

CZU: 546.56:547-304.6

EVALUAREA BIOLOGICĂ A COMPUȘI LOR COORDINATIVI AI CUPRULUI(II) CU UNELE TIOSEMICARBAZONE HETEROCICLICE

Olga GARBUZ^{*,**}, Nadejda RAILEAN^{*,**}, Igor GOSTEV^{*},
Anna RUSNAC^{**,*}, Ion TODERAȘ^{*}, Aurelian GULEA^{**}

^{*}Institutul de Zoologie

^{**}Universitatea de Stat din Moldova

Au fost sintetizați 3 compuși noi: tiosemicarbazona 2-acetilpiridinei **H₂L**, cloro(tiosemicarbazona-2-acetilpiridinei) cupru(II) (**1**) și nitrato(tiosemicarbazona-2-acetilpiridinei)cupru(II) (**2**) care potențial posedă proprietăți antiproliferative față de celulele canceroase. Doxorubicina (7-[4-amino-5-hidroxi-6-metiloxan-2-il]oxi-6,9,11-trihidroxi-9-(2-hidroxiacetil)-4-metoxi-8,10-dihidro-7H-tetracen-5,12-dionă) a fost utilizată în calitate de compus anticancerigen de referință și Trolox (acid 6-hidroxi-2,5,7,8-tetramethylcroman-2-carboxilic) a fost utilizat ca compus antioxidant de referință. Compușii testați au demonstrat efect antioxidant înalt față de cationii radicali ABTS⁺ în comparație cu interacțiunea acestor cationi cu Trolox. Compușii testați au manifestat toxicitate generală față de *Daphnia magna* după 24 de ore de expunere cu determinarea unui șir de descreștere. Datele experimentale au indicat perspectivele pentru viitoare căutări ale substanțelor anticancerigene selective cu acțiune antioxidantă înaltă și toxicitate scăzută.

Cuvinte-cheie: activitate antioxidantă, ABTS radical cation, Trolox, tiosemicarbazona, toxicitate, *Daphnia magna*, Doxorubicină.

BIOLOGICAL EVALUATION OF COPPER(II) COMPLEXES WITH SOME HETEROCYCLIC THIOSEMICARBAZONES

Three new compounds were synthesized: thiosemicarbazone 2-acetylpyridine **H₂L**, chlor (thiosemicarbazone 2-acetylpyridine) dicopper(II) (**1**) and (thiosemicarbazone 2-acetylpyridine) dicopper(II) nitrate (**2**) which potentially possesses antiproliferative properties toward cancer cells. Doxorubicin (7-[4-amino-5-hydroxy-6-methylloxan-2-il]oxi-6,9,11-trihydroxi-9-(2-hydroxiacetyl)-4-metoxi-8,10-dihydro-7H-tetracen-5,12-dion) was used as the reference anticancer compound and Trolox (acid 6-hydroxi-2,5,7,8-tetramethylcroman-2-carboxilic) was used as the reference antioxidant compound. The tested compounds demonstrated a high antioxidant effect against ABTS⁺ radical cations than interaction with Trolox. The tested compounds showed general toxicity on *Daphnia magna* after 24 hours of exposure with a determination of decreasing string. The experimental data indicated the prospects for further search for selective anticancer substances with high antioxidant activity and low toxicity among tested compounds.

Keywords: antioxidant activity, ABTS radical cation, Trolox, thiosemicarbazone, toxicity, *Daphnia magna*, Doxorubicin.

Introducere

Remediile antineoplazice sunt divizate în citotoxice și citostatice. Doxorubicina (DOXO), cisplatina, fluorouracilul, hidroxiureea, ciclofosfamida sunt cele mai cunoscute remedii anticancerigene. **DOXO**, un medicament de primă linie, este considerat unul dintre cei mai puternici agenți chimioterapeutici aprobat de FDA (Food and Drug Administration). **DOXO** manifestă toxicitate, în special cardiotoxicitate, ceea ce obligă de a limita doza în timpul tratamentului. **DOXO** provoacă dezvoltarea leziunilor toxice ale mitocondriilor din cardiomiocite contribuind la creșterea stresului oxidativ [1].

În ultimii ani, un număr mare al complexilor de cupru(II) cu liganzi tiosemicarbazonici au fost raportați ca agenți farmacologici și ca agenți potențiali anticancerigeni și inhibitori ai cancerului. S-au dovedit a fi activi atât *in vitro*, cât și *in vivo*. Tiosemicarbazonele sunt o clasă de compuși organici care posedă un spectru larg de activități biologice, în special antiproliferative [2] și proprietăți medicale [3].

Tiosemicarbazonele și compușii coordinativi ai metalelor de tranziție deseori prezintă activități antiproliferative și antioxidative [4]. În cele mai multe cazuri, coordinarea tiosemicarbazonelor cu ionii de cupru(II) duce la creșterea semnificativă a activității biologice în comparație cu ionii altor metale 3d [5]. În acest sens, prezintă interes studierea compușilor coordinativi ai cuprului(II) [6].

În această lucrare a fost evaluată acțiunea antioxidantă a compușilor tiosemicarbazona 2-acetilpiridinei **H₂L**, cloro(tiosemicarbazona-2-acetilpiridinei)cupru(II) (**1**) și nitrato(tiosemicarbazona-2-acetilpiridinei)cupru(II) (**2**) care posedă potențiale proprietăți anticancerigene.

Toxicitatea compușilor testați a fost investigată *in vivo* pe *Daphnia magna* prin biotest și microanaliză. Activitățile biologice ale compușilor testați au fost comparate cu cele ale compușilor de referință. **DOXO** (7-[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-dionă) (Fig.1a) a fost utilizat în calitate de compus anticancerigen de referință. **Trolox** (acid 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxilic) (Fig.1b) a fost utilizat ca compus antioxidant de referință.

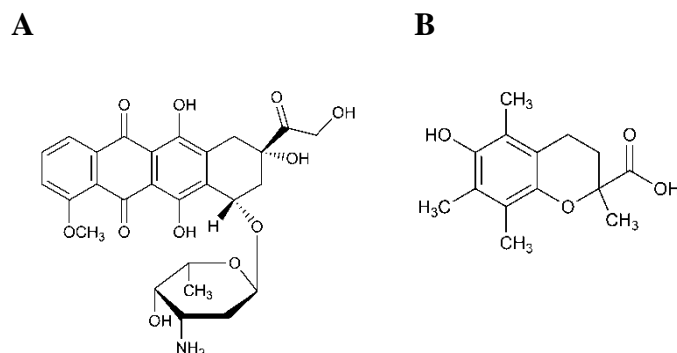


Fig.1. Formula de structură a: **DOXO** (7-[4-amino-5-hidroxi-6-metiloxan-2-il]oxi-6,9,11-trihidroxi-9-(2-hidroxiacetil)-4-metoxi-8,10-dihidro-7*H*-tetracen-5,12-dionă) (A); **Trolox** (acid 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxilic) (B).

Material și metode

Obiectele cercetării

Cercetarea dată a fost axată pe trei compuși noi:

- tiosemicarbazona 2-acetilpiridinei în calitate de ligand (**H₂L**)

și doi compuși coordinațivi ai cuprului(II):

- cloro(tiosemicarbazona-2-acetilpiridinei)cupru(II) (**1**)
- nitrato(tiosemicarbazona-2-acetilpiridinei)cupru(II) (**2**),

care au fost sintetizați în Laboratorul de cercetări științifice Materiale Avansate în Biofarmaceutică și Tehnică al Universității de Stat din Moldova.

Compușii testați și substanțele de referință au fost dizolvate în DMSO (dimetilsulfoxid) pentru a obține un stoc de soluții (10 mM) care au fost păstrate la temperatura de 7°C. Soluțiile din stoc au fost ulterior diluate cu DMSO pentru a obține soluții de 1-1000 μM folosite pentru teste biologice. Concentrația maximă finală a DMSO (<0,1%) nu a afectat viabilitatea *Daphnia magna*.

Activitatea de baleiaj a cation radicalului ABTS

Activitatea antioxidantă ABTS^{•+} a fost efectuată prin metoda descrisă de Re și colab. cu modificări. Radicalul ABTS a fost format prin reacția între soluția de ABTS^{•+} de 7 mM cu soluție de persulfat de potasiu de 2,45 mM, incubate la 25°C la întuneric timp de 12-16 ore. Radicalul format a fost diluat cu soluție tampon de acetat salin (0,02 M, pH 6,5).

Au fost preparate diluții de 19 substanțe experimentale în DMSO. După aceea, 20 μL din fiecare diluție a substanțelor experimentale au fost transferate într-o placă de microtitrare cu 96 de godeuri și 180 μL de soluție de lucru ABTS^{•+} a fost adăugată cu modulul de distribuire a cititorului hibrid (Synergy H1, Biotek). Acest amestec s-a agitat 15 s. Schimbarea absorbanței a fost măsurată la lungimea de undă de 734 nm după 30 de minute de incubare la 25°C. Experimentul a fost efectuat în 3 repetări. DMSO a fost utilizat ca martor. Doxorubicina, Troloxul au fost folosite ca standard. Troloxul (soluție metanolică de 2 mM) a fost utilizat ca referință în concentrații de diluție variind de la 0,1 până la 100 μM. Clorhidratul de doxorubicină (10 mM) preparat în DMSO a fost folosit ca referință în concentrații de la 1 până la 100 μM.

Procentul de inhibare a fost calculat după formula:

$$[(A_0 - A_1) / A_0] \times 100, \quad (1)$$

unde A₀ – absorbanta controlului, iar A₁ – absorbanta probei.

Test de toxicitate acută in vivo

Toxicitatea compușilor analizați a fost evaluată folosind *Daphnia magna* (Straus, 1820). *Daphnia magna* a fost preluată dintr-o cultură menținută partenogenetic la Institutul de Zoologie, Centrul de Cercetare a Invaziilor Biologice [7]. *Daphnia magna* a fost menținută în mediul de creștere aerat cu infuzie de paie și adaos de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (4,93 g/L), KCl (0,23 g/L), NaHCO_3 (2,59 g/L), CaCl_2 (11,76 g/L).

Organismele *Daphnia magna* au fost alese în funcție de mărimea lor și plasate în mediu de creștere, pe timp de 24 de ore. *Daphnia magna* a fost cultivată în plăci sterile transparente cu 24 de godeuri acoperite cu un capac pentru a evita capacitatea de poluare și evaporare și a asigura schimbul de gaze dintre aer și mediul de cultură. Fiecare godeu a conținut 10 organisme într-un 1 mL de mediu de creștere, precum și substanțele testate în concentrațiile corespunzătoare.

Biotestul a fost efectuat în patru concentrații (0,1, 1, 10 și 100 μM) ale substanțelor testate pentru a determina LC_{50} . Soluțiile de testare finale au conținut soluție de DMSO până la 0,1%. Soluția de DMSO 0,1% în mediul aerat ($\text{pH} \sim 7,5 \pm 0,2$; $\text{O}_2 \geq 6,0$ mg/L) a fost folosită în calitate de control negativ. În timpul experimentului *Daphnia magna* au fost incubate la $22 \pm 2^\circ\text{C}$ cu folosirea ciclului de 16 ore/8 ore de lumină/întuneric (500-1000 lx). Mobilitatea și viabilitatea organismelor au fost apreciate după 24 de ore de expunere. Experimentul a fost efectuat în repetare triplă.

Dafniile au fost considerate imobilizate în cazul în care nu pluteau în timp de 15 secunde după amestecarea blândă a soluției. Procentul de viabilitate ($V(\%)$) al *Daphnia magna* a fost calculat după formula:

$$V(\%) = \frac{N_{(\text{probă})}}{N_{(\text{control})}} \times 100, \quad (2)$$

unde: N – numărul de dafnii viabile.

Analiza statistică

Rezultatele testului de activitate antioxidantă (TAA) au fost raportate ca procentul de inhibare a substanțelor testate. Concentrația semimaximală de inhibiție (IC_{50}) a fost folosită ca indicator de eficacitate al TAA a substanțelor testate. Toxicitatea compușilor a fost prezentată sub forma valorilor de concentrație medie letală (LC_{50}), care au fost calculate din ecuația doza-răspuns determinată prin metoda potrivirii celor mai mici pătrate cu ajutorul software-ului GraphPad Prism. Toate datele sunt prezentate ca medii \pm o deviere standard (DS).

Rezultate și discuții

Această lucrare prezintă o serie de cercetări comparative privind TAA dintre o tiosemicarbazonă și doi complecși de cupru(II).

Activitatea antioxidantă a compușilor testați a fost comparată cu **DOXO** (clorhidrat de doxorubicină) și controlul antioxidant de referință **Trolox**. Se știe că cardiomiopatia indusă de complexul **DOXO** are un pronostic nefavorabil și deseori este fatală. Complexele **DOXO** provoacă afectarea toxică a mitocondriilor cardiomiocitelor contribuind la creșterea stresului oxidativ.

Rezultatele cercetărilor privind activitatea compușilor testați, **Trolox**, **DOXO**, împotriva cationilor radicali $\text{ABTS}^{+\cdot}$ sunt prezentate în Figura 2 sub formă de concentrații semimaximale de inhibiție (IC_{50}). Toți compușii testați au arătat activitate antioxidantă mai înaltă decât **Trolox** și **DOXO**. Coordinarea ligandului H_2L la ioni de cupru(II) duce la scăderea nesemnificativă a activității antioxidative.

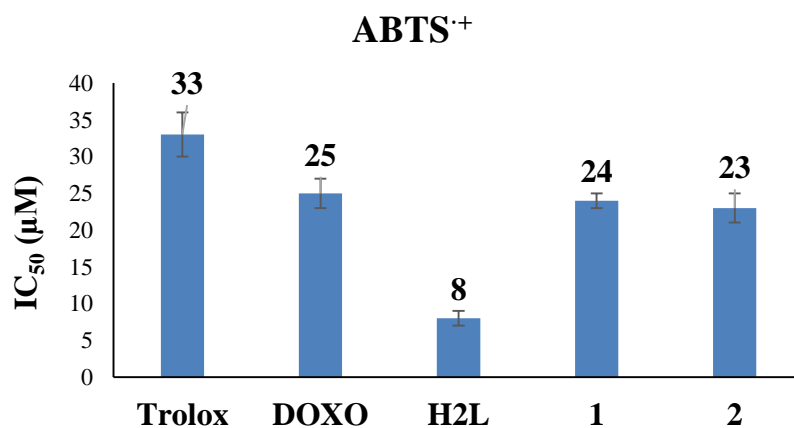


Fig.2. Valorile IC_{50} ale substanțelor sintetizate în raport cu cationii radicali $\text{ABTS}^{+\cdot}$.

Cercetările privind toxicitatea compușilor studiați reprezintă o etapă importantă în elucidarea remediilor și permite cercetarea lor în studiile preclinice și clinice. Protecția animalelor, inclusiv a celor participante la studiu, fiind principiul fundamental al tuturor cercetărilor de toxicitate, se recomandă ca aceste studii să fie efectuate *in vivo* pe organisme nevertebrate, evitându-se folosirea animalelor de laborator în toate cazurile posibile. *Daphnia magna* (Straus, 1820) este un organism cladoceran frecvent utilizat în evaluarea citotoxicității și activității biologice a compușilor [7,8].

Valorile LC_{50} ale compușilor testați au fost utilizate ca indicatori cantitativi ai toxicității lor și pentru evaluarea comparativă a rezultatelor obținute. Rezultatele biotestului cu *Daphnia magna* sunt prezentate în tabelul ce urmează.

Tabel

Toxicitatea *in vivo* a H_2L complexilor de cupru(II) 1-2 și DOXO asupra *Daphnia magna* după incubarea timp de 24 de ore

LC ₅₀ (μM) ± SD (μM)	
H₂L	15,6±3,0
1	≥100
2	≥100
DOXO	3,6±0,1

Compușii testați au manifestat toxicitate generală față de *Daphnia magna* după 24 de ore de expunere. Toxicitatea generală descrește în următorul șir: **DOXO** ≥ **H₂L** ≥ **1** = **2**.

Complexii **1**, **2** au manifestat toxicitate față de *Daphnia magna* cu $LC_{50} \geq 100 \mu M$. Așadar, toți compușii testați sunt mai puțin toxici decât **DOXO**. Coordinarea ligandului **H₂L** cu ioni de cupru(II) duce la scăderea toxicității în comparație cu **H₂L** necoordinat.

Intensitatea influenței compușilor în concentrație medie letală (LC_{50}) asupra *Daphnia magna* a fost determinată prin microanaliză (Fig.3). După cum era de așteptat, microscopia *Daphnia magna* de control (fără compuși testați) a indicat absența schimbărilor patologice în trunchiul *Daphnia magna*. Aceeași situație a fost observată după acțiunea complexilor **1**, **2** asupra *Daphnia magna*. Organismele *Daphnia magna* au fost la fundul godeurilor după incubare cu **H₂L** și **DOXO**. Cu ajutorul microscopului optic a fost evidențiat faptul că majoritatea dafniilor au fost ușor mișcate, în timp ce restul crustaceelor au rămas nemișcate. Membrele și trunchiurile *Daphniei magna* au fost deformatе și conținutul lor a fost amestecat cu mediile de creștere.



Fig.3. *Daphnia magna* (Straus, 1820).

Astfel, compușii testați au manifestat activitate antioxidantă înaltă și toxicitate mai scăzută în comparație cu **DOXO**, ceea ce prezintă un aspect important în dezvoltarea agenților anticancerigeni. În legătură cu rezultatele sus-numite, compușii testați pot fi propuși pentru cercetări ulterioare în domeniul activității antiproliferative pe celulele tumorale *in vitro*.

Concluzii

Toți compuși testați au manifestat activitate antioxidantă mai înaltă decât compusul de referință **Trolox**.

Cercetările privind toxicitatea compușilor testați pe *Daphnia magna* au arătat că acești compuși sunt mai puțin toxici față de remediile anticancerigene **DOXO**.

Compușii sintetizați: tiosemicarbazona 2-acetilpiridinei (**H₂L**), cloro(tiosemicarbazona-2-acetilpiridinei) cupru(II) (**1**) și nitrato(tiosemicarbazona-2-acetilpiridinei)cupru(II) (**2**) sunt de perspectivă pentru cercetări ulterioare în domeniul activității anticancerigene.

Referințe:

1. RAWAT, P.S., JAISWAL, A., KHURANA, A., BHATTI, J.S., UMASHANKER, N. Doxorubicin-induced cardiotoxicity: An update on the molecular mechanism and novel therapeutic strategies for effective management. In: *Bio-medicine & Pharmacotherapy*, 2021, vol.139, p.1-8. DOI: org/10.1016/j.biopha.2021.111708
2. ABREU RAMOS, A., MALHÃO, F., FERREIRA, A., ALVES, Â, CASTRO-CARVALHO, B., PRATA-SENA, M., ROCHA, E. Marine and Soil Fungi Extracts with Antiproliferative Activity Induce Morphological Alterations in Breast Cancer Cells. In: *Microscopy and Microanalysis*, 2015, no.21(S5), p.83-84. DOI:10.1017/S1431927615014221
3. MAJUMDAR, S. & VALDELLON, J. Surface Morphological Changes Of Hela Cells Exposed To Tamoxifen And Taxol. In: *Microscopy and Microanalysis*, 1999, no.5(S2), p.1270-1271. DOI:10.1017/S143192760001967X
4. PAHONTU, E., ILIES, D-C, SHOVA, S., OPREAN, C., PĂUNESCU, V., OLARU, O.T., RĂDULESCU, F.S., GULEA, A. Synthesis, Characterization, Antimicrobial and Antiproliferative Activity Evaluation of Cu(II), Co(II), Zn(II), Ni(II) and Pt(II) Complexes with Isoniazid-Derived Compound. In: *Molecules*, 2017, no.22(4), p.650. DOI:10.3390/molecules22040650
5. FUIOR, A., HIJAZI, A., GARBUZ, O., BULIMAGA, V., ZOSIM, L., CEBOTARI, D., HAOUAS, M., TODERAȘ, I., GULEA, A., FLOQUET, S. Screening of biological properties of MoV₂O₂S₂- and MoV₂O₄-based coordination complexes: Investigation of antibacterial, antifungal, antioxidative and antitumoral activities versus growing of *Spirulina platensis* biomass. In: *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2022, no.226, p.111627. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2021.111627>. ISSN 0162-0134
6. GULEA, A., GRAUR, V., ULCHINA, IA., BOUROSH, P., SMAGLII, V., GARBUZ, O., TSAPKOV, V. Synthesis, Structure, and Biological Activity of Mixed-Ligand Amine-Containing Copper(II) Coordination Compounds with 2-(2-Hydroxybenzylidene)-N-(prop-2-en-1-yl)hydrazinecarbothioamide. In: *Russian Journal of General Chemistry*, 2021, no.91(1), p.98-107. DOI: <https://doi.org/10.1134/S1070363221010114>
7. GARBUZ, O., TODERAȘ, I., TAPCOV, V., RAILEAN, N., GULEA, A. Some inorganic and organic biological agents. In: *Studia Universitatis Moldaviae*, 2021, nr.6(146), p.132-140. <https://doi.org/10.5281/zenodo.5702096>
8. GULEA, A., TODERAS, I., GARBUZ, O., ULCHINA, IA., GRAUR, V., RAILEAN N. Biological Evaluation of a Series of Amine-Containing Mixed-Ligand Copper(II) Coordination Compounds with 2-(2-hydroxybenzylidene)-N-(prop-2-en-1-yl)hydrazinecarbothioamide. In: *Microscopy and Microanalysis*, 2022, p.1-7. DOI: <https://doi.org/10.1017/S1431927622000733>

Notă: Investigațiile au fost realizate în cadrul Proiectelor: *Diversitatea arthropodelor hematofage, a zoo- și fitohelminților, vulnerabilitatea, strategiile de tolerare a factorilor climatici și elaborarea procedeelelor inovative de control integrat al speciilor de interes socioeconomic*, cifrul 20.80009.7007.12 și *Produse noi, inovative cu performanțe remarcabile în medicină (biofarmaceutică). Elucidarea mecanismelor moleculare și celulare ale acțiunii acestor produse noi și argumentarea folosirii lor la eficientizarea tratamentului unor patologii*, cifrul 20.80009.5007.10.

Date despre autori:

Olga GARBUZ, doctor în științe biologice, Institutul de Zoologie; Universitatea de Stat din Moldova.

E-mail: olhamos@mail.ru

ORCID: 0000-0001-8783-892X

Nadejda RAILEAN, cercetător științific, Institutul de Zoologie; Universitatea de Stat din Moldova.

E-mail: nadejdarailan@yahoo.com

ORCID: 0000-0001-7818-9200

Igor GOSTEV, doctorand, Institutul de Zoologie.

E-mail: gostev_i@list.ru

ORCID: 0000-0001-8913-7414

Anna RUSNAC, doctorandă, Școala doctorală Științe Biologice, Geomomice, Chimice și Tehnologice, Universitatea de Stat din Moldova.

E-mail: ana.rusnac@usm.md

ORCID: 0000-0002-2517-8927

Ion TODERAȘ, academician, doctor habilitat, profesor universitar, Institutul de Zoologie.

E-mail: iontoderas@yahoo.com

ORCID: 0000-0001-6159-5325

Aurelian GULEA, academician, doctor habilitat, profesor universitar, Universitatea de Stat din Moldova.

E-mail: guleaaurelian@gmail.com

ORCID: 0000-0003-2010-7959

Prezentat la 12.09.2022