

UNIVERSITATEA BABES-BOLYAI CLUJ-NAPOCA

PCCE 140/2008

SINTEZA CERCETARILOR
Etapa 2011

APLICATIILE BIO-MEDICALE ALE
COMPUSILOR METALELOR –
METALLOMICS

Director de proiect,
Academician Ionel Haiduc

Obiectivele propuse pentru anul 2011 faza in proiectul PCCE-140/2008 au fost realizate in totalitate. Colaborarea intre partenerii implicați in proiect a avut ca si rezultat elaborarea unor lucrări publicate/acceptate spre publicare respectiv trimise spre publicare in care sunt prezentate sinteza, caracterizarea si proprietățile biologice vizate de proiect. Se vor menționa in sinteza lucrării obiectivele acoperite in fiecare paragraf cu detalieri in special pentru datele netrimise spre publicare. In unele cazuri rezultatele au fost prezentate sub mai multe obiective pentru a păstra coerența prezentării.

Rezultatele obținute in acest an au fost valorificate dupa cum urmează:

9 lucrări apărute in reviste cotate ISI - **Suma Factorilor de impact 17,48**

3 lucrări acceptate spre publicare in reviste cotate ISI - Suma factorilor de impact 0,693

8 lucrări trimise spre publicare - Suma factorilor de impact 22,887

fata de angajamentul la contractare 10 lucrări/Factor cumulat 14

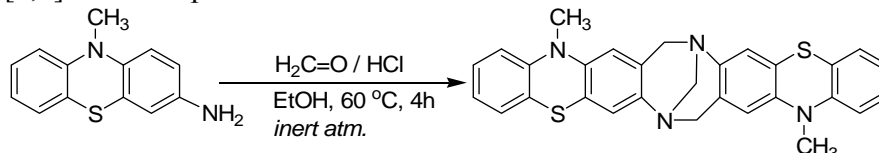
Obiectivele proiectului pentru anul 2011

- *Obținerea unor derivați organometalici cu diverse clase de liganzi de interes; P1 si P3*
- *Obținerea unor derivați coordinativi care sa contina un metal cu potențiala activitate biologic; P1, P3 si P5*
- *Caracterizarea structurala a combinațiilor chimice obținute; P1, P3, P4 si P5 - Aplicarea chimiei computaționale modelarea structurii și a comportamentului compușilor biologic activi ai metalelor in condiții apropiate de cele din organismul viu; P2*
- *Conceperea si dezvoltarea unui model analitic care sa redea cat mai fidel fenomenul de transfer controlat al componentului activ in mediul biologic P9*
- *Mărirea biocompatibilitatii; P5*
- *Studiul genotoxicitatii substanțelor nou sintetizate P6*
- *Studiul bazelor moleculare ale rezistentei la antineoplasticele pe baza de metale de interes biologic P7*
- *Testarea substanțelor „ in vivo ” si analizarea rezultatelor P8*
- *Studii de chimie organometalica si coordinativa a metalelor in condiții relevante biologic; P1, P3, P4 si P5*
- *Studiul relației structura-activitate pentru clasele de compuși care prezintă activitate biologica; P1,P2, P3, P4 si P5*
- *Studiul prin modele a comportamentului elementului activ in ambienta asemănătoare cu cea din organismul viu; P2*
- *Urmărirea mecanismelor moleculare de acțiune ale compușilor cu activitate biologica eficienta; P5*
- *Identificarea fenomenelor la nivel molecular legate de mecanismele de reparare a leziunilor apărute in urma tratamentului cu metale P6*
- *Studiul mecanismelor moleculare ale răspunsului imun medicamentele consacrate pe baza de platina P7*
- *Testarea substanțelor „ in vivo ” si analizarea rezultatelor P8*

I.1.Obtinerea unor derivati organometalici cu diverse clase de liganzi de interes

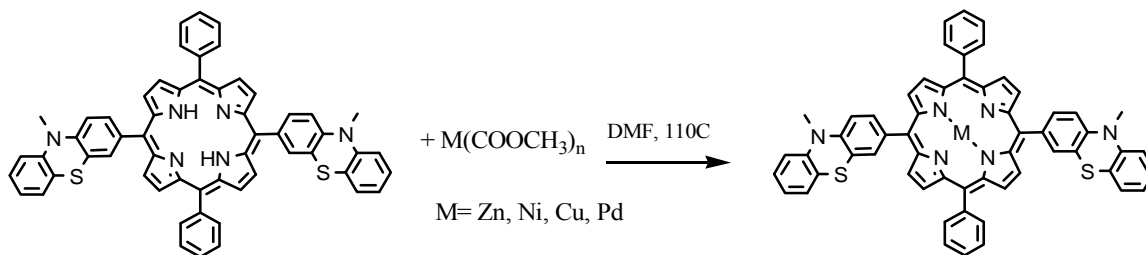
-Obtinerea unor liganzi heteropolitopici:

Seria de **analogi fenotiazinici ai Bazelor Troger** a fost completata si diversificata prin folosirea de noi precursori (10-octil-2-amino- si respectiv 10-metil-3-amino-fenotiazine) (schema 1). Folosind intreaga gama de BT sintetizate s-a formulat ipoteza unui control steric asupra regioselectivitatii reactiei de formare a punctii de metano[1,5]diazocina prin mecanismul de SE aromatica.



Schema 1

Seria de **derivati porfirinici meso-substituiti** a fost completata si diversificata prin prepararea de noi *meso-bis*(fenotiazin-3-il)-porfirine, care au fost supuse unor reactii de complexare folosind saruri de Zn, Ni, Cu si respectiv Pd (Schema 2).



Schema 2

Au fost sintetizati si caracterizati o serie de derivati elementorganici care contin unul sau mai multe heteroelemente cu activitate biologica potentiala cum ar fi **difosfaalchenilgermilenele si difosfaalchenilstanilenele**. Acesti compusi sunt de mare interes datorita prezentei in molecula a siturilor multiple de coordinare: centrul metalic divalent Ge(II) sau Sn(II), legaturile duble P=C si atomii de fosfor. Pentru determinarea capacitatii de coordinare a acestor derivati s-a examinat la inceput modul de coordinare a (NHC)Ge(Mes*P=C(Cl))₂ la fragmentele organometalice de tipul [codW(CO)₄] (cod = 1,5-ciclooctadiena) si [nbdMo(CO)₄] (nbd = 2,5-norbornadiena). Se constata ca liganzii de tip cod si nbd se indeparteaza usor in THF la 60 °C obtinandu-se complexii corespunzatori de W si Mo. Din analiza fizico-chimica efectuata rezulta ca derivatii cordinativi nu sunt echivalenti, coordinarea la metal se face in cele doua cazuri prin atomul de Ge(II) si prin unul din cei doi atomi de fosfor, celalalt atom de fosfor ramanand “pendant”. Atomul de germanium in acesti complexi prezinta chiralitate, care este data nu numai de modul de coordinare prin doua puncte, rezultand inechivalenta celor doua unitati P=C dar si datorita unei rotatii incetinite a fragmentului carbonic NHC arondat la atomul de Ge(II), rotatie care este pusa in evident prin analiza RMN.

Sinteza unor **liganzi heteropolitopici arsino-tiolici As/S respectiv As/S/N** (reprezentati in Figura 1)

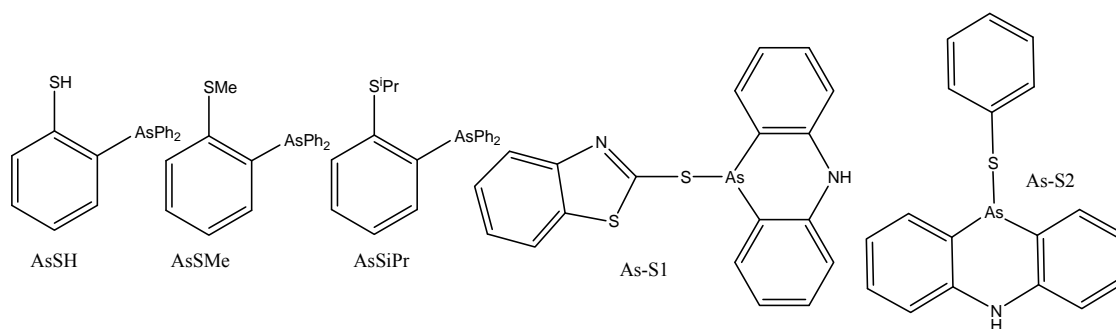


Figura 1. Liganzi heteropolitopici As/S si As/S/N

cuprinde doua etape: intr-o prima etapa s-a realizat litierea sau ortolitierea tiolilor respectiv a tioeterilor, urmata in etapa a 2-a de reactia de transmetalare cu arsina corespunzatoare. Exceptie face ligandul **AsSMe**, care s-a obtinut prin litierea ligandului **AsSH** urmata de reactia **AsSLi** cu CH_3I , in hexan la temperatura camerei. Cei cinci liganzi au fost caracterizati prin spectroscopie IR, RMN, si spectrometrie de masa.

- *Studiul reactivitatii derivatilor sintetizati in diferite medii.*

Studiul **proceselor redox** la care pot lua parte analogii fenotiazinici ai Bazelor Troger se bazează pe experimente de voltametrie ciclică efectuate în solvent organic (DCM), folosind drept electrolit: ${}^n\text{Bu}_4\text{N}^+\text{PF}_6^-$. Compușii păstrează și amplifică proprietatile redox recunoscute ale nucleului fenotiazinic, prezentând două trepte de oxidare monoelectronică succesivă care generează un curent de intensitate proporțională cu numărul de nuclee fenotiazinice din structura moleculară (fig 2).

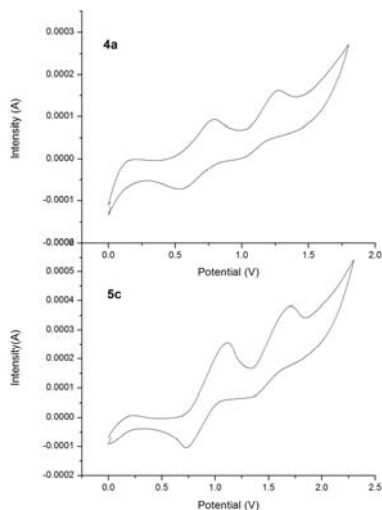


Fig. 2. Voltamograme ciclice ale: **4a** 2-amino-10-etil fenotiazina precursor, **5c** analog fenotiazinic al Bazei Troger. Condiții de înregistrare: 10^{-2} M în solvent CH_2Cl_2 , 20°C , $\nu = 250$ mV/s, electrolit: ${}^n\text{Bu}_4\text{N}^+\text{PF}_6^-$, Pt electrod de lucru, Pt contraelectrod, Ag/AgCl electrod de referință.

Reactivitatea derivatilor $\text{NHC}:\text{M}[\text{C}(\text{Cl})=\text{PMe}^*]_2$ ($\text{M} = \text{Ge}, \text{Sn}$) a fost investigata si prin reactia cu agenti oxidanti cum ar fi S_8 si Se . In cazul germilenei, in urma reactiei cu S_8 si Se se obtin derivati cu formare de dubla legatura $\text{Ge}=\text{S}(\text{Se})$. Acestia au fos investigati fizico-chimic si li s-a determinat structura moleculara prin difractie de raze X pe monocristal. Derivatul cu seleneiu ciclizeaza, cu formarea unui compus care contine in

ciclu 2 atomi de germaniu si 3 de seleniu. Prin reactia de oxidare a stanilenei cu S8 s-a obtinut direct dimerul ciclic (conformerul trans), in care ciclul SnSSnS este perfect planar.

I.2.Obtinerea unor derivati coordinativi care sa contina un metal cu potentiala activitate biologica

Obtinerea unor derivati coordinativi cu metale rare

Reactivitatea liganzilor arsino-tiolicici As/S asupra metalelor tranzitionale (Pt, Pd) in vederea obtinerii de complexi cu potential biologic, a reprezentat un obiectiv important al acestei etape. Posibile modalitatile de coordinare ale acestor liganzi heterotopici polidentati redade schematic in figura 3, sunt sugestive pentru interactiunea cu molecule cu relevanta biologica.

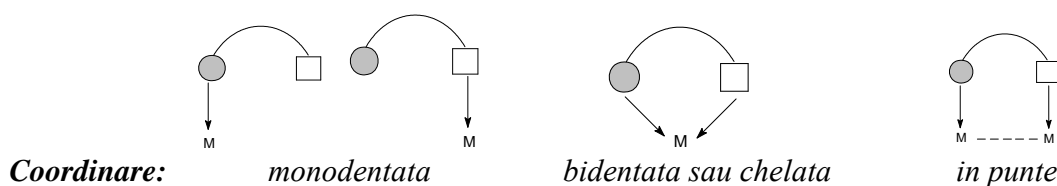


Figura 3. Modalitati de coordinare ale liganzilor heteropolitopici

Au fost sintetizati complexi ai Pd(II) si Pt(II) cu liganzi arsino-ariltiolicici. Rezultatele bune obtinute anterior, in cadrul grupului de cercetare, referitoare la proprietatile antitumorale ale unor complexi de Pd si Pt cu liganzi de tip *As,O* a impus o noua abordare de sinteza si anume: sinteza de noi complexi ai Pd si Pt cu liganzi analogi de tip *As,S*. Liganzii utilizati au fost: **AsSH**, **AsSMe** si **AsS^tPr**. Prin reactia **AsSH** cu $[MCl_2(cod)]$ (M=Pd, Pt, cod=1,5 ciclooctadiena) in raport molar 2:1, s-au obtinut complexi cu formula generala ML_2 .

In cazul reactiei germilenei $(NHC)Ge(Mes^*P=CCl)_2$ la tratare cu $ClAuSMe_2$ sau AuI s-au obtinut cantitativ complexii in care germilena coordoneaza la Au numai prin atomul de Ge(II). Acesti compusi au fost complet caracterizati, structura moleculara a fost determinata prin difractie de raze X pe monocristal.

-Studiul interactiunii cu moleculele biologice prin diverse mecanisme cum ar fi coordinarea metalelor (cu sau fara contributia ligandului), eliberare de oxid de azot etc.
S-a studiat efectul compusilor de referinta pe baza de platina (cisplatina, carboplatina, oxaliplatina) asupra structurii si reactivitatii unor metaloproteine cu implicare in stresul oxidativ, trecand apoi la validarea rezultatelor prin confirmarea acestor efecte si asupra celulelor intacte (studiindu-se deocamdata celule din sange, in special hematii, dar si E. coli). S-au identificat astfel noi modalitati prin care aceste medicamente pot induce efecte secundare, dar si modalitati de contracarare a acestora. De asemenea, s-a testat efectele compusilor nou-sintetizati in cadrul proiectului, asupra acelorasi sisteme unde compusii de referinta au dat rezultate, evidentiindu-se diferente in reactivitate care se pot partial corela cu elemente de structura, ca de exemplu sterice sau de hidrofobicitate. De asemenea, s-au sintetizat si derivati proteici cu posibile activitati biologice.

I.3. Caracterizarea structurala a combinatiilor chimice obtinute.

-Caracterizarea fizico-chimică in solutie, prin metode specifice (RMN multinuclear, IR, UV-VIS, etc).

Compușii noi au fost complet caracterizați din punct de vedere structural prin metode spectroscopice moderne: RMN de înaltă rezoluție, FT-IR și spectrometrie de masă. Experimente RMN bidimensionale de corelare homonucleară ^1H - ^1H (NOE Diff) și heteronucleară ^1H - ^{13}C (HMBC), au fost utilizate in scopul identificării elementelor cheie din structurile policiclice rigide.

Spectrele de absorbtie și emisie UV-Viz ale analogilor fenotiazinici ai Bazelor Troger și respectiv ale derivatilor cu structura porfirinică au pus in evidență existența unitatilor fluorofore responsabile pentru deplasări Stokes foarte de mari ($8000\text{-}10.000\text{ cm}^{-1}$), și randamente cuantice de fluorescența moderate (5-12%). Valorile mari ale deplasarilor Stokes fac posibilă identificarea prezentei acestor compusi in amestecuri complexe, formate din diferite clase de compusi care contin unitati aromatice cu absorbtii tipice in jurul valorii de 350nm. Emisia de fluorescența apare atat in solutii diluate cat si in stare solida, dupa cum poate fi observat in figura 4.

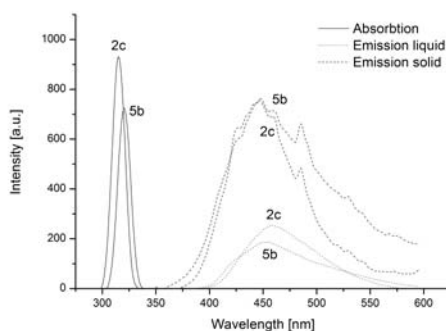


Figura 4. Spectre UV-Viz de absorbtie și emisie ale compusilor reprezentativi **2c** 2-amino-10-metil fenotiazina precursor al Bazei Troger și **5c** analog fenotiazinic al Bazei Troger.

Caracterizarea derivatilor obtinuti in stare solida, inclusiv determinarea structurii moleculare prin difractie de raze X pe monocristal.

Geometria și asocierile moleculare ale noilor derivati au fost puse in evidenta prin inregistrarea spectrelor de difractie de raze X pe monocristale.

Geometria analogilor fenotiazinici ai bazelor Troger cu forma V rigidă, ce impune o simetrie moleculară C_2 , a putut fi complet elucidată prin aceasta metodă. In rețeaua cristalină s-au pus in evidență molecule aparținând perechilor de diastereoizomeri în care configuratiile centrelor de chiralitate de la nivelul puntii de metano[1,5]diazocina sunt completate de unitati fenotiazinice continând ca element stereogen atomul de azot cu geometrie piramidală, care însă pastrează o singură configurație preferată. In figura 5 este prezentată structura moleculară a unei Baze Troger reprezentative, precum și a precursorului fenotiazinic.

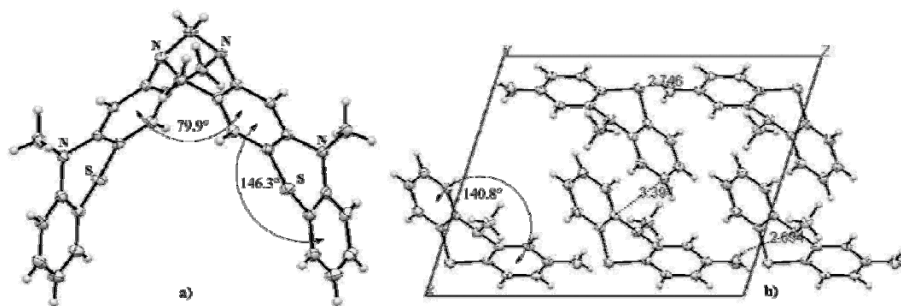


Figura 5. Structura moleculara a unei Baze Troger reprezentative si a precursorului 10-metil-2-amino-fenotiazina. Sunt indicate unghiurile tipice de pliere si distante interatomice (Å) intre molecule invecinate spartial .

Structura moleculara a ligandului **AsMe** s-a determinat prin DRX pe monocristal (Figura 6).

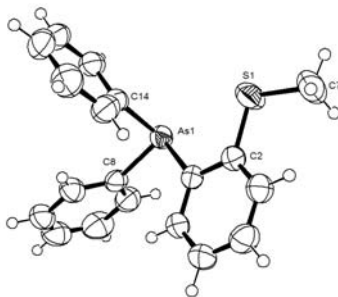


Figura 6. Structura moleculara a ligandului **AsMe**

Structura complexului $[\text{codW}(\text{CO})_4]$ (cod = 1,5-ciclooctadiena) a fost univoc determinata prin difractie de raze X pe monocristal (Figura 7).

In cazul reactiei germilenei $(\text{NHC})\text{Ge}(\text{Mes}^*\text{P}=\text{CCl})_2$ cu ClAuSMe_2 sau AuI s-au obtinut cantitativ complexii in care germilena coordoneaza la Au numai prin atomul de Ge(II). Si acesti compusi au fost complet caracterizati si li s-a determinat structura moleculara prin difractie de raze X pe monocristal (figura 8).

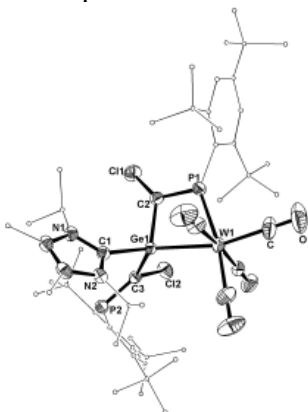


Figura 7 Structura moleculara a complexului $[\text{codW}(\text{CO})_4]$

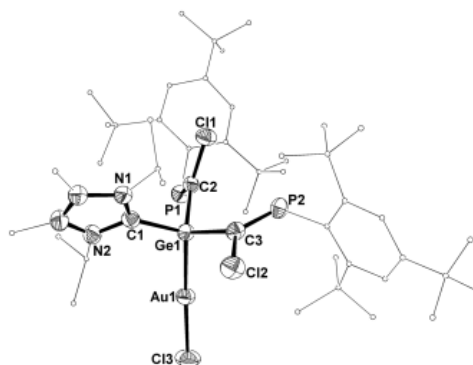


Figura 8 Structura moleculara a complexului germilenei

Derivatii continand dubla legatura Ge=S(Se) au fos investigati fizico-chimic si li s-a determinat structura moleculara prin difractie de raze X pe monocristal. Derivatul cu seleneiu ciclizeaza, cu formarea unui compus care contine in ciclu 2 atomi de germaniu si 3 de seleniu (figura 9). Prin reactia de oxidare a stanilenei cu S8 s-a obtinut direct dimerul ciclic (conformerul trans), in care ciclul SnSSnS este perfect planar (figura 10)

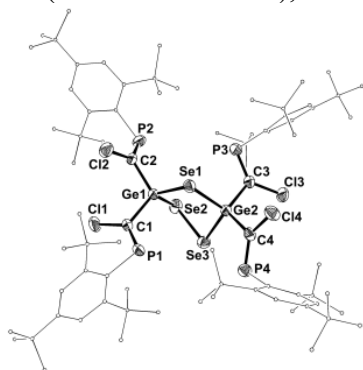


Figura 9 Structura moleculara

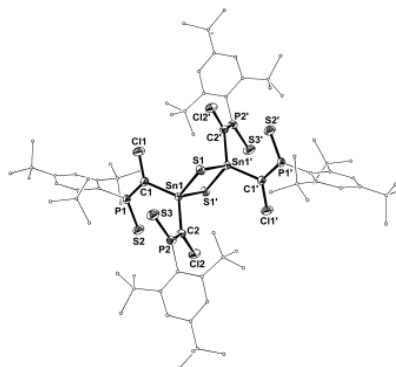


Figura 10 Structura moleculara

Complecsi ai Pd(II) si Pt(II) cu liganzi arsino-ariltiologici

Prin reactia AsSH cu $[\text{MCl}_2(\text{cod})]$ ($\text{M}=\text{Pd}, \text{Pt}$, $\text{cod}=1,5$ ciclooctadiena) in raport molar 2:1, s-au obtinut complecsi cu formula generala ML_2 , a caror structura moleculara este descrisa in Figura 11.

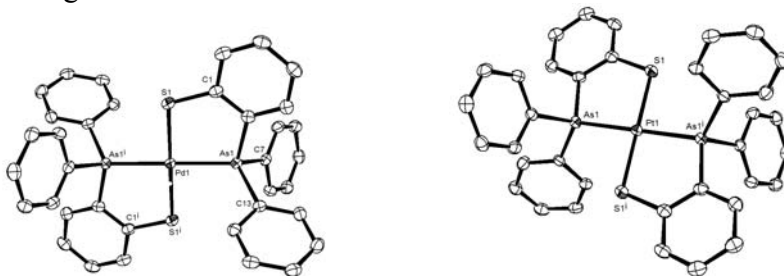


Figura 11. Structura moleculara a complexelor $[\text{Pd}\{\text{AsPh}_2(2\text{-SC}_6\text{H}_4)\text{-k}^2\text{S,As}\}_2]$ si $[\text{Pt}\{\text{AsPh}_2(2\text{-SC}_6\text{H}_4)\text{-k}^2\text{S,As}\}_2]$ (atomii de hidrogen sunt omisi pentru claritate)

In ambii complecsi se observa o coordinare bidentata *trans S,S*, *trans As,As* a liganzilor fata de Pd respectiv Pt, iar geometria in jurul centrului metalic este plan patratica.

Reactia liganzilor AsSMe respectiv AsS^iPr cu $[\text{MCl}_2(\text{cod})]$, in raport molar 2:1, a condus la complecsi cu formula generala $[\text{MCl}_2\text{L}]$ (*unde*: $\text{M}=\text{Pd}, \text{Pt}$, $\text{L}=\text{AsSMe}$ si AsS^iPr). Spre deosebire de analogii *As,O* (unde s-a observat o coordinare monodentata a ligandului, prin atomul de As, fata de central metalic), liganzii *As,S* realizeaza o coordinare bidentata la Pd respectiv Pt (pentru exemplificare vezi complexul $[\text{PdCl}_2\{\text{AsPh}_2(2\text{-S}^i\text{PrC}_6\text{H}_4)\text{-k}^2\text{S,As}\}_2]$ (**3**) in Figura 12).

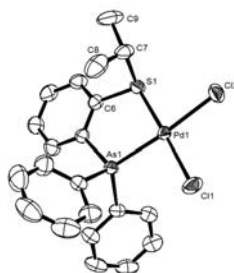


Figura 12. Structura moleculara a complexului $[PdCl_2\{AsPh_2(2-S^iPrC_6H_4)-k^2S,As\}_2]$ (**3**) (atomii de hidrogen sunt omisi pentru claritate)

I.4. Aplicarea chimiei computationale modelarea structurii și a comportamentului compusilor biologic activi ai metalelor in conditii apropiate de cele din organismul viu

Optimizări ale structurilor combinațiilor cu diferiți liganzi. Aplicarea diverselor modele de solvent.

*Calculare in faza lichida cu modele continue de solvent respectiv cu solvent explicit luat in considerare pentru a evalua efectul ambianței asupra structurii moleculare (din **Ob.II.3**)*

*Calcularele vor fi efectuate utilizând metode ONIOM (in faza lichida) in doua-trei straturi - incluzând DFT pentru partea activa si metode semiempirice/mecanica moleculara pentru straturile următoare ((din **Ob.II.3**)*

Pentru a evalua abilitatea de coordinare a sistemelor $Ge(CR_2 = PR_1)_2$ ($R_1 = H, Me, Ph, Mes; R_2 = H, Me, Ph, Cl, F, SiMe_3$) si pentru a stabili efectele sterice si electronice care le influenteaza reactivitatea, a fost efectuat un studiu MO. S-a evaluat diferenta energetica intre starea singlet si triplet precum si efectul grupării R din pozitia beta si gama fata de Ge(II) in cresterea stabilitatii acestor sisteme. In ceea ce priveste abilitatea de coordinare s-a observat ca se prefera coordinarea prin atomul de Ge(II) dar in cazul W, diferenta energetica intre compusul coordinat prin Ge(II) si P este foarte mica, ceea ce sugereaza posibilitatea coordinării prin ambele centre conective, asa cum s-a observat experimental.

O alta directie a fost investigarea proprietatilor calixarenelor de molecula transportoare a componentelor active. In acest sens au fost efectuate studii computationale privind marimea cavitatii unor derivati calixarenici si modul in care proprietatile electronice ale sistemului host/guest influenteaza capacitatea de transport a calixarenelor. Au fost efectuate calcule *ab initio* la nivel HF/6-31G(d) pe o serie de tio-calix[n]arene $n=4,6$, in prezenta si in absenta unor cationic de mono si divalent ($Li^+, Na^+, Cs^+, Ca^{2+}$ si Ba^{2+}) si s-au evaluat interactiunile dintre acesti ioni si sistemul calixarenic gazda. Se constata ca prezenta gruparilor functionale donor/acceptor care duc al formarea de legaturi de hidrogen la partea superioara a calixarenei stabilizeaza sistemele host/guest.

Partenerul P2 a adus contribuții la studiul structurii geometrice si electronice, ca si a reactivității unor structuri metalice, organometalice si organice de relevanta biologica fie ca substanțe cu activitate biologica, fie ca metaboliti sau precursori ai acestora. De asemenea, s-au studiat metaloenzime care prin rolul lor in semnalizare si stress oxidativ sunt implicate/implicabile in mecanisme de acțiune biologica relevante pentru proiect, si modele ale acestora. Metodele folosite au inclus DFT, Hartree-Fock, metode semiempirice (ZINDO/S, PM3, PM6, AM1) si empirice, prin optimizari de geometrie in

vid și în solvent, calcule de proprietăți electronice și spectrale, și prin simulări de dinamică moleculară și QM/MM. S-au obținut astfel date care au permis caracterizarea centrului catalitic pe baza de cupru dintr-o familie de oxidaze care include ceruloplasmina și lacaza. Au fost simulate spectre UV-vis, RMN, IR, Raman și RES; după știința noastră este prima dată în țară când se folosesc metode ab initio pentru simularea spectrelor RES în centri metalici (incluzând factorii g), și cu atât mai mult în metaloenzime. Acest centru este responsabil pentru activarea unor compuși potențial antioxidanți aromatici, transformându-i însă, în funcție de concentrație, și în pro-oxidanți. S-au obținut rezultate care releva detalii la nivel electronic asupra mecanismelor prin care legătura oxigen-oxigen este activată în sisteme relevante pentru stresul oxidativ, dar și în compuși de sinteză cu potențială activitate biologică, bazați pe metale precum platina sau aurul. Pentru sisteme precum superoxid dismutaza, bleomicina ferică, bleomicina cúprică, sau modele de citocromi P450 bazate pe porfirazine, s-au identificat structuri încă neizolate experimental (stări de valență înaltă la metal, aducți cu oxigenul molecular, cu superoxidul, cu peroxidul) și s-au formulat raționamente pentru aspecte încă neexplicate ale reactivității, formulându-se în plus și predicții. Acestea au inclus observații asupra reactivității diferite a stărilor de spin (în superoxid reductaze comparativ cu citocromii P450 sau bleomicina ferică, dar și în porfirazine, cu efect asupra barierei de clivare în legăturile fier-oxigen și în legăturile oxigen-oxigen), diferențe structurale între compuși aparent înrudiți (bleomicina ferică vs bleomicina cúprică). S-au examinat de asemenea și metaboliti rezultați din acțiunea unor astfel de sisteme asupra compușilor organici bioactivi. Pentru sisteme de tip platina/paladiu/aur-peroxo/hidroperoxo s-au examinat structuri electronice și geometrice și s-a identificat o nouă familie de compuși capabili de electromerie, similari în acest fel claselor de compuși de fier și cupru binecunoscuți în chimia bioanorganică. Prezența unor liganzi de hidrogen în unele dintre sistemele de referință din această categorie a dus și la descoperirea unui fenomen de electromerie încă neexplorat în literatură, implicând hidrurile metalelor tranzitionale. Și în această clasă s-au efectuat simulări de spectre UV-vis și vibraționale. O direcție nouă pentru acești complecși, deschisă în 2011, este dinamica ab initio, care poate permite predicții de precizie rezonabilă asupra evoluției în timp a structurii în condiții mai realiste (temperatura camerei) - din nou o direcție care după știința noastră este abordată pentru prima oară la noi în țară. S-au efectuat de asemenea primele calcule asupra efectului câmpului electric asupra structurii complecșilor de interes în cadrul proiectului, evidențiindu-se efecte măsurabile; acest aspect este important, deoarece complecșii cu potențial terapeutic sintetizați în cadrul proiectului sunt foarte probabil supuși câmpurilor electrice la traversarea membranelor sau la legarea de biopolimeri încarcați electric.

De asemenea, s-au formulat predicții structurale asupra unor complecși de fier și carbonari care au permis explorarea de noi paradigme structurale pentru compuși multinucleari cu potențială activitate biologică.

II.1. Studii de chimie organometalica si coordinativa a metalelor in conditii relevante biologic

Obtinerea unor noi compusi din clasele cele mai reprezentative pentru activitatea biologica.

Stabilirea protocoalelor generale de obtinere a compusilor relevanti din punct de vedere biologic

Realizarea unor studii fizico-chimice in vederea determinarii structurii combinatiilor obtinute.

Structura generica a compusilor cu structura de baza de *meso*-fenotiazinil-fenil-porfirine este prezentată în Figura 1, iar denumirile codificate ale catorva dintre compusi sunt trecute în Tabelul 1. Au fost gasite conditiile optime atat pentru reactia de condensare in mediu acid a 3-formil-fenotiazinei si a altor aldehide aromatice cu pirol precum si pentru complexare folosind saruri ale unor metale divalente.

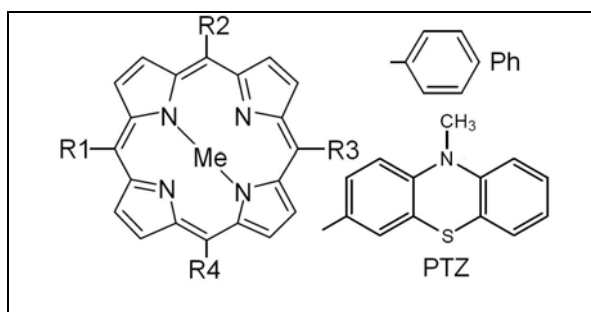


Figura 13. Reprezentarea schematică a derivatilor cu structura de *meso*-fenotiazinil-fenil-porfirine

Tabelul 1. Denumirile codificate ale compuşilor investigaţi electrochimic, stabilite în corelaţie cu substituenţii greşaţi pe nucleul porfirinic.

R1, R3	R2	R4	Me(II)	Simbolul compusului
	Ph	Ph		H ₂ Ph ₄ Porph
Ph	Ph	Ptz		H ₂ PtzPh ₃ Porph
	Ptz	Ptz	-	H ₂ Ptz ₂ Ph ₂ Porph
Ptz	Ptz	Ptz		H ₂ Ptz ₄ Porph
	Ph	Ph		NiPh ₄ Porph
Ph	Ph	Ptz	Cu	NiPtzPh ₃ Porph
	Ptz	Ptz		NiPtz ₂ Ph ₂ Porph
Ptz	Ptz	Ptz		NiPtz ₄ Porph
	Ph	Ph		CuPh ₄ Porph
Ph	Ph	Ptz	Ni	CuPtzPh ₃ Porph
	Ptz	Ptz		CuPtz ₂ Ph ₂ Porph
Ptz	Ptz	Ptz		CuPtz ₄ Porph
	Ph	Ph		PdPh ₄ Porph
Ph	Ph	Ptz	Pd	PdPtzPh ₃ Porph
	Ptz	Ptz		PdPtz ₂ Ph ₂ Porph

Au fost caracterizați electrochimic, prin voltametrie ciclică (VOC) și voltametrie cu undă pătratică (SWV, Square Wave Voltammetry) 15 noi compuși porfirinici, precum și complexii acestora cu ionii de Cu(II), Ni(II) și Pd(II).

Măsurătorile prin VOC au fost efectuate la o viteză de baleiaj de 100 mV/s, iar pentru măsurătorile prin SWV s-a folosit o durată a treptei de potențial (Δt) de 20 ms, o înălțime a treptei de potențial de 2 mV și o amplitudine a impulsurilor bipolare de ± 50 mV, rezultând o viteză aparentă de baleiaj tot de 100 mV/s. Toate măsurătorile au fost efectuate în prezență de tetra n-butilamoniu hexa fluorofosfat 0.1 M ($\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{)}_4\text{N}(\text{PF}_6)$; Fluka, Elveția; TBAPF6), cu rol de electrolit suport, dizolvat în diclormetan (CH_2Cl_2 , Merck, Germania). Voltamogramele obținute pentru unii din compușii porfirinici nou sintetizați sunt prezentate în Figura 14.

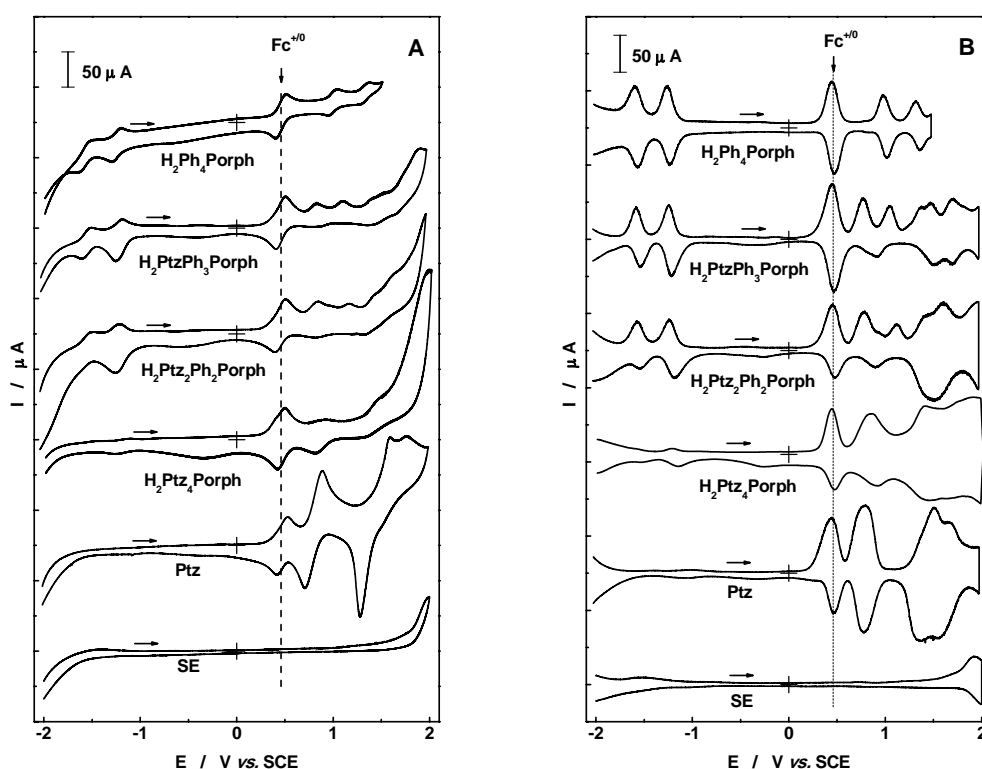


Figura 14. Voltamograme ciclice (A) și de undă patrată (B) pentru derivații porfirinici substituiți cu 0, 1, 2 sau 4 grupări N-metil-fenotiazinil (Ptz). SE= electrolit suport

Introducerea în macrociclul porfirinic a ionilor de Ni(II), Cu(II) sau Pd(II) conduce la deplasarea potențialelor de pic ale nucleului porfirinic. Un exemplu în acest sens este prezentat în Tabelul 2. Pe de altă parte, antrenarea liganzilor porfirinici investigați în complexi cu ioni ai metalelor tranziționale se traduce într-o variație specifică a diferenței de energie dintre orbitalii HOMO și LUMO, valoare estimată prin mărimea ΔE_1 (Tabelul 2).

În urma studiilor efectuate, s-a constatat că reactivitatea compușilor porfirinici nou sintetizați poate fi modificată în două moduri:

- prin grefarea unor substituenți în pozițiile *meso* ale nucleului porfirinic;
- prin complexare cu ioni ai unor metale tranzitionale.

De asemenea, așa cum era de așteptat, s-a observat că efectul complexării cu ionii de Ni(II), Cu(II) și Pd(II) este mult mai puternic decât cel exercitat de substituenții fenotiazinici grefați pe nucleul porfirinic.

Tabelul 2. Valorile potențialelor de oxidare evaluate din SWV în funcție de natura speciei centrale, pentru compuși având ca ligand H₂Ph₄Porph.

Compus	Proces redox examinat				$\Delta E_{1/2}^*$
	Porph ⁻²	Porph ^{0/-}	Porph ⁺⁰	Porph ^{+2/+}	
H ₂ Ph ₄ Porph	-1.588	-1.250	1.000	1.332	2.250
NiPh ₄ Porph	-1.898	-1.320	1.016	1.246	2.336
CuPh ₄ Porph	-1.756	-1.346	0.978	1.358	2.324
PdPh ₄ Porph	-1.772	-1.326	1.098	1.490	2.424

$$*\Delta E_{1/2} = E_{1/2}(\text{Porph}^{+0}) - E_{1/2}(\text{Porph}^{0/-})$$

Pentru procesele redox corespunzătoare primei reduceri, primei oxidări și celei de a doua oxidări ale ciclului porfirinic, variația potențialelor standard formale corespunzătoare compușilor substituiți, măsurată față de cei nesubstituiți, depinde liniar de numărul substituenților fenotiazinici grefați în poziție *meso*. În esență, această constatare reflectă faptul că între comportarea redox a compușilor investigați și structura acestora există o corelație liniară de energie liberă de tip Hammett.

II.2. Studiul relației structura-activitate pentru clasele de compuși care prezintă activitate biologică.

Determinarea mecanismelor reacțiilor de formare a compușilor coordinativi și organometalici.

Stabilirea reactivității claselor de compuși obținute și a modului de acțiune în mediu biologic.

S-a studiat efectul compușilor de referință pe baza de platina (cisplatina, carboplatina, oxaliplatina) asupra structurii și reactivității unor metaloproteine cu implicare în stresul oxidativ, în continuarea experimentelor efectuate în 2010. Au fost urmărite ca ținte hemoglobina, mioglobina, citocromul c, ceruloplasmina, și alte enzime, folosindu-se reacții în soluție omogenă sau cu lipozomi pe baza de lecitina. S-a trecut apoi la validarea rezultatelor prin confirmarea acestor efecte și asupra celulelor intacte. Astfel, au fost studiate efectele asupra celulelor din sânge, în special hematiile, demonstrându-se prin spectre UV-vis și prin microscopie electronică un efect asupra morfologiei celulelor însoțit de uzarea lor parțială și de autooxidare accelerată a hemoglobinei. În continuare, au fost identificați compuși de origine naturală capabili să contracareze efectele asupra celulelor roșii fie singuri fie în combinații; au fost examinați în această direcție atât compuși de natură proteică (albumina serică fiind un exemplu util) cât și compuși organici (ascorbat, acid uric, tioli, antioxidanți polifenolici, antioxidanți liposolubili). Rezultatele au potențialul de a permite propunerea de formulări/preparate care pot reduce efectele secundare ale medicamentelor pe baza de platina. De asemenea, în unele experimente s-a notat și fixarea medicamentelor pe suporturi/matrici biocompatibile.

Efectele medicamentelor pe baza platina asupra metabolismului radicalilor liberi au fost probate si pe celule intacte de *E. coli* (deci un exemplu de celule cu totul diferit de hematii, insa inca relevant fiziologic mai ales prin prisma florei intestinale), folosindu-se capcane de spin - ceea ce a necesitat punerea la punct a unui nou protocol de analiza, cu potențial mai general de utilitate, astfel incat celulele sa poată fi introduse in tubul capilar pentru măsurarea semnalului in aparatul de rezinanta electronica de spin (RES), intr-o forma suficient de concentrata dar in mod inerent inca fluida, si măsurabila la temperatura camerei la timpi controlabili dupa adăugarea platinei si a capcanei de spin. S-a urmarit/probat aici măsura in care capcanele de spin au captat diferente in ce privește cantitatea si tipul radicalilor, respectiv ambientul in care aceste capcane au fost surprinse.

De asemenea, P5 a testat efectele compușilor nou-sintetizati in cadrul proiectului, asupra aceluiași sistem unde compușii de referința au dat rezultate, evidentiindu-se diferente in reactivitate care se pot parțial corela cu elemente de structura, ca de exemplu sterice sau de hidrofobicitate. Acești compuși au inlcus grupări fenotiazinice, baze Troger, si/sau porfirine (metalate sau nu), asupra cărora de asemenea in cadrul proiectului exista rezultate de modelare moleculara, ceea ce va permite detalierea unor relații structura-activitate. De asemenea, s-au sintetizat si derivați proteici cu posibile activități biologice, care au inlcus si componente anti- sau pro-oxidante, ce pot modula reactivitatea la nivelul stresului oxidativ si a celui nitrozati, dar si capacitatea de oxigenare a țesuturilor.

P5 a contribuit de asemenea la fracționarea unor probe celulare si din sânge, pentru identificarea componentelor active/reactive in procesele urmărite, si in special in conexiune cu modularea stresului oxidativ si nitrozativ.

Prin electroforeza în gel a fost pusă în evidență capacitatea atât a bazelor Troger cât și a precursorilor amino-fenotiazinici de a interactiona cu ADN-ul plasmidic pTZ57R, producând o modificare a structurii macromoleculare spre o geometrie circulară relaxată. O posibila interacțiune a aminelor si respectiv a bazelor Troger cu bazele azotate din structura ADN prin legături de hidrogen, completată de forma spatia la pliată a unitatilor heterociclice poate sta la baza explicarii proprietatilor de intercalare in lantul macromolecular.

Interacțiunea cu AND-ul plasmidic a complexilor galiului $[Ga\{(SC_6H_4)_2-2-PPh\}-\kappa^3S,S',P\}\{(SC_6H_4)_2-2-PPh\}-\kappa^2S,S']$ ($X = HNEt_3, PPh_4$) a fost studiata prin electroforeza în gel, metoda care a indicat o dependenta directa de cantitatea de substanta activa din solutie.

In cadrul experimentelor destinate utilizarii derivatilor porfirinici in terapia fotodinamica (PDT), derivatii porfirinici au fost testati *in vitro* pe linii celulare de tip *Keratocyt HaCaT* si *Epidermoid A431* prin iradierea cu lumina rosie (615-630 nm) si respectiv albastră (400-505 nm). Pentru cresterea solubilitatii in apa, derivatii porfirinici au fost încapsulati in ciclodextrine, respectiv liposomi, rezultate bune obtinându-se în urma incapsularii în lipozomi.

Realizarea de studii fizico-chimice (de exemplu, RMN la diferite intervale de timp) in scopul urmaririi proceselor de stabilitate/descompunere a chimici obținuți.

Decisive pentru alegerea unui agent farmaceutic sunt criteriile de selecție care presupun: stabilitatea metabolica, lipofilicitatea, hidratarea si solubilitatea in solvenți potriviți, dar si capacitatea de a lega proteine. In acest sens, o parte din complexii sintetizați de galiu cu liganzi fosfino- respectiv arsinoariltiolicici sintetizati si caracterizati

anterior de care grupul nostru de cercetare au fost supuși unor studii de stabilitate (la temperatura camerei, oxigen, umiditate) și solubilitate ca și etape preliminare testării biologice a acestora.

Complecși de galiu testați au fost următorii:

Complecșii neutri ai Ga cu liganzi 2-EPh₂-C₆H₄SH: Ga(Me)₂{(SC₆H₄-2-PPh₂)-κ²S,P} respectiv [Ga(Me)₂{(μ₂-SC₆H₄-2-AsPh₂)-κS}]₂, unde E=P, As

Complecșii neutri ai Ga cu ligandul 2-PPh₂-C₆H₄SH: Ga{(SC₆H₄-2-PPh₂)-κ²S,P}{(SC₆H₄-2-PPh₂)-κS}₂ și Ga^t(Bu)₂{(SC₆H₄-2-PPh₂)-κ²S,P}

Complecșii anion-cationici: [X][Ga{(SC₆H₄)₂-2-PPh]-κ³S,S',P}{[(SC₆H₄)₂-2-PPh]-κ²S,S'}] (X = HNEt₃, PPh₄)

Complecșii neutri: Ga(Me){[(SC₆H₄)₂-2-PPh]-κ³S,S',P} și Ga^t(Bu){[(SC₆H₄)₂-2-PPh]-κ³S,S',P}

Testele la care au fost supuși *complecșii Ga* au presupus solubilizarea lor în DMSO-d₆ (în tub RMN) și înregistrarea de spectre RMN: ¹H și/sau ³¹P-RMN - la diferite intervale de timp: 10 min, 3 zile, 1 săptămână, 2 săptămâni. În intervalul de timp dintre măsurători, compuşii solubilizati în DMSO-d₆ au fost pastrati la temperatura camerei, în condiții atmosferice normale care au presupus prezenta umidității și a oxigenului. Trebuie menționat că sinteza celor opt complecși s-a făcut în atmosferă inertă. Studiul arată că șase dintre compuşii prezintă solubilitate bună în DMSO-d₆ dar se descompun în timp, ceea ce îi face neeligibili pentru testări ulterioare, în schimb, doi dintre compuşii ([X][Ga{(SC₆H₄)₂-2-PPh]-κ³S,S',P}{[(SC₆H₄)₂-2-PPh]-κ²S,S'}] (X = HNEt₃, PPh₄) prezintă și stabilitate în timp, motiv pentru care au fost supuși unor teste suplimentare, și anume: solubilitatea și stabilitatea acestora în apă, etanol și polietilenglicol. Spectrele RMN au dovedit că cei doi compuşii nu se descompun în prezenta apei, ceea ce îi face eligibili pentru teste de activitate biologică.

II.3. Studiul prin modele a comportamentului elementului activ în ambianța asemănătoare cu cea din organismul viu.

Calculare în faza lichidă cu modele continue de solvent respectiv cu solvent explicit luat în considerare pentru a evalua efectul ambianței asupra structurii moleculare

Calculările vor fi efectuate utilizând metode ONIOM (în faza lichidă) în două-trei straturi - incluzând DFT pentru partea activă și metode semiempirice/mecanica moleculară pentru straturile următoare

Efectuarea unor studii de caz pe sisteme concrete în vederea validării modelului analitic privind transferul controlat al componentului activ în mediul biologic. Se ține cont de caracteristicile fizico-chimice ale compuşii cu activitate biologică și ale mediului de difuzie.

Partenerul P2 a adus contribuții la studiul structurii geometrice și electronice, ca și a reactivității unor structuri metalice, organometalice și organice de relevanță biologică fie ca substanțe cu activitate biologică, fie ca metaboliti sau precursori ai acestora. De asemenea, s-au studiat metaloenzime care prin rolul lor în semnalizare și stress oxidativ sunt implicate/implicabile în mecanisme de acțiune biologică relevante pentru proiect, și modele ale acestora. Metodele folosite au inclus DFT, Hartree-Fock, metode semiempirice (ZINDO/S, PM3, PM6, AM1) și empirice, prin optimizări de geometrie in vid și în solvent, calcule de proprietăți electronice și spectrale, și prin simulări de dinamică moleculară și QM/MM.

S-au obținut astfel date care au permis caracterizarea centrului catalitic pe baza de cupru dintr-o familie de oxidaze care include ceruloplasmina și lacaza. Au fost simulate spectre

UV-vis, RMN, IR, Raman si RES; dupa stiinta noastra este prima data in tara cand se folosesc metode ab initio pentru simularea spectrelor RES in centri metalici (incluzand factorii g), si cu atat mai mult in metaloenzime. Acest centru este responsabil pentru activarea unor compusi potential antioxidanti aromatici, transformandu-i in functie de concentratie, si in pro-oxidanti.

S-au obtinut rezultate care releva detalii la nivel electronic asupra mecanismelor prin care legatura oxigen-oxigen este activata in sisteme relevante pentru stresul oxidativ, dar si in compusi de sinteza cu potentiala activitate biologica, bazati pe metale precum platina sau aurul. Pentru sisteme precum superoxid dismutaza, bleomicina ferica, bleomicina cuprica, sau modele de citocromi P450 bazate pe porfirazine, s-au identificat structuri inca neizolate experimental (stari de valenta inalta la metal, aducti cu oxigenul molecular, cu superoxidul, cu peroxidul) si s-au formulat rationamente pentru aspecte inca neexplicate ale reactivitatii, formulandu-se in plus si predictii. Acestea au inclus observatii asupra reactivitatii diferite a starilor de spin (in superoxid reductaze comparativ cu citocromii P450 sau bleomicina ferica, dar si in porfirazine, cu efect asupra barierei de clivare in legaturile fier-oxigen si in legaturile oxigen-oxigen), diferente structurale intre compusi aparent inruditi (bleomicina ferica vs bleomicina cuprica). S-au examinat de asemenea si metaboliti rezultati din actiunea unor astfel de sisteme asupra compusilor organici bioactivi. Pentru sisteme de tip platina/paladiu/aur-peroxo/hidroperoxo s-au examinat structuri electronice si geometrice si s-a identificat o noua familie de compusi capabili de electromerie, similari in acest fel claselor de compusi de fier si cupru binecunoscuti in chimia bioanorganica. Prezenta unor liganzi de hidrogen in unele dintre sistemele de referinta din aceasta categorie a dus si la descoperirea unui fenomen de electromerie inca neexplorat in literatura, implicand hidrurile metalelor tranzitionale. Si in aceasta clasa s-au efectuat simulari de spectre UV-vis si vibrationale. O directie noua pentru acesti complexe, deschisa in 2011, este dinamica ab initio, care poate permite predictii de precizie rezonabila asupra evolutiei in timp a structurii in conditii mai realiste (temperatura camerei) – din nou o directie care dupa stiinta noastra este abordat pentru prima oara la noi in tara. S-au efectuat de asemenea primele calcule asupra efectului campului electric asupra structurii complexilor de interes in cadrul proiectului, evidentindu-se efecte masurabile; acest aspect este important, deoarece complexii cu potential terapeutic sintetizati in cadrul proiectului sunt foarte probabili supusi campurilor electrice la traversarea membranelor sau la legarea de biopolimeri incarcati electric.

De asemenea, s-au formulat predictii structurale asupra unor complexe de fier si carborani care pau permis explorarea de noi paradigme structurale pentru compusi multinucleari cu potentiala activitate biologica.

Au fost studiate o serie de legi si fenomene care intervin in realizarea unui model complex care sa prezica transferul controlat al agentului activ dintr-un mediu in altul. Fenomenele de transfer de masa si fenomenele energetice care descriu sistemul analizat sunt cele care determina modul de desfasurare al procesului de transfer. In acest sens au fost scrise ecuatiile matematice care descriu transferul de masa pentru aceste sisteme si s-au rezolvat ecuatiile matematice care descriu energia potentiala a sistemelor considerate tinandu-se seama de parametrii geometrici si de material. S-a constatat ca metodele energetice sunt cele mai potrivite pentru descrierea fenomenelor complexe care au loc la interfata element transportor/element activ/mediu biologic.

Pentru rezolvarea ecuatiilor diferentiale definite s-au stabilit o serie de conditii la limita. Pentru definirea corecta a starii energetice a sistemului se are in vedere variatia parametrilor care determina conditiile la limita pana la gasirea valorilor optime.

S-a obtinut o forma a ecuatiei diferentiale care descrie energia potentiala a unui asamblu de tipul element 1/interfata/element 2. In prezent se lucreaza la rafinarea acestui model.

O alta activitate a fost aceea de a efectua studii de caz pe sisteme concrete in vederea realizarii unui model care sa descrie cat mai fidel proprietatile chimice si mecanice care au loc la suprafata de transfer. In acest sens, au fost efectuate cateva studii preliminare privind proprietatile de agent de transport a macrociclurilor calixarenice. Au fost efectuate studii preliminare pentru determinarea dimensiunii cavitatii diferitelor calixarene si energia de interactiune a acestora cu diferite substante care pot prezenta activitate biologica. Din rezultatele obtinute pana in prezent rezulta ca cei mai importanti parametri care influenteaza capacitatea de a gazdui agent activ a calixarenelor o are dimensiunea cavitatii macrociclului si natura agentului activ.

II. 4. Urmarirea mecanismelor moleculare de actiune ale compusilor cu activitate biologica eficienta

Stabilirea de paralele intre activitati biologice masurate si efecte cuantificabile asupra extractelor celulare si biomoleculare izolate, pentru identificare mecanismelor de actiune la nivel molecular

S-a studiat efectul compusilor de referinta pe baza de platina (cisplatina, carboplatina, oxaliplatina) asupra structurii si reactivitatii unor metaloproteine cu implicare in stresul oxidativ, in continuarea experimentelor efectuate in 2010. Au fost urmarite ca tinte hemoglobina, mioglobina, citocromul c, ceruloplasmina, si alte enzime, folosindu-se reactii in solutie omogena sau cu lipozomi pe baza de lecitina. S-a trecut apoi la validarea rezultatelor prin confirmarea acestor efecte si asupra celulelor intacte. Astfel, au fost studiate efectele asupra celulelor din sange, in special hematii, demonstrandu-se prin spectre UV-vis si prin microscopie electronica un efect asupra morfologiei celulelor insotit de lizarea lor partiala si de autooxidare accelerata a hemoglobinei. In continuare, au fost identificati compusi de origine naturala capabili sa contracareze efectele asupra celulelor rosii fie singuri fie in combinatii; au fost examinati in aceasta directie atat compusi de natura proteica (albumina serica fiind un exemplu util) cat si compusi organici (ascorbat, acid uric, tioli, antioxidanti polifenolici, antioxidanti liposolubili). Rezultatele au potentialul de a permite propunerea de formulari/preparate care pot reduce efectele secundare ale medicamentelor pe baza de platina. De asemenea, in unele experimente s-a notat si fixarea medicamentelor pe suporturi/matrici biocompatibile.

Efectele medicamentelor pe baza platina asupra metabolismului radicalilor liberi au fost probate si pe celule intacte de E. coli (deci un exemplu de celule cu totul diferit de hematii, inasa inca relevant fiziologic mai ales prin prisma florei intestinale), folosindu-se capcane de spin - ceea ce a necesitat punerea la punct a unui nou protocol de analiza, cu potential mai general de utilitate, astfel incat celulele sa poata fi introduse in tubul capilar pentru masurarea semnalului in aparatul de rezonanta electronica de spin (RES), intr-o forma suficient de concentrata dar in mod inerent inca fluida, si masurabila la temperatura camerei la timpi controlabili dupa adaugarea platinei si a capcanei de spin. S-

a urmarit/probat aici masura in care capcanele de spin au captat diferente in ce priveste cantitatea si tipul radicalilor, respectiv ambientul in care aceste capcane au fost surprinse. De asemenea, au fost testate efectele compusilor nou-sintetizati in cadrul proiectului, asupra acelorasi sisteme unde compusii de referinta au dat rezultate, evidentiindu-se diferente in reactivitate care se pot partial corela cu elemente de structura, ca de exemplu sterice sau de hidrofobicitate. Acesti compusi au inlcus grupari fenotiazinice, baze Troger, si/sau porfirine (metalate sau nu), asupra carora de asemenea in cadrul proiectului exista rezultate de modelare moleculara, ceea ce va permite detalierea unor relatii structura-activitate. De asemenea, s-au sintetizat si derivati proteici cu posibile activitati biologice, care au inclus si componente anti- sau pro-oxidante, ce pot modula reactivitatea la nivelul stresului oxidativ si a celui nitrozati, dar si capacitatea de oxigenare a tesuturilor.

Pentru identificarea componentelor active/reactive in procesele urmarite, si in special in conexiune cu modularea stresului oxidativ si nitrozativ au fost fractionalizate unor probe celulare si din sange.

Punerea în evidență a prezenței fierului în celule tratate cu o categorie de substanțe special sintetizate considerate a avea proprietăți antitumorale . Au fost sintetizate transferinele (Tf) bazate pe aziridine, oxalat și bicarbonat, care complexează ionii Fe(III) și facilitează transferul acestuia din urmă în celula umană.

Metoda analitică utilizată a fost spectrometria de absorbție atomică (SAA) în flacăra (aer-acetilenă) și în cuptorul cu tub de grafit. Pentru aceasta s-a folosit un Spectrometru de absorbție atomic GBC Avanta PM.

Probele de celule umane tratate, timp de 24 de ore, cu complecși de transferină au fost recoltate de pe plăcile de cultura și spălate cu o soluție tampon (fără conținut de fier) și conservate la -80 °C până la efectuarea analizei. Au fost supuse analizei SAA eşantioane a căror masă este precizata in Tabelul 1.

Dizolvarea probelor s-a făcut în acid azotic. În acest fel, fondul soluțiilor care conțin probele a fost același cu cel al soluțiilor folosite la etalonarea SAA. Pentru a compara capacitatea substanțelor sintetizate de a transfera fierul s-a efectuat și o analiză a celulelor netratate cu acestea.

Tabel 3. Determinarea cantității de fier transferat cu ajutorul transferinelor în celule tumorale.

Nr. probă	Tipul de celule analizate	Masa probei μg	*Concentratia de fier in proba analizata (μg /g)
1.	Celule netratate	131	0.00091
2	Celule tratate cu Tf-Fe-bicarbonat	122	0.00115
3.	Celule tratate cu Tf-Fe-oxalat	109	0.00147
4.	Celule tratate cu Tf-Fe-aziridina	123	0.00244

*Datele reprezintă valorile medii a 3 măsurători.

Pe baza măsurătorilor de SAA s-a putut demonstra capacitatea diferită de transfer a substanțelor investigate, dovedită prin concentrația diferită de fier prezentă în celule.

Măsurătorile de SAA au fost folosite în corelație cu alte tipuri de determinări biomedicale pentru a se demonstra efectul antitumoral al acestor substanțe.

II.5. Identificarea fenomenelor la nivel molecular legate de mecanismele de reparare a leziunilor aparute in urma tratamentului cu metale

Tratarea liniilor celulare si a suspensiilor unicelulare cu substantele metalice

Studiul mecanismelor moleculare ale repararii, a genelor implicate in apoptoza si reparare, si efectul regulator cu ajutorul tehnicilor moleculare

Pregatirea probelor in vederea determinarilor formarii de aducti metal-ADN sau metal-proteina cu ajutorul spectrometriei de masa

Pentru elucidarea mecanismelor de actiune a derivatilor organometalici si coordinativi s-a evaluat activitatea biologica a unor complexi de Pd-curcumina; pe baza evaluarii citotoxicitatii s-a stabilit ca ele au o actiune selectiva statistic semnificativa asupra celulelor studiate, fiind mai toxice fata de liniile tumorale in vitro, decat fata de cele normale.

O comparatie a efectului antiproliferativ al curcuminei si a doi complexi de Pd-curcumina a fost facuta asupra celulelor tumorale de cervix uterin HeLa, de carcinom colorectal Colo, stem tumorale hepatice CSC, melanom malign cu grad inalt de metastazare M1/15, keratinocite normale HaCaT si limfocite normale umane (Fig 15).

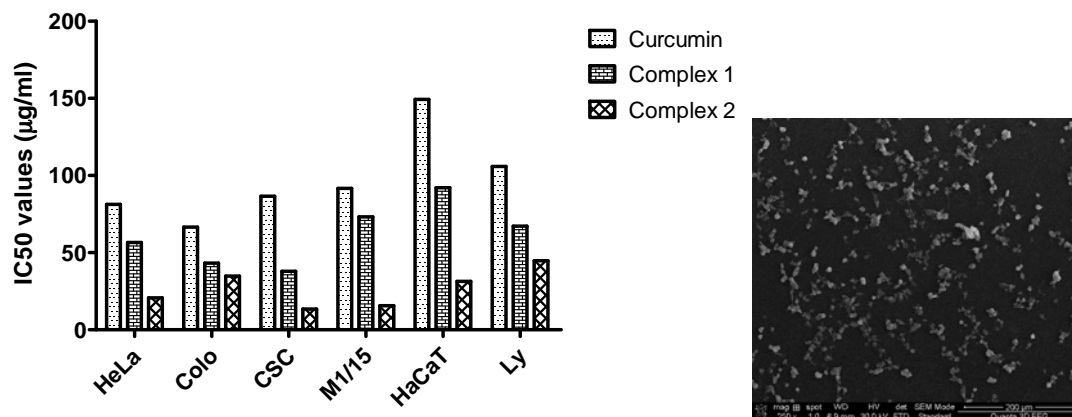


Fig. 15 Actiunea curcuminei si complexilor Pd-curcumina asupra celulelor tumorale de cervix uterin HeLa, de carcinom colorectal Colo, stem tumorale hepatice CSC, melanom malign cu grad inalt de metastazare M1/15, keratinocite normale HaCaT si limfocite normale umane.

In imaginea de microscopie electronica este reprezentata populatia de celule CSC tratata timp de 24 de ore cu complexul Pd-curcumin(1). Ele au o activitate imunomodulatoare pronuntata, influentind supravietuirea subpopulatiilor limfocitare in mod selectiv si exprimarea clusterilor de diferentiere in celulele tratate. Cu ajutorul flow-citometriei s-a evidentiat diferenta cantitativa dintre diversele subpopulatii limfocitare prezente in cultura dupa tratamentul cu complexi:

Figura 16 reprezinta procentul de celule care exprima markerii de suprafata membranara, de la stanga la dreapta: CD4, CD25, CD127si CD154. Histograma neagra corespunde celulelor netratate, cea rosie tratamentului cu curcumina, iar liniile albastru si mov de pe figura reprezinta complexii 1 si 2 ai paladiului. Moleculele studiate sunt specifice limfocitelor T care au un rol de reglare al raspunsului imun si sunt indicatori ai gradului de stimulare al raspunsului imun.

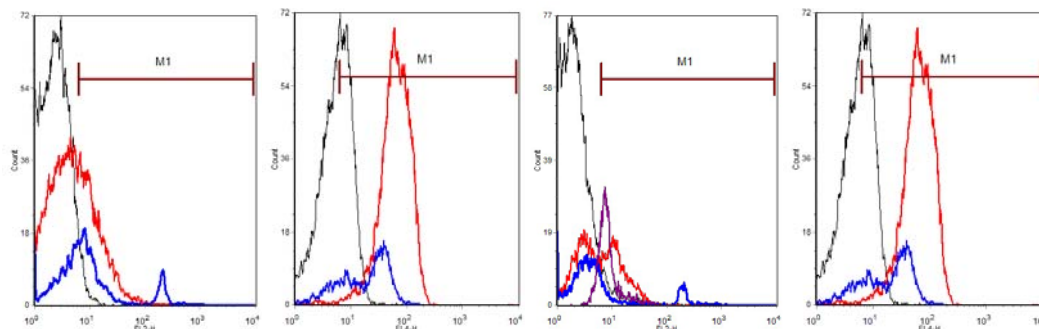


Fig. 16 Histograma neagra corespunde celulelor netratate, cea rosie tratamentului cu curcumina, iar liniile albastru si mov de pe figura reprezinta complexii 1 si 2 ai paladiului.

S-a realizat o evaluare a exprimării genelor cu ajutorul metodei PCR semicantitative, care releva o activare imună în urma tratamentului cu complexii de paladiu. ARN total a fost extras dintr-un număr identic de celule viabile. Concentrația de ARN a fost determinată spectrofotometric; cantități identice de ARN au fost utilizate pentru transcrierea inversă în ADNc utilizând iScript™ iar ADNc obținut a fost analizat prin PCR specific genelor.

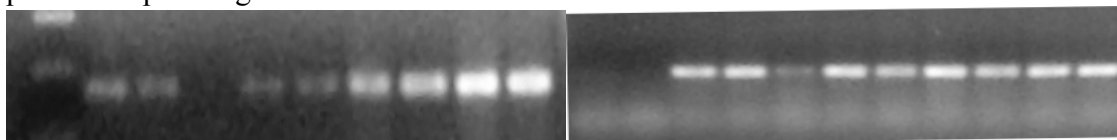


Figura 17 Benzile specifice obținute prin electroforeza exprimării genelor TGF β 1 și IL-2, de la stînga la dreapta sunt reprezentate celulele netratate, respectiv curcumina și șase complexi de Pd-curcumina.

S-au utilizat următoarele perechi de amorse: TGF β 1: 5'-GCC CTG GAC ACC AAC TAT TGC T-3' și 5'-AGG CTC CAA ATG TAG GGG CAG G-3'; IL-2 5'- GCT ACA ACT GGA GCA TTT ACT GCT G-3' și 5'-CTA CAA TGG TTG CTG TCT CAT CAG C-3'; GITR: 5'-TTG GAA CAA GAC CCA CAA CG-3' și 5'-GGC ACC TCC AGC AGC AGC T-3'; CTLA-4: 5'-CTT CTC TTC ATC CCT GTC TTC TGC-3' și 5'-ATT GCT TTT CAC ATT CTG GCT CTG-3'; IL-18: 5'-GCT TGA ATC TAA ATT ATC AGT C-3' și 5'-GAA GAT TCA AAT TGC ATC TTA-3'.

S-a constatat că datorită efectului dual de inhibiție selectivă a proliferării tumorale și a stimulării sistemului imun în răspunsul antitumoral, complexii de paladiu ai curcuminelor au potențial de terapie adjuvantă în schemele de tratament al cazuisticii maligne.

O altă direcție de studiu a constituit-o evaluarea capacității transportoare a transferinei pentru țintirea celulei tumorale cu ajutorul complexilor anion-Fe-transferina. Prin înlocuirea bicarbonatului care este prezent în complexii formați cu Fe și transferina în condiții fiziologice, s-a introdus anionul oxalat și anionul aziridin-carboxilat formându-se complexi cu ansamblul Fe(III)-transferina.

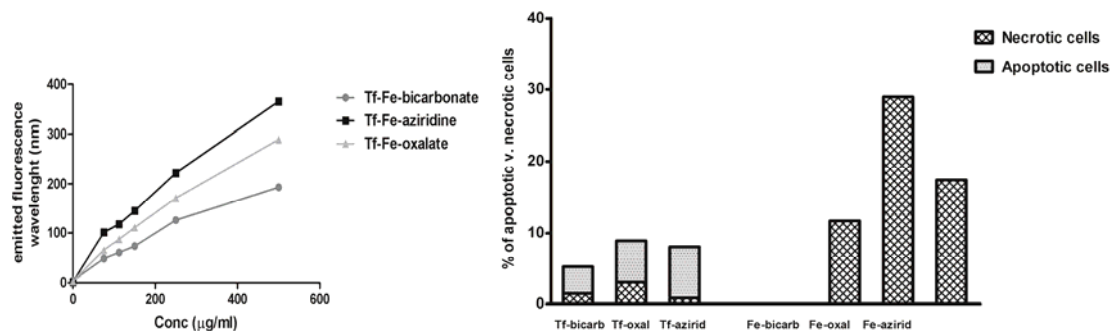


Figura 18. Evaluarea capacitatii transportoare a transferinei

Cu ajutorul marcajului fluorescent al fluoresceinizocianatului, grefat pe proteina transferina, s-a evidentiat patrunderea in celula maligna a complexelor, s-a evaluat dinamica uptake-ului celular si cantitatea de Fe incorporata in celula cu ajutorul spectrometriei de absorbtie atomica. Cantitatea de complex anion-Fe(III)transferina inglobata in celula maligna de cervix uterin HeLa si in celulele de glioblastom maligne este corelata direct cu citotoxicitatea. Anionii singuri, desi sunt mai toxici la aceeasi concentratie decat forma lor legata de transferina, provoaca mecanismele de necroza celulara masiva, pe cand ansamblul format cu transferina initiaza dupa 24 de ore mecanismele de moarte celulara programata (apoptoza).

Concluzia studiului este ca datorita capacitatii de transport in interiorul moleculei, ansamblul Fe-transferina este capabila sa transporte preferential in interiorul celulei maligne care prezinta receptori de suprafata pentru transferina, o cantitate mare de substanta activa, si poate actiona sinergic in imbunatatirea efectului citotoxic al acestora.

In vederea elucidarii mecanismelor celulare si moleculare de rezistenta fata de tratamentul cu substante chioterapeutice s-au investigat celule de adenocarcinom colorectal HT-29R si Colo320R care au dobindit rezistenta fata de tratamentul cu oxaliplatin.

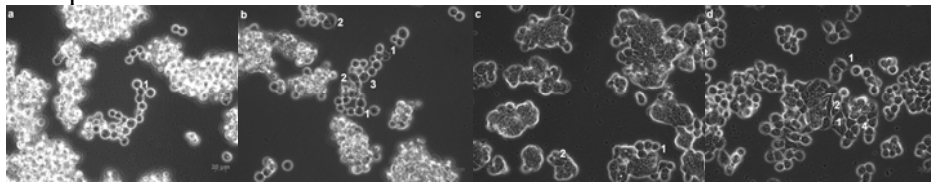


Fig 19. Imagini microscopice ale liniilor Colo320 (a), Colo320R (b), HT-29 (c) si HT-29R

Imaginile microscopice ale liniilor Colo320 (a), Colo320R (b), HT-29 (c) si HT-29R arata modificarile morfologice survenite ca urmare a dobindirii rezistentei la platina: cele rezistente devin fusiforme, se observa tranzitia de la fenotipul epitelial la cel mezenchimal prin prezenta pseudopodelor si pierderea polaritatii celulei, care duc la scaderea aderenței si cresterea distantei intercelulare in cultura. Fata de celulele sensibile la platina, cele rezistente prezinta un tablou celular si molecular diferit, sunt deosebite morfologic, din punct de vedere al citotoxicitatii, al punctilor formate de ADN-ul celular cu platina, si cel mai important: au un profil de expresie al genelor specifica, mai ales in

ceea ce priveste genele responsabile de inhibitia apoptozei si proliferarea celulara. Transcriptia ADN si replicarea celulara este afectata.

Din cele citeva sute de gene estimate, cele mai reprezentative supraexprimari si suprimari in profilul genetic sunt sintetizate in tabelul 4.

Tabel 4. Supraexprimari si suprimari in profilul genetic

Simbolul genei	Denumire gena	Colo 320		HT29	
		Nivelul reglariei	Valoare p	Nivelul reglariei	Valoare p
Clasa A					
TMX4	Thioredoxin-related transmembrane protein 4	3.43	1.18E-06	2.73	6.57E-10
PTPRO	Protein tyrosine phosphatase, receptor type, O	1.58	2.58E-05	1.85	1.93E-08
LGALS1	Lectin, galactoside-binding, soluble, 12	2.71	7.32E-07	1.58	3.62E-09
KRT18	Keratin 18, transcript variant 1	1.87	7.29E-08	1.54	1.81E-07
AK022045	Homo sapiens cDNA FLJ11983 fis, clone HEMBB1001337	1.80	1.24E-05	1.82	6.51E-09
THC2611661	RR12_SPIMX (P42344) Chloroplast 30S ribosomal protein S12, partial (11%)	1.80	2.24E-04	1.51	8.50E-08
NM_173624	KRT18P55 keratin 18 pseudogene 55	1.72	3.34E-07	1.57	1.13E-06
NM_001007139	Homo sapiens insulin-like growth factor 2 (somatomedin A) (IGF2), transcript variant 2, mRNA	2.08	7.10E-06	1.53	6.85E-09
Clasa B					
IL1RAP	Interleukin 1 receptor accessory protein	-1.61	2.86E-05	-1.53	4.67E-07
GRB14	Growth factor receptor-bound protein 14	-1.73	3.97E-07	-1.56	4.16E-09
CD302	CD302 molecule	-1.88	2.57E-06	-1.68	1.07E-09
HMGCS1	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 1	-1.56	2.38E-04	-1.73	2.77E-07
POLR1D	Polymerase (RNA) I polypeptide D, 16kDa	-1.52	1.44E-06	-1.74	3.02E-10
CA12	Carbonic anhydrase XII (CA12), transcript variant 1	-2.60	2.55E-10	-1.95	4.95E-11
Clasa C					
IFITM3	Interferon induced transmembrane protein 3	-1.74	1.87E-07	2.08	1.28E-11
IFIH1	Interferon induced with helicase C domain 1	-2.64	1.40E-07	1.67	4.51E-08
CFHR1	Complement factor H-related 1	-2.64	4.32E-09	1.61	1.70E-08
Clasa D					
CAMK2N1	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II inhibitor 1	1.64	1.33E-07	-1.55	3.97E-07
NDRG1	N-myc downstream regulated 1	1.79	7.96E-07	-1.75	1.55E-07
COL9A3	Collagen, type IX, alpha 3	1.91	3.92E-06	-1.79	6.45E-09

In consecinta putem afirma ca studiile paralele pe liniile celulare imortalizate si pe cele primare derivate din tumorile umane, au condus la elucidarea unor aspecte ale mecanismului de actiune a compusilor metalici si corelate cu evolutia clinica, pot duce la identificarea markerilor moleculari si celulari ai reusitei tratamentului oncologic, si pot fi folosite ca si viitoare tinte terapeutice.

II.6. Studiul mecanismelor moleculare ale raspunsului imun medicamentele consacrate pe baza de platina

*Studiul raspunsului imun la tratamentul chimioterapeutic cu platina, folosind tehnologia Luminex
Corelarea efectelor medicamentelor consacrate cu raspunsul imun provocat de substantele nou sintetizate, folosind tehnologia Luminex.*

Efectuarea de analize in laboratoare acreditate

S-a urmarit efectul medicamentelor platinice luand ca reper doua tinte majore ale actiunii acestora in organismul uman: incorporarea in celula tumoral primara si actiunea asupra markerilor de suprafata ale celulelor tumorale si normale

Raport clinic 2011: In vederea determinarii nivelului platinei din tesutul tumoral si sangele circulant s-a constituit o banca de material biologic. In perioada martie-noiembrie 2011 in studiu au fost incluse 12 paciente cu cancer de col uterin avansat loco-regional (stadiu IIB-III B). Pacintelor li s-a recoltat un fragment tumoral prin biopsie cervicala si sange venos periferic dupa terminarea chimioterapiei cu cisplatin (DDP). Pacientele au primit chimioterapie cu DDP – diferite scheme- in functie de bratul de studiu in care au fost incluse, pe baza urmatorului protocol terapeutic:

Bratul I: Radio-chimioterapie (RTCT) concomitenta cu DDP, doua scheme terapeutice:

A. RTCT concomitenta cu DDP schema 20 mg/mp x 5 zile la 21 zile interval

Recoltarea fragmentului tumoral si a sangelui venos periferic s-a facut in a 3-a zi dupa terminarea CT-ei (dupa ziua 5 de CT) si **B.** RTCT concomitenta cu DDP schema 40 mg/mp/saptamanal.

Bratul II: Chimioterapie neoadjuvanta radio-chimioterapiei concomitente, cu doza de DDP=100 mg/mp. Recoltarea fragmentului tumoral si a sangelui s-a facut la 24 ore dupa administrarea cisplatinului.

In studiu au fost incluse: 4 paciente in stadiul IIB, 5 paciente in stadiul IIIA si 3 paciente in stadiul III B. Includerea in bratul terapeutic a fost urmatoarea:- bratul IA 4 paciente, bratul IB : 1 pacienta, bratul II: 7 paciente Materialul biologic a fost cuprins intr-o banca de celule si tesuturi.

S-a studiat exprimarea unor gene si receptori pe limfocitele pacientelor tratate cu medicamente platinice, cu ajutorul unei metode de PCR semicantitativ. Ca si tinta s-a ales gena GITR din familia TNF, a factorilor de necroza tumoral, care are doua variante implicate in raspunsul imun antitumoral: varianta 1 si 3. Limfocitele s-au izolat din suspensia unicelulară obținută prin centrifugare în gradient de densitate utilizând reactivul Ficoll-Paque Plus (Amersham Bioscience). Amorsele utilizate la PCR au fost proiectate astfel încât să se excludă posibilitatea amplificării ADN-lui genomic si să permită amplificarea diferitelor variante ale ARNm. Produsii de amplificare s-au separat prin electroforeză în gel de agaroză de 1,5% si au fost vizualizati în UV cu bromura de etidiu. Prin această metodă s-au identificat mai multe variante ale genelor dintre care cele utilizate în acest studiu sunt următoarele: GITR var1 si GITR var3.

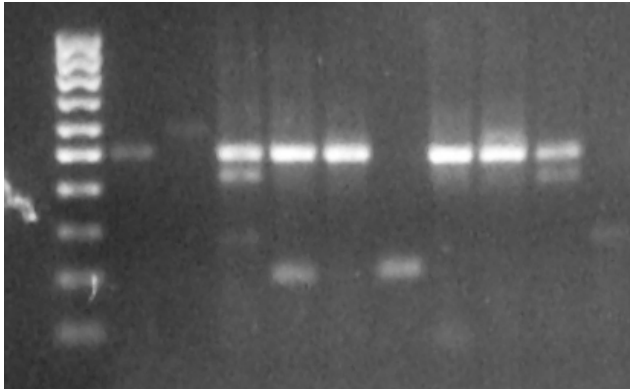


Fig. 19 Beznilor specifice obtinute prin electroforeza in gel pentru exprimarea GITR var1 si GITR var3.

Figura 19 reprezinta imaginile beznilor specifice pentru exprimarea celor doua variante ale genei GITR; s-au folosit amorsele : forward CCCCTTCTCCTCTGCCGATC, respectiv reverse: ATGTGTGTCCAGCCTGAATTCC. La banda corespunzatoare 485 bp este produsul corespunzator genei, benzile dublate indica prezenta ambelor variante: 1 si 3. Limfocitele recoltate de la subiectii supusi chimioterapiei cu cisplatin exprima in majoritatea cazurilor gena GITR, in imagine de la stinga la dreapta sunt reprezentate cazurile 3-12; se observa exprimarea genei GITR la benzile corespunzatoare cazurilor 5,6,7, 9 si 10, la toate fiind prezenta varianta 1, iar la cazul 5 exprimata si varianta 3.

II. S-a studiat cu ajutorul tehnologiei Luminex exprimarea unor molecule de suprafata si productia unor molecule implicate in semnalizarea celulara la limfocitele si macrofagele umane tratate cu substante platinice

S-a analizat modularea exprimarii unor markeri de suprafata ai macrofagelor din infiltratul tumoral sub actiunea compusilor de platina de uz clinic si compusilor metalici nou sintetizati, folosind tehnologia Luminex. Sistemul Luminex 200(Luminex Corporation, Austin, TX ,SUA) este un analizor flexibil bazat pe principiile citometriei in flux. Sistemul permite masurarea simultana a pana la 100 molecule intr-un singur godeu, folosind volume foarte mici. Sistemul reprezinta o combinatie a trei tehnologii core xMAP: microsferile xMAP, o familie de microsfere de polistiren cu dimensiunea de 5.6 microni marcate fluorescent care au rolul atat de marker cat si de suprafata solida pe care se construiesc testul. Al doilea reprezinta analizorul in sine, care cuprinde componentele de detectie, iar al treilea este softul xPONENT, pentru analiza datelor.

Pe macrofagele infiltrate izolate din lichidul ascitic provenit de la un caz de carcinom de colon , tratate *in vitro* cu cisplatin, oxaliplatin si carboplatin s-a determinat expresia CD40 Ligand/TNFSF5 si CXCL10/IP-10 molecule implicata in raspunsul imun antitumoral si in inflamatie.

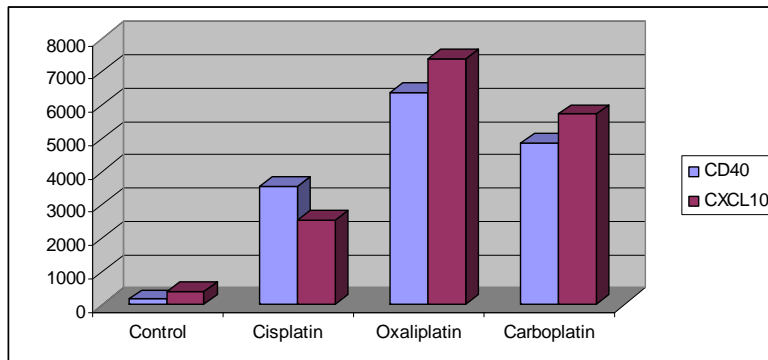


Fig. 20. Modularea exprimării unor markeri de suprafață ai macrofagelor din infiltratul tumoral sub acțiunea compusilor de platina

Figura 20 indică cantitatea celor două molecule, exprimată în picograme, la macrofagele tratate cu medicamente standard platinice. Față de celulele netratate, o creștere semnificativă a fost înregistrată la oxaliplatin, care este și cel mai eficient medicament platinic în cazistica digestivă, dar și valorile corespunzătoare cisplatinului și carboplatinului sunt semnificativ marite față de control.

S-a studiat efectul medicamentelor consacrate pe baza de platina asupra subpopulațiilor limfocitare prin evaluarea cantitativă a metaloproteazelor MMP2 și MMP9, implicate în semnalizarea celulară.

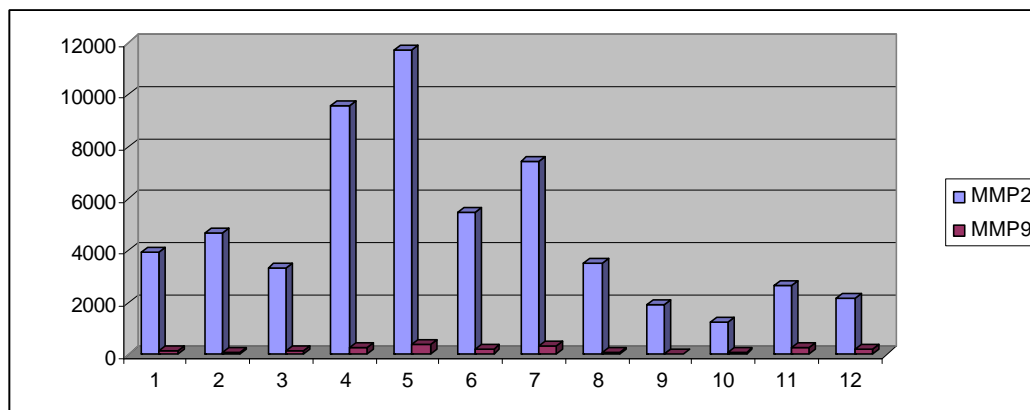


Fig. 21. Evaluarea cantitativă a metaloproteazelor MMP2 și MMP9 implicate în semnalizarea celulară a subpopulațiilor limfocitare după tratare cu complecși de platina

Rezultatele din figura 21, exprimate în picograme, arată o puternică capacitate a celulelor tumorale de a secreta metaloproteaza 2, implicată în inflamație, ca urmare a tratamentului cu cisplatin, pe când metaloproteaza 9 este slab exprimată.

Rezultatele obținute în urma investigării comportamentului celulelor tumorale și normale sub acțiunea medicamentelor standard platinice, folosind o gamă largă de metode moderne, a relevat aspecte noi în terapia cancerului. Aceste rezultate au fost cuprinse în articolele științifice elaborate.

II.7. Testarea substantelor „in vivo” si analizarea rezultatelor.

Administrarea substantelor sintetizate si testate anterior in vitro.

Studii de cronobiologie. Centralizarea rezultatelor si prelucrarea statistica a acestora.

Studii privind efectele secundare prin administrare de substante organometalice cu activitate citostatica “*in vivo*” (pentru experimentele preliminare s-a utilizat cisplatinul si substantele biologice active nou sintetizate). S-a experimentat pe un lot de șobolani Wistar (masculi și femele). Pentru lotul de control s-a administrat ser fiziologic, primului lot experimental i s-a administrat cisplatin în două reprize la interval de două ore, iar pentru lotul experimental doi s-a administrat 3 complecsi cu paladiu într-o singură repriză;

Metodele utilizate pentru administrarea citostaticelor sunt cele clasice in cazul cisplatinului ci complecsilor nou sintetizati administrarea s-a facut intraperitoneal;

S-au prelevat si analizat urmatoarele organe: rinici, inima si ficat. In cazul analizele hematologice s-au urmarit parametrii hematologici: elemente figurate din sânge (RBC ($\times 10^3/\mu\text{L}$); WBC ($\times 10^3/\mu\text{L}$); PLT ($\times 10^3/\mu\text{L}$) si HGB (g/dL), HCT (%); de asemenea s-au determinat numărul de leucocite diferențiate (NEUT ($\times 10^3/\mu\text{L}$), LYMPH ($\times 10^3/\mu\text{L}$), MONO ($\times 10^3/\mu\text{L}$), EO ($\times 10^3/\mu\text{L}$), BASO ($\times 10^3/\mu\text{L}$), iar pentru analizele biochimice s-au realizat urmatoarele determinari: uree (mg/dL), acid uric (mg/dL), creatinina (mg/dL), proteine totale (g/dL);

Cele mai frecvente efecte seundare ce apar în terapia cu substante organometalice sunt: afectarea zonei gastrointestinale (aparitia de grețuri și stări de vomă) și a rinichilor, datorită inhibării enzimatic prin coordonarea metalului la grupările sulfhidrice ale proteinelor. Alte manifestari semnalate in urma administrarii de derivati organometalici su fost: hipomagneziemia, hipokaliemie și hipocalcemie.

Rezultatele acestor cercetari interdisciplinare s-au concretizat printr-o serie de articole publicate si acceptate de reviste de specialitate din tara si strainatate, care depaseste ca numar si factor de impact obiectivele proiectului pe anul 2011, la care se adauga un numar semnificativ de manuscrise trimise spre publicare sau in lucru. La aceste rezultate, alaturi de cercetatorii cu experienta au contribuit in masura semnificativa tinerii cercetatori din cadrul proiectului, precum si un numar de studenti de nivel licenta si master, atingandu-se astfel si obicetivul de formare a resursei umane.

10.12.2011

**Director de proiect,
Academician Prof. Dr. Ionel Haiduc**