fost efectuată în cadrul Laboratorului de Biochimie al Universității de Stat și Medicină și Farmacie "*Nicolae Testemițanu*„ cu ajutorul testului cu resazurină.

Liniile de celule pentru experimente au fost luate după crioconservare, în faza de vapori de azot lichid la temperatura de la -180° până la -196°C în mediul de înghețare (mediul de creștere complet, suplimentat cu 5% (v/v) DMSO). Pentru formarea monostratului intact pe substrat, celulele au fost cultivate timp de cel puțin trei săptămâni, transferate la fiecare 2-3 zile, urmate de tripsinizarea grupurilor de celule adezive și substituirea mediilor de creștere, adăugându-se ser fetal bovin inactivat ca factor de creștere. Pentru experimente au fost utilizate celule în faza de creștere logaritmică. Viabilitatea celulelor a fost evaluată cu ajutorul soluţiei de 0,2% de colorant albastru de tripan (acid (3*Z*,3'*Z*)-3,3'-[(3,3'-dimetilbifenil-4,4'-diil)di(1*Z*)hidrazin-2-il-1-iliden]bis(5-amino-4-oxo-3,4-dihidronaftalen-2,7-disulfonic).

Pentru a determina mecanismul de acțiune al compușilor testați asociat cu un efect direct asupra fragmentării ADN-ului genomic al celulelor, a fost utilizată metoda electroforetică.

În plus, activitatea antioxidantă și capacitatea de captare a radicalilor liberi *in vitro* au fost evaluate prin teste considerate importante ($ABTS^{\bullet+}$, $DPPH^{\bullet}$, ORAC-Fluoresceină, LOX) pentru a determina proprietățile antioxidante ale compușilor testați potențiali utili pentru prevenirea cancerului.

A patra și a cincea secțiune elucidează hemoliza toxică a eritrocitelor și a methemoglobinei (metHb) în teste pe eritrocite intacte *in vitro* pentru a determina reacțiile adverse ale compușilor studiați, asociate cu hipoxia tisulară și hemoliza în sângele uman.

În final, în acest capitol este inclus subcapitolul dedicat NR testului de toxicitate *in vivo* cu *Paramecium caudatum,* ca obiect de testare.

Calculele necesare sunt descrise extensiv pentru fiecare metodă.

3. ACTIVITATEA ANTIPROLIFERATIVĂ A COMPUȘILOR TESTAȚI

3.1. Activitatea antiproliferativă *in vitro* a compușilor testați CMT-22, CMT-67 și CMT-68 pe diferite linii de celule canceroase

Activitatea antiproliferativă a compușilor cercetați CMT-22, CMT-67 și CMT-68 pe celulele MeW-164 a fost evaluată, folosind testul MTT. Colorantul MTT (bromură de 3-(4,5-

dimetiltiazolil-2)-2,5-difeniltetrazoliu) este utilizat ca un indice al integrității membranei mitocondriale interne în celulele vii. Substanța este o sare galbenă de tetrazoliu, care este utilizată pentru a determina activitatea și viabilitatea celulelor datorită descompunerii cauzate de reducerea la inelul sării de tetrazoliu MTT prin acțiunea enzimelor mitocondriale dehidrogenaze. Astfel, se formează cristale de formazan purpuriu, unde absorbția poate fi determinată spectrofotometric la un interval de lungime de undă de 540-570 nm. Astfel de cristale, care sunt insolubile în apă, sunt solubile în dimetilsulfoxida (DMSO) sau alți solvenți. Pe de altă parte, viabilitatea celulară este proporțională cu absorbția, evidențiată de prezența cristalelor de formazan în soluție [8].

Experimentele cu referire la activitatea antiproliferativă au fost prezentate într-o manieră dependentă de doză și au elucidat dependența efectelor inhibitorii de concentrația compușilor testați CMT-22, CMT-67 și CMT-68 la intervalul micromolar.

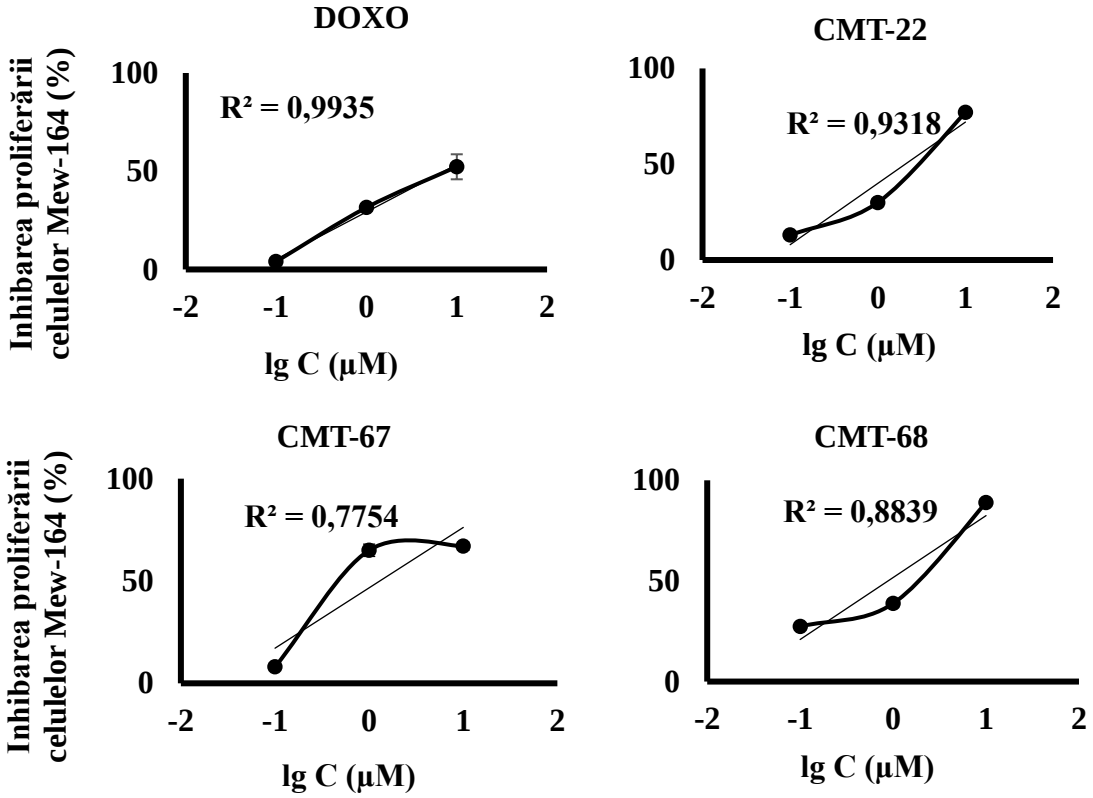


Fig. 1. Efectul inhibitor al DOXO, CMT-22, CMT-67 și CMT-68 asupra proliferării liniei MeW-164. Celulele MeW-164 au fost tratate cu DOXO, CMT-22, CMT-67 și CMT-68 la concentrații de 0,1; 1;10 µM timp de 24 de ore. Valorile sunt reprezentate ca media ± SD a 3 replici.

Evaluarea efectului antiproliferativ pe liniile de celule MeW-164, creșterea cantității compușilor testați CMT-22, CMT-67, CMT-68 și a concentrației de DOXO ca control de referință până la 10 µM a condus la o creștere logaritmică a inhibării procentuale cu valori ale concentrației inhibitorii a proliferării celulare 50% (IC_{50}) de 2,5±0,1 µM, 1,0±0,1 µM, 1,0±0,1 µM și 7,3±0,3 µM, respectiv (Figura 1). Astfel, toți compușii au manifestat o activitate antiproliferativă ridicată față de linia MeW-164.

Viabilitatea celulelor HeLa, BxPC-3, RD și MDCK a fost determinată cu ajutorul testului cu resazurină [9,10]. Resazurina este un colorant indicator nefluorescent, care este transformat în resorufină fluorescentă de culoare roșie intensă prin reacțiile de reducere a celulelor metabolic active. Cantitatea de fluorescență produsă este proporțională cu numărul de celule vii. Resazurina a fost dizolvată în soluție tampon fiziologică (rezultând o soluție colorată în albastru intens) și adăugată direct la celulele din cultură într-un format omogen. De obicei, în prezența enzimelor NADPH dehidrogenazei sau NADH dehidrogenazei, în calitate de reducători se utilizează NADPH sau NADH care reduc resazurina.

Studiul comparativ a activității citotoxice în depindența de concentrațiile a compușilor testați și controalelor de referință DOXO, CDDP în celulele canceroase umane a liniei HeLa sunt prezentate în figura 2.

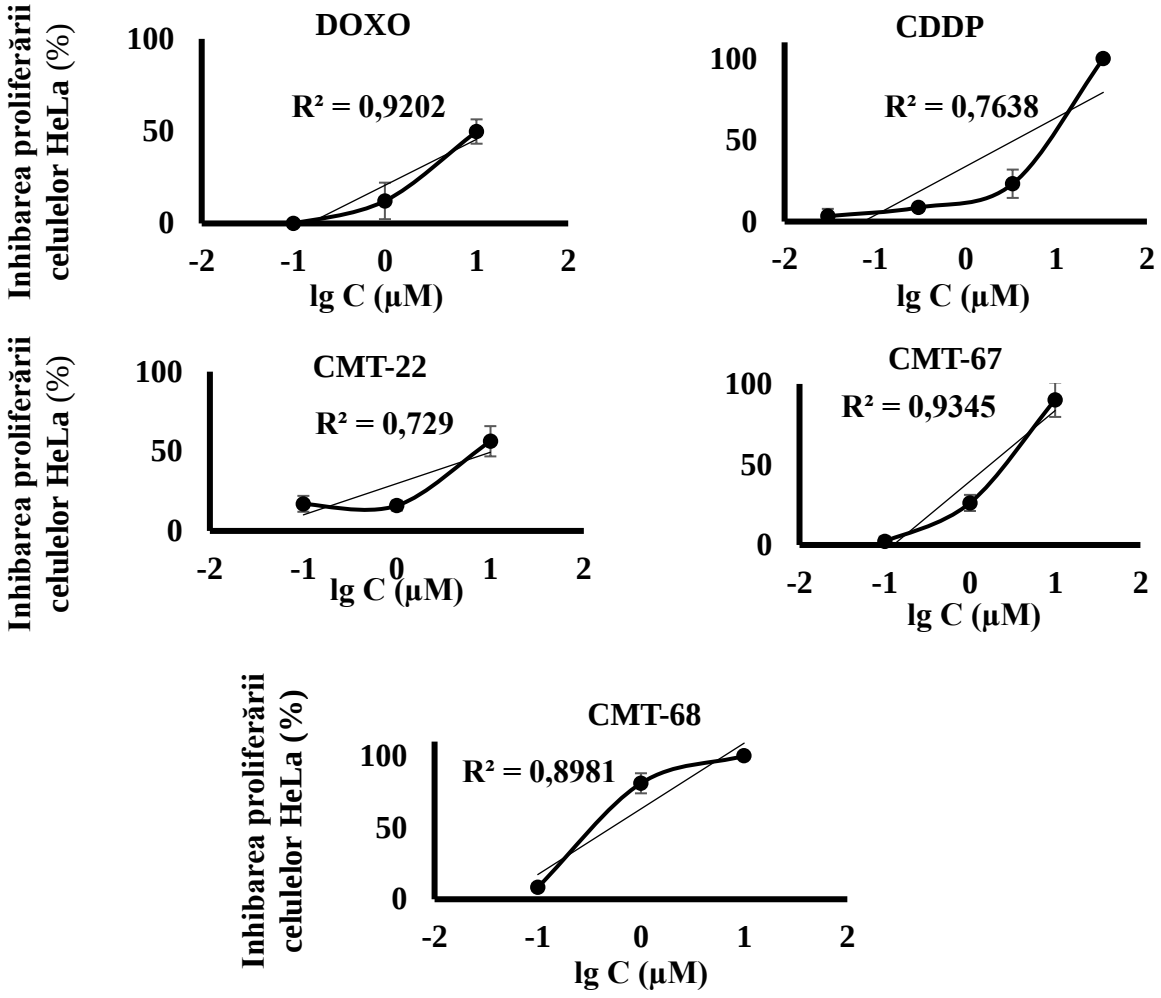


Fig. 2. Efectul inhibitor al DOXO, CDDP, CMT-22, CMT-67 și CMT-68 asupra proliferării liniei HeLa. Celulele HeLa au fost tratate cu DOXO, CMT-22, CMT-67 și CMT-68 de 0,1; 1 și 10 µM și CDDP de 0,03; 0,3; 3.3 și 33 µM timp de 24 ore. Valorile sunt reprezentate ca media ± SD a 3 replici.

S-a determinat că compușii testați CMT-22, CMT-67și CMT-68 au manifestat activitate inhibitoare în celulele HeLa, cu valori ai IC_{50} de 8,3±0,2 μM, 2,1±0,4 μM și 0,40±0,04 μM, respectiv. Valorile IC_{50} ale remediilor medicamentoase de referință DOXO și CDDP s-au dovedit a fi de 10,0±0,4 μM și 4,0±0,3 μM.

Astfel, s-a stabilit că, compușii CMT-67 și CMT-68 manifestă o activitate inhibitorie mai puternică în proliferarea celulelor HeLa, decât DOXO și CDDP. Activitatea inhibitoare a CMT-22 este comparabilă cu cea a DOXO și CDDP.

Compușii testați CMT-22, CMT-67 și CMT-68 inhibă formarea și creșterea celulelor a liniei BxPC-3, ce demonstrează capacitatea substanțelor experimentale de a inhiba procesul de metastază. S-a relevat că valorile IC_{50} ale celulelor BxPC-3 sunt ≥10 μM (CMT-22); 0,6±0,1 μM (CMT-67); 1,7±0,2 μM (CMT-68); 5,24±0,03 μM (DOXO) și 11,2±1,2 μM (CDDP) (Figura 3).

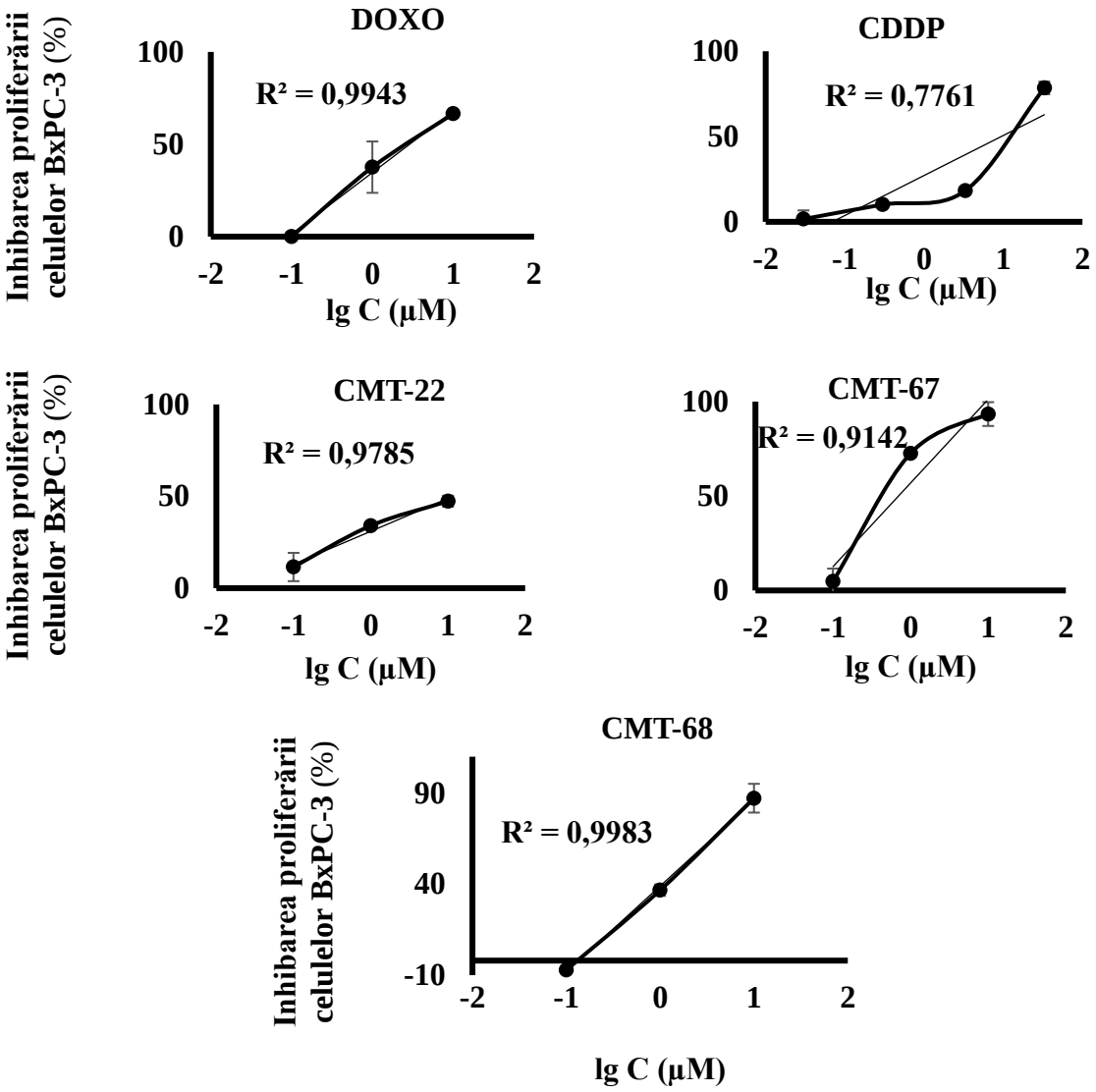


Fig. 3. Efectul inhibitor al DOXO, CDDP, CMT-22, CMT-67 și CMT-68 asupra proliferării liniei BxPC-3. Celulele BxPC-3 au fost tratate cu DOXO, CMT-22, CMT-67 și CMT-68 de 0,1; 1 și 10 μM și cisplatină de 0,03; 0,3; 3.3 și 33 μM timp de 24 ore. Valorile sunt reprezentate ca media ± SD a 3 replici.

Astfel, studiul experimental a estimat, că tiosemicarbazona CMT-22 inhibă proliferarea celulelor BxPC-3 doar la concentrația de 10 μM cu 47,3%. De asemenea, a fost stabilit că complexul de cupru(II) CMT-67 și complexul de cupru(II) cu liganzi micști (CMT-68) manifestă o activitate inhibitoare mai puternică asupra proliferării celulelor BxPC-3, decât DOXO și cisplatina.

S-a constatat că, compușii testați CMT-22, CMT-67 și CMT-68 prezintă o activitate inhibitoare mai puternică pe axul de rabdomiosarcom al mușchilor umani și celulele multinucleate mari ale liniei de proliferare RD decât DOXO. Astfel, IC_{50} pentru RD înregistrează următoarele valori: 1,1±0,1 μM (CMT-22); 0,27±0,02 μM (CMT-67); 1,3±0,3 μM (CMT-68) și 2,3±0,9 μM pentru DOXO (Figura 4).

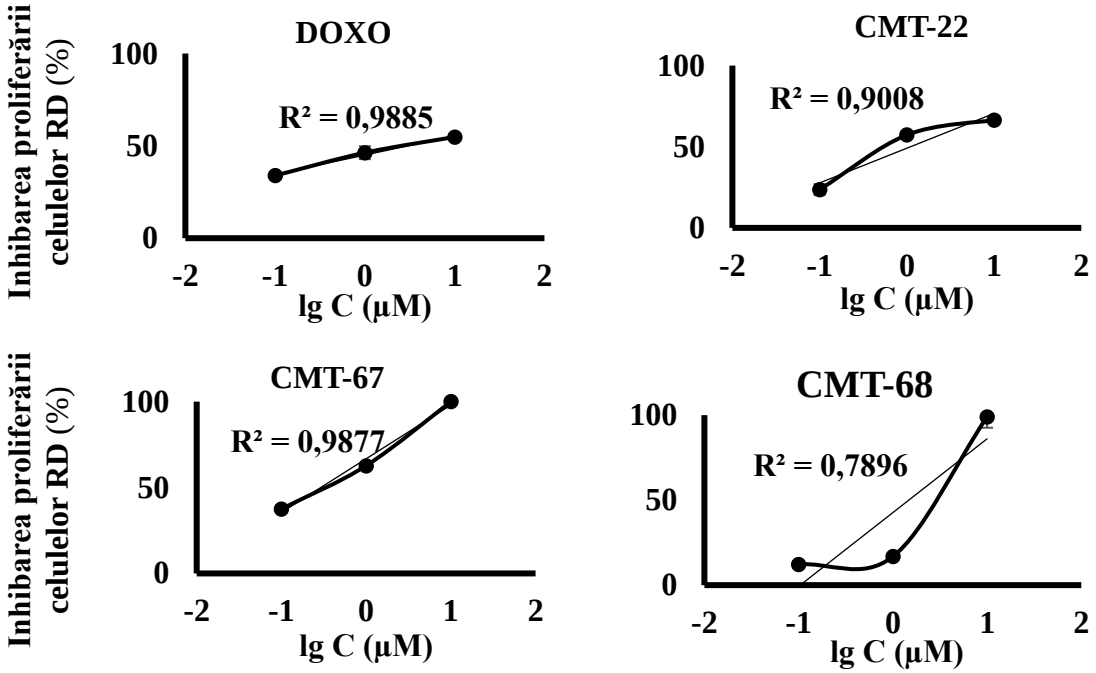


Fig. 4. Efectul inhibitor al DOXO, cisplatinei, CMT-22, CMT-67 și CMT-68 asupra proliferării liniei RD. Celulele RD au fost tratate cu DOXO, CMT-22, CMT-67 și CMT-68 de 0.1, 1 și 10 μM timp de 24 ore. Valorile sunt reprezentate ca media ± SD a 3 replici.

Complecșii CMT-67 și CMT-68 depășesc activitatea antiproliferativă a CDDP și DOXO față de celulele canceroase MeW-164, HeLa, BxPC-3, RD, iar tiosemicarbazona CMT-22 manifestă activitate antiproliferativă numai față de celulele MeW-164, HeLa și RD [11].

Din literatura de specialitate se cunoaște că, de regulă, medicamentele chimioterapeutice anticancer posedă un efect citotoxic ridicat asupra celulelor normale, ceea ce duce la reacții adverse grave, care pot fi fatale. Din aceste considerente, am exploatat celulele normale epiteliale ale liniei MDCK pentru evaluarea selectivă a citotoxicității.

După cum observăm din figura 5, tiosemicarbazona CMT-22 în intervalul de concentrații de la 0,1 μM până la 100 μM nu manifestă activitate inhibitoare asupra proliferării celulare, ci, dimpotrivă, sporește efectul proliferativ, ce indică proprietățile sale non-toxice în raport cu linia celulară MDCK. Efectul de proliferare a celulelor MDCK s-a manifestat la concentrații scăzute a tiosemicarbazonei HL, posibil datorită gradului de disociere, care este crescut la concentrații mai

mici. O creștere a concentrației substanței până la 100 μM conduce la un efect inhibitor cu 12,5±1,8%.

Compușii complecși testați CMT-67 și CMT-68 inhibă formarea și creșterea liniilor celulare MDCK, cu valorile IC_{50} de 4,0±0,1 μM și 12,0±0,9 μM, respectiv. Controlul pozitiv DOXO a demonstrat efectul citotoxic în raport cu liniile celulare MDCK, cu valorile IC_{50}=7,0±0,3 μM.

Identificarea de noi compuși care manifestă selectivitate pentru celulele canceroase, dar nu și pentru celulele normale este o provocare majoră în cercetarea medicamentelor anticancer [12].

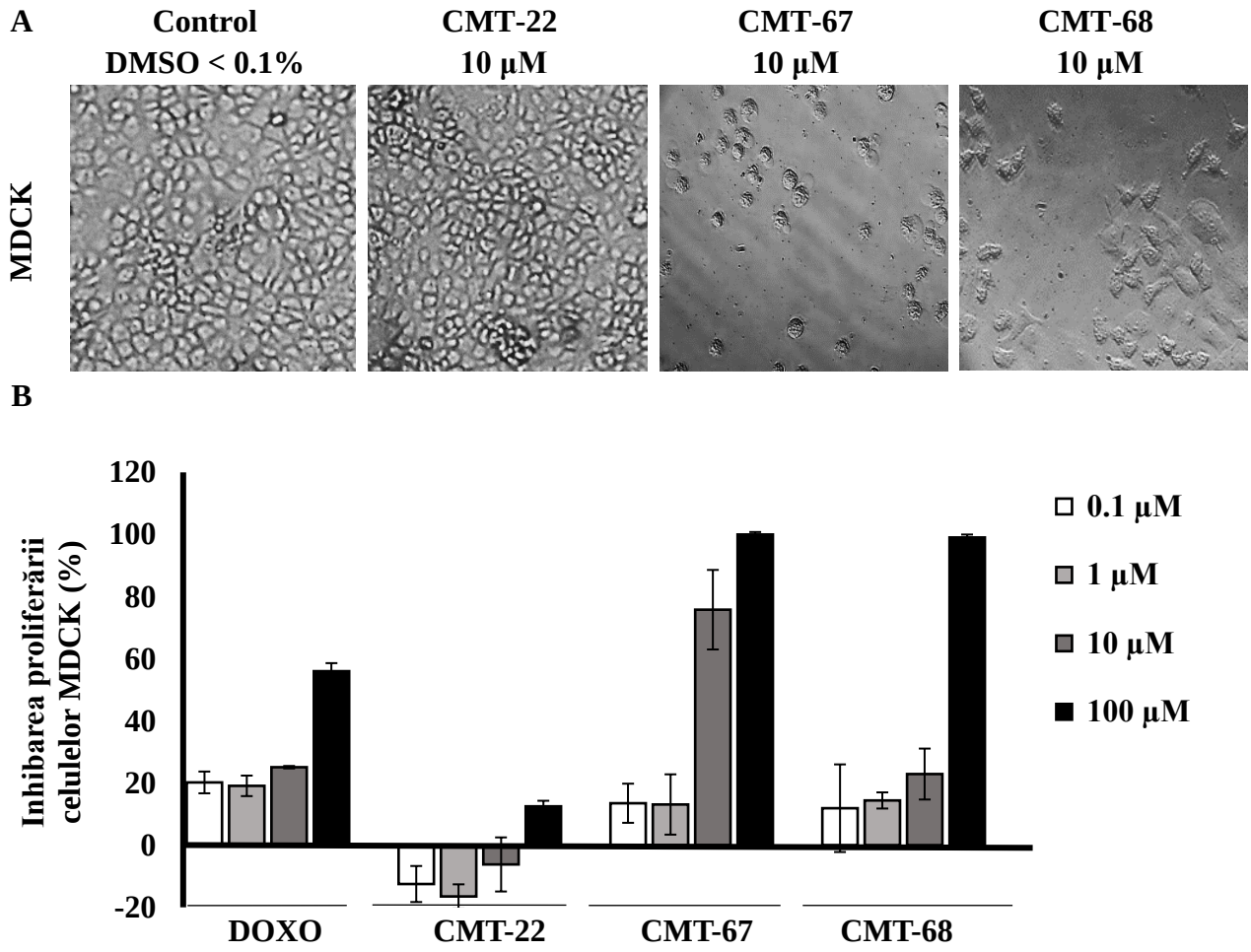


Fig. 5. Activitatea antiproliferativă a controlului pozitiv DOXO și a compușilor testați pe celulele normale ale liniei MDCK. A: Imagini cu contrast de fază ale celulelor MDCK după 24 de ore de tratament cu compușii testați de 10 μM. Celulele MDCK netratate au servit drept control. B: Efectul nefrocitotoxic *in vitro* al DOXO, CMT-22, CMT-67, CMT-68 asupra celulelor MDCK după expunerea de 24 ore. Valorile sunt reprezentate ca media ± SD a 3 replici.

Astfel, s-au estimat indicii de selectivitate (IS) ai compușilor testați (Tabelul 1). Pentru de comparație, citotoxicitatea DOXO ca preparat medicamentos antitumoral de referință, de asemenea, a fost evaluată în aceleași condiții. IS ale DOXO, CMT-67 și CMT-68 variază în intervalul 0,7–3,0; 1,9–14,8 și 7,1–30,0, respectiv. Tiosemicarbazona CMT-22 a prezentat

citotoxicitate selectivă pentru liniile de cancer BxPC-3, RD, HeLa și MeW-164, cu indicele de selectivitate ≥10**;** ≥91**;** ≥12 și ≥40, respectiv [13].

Rezultatele obținute confirmă faptul, că toți compușii testați demonstrează o activitate selectivă mai înaltă decât DOXO în liniile de celule testate. Concomitent s-a elucidat, că CMT-22 posedă cea mai înaltă citotoxicitate selectivă, ceea ce prezintă un aspect important în chimioterapia personalizată. Evident, coordonarea tiosemicarbazonei CMT-22 la centrul metalic conduce la o sporire marcată a activității sale antiproliferative.

Trebuie de menționat că tiosemicarbazona CMT-22 inhibă discret proliferarea celulelor canceroase doar la o concentrație de 10 μM. Introducerea acestuia în calitate de ligand în compușii complecși conduce la o creștere a activității anticancer. Principala influență asupra activității anticancer a complexului este exercitată de natura atomului central. Astfel, coordonarea la ionul de cupru(II) conduce la inhibarea creșterii și divizării celulelor canceroase la un interval de concentrație de 10,0–0,4 μM. Din literatura de specialitate se cunoaște că introducerea aminelor în sfera internă a complecșilor de cupru(II) cu diferite azometine are ca rezultat o creștere a activității lor anticancer [3]. Complexul de cupru(II) cu liganzi micști CMT-68 confirmă acest fapt.

Tabelul 1. Indicii de selectivitate a compușilor testați CMT-22, CMT-67, CMT-68 și controlului pozitiv DOXO asupra celulelor canceroase ale liniilor BxPC-3, RD, HeLa, MeW-164 și celulelor normale a liniei MDCK.

Compusul	IS_1	IS_2	IS_3	IS_4
DOXO	1,3	3,0	0,7	0,95
CMT-22	≥10	≥91	≥12	≥40
CMT-67	6,7	14,8	1,9	4,0
CMT-68	7,1	9,2	30,0	12

Notă: Valoarea IC_{50} este concentrația inhibiției proliferării celulare cu 50%. Valoarea IS este indicele de selectivitate. IS_1 al fiecărui compus a fost calculat ca raportul dintre IC_{50} pentru celulele MDCK / IC_{50} pentru celulele canceroase din linia BxPC-3; $SI_2=IC_{50}$ MDCK / IC_{50} RD; $SI_3=IC_{50}$ MDCK / IC_{50} HeLa; $SI_4=IC_{50}$ MDCK / IC_{50} MeW-164. Substanțele cu un IS>3 sunt considerate promițătoare.

3.2. Activitatea antiproliferativă *in vitro* a compușilor testați CMJ-23 și CMJ-33 pe diferite linii de celule canceroase

Activitatea antiproliferativă a compușilor testați CMJ-23 și CMJ-33 a fost determinată pe celulele MeW-164, folosind testul citotoxic cu ajutorul citometriei fluorescente cu flux Nucleo Counter [14].

Studiul activității antiproliferative a relevat că există o dependență dintre efectele inhibitoare şi concentrația compușilor testați la intervalul micromolar. Efectul inhibitor a fost prezentat într-un mod dependent de doză. S-a constatat că valorile IC_{50} sunt 0.40±0.02 μM pentru CMJ-23 și 0,20±0,01 μM pentru CMJ-33. Astfel, ambii compuși au demonstrat o activitate antiproliferativă ridicată față de linia MeW-164, iar complexul de cupru(II) CMJ-33 este cu 50% mai activ decât ligandul său CMJ-23 (Tabelul 2).

De asemenea, studiul comparativ al activității citotoxice a compușilor testați CMJ-23, CMJ-33 și controlului pozitiv DOXO, în raport cu celulele HeLa, BxPC-3 și RD sunt prezentate

în tabelul 2. Viabilitatea celulelor canceroase HeLa, BxPC-3, RD și a celulelor normale MDCK a fost evaluată cu ajutorul indicatorului redox - rezazurinul, ceea ce ne-a permis să determinăm numărul de celule viabile.

Citotoxicitatea compusului testat CMJ-23 în raport cu liniile de celule BxPC-3 și RD se manifestă prin valorile IC_{50} de 2,5±0,7 μM și 0,30±0,04 μM, respectiv. Totuși, compusul CMJ-23 a fost semnificativ mai puțin toxic, având o valoare IC_{50} de 18,7±1,0 μM față de celulele HeLa. În schimb, complexul CMJ-33 a demonstrat o toxicitate puternică pentru liniile de celule BxPC-3, RD, HeLa cu valorile IC_{50} de 0,10±0,04 μM, 0,20±0,03 μM și 0,40±0,02 μM, respectiv. Controlul de referință DOXO a manifestat o activitate citotoxică în raport cu liniile celulare BxPC-3, RD și HeLa, cu valorile IC_{50} de 6,0±0,8 μM, 2,3±0,9 μM și 6,2±1,0 μM, respectiv.

Tabelul 2. Activitatea antiproliferativă a controlului pozitiv DOXO și a compușilor testați CMJ-23, CMJ-33 pe liniile canceroase BxPC-3, RD, HeLa și MeW-164

	IC_{50} (μM)			
Compusul	**BxPC-3**	**RD**	**HeLa**	**MeW -164**
DOXO	6,0±0,8	2,3±0,9	6,2±1,0	7,3±0,9
CMJ-23	2,5±0,7	0,30±0,04	18,7±1,0	0,40±0,02
CMJ-33	0,10±0,04	0,20±0,03	0,40±0,02	0,20±0,01

Astfel, compusul complex de cupru(II) CMJ-33 manifestă o activitate inhibitoare mai puternică asupra proliferării celulelor canceroase, comparativ cu controlul de referință DOXO. Cu toate acestea, activitatea antiproliferativă a CMJ-23 este comparabilă cu cea a DOXO. Evident, coordonarea moleculelor organice la centrul metalic conduce la o creștere semnificativă a activității lor biologice.

Întrucât principalul dezavantaj al compușilor cu proprietăți anticancer este toxicitatea lor, pentru compușii testați este necesar să se determine selectivitatea acțiunii citotoxice. În acest scop, efectul citotoxic al acestor substanțe a fost studiat asupra celulelor normale MDCK. Studiul comparativ și valorile concentrației de identificare a activității proliferative a compușilor testați CMJ-23, CMJ-33 și a controlului de referință DOXO în raport cu celulele normale ale liniei MDCK sunt prezentate în figura 6.

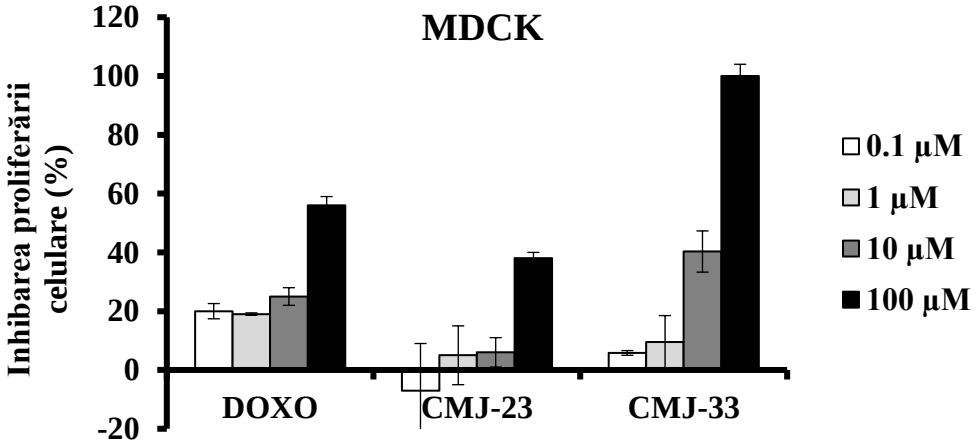


Fig. 6. Activitatea antiproliferativă a controlului pozitiv DOXO și a compușilor testați CMJ-23, CMJ-33 pe celulele normale ale liniei MDCK. Valorile sunt reprezentate ca media ± SD a 3 replici.

S-a stabilit că, compușii testați CMJ-23 și CMJ-33 au manifestat o activitate citotoxică scăzută față de celulele MDCK, cu IC_{50} ≥100 μM. Controlul pozitiv DOXO a prezentat citotoxicitate față de celulele MDCK cu IC_{50} de 7,0±0,3 μM.

Concomitent s-a constatat faptul că, activitatea citotoxică a compușilor testați CMJ-23 și CMJ-33 asupra liniei de celule MDCK este semnificativ mai scăzută decât cea exercitată asupra celulelor tumorale și mai diminuată decât cea exercitată de DOXO (Tabelul 3).

Indicele de selectivitate, care este raportul dintre valoarea IC_{50} pentru celulele MDCK și valorile IC_{50} pentru celulele canceroase variază în intervalul 0,96–3,04 pentru DOXO și 28-110 pentru CMJ-33. Tiosemicarbazona CMJ-23 a prezentat citotoxicitate selectivă pentru liniile de cancer BxPC-3, RD, HeLa și MeW-164 cu un indice de selectivitate (IS) ≥40**;** ≥330**;** ≥5.3 și ≥250, respectiv. Important este că, toți compușii testați demonstrează selectivitate mai mare decât DOXO în toate liniile de celule testate.

Un experiment suplimentar care vizează evaluarea efectului nefrocitotoxic asupra celulelor epiteliale renale normale ale liniei MDCK a relevat faptul că compusul CMJ-23 este semnificativ mai puțin toxic decât compusul CMJ-33, ceea ce reprezintă un aspect important în chimioterapia personalizată.

Tabelul 3. Indicele de selectivitate (IS) al compușilor testați CMJ-23, CMJ-33 și a controlului pozitiv DOXO asupra liniilor de celule canceroase BxPC-3, RD, HeLa, MeW-164 și liniei de celule normale MDCK.

Compusul	IS_1	IS_2	IS_3	IS_4
DOXO	1,2	3,04	1,13	0,96
CMJ-23	≥40	≥330	≥5,3	≥250
CMJ-33	110	55	28	55

Notă: IS_1 al fiecărui compus a fost calculat ca raportul dintre IC_{50} pentru celulele MDCK / IC_{50} pentru celulele canceroase din linia BxPC-3; $SI_2=IC_{50}$ MDCK / IC_{50} RD; $SI_3=IC_{50}$ MDCK / IC_{50} HeLa; $SI_4=IC_{50}$ MDCK / IC_{50} MeW-164.

3.3. Capacitatea compușilor testați de a induce fragmentarea ADN-ului *in vitro*

Actualmente, remediile anticancer utilizate s-au dovedit a induce apoptoza în celulele sensibile. Apoptoza este un proces important al multor afecțiuni patologice. Principiul apoptozei a fost descris de Vogt care îl prezintă ca o moarte programată a celulelor, ce poate apărea chiar și în organismele multicelulare. În timpul apoptozei, au loc diverse modificări biochimice, cum ar fi pierderea asimetriei și atașării membranei celulare, contracției celulare, fragmentării nucleare, condensării cromatinei și fragmentării ADN-ului cromozomial. Fragmentarea ADN-ului are loc în etapa finală a apoptozei, care include activarea nucleazelor dependente de calciu și magneziu care degradează ADN-ul genomic.

Celulele epiteliale ale colului uterin uman ale liniei HEp-2 au fost tratate cu CMT-22, CMT-67, CMT-68, CMJ-23 și CMJ-33 de 5 μM timp de 24 ore. În scopul studiului substanțelor privind fragmentarea ADN-ului, s-a utilizat o concentrație de 5 μM, care reprezintă IC_{50} medie (μM) a tuturor compușilor testați pe celulele liniei HeLa. Compușii testați CMT-22, CMT-67, CMT-68, CMJ-23 și CMJ-33 au fost raportați de a induce fragmentarea ADN-ului în celulele canceroase. Aceste rezultate precum și resultate obținute prin metoda de citometrie fluorescentă

de flux au furnizat dovezi că compușii testați CMT-22, CMT-67, CMT-68, CMJ-23 și CMJ-33 induc stoparea ciclului celular și apoptoza în celule.

Compușii testați CMJ-23 și CMJ-33 au demonstrat o capacitate promițătoare de clivare a ADN-ului genomic. Astfel, compușii testați au manifestat o activitate antiproliferativă sporită, asociată cu inducerea crescută a apoptozei, scindând structurile ADN-ului genomic din nucleul celular, ceea ce este semnificativ de important, deoarece moartea celulară este scopul farmacologic care stă la baza chimioterapiei. Perturbarea căilor apoptotice, semnul distinctiv al cancerului, este un obstacol major în chimioterapie.

Un studiu magnetochimic a substanțelor testate a arătat că ele posedă un moment magnetic caracteristic unui electron necuplat, ceea ce indică structura lor monomerică. Din literatura de specialitate se cunoaște că compușii cu o structură monomerică sunt capabili să intercaleze între bazele azotate ale acizilor nucleici, ceea ce provoacă apoptoza celulară [7].

Probabil, capacitatea de a induce un efect apoptotic ridicat al complexului de cupru(II) cu liganzi micști CMT-68 la concentrația de 5 μM a rezultat din proprietățile mediului de liganzi, deci prezența unei grupări amino suplimentare de 4-aminobenzensulfonamida în sfera internă a complexului de cupru(II) face mai ușoară interacțiunea cu atomii canelurilor moleculelor de ADN în momentul replicării sau transcripției.

Posibil, o activitate antiproliferativă mult mai sporită a compușilor coordinativi de cupru poate fi cauzată și de coordonarea CMT-22 cu atomul central de cupru, ceea ce conduce la o schimbare a densității electronilor în partea tiosemicarbazonei. Deci, atomul de cupru în acest compus coordinativ are posibilitatea de a coordona moleculele de ADN. În baza analizelor RMN şi cu raze X a fost stabilit că thiosemicarbazonele interacţionează cu fragmentul ADN (guanina) formând legături de hidrogen, ceea ce cauzează fragmentarea ADN şi, în final, apoptoza.

4. STUDIUL MECANISMULUI DE ACȚIUNE ȘI REACȚIILE ADVERSE ALE NOILOR INHIBITORI DE CELULE CANCEROASE ORGANICI ȘI ORGANOMETALICI ASOCIATE CU STRESSUL OXIDATIV

Radicalii liberi sunt implicați în declanșarea mai multor boli de deteriorare oxidativă, cum ar fi ciroza hepatică, ateroscleroza, cancerul, diabetul. Un antioxidant poate fi definit ca orice substanță care, atunci când este prezent în concentrații scăzute în comparație cu cele ale unui substrat oxidabil, poate inhiba oxidarea lipidelor, proteinelor sau a altor molecule, împiedicând inițierea sau propagarea reacțiilor oxidative în lanț și poate astfel preveni sau repara deteriorarea realizată de către radicalii de oxigen celulelor corpului.

Tiosemicarbazonele și antioxidanții săi din complexele metalice recent au focusat atenția pentru capacitatea lor de a proteja organismul și celulele de daunele induse de stresul oxidativ sau de radicalii liberi [15]. Acești compuși, care manifestă o activitate biologică considerabilă, pot reprezenta o abordare interesantă în crearea de noi medicamente anticancer [16].

Cu scopul de a exclude eventuala prezență a reacțiilor adverse concomitente asociate cu stresul oxidativ, compușii testați: tiosemicarbazona (CMT-22), complexul de cupru(II) CMT-67, complexul de cupru(II) cu liganzi micști (CMT-68) și complexul de cupru(II) CMJ-33 cu ligandul său CMJ-23 au fost cercetați cu ajutorul mai multor teste de capacitate antioxidantă, precum $ABTS^{\bullet+}$, $DPPH^{\bullet}$, ORAC și LOX [17]. Capacitatea antioxidantă a compușilor testați a fost comparată cu remediul anticancer aprobat de FDA - doxorubicina (DOXO), și antioxidanții de referință troloxul și rutina. Se cunoaște că, cardiomiopatia indusă de doxorubicină poartă un

prognostic slab și este frecvent fatală. Doxorubicina induce leziuni toxice mitocondriilor cardiomiocitelor contribuind astfel la creșterea stresului oxidativ.

Hemoliza indusă de tratament și formarea methemoglobinei se întâlnește relativ rar, dar cu o toxicitate gravă cauzată de stresul oxidativ, astfel încât compușii CMT-22, CMT-67, CMT-68, CMJ-33 și CMJ-23 au fost testați la hemoliza toxică și formarea methemoglobinei în eritrocitele umane.

În cele din urmă, evaluarea toxicității directe a CMT-22, CMT-67, CMT-68, CMJ-33 și CMJ-23 și a DOXO a fost studiată cu ajutorul testului NR- colorimetric al cuantificării permeabilității membranei și a activității lizozomale a *Paramecium caudatum*, care este unul dintre cele mai utilizate obiecte de testare în cercetarea de laborator care vizează determinarea directă a toxicității compușilor chimici, utilizați în medicina toxicologică [18].

4.1. Activitatea compușilor testați de înlăturare a radicalilor $ABTS^{\bullet+}$ și $DPPH^{\bullet}$

Testele $ABTS^{\bullet+}$ și $DPPH^{\bullet}$ sunt metode utilizate pe scară largă pentru evaluarea *in vitro* a capacității antioxidante totale ale compușilor anticancer.

Conform acestui studiu, compușii testați au fost capabili să înlăture radicalul $ABTS^{\bullet+}$ într-o manieră dependentă de concentrație. Compușii testați CMT-22, CMT-67, CMT-68, CMJ-33, CMJ-23, precum și DOXO, trolox și rutina au fost testați la activitatea de eliminare a radicalilor liberi prin metoda $ABTS^{\bullet+}$. Coordonarea ionilor de cupru(II) la tiosemicarbazona CMT-22 a condus la o activitate mai înaltă comparativ cu cea a compușilor antioxidanți de referință utilizați (troloxul, rutina) și DOXO. Compușii testați au prezentat o activitate de scavenger moderată până la înaltă, decât compușii antioxidanți de referință rutina și troloxul la cea mai scăzută concentrație de 1 μM. Valorile IC_{50} ale compușilor testați sunt enumerate în tabelul 4, compusul CMT-68 posedând cea mai înaltă capacitate (IC_{50} = 0,67 ± 0,01 μM), urmată de CMT-67, CMJ-23, CMJ-33, CMT-22 cu IC_{50} de 4,9 ± 0,1 μM, 6,20 ± 0,01 μM, 11,4 ± 0,4 μM, 14,9 ± 1,4 μM, respectiv.

S-a constatat că compușii de referință troloxul, rutina, DOXO au manifestat activitate antioxidantă, cu IC_{50} de 26,9±0,7 μM, 20,7±0,1 μM și 11,5±0,6 μM, respectiv. Capacitatea de scavenger a cationului radical $ABTS^{\bullet+}$ a compușilor testați și de referință poate fi aranjată în ordinea CMT-68 ≥ CMT-67 ≥ CMJ-23 ≥ CMJ-33 ≥ DOXO ≥ CMT-22 ≥ rutina ≥ troloxul. Analizând rezultatele metodei $ABTS^{\bullet+}$, s-a relevat că compușii cercetați au manifestat cea mai puternică activitate antioxidantă, comparativ cu troloxul și rutina. Activitatea antioxidantă crescută a compușilor complecși CMT-68 și CMT-67 poate fi atribuită efectului de retragere a electronului ionului de Cu(II) care facilitează eliberarea de hidrogen pentru a reduce radicalul $ABTS^{\bullet+}$.

Modificările examinate și comparate ale capacității de scavenger a radicalului liber $DPPH^{\bullet}$ sub influența CMT-22, CMT-67, CMT-68, CMJ-33 și CMJ-23, precum și a DOXO, troloxului, rutinei pe baza IC_{50} sunt reprezentate în tabelul 4. S-a constatat că liganzii liberi CMT-22 și CMJ-23 posedă o activitate mai înaltă decât complexele de cupru(II). La concentrația cea mai ridicată, 100 μM, activitatea antioxidantă a liganzilor liberi s-a dovedit a fi 57,1±0,5% pentru CMT-22 și 61,7±0,8% pentru CMJ-23, dar la formarea complexelor, s-a modificat în intervalul 32,4% - 54,1% .

S-a relatat că efectul inhibitor al compușilor asupra procentajului activității de scavenger a $DPPH^{\bullet}$ a fost într-o manieră dependentă de concentrație. Activitatea antioxidantă a compușilor

testați CMT-22, CMT-67, CMT-68, CMJ-33 și CMJ-23 poate fi atribuită efectului eliberării de hidrogen pentru a reduce radicalul DPPH$^{\bullet}$. Această eliberare de protoni a fost pronunțată la tiosemicarbazona CMT-22, cu valoarea IC_{50} de 72,7±0,5 μM, urmată de CMT-67 cu IC_{50} de 83,1±1,3 μM, CMT-68 cu IC_{50} de 133,0±2,5 μM, CMJ-23 cu IC_{50} de 48,3±0,8 μM și CMJ-33 cu IC_{50} de 139,0±2,5 μM. Prin analiza comparativă a compușilor testați, remediul anticancer DOXO și compușii antioxidanți de referință troloxul și rutina au fost stabilite valorile IC_{50} de ≥100 μM, 48,9±0,8 μM și 64,8±2,1 μM, respectiv. Capacitatea de scavenger a radicalului DPPH$^{\bullet}$ a compușilor poate fi astfel aranjată în ordinea: CMJ-23 ≥ troloxul ≥ rutina ≥ CMT-22 ≥ CMT-67 ≥ CMT-68 ≥ CMJ-33 ≥ DOXO.

Tabelul 4. Influența compușilor testați și controalelor de referință pentru radicalii liberi ABTS$^{\bullet+}$ și DPPH$^{\bullet}$

Compusul	Activitatea de scavenger a cationului radicalic ABTS$^{\bullet+}$	Activitatea de scavenger a cationului radicalic DPPH$^{\bullet}$
	IC_{50} (μM) ±SD	IC_{50} (μM) ±SD
Trolox	26,9±0,7	48,9±0,8
Rutina	20,7±0,1	64,8±2,1
DOXO	11,5±0,6	≥100
CMT-22	14,9±1,4	72,7±0,5
CMT-67	4,9±0,1	83,1±1,3
CMT-68	0,67±0,01	133,0±2,5
CMJ-23	6,20±0,01	48,3±0,8
CMJ-33	11,4±0,4	139,0±2,5

S-a relevat că înlăturarea radicalului DPPH$^{\bullet}$ de către compușii studiați s-a dovedit a fi moderată în comparație cu cea a radicalului cation ABTS$^{\bullet+}$. Inhibarea sporită manifestată pe radicalul cation ABTS$^{\bullet+}$ de către probele testate estimează că compușii sunt capabili să doneze electroni pentru a neutraliza radicalii liberi, ceea ce indică potențialul lor ca agenți chimioterapeutici pentru întreruperea lanțurilor radicalice.

4.2. Capacitatea de absorbție a radicalilor de oxigen (RO) a compușilor testați

Testul ORAC determină capacitatea de rupere a lanțului radicalic al antioxidanților prin monitorizarea inhibării oxidării induse de radicalul peroxil. Radicalii peroxidici sunt radicalii liberi predominant implicați în oxidarea lipidelor în sistemele biologice în condiții fiziologice. Prin urmare, valorile ORAC sunt considerate de relevanță biologică ca fiind de referință pentru eficacitatea antioxidanților. În acest test, radicalul peroxil produs de un generator reacționează cu o probă fluorescentă care conduce la degradarea fluorescenței, care este înregistrată cu un cititor al microplăcii fluorescente. Un set de curbe de degradare a fluorescenței pot fi construite în absența sau prezența antioxidanților, iar zona integrată netă sub curbele de degradare (câștigul de suprafață în prezența antioxidanților în comparație cu cel al unui control fără antioxidanți) poate fi calculat ca un indice al capacității de înlăturare a radicalilor peroxil ai antioxidanților.

Proprietățile antioxidante ale compușilor testați CMT-22, CMT-67, CMT-68, CMJ-33, CMJ-23, preparatul anticancer DOXO și controlul antioxidant de referință troloxul au fost

determinate ca panta (m) a curbei de regresie liniară. Valorile pantei (m) sunt 3,4 (CMT-22)**;** 3,5 (CMT-67)**;** 3,6 (CMT-68)**;** 3,7 (CMJ-23)**;** 3,6 (CMJ-33)**;** 0,5 (DOXO) și 1,2 (trolox). Echivalenții calculați ai troloxului au fost utilizați pentru analiza comparativă a capacității antioxidante a compușilor testați și a remediului anticancer DOXO. Analizând rezultatele testului ORAC s-a constatat că valorile TE (echivalentului trolox) sunt 2,8 (CMT-22)**;** 2,9 (CMT-67)**;** 3,0 (CMT-68)**;** 3,1 (CMJ-23)**;** 3,0 (CMJ-33)**;** 0,4 (DOXO) [19] .

Capacitatea antioxidantă a compușilor față de RO compușilor poate fi astfel aranjată în următorul ordin: CMJ-23 ≥ CMJ-23 = CMT-68 ≥ CMT-67 ≥ CMT-22 ≥ DOXO ≥ trolox. Astfel, s-a relevat că compușii testați au manifestat o capacitate de absorbție a radicalilor liberi de oxigen mai înaltă, în comparație cu DOXO.

4.3. Activitatea antilipoxigenazică a compușilor testați

Lipoxigenazele (LOX) sunt enzime implicate în convertirea acidului arahidonic, linoleic și alți acizi grași polinesaturați în metaboliți biologic activi care sunt implicați în procesele inflamatorii și imune. LOX joacă, de asemenea, un rol semnificativ în creșterea celulelor canceroase, metastază, invazie, supraviețuirea celulelor și inducerea factorului de necroză tumorală alfa (TNF-α) (Arfan și colab., 2010). Inflamația este favorabilă în majoritatea cazurilor, deoarece este o reacție de răspuns defensiv al organismului la stimuli externi; uneori, inflamația este, de asemenea, dăunătoare, cum ar fi atacurile asupra țesuturilor proprii ale organismului. S-ar putea ca inflamația să fie un proces unificat de afectare și rezistență la leziune. Inflamația provoacă dureri extreme pacienților, prezentând simptome de umflare, febră, durere și disfuncție. În acest aspect, ar trebui să fie cercetate proprietățile medicale ale compușilor testați asupra activității biologice pentru a contracara răspunsul inflamator, fără reacții adverse și cu viabilitate economică ridicată.

În acest aspect, în studiul dat a fost evaluată capacitatea compușilor studiați CMT-22, CMT-67, CMT-68, CMJ-33, CMJ-23, precum și a preparatului anticancer DOXO de a inhiba activitatea lipoxigenazei [20].

Quercetina a fost utilizată în calitate de control pozitiv. Compușii testați CMT-22, CMT-67, CMT-68, CMJ-33 și CMJ-23 au fost capabili să inducă inhibarea LOX de soia într-o manieră dependentă de doză, cu valorile IC_{50} de 0,20±0,02 μM**;** 0,40±0,05 μM**;** 0,30±0,06 μM, 0.30±0.02μM și, respectiv, 0,30±0,01μM. În schimb, valorile IC_{50} pentru testul de control pozitiv quercetină și remediul anticancer DOXO au atins valori de 15,6±1,6 μM și 5,6±0,3 μM. Astfel, aceste date sugerează că compușii testați reprezintă inhibitori puternici ai activității LOX (Tabelul 5).

Analizând proprietățile antioxidante ale compușilor testați CMT-22, CMT-67, CMT-68, CMJ-23 și CMJ-33 prin testele LOX, putem constata că ei reprezintă inhibitori puternici reducători și au manifestat rezultate mai promițătoare, comparativ cu DOXO și quercetina. Lipoxigenaza joacă un rol major în multe afecțiuni inflamatorii pulmonare, inclusiv afecțiunea pulmonară obstructivă cronică, astmul și bronșita cronică. Expresia excesivă a LOX este legată de unele carcinoame specifice, incluzând tumorile pancreatice, gastrice și cerebrale. Prin urmare, identificarea unor inhibitori puternici ai LOX sunt necesari pentru descoperirea preparatelor medicamentoase noi. Compusul testat CMT-22 a manifestat un potențial inhibitor excelent pentru LOX. Compușii cercetați au demonstrat un potențial puternic de inhibiție a activității

LOX, ceea ce deschide perspectiva pentru a fi elaborați ca noi remedii medicamentoase antiinflamatoare.

Tabelul 5. IC_{50}, procentajul de inhibiție a activității lipoxigenazei compușilor testați CMT-22, CMT-67, CMT-68, CMJ-33, CMJ-23 (în calitate de control pozitiv au fost utilizate quercetina și remediul anticancer DOXO).

	% inhibiție media ± SD			
Compusul	**0,05 μM**	**0,5 μM**	**5 μM**	**IC_{50}**
Quercetina	20,0±1,5	28,0±2.1	50,0±0.8	15,6±1,6
DOXO	34,5±0,5	37,0±1.0	40,0±1.0	5,6±0,3
CMT-22	48,5±0,5	52,5±2,5	61,0±1,0	0,20±0,02
CMT-67	44,2±1,5	53,1±0,5	77,6±1,9	0,40±0,05
CMT-68	48,4±0,5	53,1±0,4	58,1±0,9	0,30±0,06
CMJ-33	46,0±1,0	54,0±0,4	61,0±1,2	0,30±0,02
CMJ-23	42,0±0,2	54,0±0,9	70,0±0,7	0,30±0,01

4.4. Impactul compușilor testați asupra formării methemoglobinei

Studiile asupra mecanismelor care stau la baza proceselor biochimice de perturbare a funcției de transport a oxigenului din sânge reprezintă o sarcină urgentă a biologiei și medicinei moderne.

Una dintre principalele verigi în lanțul tulburărilor metabolice ale sistemului de transport al oxigenului din sânge este reacția de transformare a hemoglobinei în forma sa inactivă - methemoglobina. În acest aspect, este necesară identificarea metodelor și mijloacelor de corectare a acestor leziuni, care cresc eficiența proceselor redox de reducere a methemoglobinei.

În sângele unei persoane sănătoase, conținutul de methemoglobină nu depășește 3-4%, ceea ce este atins prin echilibrul dintre reacțiile de formare a acesteia și reacțiile de reducere a methemoglobinei. Dacă conținutul de methemoglobină din sânge depășește 3%, aceasta reprezintă methemoglobinemia. Multe substanțe medicale, în special la utilizarea îndelungată în doze mari, pot provoca methemoglobinemie. Cu toate acestea, la majoritatea oamenilor metHb este restabilită în Hb după sistarea tratamentului sub influența methemoglobin-reductazei [21]. Orice methemoglobinemie se bazează pe hipoxia acută sau cronică datorită scăderii saturației de oxigen a sângelui arterial. Mai mult decât atât, methemoglobina nu numai că nu participă în transportul oxigenului, dar și agravează funcția de transport a oxihemoglobinei existente.

Severitatea simptomelor depinde de conținutul de methemoglobină din sânge. Cianoza apare la aproximativ 15-30% metHb și hipoxia tisulară poate apărea pe măsură ce nivelurile cresc în continuare. Nivelurile de metHb de 70% pot fi fatale [22].

Eritrocitele conțin sisteme endogene enzimatice și non-enzimatice de methemoglobin reductază. Principalul sistem de protecție împotriva agenților oxidanți, care permite menținerea fracției de hemoglobină la subiecții sănătoși la nivelul de 1,0-1,5 %, include trei componente: nicotinamid adenin dinucleotidul redus (NAD-H), hemoproteincitochromul b5 care conține heme și enzima citocrom b5 reductaza. Donatorul de electroni este produsul glicolizei NAD-H. Un electron este transferat de la NAD-H la citocromul b5 și, în final, la methemoglobină. Transportul electronilor este catalizat de enzima citocrom b5 reductaza. Acest mecanism este responsabil pentru restabilirea a 99% de hemoglobină din methemoglobină. O altă modalitate de

a restabili hemoglobina, asociată cu activitatea NADP-methemoglobin-reductazei, în condiții normale, are un efect redus. Rolul său crește în caz de deficiență de citocrom b5 reductază.

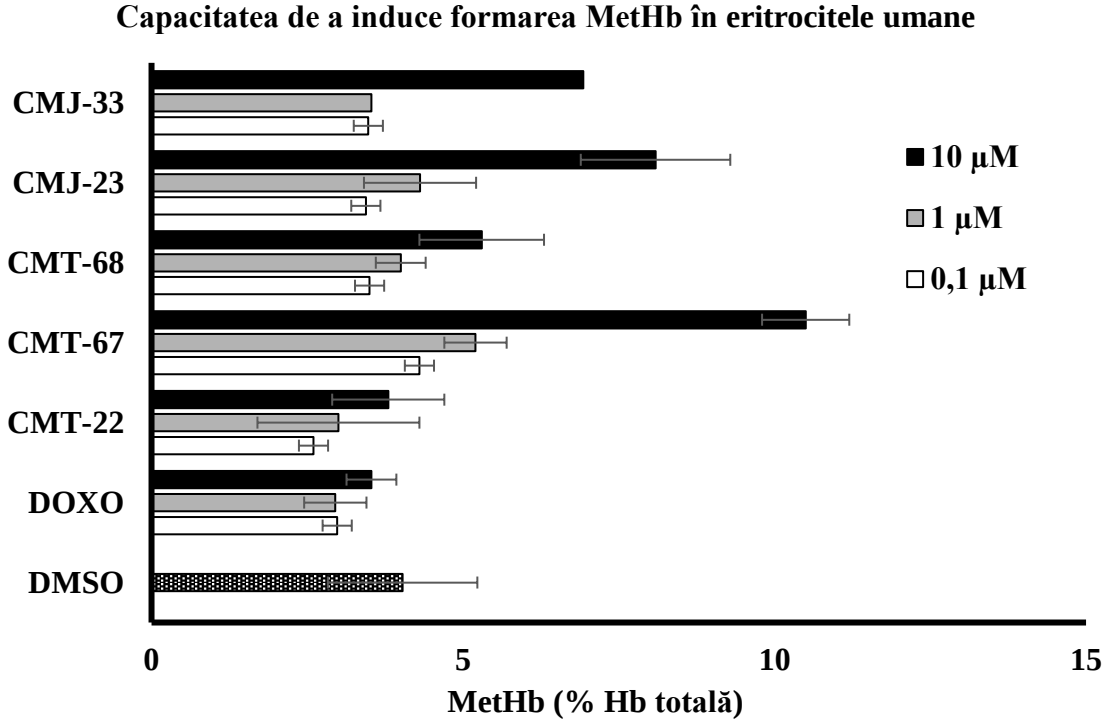


Fig. 7. Efectul compușilor testați CMT-22, CMT-67, CMT-68, CMJ-23, CMJ-33 și a controlului anticancer DOXO asupra formării metHb *in vitro.* Valorile sunt reprezentate ca media ± SD a 3 replici.

Astfel compușii studiați au fost testați la formarea de methemoglobină în eritrocitele umane, deoarece aceasta reprezintă un efect toxic semnificativ. Studiul dat al compușilor testați CMT-22, CMT-67, CMT-68, CMJ-23 și CMJ-33 a relevat un rezultat eficient, care nu a depășit valorile admisibile în intervalul de concentrație de 1-10 μM.

Nu s-au observat fluctuații semnificative în formarea metHb după expunerea eritrocitelor la diferite concentrații ale compușilor testați. Astfel, administrarea a 10 μM de CMT-22, CMT-67, CMT-68, CMJ-23, CMJ-33 și DOXO a indus formarea de metHb de 3,8±0,5%, 10,5±0,6%, 5,3±0,8%, 8,1±1,2%, 6,9±0,6% și 3,0±0,5%, respectiv (Figura 7).

Studiul asupra compușilor testați a estimat rezultate, care nu au depășit valorile admisibile în intervalul de concentrație terapeutică [23].

4.5. Impactul compușilor testați asupra hemolizei eritrocitelor

Procesul de hemoliză se caracterizează printr-o ruptură sau o creștere accentuată a permeabilității membranei eritrocitare și eliberarea hemoglobinei în plasmă. Deoarece liza eritrocitelor este una din reacțiile adverse majore cauzate de tiosemicarbazone, capacitatea CMT-22, CMT-67, CMT-68, CMJ-23, CMJ-33 și DOXO a fost comparată cu inducerea hemolizei eritrocitelor umane.

Testul de hemoliză *in vitro* evaluează eliberarea hemoglobinei în plasmă ca un indicator al lizei eritrocitelor, după expunerea la agentul de testare (compușii testați). Rezultatele cu o

valoare a hemolizei < 10% au fost considerate nehemolitice, în timp ce valorile > 25% au fost considerate ca hemolitice

În plus, soluția hipotonică (0,1%) de NaCl a fost utilizată ca control pozitiv, iar soluția izotonică (0,9%) de NaCl a fost utilizată ca control negativ. Așa cum era de așteptat, utilizarea controlui pozitiv și celui negativ a indus hemoliza eritrocitelor la valoarea de 100% și <10%, respectiv [24]. În contrast, diferite concentrații ale compușilor testați au demonstrat o activitate hemolitică scăzută, iar la expunerea eritrocitelor la acțiunea a 10 µM de CMT-22, CMT-67, CMT-68, CMJ-23 și CMJ-33 au fost înregistrate valori maxime de 8,2±0,1%, 10,2±0,2%, 10,6±0,1%, 14,2±0,6% și 10,3±0,2%, respectiv. Incubarea eritrocitelor cu preparatul DOXO favorizează hemoliza 15,0±0,2% (Figura 8).

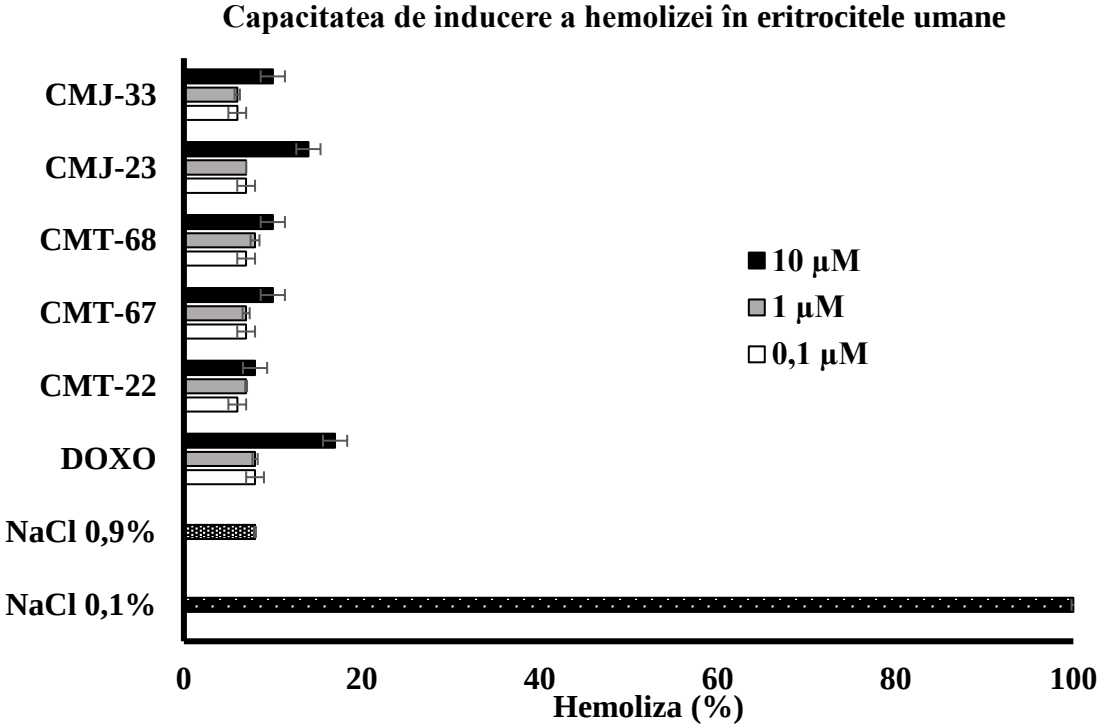


Fig. 8. Procentajul activității hemolitice a compușilor testați CMT-22, CMT-67, CMT-68, CMJ-23, CMJ-33, DOXO, NaCl 0,1 % și NaCl 0,9 %. Valorile sunt reprezentate ca media ± SD a 3 replici.

Aceste rezultate indică faptul că compușii testați manifestă o capacitate mai scăzută de a induce hemoliza eritrocitelor, în comparație cu DOXO. Deci, studiul hemolizei induse de compușii testați a relevat rezultate, care nu au depășit valorile admisibile în intervalul de concentrație terapeutică.

4.6. Toxicitatea compușilor testați

Studiile toxicității reprezintă o etapă importantă în elaborarea medicamentelor, fiind o premisă înainte de începerea utilizării lor în studiile clinice. Întrucât principiul fundamental al studiilor toxicologice este protecția animalelor, inclusiv a celor care participă la studii, actualmente este recomandat ca în toate cazurile posibile să fie efectuate studii pe linii de celule *in vitro* sau organisme unicelulare *in vivo*, evitând includerea animalelor de laborator în studii.

În studiul dat, organismele unicelulare *Paramecium caudatum* au fost utilizate ca obiecte de testare pentru a detecta toxicitatea substanțelor active [27, 28, 29, 30]. *P. caudatum* este o

specie de protozoare extrem de organizate care combină toate proprietățile unei singure celule și a unui întreg organism, este unul dintre cei mai răspândiți locuitori ai bazinelor continentale de apă dulce. Aceste organisme unicelulare sunt apropiate de animalele mai mari după parametrii lor biochimici, astfel încât rezultatele unei astfel de biotestări pot fi extrapolate la om.

Testarea biologică a substanțelor a fost realizată prin două abordări metodologice principale, utilizându-se metode microscopice și spectrofotometrice. Drept urmare, în cursul experimentelor legate de evaluarea toxicității unei substanțe în raport cu *P. caudatum,* a fost elaborată o nouă metodă spectrofotometrică folosind colorantul roșu neutru (NR) 3-amino-7-dimetilamino-2-metilfenazin hidroclorid, care permite accelerarea biotestării pentru a determina cel mai precis dependența toxicității de concentrația substanței [27]. Principiul metodei constă în capacitatea colorantului roșu neutru intravital de a fi absorbit și reținut în lizozomii parameciului viu [28].

S-a constatat că valorile LC_{50} timp de 24 de ore sunt următoarele: 4,9±0,5 μM (CMT-22), 10,0±0,2 μM (CMT-67), 25,5±0,8 μM (CMT-68), 44,5±1,5 μM (CMJ-23), 24,3±0,1 μM (CMJ-33) și 1,0±0,4 μM (DOXO). Valorile LC_{50} timp de 48 de ore sunt: 12,1±2,5 μM (CMT-22), 5,1±0,6 μM (CMT-67), 6,9±0,9 μM (CMT-68), 11,6±0,5 μM (CMJ-23), 13,3±0,2 μM (CMJ-33) și 1,10±0,01 μM (DOXO).

Biotestul colorimetric, a demonstrat că LC_{50} al celor 5 compuși testați în tratamentul pe *P. caudatum* 24 și 48 de ore, comparativ cu DOXO este mai redusă de 5 și 11 ori (CMT-22), de 10 și 5 ori (CMT-67), de 26 și 6 ori (CMT-68), de 45 și 11 ori (CMJ 23) și de 24 și 12 ori (CMJ 33), respectiv.

Astfel, aceste rezultate au demonstrat că compușii testați posedă o toxicitate mai diminuată timp de 24 de ore și 48 de ore decât cea exercitată de DOXO. Cea mai înaltă activitate de toxicitate pe *Paramecium caudatum* a fost manifestată de DOXO.

CONCLUZII GENERALE

1. În premieră au fost identificaţi noi inhibitori ai proliferării celulelor canceroase (CMT-22, CMT-67, CMT-68, CMJ-23 şi CMJ-33) cu activitate selectivă ridicată, toxicitate scăzută şi mai eficienţi, comparativ cu DOXO şi cisplatina, ceea ce deschide perspectiva de utilizare a lor ca agenţi anticancer.
2. Pentru prima dată în Republica Moldova compuşii autohtoni au fost testaţi pe diferite linii de celule canceroase. S-a constatat că compuşii testaţi au demonstrat o activitate inhibitoare ridicată a proliferării celulelor canceroase MeW-164 (Centrul de Cancer din Varşovia), HeLa (ATCC CCL-2), BxPC-3 (ATCC CRL-1687), RD (ATCC CCL-136), care în majoritatea cazurilor este de 1,2-60 de ori mai mare decât activitatea DOXO şi sunt, de asemenea, de 2,7-260 de ori mai selectivi în raport cu celulele canceroase, comparativ cu DOXO. Complecșii Cu(II) cu tiosemicarbazonele CMT-67, CMT-68 şi CMJ-33 prezintă o activitate antiproliferativă mai înaltă, iar selectivitatea este mai înaltă pentru tiosemicarbazonele CMT-22 şi CMJ-23 [3, 10, 11, 13, 23, 13, 14, 16, 23, 28, 31].
3. A fost stabilit că mecanismul de acţiune a activităţii antiproliferative a compuşilor testaţi asupra celulelor este asociat cu apoptoza. În baza analizelor RMN şi cu raze X a fost stabilit că thiosemicarbazonele interacţionează cu fragmentul ADN (guanina) formând legături de hidrogen, ceea ce cauzează fragmentarea ADN şi, în final, apoptoza.

4. Substanţele testate manifestă activitate antioxidantă împotriva radicalilor $ABTS^{\bullet+}$ şi peroxilici mai înaltă, comparativ cu compuşii de referinţă, conform şirului: CMT-68 ≥ CMT-67 ≥ CMJ-23 ≥ CMJ-33 ≥ DOXO ≥ CMT-22 ≥ rutina ≥ trolox şi CMJ-23 ≥ CMJ-23 = CMT-68 ≥ CMT-67 ≥ CMT-22 ≥ DOXO ≥ trolox, respectiv. Capacitatea de a inhiba activitatea LOX pentru compuşii testaţi, comparativ cu quercetina şi DOXO este mai esenţială, conform succesiunii: CMT-22 ≥ CMJ-23 = CMJ-33 = CMT-67 = CMT-68 ≥ DOXO ≥ quercetina [10, 14, 17, 23, 16, 19, 31].
5. S-a constatat că substanţele testate nu includ inducerea formării metHb şi nu cresc hemoliza, ceea ce indică absenţa reacţiilor adverse asociate cunoscute, legate de utilizarea medicamentelor anticanceroase [23].
6. Au fost adaptate metodele de studiu a activităţii biologice a substanţelor [20, 21, 24]. A fost elaborată şi brevetată o metodă pentru determinarea toxicităţii directe *in vivo*, folosind *Paramecium caudatum,* ceea ce a permis evaluarea efectului toxic al compuşilor chimici testaţi şi a diapazonului de concentraţii pentru determinarea toxicităţii în cercetări preclinice [27, 18, 28, 25]. S-a constatat că compuşii testaţi au o toxicitate cu valori LC_{50} (μM) mai mici de 5-45 ori decât DOXO.

RECOMANDĂRI PRACTICE

1. De recomandat utilizarea metodelor de cercetări biochimice adaptate și modificate, precum și metoda patentată de cercetare a toxicității inhibitorilor moleculari anorganici și organici pe *Paramecium Caudatum,* ca metodă rentabilă și rapidă pentru testarea umană.
2. Se propune de utilizat substanțele studiate pentru studii preclinice și clinice ulterioare, ca inhibitori moleculari selectivi și eficienți ai celulelor canceroase cu toxicitate scăzută.
3. Este necesar de a continua identificarea unor noi substanțe cu activitate antiproliferativă ridicată și selectivitate înaltă printre derivații 4-feniltiosemicarbazonelor substituite ale 2-formilpiridinei.
4. Se recomandă de a continua studiul aprofundat al mecanismului activității antiproliferative a substanțelor studiate în vederea excluderii unor efecte genotoxice, mutagenice, teratogenice *in vivo.*

REFERINȚE

1. BRAY, F., JEMAL, A., GREY, N., FERLAY, J., FORMAN, D. Global cancer transitions according to the Human Development Index (2008-2030): a population-based study. În: *Lancet Oncol*, 2012. vol. 13, nr. 8, pp. 790-801.
2. ISMAIL, MA., ARAFA, RK., YOUSSEF, MM., EL-SAYED, WM. Anticancer, antioxidant activities, and DNA affinity of novel monocationic bithiophenes and analogues. In: *Drug Design, Development and Therapy*, 2014. Vol.8, pp. 1659-1672.
3. **GARBUZ, O.** *In vitro* anticancer activity of chloro(n-phenyl-n'-[(pyridin-2-yl)methylidene]carbamohydrazono-thioato)(4-aminobenzene-1-sulfonamide)copper. In: *Studia Universitatis Moldaviae*, 2019. Vol.6, nr. 116, pp. 70-76.
4. ILIESAB, D., SHOVAC, S., RADULESCUB, V., et al. Synthesis, characterization, crystal structure and antioxidant activity of Ni(II) and Cu(II) complexes with 2-formilpyridine N(4)-phenylthiosemicarbazone. In: *Polyhedron*, 2015.Vol. 97, pp. 157-166.
5. PAHONTU, E., FALA, V., GULEA, A., et al. Synthesis and Characterization of Some New Cu(II), Ni(II) and Zn(II)Complexes with Salicylidene Thiosemicarbazones: Antibacterial, Antifungal and *in Vitro* Antileukemia Activity. In: *Molecules*, 2013. Vol.18, pp. 8812-8836,
6. ALI, I., SHAH, MR., et al. Hemolytic and cellular toxicology of a sulfanilamide-based nonionic surfactant: a niosomal carrier for hydrophobic drugs. In: *Toxicol Res (Camb)*, 2018. Vol.7, nr. 5, pp. 771-778.
7. TACAR, O., et al. Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems. In*: Pharm Pharmacol*, 2013.Vol.65, nr. 2, pp. 157-70.
8. LIM, SW., LOH, HS., TING, KN., et al. Reduction of MTT to Purple Formazan by Vitamin E Isomers in the Absence of Cells. În: *Trop Life Sci Res*, 2015. Vol. 26, nr. 1, pp. 111-20.
9. ERHAN, T., **GARBUZ, O.,** GULEA, A. Sinteza și studiul unor N'-(N-dimetilfenil)-N,N-dimetiltiourei și N(4)-N-dimetilfeniltiosemicarbazide. In: *Studia universitatis moldaviae*, 2017. Vol. 1, nr. 101, pp. 89-95.
10. GRAUR, V., **GARBUZ, O**., ZARICIUC, E., GUDUMAC, V., GULEA, A. Synthesis and biological activity of 2-formylpyridine N(4)-allyl-3-selenosemicarbazone and its copper coordination compound. In: *Journal of Academy of Sciences of Moldova.* Life Sciences, 2015.Vol. 3, nr. 327, pp. 135-142.
11. GULEA, A., GUDUMAC, V., **GARBUZ, O.,** ANDRONACHE, L. *In vitro* antiproliferative activity and antioxidant capacity of new organometallic coordination compounds, rezults correlation analysis. În: *Buletinul AȘM. Științele vieții*, 2016. Vol. 3, nr. 330, pp. 65-72,
12. ГУЛЯ, А., ГРАУР, В., ЧУМАКОВ, Ю., ПЕТРЕНКО, П., **ГАРБУЗ, О**., ЦАПКОВ, В., ГУДУМАК, В. Координационные соединения никеля(II) с бис(4-аллилтиосемикарбазоном) пентан-2,4-диона. В: *Журнал общей химии*, 2020. Том. 90, № 1, стр. 143-150.
13. **GARBUZ, O.** *In vitro* antiproliferative activity of 2-formilpyridine N(4)-phenylthiosemicarbazone and copper(II) complex [Cu(L)Cl] with 2-formylpyridine N(4)-phenylthiosemicarbazone ligand. In: International Conference. Stiinte ale nature si exacte. *Chimie si tehnologie chimica. 7-8 noembrie, Republica Moldova, 2019, Chisinau*, p. 217- 20.
14. GULEA, A., TODERAS, I., GUDUMAC, V., TAPCOV, V., **GARBUZ, O**., ROSCOV, E., SARDARI, V., TAGADIUC, O. Anticancer and toxicity activities of new synthesized compound. In: *International research journal*, 1017. Vol. 12, nr. 66, pp. 107-110.
15. **GARBUZ, O.** Culegere de rezumate ştiinţifice. Conferinţa ştiinţifică anuală a colaboratorilor şi studenţilor. În: *Activitatea antioxidantă a unor noi compuşi coordinativi bioactivi in vitro*, Chişinău, Republica Moldova. 2015, p.20.
16. GULEA, A., GUDUMAC, V., **GARBUZ, O.,** CEBOTARI, D., SPINU, I., PIRVU, O., SARDARI, V., TAGADIUC, O., et al. Antiproliferative and antioxidant activity of nitrato-

[4-(3,4-dimethylphenyl)-2-(2-oxo-3- methoxybenzylidene) hydrazinecarbothioamido]copper. In: *International research journal*, 2018.Vol. 2, nr. 68, pp. 19-22.
17. **GARBUZ, O**, GULEA, A, DYNIEWICZ, J, ZABLOCKA, B, LIPKOWSKI, AW. The non-opioid receptor, antioxidant properties of morphine and the opioid peptide analog biphalin. În: *Peptides*, 2015.Vol. 63, pp. 1-3.
18. TODERAŞ, I., GULEA, A., ROŞCOV, E., **GARBUZ, O**. Influenţa substanţelor coordinative metaloorganice asupra viabilității populaţiei de *Paramecium caudatum*. In: *Buletinul AŞM. Ştiinţele vieţii*., 2016.Vol. 3, nr. 330, pp. 109-115.
19. GULEA, A., GUDUMAC, V., **GARBUZ, O.,** ANDRONACHE L. *In vitro* antiproliferative activity and antioxidant capacity of new organometallic coordination compounds, results correlation analysis. In: *The 6th International Conference Ecological & Environmental Chemistry 2017*. Chisinau, Republic of Moldova. March 2-3, 2017, p. 81.
20. ŞTÎRBA, O., ANDRONACHE, L., **GARBUZ, O**. *Metodă de determinare a activității lipoxigenazei.* Certificat de inovator nr. 5319. 2014.
21. PANTEA, V., TAGADIUC, O., ANDRONACHE L., ŞTÎRBA O., **GARBUZ O.,** GUDUMAC, V. *Procedeu de dozare a niveluluide oxihemoglobina methemoglobina si sulfohemoglobina in aceiasi proba* nr.5465.2015.
22. EL-HUSSEINI, A., AZAROV, N. Is threshold for treatment of methemoglobinemia the same for all? A case report and literature review. In: *Emerg Med*, 2010. Vol. 28, nr. 6, pp. 748.e5-748.e10.
23. **GARBUZ, O**., SPINU, I., PIRVU, O., PINZARU, I., APOSTOL, M., GUDUMAC, V., GULEA, A. Anticancer, antioxidant and toxicity activities of new compounds along with their ability to include hemolysis and methemoglobin formation in human RBCs. *In: 4th French-Romanian Colloquium on Medicinal Chemistry, Iasi, Romania,* 2017. p. 46.
24. ANDRONACHE, L., **GARBUZ, O.,** SARDARI, V.,SVET, I. *Procedeu de determinare a capacitatii de inducere a hemolizei.* nr. 5464. 2015.
25. TODERAŞ, I., GULEA, A., ROŞCOV, E., **GARBUZ, O.** Biotestarea și aprecierea toxicității compușilor metalooragnice asupra populaţiei de *Paramecium caudatum*. În: *Revista Ştiinţifică a Universităţii de Stat din Moldova. Studia Universitatis Moldaviae*, 2016. Vol. 3, nr. 330, pp. 65-72.
26. TODERAŞ, I., GULEA, A., ROŞCOV, E., **GARBUZ, O.** Bioassay and Estimation of the Toxicity of Metalloorganic Compounds Impacting the Population of *Paramecium Caudatum*. *In: The 6th International Conference Ecological & Environmental Chemistry 2017 (EEC-2017). Chisinau, Republic of Moldova. March 2-3, 2017,* p. 91.
27. TODERAŞ, I., GULEA, A., GUDUMAC, V., ROŞCOV, E., **GARBUZ, O**. *Metodă de apreciere a toxicităţii substanţelor chimice*. Brevet de invenție. 1279 Z, MD, G01N 1/28. Cererea depusă 23.05.2017, BOPI 8/2018.
28. **GARBUZ, O.** Conferința științifică națională cu participare internațională. Integrare prin Cercetare și Inovare, USM. In: *Anticancer and toxicity activities of new synthesized compound.* Chisinau, 2017. p. 178-181.
29. SUEZOV, R., GRISHINA, P., et al. Relative cytotoxicity of complexes of platinum(II) and palladium(II) against pure cell culture *Paramecium caudatum* and human cell lines A431 and HaCaT. *In: Mediterranean Journal of Chemistry, 2018*. Vol. 7, nr. 1, pp. 28-38.
30. KRYUCHKOVA, M., DANILUSHKINA, A., LVOVAB, Y., et al. Evaluation of toxicity of nanoclays and graphene oxide *in vivo*: a *Paramecium caudatum* study. *In: The Royal Society of Chemistry. Environmental Science Nano, 2016.* Vol. 3, pp. 442-454.
31. GUDUMAC, V., **GARBUZ, O.**, GRAUR, V., ŢAPCOV, V., GULEA, A. *In Vitro* antioxidants and antilipoxygenase activity of some thiosemicarbazones and their non-platinum coordination compounds. *In: 3rd French-Romanian Colloquium on Medicinal Chemistry. Iaşi, Romania. October 30-31. 2014,* p.70.

LISTA LUCRĂRILOR ŞTIINŢIFICE LA TEMA TEZEI

Articole în reviste ştiinţifice:

1. **GARBUZ, O.**, GULEA, A., DYNIEWICZ, J., ZABLOCKA, B., LIPKOWSKI, A. W. The non-opioid receptor, antioxidant properties of morphine and the opioid peptide analog biphalin. In: *Elsevier. Peptides*. January, 2015, Vol. 63, p. 1–3, IF=2.61.
2. ГУЛЯ, А., ГРАУР, В., ЧУМАКОВ, Ю., ПЕТРЕНКО, П., **ГАРБУЗ, О.**, ЦАПКОВ, В., ГУДУМАК, В. Координационные соединения никеля(II) с бис(4-аллилтиосемикарбазоном)пентан-2,4-диона. *В: Журнал общей химии.* 2020, Том. 90(1), стр. 143–150. Импакт-фактор: 0.658.
3. RUSNAC, Roman, RUSNAC, Anna, **GARBUZ, Olga,** GULEA, Aureliun. Synthesis and Structure of COPPER (II) Coordination Compounds with 4-NSUBSTITUTE-THIOSEMICARBAZONE OF 4-BENZOL-5-METHYL-2-PHENYL-2,4 -DIHID RO-3H-PYRAZOL-3-ONE. Antioxidant, Antimicrobiant and Antituntor Properties. *In: Economy Transdisciplinarity Cognition.* ROMANIA/ lssue 2/2019, Vol. 22, p.5-14. ISSN:2067-504.
4. GULEA, A., GUDUMAC, V., **GARBUZ, O.,** ANDRONACHE, L. *In vitro* antiproliferative activity and antioxidant capacity of new organometallic coordination compounds, rezults correlation analysis. În: *Buletinul AŞM. Ştiinţele vieţii*. 2016, Vol. 3(330), p. 65-72. Categoria B.
5. TODERAŞ, I., GULEA, A., ROŞCOV, E., **GARBUZ, O.** Biotestarea și aprecierea toxicității compușilor metalooragnice asupra populaţiei de *Paramecium caudatum*. În: *Revista Ştiinţifică a Universităţii de Stat din Moldova. Studia Universitatis Moldaviae*. 2016, 6(96), p. 164-169. Categoria B.
6. TODERAŞ, I., GULEA, A., ROŞCOV, E., **GARBUZ, O.** Influenţa substanţelor coordinative metaloorganice asupra viabilităţii populaţiei de *Paramecium caudatum*. În: Buletinul AŞM. Ştiinţele vieţii. 2016, Vol. 3(330), p. 109-115. Categoria B.
7. **GARBUZ, O**. *In vitro* anticancer activity of chloro(N-phenyl-N'-[(pyridin-2-yl)methylidene]carbamohydrazonothioato)(4-aminobenzene-1-sulfonamide)copper. În: *Studia Univesitatis Moldaviae.* 2018, Vol. 6(116), p. 70-76. Categoria B.

Brevete:

8. GULEA, Aurelian (MD), LIPKOWSKI, Andrzej (PL), **GARBUZ, Olga** (MD), MATALINSKA, Joanna (PL), ŢAPCOV, Victor (MD). *Compusul N-(3-metoxifenil)-2-(piridin-2-ilmatilen)-hidrazincarbotioamidă-inhibitor al proliferării celulelor MeW-164 ale melanomului uman*. Brevet de invenție. 4349 C1, MD, C07C 337/08. Cererea depusă 23.06.2014, BOPI nr.06/2019.
9. TODERAŞ, Ion (MD), GULEA, Aurelian (MD), GUDUMAC, Valentin (MD), ROŞCOV, Elena (MD), **GARBUZ, Olga** (MD). *Metodă de apreciere a toxicităţii substanţelor chimice.* Brevet de invenție. 1279 Z, MD, G01N 1/28. Cererea depusă 23.05.2017, BOPI 8/2018.
10. FUIOR, Arcadie (MD), FLOQUET, Sébastien (FR), CADOT, Emmanuel (FR), **GARBUZ, Olga** (MD), ŢAPCOV, Victor (MD), TODERAŞ, Ion (MD), GULEA, Aurelian (MD). *Ansamblu supramolecular (NMe4)(C42 H70O35)[Mo10 O10 S10 (OH)11 (H2O)4]•27H2O care manifestă activitate antioxidantă.* Brevet de invenție. 4644 C1, MD, C07F 11/00. Cererea depusă 22.03.2018, BOPI nr. 8/2019.

11. GULEA, Aurelian (MD), ISTRATI, Dorin (MD), ŢAPCOV, Victor (MD), **GARBUZ, Olga** (MD), GUDUMAC, Valentin (MD), GROPPA, Stanislav (MD). *Utilizare a di(μ-s)-bis{(4-aminobenzensulfamid)-cloro-{N-[fenil-2-(piridin-2-ilmetiliden)hidrazin-1-carbotioamido)(1-)]}cupru în calitate de inhibitor al proliferării celulelor cancerigene.* Brevet de invenție. 4620 C1, MD, C07F 1/08. Cererea depusă 11.04.2018, BOPI 2/2019.

Inovaţii:

12. ŞTÎRBA, O., ANDRONACHE, L., **GARBUZ, O**. *Metodă de determinare a activităţii lipoxigenazei.* Certificat de inovator nr. 5319. 2014.
13. PANTEA, V., TAGADIUC, O., ANDRONACHE L., ŞTÎRBA O., **GARBUZ O.,** GUDUMAC, V. *Procedeu de dozare a niveluluide oxihemoglobina methemoglobina si sulfohemoglobina in aceiasi proba* nr.5465.2015.
14. ANDRONACHE, L., **GARBUZ, O.,** ȘVEȚ, I., GUDUMAC, V. *Metoda de determinare in vitro a viabilităţii şi citotoxicităţii celulare*. Certificat de inovator nr. 5505. 2016.

Teze ale comunicărilor ştiinţifice:

15. GUDUMAC, V., **GARBUZ, O.**, GRAUR, V., ŢAPCOV, V., GULEA, A. *In Vitro* antioxidants and antilipoxygenase activity of some thiosemicarbazones and their non-platinum coordination compounds. *In: 3rd French-Romanian Colloquium on Medicinal Chemistry. Iaşi, Romania. October 30-31. 2014,* p.70.
16. TAGADIUC, V., ŞTÎRBA, O., ANDRONACHE, L., **GARBUZ, O.,** POPA, V. Bioactive coordination compounds action on the intensity of the oxidative stress and antioxidant system activity in animals under physiological. *In: 3rd French-Romanian Colloquium on Medicinal Chemistry. Iaşi, Romania. October 30-31*. 2014, p.64.
17. **GARBUZ, O**., SPINU, I., PIRVU, O., PINZARU, I., APOSTOL, M., GUDUMAC, V., GULEA, A. Anticancer, antioxidant and toxicity activities of new compounds along with their ability to include hemolysis and methemoglobin formation in human RBCs. *In: 4th French-Romanian Colloquium on Medicinal Chemistry, Iasi, Romania. October 5-7, 2017*, p. 46.
18. MIHALCIUC, O., **GARBUZ, O.,** PANTEA, V., BERNIC, V., GULEA, A. Influence of local bioactive compounds on spleen lysosomal enzymes activity in ethylrne glycol intoxication. *In: The XVIII-th International Conference. „Physical Methods in Coordination and Supramolecular Chemistry". Chişinău, Moldova. October 8-9. 2015*, p. 103.
19. ANDRONACHE, L., GUDUMAC, V., GULEA, A., TAGADIUC, O., **GARBUZ, O**., PANTEA, V. New inhibitors of glycation and of the formation of advanced glycation end products. *In: The XVIII-th International Conference „Physical Methods in Coordination and Supramolecular Chemistry". Chişinău, Moldova. October 8-9, 2015*, p.33.
20. GULEA, A., TSAPKOV, V., COTOVAIA, A., **GARBUZ, O**., ANACHII, A., GUDUMAC, V. Synthesis, structure, and antioxidant activity of some biometal coordination compounds of pentane-2,4-dione bis-(4-(pyrid-2-yl)thiosemicarbazone). *In: The XVIII-th International Conference „Physical Methods in Coordination and Supramolecular Chemistry". Chişinău, Moldova. October 8-9, 2015*, p. 53.
21. POPA, V., PANTEA, V., **GARBUZ, O.**, SVET, I. Influence of local biologically active compounds on protein metabolism in experimental hepatopathy. *In: International Scientific Conference on Microbial Biotechnology (3rd edition). Chişinău, Moldova. October 12-13, 2016*, p. 80.
22. GULEA, A., GUDUMAC, V., **GARBUZ, O**., ANDRONACHE L. *In vitro* antiproliferative activity and antioxidant capacity of new organometallic coordination compounds, results

correlation analysis. *In: The 6th International Conference Ecological & Environmental Chemistry 2017. Chisinau, Republic of Moldova. March 2-3, 2017*, p. 81.

23. TODERAŞ, I., GULEA, A., ROŞCOV, E., **GARBUZ, O.** Bioassay and Estimation of the Toxicity of Metalloorganic Compounds Impacting the Population of *Paramecium Caudatum*. *In: The 6th International Conference Ecological & Environmental Chemistry 2017 (EEC-2017). Chisinau, Republic of Moldova. March 2-3, 2017*, p. 91.
24. **GARBUZ, O.** Anticancer and toxicity activities of new synthesized compound. Conferința științifică națională cu participare internațională. În: *Integrare prin Cercetare și Inovare, USM, 9-10 noiembrie 2017,* p. 178-181.
25. TODERAŞ, I., GULEA, A., GUDUMAC, V., ROŞCOV, E., **GARBUZ, O**. Metoda de apreciere a toxicităţii substanţelor chimice. Simpozionul international. Ecologia funcțională a animalelor. În: *Consacrat aniversării a 70 de ani de la naşterea academicianului Ion Tederaş. Chișinău, Republica, Moldova. 21 septembrie, 2018*, p. 454-463.
26. GULEA, A., CEBOTARI, D., PETRENKO, P., CHUMAKOV, Y., **GARBUZ, O**., TSAPCOV, V., GUDUMAC, V. Synthesis, structure and antioxidant properties of bis-ligand complex of nickel with 2-hydroxy-3-methoxibenzaldehyde 4-(2,4-dimethylphenyl)thiosemicarbazone. In: *International Conference. Achievements and perspectives of modern chemistry. Chisinau, October 9-11, 2019*, p.153.
27. **GARBUZ, O.** *In vitro* antiproliferative activity of 2-formilpyridine N(4)-phenylthiosemicarbazone and copper(II) complex [Cu(L)Cl] with 2-formylpyridine N(4)-phenylthiosemicarbazone ligand. *In: International Conference. Stiinte ale nature si exacte. Chimie si tehnologie chimica. 7-8 noembrie, 2019, Chisinau, Republica Moldova*, p. 217-220.
28. **GARBUZ, O.** Activitatea antioxidantă a unor noi compuşi coordinativi bioactivi *in vitro*. Culegere de rezumate ştiinţifice. În: *Conferinţa ştiinţifică anuală a colaboratorilor şi studenţilor. Chişinău, Republica Moldova. 2015*, p.20.

ADNOTARE

Garbuz Olga, „Noi inhibitori moleculari anorganici şi organici ai proliferării celulelor canceroase, mecanisme de acțiune", teză de doctor în științe biologice, Chișinău, 2021.

Teza constă din: introducere, patru capitole, concluzii generale şi recomandări, 204 de referințe bibliografice, 5 anexe, 129 de pagini de text de bază (până la Bibliografie), 41 de figuri, 8 scheme, 6 tabele şi 5 anexe. Rezultatele obţinute sunt publicate în 28 de lucrări ştiinţifice (7 articole, 14 teze la conferinţe, 4 brevete de invenţie, 3 inovații).

Cuvinte-cheie: compuși anticancer, activitate antiproliferativă, celule canceroase umane, activitate selectivă, activitate antioxidantă, hemoliză.

Domeniul de studiu: ştiinţe ale naturii.

Scopul lucrări: elucidarea efectului noilor inhibitori moleculari pe bază de compuși organici și complecși asupra proliferării liniilor celulare ale cancerului uman în comparație cu medicamentele anticanceroase doxorubicina și *cis*-diclorodiamminplatinum; determinarea mecanismului de acțiune a inhibitorilor.

Obiectivele cercetării: detectarea activității antiproliferative a substanțelor testate CMT-22, CMT-67, CMT-68, CMJ-23, CMJ-33 împotriva celulelor canceroase HeLa, BxPC-3, RD, MeW-164; testarea acțiuniii substanțelor investigate asupra celulelor renale epiteliale normale de linia MDCK pentru a detecta citotoxicitatea selectivă; stabilirea mecanismului de inhibare a proliferării celulelor canceroase de către substanțele testate; evaluarea *in vitro* a probabilității de dezvoltare și a naturii posibilelor efecte secundare ale substanțelor testate asociate cu hemoliza și formarea methemoglobinei în eritrocitele umane; determinarea toxicității substanțelor testate.

Noutatea şi originalitatea ştiinţifică: au fost adaptate metode de studiu al activității biologice a substanțelor testate; a fost determinată activitatea antiproliferativă şi antioxidantă a cinci compuşi autohtoni (tiosemicarbazone şi compuşi coordinativi ai Cu(lI) cu tiosemicarbazone); a fost elaborată o metodă nouă pentru determinarea toxicităţii directe, utilizând *Paramecium caudatum* şi evaluată toxicitatea directă a substanţelor investigate; a fost elucidat mecanismul efectului substanțelor asupra proliferării celulelor canceroase; a fost stabilit că compușii testați prezintă interes din punctul de vedere al utilizării lor ca agenți anticancer mai puțin toxici și mai eficienți.

Problema ştiinţifică importantă soluţionată constă în identificarea unor inhibitori noi de proliferare a celulelor canceroase cu activitate selectivă înaltă şi toxicitate mai scăzută, comparativ cu compuşii anticancer de referinţă aprobaţi de FDA (DOXO şi CDDP), precum şi elucidarea mecanismului de acţiune antiproliferativă a compuşilor autohtoni testaţi. A prezentat interes şi acţiunea antioxidativă a inhibitorilor moleculari organici şi anorganici asupra radicalilor ($ABTS^{\bullet+}$, $DPPH^{\bullet}$, $HO_2^{\bullet}$),comparativ cu standardele de referinţă, precum şi evaluarea impactului compuşilor asupra indicilor sistemului de hemoliză a eritrocitelor *in vitro,* în vederea evaluării impactului lor.

Semnificația teoretică a lucrării și valoarea aplicativă. Au fost identificați noi inhibitori ai proliferării celulelor canceroase cu activitate selectivă ridicată și toxicitate scăzută, ceea ce a făcut posibilă propunerea acestora pentru studii preclinice. A fost propusă o metodă directă de biotestare a toxicității cu un cost redus, folosind cantități mici de substanță A fost stabilit mecanismul de acțiune a substanțelor asupra proliferării celulelor canceroase. Rezultatele obținute au semnificație științifică și științifico-didactică și pot fi utilizate la predarea cursurilor speciale de Chimie biofarmaceutică și Biochimie.

Implementarea rezultatelor științifice obținute. A fost elaborată și brevetată o metodă de determinare a toxicității directe a substanțelor, folosind *Paramecium caudatum*. Au fost brevetați doi inhibitori moleculari de proliferare a celulelor de cancer și o substanță cu activitate antioxidantă. În rezultatul modificării și adaptării metodelor de studiu a activității biologice a substanțelor au fost impliementate trei inovații.

ANNOTATION

Garbuz Olga, „New inorganic and organic molecular inhibitors of cancer cells proliferation, the mechanisms of action", thesis for PhD in biological sciences, Chisinau, 2021.

The thesis consists of introduction, four chapters, general conclusions and recommendations, 204 references, 5 annexes, 129 pages, 41 figures, 8 schemes, 6 tables. The results are published in 28 scientific publications (7 articles, 4 patents, 14 theses at conferences, 3 innovations).

Keywords: anticancer compound, antiproliferative activity, human cancer cell line, selective activity, antioxidant activity, hemolysis.

Field of study: Nature Sciences

The aim of the thesis: elucidation of the effect of the new molecular inhibitors based on organic and complex compounds on the proliferation of human cancer cell lines in comparison with such anticancer drugs as doxorubicin and cis-dichlorodiammineplatinum; determination of the inhibitors action mechanism.

The objectives of the thesis: detection of the antiproliferative activity of the tested substances CMT-22, CMT-67, CMT-68, CMJ-23, CMJ-33 on the cancer cells HeLa, BxPC-3, MeW-164, RD; testing substances against normal kidney epithelial cell line MDCK in order to detect selective cytotoxicity; identification of the mechanism of inhibition of the cancer cell proliferation by the test substances; *in vitro* assessment of the probability of development and the nature of possible side effects of the tested substances associated with hemolysis and the formation of methemoglobin in human erythrocytes; determination of the toxicity of substances.

Novelty and relevance of the study: methods for studying the biological activity of substances were adapted; antiproliferative and antioxidant activities of five synthetic compounds (tiosemicarbazones and Cu(lI) coordination compounds with tiosemicarbazones) were determined; it was established *in vitro* that the investigated substances do not cause the formation of methemoglobin and do not increase the index of hemolysis in human erythrocytes; a method for determining direct toxicity using *Paramecium* was developed, and the direct toxicity of the investigated substances was assessed; the mechanism of the effect of the substances on the proliferation of cancer cells was revealed; the tested compounds are of interest from the point of view of their use as less toxic and more effective anticancer agents.

Scientific problem solved in this thesis is the identification of new inhibitors of cancer cells proliferation with high selective activity and lower toxicity compared to FDA-approved reference anticancer compounds (DOXO and CDDP), as well as the elucidation of the mechanism of antiproliferative action of the tested compounds. The antioxidant action of organic and inorganic molecular inhibitors on radicals ($ABTS^{\bullet+}$, $DPPH^{\bullet}$, $HO_2^{\bullet}$) was determined. It has been found that the tested compounds do not cause the formation of methemoglobin and do not increase the index of hemolysis in human erythrocytes.

The theoretical importance and potential application value of the work. New inhibitors of cancer cell proliferation with high selective activity and low toxicity have been identified which made it possible to propose them for preclinical studies. A method for evaluation of the substances toxicity using *Paramecium* has been developed which allows to accelerate and reduce the cost of biotesting. The mechanism of the substances effect on the cancer cells proliferation has been determined. The findings are of scientific interest and can be used for special training courses in Biopharmaceutical Chemistry, and Biochemistry.

Implementation of scientific results. A method for determination of direct toxicity of substances using *Paramecium caudatum* has been developed and patented. Two molecular inhibitors of cancer cell proliferation and one substance with antioxidant activity have been patented. Three innovations have been implemented as a result of modification and adaptation of methods for studying the biological activity of substances.

АННОТАЦИЯ

Гарбуз Ольга: «Новые молекулярные неорганические и органические ингибиторы пролиферации раковых клеток, механизм действия», диссертация доктора биологических наук, Кишинёв, 2021.

Диссертация состоит из: введения, 4-х глав, общих выводов и рекомендаций, библиографии из 204 наименований, 129 страниц, 5 приложений, 41 рисунков, 8 схем и 6 таблиц. Полученные результаты опубликованы в 28 научных работах (7 статей, 14 тезисов докладов на конференциях, 4 патента, 3 инновации).

Ключевые слова: противораковое вещество, антипролиферативная активность, раковые клетки человека, селективная активность, антиоксидантная активность, гемолиз.

Область исследования: естественные науки.

Цель: выявление влияния новых молекулярных ингибиторов на основе органических и комплексных соединений на пролиферацию линий раковых клеток человека в сравнении с используемыми противораковыми препаратами доксорубицином и *цис*-дихлородиамминплатиной; определение механизма действия ингибиторов.

Задачи исследования: выявление антипролиферативной активности тестируемых веществ CMT-22, CMT-67, CMT-68, CMJ-23, CMJ-33 в отношении клеток раковых линий HeLa, BxPC-3, MeW-164, RD; тестирование веществ в отношении линии MDCK эпителиальных нормальных клеток почки собаки с целью выявления селективной цитотоксичности; выявление механизма ингибирования пролиферации раковых клеток исследуемыми веществами; оценка *in vitro* вероятности развития и характер возможных побочных эффектов тестируемых веществ, связанных с гемолизом и образованием метгемоглобина в эритроцитах человека; определение токсичности тестируемых веществ.

Научная новизна и оригинальность: адаптированы методики исследования биологической активности веществ; определены антипролиферативная и антиоксидантная активности 5 синтетических соединений; установлено *in vitro*, что исследуемые вещества не вызывают образование метгемоглобина и не повышают индекс систем в эритроцитах крови человека; разработан метод определения прямой токсичности с использованием *Paramecium caudatum*, и произведена оценка прямой токсичности исследованных веществ; выявлен механизм воздействия веществ на пролиферацию раковых клеток; тестируемые соединения представляют интерес с точки зрения их применения в качестве менее токсичных и более эффективных противораковых веществ.

Решенная научная проблема. Выявлены новые молекулярные ингибиторы пролиферации раковых клеток, обладающие высокой селективной активностью и низкой токсичностью. Установлен механизм действия ингибиторов в отношении радикалов $ABTS^{\bullet+}$, $DPPH^{\bullet}$, $HO_2^{\bullet}$. Обнаружено, что исследуемые вещества не вызывают образования метгемоглобина и гемолиза в эритроцитах человека.

Теоретическая и практическая значимости работы. Выявлены новые ингибиторы пролиферации раковых клеток, обладающие высокой селективной активностью и низкой токсичностью, что позволило предложить их для предклинических исследований. Разработан метод установления зависимости токсичности от концентрации веществ, позволяющий ускорить и удешевить биотестирование. Выявлен механизм действия веществ на пролиферацию раковых клеток. Полученные результаты имеют научную значимость и могут быть использованы при чтении спецкурсов по Биофармацевтической химии и Биохимии.

Внедрение полученных научных результатов. Разработан и запатентован метод определения прямой токсичности веществ с использованием *Paramecium caudatum*. Запатентованы 2 молекулярных ингибитора пролиферации раковых клеток и одно вещество с антиоксидантной активностью. В результате модифицирования и адаптации методик исследования биологической активности веществ были внедрены 3 инновации.

GARBUZ OLGA

NOI INHIBITORI MOLECULARI ANORGANICI ŞI ORGANICI AI PROLIFERĂRII CELULELOR DE CANCER, MECANISME DE ACȚIUNE

163.02 – BIOCHIMIE

Rezumatul tezei de doctor în ştiinţe biologice

Aprobat spre tipar: 14.01.2021 Formatul hârtiei 60x84 $^{1}/_{16}$
Hârtie ofset. Tipar ofset. Tiraj 50 ex.
Coli de tipar.: 2,1 Comanda nr. 05/21.

Centrul Editorial-Poligrafic al USM
Str. Al. Mateevici, 60, Chisinau, MD, 2009