

Școala doctorală în domeniul Științe medicale

Cu titlu de manuscris

C.Z.U.: 546.56-386:615.277.3+616-006.6-091.8-092.9(043.2)

Pantea Valeriana

**EFECTELE METABOLICE ALE COMPUȘILOR BIOLOGIC ACTIVI
AUTOHTONI CU ACȚIUNE ANTITUMORALĂ**

315.01. Biochimie medicală

Teză de doctor în științe medicale

Chișinău, 2023

Teza a fost elaborată la Laboratorul de biochimie al Universității de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu” a Consorțiului fondator al Școlii doctorale în domeniul Științe medicale

Conducător științific:

Tagadiuc Olga,
dr. hab. șt. med., prof. univ.

Conducător prin cotutelă:

Gulea Aurelian,
academician, Om Emerit al R. Moldova
dr. hab. șt. chim., prof. univ.

Membrii comisiei de îndrumare:

Gudumac Valentin,
dr. hab. șt. med., prof. univ.

Protopop Svetlana,
dr. șt. med., conf. univ.

Sardari Veronica,
dr. șt. med., cercet. șt. sup.

Susținerea va avea loc la 15.11.2023, ora 14⁰⁰, în ședința Comisiei de susținere publică a tezei de doctorat, din cadrul USMF „Nicolae Testemițanu” (bd. Ștefan cel Mare și Sfânt, 165, biroul 204), aprobată prin decizia Consiliului Științific al Consorțiului (proces verbal nr. 21, din 05.10.2023).

Componenta Comisiei de susținere publică a tezei de doctorat:

Președinte:

Cobeț Valeriu,
dr. hab. șt. med., prof. univ.

Membrii:

Tagadiuc Olga,
dr. hab. șt. med., prof. univ.
Gulea Aurelian,
dr. hab. șt. chim., prof. univ.
Todiraș Mihail,
dr. hab., șt. med., conf. cercet.

Referenți oficiali:

Gudumac Valentin,
dr. hab. șt. med., prof. univ.
Macari Vasile,
dr. hab. șt. biolog., conf. univ.
Caragia Svetlana,
dr. șt. biolog.

Autor

Pantea Valeriana

© Pantea Valeriana, 2023

CUPRINS

LISTA ABREVIEILOR	5
LISTA FIGURILOR	7
LISTA TABELELOR	8
INTRODUCERE	9
1. MECANISMELE DE ACȚIUNE A COMPUȘILOR COORDINATIVI LOCALI AI CUPRULUI CU TIOSEMICARBAZONE	15
1.1. Aplicarea în medicină a compușilor coordinativi ai cuprului cu tiosemicarbazone	15
1.2. Impactul utilizării compușilor coordinativi ai cuprului cu tiosemicarbazone asupra stresului oxidativ și sistemului antioxidant	22
1.3. Aplicațiile multifuncționale bazate pe moartea celulară indusă de cupru	23
2. MATERIALE ȘI METODE DE CERCETARE A MARKERILOR BIOCHIMICI ÎN STUDIUL PRECLINIC EXPERIMENTAL AL COMPUȘILOR COORDINATIVI AUTOHTONI AI CUPRULUI CU TIOSEMICARBAZONE	28
2.1. Finanțarea studiului și considerații etice	28
2.2. Caracteristica generală a cercetării	29
2.2.1. Compușii biologic activi autohtoni noi studiați	29
2.2.2. Design-ul general al cercetării	30
2.3. Metodologia studiului citotoxicității compușilor coordinativi <i>in vitro</i> pe culturi celulare	31
2.3.1. Evaluarea potențialului citotoxic al compușilor coordinativi <i>in vitro</i> în cultura de gliom C6 de șobolan	31
2.3.2. Evaluarea potențialului citotoxic al compușilor coordinativi ai cuprului cu tiosemicarbazone <i>in vitro</i> în cultura de hepatocite	35
2.4. Metodologia studiului efectelor metabolice ale CCT	37
2.4.1. Cercetarea <i>in vivo</i> pe animale de laborator	37
2.4.2. Metode de investigare ale indicilor biochimici	38
2.4.3. Tehnologii informaționale și procedee de analiză statistică a rezultatelor	43
3. EVALUAREA ACȚIUNII COMPUȘILOR COORDINATIVI AI CUPRULUI CU TIOSEMICARBAZONE <i>IN VITRO</i>	45
3.1. Evaluarea potențialului citotoxic al CCT <i>in vitro</i> în cultura de celule de gliom C6 de șobolan (CCL - 107)	45
3.2. Evaluarea potențialului citotoxic al CCT <i>in vitro</i> în cultura de hepatocite	47

3.3. Impactul compușilor coordinativi ai cuprului cu tiosemicarbazone asupra viabilității și proliferării <i>in vitro</i> a celulelor sănătoase și tumorale	50
4. INFLUENȚA COMPUȘILOR COORDINATIVI AI CUPRULUI CU TIOSEMICARBAZONE ASUPRA INDICILOR HEMOLEUCOGRAMEI ȘOBOLANILOR SĂNĂTOȘI <i>IN VIVO</i>	55
4.1. Evaluarea impactului compușilor coordinativi ai cuprului cu tiosemicarbazone benzotiazolice asupra indicilor hemoleucogramei șobolanilor <i>in vivo</i>	55
4.2. Efectele compușilor coordinativi ai cuprului cu feniltiosemicarbazone asupra indicilor hemoleucogramei șobolanilor <i>in vivo</i>	59
4.3. Influența compușilor coordinativi ai cuprului cu aliltiosemicarbazone asupra indicilor hemoleucogramei șobolanilor <i>in vivo</i>	62
4.4. Analiza comparativă a influenței compușilor coordinativi ai cuprului cu tiosemicarbazone asupra indicilor hemoleucogramei șobolanilor <i>in vivo</i>	65
5. INFLUENȚA COMPUȘILOR COORDINATIVI AI CUPRULUI CU TIOSEMICARBAZONE ASUPRA INDICILOR STRESULUI OXIDATIV ȘI AI SISTEMULUI ANTIOXIDANT ÎN SERUL SANGVIN AL ȘOBOLANILOR SĂNĂTOȘI	73
5.1. Evaluarea activității compușilor coordinativi ai cuprului cu tiosemicarbazone asupra markerilor stresului oxidativ <i>in vivo</i>	73
5.2. Evaluarea acțiunii compușilor coordinativi ai cuprului cu tiosemicarbazone asupra indicilor sistemului antioxidant în serul sangvin al șobolanilor sănătoși	76
5.2.1. Evaluarea acțiunii compușilor coordinativi ai cuprului cu tiosemicarbazone asupra indicilor generali ai sistemului antioxidant în serul sangvin al șobolanilor sănătoși	76
5.2.2. Evaluarea acțiunii compușilor coordinativi ai cuprului cu tiosemicarbazone asupra indicilor individuali ai sistemului antioxidant în serul sangvin al șobolanilor sănătoși	77
5.3. Sinteza impactului acțiunii compușilor coordinativi ai cuprului cu tiosemicarbazone asupra indicilor stresului oxidativ și ai sistemului antioxidant în serul sangvin al șobolanilor sănătoși	82
CONCLUZII GENERALE	88
RECOMANDĂRI PRACTICE	90
BIBLIOGRAFIE	91
INFORMAȚII PRIVIND VALORIFICAREA REZULTATELOR CERCETĂRII	115
Declarația privind asumarea răspunderii	120
ANEXE	121
CV-UL AUTORULUI	12828

LISTA ABREVIELOR

AAT	–	activitatea antioxidantă totală (total antioxidant activity)
ADN	–	acidul dezoxiribonucleic (deoxyribonucleic acid)
AGE	–	produși finali ai glicării avansate (advanced glycation end products)
AMA	–	activitatea medie a substanțelor antioxidante (the average activity of antioxidant substances)
ARN	–	acidul ribonucleic (ribonucleic acid)
ATOX1	–	gena antioxidantă1 însoțită de cupru (antioxidant1 gene accompanying copper)
ATP	–	adenozin trifosfat (adenosine triphosphate)
ATP7A; ATP7B	–	polipeptide transportoare de cupru (copper transporter polypeptides)
BPA	–	balanța pro-oxidantă-antioxidantă (pro-oxidant-antioxidant balance)
CCS	–	gena însoțită de cupru pentru superoxid dismutaza (gene - copper chaperone for superoxide dismutase)
CCT	–	compuși coordinativi ai cuprului cu tiosemicarbazone (coordination compounds of copper with thiosemicarbazones)
DAM	–	dialdehida malonică (malonic dialdehyde)
DLAT	–	dihidrolipoamida S-acetiltransferaza (dihydrolipoamide S-acetyltransferase)
DMSO	–	dimetil sulfoxid (dimethyl sulfoxide)
DTC	–	ditiocarbamat (dithiocarbamate)
FGF1	–	factorul 1 de creștere a fibroblastelor (fibroblast growth factor 1)
FL	–	femtolitru (femtoliter)
GPO; GPx	–	glutation peroxidaza (glutathione peroxidase)
GR	–	glutation reductaza (glutathione reductase)
GSH total	–	glutationul total (total glutathione)
G-S-T	–	glutation-S-transferaza (glutathione-S-transferase)
HCT	–	hematocritul (hematocrit)
HGB	–	hemoglobina (hemoglobin)
HTD	–	homeostazia tiol-disulfidică (thiol-disulfide homeostasis)
MA	–	masa substanțelor antioxidante (mass of antioxidant substances)
MCH	–	conținutul mediu de hemoglobină într-un eritrocit (mean corpuscular hemoglobin)

MCHC	–	concentrația medie a hemoglobinei (mean corpuscular hemoglobin concentration)
MCV	–	volumul mediu al eritrocitului (average erythrocyte volume)
MPV	–	volumul mediu al trombocitului (mean platelet volume)
MRO	–	metaboliții reactivi ai oxigenului (reactive oxygen metabolites)
MTT	–	Bromură de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide)
MT	–	metalotioneine (metallothioneins)
NO	–	radicalul oxidului nitric (the nitric oxide radical)
NO ₂ +NO ₃	–	metaboliții oxidului nitric (nitric oxide metabolites)
PLT	–	trombocite (platelets)
PPOA	–	produși proteici de oxidare avansată (advanced oxidation protein products)
RBC	–	eritrocite (red blood cells/erythrocytes)
RDW	–	amplitudinea distribuției eritrocitare (red cell size distribution width)
RDW-CV	–	lățimea distribuției eritrocitare (erythrocyte distribution width)
RL	–	radicalii liberi (free radicals)
RR	–	ribonucleotid reductaza (ribonucleotide reductase)
SOD	–	superoxid dismutaza (superoxide dismutase)
SO	–	stresul oxidativ (oxidative stress)
SRN	–	specii reactive de azot (reactive nitrogen species)
SRO	–	specii reactive de oxigen (reactive oxygen species)
TAC	–	capacitatea antioxidantă totală (total antioxidant capacity)
TCA	–	ciclul acizilor tricarboxilici (tricarboxylic acid cycle)
TGN	–	rețeaua trans-Golgi (the trans-Golgi network)
TfR1	–	proteina receptoare de transferină (transferrin receptor protein)
TSC	–	tiosemicarbazone (thiosemicarbazones)
U/C	–	unități convenționale (conventional units)
VEGF	–	factorul de creștere al endoteliului vascular (vascular endothelial growth factor)
WBC	–	leucocite (white blood cells/leukocyte)

LISTA FIGURILOR

Figura 1.	Căile implicate în homeostazia celulară a cuprului conform Wang T. și coaut.....	18
Figura 2.	Mecanismul declanșării apoptozei de către ionii de cupru conform Aishajiang R. și coaut.....	24
Figura 3.	Mecanismul de inducere a autofagiei de către ionii de cupru conform Aishajiang R. și coaut.....	25
Figura 4.	Mecanismul cuproptozei conform Aishajiang R. și coaut.....	27
Figura 5.	Design-ul evaluării citotoxicității CCT <i>in vitro</i>	30
Figura 6.	Design-ul evaluării efectelor metabolice ale CCT <i>in vivo</i>	30
Figura 7.	Celule de gliom C6 de șobolan vizualizate la microscopul inversat cu contrast de fază: – (x100) în mediu Egale modificat de Dulbeco (DMEM).....	31
Figura 8.	Celule control de gliom C6 vizualizate în timpul efectuării testului MTT.....	32
Figura 9.	Celule control de gliom C6 vizualizate în timpul efectuării testului cu resazurină..	34
Figura 10.	Perfuzia ficatului prin vena cavă superioară.....	35
Figura 11.	Dezintegrarea mecanică a ficatului (A), carcasă hepatică după izolarea hepatocitelor (B).....	36
Figura 12.	Celule hepatice vizualizate cu microscopul inversat cu contrast de fază KZD.....	36
Figura 13.	Influența CCT în dozele de 10,0 $\mu\text{M/L}$ și 1,0 $\mu\text{M/L}$ asupra viabilității celulare de gliom C6 de șobolan testate <i>in vitro</i> prin testul MTT.....	45
Figura 14.	Proliferarea celulelor de gliom C6 de șobolan (CCL-107) sub influența CCT în dozele de 10,0 $\mu\text{M/L}$ și 1,0 $\mu\text{M/L}$ evaluate prin testul cu resazurină.....	46
Figura 15.	Rezultatele evaluării viabilității și citotoxicității <i>in vitro</i> sub acțiunea CCT (10,0 $\mu\text{M/L}$ și 1,0 $\mu\text{M/L}$) în hepatocite de șobolan.....	48
Figura 16.	Proliferarea hepatocitelor sub influența CCT în dozele de 10,0 $\mu\text{M/L}$ și 1,0 $\mu\text{M/L}$ evaluate prin testul cu resazurină.....	50
.Figura 17.	Aprecierea metaboliților oxidului nitric în serul sangvin la șobolani după administrarea compușilor coordinativi ai cuprului cu tiosemicarbazone.....	75

LISTA TABELELOR

Tabelul 1.	Compușii coordinativi ai cuprului cu tiosemicarbazone autohtoni studiați.....	29
Tabelul 2.	Divizarea animalelor experimentale în loturile de studiu cu CCT autohtoni.....	37
Tabelul 3.	Indicii sangvini la șobolani masculi sub influența compușilor coordinativi ai cuprului cu tiosemicarbazone benzotiazolice (în doza de 0,01 mg/kg).....	56
Tabelul 4.	Dinamica indicilor sangvini la șobolani femele sub influența compușilor coordinativi ai cuprului cu tiosemicarbazone benzotiazolice (în doza de 0,01 mg/kg).....	58
Tabelul 5.	Impactul acțiunii compușilor coordinativi ai cuprului cu feniltiosemicarbazone asupra indicilor sangvini la șobolani masculi (în doza de 0,01 mg/kg).....	60
Tabelul 6.	Influența compușilor coordinativi ai cuprului cu feniltiosemicarbazone asupra indicilor sangvini la femele (în doza de 0,01 mg/kg).....	61
Tabelul 7.	Acțiunea compușilor coordinativi ai cuprului cu alitiosemicarbazone asupra parametrilor sangvini ai șobolanilor masculi (în doza de 0,01 mg/kg).....	63
Tabelul 8.	Dinamica parametrilor sangvini la șobolani femele sub influența compușilor coordinativi ai cuprului cu alitiosemicarbazone (în doza de 0,01 mg/kg).....	66
Tabelul 9.	Nivelul indicilor stresului oxidativ și al balanței prooxidante-antioxidante (PAB) în serul de șobolani la acțiunea compușilor coordinativi ai cuprului cu tiosemicarbazone.....	71
Tabelul 10.	Influența compușilor coordinativi ai cuprului cu tiosemicarbazone asupra indicilor generali ai sistemului antioxidant în serul sangvin al șobolanilor sănătoși.....	78
Tabelul 11.	Acțiunea compușilor coordinativi ai cuprului cu tiosemicarbazone asupra indicilor ce reflectă capacitatea de neutralizare a radicalilor în serul sangvin al șobolanilor.....	79
Tabelul 12.	Modificările activității enzimelor metabolismului glutatationului în serul sangvin de șobolan la administrarea compușilor coordinativi ai cuprului cu tiosemicarbazone.....	81
Tabelul 13.	Modificările nivelului glutatationului total și al grupărilor tiolice în serul sangvin de șobolan la administrarea compușilor coordinativi ai cuprului cu tiosemicarbazone.....	83

INTRODUCERE

Actualitatea și importanța problemei cercetate

Actualmente, bolile oncologice reprezintă o problemă actuală a medicinei moderne. Cercetarea de noi medicamente cu activitate anti-neoplazică este una dintre sarcinile majore ale chimiei medicale moderne [1, 2]. Una dintre cele mai importante probleme în tratamentul bolilor neoplazice este toxicitatea ridicată a agenților chimioterapeutici. Până în prezent, sunt cunoscuți câteva sute de agenți antitumorali eficienți utilizați pentru a trata diferite patologii maligne și aproape toți acești compuși, utilizați în practica clinică, sunt neselectivi și toxici [2, 3, 4].

Medicamentele anti-neoplazice (doxorubicina, cisplatina, vinblastina, metotrexatul etc.) sunt utilizate pe scară largă în oncologia clinică [2, 4]. Acestea manifestă o selectivitate scăzută în raport cu țesuturile sănătoase, ceea ce conduce la reacții adverse severe, la necesitatea reducerii dozelor terapeutice de chimioterapie și, ca rezultat, la dezvoltarea rezistenței la chimioterapie [3]. În consecință, în ultimul deceniu, alături de sarcina de a găsi noi medicamente antitumorale, s-a pus problema creșterii selectivității și a reducerii toxicității compușilor noi, precum și cea a creării de noi strategii privind sinteza unor medicamente selective pentru celulele tumorale. Una dintre posibilitățile de reducere a toxicității generale a medicamentelor antitumorale este introducerea în moleculă a unui fragment responsabil de livrarea țintită a unui agent terapeutic care ar opri proliferarea celulelor tumorale. Creșterea selectivității față de celulele tumorale este posibilă în mai multe moduri: a) prin creșterea afinității medicamentului pentru receptorul de acid folic și de biotină, a cărui expresie s-a raportat a fi crescută pe suprafața majorității celulelor tumorale [2, 5]; b) prin introducerea fragmentelor din unele peptide în structura medicamentului antitumoral cu afinitate mare pentru integrinele super expresate la suprafața tumorii [2, 6] sau c) prin elaborarea de medicamente antitumorale, care vor conține anticorpi specifici ce vor recunoaște celulele tumorale [2, 7, 8].

O atenție deosebită în ultimii ani se acordă bazelor Schiff – compuși chimici importanți care și-au găsit aplicații largi în diverse domenii precum chimia anorganică, analitică și medicală datorită capacității lor de a forma numeroase complexe stabile atunci când sunt coordonate cu ioni ai metalelor de tranziție [9].

Bazele Schiff se referă la legăturile imine formate în urma reacției de substituție nucleofilă ce are loc între o amină și un compus carbonil, care sunt compuși de tip aldehide și cetone, în care gruparea carbonil este înlocuită cu o grupare imină sau azometină. Grupul lor de compuși conține electroni, făcându-i candidați ideali pentru elaborarea de noi medicamente antitumorale implementate în chimia terapeutică [2, 9, 10]. Dintre substanțele organice utilizate ca liganzi, un rol important le

revine tiosemicarbazonelor (TSC), compuși cu proprietăți farmacologice și terapeutice valoroase dintre care pot fi menționate cele antimicrobiene, antimicotice, antitumorale, antitoxice, antioxidante și antidiabetice [2, 11-13]. Tiosemicarbazonele reprezintă o clasă versatilă de liganzi de baze Schiff noi cu liganzi chelanți și macrociclici în baza halogensemicarbazidelor, combinația lor cu metale nonplatinice. Ele sunt obținute prin reacția de condensare dintre aldehide sau cetone cu tiosemicarbazide [2, 14]. Primele aplicații terapeutice ale tiosemicarbazonelor au fost în tratamentul tuberculozei și infecției cu lepră în anii 1950. În anii '60, au fost stabilite proprietățile antivirale și au fost implementați derivații Metisazona (Marboran) pentru a trata virusul variolei [2, 15]. Primele informații cu privire la activitatea antitumorală a tiosemicarbazonei au fost publicate în aceeași perioadă și s-au referit la tripină (3-aminopiridin-2-carboxaldehidă tiosemicarbazonă). Medicamentul a ajuns la studii de fază II în variate tipuri de cancer, manifestând un spectru larg de activitate antitumorală în diverse tipuri de celule tumorale [2, 16].

Trebuie de remarcat faptul că activitatea biologică a tiosemicarbazonelor în stare liberă este mai puțin pronunțată decât cea a compușilor de coordonare ai liganzilor cu metale [2, 17]. Acești compuși sunt obținuți, de obicei, prin reacția de condensare dintre aldehide sau cetone cu tiosemicarbazone.

Chelații macrociclici sintetici ai metalelor de tranziție joacă un rol deosebit în chimia coordinativă supramoleculară. Complexele de ioni metalici ale tiosemicarbazonelor s-au dovedit a fi agenți antitumorali mai puternici decât cisplatina. Ele inhibă proliferarea celulelor tumorale prin stoparea ciclului celular [2, 17]. Compușii coordinativi care conțin cupru și fier s-au dovedit a fi agenți terapeutici antitumorali mai activi decât semicarbazona liberă și tiosemicarbazona și capabili să perturbe metabolismul celular și căile de semnalizare. S-a observat că activitatea citotoxică depinde nu doar de ionul metalic, ci și de poziția grupării substituente în ciclul aromatic [2, 18-23]. Complecșii de fier trivalent și nichel bivalent cu S-metil-tiosemicarbazone de 2-hidroxi-R-benzaldehidă au prezentat potențial citotoxic maxim atunci când gruparea metoxi (-OCH₃) a fost plasată în inelul aromatic al lanțului lateral [2, 12].

În pofida progreselor semnificative realizate în chimioterapia cancerului, toxicitatea sistemică mare și rezistența la chimioterapicele antineoplazice rămân o provocare majoră pentru farmacoterapia oncologică contemporană. Astfel, este important ca medicamentele anticancerigene să exercite activitate antiproliferativă și citotoxică în celulele tumorale, fără a afecta celulele sănătoase. Având în vedere cele expuse mai sus, elaborarea de noi chimioterapice cu efecte adverse minime este de mare importanță teoretică și practică.

În acest aspect, deosebit de valoroase s-au dovedit a fi cercetările științifice privind sinteza dirijată a compușilor coordinativi ai metalelor 3d, efectuate la Catedra de Chimie Anorganică și Fizică de la Universitatea de Stat din Moldova. Pe parcursul ultimilor ani, sub conducerea profesorului universitar, academicianului Aurelian Gulea s-au obținut un șir de compuși noi ai metalelor 3d cu liganzi chelanți și macrociclici, asamblați în urma condensării tiosemicarbazonei cu aldehide și cetone și care manifestă proprietăți antitumorale net superioare doxorubicinei – preparat utilizat actualmente pe larg în oncologie.

Totuși, până în prezent, nu există cercetări profunde și detaliate privind influența compușilor coordinativi ai metalelor 3d asupra viabilității celulare, potențialului citotoxic și antiproliferativ *in vitro* în cancerul multifactorial, precum și efectele lor asupra celulelor normale, care ar putea servi ca bază pentru dezvoltarea de noi medicamente cu efecte anticanceroase potente și cu toxicitate minimă sau chiar lipsite de efecte adverse.

Scopul cercetării a fost studierea influenței compușilor coordinativi ai cuprului cu tiosemicarbazone autohtoni asupra viabilității celulare și evaluarea mecanismelor lor biochimice de acțiune pentru selectarea compușilor cu efecte toxice minime.

Obiectivele cercetării:

1. Cercetarea efectelor compușilor coordinativi ai cuprului cu tiosemicarbazone asupra viabilității și proliferării celulare *in vitro* pe celule de cancer de șobolan C6.
2. Evaluarea acțiunii compușilor coordinativi ai cuprului cu tiosemicarbazone asupra viabilității și a proliferării celulare *in vitro* pe hepatocite normale de șobolan.
3. Studierea influenței compușilor coordinativi ai cuprului cu tiosemicarbazone asupra indicilor hematologici *in vivo* pe animale de laborator sănătoase.
4. Estimarea acțiunii compușilor coordinativi ai cuprului cu tiosemicarbazone autohtoni asupra indicilor stresului oxidativ și ai sistemului antioxidant *in vivo* pe animale de laborator sănătoase.

Metodologia cercetării științifice

Studiul a fost avizat pozitiv de Comitetul de Etică a Cercetării al USMF „Nicolae Testemițanu” (proces-verbal nr. 73, la nr. 65, din data de 26.04.2017).

S-a efectuat un studiu preclinic experimental *in vitro* pe anumite sisteme celulare (gliom C6 de șobolan, hepatocite normale de șobolan) și *in vivo* pe șobolani albi de laborator (*Rattus norvegicus* var. Albicans), respectând toate rigorile științifice și principiile etice de cercetare. S-a apreciat viabilitatea celulelor, capacitatea lor de proliferare și modificările sangvine și metabolice la administrarea CCT

autohtoni. Pentru realizarea scopului și obiectivelor tezei au fost elaborate un șir de micrometode de cercetare în baza metodelor existente.

Datele obținute au fost procesate statistic cu ajutorul funcțiilor și modulelor programului Statistical Package for the Social Science (v.23, SPSS Inc. Chicago, IL, USA) și prezentate în diferite tipuri de tabele și figuri realizate în Excel și Word. Pentru a testa diferența semnificativă dintre indicii studiați ai grupurilor comparate, a fost aplicat testul post-hoc pentru comparații multiple Games-Howel după One-Way Anova și după testul nonparametric Kruskal Wallis. Pentru stabilirea legăturilor s-a utilizat coeficientul nonparametric de corelație ρ Spearman.

Cercetarea s-a realizat la Laboratorul Biochimie al USMF „Nicolae Testemițanu” în cadrul proiectelor:

1) doctoral cu tema „Efectele metabolice ale compușilor biologic activi autohtoni cu acțiune antitumorală” finanțat de Ministerul Educației și Cercetării al R. Moldova (HG nr.1071 din 22.09.2016 și ordinul MEC nr. 842 din 26.09.2016),

2) „Identificarea mecanismelor biochimice celulare și moleculare ale acțiunii compușilor bioactivi autohtoni noi și argumentarea folosirii lor în chimioprevenția și tratamentul unor procese tumorale” (cifrul 15.817.04.05F 2015 -2019);

3) „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, 2020-2023).

Noutatea și originalitatea științifică a rezultatelor obținute

S-a cercetat acțiunea individuală a diferitor tipuri de CCT asupra viabilității și capacității de proliferare *in vitro* a celulelor canceroase de gliom C6 de șobolan, care constituie o cultură celulară similară gliomului uman, ce permite raportarea relativă a rezultatelor la om. S-a studiat *in vitro* și potențialul citotoxic al CCT asupra hepatocitelor normale de șobolan, celule care reprezintă sediul metabolizării diferitor medicamente și subsecvent ținta acțiunii toxice a substanțelor farmaceutice. În ambele cazuri a fost identificată dependența acțiunii de tipul CCT – benzotiazolici, fenil și alil, și de doza administrată.

S-au elucidat *in vivo*, pe animale de laborator sănătoase, efectele CCT autohtoni noi asupra celulelor sangvine (număr și proprietăți), sângele fiind implicat în transportul CCT și al metaboliților lor, precum și reflectă modificările metabolice induse de CCT în organe și țesuturi. Schimbările produse în hemoleucograma șobolanilor sănătoși au fost selective în funcție de tipul CTT și de sexul animalului de laborator.

Pentru a stabili unele mecanisme de acțiune a CCT s-au evaluat *in vivo* markerii stresului oxidativ și ai sistemului antioxidant în sângele șobolanilor sănătoși, fiind constatată acțiunea modulatorie a CCT ce poate constitui posibile mecanisme ale acțiunii antitumorale a compușilor testați.

Aprobarea rezultatelor științifice

Rezultatele cercetării au fost prezentate, discutate și aprobate la mai multe foruri științifice naționale și internaționale:

- *Zilele Universității și Conferințele științifice anuale*, Probleme fundamentale ale medicinei. Fiziologia normală și patologică, biochimie, farmacologie și farmacologie clinică. USMF „Nicolae Testemițanu”, Chișinău, Moldova, 18 – 20 octombrie 2017; 15 – 19 octombrie 2018; 15 – 18 octombrie 2019.
- *Congresul consacrat aniversării a 75-a de la fondarea USMF „Nicolae Testemițanu”*. Probleme fundamentale ale medicinei. Fiziologie, fiziopatologie, biochimie, farmacologie și medicină de laborator. Chișinău, Moldova, 21 – 23 octombrie 2020;
- *Conferințele Științifice anuale Cercetarea în Biomedicină și Sănătate: Calitate. Excelență și Performanță*. Probleme fundamentale ale medicinei. Fiziologie, fiziopatologie, biochimie, farmacologie și medicină de laborator. USMF „Nicolae Testemițanu”, Chișinău, Moldova, 20 – 22 octombrie 2021; 19 – 21 octombrie 2022;
- *International Chemical Engineering and Materials Symposium, SICHEM 2020*, University Politehnica of Bucharest, Romania, 17 – 18 september 2020;
- *8th International Medical Congress for Students and Young Doctors MedEspera*, USMF „Nicolae Testemițanu”, Chișinău, Moldova, 24 – 26 septembrie 2020;
- *Vth International Scientific and Practical Conference*, Medical drugs for humans. Modern issues of pharmacotherapy and prescription of medicine. National University of Pharmacy. Educational and Research Institute of Applied Pharmacy, Kharkiv, Ukraine, 11 – 12 march 2021;
- *Simpozion Științific Național cu participare Internațională: Biotehnologii Moderne – soluții pentru provocările lumii contemporane*, Chișinău, Moldova, 20 – 21 mai 2021;
- *International Scientific Conference on „Applications of Chemistry in Nanosciences and Biomaterials Engineering”*, the Academy of Romanian Scientists, University Politehnica of Bucharest, Romania, 25 – 26 june 2021;

- *4th International European Conference on Interdisciplinary Scientific Researches*, Institute of Economic Development and Social Researches, Warsaw, Poland, august 8 – 9, 2021;
- *International Scientific Conference on „Applications of Chemistry in Nanosciences and Biomaterials Engineering – NanoBioMat”*, the Academy of Romanian Scientists, University Politehnica of Bucharest, 22 – 24 june 2022;
- *5th edition International Scientific Conference on Microbial Biotechnology*, Chisinau, Moldova, 12 – 13 october, 2022;
- *International Scientific Conference on „Applications of Chemistry in Nanosciences and Biomaterials Engineering – NanoBioMat”*, the Academy of Romanian Scientists, University Politehnica of Bucharest 24 – 26 november 2022.

Publicații la tema tezei

Au fost publicate 28 de lucrări științifice la subiectul tezei, inclusiv 6 articole, dintre care 2 în reviste din baze de date internaționale (SCOPUS, Biomedicines 2023: Citescore 3,0; IF - 4,757), 1 articol în revistă internațională recenzate, 2 articole în reviste din Registrul Național al revistelor de profil, categoria B, inclusiv 1 articol în Moldovan Journal of Health Sciences (Revista de Științe ale Sănătății din Moldova) și 14 rezumate în lucrările conferințelor și congreselor științifice naționale și internaționale. Au fost obținute 3 brevete de invenții și 5 certificate de inovator.

Cuvinte-cheie: compuși coordinativi ai cuprului cu tiosemicarbazone, viabilitate, proliferare, citotoxicitate, stres oxidativ, sistem antioxidant.

1. MECANISMELE DE ACȚIUNE A COMPUȘILOR COORDINATIVI LOCALI AI CUPRULUI CU TIOSEMICARBAZONE

1.1. Aplicarea în medicină a compușilor coordinativi ai cuprului cu tiosemicarbazone

În ultimele decenii, tiosemicarbazonele și complexele lor cu metalele de tranziție au devenit destul de importante în chimia medicinală [24-26]. Au fost efectuate numeroase investigații pentru a testa noi compuși de coordonare a metalelor, care pot fi precursori ai unor medicamente mai eficiente și mai puțin toxice acționând prin diferite mecanisme biologice [27-28]. Ulterior, și datorită potențialelor lor proprietăți terapeutice, acești liganzi multidentati au constituit o clasă importantă de compuși care și-au găsit o aplicare largă în diferite domenii ale activității umane [29, 30]. Proprietățile electronice ale sistemului donor N,N,S și varietatea de specii chimice pe care sistemul le poate produce sunt motivele pentru care liganzii TSC acționează ca buni agenți de chelare ce se pot coordona cu ușurință cu o mare varietate de ioni ai metalelor de tranziție, formând complexe care pot modifica activitatea biologică a liganzilor precursori [30]. TSC și complexele lor cu metale de tranziție, datorită versatilității lor chimice, au un spectru larg de proprietăți farmacologice, cum ar fi cele antibacteriene, antifungice, antiparazitare și antivirale [31-32]. Interacțiunea dintre acești compuși și ADN a atras o mare atenție în chimia medicinală datorită potențialei utilizări a acestor complexe ca agenți antineoplazici [33]. Tiosemicarbazonele (TSC) sunt o clasă de compuși de interes medicinal a căror activitate anticanceroasă a fost raportată încă din anii 1960 [34, 35] și sunt încă în curs de dezvoltare [36-40]. Unele dintre ele, cum ar fi MarboranTM sau TriapineTM, sunt utilizate în practica clinică [41].

Deși chimia medicinală s-a bazat aproape exclusiv pe compuși organici și produse naturale, în ultimele trei decenii, complexele metalice au obținut un interes din ce în ce mai mare în calitate de produse farmaceutice pentru utilizare ca agenți de diagnostic sau ca medicamente, inclusiv chimioterapeutice [42-44]. Un subiect important de dezbatere a fost accentul relativ care ar trebui focusat pe medicamentele pe bază de metale țintite molecular (concepute să se lege și să inhibe o singură țintă moleculară cu specificitate ridicată) sau pe noi agenți citotoxici și cu spectru larg de acțiune. În medicamentele pe bază de metal, metalul poate coordona liganzii într-o configurație tridimensională precisă, promovând asigurarea recunoașterii de către moleculă și interacțiunea acesteia cu o țintă specifică moleculară. Acest fapt este îmbunătățit și mai mult de multiple modificări chimice ale liganzilor. Mai mult, complexele metalice suferă cu ușurință reacții redox și de substituție de liganzi care le permit să participe în procesele redox biologice și să interacționeze cu biomoleculele. O arie de investigare în acest domeniu este utilizarea complexelor biologic active formate din ioni

esențiali, precum cuprul [45]. Deoarece orice metal esențial, care se eliberează din căile sale metabolice normale, poate fi foarte toxic pentru organism, complexe ale acestor metale pot servi ca agenți citotoxici eficienți [46].

Cuprul se găsește în toate organismele vii și este un microelement, care joacă un rol crucial în activitatea vitală a organismului [47]. Este important pentru funcționarea mai multor enzime și proteine implicate în metabolismul energetic, sinteza ADN-ului, precum citocrom oxidaza, superoxid dismutaza (SOD), ascorbat oxidaza și tirozinaza. Funcțiile majore ale compușilor biologici ai cuprului implică reacții de oxido-reducere în care moleculele biologice care conțin cupru reacționează direct cu oxigenul molecular pentru a produce radicali liberi [48]. Cuprul joacă un rol esențial în fiziologia celulară și ca un cofactor catalitic în procesele redox ale respirației mitocondriale, în absorbția fierului, captarea radicalilor liberi, reticularea collagenului și a elastinei [49]. Ca și în cazul sindromului *Menkes* și al bolii *Wilson* [50], care sunt de origine genetică, modificarea concentrației de cupru este asociată cu o multitudine de boli multifactoriale precum artrita reumatoidă, ulcerul gastro-intestinal, epilepsia, diabetul și cancerul. Cercetările privind afecțiunile *Menkes* și *Wilson* au oferit noi perspective în domeniul homeostaziei cuprului și în special în înțelegerea traficului intracelular și a distribuției cuprului la nivel molecular. Toxicitatea cuprului provine din capacitatea sa de a produce specii reactive de oxigen (SRO), de a substitui alți ioni metalici, de a peroxida lipidele și de a afecta structura ADN-ului și ARN-ului [51]. Niveluri crescute de cupru au fost găsite în multe tipuri de cancer uman, inclusiv de prostată, mamar, colon, plămâni și creier [52]. O anumită cantitate de cupru local pare să fie necesară pentru ca angiogeneza să aibă loc [53]. Prin urmare, complexii de cupru pot asigura, cel puțin în principiu, un spectru larg de activitate antitumorală.

Acumularea în exces de cupru, precum și deficiența acestuia pot fi dăunătoare sănătății umane, prin urmare, homeostazia cuprului este reglată. Un grup conservat de proteine care conțin domenii unice bogate în cisteină, metionină sau histidină, denumite secvențe de legare la metal, mențin concentrația de Cu liber la $<10^{-18}$ per celulă M [54]. Căile implicate în menținerea homeostaziei celulare a cuprului în celulele de mamifere sunt prezentate în figura (1).

Cuprul alimentar este absorbit în tractul digestiv și ulterior intră în circulația sangvină prin acțiunea în principal a proteinei ATP₇A (proteina Menkes). Cea mai mare parte a cuprului din serul uman normal este legată de ceruloplasmină, o enzimă care conține șase atomi de cupru atât în stare de Cu(II) cât și Cu(I). Cuprul în această formă nu este intermodificabil. Forma modificabilă a cuprului este legată de albumină și aminoacizi [55]. A fost identificat complexul cupru-histidină ca principalul

complex cupru-aminoacizi din serul uman. De asemenea, s-a demonstrat că albumina umană formează un complex ternar cu cupru-histidina [56, 57].

Unul dintre principalele mecanisme propuse pentru a explica toxicitatea celulară indusă de cupru provine din tendința ionilor liberi de cupru de a participa la formarea SRO. Ionii de cupru pot participa în reacțiile de oxidare și reducere. În prezența radicalului superoxid anion (O_2^-) sau a agenților reducători precum acidul ascorbic sau glutationul redus (GSH), Cu(II) poate fi redus la Cu(I), care este capabil să catalizeze formarea de radicali hidroxil ($OH^\cdot$) din peroxid de hidrogen (H_2O_2) prin reacțiile Fenton și Haber-Weiss. Acest fapt conduce la deteriorarea oxidativă a membranei celulare [58]. S-a demonstrat că cuprul este capabil să inducă ruperea catenelor de ADN și oxidarea bazelor azotate prin producerea de SRO. Totodată, GSH inhibă formarea radicalilor liberi de către ionii de cupru în prezența peroxidului de hidrogen, ascorbatului și ADN-ului. Efectul protector al GSH a fost atribuit capacității sale de a stabiliza Cu(I), prevenind ciclul redox și generarea de radicali liberi. La intrarea în citoplasmă, cuprul poate fi complexat cu o varietate de liganzi pentru a preveni interacțiunea cuprului liber cu componentele membranelor celulare, proteinele sau ADN-ul ce poate conduce la deteriorarea oxidativă a lor. Totuși, majoritatea cuprului citoplasmatic este complexat cu GSH în formă de Cu(I) [59]. Complexul Cu(I)-GSH poate dona cuprul diferitor proteine intracelulare, cum ar fi metalotioneinele (MT), o familie de proteine importante pentru detoxifierea metalelor [60-62]. O altă clasă importantă de molecule care sunt vitale pentru livrarea cuprului sunt însoțitoarele de cupru. Acestea sunt niște peptide citosolice care includ ATOX1 (HAH1), care furnizează Cu către ATPaza de tip P ATP_{7A} și ATP_{7B} la rețeaua trans-Golgi, COX17, care livrează Cu către citocrom-c oxidaza în mitocondrii, și CCS1, care asigură cu Cu SOD citoplasmatică [63]. Pentru a evita excesul de cupru, celulele mamiferelor au două ATPaze de tip P structural similare, ATP_{7A} și ATP_{7B}, care mediază fluxul celular de Cu. Defecte în funcția ATP_{7A} conduc la boala Menkes, în timp ce defectele ATP_{7B} provoacă boala Wilson. ATP_{7A} este exprimat în epiteliul intestinal [64], precum și în majoritatea țesuturilor, altele decât ficatul [65]. ATP_{7B} este exprimat în ficat și rinichi și într-o măsură mai mică în creierul animalelor intacte [66].

Proteinele care mențin homeostazia cuprului reprezintă un grup conservat, care conține domenii de legare a cuprului bogate în resturi de cisteină, metionină sau histidină [67]. Acest fapt include în principal trei procese continui: absorbția, distribuția subcelulară și efluxul. Căile implicate în homeostazia celulară a cuprului sunt descrise în figura 1.

Cuprul manifestă o acțiune biochimică considerabilă fie ca metal sau ca constituent al diversilor compuși la administrarea endogenă la animale. Cuprul reprezintă un microelement de tranziție esențial

atât pentru procariote, cât și pentru eucariote. Cu toate acestea, cuprul liber intracelular trebuie strict limitat datorită efectelor sale secundare toxice, prin generarea de specii reactive de oxigen în ciclul redox. Astfel, toate organismele posedă mecanisme neelucidate de homeostazie celulară a cuprului care asigură absorbția, distribuția, sechestrarea și exportul cuprului [69].

Cuprul – microelement esențial care joacă rolul vital ca un cofactor catalitic pentru o varietate de metaloenzyme, inclusiv superoxid dismutaza (pentru protecție împotriva radicalilor liberi), citocrom c oxidaza (în lanțul mitocondrial de transport al electronilor), tirozinaza-enzimă responsabilă de sinteza melaninei și lisil oxidaza etc. [70-71].

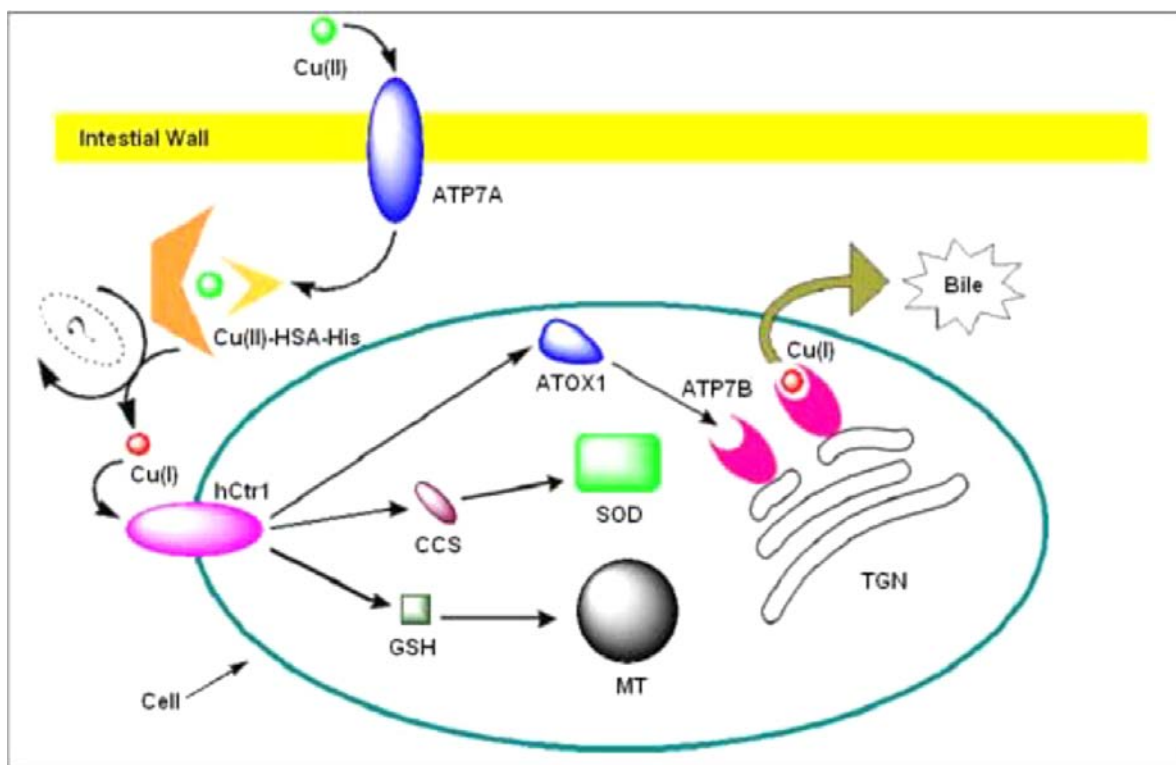


Figura 1. Căile implicate în homeostazia celulară a cuprului conform Wang T. și coaut. [68]

Notă: **ATP7A** și **ATP7B** – polipeptide transportatoare de cupru ATPază, **Cu(II)-HSA-His** – complex ternar, **hCtr1** – transportor uman de cupru 1, **ATOX1** – gena antioxidantă 1 însoțită de cupru, **CCS** – gena însoțită de cupru pentru superoxid dismutaza, **MT** – metalotioneine, **TGN** – rețeaua trans- Golgi.

S-a determinat că sechestrarea cuprului(I) de către MT în celulele mucoasei intestinale este asociată cu scăderea absorbției cuprului [72-73]. Datele obținute au estimat că administrarea cuprului la șobolani a condus la o scădere a nivelului de GSH în ficat [74], iar alte cercetări au relevat că șobolanii cu deficiență de cupru au avut o creștere a nivelului de GSH în hepatocite [75]. Celulele cu niveluri reduse de GSH au absorbția mai lentă a cuprului din mediu și, prin urmare, o concentrație

mai redusă de cupru pentru starea de echilibru a celulei [76]. Dovezile de mai sus susțin concluzia că GSH și MT-urile sunt cel puțin parțial implicate în controlul distribuției cuprului.

Cercetările menite să elucideze rolul cuprului în promovarea angiogenezei au demonstrat că acest metal interacționează cu mai mulți factori proangiogenici. În pofida semnificației funcționale a acestor interacțiuni rămase adesea neclare, s-a sugerat că rolul cuprului în angiogeneză se referă la mai multe mecanisme: 1) acționează prin legarea factorilor de creștere angiogenici și creșterea afinității acestora pentru celulele endoteliale, ca și în cazul angiogeninei; 2) controlează secreția de citokine angiogenice, așa cum s-a demonstrat ca FGF1 și IL-1 și 3 induc exprimarea factorilor de creștere angiogenici, cum ar fi VEGF [77].

TSC-ele au fost studiate intens datorită inhibiției asupra enzimei ADN ribonucleotid difosfat reductaza și selectivității acestora față de cancerule hormono-responsive [78]. De mulți ani se știe că un număr mare de bistiozemicarbazone (bTSC) și serii de complexe de cupru ale acestora au prezentat activități antitumorale promițătoare [79]. O proprietate critică a multora dintre aceste complexe de cupru este solubilitatea redusă în apă și toxicitatea relativ ridicată *in vivo* [80]. În ultimele decenii s-au făcut multe încercări de îmbunătățire a hidrofilității și de reducere a efectelor toxice prin modificarea TSC ale complexelor de cupru [81].

Interesul mare pentru bazele Schiff care conțin tiosemicarbazonă și complecșii lor cu metale de tranziție se datorează activității lor biologice proeminente [82]. Reieșind din cele menționate mai sus, complexele de cupru pot oferi, în principiu, un spectru mai larg de activitate antitumorală, de aceea, acestea merită o atenție deosebită.

Tiosemicarbazonele în forma lor neutră sau deprotonată acționează ca liganzi N, N, S-tiodentați în timp ce formează compuși chelați cu ioni metalici esențiali manifestând activitate antiproliferativă pe diferite linii de celule tumorale.

Chelații macrociclici sintetici ai metalelor de tranziție au atras multă atenție în coordonarea și chimia supramoleculară [83]. Unii dintre chelații formați de tiosemicarbazone au primit o atenție considerabilă ca compuși ai medicamentelor anticanceroase. S-a observat că activitatea citotoxică depinde nu numai de ionul metalic, ci și de poziția grupării substituente în ciclul aromatic. S-a demonstrat că complexele metalice care conțin Cu(II) și Fe(II) sunt mai active decât semicarbazona și tiosemicarbazona liberă, aceste complexe având o activitate biologică mai înaltă [84].

Mecanismele biochimice de acțiune ale tiosemicarbazonelor sunt multiple. Ele includ inhibarea biosintezei ADN-ului prin blocarea enzimei ribonucleotid difosfat reductaza, pe de o parte, iar pe de

altă parte, legarea de bazele azotate ale ADN sau ARN, fapt ce împiedică sau blochează replicarea acestora. Un alt mecanism constă în lezarea catenelor de ADN prin inducerea stresului oxidativ [85].

Având în vedere rolul enzimei ribonucleotid difosfat reductaza în multe forme de cancer, datele prezentate mai sus sugerează o nouă cale de studii promițătoare și relevante în domeniul de dezvoltare a medicamentelor noi. Inhibarea topoizomerazei II și a interacțiunilor ADN este un alt mecanism important de acțiune al tiosemicarbazonelor și complexelor lor cu metalele de tranziție. Topoizomeraza II (Topo-II) este o enzimă nucleară a celulei eucariote care despiralizează ADN, trecând un helix prin altul pentru a preveni supra înfășurarea în timpul replicării ADN-ului [86]. Topo-II este necesară pentru sinteza ADN-ului și diviziunea celulară, celulele cu proliferare rapidă, cum ar fi cele din tumori, conțin în general un nivel ridicat al acestei enzime, ceea ce o face o țintă interesantă terapeutică în celulele canceroase.

Zeglis B. M., Divilov V., Lewis J. S., (2011) au evaluat activitatea antiproliferativă a tiosemicarbazonelor α -heterociclice și a complexilor lor de cupru (II). S-a elucidat că complexele Cu(II)(tiosemicarbazonato)Cl inhibă catalitic topoizomeraza-II α la concentrații cu un ordin de mărime mai mic (0,3-7,2 μ M) decât liganzii lor corespunzători de tiosemicarbazonă. S-a estimat, de asemenea, că complexele de cupru inhibă proliferarea celulelor cancerului mamă care exprimă niveluri ridicate de topoizomerază-II α (SK-BR-3) la concentrații mai mici decât celulele care exprimă niveluri mai scăzute ale enzimei (MCF-7) [87].

Tiosemicarbazonații de cupru (II) sunt capabili să inhibe activitatea Topo II α prin prevenirea formării complexului ADN-enzimă sau prin interferarea cu domeniul ATP al enzimei. Wilson J. T. et al (2016) au adus dovezi precum că complexele Cu(II) ale tiosemicarbazonelor α -(N)-heterociclice inhibă catalitic enzima prin domeniul ATPazei, dar promovează și scindarea ADN-ului dublu catenar de către enzimă, fapt ce ar putea fi o strategie foarte promițătoare în lupta împotriva cancerului. Datele prezentate permit de a încuraja extinderea acestei familii de remedii anticancerigene semnificativ de active în studiile clinice și în terapia cancerului pe viitor [88, 89].

Topo-II α este un biomarker bine-cunoscut care este supraexprimat în multe forme de cancer și reprezintă una dintre cele mai importante ținte pentru chimioterapicele moderne, cu o mare varietate de inhibitori (inclusiv etoposid, doxorubicină, mitoxantronă, amsacrin și idarubicină) folosiți în clinică în calitate de remedii antitumorale [90].

Având în vedere potențialul mare al TSC și al complexelor lor metalice în elaborarea agenților chimioterapeutici și importanța Topo-II α în multe forme de cancer, aceste rezultate sugerează o nouă cale de studii promițătoare care ar putea ajuta la progresul cercetărilor în acest domeniu.

Proteazomii sunt mașini de degradare a proteinelor care joacă multiple roluri în viața celulei: îndepărtează proteinele anormale și pliate greșit din celulă, sunt implicați în reglarea ciclului celular, în diferențierea celulară (unde degradează factorii de transcripție și enzimele metabolice) și care manifestă un rol central în reglarea proteinelor ce controlează progresia ciclului celular și apoptoza, și de aceea au devenit o țintă importantă pentru chimioterapia antitumorală [91, 92]. Deoarece concentrațiile mai înalte de cupru sunt caracteristice pentru multe tumori umane, ținerea cuprului celular cu agenți de chelatare a cuprului prin inhibarea proteazomului celulelor canceroase a devenit o nouă cale eficientă în terapia cancerului [93-95]. S-a demonstrat recent că bazele Schiff și complexele lor cu Cu pot fi utilizate ca inhibitori tumorali proteazom specifici și inductori de apoptoză, prin ținerea căii ubiquitin-proteazomice [96]. Prin urmare, inhibarea selectivă a proteazomului și inducerea apoptotică în celulele canceroase pot fi considerate ca strategii anticanceroase relevante ale chimiei medicale.

În afară de aceste mecanisme comune, s-a observat, de asemenea, că substituția azotului terminal mărește activitatea globală a derivaților tiosemicarbazonelor și a complexelor lor metalice asupra diferitor tumori [97]. Complexul terminal amino substituit a prezentat o activitate anticancerigenă mai puternică decât cea a complexului nesubstituit.

Interesul pentru complexele metalice cu tiosemicarbazone și semicarbazone a fost stimulat, deoarece activitatea biologică este adesea sporită pe baza complexelor [98]. Explicația mai rezonabilă a activității superioare a complexelor metal-tiosemicarbazone în comparație cu liganzii liberi constă în prevalența mecanismului difuz asupra mecanismului de transport activ prin membrane. Chelarea ionului metalic de către regiunile cele mai polare ale liganzilor (atomii donatori) permite o absorbție mai ușoară de către celulă. Rezultatele obținute indică faptul că complexarea derivaților tiosemicarbazonei cu ioni Cu(II) sporește activitatea lor anti-neoplazică, efectul lor antitumoral fiind asociat cu deteriorarea ADN-ului și faza G2 / M a stopării ciclului celular, precum și cu tulburări ale expresiei enzimelor antioxidante [99].

Coordonarea tiosemicarbazonei cu ionul de cupru poate activa căile de moarte celulară apoptotică prin mecanisme care sunt atât dependente, cât și independente de proteina p53 care este considerată gardianul celulei. Acest fapt este confirmat de un studiu în care cercetătorii au stabilit că aproximativ două treimi dintre gliome au defecte în calea p53, iar capacitatea compușilor tiosemicarbazonici de a afecta celulele, indiferent de statutul lor privind proteina p53, sugerează că au un potențial eficient de a fi elaborate ca noi candidați chimioterapici pentru terapia tumorilor cerebrale [100].

1.2. Impactul utilizării compușilor coordinativi ai cuprului cu tiosemicarbazone asupra stresului oxidativ și sistemului antioxidant

Esența stresului oxidativ (SO) este starea de dezechilibru a sistemului de pro-oxidare-antioxidare, manifestată prin concentrația sporită de SRO instantaneu sau cronic [101]. Majoritatea celulelor canceroase au prezentat glicoliză anaerobă crescută, având ca rezultat producerea de acid lactic și niveluri ridicate de stres oxidativ [102]. Cu toate acestea, astfel de intensități au fost mai puțin nocive decât ar fi în celulele normale, deoarece nivelurile persistente scăzute de SO pot promova proliferarea celulară și migrarea tumorii, în timp ce intensitatea mare a SO poate declanșa moartea celulelor canceroase [103]. Ca metal de tranziție, ionii de Cu în concentrații crescute în țesutul canceros manifestă un impact antitumoral care implică în principal SO prin declanșarea reacției Fenton și de formare a SRO.

Speciile reactive de oxigen sunt vitale pentru diferite procese biologice din celulă, deoarece acționează ca mesageri secunzi în căile de semnalizare celulară [104]. De asemenea, este bine cunoscut faptul că celulele canceroase au niveluri mai ridicate de SRO în comparație cu celulele normale, acestea fiind implicate în promovarea tumorii prin inducerea directă a instabilității genomice, fapt datorat intensificării proceselor de oxidare, metilare a ADN-ului, proteinelor și lipidelor. Supraproducția de SRO poate afecta reglarea expresiei anumitor gene și proteine care sunt responsabile pentru restabilirea echilibrului redox. Dintre acestea, cele mai importante sunt genele care codifică superoxid dismutaza mangan dependentă (MnSOD) și catalaza (CAT). MnSOD este o proteină mitocondrială extrem de eficientă în captarea anionilor superoxid, transformându-i în peroxid de hidrogen, care este scindat în continuare de CAT în citosol [105]. Prin urmare, majorarea SRO poate fi utilizată ca o cale potențială pentru distrugerea celulelor canceroase [106].

Într-un șir de studii s-a demonstrat rolul important al generării SRO în creșterea activității selective a tiosemicarbazonelor și complexelor lor asupra celulelor tumorale [107-111].

Compușii coordinativi care conțin cupru s-au dovedit a fi agenți terapeutici antitumorali promițători care acționează prin formarea SRO, precum și prin capacitatea de diminuare a expresiei enzimelor antioxidante [112].

Celulele canceroase demonstrează o necesitate mai mare de fier decât celulele normale și acest fapt se datorează creșterii expresiei receptorului transferinei 1 (TfR1), care preia fierul din proteina de transport a fierului, transferina (Tf), de pe suprafața celulei [113, 114].

Deși mecanismele moleculare implicate în activitatea TSC nu au fost complet elucidate, au fost raportate o serie de moduri de acțiune legate cu homeostazia fierului cum ar fi, inhibarea captării celulare a fierului din transferină și mobilizarea fierului din celule [115-117].

Multe dintre complexele metalice sunt raportate ca având activitate anticanceroasă și antioxidantă puternică [118, 119]. Studiile anterioare au estimat că complexele de ruteniu și nichel ale TSC au proprietăți antioxidante și antimaligne semnificative [120-122]. Mai mult, există o necesitate din ce în ce mai mare de a elabora noi medicamente anticancerigene cu capacitatea de captare a radicalilor liberi, deoarece multe dintre moleculele utilizate în clinică prezintă reacții adverse severe și toxicitate sistemică [123]. Prin urmare, crearea unor noi molecule cu proprietăți antioxidante care pot inhiba proliferarea celulelor canceroase reprezintă o problemă de mare actualitate [124].

Tiosemicarbazonele sunt o clasă bine cunoscută de compuși cu proprietăți antitumorale elocvente, dar mecanismele moleculare precise de acțiune sunt încă insuficient elucidate [125].

Conceperea de noi agenți antitumorali este asociată cu multe impedimente, iar principala problemă constă în faptul că nu există un ghid general care ar putea direcționa sinteza de noi agenți antitumorali activi cu cele mai reduse proprietăți de apariție a rezistenței. Până în prezent, s-au înregistrat progrese semnificative în înțelegerea etiologiei moleculare a cancerului, dar modalitățile terapeutice ideale încă lipsesc. Având în vedere aceste fapte, este necesar să se accelereze elaborarea de noi agenți anticancerigeni. Potențialul terapeutic al diversității de molecule (atât liganzi, cât și complexe metalice) poate fi valorificat pe deplin prin proiectarea de agenți anticancerigeni noi și eficienți. Astfel, ar fi benefic să se exploreze complexe de metale de baze heterociclice Schiff cu diverse caracteristici moleculare și topologii ca agenți anticancer. În plus, strategiile de țintire și activare pot fi utile în dezvoltarea generațiilor viitoare de medicamente anticancerigene cu capacitatea de a depăși dezavantajele agenților disponibili. Prin urmare, studiile chimice ale agenților anticancer în condiții relevante din punct de vedere fiziologic devin foarte importante în elaborarea medicamentelor.

1.3. Aplicațiile multifuncționale bazate pe moartea celulară indusă de cupru

Apoptoza este principala cale de moarte celulară care joacă un rol important în tratamentul cancerului. Excesul de cupru poate induce niveluri toxice de SRO, care exacerbează SO mitocondrial, provocând leziuni mitocondriale și apoptoză celulară printr-o cale mediată de mitocondrii. Deoarece mecanismul apoptozei este cunoscut a fi complex și implică diferite căi de semnalizare, este popular ca în strategiile de tratament să se utilizeze apoptoza ca țintă principală de tratament. Numeroase cercetări au relevat că apoptoza pe bază de cupru în cancer este posibilă. De exemplu, Yang și colegii săi au demonstrat că sulfatul de cupru (CuSO_4) poate induce apoptoza mediată de SRO în hepatocitele de pui prin calea mitocondrială. SO indus de Cu a crescut Bax pro-apoptotică, în timp ce Bcl-2 anti-apoptotică, conducând la o modificare a permeabilității membranei mitocondriale prin scăderea

potențialului membranei mitocondriale, stadiu incipient al apoptozei, și prin eliberarea de citocrom c, a activat caspaza 3 [126].

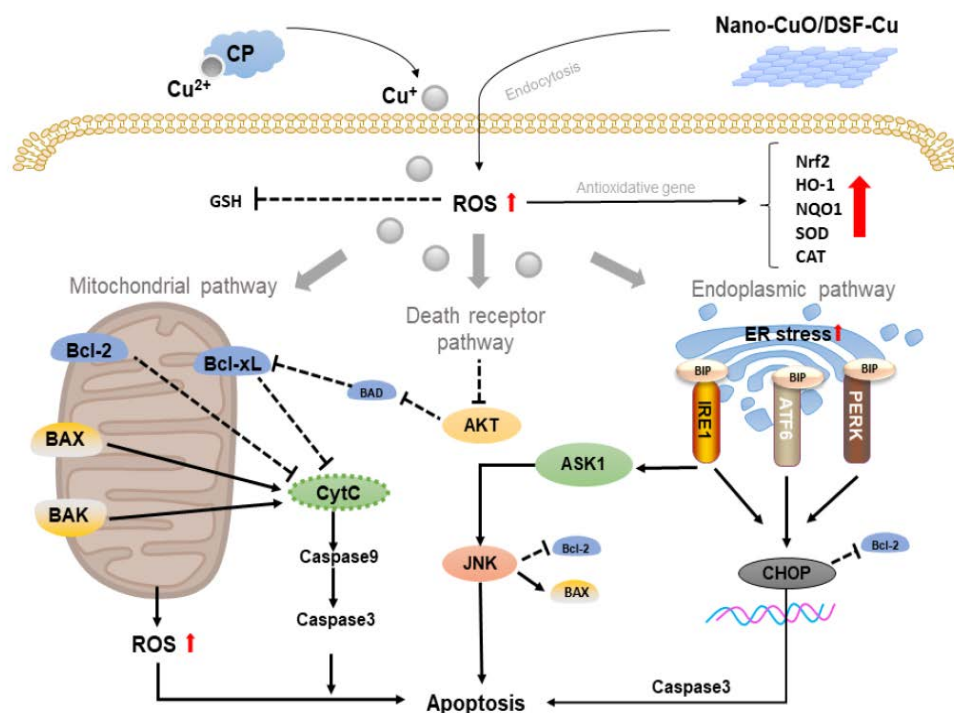


Figura 2. Mecanismul declanșării apoptozei de către ionii de cupru conform Aishajiang R. și coaut. [127]

Notă: **CP** – ceruloplasmina, **Nano-CuO/DSF-Cu** – nanoparticule de oxid de cupru/complex de disulfură de cupru, **GSH** – glutationul redus, **ROS** – specii reactive de oxigen, **Nrf2** – factorul 2 nuclear eritroid, **HO-1** – hemoxigenaza 1, **MQO1** – chinona 1 dehidrogenaza, **SOD** – superoxid dismutaza, **CAT** – catalaza, **ER** – reticulul endoplasmatic, **PERK**, **ATF6**, **IRE1** – proteine transmembranare, **CHOP** – reglator al proteinelor, **Bcl-2** – proteină anti-apoptotică, **Bax** – proteină pro-apoptotică, **AKT** – cale de semnalizare celulară, **ASK1** – kinaza 1 de reglare a semnalului de apoptoză, **JNK** – kinaza c-Jun N-terminală, **CytC** – citocrom C oxidaza.

Autofagia este un proces adaptativ care precede apoptoza. Deoarece autofagia și apoptoza reprezintă mecanisme de menținere a activității vitale a macroorganismului sau a organismului multicelular, multe căi de stres celular activează autofagia precoce și ulterior când stresul este exagerat induc apoptoza celulară [128].

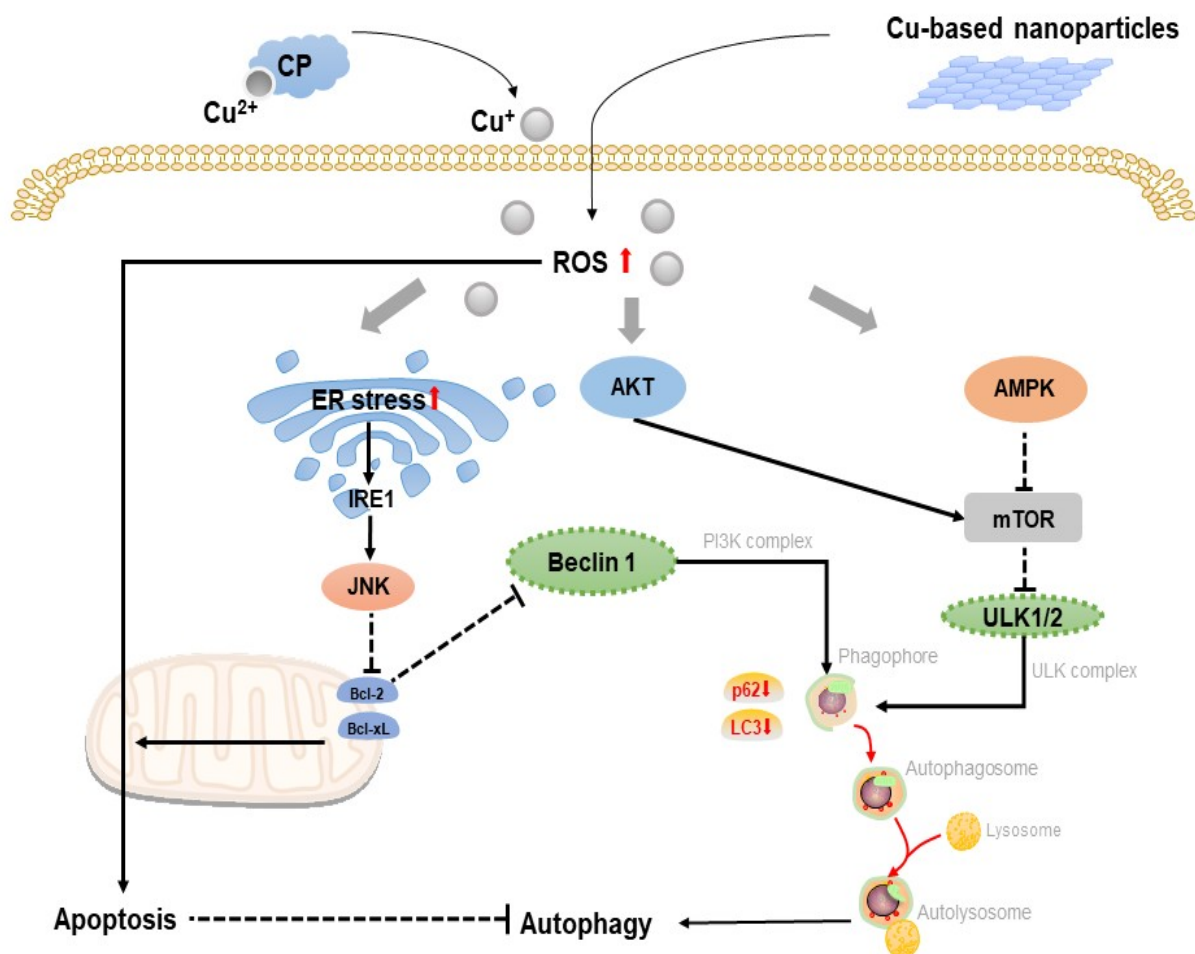


Figura 3. Mecanismul de inducere a autofagiei de către ionii de cupru

conform Aishajiang R. și coaut. [127]

Notă: **AMPK** – kinaza proteică, senzor de energie în reglarea metabolismului celular, **mTOR** – regulator central al creșterii celulare, **ULK1/2** – kinaza 1 și 2 de activare a autofagiei, **Beclin 1** – o proteină a sistemului de autofagie celulară.

Cuproptoza este o formă de moarte celulară dependentă de cupru. Tsvetkov și coautorii, în anul 2022, au constatat că cuprul intracelular a indus o nouă formă de moarte celulară prin țintirea enzimelor mitocondriale lipolitice și însoțite de pierderea proteinelor Fe-S. Acest proces nu a putut fi inhibat de alte căi cunoscute de moarte celulară (necroptoza, ferroptoza și apoptoza). Pe baza acestui studiu, unii cercetători au sugerat că nanomaterialele pe bază de cupru contribuie la terapia anticancer prin mecanismul de cuproptoza [129].

Cu^{2+} intracelular acumulat este combinat cu dihidrolipoamida S-acetiltransferaza lipolilată (DLAT), ceea ce induce oligomerizarea acesteia, provocând moartea celulară prin cuproptoza.

Ferredoxina 1 (FDX1) reduce Cu^{2+} la Cu^+ , ceea ce de fapt inhibă biosinteza proteinelor Fe-S și induce moartea celulară [127].

Complexele de cupru cu liganzi, inclusiv 8-hidroxichinolina, un chelator de cupru care inhibă activitatea proteazomului, au cauzat supresia proliferării și apoptoza în celulele canceroase de glandă mamară și prostată [130, 131]. Ditiocarbamatul (DTC) este un alt ligand cu activitate de inhibare a proteazomului. Dietilditiocarbamatul (L14a) este principalul produs al Cu și disulfuramului (DSF) și manifestă, de asemenea, efecte anticanceroase. Două și colab. au demonstrat că $[\text{Cu}(\text{L14b})_2]\text{14b}$ ar putea induce apoptoza în celulele cancerului de prostată și de glandă mamară prin activarea calpainei și a căii dependente de caspaza 3 [132].

Compușii menționați constituie o alternativă mai puțin costisitoare și mai sigură pentru chimioterapia clasică bazată pe preparatele pe bază de platină (cum ar fi carboplatină, oxaliplatină și picoplatină). Utilizarea clinică a preparatelor pe bază de platină implică multiple reacții adverse severe [133].

Compușii noi ai metalelor *3d* cu liganzi chelanți și macrociclici, asamblați în urma condensării tiosemicarbazonei cu aldehide și cetone, merită o atenție deosebită datorită activității redox și biogenicității ionilor de cupru, oferind căi multiple de activitate biologică.

Mai mult decât atât, compușii coordinativi cu liganzi chelanți și macrociclici, asamblați în urma condensării tiosemicarbazidei cu aldehide și cetone, marcați cu ^{64}Cu , datorită stabilității lor în circuitul sangvin și capacității lor de a pătrunde ușor prin bariera hemato-encefalică, pot fi folosiți în calitate de agenți de imagistică PET (tomografie cu emisie de pozitroni) prețioși pentru diagnosticarea patologieilor maligne (identificarea stadiului în care se află tumora și evaluarea eficienței tratamentului antineoplazic aplicat), precum și depistarea amiloidului- β ($\text{A}\beta$) care este semnul distinctiv al bolii Alzheimer [134].

Se consideră că preparatele antitumorale pe bază de metale endogene (Cu, Co, Fe, Zn) sunt mai puțin toxice în comparație cu analogii de platină [135]. Eficiența înaltă și perspectivele de aplicare în practică a compușilor menționați poate fi explicată prin faptul că aceștia acționează prin multiple mecanisme, cum ar fi inhibarea activității proteazomului și a telomerazei [136, 137], formarea speciilor reactive ale oxigenului [138], degradarea și intercalarea ADN-lui [139], paraptota [140] și altele.

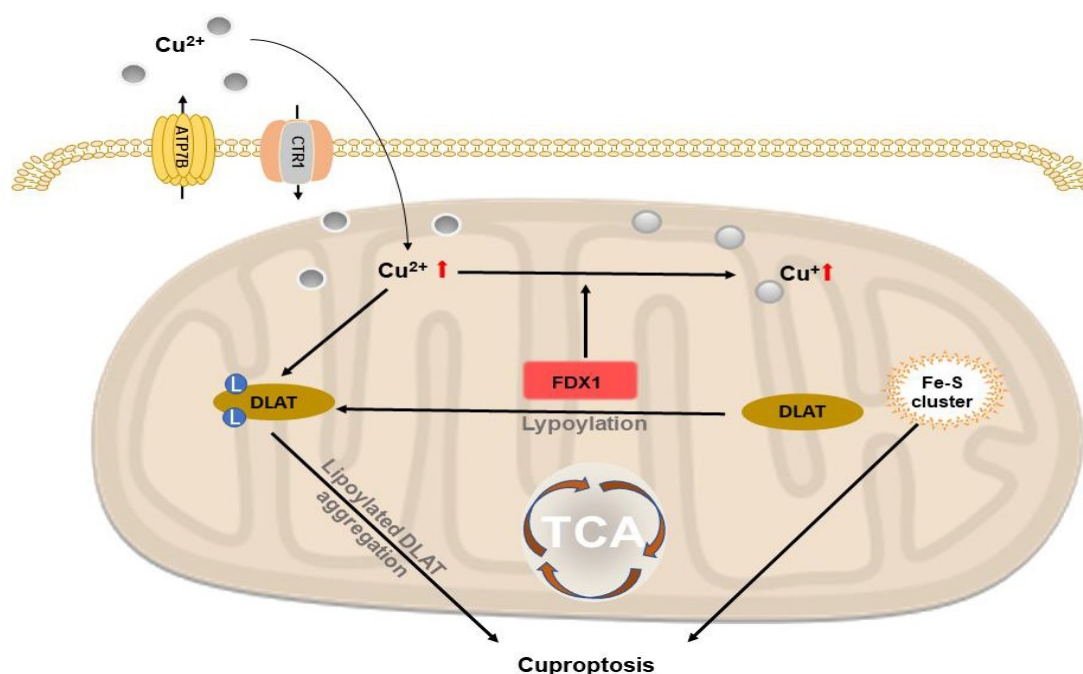


Figura 4. **Mecanismul cuproptozei** conform Aishajiang R. și coaut. [127]

Notă: **ATP7B** – polipeptidă transportatoare de cupru ATPază, **Ctr1** – genă umană ce transportă cuprul, **DLAT** – gena dihidrolipoamidă S-acetiltransferaza lipolilată, **FDX1** – Ferredoxina 1, **Fe-S** – proteina fier-sulf, **TCA** – ciclul acizilor tricarboxilici (ciclul Krebs).

Cuprul este un element de importanță fundamentală pentru formarea și funcționarea mai multor enzime și proteine, precum citocrom C oxidaza și Cu/Zn superoxid dismutaza, care sunt implicate în procesele de respirație, în metabolismul energetic și în sinteza ADN [141]. Majoritatea compușilor coordinativi ai Cu(II) formează rapid legături cu glutathionul – un tripeptid tiolic important, ceea ce duce la formarea unui compus coordinativ de Cu(I) monovalent capabil să genereze un anion superoxid, care poate induce formarea SRO similar reacției Fenton [142]. Datorită activității redox ridicate, eficacitatea terapeutică a compușilor coordinativi ai cuprului, după cum s-a menționat mai sus, nu se limitează doar la acțiunea antiproliferativă.

2. MATERIALE ȘI METODE DE CERCETARE A MARKERILOR BIOCHIMICI ÎN STUDIUL PRECLINIC EXPERIMENTAL AL COMPUȘILOR COORDINATIVI AUTOHTONI AI CUPRULUI CU TIOSEMICARBAZONE

2.1. Finanțarea studiului și considerații etice

Prezenta cercetare științifică a fost realizată în perioada 2017-2022 în cadrul Laboratorului de biochimie și al Catedrei de biochimie și biochimie clinică a Universității de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”.

Studiul dat a fost realizat în cadrul proiectului doctoral cu tema „Efectele metabolice ale compușilor biologic activi autohtoni cu acțiune antitumorală” finanțat de Ministerul Educației și Cercetării al R. Moldova (HG nr.1071 din 22.09.2016 și ordinul MEC nr. 842 din 26.09.2016), a proiectului instituțional de cercetări fundamentale „Identificarea mecanismelor biochimice celulare și moleculare ale acțiunii compușilor bioactivi autohtoni noi și argumentarea folosirii lor în chimioprevenția și tratamentul unor procese tumorale” (cifrul 15.817.04.05F 2015-2019) și a proiectului din Programul de Stat „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, 2020-2023).

A fost realizată o cercetare de tip preclinic experimentală. Studiile fundamentale ale compușilor biologic activi autohtoni s-au efectuat *in vivo* pe animale de laborator și *in vitro* conform principiilor contemporane în standardizarea biologică a experiențelor. Cercetările au fost aprobate de Comitetul de Etică a Cercetării al USMF „Nicolae Testemițanu” cu emiterea avizului favorabil sub nr. 73 din 26 aprilie 2017.

La efectuarea cercetărilor experimentale *in vivo* s-a ținut cont de cele 3 principii fundamentale cunoscute drept „conceptul celor trei R”, adoptat de Congresul Internațional de Standardizare Biologică de la San Antonio (Texas, SUA) în anul 1979 [143]. Acest concept exprimă preocupările pe plan internațional referitor la standardizarea experiențelor pe animale care contribuie la:

- reducerea (reduction) numărului de animale utilizate în experiență, dar care să atingă limita minimă pentru prelucrarea statistică a rezultatelor studiului;
- înlocuirea (replacement) metodelor de experimentare pe animale vertebrate prin teste biologice, atunci când acestea permit extrapolarea rezultatelor obținute pe animale vii;

- cizelarea (refinement) procedurilor și tehnicilor experimentale pentru diminuarea suferințelor animalelor utilizate în experiențe (utilizarea substanțelor anestezice fără a influența rezultatul experienței), cât și „umanizarea” actului experimental.

Reieșind din principiile date, la efectuarea experiențelor pe animale s-a recurs în mod obligatoriu la un număr minim posibil de animale, dar totodată suficient pentru obținerea rezultatelor veridice. Toate intervențiile pe animalele de laborator, în special, recoltările de probe și sacrificarea s-au efectuat în mod obligatoriu sub anestezie prin inhalatie cu eter sulfuric.

2.2. Caracteristica generală a cercetării

2.2.1. Compușii biologic activi autohtoni noi studiați

Compușii biologic activi autohtoni - bazele Schiff noi cu liganzi chelanți și macrociclici, combinația lor cu metale 3d, au fost sintetizați la Catedra de Chimie Anorganică și Fizică de la Universitatea de Stat din Moldova sub conducerea prof. universitar, acad. Aurelian Gulea [144]. Pentru sinteza compușilor chimici testați au fost utilizați reagenți de puritate înaltă de la compania „Sigma - Aldrich”.

În studiu au fost utilizați compușii coordinativi ai cuprului autohtoni noi (tabelul 1):

1. cu tiosemicarbazone-benzotiazolice – CMA-18, CMD-8, MG-22;
2. cu fenil-tiosemicarbazone – CMC-34, CMJ-33, CMT-67;
3. cu alitiosemicarbazone – CMG-41, TIA-123, TIA-160.

Tabelul 1. **Compușii coordinativi ai cuprului cu tiosemicarbazone autohtoni noi studiați**

CMA-18	Cloro-{1-(1,2-benzotiazol-3-il)-2-[1-(piridin-2-il)etiliden]diazanido}cupru
CMD-8	Cloro-{4-etil-2-[fenil (piridin-2-il)metilidenă] hidrazin-1-carbotioamido} cupru
MG-22	Cloro-{N'-(4-metoxifenil)-N,N-dimetilcarbamimidotioato}cupru
CMC-34	Cloro-{N'-[fenil(piridin-2-il)metiliden]-N-piridin-2-ilcarbamohidrazonotioato}cupru
CMJ-33	Cloro-{4- (3-metoxifenil)-2-[1-(piridin-2-il)etiliden] hidrazin-1-carbotioamido} cupru
CMT-67	Nitrato-{N-fenil-N'-(piridin-2-ilmetiliden)carbamohidrazonotioato}cupru
CMG-41	Nitrato-{N'-[fenil(piridin-2-il)metiliden]-N-prop-2-en-1-ilcarbamohidrazonotioato} cupru
TIA-123	Cloro-{N'-[fenil(piridin-2-il)metiliden]-N-prop-2-en-1-ilcarbamohidrazonotioato} cupru
TIA-160	Acetato-{ 2-({[(metilsulfanil)(prop-2-en-1-ilamino) metiliden]hidraziniliden} metil) enolato} cupru

2.2.2. Design-ul general al cercetării

Rezumatul design-ului studiului este reflectat în figurile 5 și 6.

Studiul efectelor biologice ale CCT s-a efectuat în 2 modele experimentale:

a) *in vitro*:

- pe culturi celulare de gliom standardizate C6 de șobolan (ref-CCL-107);
- pe materialul biologic colectat de la animale sănătoase.

b) *in vivo* pe animale de laborator

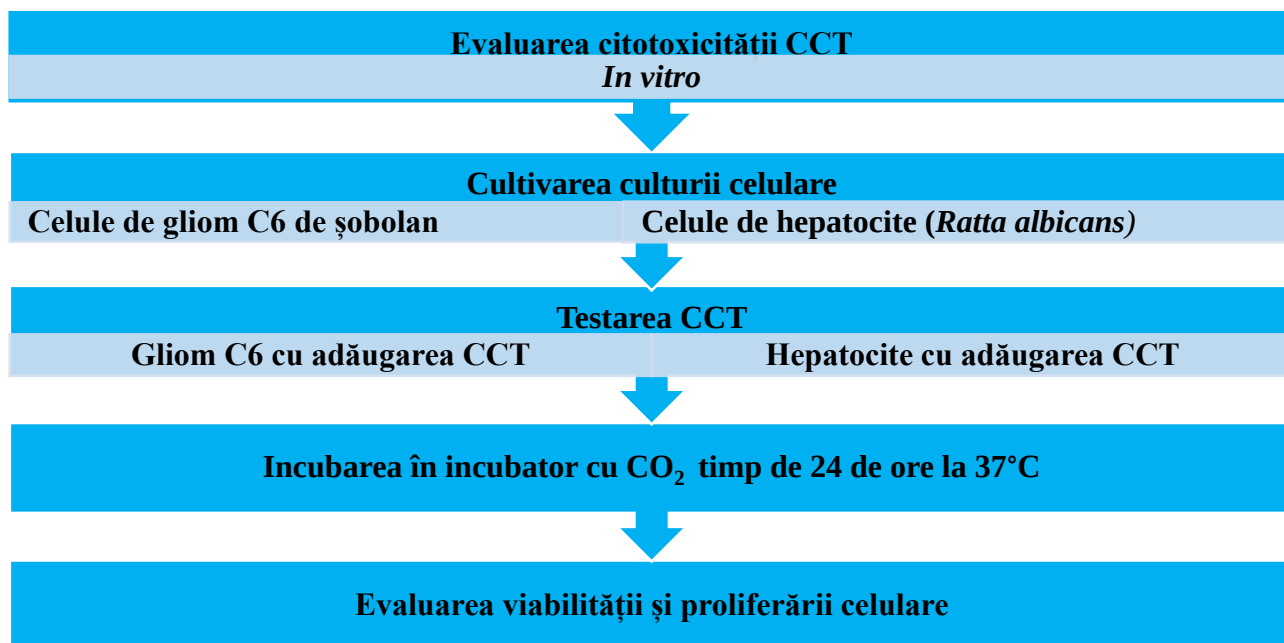


Figura 5. Design-ul evaluării citotoxicității CCT *in vitro*

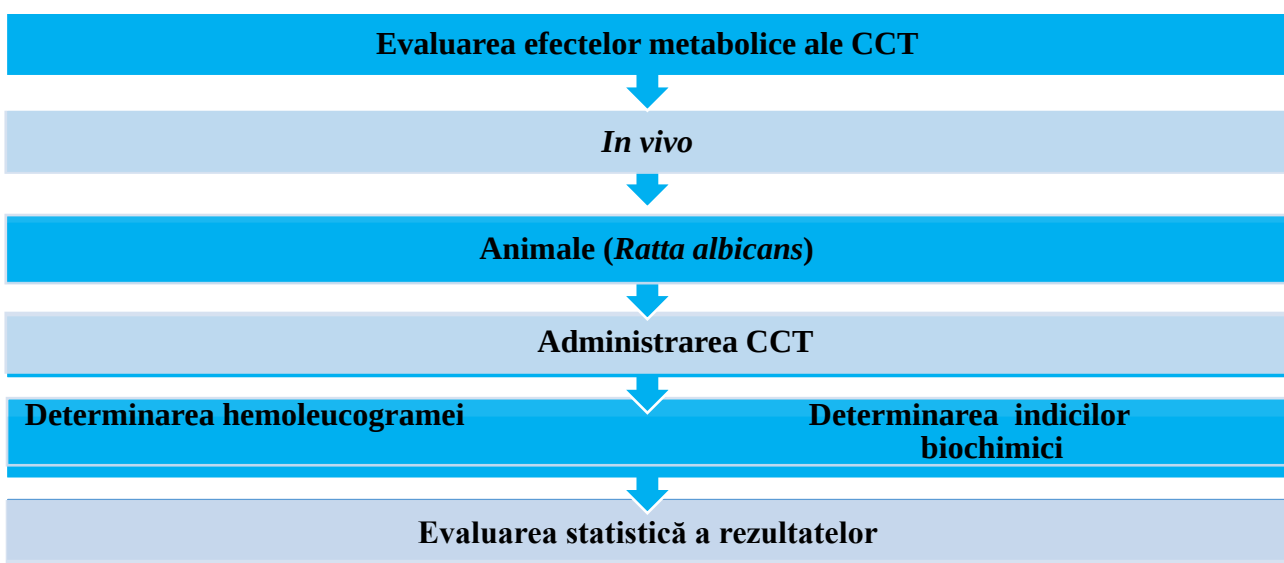
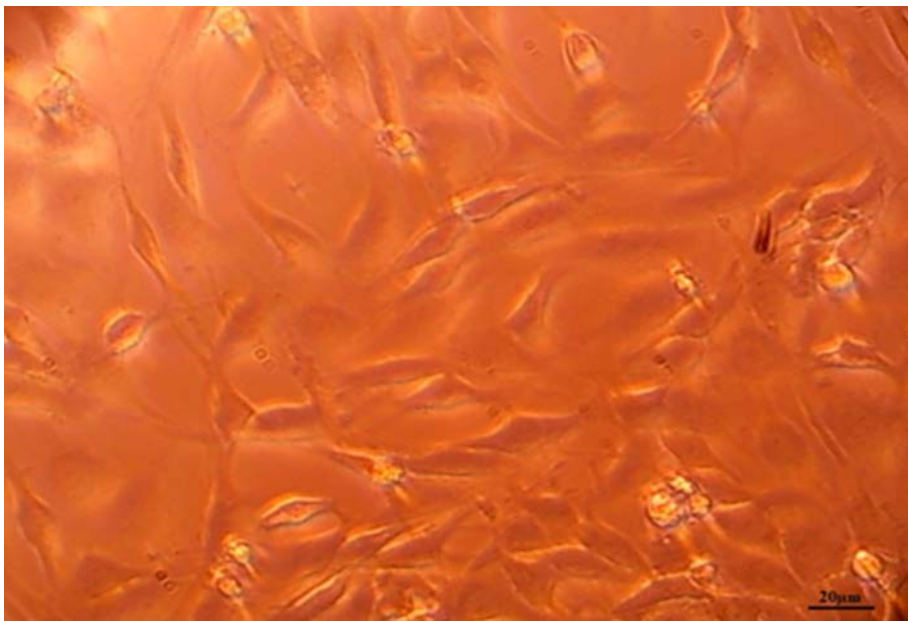


Figura 6. Design-ul evaluării efectelor metabolice ale CCT *in vivo*

2.3. Metodologia studiului citotoxicității compușilor coordinativi *in vitro* pe culturi celulare

2.3.1. Evaluarea potențialului citotoxic al compușilor coordinativi *in vitro* în cultura de gliom C6 de șobolan

Pentru aprecierea potențialului citotoxic al compușilor coordinativi ai cuprului cu tiosemicarbazone *in vitro* a fost utilizată linia de celule de gliom C6 de șobolan, care a fost obținută din American Type Culture Collection (ref-CCL-107). Linia celulară de gliom C6 de șobolan este asemănătoare morfologic cu glioblastomul multiform (GBM). Tumorile derivate din implanturi de celule C6 de șobolan în creierul de șobolan prezintă caracteristici morfologice și grad de vascularizare similare cu glioblastoamele umane. Glioblastomul multiform este unul dintre cele mai maligne tipuri de tumori ale sistemului nervos central. În ciuda progreselor în modalitățile de tratament, acesta rămâne în mare parte incurabil. Deși sunt disponibile mai multe opțiuni de tratament, inclusiv intervenția chirurgicală, împreună cu chimio- și radioterapia adjuvantă, boala are un prognostic nefavorabil și pacienții, în general, cedează în decurs de 18 luni de la stabilirea diagnosticului.



**Figura 7. Celule de gliom C6 de șobolan vizualizate la microscopul inversat cu contrast de fază:
– (x100) în mediu Egale modificat de Dulbecco (DMEM)**

Cultura de celule și evaluarea viabilității celulare prin testul MTT

Celulele de glioblastom C6 de șobolan (CCL-107) au fost crescute în DMEM suplimentat cu 10% ser fetal bovin, L-glutamină 2mM, 1% aminoacizi neesențiali, gentamicină și fluconazol (100 μg/l) și plasate într-un incubator la 37°C cu 3,5% CO₂, mediul fiind schimbat la fiecare 2 zile. Celulele

au fost crescute în sticle de culturi celulare de 200 ml. După atingerea confluentei, celulele au fost spălate cu tampon fosfat salin (PBS) și disociate cu 0,05% tripsină-EDTA, urmată de centrifugare (1500 rpm timp de 3 min). După numărare, celulele au fost resuspendate în mediul de cultură și utilizate pentru a efectua testele propuse. Într-o microplacă cu fund plat cu 96 de godeuri s-au turnat câte 100 μ l de suspensie de celule la o densitate de 1×10^4 celule/godeu și lăsate să adere timp de 24 de ore la 37°C într-un incubator cu 3,5% CO₂. După 24 de ore de incubare, mediul de cultură s-a înlocuit cu un mediu proaspăt (90 μ l). Apoi celulele s-au tratat cu 10 μ l de compuși de cercetat în diluțiile de 1,0 μ M/L și 10,0 μ M/L într-un incubator cu CO₂ timp de 24 de ore la 37°C. În calitate de control pentru stabilirea viabilității celulelor de gliom C6 de șobolan s-au folosit celule de gliom neexpuse la acțiunea compușilor coordinativi ai cuprului cu tiosemicarbazone. Ulterior, după incubare s-au adăugat câte 10 μ l de soluție de lucru de MTT (5 mg/ml în soluție tampon fosfat salin) în fiecare godeu al plăcii și s-a incubat timp de 4 ore la 37°C, până când cristalele de formazan violet intracelular sunt vizibile sub microscop. Apoi mediul s-a înlăturat și cristalele de formazan formate s-au dizolvat prin adăugarea a câte 100 μ l de izopropanol per godeu timp de 30 de minute la 37°C. Rezultatele au fost citite la spectrofotometru utilizând metodologii adaptate microplăcilor multimodale Synergy H1 Hybrid Reader (BioTek Instruments, SUA).

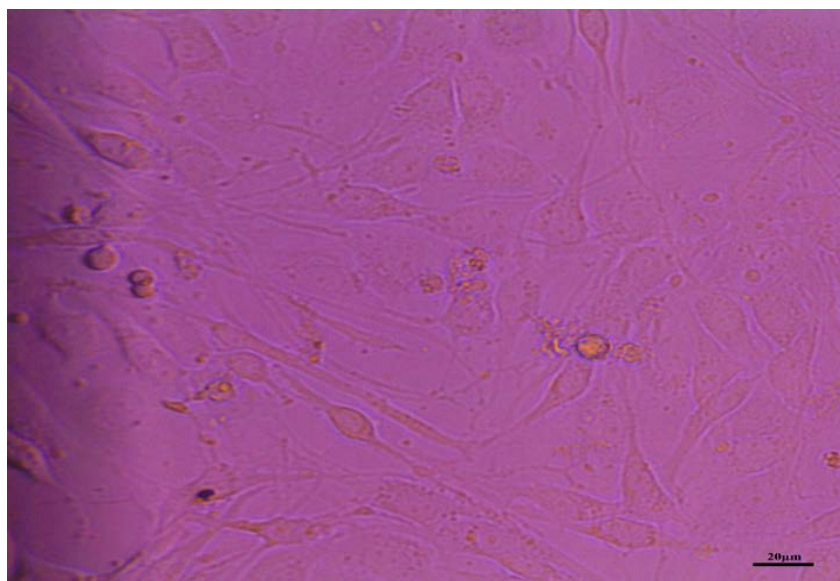


Figura 8. Celule control de gliom C6 vizualizate în timpul efectuării testului MTT

Viabilitatea liniei celulare de gliom C6 de șobolan a fost evaluată prin testul colorimetric MTT (bromură de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium). Testul MTT a fost realizat conform metodei propuse de Mosmann's [145], cu unele modificări Pantea V. și coautorii [146], care se

bazează pe activitatea enzimei succinat dehidrogenaza a ciclului Krebs metabolic activă, strâns atașată de membrana mitocondriilor. Testul MTT implică determinarea colorimetrică a activității metabolice a celulelor, bazată pe reducerea sării de MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolium bromură] cu formarea cristalelor de formazan insolubil (E,Z)-5-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-1,3-difenilformazan) în prezența dehidrogenazelor active NADP(P)H în celulele vii. Formazanul format a fost dizolvat cu izopropanol, obținându-se o soluție de culoare violetă cu un maximum de absorbție de 570 nm. Intensitatea culorii violete este direct proporțională cu numărul de celule vii și, astfel, relevă viabilitatea celulară.

Pentru efectuarea testului MTT într-o microplacă cu fundul plat cu 96 de godeuri s-au turnat câte 100 μ l de suspensie de celule de gliom C6 (densitatea de 1×10^4 celule/godeu). Celulele au fost lăsate să adere timp de 24 de ore la 37°C într-un incubator cu 3,5% CO₂. După 24 de ore de incubare, mediul de cultură a fost înlocuit cu mediu proaspăt (90 μ l). Ulterior celulele au fost tratate cu CCT cercetați (10 μ l) în diluțiile de 1,0 μ M/L și 10,0 μ M/L și incubate timp de 24 de ore la 37°C în incubator cu CO₂. În calitate de control pentru stabilirea viabilității celulelor de gliom C6 s-au folosit celule de gliom C6 intacte, ce nu au fost expuse la acțiunea CCT.

După incubare, în fiecare godeu al plăcii s-au suplimentat câte 10 μ l de soluție de lucru de MTT (5 mg/ml în soluție tampon fosfat salin) și s-au incubat timp de 4 ore la 37°C, până la formarea în celule a cristalelor de formazan vizibile la microscop. Mediul a fost înlăturat, iar cristalele de formazan au fost dizolvate la incubare timp de 30 de minute la 37°C, ca urmare a adăugării a câte 100 μ l de izopropanol per godeu. Rezultatele au fost citite la spectrofotometru la lungimea de undă 570 nm (Power Wave HT, BioTek Instruments, SUA).

Pentru aprecierea viabilității celulare s-a calculat diferența procentuală de reducere între celulele tratate cu compușii de testare și cele de control neexpuse, folosind formula:

$$\% \text{ viabilitatea celulară} = ((\text{Abs}_{pr} - \text{Abs}_{bl}) / (\text{Abs}_{control} - \text{Abs}_{bl})) * 100 \quad (\text{formula1})$$

Valorile de absorbție mai mari decât cele de control indică proliferarea celulelor, în timp ce valorile mai mici sugerează moartea celulelor sau inhibarea proliferării.

|Testul de citotoxicitate cu resazurină s-a efectuat în corespundere cu metoda descrisă de Riss T. L. și coaut. [147-148], cu unele modificări Andronache L. și coautorii [149]. Principiul metodei are la bază capacitatea resazurinei (10-oxid 7-hidroxi-3H-fenoxazin-3-onă) – oxidant de culoare albastră, de a trece liber prin membrana celulară și membranele organelor (inclusiv a mitocondriilor). În interiorul celulei compusul este redus de dehidrogenaze la resorufină – un compus roz fluorescent.

Intensitatea fluorescenței este direct proporțională cu numărul celulelor vii și se apreciază fluorometric.

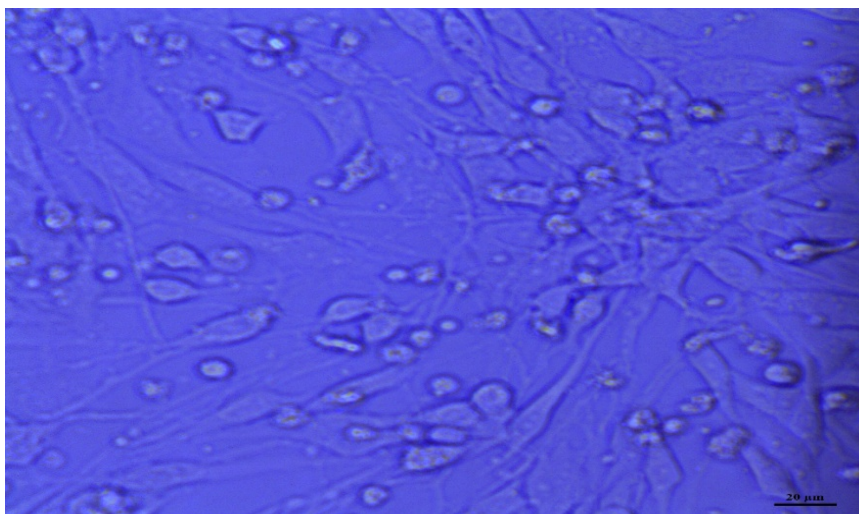


Figura 9. **Celule control de gliom C6 vizualizate în timpul efectuării testului cu resazurină**

Pentru efectuarea testului cu resazurină într-o microplacă cu fund plat cu 96 de godeuri s-au turnat câte 100 μL suspensie de celule de gliom C6 la o densitate de 1×10^4 celule/godeu. Celulele au fost lăsate să adere timp de 24 de ore la 37°C în incubatorul cu 3,5% CO_2 . După 24 de ore de incubare, mediul de cultură a fost înlocuit cu 90 μL de mediu proaspăt. Ulterior, în godeurile microplăcii s-au adăugat câte 10 μL de CCT în diluții de 1,0 $\mu\text{M/L}$ și 10,0 $\mu\text{M/L}$ și incubate timp de 24 de ore la 37°C în incubatorul cu CO_2 . Probele de control ce au conținut celule de gliom C6 nu au fost expuse acțiunii CCT. Câte 20 μL de soluție de 0,15 g/l de resazurină s-au adăugat în fiecare godeu al microplăcii și microplaca a fost incubată timp de 4 ore la 37°C în incubatorul cu 3,5% CO_2 . Absorbția s-a măsurat la lungimea de undă de 570 nm și 600 nm la spectrofotometru cu microplăci Power Wave HT (BioTek Instruments, SUA).

Pentru aprecierea citotoxicității s-a calculat diferența procentuală de reducere între celulele tratate cu compușii de testare și cele de control neexpuse, folosind formula:

$$((O2 \times \text{Abs1}) - (O1 \times \text{Abs2}) / (O2 \times C1) - (O1 \times C2)) \times 100, \quad (\text{formula 2})$$

unde: O1 – coeficientul molar de absorbție (ϵ) al resazurinei oxidate la 570 nm;

O2 – coeficientul molar de absorbție (ϵ) al resazurinei oxidate la 600 nm;

Abs1 – absorbția probelor de cercetat la 570 nm;

Abs2 – absorbția probelor de cercetat la 600 nm;

C1 – absorbția controlului pozitiv la 570 nm;

C2 – absorbția controlului pozitiv la 600 nm.

2.3.2. Evaluarea potențialului citotoxic al compușilor coordinativi ai cuprului cu tiosemicarbazone *in vitro* în cultura de hepatocite

Pentru aprecierea potențialului citotoxic al compușilor coordinativi ai cuprului *in vitro* în cultura de hepatocite, acestea au fost izolate din ficatul unui lot de 3 șobolani albi masculi (*ratta albicans*) cu masa de 220–250 g. Înainte de a fi sacrificate, animalelor intraperitoneal li s-au administrat 5000 UI de heparină. S-a efectuat anestezia generală cu ketamină (60 mg/kg) și xilazină (5 mg/kg), apoi a fost îndepărtată blana cu un trimmer și câmpul intervenției a fost prelucrat cu alcool de 70%. Peretele toracoabdominal a fost îndepărtat și o porțiune suprahepatică a venei cava inferioare a fost canalizată cu un cateter de plastic de (18 G) în timpul contracțiilor cardiace persistente, pentru menținerea hepatocitelor în viață.

Hepatocitele au fost izolate în două etape. Inițial a fost realizată perfuzia în vena cavă superioară cu soluție de 0,05% collagenază de tip II (HiMedia, India), 0,01% dispază de tip I, HBSS fără Ca^{2+} și Mg^{2+} (HiMedia, India) cu 0,9 mM MgCl_2 , 0,5 mM EDTA (acid etilendiaminotetra-acetic) și 25 mM HEPES (acid 4-(2-hidroxiethyl)-1-piperazinetan sulfonic) (HiMedia, India) [150].

Ficatul a fost transferat în mediul de cultură și capsula Glisson a fost înlăturată pentru a obține o suspensie de celule brute care este apoi filtrată, spălată, suspendată și diluată până la concentrația celulară necesară pentru cultură și testare. Mediul de cultură utilizat a fost mediul William's E (HiMedia, India) cu L-glutamină 2 mM, ser fetal bovin 5% (Lonza, Belgia), soluție antimicotică cu antibiotice (HiMedia, India), dexametazonă 100 nM și insulină 100 nM (figurile 11-12).

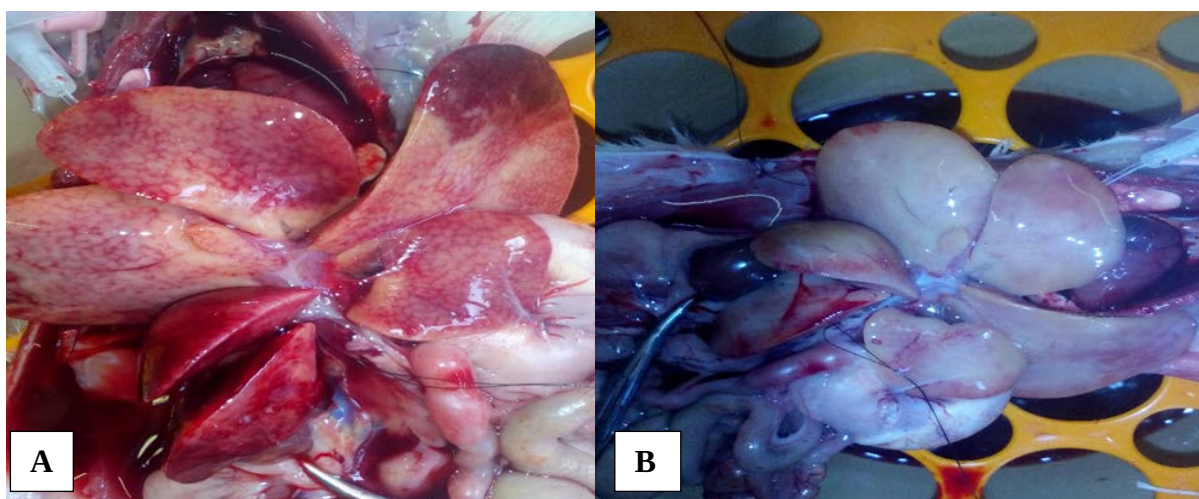


Figura 10. Perfuzia ficatului prin vena cavă superioară

A – cu soluție Hank cu 0,9 mM MgCl_2 , 0,5 mM EDTA și 25 mM HEPES la o viteză de 15-20 ml/min,
B – cu soluție Hank și collagenază de tip II / deplasare de tip I cu viteza de 25 ml/min.

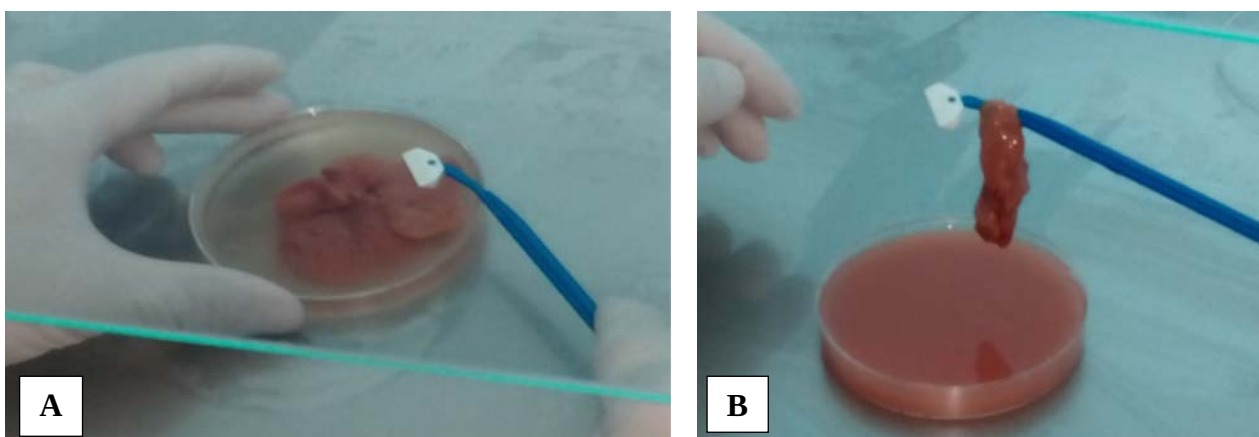


Figura 11. **Dezintegrarea mecanică a ficatului (A),
carcasă hepatică după izolarea hepatocitelor (B)**

Cultivarea hepatocitelor și cuantificarea celulelor vii prin testul cu albastru de tripan.

Testul de evaluare cu albastru de tripan este o metodă de colorare versatilă utilizată în mod obișnuit pentru a cuantifica moartea celulelor, precum și pentru a număra celulele înainte de însămânțarea celulelor *in vitro* [151]. Acest test se bazează pe capacitatea moleculei de albastru de tripan, un colorant tetrasulfonat anionic cu masa moleculară mare, de a pătrunde prin membranele plasmatice celulare moarte, distruse și care colorează proteinele intracelulare în albastru închis, în timp ce celulele viabile vor rămâne necolorate și mici [152]. Numărul de celule moarte poate fi monitorizat la inspecția cu microscopie luminoasă folosind un hemocitometru automat sau un contor de celule. După prelucrarea cu soluție de 0,25% de albastru de tripan, celulele au fost numărate într-un hemocitometru automat și a fost apreciată viabilitatea celulară.

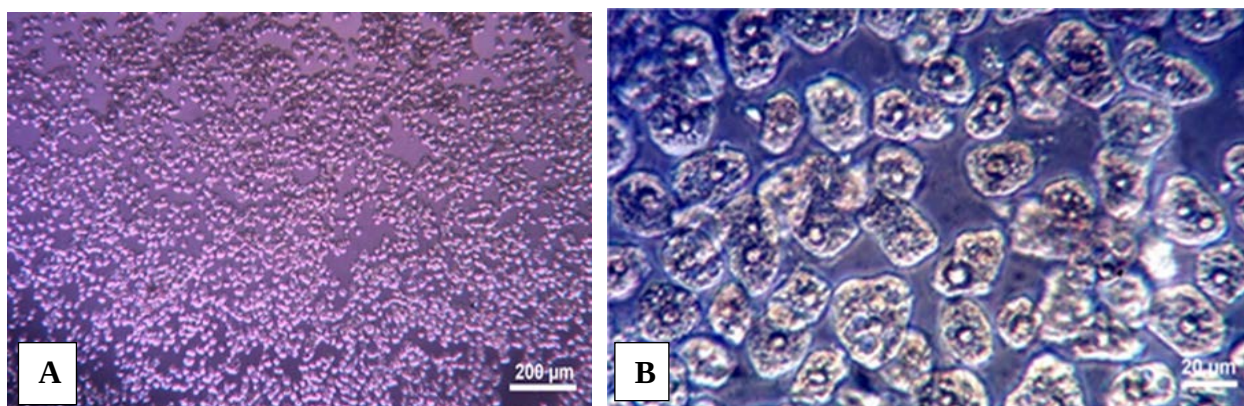


Figura 12. **Celule hepatice vizualizate cu microscopul inversat cu contrast de fază KZD: A –
x10, B – x40 [153]**

Testul colorimetric MTT (bromură de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium). Testul MTT a fost realizat conform metodei propuse de Mosmann's [145], cu unele modificări Pantea V. și coaut. [146].

Pentru aprecierea *in vitro* a citotoxicității CCT în cultura de hepatocite de șobolan s-au aplicat testele MTT și cu resazurină, care au fost efectuate conform aceluiași protocol ca și în cazul studiului culturii de gliom C6 de șobolan (pct. 2.3.1. pp. 30-33).

2.4. Metodologia studiului efectelor metabolice ale CCT

2.4.1. Cercetarea *in vivo* pe animale de laborator

Experiențele s-au montat pe 120 de animale de laborator – șobolani albi de laborator (*rattus albicans*) adulți, de vârstă reproductivă (6 – 12 luni). În studiu a fost utilizat un număr egal de masculi și femele: 60 de masculi cu o greutate de 180 – 230 grame și 60 de femele cu masa de 210 – 228 grame.

Toate animalele, atât cele din loturile experimentale, cât și din cel de referință au fost întreținute în condiții similare și la rații standarde de vivarium. Considerând mecanismele de reglare circadiană a ritmurilor biologice (diurne și sezoniere) și influența acestora asupra concentrației, structurii și distribuției componentelor intracelulare, experiențele au fost efectuate în cursul aceluiași perioade sezoniere, iar materialul de investigare se preleva la aceeași oră a zilei.

Animalele au fost împărțite în următoarele 10 loturi: lotul-martor și 9 loturi experimentale. Fiecare lot a inclus 2 subloturi – masculi (a) și femele (b), egale ca număr de animale (nr. 6) (tabelul 2).

Tabelul 2. Divizarea animalelor experimentale în loturile de studiu cu CCT autohtoni

Lot	Descriere
Nr. 1	Martor – constituit din animale sănătoase, intacte, întreținute într-un regim obișnuit de vivariu (condiții de viață și alimentație)
Nr. 2	animale cărora le-a fost administrat intramuscular compusul coordinativ CMA-18
Nr. 3	animale cărora le-a fost administrat intramuscular compusul coordinativ CMD-8
Nr. 4	animale cărora le-a fost administrat intramuscular compusul coordinativ MG-22
Nr. 5	animale cărora le-a fost administrat intramuscular compusul coordinativ CMC-34
Nr. 6	animale cărora le-a fost administrat intramuscular compusul coordinativ CMJ-33
Nr. 7	animale cărora le-a fost administrat intramuscular compusul coordinativ CMT-67
Nr. 8	animale cărora le-a fost administrat intramuscular compusul coordinativ CMG-41
Nr. 9	animale cărora le-a fost administrat intramuscular compusul coordinativ TIA-123
Nr. 10	animale cărora le-a fost administrat intramuscular compusul coordinativ TIA-160

Substanțele de testat au fost dizolvate în ser fiziologic pentru obținerea concentrației de 10 mg/L și administrate la animale zilnic intramuscular timp de 30 de zile. Doza preparatelor a fost de 0,01 mg de substanță la 1 kg de greutate corporală a animalului. După 24 de ore de la ultima administrare, animalele au fost sacrificate sub anestezie ușoară cu eter sulfuric, materialul de studiu fiind recoltat la una și același oră a zilei.

Sângele periferic pentru studiul indicilor hematologici a fost prelevat și colectat în eprubete ce conțineau în calitate de anticoagulant soluție de 6% de K4-EDTA cu pH-ul 7,4. Indicii hemoleucogramei au fost apreciați în sângele periferic la analizorul hematologic PCE-210 (ERMA, Japonia).

Serul sangvin a fost obținut prin centrifugarea sângelui periferic prelevat fără anticoagulant la 3000 tur/min timp de 10 minute. După centrifugare serul sangvin a fost transferat în eprubete curate de unică folosință de tip Eppendorf și păstrat la frigider la - 40°C până la finalizarea explorărilor. Întreg procesul de preparare a sângelui s-a executat în condiții specifice pentru aprecierea activității enzimatice.

În ser au fost evaluați indicii biochimici conform protocoalelor descrise ale studiului *in vivo* (pct. 2.4.2. pp.38-43).

2.4.2. Metode de investigare ale indicilor biochimici

Toate procedeele de determinare a activității enzimelor și a conținutului de substanțe au fost executate după tehnici adaptate pentru aplicarea la spectrofotometrul cu microplăci Synergy H1 (Hydrid Reader) (BioTek Instruments, SUA) și la spectrofotometrul Power Wave HT (BioTek Instruments, SUA).

Pentru realizarea scopului și obiectivelor trasate au fost utilizate metode standardizate, ajustate studiului acțiunii compușilor biologic autohtoni noi asupra indicilor metabolici. Au fost evaluați indicii stresului oxidativ, ai sistemului antioxidant, ai metabolismului glutationic și tiol disulfidic.

Indicii stresului oxidativ: metaboliții reactivi ai oxigenului, balanța pro-oxidantă-antioxidantă, produșii proteici de oxidare avansată, dialdehida malonică, metaboliții oxidului nitric.

Determinarea *metaboliților reactivi ai oxigenului (MRO)* a fost efectuată prin metoda descrisă de Ito F. și coaut. [154], modificată de Andronache L. și coaut. [155]. Principiul metodei de determinare a metaboliților reactivi ai oxigenului constă în aceea că proba de cercetat se incubează într-o soluție tampon ce conține clorură de fier (II), apoi se adaugă o soluție ce conține N, N-dimethy-p-phenylene-diamine (DMPD). Radicalii liberi, peroxizii conținuți în proba de cercetat oxidează

moleculele de DMPD sau o-dianisidină în radicali DMPD* ori diansidil, cu formarea unui produs colorat într-un grad proporțional cu concentrațiile lor. S-a determinat 1m/ΔAbs/min ce corespunde la 23,7 μM tert-butyl hydroxide. Calculul s-a efectuat după următoarea formulă:

$$\text{MRO tert-butyl hydroxide} = (23,7 * \Delta\text{Abs})/0,001, \quad (\text{formula 3})$$

unde:

1m/ΔAbs/min – mili/absorbția probei/minut;

0,001 – calculul la 1ml material biologic.

Procedeul de determinare a *balanței pro-oxidante-antioxidante (BPA)* a fost efectuat prin metoda descrisă de Toloue Pouya V. și coaut. [156], modificată de Pantea V. și coaut. [157]. Esența procedurii constă în aceea că la determinarea balanței pro-oxidante-antioxidante (BPA), proba de cercetat se incubează într-un mediu de lucru ce conține o soluție de tetrametilbenzidină (TMB) și cation TMB, iar radicalii liberi, peroxizi și antioxidanții conținuți în proba de cercetat, influențează asupra colorării mediului de lucru într-un grad proporțional cu concentrațiile lor. Calculul concentrației BPA s-a efectuat cu ajutorul curbei de calibrare, construită în baza diluțiilor succesive ale soluției standard de acid uric și a fost exprimat în unități arbitrare.

Nivelul *produșilor proteici de oxidare avansată (PPOA)* a fost estimat cu ajutorul metodei propuse de către Capeillere-Blandin C. și coaut. [158], modificată de Gudumac V. și coaut. [159], aceștia fiind identificați spectrofotometric datorită absorbției specifice la 340 nm. Cantitatea de PPOA a fost evaluată cu ajutorul curbei de calibrare a sol. standard de cloramină-T (0-100 μmol/L), structurizată în baza diluțiilor succesive. Rezultatul a fost prezentat în μmol/L.

Determinarea *dialdehidei malonice* – produsul final al peroxidării lipidelor, s-a efectuat conform procedurii descris de Галактионова Л. П. și coaut. [160], modificată de Gudumac V. și coaut. [161]. Metoda se bazează pe identificarea spectrofotometrică a complexului trimetinic colorat, rezultat în urma interacțiunii acidului tiobarbituric cu DAM. Concentrația DAM în proba de cercetat este direct proporțională cu intensitatea colorației, iar rezultatul final a fost exprimat în μM/L în supernatantul biologic cercetat. Calculul s-a efectuat după următoarea formulă:

$$\text{DAM } \mu\text{M/L} = \frac{\text{Abs} * 10^6 * 1,55 \text{ ml}}{1,56 * 10^5 * 0,05 \text{ ml} * x} = \text{Abs} * 198,7, \quad (\text{formula 4})$$

unde: Abs – absorbția probei;

1,55 ml – volumul fazei organice;

$1,56 * 10^5 \text{ mol} * \text{cm}^{-1}$ – coeficientul molar de absorbție al DAM;

X – diluția probei.

Dozarea *metaboliților oxidului nitric* a fost realizată conform procedurii descrise de Метельская В. А. și Гуманова Н. Г. [162], în modificarea Gudumac V. și coaut. [163]. Principiul metodei constă în deproteinizarea materialului biologic, reducerea nitraților în nitriți, prelucrarea cu reactivul Griss a supernatantului și în măsurarea ulterioară a densității optice a produsului reacției. Calculul concentrației nitritului s-a efectuat cu ajutorul curbei de calibrare, construită în baza diluțiilor succesive ale soluției standard de nitrit de sodiu și exprimat în $\mu\text{mol/L}$.

Indicii sistemului antioxidant: activitatea antioxidantă totală, capacitatea antioxidantă totală, masa substanțelor antioxidante, activitatea medie a antioxidantilor, superoxidismutaza și catalaza.

Evaluarea *activității antioxidantilor totali* prin metoda cu ABTS (AAT-ABTS) s-a efectuat utilizându-se procedeul descris de Re R. [164], în modificarea Gudumac V. și coaut. [165]. Principiul metodei se bazează pe degradarea radicalului acidului 2,2-azinobis-3-etilbenzotiazolină-6-sulfonic (ABTS*) la interacțiunea cu compușii cu proprietăți antioxidante din proba biologică și măsurarea inhibiției/diminuării la 734 nm [165]. Nivelurile AAT-ABTS au fost exprimate în $\mu\text{M/L}$.

Determinarea *capacității antioxidante totale (TAC)*, *masei substanțelor antioxidante (MA)* și a *activității medii a antioxidantilor (AMA)* a fost efectuată prin procedeul descris de Zhang M. [166], modificată de Tagadiuc O. [167]. Procedeul permite aprecierea capacității antioxidante totale, a masei totale a substanțelor antioxidante și a capacității antioxidante per unitate de masă în probele biologice prin metoda redox cu permanganat de potasiu. Antioxidanții prezenți în proba de cercetat suprimă formarea colorației proporțional concentrației lor. Pentru evaluarea indicilor (TAC, MA, AMA) s-a măsurat absorbția inițială (A_0) și după 30 min de incubare (A_{30}) cu agitarea permanentă la 700 tur/min se măsoară absorbția la 570 nm a diluțiilor de lucru ale materialului biologic cu ser fiziologic de 0,9% (1: 10; 1: 20; 1: 40; 1: 80 și 1: 160), la care se adaugă o soluție de KMnO_4 .

Factorii de diluție serică (1: 10; 1: 20; 1: 40; 1: 80 și 1: 160) au fost transformați într-o scară logaritmică (1.0, 1.30, 1.6, 1.9, și 2.2). Aria de sub curbă a reprezentat inversul TAC. Luând în considerare cele menționate și ca urmare a raționamentelor matematice, calcularea TAC a probei de cercetat s-a efectuat conform formulei 5.

$$\text{TAC (u/c)} = 100 / [\text{Abs1} + 2 * (\text{Abs2} + \text{Abs3} + \text{Abs4}) + \text{Abs5}], \quad (\text{formula 5})$$

unde:

Abs1, Abs2, Abs3, Abs4, Abs5 – absorbția diluțiilor de lucru a probei de cercetat Abs1 (1: 10); Abs2 (1: 20); Abs3 (1: 40); Abs4 (1: 80) și Abs5 (1: 160).

Calcularea *masei substanțelor antioxidante* în proba de cercetat s-a efectuat după formula:

$$MA(u/c) = 0,3 \times (Abs_{control} - Abs_{minimă}) / (Abs_{maximă} - Abs_{minimă}) + lgT_{minim}, \quad (\text{formula 6})$$

unde:

$Abs_{control}$ – reprezintă valoarea de absorbție a probei de control;

$Abs_{maximă}$ și $Abs_{minimă}$ – reprezintă valorile Abs mai mari și Abs mai adiacente intervalului de salt;

lgT_{minim} – reprezintă cel mai mic logaritm al diluției adiacente intervalului de salt.

Pentru calcularea intervalului de salt s-au aranjat valorile absorbanței probelor (Abs) în ordine crescândă. Ulterior s-au scăzut valorile absorbției ale concentrațiilor adiacente, iar cea mai mare valoare absolută a diferenței este definită ca interval de salt.

Calcularea activității medii a antioxidanților din proba de cercetat se efectuează după formula:

$$AMA(u/c) = \frac{TAC}{MA}, \quad (\text{formula 7})$$

unde:

TAC – reprezintă capacitatea antioxidantă totală;

MA – reprezintă masa substanțelor antioxidante din proba de cercetat;

AMA – reprezintă activitatea medie a substanțelor antioxidante din proba de cercetat.

Activitatea *superoxid dismutazei* (EC 1.15.1.1) a fost estimată conform metodelor descrise de Матюшин Б. Н. și coaut. [168] și Дубинина Е. Е. și coaut. [169], modificate de Tagadiuc O. și coaut. [170]. Principiul metodei constă în inhibiția reducerii sării de tetrazolium (NBT) în sistemul ce conține fenazinmetasulfat și NADH sub acțiunea SOD. În urma reducerii NBT se formează nitroformazan, care are o colorație albastră. Cantitatea acestuia a fost dozată apoi spectrofotometric la 540 nm, intensitatea colorației fiind proporțională cu cantitatea de NBT redus. Activitatea SOD este capabilă să inhibe acest proces [170]. Activitatea SOD a fost exprimată în unități convenționale (u.c.). În calitate de unitate a activității SOD se ia cantitatea de enzimă necesară pentru inhibiția a 50% din reacția de reducere a NBT. Activitatea enzimei s-a raportat la 1 ml de ser.

Determinarea activității *catalazei* (EC 1.11.1.6) a fost efectuată utilizându-se procedeul descris de Корольюк М. А. și coaut. [171], modificat de Baciuc E. și Nastas I. [172], estimându-se proprietatea enzimei de a scinda molecula de H_2O_2 în H_2O și O_2 . Ulterior, H_2O_2 formează cu molibdatul de amoniu un compus complex de culoare galbenă, iar descompunerea acestuia de către enzimă induce decolorarea soluției, determinată spectrofotometric la 410 nm. Activitatea CAT corelează cu gradul decolorării și a fost exprimată în micromoli la 1 litru de ser ($\mu M/L$).

Indicii metabolismului glutationic și tiol-disulfidic: glutation peroxidaza, glutation-S-transferaza, glutation reductaza, glutationul total, homeostazia tiol-disulfidică (SH-grupe tiolice totale, SH-grupe tiolice libere și SH-grupări tiolice ale proteinelor).

Activitatea *glutacion peroxidazei* (EC 1.11.1.9) s-a estimat în baza testului optic Warburg, utilizându-se procedeul propus de Wendel A. [173], modificat de Tagadiuc O. și coaut. [174], determinându-se absorbția la interval de timp prestabilit la 340 nm. Rezultatul activității GPx a fost exprimat în nanomoli de glutacion redus pe secundă la un litru de ser sangvin (nM/s/L).

Activitatea *glutacion-S-transferazei* (EC 2.5.1.18) a fost dozată conform procedurii descrise de Habig W. H. și coaut. [175], modificat de Tagadiuc O. și coaut. [176], având la bază capacitatea GST de a cataliza reacția de condensare a GSH cu 1-clor-2,4-dinitrobenzenul, cu formarea unui compus ce se determină spectrofotometric la 346 nm și a cărui cantitate este proporțională cu activitatea GST, care a fost exprimată în nanomoli pe secundă la un litru de ser sangvin (nmol/s.L).

Activitatea *glutacion reductazei* (EC 1.6.4.2) s-a determinat prin metoda descrisă de Власова С. H. și coaut. [177], modificată de Gudumac V. și coaut. [178], ce are la bază testul optic Warburg. La baza metodei stă măsurarea consumului de NADPH, utilizat de către GR cu scopul reducerii GSSG, observat prin diminuarea absorbției la 340 nm. Activitatea enzimei a fost exprimată în nanomoli de GSSG ce a fost transformat în GSH într-o secundă la un litru de ser sangvin (μ M/s.L).

Determinarea *glutacionului total* s-a făcut conform procedurii descrise de Akerboom T. P. și coaut. [179], modificat de Andronache L. și coaut. [180]. Metoda are la bază formarea compusului colorat dintre GSH și acidul ditiobisnitrobenzoic (DTNB) în mediul de reacție ce conține NADPH, identificat la 405 nm în funcție de timp. Calculele se fac conform curbei de calibrare construită în baza soluției standard stock de 10 mM GSH [180]. Rezultatele se exprimă în nanomoli la litru (nM/L).

Determinarea *homeostaziei tiol-disulfidice (SH-grupe tiolice libere și SH-grupe tiolice totale)* a decurs prin metoda descrisă de Erel O. [181]. Principiul metodei se bazează pe reducerea legăturilor disulfurice reductibile pentru a forma grupări tiol funcționale libere. Borhidrura de sodiu reducătoare neutilizată a fost consumată și îndepărtată cu formaldehidă și toate grupările tiol, inclusiv grupările tiol reduse și native, au fost determinate după reacția cu acidul 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoic) (DTNB), stabilindu-se absorbția spectrofotometrică la 412/700 nm. Activitatea homeostaziei tiol-disulfidice a fost evaluată cu ajutorul curbei de calibrare a sol. standard de 2-mecrptoetanol (10 mM), structurizată în baza diluțiilor succesive. Rezultatul a fost prezentat în μ M/L.

Conținutul de SH – *grupări tiolice ale proteinelor* în materialul de cercetare s-a apreciat în conformitate cu procedeul propus de Ellman G. L. și Hu M. L. [182, 183], modificat de Gudumac V.

și coaut. [184]. Principiul metodei se bazează pe interacțiunea dintre reactivul Ellman - 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) și grupele tiolice ale proteinelor, ce va forma un compus colorat cu capacitatea maximă de absorbție la 412 nm. Rezultatul se exprimă în $\mu\text{M/gproteină}$. Calculul se efectuează după formula:

$$\text{SH} - \text{grupări tiolice ale proteinelor } (\mu\text{M/gprot.}) = \frac{1000}{[\text{PT}]} \times \frac{\text{Abs}}{\Sigma} \times \frac{V_t}{V_{\text{pr}}}, \quad (\text{formula 8})$$

unde:

PT – proteina totală;

Abs – absorbția probei de cercetat;

Σ – coeficientul molar de extincție ($13600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) al DTNB;

V_t – volumul total al probei de cercetat;

V_{pr} – cantitatea de material biologic cercetat.

2.4.3. Tehnologii informaționale și procedee de analiză statistică a rezultatelor

În literatura științifică internațională au fost analizate date de ultimă oră ce țin de tematica tezei de doctor, fiind accesate baze de date cu predilecție de profil medical: PubMed, HINARI, Google scholar, ARDI, OARE. Au fost utilizate cuvinte-cheie: coordination compounds of thiosemicarbazides, oxidative stress, antioxidant defense system, reactive oxygen species, malonic dialdehyde, advanced oxidation protein products, reactive oxygen metabolites, prooxidant antioxidant balance, nitric oxide, total glutathione, glutathione peroxidase, glutathione S-transferase, glutathione reductase, total antioxidant capacity, mass of antioxidants, average antioxidant activity.

Teza a fost redactată utilizându-se programul Microsoft Office versiunea 2013.

Graficele incluse în teză au fost realizate cu ajutorul programului Microsoft Excel 2013.

Evaluarea statistică a datelor obținute a fost realizată cu ajutorul programului de calculator Statistical Package for the Social Science (v.23, SPSS Inc. Chicago, IL, SUA). S-au determinat indicatorii de bază ai statisticii descriptive: *media aritmetică $\pm$ std. deviation, mediana, abaterea intercuartilă, minimum și maximum, percentil 25, percentil 75*.

Analiza a presupus, în prima etapă, alegerea testelor potrivite pentru identificarea diferențelor statistic semnificative între loturile de studiu [185]. Cu scopul etalării diferențelor dintre loturi s-au aplicat testele post-hoc pentru comparații multiple: Tukey, Bonferroni, Games-Howell după One-Way Anova. Pragul de semnificație stabilit a fost $p < 0,05$.

După verificarea datelor obținute, pentru a evidenția diferența semnificativă a parametrilor biochimici studiați în loturile comparate, a fost utilizat testul post-hoc comparația multiplă Games-

Howell după One-Way Anova, testul nonparametric Kruskal-Wallis, pragul de semnificație $p < 0,05$, fiind calculate *mediana*, *abaterea intercuartilă* și coeficientul nonparametric de corelație ρ *Spearman*.

Coeficientul de corelare a rangului lui *Spearman* este cea mai răspândită alternativă la r -ul lui *Pearson*. Este un coeficient de corelare a rangului, deoarece folosește clasamentele datelor din fiecare variabilă (de exemplu, de la cel mai mic la cel mai mare) mai degrabă decât datele brute în sine.

Coeficientul nonparametric de *corelație* ρ *Spearman* este bazat pe ranguri (coeficientul de corelație a rangurilor) și nu este influențat de reprezentativitatea mediei. Se utilizează când lotul de cercetare are dimensiuni mici (sub 30 de cazuri) sau când cel puțin una dintre variabile nu îndeplinește condițiile de administrare a testelor parametrice. Scorurile originale sunt transformate în ranguri și se analizează relația dintre acestea [185].

Coeficientul ρ *Spearman* este folosit atunci când:

- ambele variabile se află la nivel ordinal de măsuri;
- când o variabilă se află la nivel ordinal, iar cealaltă variabilă la nivel scalar;
- când ambele se află la nivel scalar, dar cel puțin una dintre ele nu prezintă distribuție normală.

Corelația exprimă sub formă numerică gradul de asociere dintre variabile. Raportarea corelației include trei elemente esențiale [185]:

- sensul dat de semnul coeficientului de corelație:
„+” (corelație pozitivă) – direcția în care evoluează o variabilă este și direcția de evoluție a celeilalte variabile;
„-” (corelație negativă) – direcția de evoluție a unei variabile reprezintă evoluția inversă a celeilalte variabile.
- semnificația (pragul de semnificație) $p < 0,05$;
- valoarea (intensitatea) indică puterea corelației:
0,00 – 0,20 – absența unei corelații reale sau o corelație foarte slabă;
0,21 – 0,40 – corelație slabă;
0,41 – 0,60 – corelație moderată;
0,61 – 0,80 – corelație puternică;
0,81– 1,00 – existența unei legături foarte puternice între două variabile.

3. EVALUAREA ACȚIUNII COMPUȘILOR COORDINATIVI AI CUPRULUI CU TIOSEMICARBAZONE *IN VITRO*

Pentru a identifica cei mai eficienți CCT din punctul de vedere al acțiunii antitumorale și cu cel mai mic impact asupra celulelor normale, s-au studiat efectele CCT asupra viabilității și proliferării culturii celulare de gliom C6 și a hepatocitelor normale de la șobolani sănătoși.

3.1. Evaluarea potențialului citotoxic al CCT *in vitro* în cultura de celule de gliom C6 de șobolan (CCL - 107)

Ținând cont de scopul lucrării, a fost studiată influența CCT autohtoni noi asupra viabilității și proliferării celulare *in vitro* pe cultura de celule de gliom C6 de șobolan prin testele MTT și cu resazurină.

Rezultatele testului MTT au evidențiat o influență diferită asupra viabilității celulelor de gliom C6 de șobolan și o toxicitate moderată în ambele doze (10,0 $\mu\text{M/L}$ și 1,0 $\mu\text{M/L}$) a compușilor testați (figura 13).

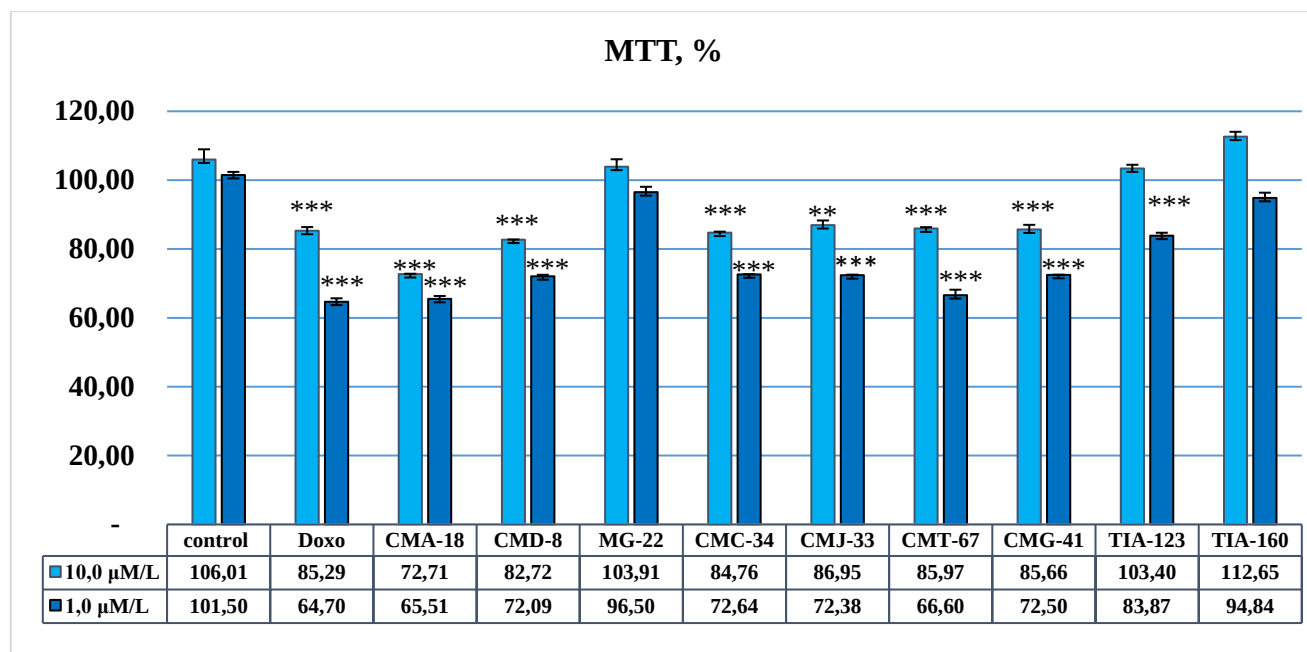


Figura 13. **Influența CCT în dozele de 10,0 $\mu\text{M/L}$ și 1,0 $\mu\text{M/L}$ asupra viabilității celulare de gliom C6 de șobolan testate *in vitro* prin testul MTT**

Notă: Veridicitatea statistică față de lotul-martor: ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$.

Analiza rezultatelor testului MTT a evidențiat o diminuare semnificativă statistic ($p < 0,001$) a viabilității celulelor la administrarea compusului de referință – DOXO, atât în doză de $10,0 \mu\text{M/L}$ (-14%), cât și de $1,0 \mu\text{M/L}$ (-25%), comparativ cu martorul.

Compusul de referință DOXO administrat în doză de $10,0 \mu\text{M/L}$ a manifestat acțiune similară cu DOXO CMD-8 (-17, $p < 0,001$), CMC-34 (-15%, $p < 0,001$), CMJ-33 (-13%, $p < 0,001$), CMT-67 și CMG-41 (-14%, $p < 0,001$). Efectul CMA-18 a fost mai pronunțat (-27%, $p < 0,001$), iar MG-22, TIA-123 și TIA-160 nu au exercitat nici o acțiune (figura 13).

Micșorarea dozei administrate de 10 ori a potențiat efectele CCT asupra viabilității celulelor de gliom C6. Astfel, CMA-18 și CMT-67 au diminuat viabilitatea celulelor C6 cu cca 35% ($p < 0,001$ în ambele cazuri), CMD-8, CMC-34, CMJ-33 și CMG-41 cu cca 27% ($p < 0,001$ în toate cazurile), iar TIA-123 doar cu 14% ($p < 0,001$). MG-22 și TIA-160 nici la această doză n-au influențat viabilitatea celulelor de gliom C6.

Rezultatele evaluării proliferării celulelor de gliom C6 de șobolan sub influența compușilor de coordonare ai cuprului cu tiosemicarbazone în dozele de $10,0 \mu\text{M/L}$ și $1,0 \mu\text{M/L}$ evaluate cu ajutorul testului resazurină sunt prezentate în figura 14.

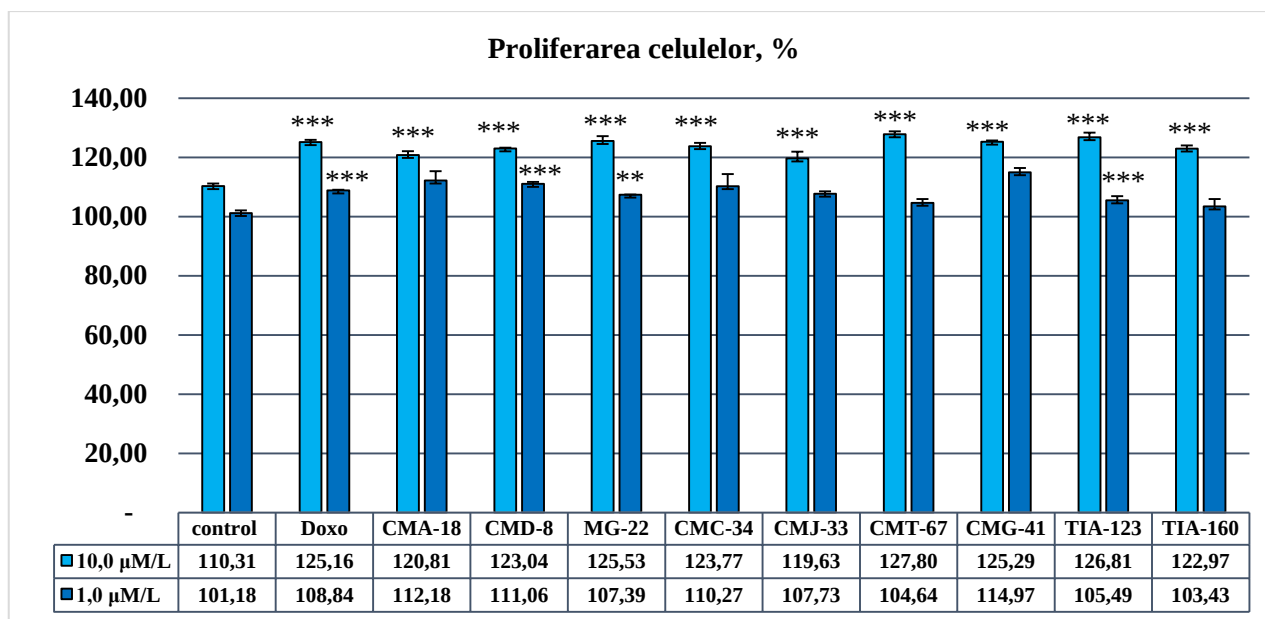


Figura 14. Proliferarea celulelor de gliom C6 de șobolan (CCL-107) sub influența CCT în dozele de $10,0 \mu\text{M/L}$ și $1,0 \mu\text{M/L}$ evaluate prin testul cu resazurină

Notă: Veridicitatea diferenței statistice comparativ cu lotul-martor: ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$.

Rezultatele testului cu resazurină au relevat că proliferarea în timpul perioadei de incubare a culturii martor a gliomului C6 de șobolan a fost de 10,31%. Modificări semnificativ statistice ale

proliferării celulelor de gliom au fost atestate când celulele au fost tratate în ambele doze cu preparatele CMA-18 (+9,5% - 10,9%, $p < 0,001$), CMD-8 (+9,8% - 11,5%, $p < 0,001$) și TIA-123 (+4,3% - 15%, $p < 0,001$). În același timp, la administrarea MG-22 în doza de 10 $\mu\text{M/L}$ se atestă o proliferare cu 13,8%, $p < 0,001$, iar în doza de 1,0 $\mu\text{M/L}$ o proliferare cu 6,1%, $p < 0,01$. Compușii CMC-34, CMT-67, CMG-41 și CMT-67 în doza de 10,0 $\mu\text{M/L}$ au amplificat proliferarea celulelor veridic statistic cu 11,5% - 15,9% ($p < 0,001$), pe când în doza de 1,0 $\mu\text{M/L}$ nesemnificativ cu 2,2% - 13,6% ($p > 0,05$). Similar, compusul coordonativ CMJ-33 a indus o proliferare nesemnificativă statistic în doza de 10,0 $\mu\text{M/L}$ cu 8,4% ($p > 0,05$), iar în doza de 1,0 $\mu\text{M/L}$ cu 6,5% ($p < 0,001$).

Testele cu MTT și resazurină sunt vizual aplicate pentru studiul compușilor chimici biologic activi cu potențial de medicamente cu scopul de a identifica capacitatea de a influența viabilitatea (MTT) și proliferarea (resazurină) celulelor *in vitro*.

Studiul nostru a stabilit, că toți CCT cercetați micșorează viabilitatea celulelor de gliom C6 în ambele doze – în diapazon de 3% - 35% fiind administrate în concentrație de 1,0 $\mu\text{M/L}$ și de 15% - 27% în doza de 10,0 $\mu\text{M/L}$, spre deosebire de DOXO care nu a afectat indicele respectiv.

În același timp, CCT au avut efecte similare cu DOXO asupra proliferării celulare administrate în doza de 10,0 $\mu\text{M/L}$. Micșorarea dozei a relevat lipsa stimulării proliferării de către CMA-18, CMT-67, CMG-41 și TIA-160.

Astfel, am stabilit că 4 CCT: CMA-18, CMC-34, CMT-67 și CMG-41, semnificativ inhibă viabilitatea celulelor de gliom de șobolan C6 și nu induc proliferarea lor. Luând în considerare, că testele MTT și cu resazurină se bazează pe activitatea metabolică a celulelor [145], putem presupune că CCT interferează cu procesele metabolice cardinale, în special cu cele mitocondriale. Efectul ar putea fi condiționat de prezența cuprului în componența CCT și de inducerea de către metal a apoptozei mediată de speciile reactive de oxigen pe calea mitocondrială (eliberarea citocromului c și activarea caspazei 3) [126].

CCT au manifestat un impact de diferită amploare, fenomen ce ar putea fi determinat de diferențele în structura părții organice a CCT, care influențează atât proprietățile fizico-chimice, cât și cele biologice.

3.2. Evaluarea potențialului citotoxic al CCT *in vitro* în cultura de hepatocite

Majoritatea medicamentelor antineoplazice existente pot afecta țesuturile normale, producând deseori efecte citotoxice [154, 186, 187]. Acest fapt limitează utilizarea lor și constituie o indicație pentru reducerea dozei de medicament, întreruperea și sistarea completă a tratamentului. În ciuda progreselor semnificative realizate în chimioterapia cancerului, toxicitatea sistemică mare și rezistența

la chimioterapicele antineoplazice rămâne o provocare majoră pentru farmacoterapia oncologică contemporană. Mulți agenți anticancerigeni provoacă efecte secundare severe, care se datorează efectelor lor citotoxice asupra celulelor normale.

De aceea, este important ca medicamentele anticanceroase să exercite activitate antiproliferativă și citotoxică înaltă în celulele tumorale, fără a afecta țesuturile normale. Elaborarea de noi chimioterapice eficiente, cu efecte adverse minimale este de mare importanță teoretică și practică. Luând în considerare rolul ficatului în detoxifierea compușilor endo- și exogeni, inclusiv a medicamentelor, organul este o țintă primară a acțiunii toxice a substanțelor medicamentoase, în special a celor utilizate în chimioterapie. Pornind de la aceste premise, am realizat studiul efectelor CCT asupra viabilității și proliferării celulelor normale hepatice obținute de la șobolani sănătoși (*ratta albicans*).

Rezultatele testului MTT au estimat că celulele hepatice tratate cu CCT au avut viabilitate relativ ridicată, indicând o citotoxicitate scăzută a compușilor testați (figura 15).

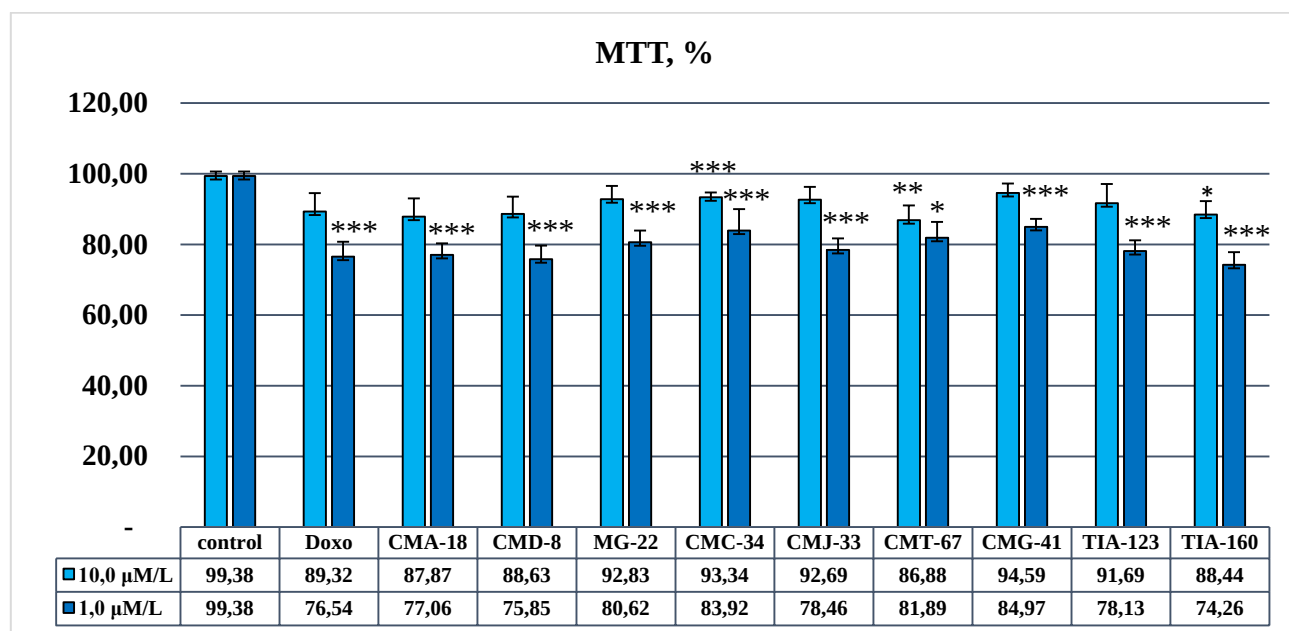


Figura 15. **Rezultatele evaluării viabilității și citotoxicității *in vitro* sub acțiunea CCT (10,0 μM/L și 1,0 μM/L) în hepatocite de șobolan**

Notă: Veridicitatea statistică față de lotul-martor: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$.

Suplimentarea de doxorubicină într-o concentrație de 10,0 μM/L la cultura de hepatocite a indus o scădere nesemnificativă a viabilității hepatocitelor (10%, $p > 0,05$). Analiza rezultatelor testului MTT a indicat că viabilitatea celulelor tratate cu CCT la o concentrație de 10,0 μM/L a scăzut semnificativ doar sub influența CMC-34 (5,8%, $p < 0,001$), CMT-67 (12,5%, $p < 0,01$) și TIA-160

(11,0, $p < 0,01$), în timp ce alți CCT au redus nesemnificativ viabilitatea hepatocitelor cu 5% - 11% ($p > 0,05$). În urma cercetărilor se poate concluziona că CCT la o concentrație de 10,0 $\mu\text{M/L}$ nu au manifestat un efect toxic asupra celulelor hepatice, care și-au păstrat în mare măsură viabilitatea, posibil datorită funcțiilor metabolice păstrate.

La administrarea CCT în doza de 1,0 $\mu\text{M/L}$ s-a constatat, că toți compușii au scăzut sugestiv statistic viabilitatea: CMG-41 (14,5%, $p < 0,001$), CMC-34 (17,4%, $p < 0,001$), CMT-67 (17,6%, $p < 0,05$), MG-22 (18,8%, $p < 0,001$), CMJ-33 (21,06%, $p < 0,001$), TIA-123 (21,4%, $p < 0,001$). Compușii CMA-18, DOXO, CMD-8 și TIA-160 au determinat scăderea veridică statistic cu 14 % - 22%, $p < 0,001$, demonstrând cel mai bun efect asupra celulelor hepatice, care și-au păstrat funcțiile și viabilitatea într-o măsură mai mare.

Pentru a determina dacă CCT manifestă o influență directă asupra proliferării celulare, am testat efectele acestora asupra celulelor hepatice *in vitro* prin testul cu resazurină.

Rezultatele testului cu resazurină au relevat că proliferarea în perioada de incubare a culturii martor a hepatocitelor a constituit 12,99%. Efectul CCT 10,0 $\mu\text{M/L}$ asupra proliferării culturii de hepatocite, evaluat cu ajutorul testului cu resazurină, a stabilit modificări semnificative statistic la tratamentul cu CMA-18 (+38%, $p < 0,001$), CMC-34 (-16%, $p < 0,05$) și CMJ-33 (-15%, $p < 0,05$), creșterea nesemnificativă statistic a fost produsă de CMG-41 (+1%, $p > 0,05$), MG-22 (+20%, $p > 0,05$) și DOXO (+24%, $p > 0,05$), în timp ce s-a înregistrat o diminuare statistic nesemnificativă la administrarea CMD-8 (1,17%, $p > 0,05$), CMT-67 (7%, $p > 0,05$), TIA-160 (9,62%, $p > 0,05$) și TIA-123 (15,09%, $p > 0,05$) (figura 16).

Testul cu resazurină a influenței CCT în doza de 1,0 $\mu\text{M/L}$ asupra proliferării culturii de hepatocite atestând o creștere nesemnificativă statistic indusă de DOXO (+2%, $p > 0,05$) și o scădere nesemnificativă statistic a MG-22 (4%, $p > 0,05$). O creștere veridică statistic a proliferării culturii de hepatocite a fost atestată la tratarea hepatocitelor cu CMA-18 (+20%, $p < 0,05$), în timp ce s-a înregistrat o scădere statistic semnificativă de către CMD-8 (25%, $p < 0,001$), CMJ-33 (27%, $p < 0,001$), TIA-160 (26,62%, $p < 0,001$), CMT-67 (27,48%, $p < 0,001$), CMC-34 (27,87%, $p < 0,001$), CMG-41 (28,31%, $p < 0,05$) și TIA-123 (38,37%, $p < 0,001$).

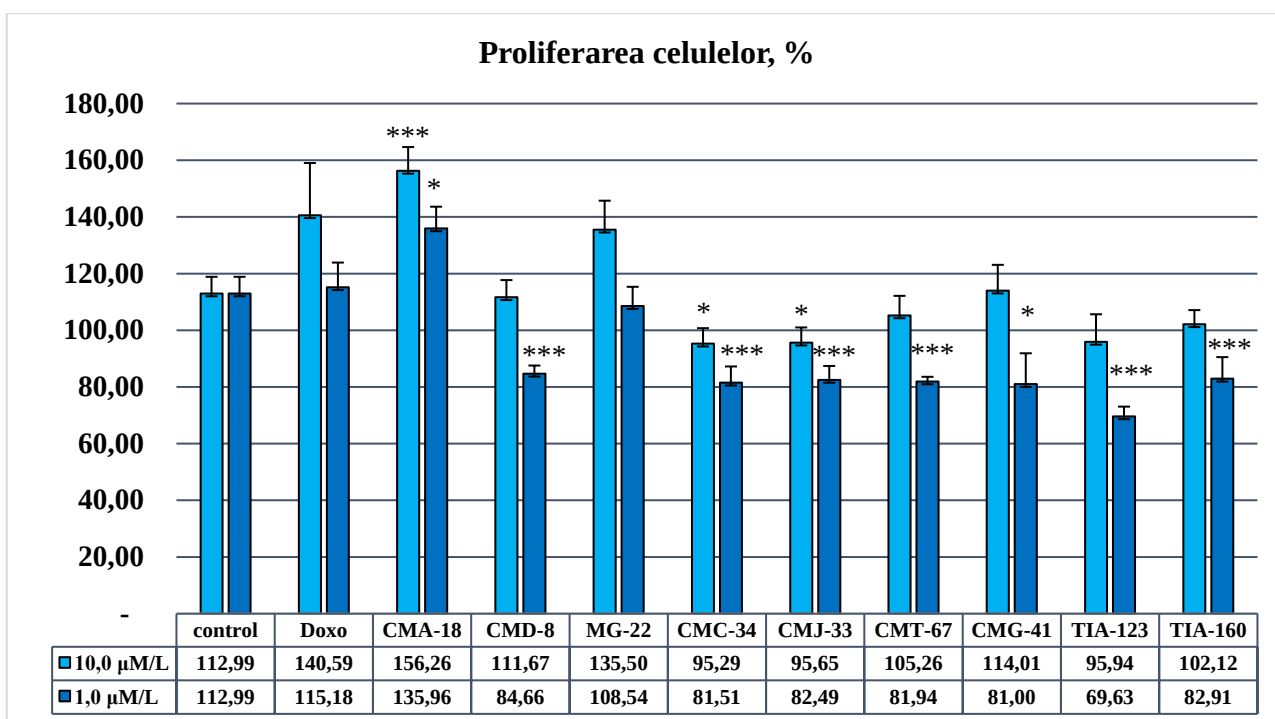


Figura 16. Proliferarea hepatocitelor sub influența CCT în dozele de 10,0 µM/L și 1,0 µM/L evaluată prin testul cu resazurină

Notă: semnificația statistică în comparație cu martorul: * – $p < 0,05$; *** – $p < 0,001$.

În urma cercetărilor se poate concluziona, că compușii testați în doză de 1,0 µM/L exercită efecte nefavorabile asupra viabilității și proliferării celulare. Majorarea concentrației conduce la anihilarea efectelor respective. Astfel, în doză de 10,0 µM/L compușii CMD-8, MG-22, CMG-41 și TIA-123 nu afectează viabilitatea și proliferarea celulelor hepatice normale, iar CMA-18 stimulează proliferarea lor fără a influența viabilitatea.

3.3. Impactul compușilor coordinativi ai cuprului cu tiosemicarbazone asupra viabilității și proliferării *in vitro* a celulelor sănătoase și tumorale

Scopul unui număr semnificativ de studii realizate în domeniul chimiei la intersecție cu oncologia a constituit elaborarea a noi compuși-potențiale medicamente antitumorale selective, eficiente și cu efecte adverse minime asupra celulelor sănătoase [188-190]. În acest domeniu s-au remarcat tiosemicarbazonele, derivații cărora prezintă un interes sporit ca posibili compuși chimioterapici, datorită acțiunii lor antitumorale farmacologice diverse, cum ar fi inhibarea creșterii, stoparea invaziei și promovarea regresiei tumorii [19, 191, 192].

Studii anterioare ale altor grupuri de cercetători au identificat capacitatea tiosemicarbazonelor de a inhiba *in vitro* viabilitatea și/sau proliferarea celulelor de eritroleucemie (K562), de melanom (SK-Mel-28) și de cancer mamar (MCF-7), carcinom hepatocelular uman (HepG2), carcinom colorectal uman (HCT-116), carcinom pulmonar uman (A549), cancer pancreatic uman (BxPC3; AspC1; MiaPaCa2; PANC-1) etc. [193-196], unele dintre ele exercitând acțiune antitumorală mai pronunțată decât doxorubicina – medicament uzual al oncologiei moderne [197].

O etapă esențială în elaborarea unui medicament antitumoral este evaluarea citotoxicității lui prin elucidarea *in vitro* a impactului asupra viabilității și proliferării celulelor atât canceroase, cât și normale. Printre cele mai utilizate teste în acest scop sunt cele cu MTT și resazurină (Alamar Blue).

Aplicarea testului MTT pentru aprecierea impactului asupra viabilității celulelor se bazează pe dependența transformării MTT de activitatea lor metabolică, care este direct corelată cu viabilitatea [198-199]. Sarcina pozitivă și caracterul lipofil al moleculei de MTT fundamentează traversarea membranelor biologice și intrarea în celulă și ulterior în organitele celulare, unde MTT este redus la formazan de numeroși compuși și enzime (dehidrogenazele NAD(P)H-dependente, acidul ascorbic, tocoferoli, acidul dihidrolipoic, cisteina, glutatyonul și glutatyon-S-transferaza) [198-201]. Deși testul MTT este considerat a fi un standard de aur pentru testarea citotoxicității *in vitro* și este utilizat pe scară largă pentru a testa evenimentele citotoxice timpurii, nu este lipsit de limitări. Diferiți factori pot provoca variații semnificative în viabilitatea efectivă a celulei, inclusiv variabilitatea activității metabolice a celulei pe parcursul ciclului celular, în diferite faze de cultivare (faza staționară vs logaritmică) și/sau tipul celulei etc. [150].

Testul cu resazurină ne relevă proliferarea celulelor deoarece reducerea compusului în mediul culturii celulare este direct proporțională cu numărul de celule vii. Conversia resazurinei în rezorufină fluorescentă are loc intracelular. Procesul este deosebit de activ în mitocondrii, dar și enzimele localizate în citoplasmă sunt capabile să reducă resazurina. Prin urmare, cantitatea de rezorufină generată se corelează direct cu numărul celulelor vii în care are loc transformarea [202-204].

Rezultatele testului MTT au relevat că CCT testați în studiul nostru au indus scăderea viabilității celulelor de glioblastom C6 de 15-27%, fiind administrate în concentrație de 10,0 $\mu\text{M/L}$ și de 3-35% în concentrație de 1,0 $\mu\text{M/L}$ după o incubare de 24 de ore.

Testul cu resazurină a relevat că administrarea de DOXO în doze de 1,0 $\mu\text{M/L}$ și 10,0 $\mu\text{M/L}$ nu a avut un impact negativ major asupra proliferării celulelor C6, care a crescut în comparație cu

culturile martor cu 8,8% și 25,2%, respectiv ($p < 0,001$ în ambele cazuri). Compușii TSC testați au prezentat un impact similar cu DOXO atunci când au fost administrați la o doză de 10,0 $\mu\text{M/L}$. Cu toate acestea, la o doză mică de 1,0 $\mu\text{M/L}$, cinci dintre substanțele testate (CMA-18, CMC-34, CMT-67, CMG-41 și TIA-160) nu au indus proliferarea celulară în cultura de gliom.

Studii similare ale altor cercetători au evidențiat, de asemenea, efectul de inhibare a celulelor de glioblastom de către diverși CCT. Astfel, Turan-Zitouni G. și coaut. (2016) au atestat acțiunea de inhibare a celulelor în cultura de glioblastom de șobolan C6 de către 3,3'-dimetoxi-N(4),N(4')-bis(4-(4-bromofenil)tiazol-2-yl)-[1,1'-bifenil]-4,4'-diamină cu o concentrație inhibitorie medie apropiată de cea utilizată de noi – $11,3 \pm 1,2 \mu\text{g/mL}$ [205]. Diferită sensibilitate la acțiunea tiosemicarbazonelor manifestă și culturile celulare de gliom uman. Astfel, mai multe studii raportează că viabilitatea celulelor din cultura de gliom uman U-87 a fost modest diminuată la administrarea tiosemicarbazonelor noi în concentrație de 100 μM timp de 24 de ore [206-208]. Extinderea perioadei de incubare și creșterea concentrației poate amplifica semnificativ capacitatea tiosemicarbazonelor de a inhiba celulele de gliom T98G (IC_{50} : 140–1.0 nM) și U87 (IC_{50} : 160–1.4 nM) [209].

Având în vedere durata mai scurtă de acțiune și concentrația semnificativ mai mică a compușilor testați de noi, am putea sugera că ei posedă o capacitate semnificativă de a inhiba viabilitatea celulelor de glioblastom. O comparație a acțiunilor compușilor a constatat că toți cei trei derivați fenil (CMC-34, CMJ-33 și CMT-67) ai tiosemicarbazonelor au demonstrat un efect de scădere asupra viabilității celulelor C6 în comparație cu derivații de benzotiazol (CMA-18, CMD-8 și MG-22) și derivații de alil (CMG-41, TIA-123 și TIA-160), printre care doar două substanțe au prezentat acțiune asupra viabilității celulelor de gliom de șobolan C6.

Analizând efectele cumulate ale CCT asupra viabilității (testul MTT) și proliferării (testul resazurină) celulelor gliomului C6, am constatat că compușii CMA-18, CMC-34, CMT-67 și CMG-41 au scăzut semnificativ viabilitatea, în timp ce nu au stimulat proliferarea celulară. Prin urmare, putem concluziona că derivații fenil testați în studiul curent au prezentat cele mai promițătoare acțiuni dintre cele trei grupe de substanțe incluse în studiu.

Compușii coordinativi ai cuprului cu tiosemicarbazone pot interveni prin diverse mecanisme în procesele metabolice, ce se reflectă asupra funcției și viabilității celulare. Efectele menționate au fost relatate atât cu privire la celulele canceroase [210-212], cât și la cele normale [213, 153].

În cercetarea noastră a fost testat impactul CCT asupra hepatocitelor normale de șobolan, luând în considerare rolul organului în metabolizarea medicamentelor și în menținerea homeostaziei organismului. Testul cu MTT a relevat că în doză de 10,0 $\mu\text{M/L}$, CCT nu au avut un efect semnificativ asupra viabilității celulelor hepatice (-6-12% la administrarea a CMC-34 și CMT-67), care și-au păstrat în mare parte viabilitatea, posibil datorită funcțiilor metabolice păstrate. În concentrație redusă (1,0 $\mu\text{M/L}$), toți CCT au diminuat statistic semnificativ viabilitatea hepatocitelor (-15-25%) la nivel similar cu cel produs de DOXO.

Rezultatele testului cu resazurină au estimat că proliferarea în perioada de incubare a culturii martor a hepatocitelor a constituit 12,99%. Efectul CCT 10,0 $\mu\text{M/L}$ asupra proliferării culturii de hepatocite, evaluat cu ajutorul testului cu resazurină, a evidențiat că majoritatea CCT nu au influențat intensitatea procesului, excepție făcând doar CMA-18, CMC-34 și CMJ-33. Diminuarea cantității de CCT administrat (în doza de 1,0 $\mu\text{M/L}$) produce numeroase efecte inhibitorii asupra culturii de celule hepatice normale, atestându-se scăderea concludentă a proliferării lor cu cca 25-38%, cu excepția CMA-18 care a indus procesul.

Se poate concluziona că majoritatea CCT testați exercită efecte selective în funcție de doza utilizată (10,0 $\mu\text{M/L}$ vs 1,0 $\mu\text{M/L}$) și tipul de celulă – gliom de șobolan C6 vs hepatocite normale de șobolan. Rezultatele obținute relevă răspunsul individual al celulelor din cultură (direcția și magnitudinea) la acțiunea diferitor CCT. Aceasta poate fi o demonstrație a capacității CCT studiate de a produce răspunsuri adaptive ale celulelor, prin care ele își optimizează funcționalitatea, proces cunoscut drept hormezis [214]. În medicină, hormezis-ul este definit ca răspuns adaptiv al celulelor la stresul moderat și ca regulă intermitent, care poate fi produs de restricția calorică, efort fizic, expunerea la anumite substanțe în doze mici etc. Răspunsurile hormetice sunt mediate de căi de semnalizare celulară și mecanisme moleculare care conduc la o creștere a producției în celulă a compușilor protectori și care stimulează procesele de regenerare [215].

Răspunsul hormetic al CCT testați poate fi condiționat de prezența în componența lor a cuprului, care este un bioelement esențial datorită implicării în formarea și menținerea conformației proteinelor, asigurarea funcționalității enzimelor (citocrom oxidază, catalază, superoxid dismutază, alcool dehidrogenază, lizil oxidază etc.), care sunt implicate în sinteza ATP, protecția antioxidantă, sinteza componentelor matricei extracelulare și în alte procese vitale [216, 217].

S-a demonstrat că compușii de coordonare care conțin cupru sunt agenți terapeutici antitumorali promițători ce acționează prin diferite mecanisme, cum ar fi inhibarea activității proteasomului, formarea speciilor reactive de oxigen, degradarea ADN-ului etc. [218-220]. Țesuturile maligne și inflamate metabolizează o cantitate crescută de cupru în comparație cu țesuturile sănătoase [221], ceea ce conferă compușilor de coordonare care conțin cupru un avantaj suplimentar față de alte medicamente care includ metale, ce pot fi utilizate în tratamentul cancerului. Crearea de noi compuși de coordonare ai cuprului cu activitate antitumorală este un domeniu de perspectivă și relevant al chimiei medicale, ceea ce este confirmat de rezultatele studiului nostru privind efectul CCT asupra viabilității și proliferării celulelor hepatice.

4. INFLUENȚA COMPUȘILOR COORDINATIVI AI CUPRULUI CU TIOSEMICARBAZONE ASUPRA INDICILOR HEMOLEUCOGRAMEI ȘOBOLANILOR SĂNĂTOȘI *IN VIVO*

Cuantificarea indicilor sangvini reprezintă primul pas în evaluarea homeostaziei hematologice în diagnosticul diverselor afecțiuni hematologice și non-hematologice, precum și în evaluarea acțiunii medicamentelor și substanțelor cu potențial ce ar putea fi utilizate ca medicamente.

Pe parcursul studiului nu s-au constatat decese, modificări în comportamentul și activitatea motorie spontană în lotul animalelor martor și în cel al animalelor experimentale.

Valorile de referință determinate pentru testele de hemoleucogramă, așa cum sunt discutate și evidențiate în literatura de specialitate, pot să nu reprezinte tocmai cele ale anumitor populații sau specii de animale și, prin urmare, ar trebui să fie atent interpretate. Odată ce există o gamă largă de variații fiziologice, care sunt suplimentar influențate de condițiile de mediu, alimentare, sex, vârstă, origine, sistem reproductiv și descendență, este necesară stabilirea valorilor de referință pentru animalele luate în fiecare studiu individual. Astfel, în studiul nostru a fost inclus lotul animalelor martor – animale sănătoase, intacte, care au servit drept referință pentru compararea rezultatelor obținute în grupurile experimentale.

4.1. Evaluarea impactului compușilor coordinativi ai cuprului cu tiosemicarbazone benzotiazolice asupra indicilor hemoleucogramei șobolanilor *in vivo*

Rezultatele studiului privind influența CCT benzotiazolice asupra indicilor sangvini la șobolanii masculi și femele sunt expuse în datele statistice din tabelele 3 și 4.

În urma cercetărilor s-a constatat, că CCT benzotiazolice administrați animalelor de laborator nu au modificat statistic semnificativ numărul de eritrocite, precum și raportul eritro-plasmatic (HCT). Totodată, s-a atestat modificarea conținutului total de hemoglobină, care a fost statistic semnificativă la administrarea MG-22 atât la femele (+3%, $p < 0,01$), cât și la masculi (-8%, $p < 0,05$), și la administrarea CMA-18 la masculi (-9%, $p < 0,01$). În celelalte cazuri la animalele ambelor sexe s-au atestat doar tendințe neveridice de diminuare a conținutului total de hemoglobină de diferită amploare (-11-5%). De asemenea, nu a fost modificată concentrația medie eritrocitară a hemoglobinei (MCH), dar s-a remarcat creșterea conținutului de hemoglobină per unitate de volum eritrocitar la administrarea tuturor CCT la femele (CMA-18 - +7%, $p < 0,05$; CMD-8 - +9%, $p < 0,01$ și MG-22 - +8%, $p < 0,05$) și diminuarea la administrarea MG-22 la masculi (-4%, $p < 0,01$).

Tabelul 3. Indicii sangvini la șobolani masculi sub influența compușilor coordinativi ai cuprului cu tiosemicarbazone benzotiazolice (în doza de 0,01 mg/kg)

Indicii hemoleuco-gramei	Martor mediana (IQR)	CMA-18 mediana (IQR)	CMD-8 mediana (IQR)	MG-22 mediana (IQR)
RBC *10 ¹² /L	8,28 ; IQR 4,74	7,59 ; IQR 1,20	7,85 ; IQR 0,71	7,70 ; IQR 1,62
%	100 %	92%	95%	93%
HGB g/L	152,00; IQR12,00	138,00; IQR 13,00**	145,00 ; IQR 21,00	140,00; IQR 13,00 *
%	100%	91%	95%	92%
HCT %	40,40 ; IQR 24,60	38,70 ; IQR 2,00	40,30 ; IQR 5,15	40,20 ; IQR 3,23
%	100%	96%	99,7%	99,5%
MCV fL	52,90 ; IQR 5,40	52,10 ; IQR 3,95	52,20 ; IQR 2,93	51,55 ; IQR 8,43
%	100%	98%	99%	97%
MCH pg	18,70 ; IQR 22,10	18,60 ; IQR 1,40	19,10 ; IQR 1,55	18,40 ; IQR 2,68
%	100%	99%	102%	98,4%
MCHC	36,60 ; IQR 38,40	35,55 ; IQR 0,85	36,60 ; IQR 0,75**	35,15 ; IQR 1,60 **
%	100%	97%	100%	96%
RDW fL	5,90 ; IQR 0,10	5,80 ; IQR 0,43	6,15 ; IQR 0,60 *	5,75 ; IQR 0,45 *
%	100%	98%	104%	97%
RDW-CV %	15,40 ; IQR 2,0	16,30 ; IQR 1,70	17,00 ; IQR 2,40	15,60 ; IQR2,10
%	100%	106%	110%	101%
WBC *10 ⁹ /L	11,72 ; IQR 6,78	11,86 ; IQR 5,67	12,01; IQR 6,39	9,80 ; IQR 6,30 *
%	100 %	101%	103%	84%
Segmentate %	43,50 ; IQR 1,75	20,00; IQR 3,75 **	38,50; IQR 3,75***	30,50; IQR 2,50 ***
%	100%	46%	88%	70%
Limfocite %	46,00 ; IQR 2,00	71,00; IQR 2,25 **	51,00; IQR 4,75***	61,00; IQR 4,75 ***
%	100%	154%	111%	133%
Monocite %	5,50 ; IQR 4,25	4,50 ; IQR 2,25	3,50 ; IQR 3,25	4,00 ; IQR 2,25
%	100%	82%	64%	73%
Eozinofile %	3,00 ; IQR 1,50	2,00 ; IQR 0,75 *	4,00 ; IQR 0,50 *	2,00 ; IQR 1,25 **
%	100%	67%	133%	67%
Bazofile %	1,00 ; IQR 0,25	2,00 ; IQR 1,50	1,00 ; IQR 0,25	1,00 ; IQR 1,25
%	100%	200%	100%	100%
Nesegmentate %	0,00 ; IQR 1,00	1,00 ; IQR 1,25	1,00 ; IQR 1,00	0,50 ; IQR 2,00
%	100%	0,0%	0,0%	0,0%
PLT *10 ⁹ /L	578,00;IQR 318,0	673,00; IQR 133,5	602,00 ; IQR 157,2	710,00 ; IQR 230,0
%	100%	116%	104%	123%
MPV fL	6,40 ; IQR 0,10	6,25 ; IQR 0,28	6,45 ; IQR 0,38	6,30 ; IQR 0,23 *
%	100%	98%	101%	98,4%

Notă: Veridicitatea statistică față de lotul-martor după testul nonparametric Kruskal Wallis:

* – p< 0, 05; ** – p< 0,01; *** – p< 0,001.

RBC – eritrocite; HGB – hemoglobina; HCT – hematocrit; MCV – volumul mediu al eritrocitului; MCH – conținutul mediu de hemoglobină într-un eritrocit; MCHC – concentrația medie a hemoglobinei; RDW – amplitudinea distribuției eritrocitare; RDW-CV – lățimea distribuției eritrocitare; WBC – leucocite; PLT – trombocite; MPV – volumul mediu al trombocitului; IQR – intervalul intercuartil.

Cu excepția CMD-8 la femele (-7%, $p < 0,05$), CCT testați nu au influențat volumul mediu al eritrocitelor, MCV variind în limitele de (-1)-(-7)% atât la femele cât și la masculi. Minore au fost și influențele CCT benzotiazolice asupra indicilor ce relevă variațiile dimensiunilor eritrocitului – RDW și RDW-CV. La femele a fost concludent statistic diminuat RDW-CV de către MG-22 (-17%, $p < 0,001$), iar la masculi RDW a fost majorat de către CMD-8 (+4%, $p < 0,05$) și micșorat de MG-22 (-3%, $p < 0,05$) în tabelele 3 și 4.

Analiza impactului CCT benzotiazolice asupra indicilor leucocitari a relevat că numărul total de leucocite (WBC) nu a fost modificat de aceste substanțe cu excepția MG-22, care a micșorat numărul WBC la femele cu 22%, iar la masculi cu 16% ($p < 0,05$, în ambele cazuri).

Totuși, CCT benzotiazolice au manifestat un impact semnificativ asupra formulei leucocitare. La femele s-a atestat creșterea veridică a segmentatelor (CMA-18 - +117%, $p < 0,01$; CMD-8 - +18%, $p < 0,01$ și MG-22 - + 41%, $p < 0,01$), iar la masculi – diminuarea lor concludentă statistic (CMA-18 - (-54)%, $p < 0,01$; CMD-8 - (-12)%, $p < 0,001$ și MG-22 - (-30)%, $p < 0,001$). Concomitent nu s-a modificat numărul de nesegmentate, dar s-au observat modificări de sens opus al numărului segmentatelor, ale numărului de limfocite: diminuarea la femele (CMA-18 - (-39)%, $p < 0,05$; CMD-8 - (-8)%, $p < 0,05$ și MG-22 - (-11)%, $p > 0,05$) și creșterea la masculi (CMA-18 - +54%, $p < 0,01$; CMD-8 - +11%, $p < 0,001$ și MG-22 - + 33%, $p < 0,001$).

Monocitele la femele au fost sugestiv crescute doar de CMA-18 (+203%, $p < 0,05$) și CMD-8 (+296%, $p < 0,05$), spre deosebire de MG-22 (+34, $p > 0,05$), în celelalte loturi ale masculilor fiind atestată o tendință de micșorare a numărului lor (-18-36%, $p > 0,05$). Numărul de eozinofile a fost influențat la femele doar de CMD-8 (-23%, $p < 0,05$) și MG-22 (+31%, $p < 0,01$), pe când la masculi de toți 3 CCT benzotiazolice: CMA-18 (-23%, $p < 0,05$), CMD-8 (+33%, $p > 0,05$) și MG-22 (-23%, $p > 0,01$). Nu s-a modificat concludent statistic numărul de bazofile nici la femele, nici la masculi, dar s-a atestat o tendință neveridică de creștere a acestor celule la administrarea tuturor CTT studiați la femele și a CMA-18 la masculi.

Evaluarea numărului de trombocite a specificat modificări de același sens, dar de diferită amploare și veridicitate statistică. Numărul plachetelor a fost majorat de toți CCT cercetați. La femele compuşii CMA-18 și CMD-8 au majorat numărul trombocitelor statistic veridic ($p < 0,01$) cu respectiv 72% și 63%, iar MG-22 neveridic cu 16%. La masculi toate creșterile au fost statistic neconcludente cu cca 4-23%.

Tabelul 4. Dinamica indicilor sangvini la șobolani femele sub influența compușilor coordinativi ai cuprului cu tiosemicarbazone benzotiazolice (în doza de 0,01 mg/kg)

Indicii hemo-leucogramei	Martor mediana (IQR)	CMA-18 mediana (IQR)	CMD-8 mediana (IQR)	MG-22 mediana (IQR)
RBC *10 ¹² /L	7,80 ; IQR 1,60	6,98 ; IQR 0,48	7,26 ; IQR 0,60	8,05 ; IQR 0,85*
%	100 %	89%	93%	103%
HGB g/L	143,00; IQR 34,0	128,00 ; IQR 7,00	134,00 ; IQR 6,00	147,00;IQR 13,00**
%	100 %	89%	94%	103%
HCT %	42,40 ; IQR 20,0	42,70 ; IQR 2,95	44,10 ; IQR 2,20	48,10 ; IQR 5,1*
%	100 %	101%	104%	113%
MCV fL	64,40 ; IQR 4,70	60,90 ; IQR 4,15	60,25 ; IQR 4,65 *	60,30 ; IQR 4,23
%	100%	95%	93%	94%
MCH pg	18,20 ; IQR 1,25	18,10 ; IQR 1,70	18,60 ; IQR 0,65	18,60 ; IQR 1,70
%	100%	99%	102%	103%
MCHC	28,15 ; IQR 1,43	30,15 ; IQR 1,05 *	30,65; IQR 1,3 **	30,35 ; IQR 1,58 *
%	100%	107%	109%	108%
RDW fL	6,90 ; IQR 1,30	6,35 ; IQR 0,55	6,20 ; IQR 0,23	6,75 ; IQR 1,03
%	100%	92%	90%	98%
RDW-CV %	19,85 ; IQR 4,55	18,40 ; IQR 2,25	16,15 ; IQR 2,65	16,55;IQR1,35 ***
%	100%	93%	81%	83%
WBC *10 ⁹ /L	9,74 ; IQR 2,79	9,63 ; IQR 5,03	7,15 ; IQR 3,27	7,65 ; IQR 2,73 *
%	100%	99%	73%	78%
Segmentate %	17,80 ; IQR 9,8	38,65; IQR 24,25 **	21,00; IQR 5,3 **	25,10; IQR 9,63 *
%	100%	217%	118%	141%
Limfocite %	76,60 ; IQR 8,93	47,00 ; IQR 24,43 *	70,20 ; IQR 6,70 *	68,25 ; IQR 10,58
%	100%	61%	92%	89%
Monocite %	1,45 ; IQR 2,20	4,40 ; IQR 7,83 *	5,75 ; IQR 3,60 *	1,95 ; IQR 5,43
%	100%	303%	396%	134%
Eozinofile %	2,45 ; IQR 1,35	1,70 ; IQR 1,25	1,65 ; IQR 0,35 *	3,20; IQR 2,53 **
%	100%	69%	67%	131%
Bazofile %	0,20 ; IQR 0,03	0,25 ; IQR 0,30	0,25 ; IQR 0,35	0,30 ; IQR 0,40
%	100%	125%	125%	150%
Nesegmentate %	0,20 ; IQR 0,35	0,40 ; IQR 0,28	0,40 ; IQR 0,50	0,30 ;IQR 0,18
%	100%	200%	200%	150%
PLT *10 ⁹ /L	406,0 ;IQR 154,0	699,0 ;IQR149,0**	660,0;IQR171,5**	473,0 ; IQR 126,0***
%	100%	172%	163%	116%
MPV fL	7,15 ; IQR 0,63	6,60 ; IQR 0,53 *	6,50 ; IQR 0,30 *	7,00 ; IQR 0,70 *
%	100%	92%	91%	98%

Notă: Veridicitatea statistică față de lotul-martor după testul nonparametric Kruskal Wallis:

* – $p < 0, 05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$.

Majorarea numărului de trombocite la femele a fost asociată cu diminuarea statistic veridică a volumului mediu al trombocitului la administrarea tuturor CTT: CMA-18 cu -8%, CMD-8 cu -9% și

MG-22 cu -2% ($p > 0,05$, în toate cazurile). La masculi doar MG-22 a produs o diminuare veridică statistic de cca 2% ($p < 0,05$), pe când ceilalți CCT nu au avut influențe concludente.

În urma cercetărilor se poate concluziona că CCT benzotiazolice administrați șobolanilor sănătoși au indus modificări ale indicilor hemoleucogramei de diferită amploare și putere statistică, care au fost în funcție de acțiunea CCT individual și sexul animalului.

4.2. Efectele compușilor coordinativi ai cuprului cu feniltiosemicarbazone asupra indicilor hemoleucogramei șobolanilor *in vivo*

Rezultatele cercetărilor efectuate privind influența compușilor coordinativi ai cuprului cu feniltiosemicarbazone asupra indicilor sangvini la masculi și femele sunt expuse în datele statistice ale tabelelor 5 și 6.

Analiza rezultatelor modificărilor liniei eritrocitare a relevat că CCT fenil nu au modificat numărul de eritrocite și raportul plasmă/elemente figurate (HCT) atât la femele, cât și la masculi. Totuși, derivații fenil ai TSC au avut un impact statistic semnificativ, de amploare mică asupra celorlalți indici eritrocitari ai hemoleucogramei, modificările fiind mai importante la femele, comparativ cu masculii. Astfel, la administrarea tuturor CCT fenil la femele s-a atestat diminuarea statistic veridică a volumului mediu al eritrocitului – cu 6% ($p < 0,01$) de către CMC-34, cu 10% ($p < 0,05$) de CMJ-33 și cu 5% ($p < 0,05$) de către CMT-67, precum și a variației dimensiunilor eritrocitului cu 6% ($p < 0,01$) de către CMJ-33 și cu 10% ($p < 0,01$) de către CMT-67. Modificările dimensiunilor eritrocitelor au determinat schimbări ale cantității de hemoglobină per unitate de volum al celulei, care a crescut ca urmare a administrării tuturor CCT fenil la femele (CMC-34 - +10%, $p < 0,01$; CMJ-33 - +7% și CMT-67 - +6%, $p < 0,05$ în ambele cazuri).

La masculi s-au înregistrat modificări concludente ale 3 indicatori eritrocitari – HGB, MCHC și RDW. Compusul CMC-34 a modificat doar MCHC (-4%, $p < 0,05$), CMJ-33 (-2, $p < 0,05$) și CMT-67 (-3, $p < 0,01$). La masculi a fost diminuată HGB de CMJ-33 și CMT-67 cu, respectiv, -14% și -5% ($p < 0,05$ în ambele cazuri), MCHC cu -4% de către CMC-34, cu -2% de către CMJ-34 și cu -3% de către CMT-67 ($p < 0,05$ în toate cazurile), RDW a fost modulată cu 1-3% ($p < 0,05$) de CMJ-33 și CMT-67.

Ca și în cazul liniei eritrocitare, modificări multiple semnificative ale celei leucocitare au fost atestate la femele. CMJ-33 a produs creșterea statistic veridică a numărului de leucocite (+20%, $p < 0,05$) și segmentate (+56%, $p < 0,01$) concomitent cu diminuarea limfocitelor (-18%, $p < 0,05$) și a eozinofilelor (-4%, $p < 0,01$). CMT-67 a micșorat numărul total de leucocite (-23%, $p < 0,01$), de limfocite (-14%, $p < 0,05$) și de eozinofile (-8%, $p < 0,01$) și l-a majorat pe cel de segmentate (+45%,

p< 0,05). CMC-34 a indus o tendință de diminuare a numărului total de leucocite, dar a micșorat statistic veridic cu 10% (p< 0,05) numărul limfocitelor și l-a majorat pe cel al segmentatelor (+20%, p< 0,01) și al monocitelor (+245%, p< 0,05) (tabelul 6).

Tabelul 5. Impactul acțiunii compușilor coordinativi ai cuprului cu feniltiosemicarbazone asupra indicilor sangvini la șobolani masculi (în doza de 0,01 mg/kg)

Indicii hemo-leucogramei	Martor mediana (IQR)	CMC-34 mediana (IQR)	CMJ-33 mediana (IQR)	CMT-67 mediana (IQR)
RBC *10 ¹² /L	8,28 ; IQR 4,74	8,16 ; IQR 1,91	7,16 ; IQR 2,45	8,18 ; IQR 2,08
%	100 %	98%	86%	99%
HGB g/L	152,00; IQR12,00	152,00; IQR 33,00 *	131,00 ; IQR 28,50*	144,00 ; IQR 20,50*
%	100%	100%	86%	95%
HCT %	40,40 ;IQR 24,60	43,20 ; IQR 13,10	36,95 ; IQR 6,80	38,80 ; IQR 2,65
%	100%	107%	92%	96%
MCV fL	52,90 ; IQR 5,40	52,70 ; IQR 2,13	52,55 ; IQR 2,33	52,50 ; IQR 3,15
%	100%	99,6%	99%	99%
MCH pg	18,70 ;IQR 22,10	18,70 ; IQR 0,80	18,60 ; IQR 0,65	18,55 ; IQR 0,95
%	100%	100 %	99,5%	99,2%
MCHC	36,60 ; IQR38,40	35,20 ; IQR 0,93 *	35,90 ; IQR 1,08 *	35,40 ;IQR 0,82 **
%	100%	96%	98%	97%
RDW fL	5,90 ; IQR 0,10	5,95 ; IQR 0,55	6,10 ; IQR 0,25*	5,85 ; IQR 0,38 *
%	100%	101%	103%	99%
RDW-CV %	15,40 ; IQR 2,0	15,65 ; IQR 2,30	16,30 ; IQR 3,40	15,90 ; IQR 1,83
%	100%	102%	106%	103%
WBC *10 ⁹ /L	11,72 ; IQR 6,78	16,08 ; IQR 5,88	14,01 ; IQR 5,35	7,79 ; IQR 5,22
%	100 %	137%	119%	66%
Segmentate %	43,50 ; IQR 1,75	36,50; IQR 9,75 ***	36,50 ; IQR 5,75****	31,50; IQR 8,75 ***
%	100%	84%	84%	72%
Limfocite %	46,00 ; IQR 2,00	53,00 ; IQR 6,00***	55,50 ; IQR 7,00***	58,00; IQR14,50***
%	100%	115%	121%	126%
Monocite %	5,50 ; IQR 4,25	7,50 ; IQR 5,25	4,00 ; IQR 1,50	5,50 ; IQR 3,50
%	100%	136%	73%	100%
Eozinofile %	3,00 ; IQR 1,50	3,50 ; IQR1,25	3,50 ; IQR1,25 *	3,50 ; IQR 2,50 *
%	100%	117%	117%	117%
Bazofile %	1,00 ; IQR 0,25	1,00 ; IQR 0,25	1,00 ; IQR 0,25	1,50 ; IQR 1,25
%	100%	100%	100%	150%
Nesegmentate %	0,00 ; IQR 1,00	0,50 ; IQR 1,00	1,00 ; IQR 1,25	0,00 ; IQR 1,00
%	100%	0,0%	0,0%	0,0%
PLT *10 ⁹ /L	578,00;IQR 318,0	549,50 ; IQR 68,50	578,00 ; IQR 145,50	680,00 ; IQR 146,50
%	100%	95%	100%	118%
MPV fL	6,40 ; IQR 0,10	6,30 ; IQR 0,28	6,50 ; IQR 0,25	6,25 ; IQR 0,33
%	100%	98%	102%	98%

Notă: Veridicitatea statistică față de lotul-martor după testul nonparametric Kruskal Wallis:

* – p< 0,05; ** – p< 0,01; *** – p< 0,001.

Derivații fenil TSC administrați masculilor nu au indus modificări concludente numeroase ale formulei leucocitare. Numărul de leucocite manifestă doar tendințe de amplificare la administrarea CMC-34 și CMJ-33 și de micșorare la administrarea CMT-67. Schimbări statistic concludente, ce s-au manifestat prin micșorarea segmentatelor, s-au înregistrat la administrarea tuturor compușilor fenil (respectiv, -16%, -16% și -28%, $p < 0,001$ în toate cazurile) (tabelul 5).

Tabelul 6. Influența compușilor coordinativi ai cuprului cu feniltiosemicarbazone asupra indicilor sangvini la șobolani femele (în doza de 0,01 mg/kg)

Indicii hemo-leucogramei	Martor mediana (IQR)	CMC-34 mediana (IQR)	CMJ-33 mediana (IQR)	CMT-67 mediana (IQR)
RBC $\cdot 10^{12}/L$	7,80 ; IQR 1,60	7,60 ; IQR 0,69	6,95 ; IQR 0,73	7,25 ; IQR 0,56
%	100 %	97%	89%	93%
HGB g/L	143,0; IQR 34,0	136,00 ; IQR 16,00	123,00 ; IQR 13,50	130,00 ; IQR 16,50
%	100 %	95%	86%	91%
HCT %	42,40 ; IQR 20,0	44,30 ; IQR 4,65	40,10 ; IQR 2,60	43,90 ; IQR 4,80
%	100 %	104%	95%	103%
MCV fL	64,40 ; IQR 4,70	60,35 ; IQR 5,55 **	58,15 ; IQR 4,88 *	61,10 ; IQR 4,22 *
%	100%	94%	90%	95%
MCH pg	18,20 ; IQR 1,25	18,35 ; IQR 1,75	17,60 ; IQR 1,18	18,65 ; IQR 1,60
%	100%	101%	97%	103%
MCHC	28,15 ; IQR 1,43	31,00 ; IQR 1,00 **	30,25 ; IQR 1,38 *	29,85 ; IQR 0,78 *
%	100%	110%	107%	106%
RDW fL	6,90 ; IQR 1,30	6,25 ; IQR 0,85	6,10 ; IQR 1,05	6,65 ; IQR 0,63
%	100%	91%	88%	96%
RDW-CV%	19,85 ; IQR 4,55	17,30 ; IQR 1,23	18,75 ; IQR 2,60 **	17,80 ; IQR 1,85**
%	100%	87%	94%	90%
WBC $\cdot 10^9/L$	9,74 ; IQR 2,79	8,21; IQR 2,44	11,70 ; IQR 2,07*	6,55 ; IQR 4,69 **
%	100%	84%	120%	67%
Segmentate %	17,80 ; IQR 9,80	21,30; IQR 6,98**	27,80 ; IQR 12,23**	25,80 ; IQR 15,25*
%	100%	120%	156%	145%
Limfocite %	76,60 ; IQR 8,93	68,90 ; IQR 6,18 *	62,50 ; IQR 19,35 *	66,25 ; IQR 22,43 *
%	100%	90%	82%	86%
Monocite %	1,45 ; IQR 2,20	5,00 ; IQR 5,53 *	5,20 ; IQR 6,68	3,20 ; IQR 10,40
%	100%	345%	359%	221%
Eozinofile %	2,45 ; IQR 1,35	3,20 ; IQR 1,85	2,35 ; IQR 1,38 **	2,25 ; IQR 1,70 **
%	100%	131%	96%	92%
Bazofile %	0,20 ; IQR 0,03	0,25 ; IQR 0,15	0,25 ; IQR 0,23	0,15 ; IQR 0,30
%	100%	125%	125%	75%
Nesegmentate %	0,20 ; IQR 0,35	0,25 ; IQR 0,50	0,25 ; IQR 0,93	0,25 ; IQR 0,40
%	100%	125%	125%	125%
PLT $\cdot 10^9/L$	406,0;IQR154,0	685,0;IQR 159,0 **	546,0; IQR 214,50**	461,00; IQR 82,0***
%	100%	169%	134%	113%
MPV fL	7,15 ; IQR 0,63	6,60 ; IQR 0,77	6,55 ; IQR 0,48 *	7,05 ; IQR 0,55 *
%	100%	92%	92%	99%

Notă: Veridicitatea statistică, comparativ cu lotul martor, conform testului nonparametric Kruskal Wallis: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$.

De asemenea, s-a stabilit creșterea veridică a limfocitelor cu, respectiv, +15%; +21% și +26% ($p < 0,001$ în toate cazurile), comparativ cu valorile lotului martor, și a eozinofilelor la administrarea CMJ-33 și a CMT-67 (în ambele cazuri +17%, $p < 0,05$) (tabelul 5).

Indicii trombocitari nu au fost influențați de compușii coordinativi ai cuprului cu feniltiosemicarbazone la masculi, pe când la femele a crescut veridic atât numărul de plachete (CMC-34 cu 69%, $p < 0,01$; CMJ-33 cu 34%, $p < 0,01$; CMT-67 cu 13%, $p < 0,001$) concomitent cu diminuarea volumului mediu al trombocitului (CMJ-33 cu -8%, $p < 0,05$ și CMT-67 cu -1%, $p < 0,05$) (tabelul 6).

Putem concluziona, că acțiunea compușilor coordinativi ai cuprului cu feniltiosemicarbazone este selectivă.

4.3. Influența compușilor coordinativi ai cuprului cu aliltiosemicarbazone asupra indicilor hemoleucogramei șobolanilor *in vivo*

Compușii coordinativi ai cuprului cu aliltiosemicarbazone au manifestat un impact important asupra indicilor hemoleucogramei la șobolanii sănătoși de ambele sexe, fiind influențați atât markerii eritrocitari, cât și cei leucocitari și plachetari (tabelul 7 și tabelul 8).

La femele, ca urmare a administrării CMG-41, s-a atestat diminuarea dimensiunilor eritrocitelor (MCV cu -8%, $p < 0,05$ și RDW-CV cu -1%, $p < 0,01$) asociată cu creșterea cantității medii de hemoglobină per eritrocit cu 7% ($p < 0,01$). S-a modificat statistic veridic numărul de leucocite, dar s-a modificat și cantitatea diferitor forme. Astfel, a crescut numărul de segmentate (+47%, $p < 0,01$), de eozinofile (+68%, $p < 0,01$), de monocite (+48%, $p < 0,05$) și s-a micșorat cel al limfocitelor (-11%, $p < 0,05$). Numărul de trombocite a fost semnificativ crescut (+43%, $p < 0,01$), dar volumul mediu al celulelor plachetare s-a micșorat (-6%, $p < 0,05$) (tabelul 8).

Administrarea compusului TIA-123 femelelor a produs schimbări practic ale tuturor indicilor eritrocitari. A crescut atât numărul de eritrocite (+6%, $p < 0,01$), cât și hematocritul (+13%, $p < 0,01$), cantitatea totală de hemoglobină (+3%, $p < 0,01$) și distribuția hemoglobinei per unitate de volum celular (+7%, $p < 0,05$). De asemenea, s-au mărit indicii leucocitari. S-a atestat o creștere veridică statistic a numărului total de leucocite cu 8% ($p < 0,05$) și a numărului de eozinofile cu 53% ($p < 0,01$). Impactul asupra indicilor trombocitari a fost similar cu cel al CMG-41: s-a majorat numărul total de plachete cu 14% ($p < 0,001$) și a scăzut volumul lor mediu cu 3% ($p < 0,05$) (tabelul 8).

**Tabelul 7. Acțiunea compuşilor coordinativi ai cuprului cu alitiosemicarbazone
asupra parametrilor sangvini la șobolani masculi (în doza de 0,01 mg/kg)**

Indicii hemoleucogramei	Martor mediana (IQR)	CMG-41 mediana (IQR)	TIA-123 mediana (IQR)	TIA-160 mediana (IQR)
RBC *10 ¹² /L	8,28 ; IQR 4,74	7,87 ; IQR 2,81	8,16 ; IQR 0,96	7,38 ; IQR 3,03
%	100 %	95%	92%	89%
HGB g/L	152,00; IQR12,00	143,00 ; IQR 10,00	150,00;IQR 17,00*	151,00; IQR 21,50*
%	100%	94%	98%	99%
HCT %	40,40 ; IQR 24,60	40,20 ; IQR 3,55	41,40 ; IQR 5,00	41,50 ; IQR 7,20
%	100%	99,5%	102%	103%
MCV fL	52,90 ; IQR 5,40	51,40 ; IQR 3,70	49,85 ; IQR 3,23	56,10 ; IQR 12,15
%	100%	97%	94%	106%
MCH pg	18,70 ; IQR 22,10	18,55 ; IQR 1,83	18,15 ; IQR 1,13	18,85 ; IQR 3,03
%	100%	99,2%	91%	101%
MCHC	36,60 ; IQR 38,40	35,60 ; IQR 0,42 **	36,05; IQR 1,05 **	34,95; IQR 2,00 **
%	100%	97%	95%	95%
RDW fL	5,90 ; IQR 0,10	6,20 ; IQR 0,53 *	5,95 ; IQR 0,30*	6,20 ; IQR 1,00 *
%	100%	105%	101%	105%
RDW-CV%	15,40 ; IQR 2,0	16,10 ; IQR 1,65	15,95 ; IQR 1,78	15,80 ; IQR 3,23
%	100%	104%	104%	103%
WBC *10 ⁹ /L	11,72 ; IQR 6,78	15,18 ; IQR 8,55	17,75 ; IQR 4,61 **	13,62;IQR 5,06 **
%	100 %	129%	151%	116%
Segmentate %	43,50 ; IQR 1,75	29,00; IQR 5,25 **	31,50;IQR 5,25***	36,00;IQR 2,00***
%	100%	67%	72%	83%
Limfocite %	46,00 ; IQR 2,00	59,0 ; IQR 11,25**	55,00;IQR 3,50***	54,50;IQR 2,50***
%	100%	128%	120%	118%
Monocite %	5,50 ; IQR 4,25	7,00 ; IQR 4,00	7,50 ; IQR 3,75 *	5,50 ; IQR 2,25 *
%	100%	127%	136%	100%
Eozinofile %	3,00 ; IQR 1,50	4,50 ; IQR 1,50 *	3,50 ; IQR 2,25 **	3,00 ; IQR 2,00
%	100%	150%	117%	100%
Bazofile %	1,00 ; IQR 0,25	1,00 ; IQR 0,50	1,00 ; IQR 0,25	1,00 ; IQR 0,25
%	100%	100%	100%	100%
Nesegmentate %	0,00 ; IQR 1,00	0,00 ; IQR 0,25	1,00 ; IQR 1,00	0,00 ; IQR 1,25
%	100%	0,00%	0,00%	0,00%
PLT *10 ⁹ /L	578,00;IQR 318,0	612,00; IQR 293,75	628,00; IQR 130,50	735,00;IQR 230,5*
%	100%	106%	109%	127%
MPV fL	6,40 ; IQR 0,10	6,50 ; IQR 0,48	6,15 ; IQR 0,35 *	6,45 ; IQR 0,88
%	100%	102%	96%	101%

Notă: Veridicitatea statistică, comparativ cu lotul martor, conform testului nonparametric Kruskal Wallis: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$.

Compusul TIA-160 a manifestat o acțiune similară celei determinate de TIA-123 la femele. S-au modificat indicatorii tuturor liniilor celulare sangvine – eritrocitare, leucocitare și trombocitare, dar cu diferită amploare și semnificație. S-au majorat veridic numărul de eritrocite (+3%, $p < 0,01$), hematocritul (+16%, $p < 0,001$) și cantitatea totală de hemoglobină (+2%, $p < 0,001$), iar RDW-CV

s-a micșorat cu 12% ($p < 0,001$). La fel, s-a majorat numărul total de leucocite (+2%, $p < 0,05$) și segmentate (+41%, $p < 0,05$), iar cel al eozinofilelor s-a micșorat cu 4% ($p < 0,01$). Efectele asupra indicilor trombocitari a fost similar cu cel al celorlalți compuși alitiosemicarbazone: s-a majorat numărul total de plachete cu 21% ($p < 0,001$) și a scăzut volumul lor mediu cu 3% ($p < 0,01$) (tabelul 8).

În urma analizei datelor cercetării am stabilit că la masculi, similar cu femelele, administrarea compușilor coordinativi ai cuprului cu alitiosemicarbazone produce modificări numeroase și importante ale indicilor hemoleucogramei. CMG-41 a produs un număr limitat de modificări, pe când compușii TIA-123 și TIA-160 au semnalat multiple schimbări.

La administrarea CMG-41 masculilor s-a înregistrat doar creșterea RDW cu 5% ($p < 0,05$) asociată cu diminuarea MCHC cu 3% ($p < 0,01$), precum și micșorarea numărului de segmentate cu 33% ($p < 0,001$) cu creșterea concomitentă a limfocitelor cu 28% ($p < 0,01$). Restul indicilor au variat ne semnificativ, atestându-se valori apropiate celor specifice animalelor din lotul martor.

Compușii TIA-123 și TIA-160 nu au modificat numărul eritrocitelor și hematocritul, dar au determinat diminuarea semnificativă statistic a conținutului total de hemoglobină (-1-2%, $p < 0,05$) și distribuția hemoglobinei per unitate de volum celular cu -5% în ambele cazuri ($p < 0,01$), posibil datorită schimbărilor survenite în dimensiunile eritrocitelor – RDW a crescut cu 1-5% ($p < 0,05$).

Ambii compuși biologici TIA au produs schimbări majore în seria leucocitară a celulelor sangvine. A crescut semnificativ numărul de leucocite cu 51% ($p < 0,01$) la administrarea TIA-123 și cu 16% ($p < 0,01$) la administrarea TIA-160, fenomen posibil determinat de majorarea numărului de limfocite cu 20% și, respectiv, 18% ($p < 0,001$, în ambele cazuri), iar la administrarea compusului TIA-123 și a numărului de monocite cu (+36%, $p < 0,05$) și de eozinofile cu (+17%, $p < 0,01$). Ambii compuși biologici au micșorat semnificativ statistic numărul de segmentate – TIA-123 cu 28% și TIA-160 cu 17% ($p < 0,001$ în ambele cazuri) (tabelul 7).

Compușii coordinativi ai cuprului cu alitiosemicarbazone TIA-123 și TIA-160 nu au modificat statistic concludent numărul de trombocite, dar au indus tendințe de majorare, cu excepția TIA-160 care a produs creșterea plachetelor cu 27% ($p < 0,05$). În același timp, volumul mediu plachetar a fost diminuat statistic veridic de TIA-123 cu 4% ($p < 0,05$).

Astfel, putem concluziona că compușii coordinativi ai cuprului cu alitiosemicarbazone testați pe șobolani masculi: CMG-41, TIA-123 și TIA-160 induc numeroase efecte asupra indicilor hemoleucogramei, ele fiind diferite ca direcție, amploare și semnificație în funcție de compusul individual.

4.4. Analiza comparativă a influenței compușilor coordinativi ai cuprului cu tiosemicarbazone asupra indicilor hemoleucogramei șobolanilor *in vivo*

Hemoleucograma, sau analiza generală a sângelui, este un test de laborator care evaluează componentele celulare ale sângelui și anumite proprietăți ale acestor celule, permițând de a obține informații despre sănătatea generală a unui individ. Modificările hemoleucogramei pot semnala diferite maladii sau stări patologice, precum prezența anemiei și uneori geneza și/sau severitatea ei, a procesului inflamator sau a unei infecții, a dereglărilor de coagulare, a reacțiilor alergice etc.

Hemoleucograma este o investigație de rutină utilizată în diagnosticul și monitorizarea a numeroase maladii precum diverse tipuri de anemii [222-224], boli sistemice [225-227], tromboze de diferită genă [228-229], astm [230], boli transmisibile [231-233] etc.

Literatura științifică de specialitate nu prezintă rezultate exhaustive ale impactului compușilor coordinativi ai metalelor asupra indicilor hemoleucogramei. Pati M. L. și coaut. (2018) [234], în cadrul cercetărilor unor tiosemicarbazone multifuncționale și analogilor deconstruiți, au stabilit, că tiosemicarbazonele nu induc modificări în componența celulară a sângelui după administrarea șoarecilor C57BL/6 purtători de tumoră KP02.

Poate fi remarcat studiul lui Fayed E. A. și coaut. (2021) [235], care au cercetat efectele mai multor derivați de tiazlidin/tiosemicarbazid-indolin-2-onă *in vivo* pe șobolani, accentul fiind pus pe modificările hematologice, biochimice precum și pe structura histologică a ficatului și rinichilor etc. S-au identificat modificări minore ale numărului de eritrocite, leucocite și trombocite, ale cantității de hemoglobină și creatinină și ale activității ASAT și ALAT. Un alt studiu, realizat de Farias R. L. și coaut. (2021) [236], a inclus în protocol cercetarea acțiunii hemolitice a 2 complexe-Ni(II) cu formulele generale $[\text{Ni}(\text{L}1)_2]$ (Ni1) și $[\text{Ni}(\text{L}2)_2]$ (Ni2), unde L1 = trans-cinamaldehydă-N (4)-metil tiosemicarbazonă și L2 = trans-cinamaldehydă-N (4)-etil tiosemicarbazonă. Studiul a evidențiat că acești compuși tiosemicarbazonici au un efect hemolitic redus de 0-9% la concentrații de 1-10 μM .

Totuși, mai mulți autori au remarcat capacitatea CCT de a pătrunde în eritrocite și de a modifica compoziția chimică a celulei și/sau funcționalitatea compușilor intracelulari. Unele grupuri de cercetători au relatat acțiunea methemoglobin formatoare a tiosemicarbazonelor atât în studii *in vitro*, cât și *in vivo*, inclusiv la pacienții din cadrul trialurilor clinice. Ma B. și colegii (2008) [237] au raportat, că administrarea Triapinei (3-AP) pacienților care au participat la un trial de fază II a determinat creșterea moderată a nivelului de methemoglobină, între 7,8-17,6% din conținutul total de hemoglobină, și dezvoltarea hipoxiei. Rezultate similare au fost constatate la 11 din cei 15 pacienți cu

leucemie mieloidă refractară, care au fost înrolați în trialul clinic și li s-au testat 3 doze de Triapină (3-AP). Methemoglobinemia tranzitorie a fost indusă de doza de 75 mg/m² de Triapină (3-AP) [238].

Tabelul 8. Dinamica parametrilor sangvini la șobolani femele sub influența compușilor coordinativi ai cuprului cu alitiosemicarbazone (în doza de 0,01 mg/kg)

Indicii hemo-leucogramei	Martor mediana (IQR)	CMG-41 mediana (IQR)	TIA-123 mediana (IQR)	TIA-160 mediana (IQR)
RBC *10 ¹² /L	7,80 ; IQR 1,60	7,30 ; IQR 0,95	8,30 ; IQR 0,95 **	8,05 ; IQR 1,25 **
%	100 %	94%	106%	103%
HGB g/L	143,00; IQR4,00	130,00 ; IQR 12,00	148,00 ; IQR 20,50**	146,00; IQR 16,50***
%	100 %	91%	103%	102%
HCT %	42,40 ; IQR 20,0	42,60 ; IQR 3,00	48,00 ; IQR 8,10 **	49,30 ; IQR 4,40 ****
%	100 %	101%	113%	116%
MCV fL	64,40 ; IQR 4,70	59,35 ; IQR 6,38 *	59,10 ; IQR 3,80 *	60,75 ; IQR 3,90
%	100%	92%	92%	94%
MCH pg	18,20 ; IQR 1,25	18,00 ; IQR 1,00	17,65 ; IQR 0,55	18,30 ; IQR 0,60
%	100%	99%	97%	101%
MCHC	28,15 ; IQR 1,43	30,10 ; IQR 1,45 **	30,0 ; IQR 1,10 *	29,95 ; IQR 1,50
%	100%	107%	107%	106%
RDW fl	6,90 ; IQR 1,30	6,60 ; IQR 1,18	6,55 ; IQR 0,42	6,50 ; IQR 0,78
%	100%	96%	95%	94%
RDW-CV %	19,85 ; IQR 4,55	19,75 ; IQR 1,70 **	18,40 ; IQR 2,48	17,50 ; IQR 1,03****
%	100%	99%	93%	88%
WBC *10 ⁹ /L	9,74 ; IQR 2,79	9,61 ; IQR 2,48	10,56 ; IQR 3,74 *	9,92 ; IQR 2,38 *
%	100%	99%	108%	102%
Segmentate %	17,80 ; IQR 9,80	26,10 ; IQR 8,23 **	22,95 ; IQR 5,03 *	25,10 ; IQR 10,23 *
%	100%	147%	129%	141%
Limfocite %	76,60 ; IQR 8,93	67,95 ; IQR 9,50 *	72,60 ; IQR 7,95	66,75 ; IQR 10,95
%	100%	89%	95%	87%
Monocite %	1,45 ; IQR 2,20	2,15; IQR 3,85 *	1,05; IQR 3,53	5,1 ; IQR 1,85
%	100%	148%	72%	352%
Eozinofile %	2,45 ; IQR 1,35	3,35 ; IQR 4,58 **	3,75 ; IQR 3,33 **	2,35 ; IQR 1,35 **
%	100%	168%	153%	96%
Bazofile %	0,20 ; IQR 0,03	0,20 ; IQR 0,43	0,20 ; IQR 0,10	0,20 ; IQR 0,08
%	100%	100%	100%	100%
Nesegmentate%	0,20 ; IQR 0,35	0,25 ; IQR 0,43	0,20 ; IQR 0,48	0,25 ; IQR 0,35
%	100%	125%	100%	125%
PLT *10 ⁹ /L	406,00;IQR154,0	582,0;IQR 160,5**	462,0;IQR 104,0 ***	490,00;IQR145,50****
%	100%	143%	114%	121%
MPV fL	7,15 ; IQR 0,63	6,75 ; IQR 0,65 *	6,95 ; IQR 0,38 *	6,95 ; IQR 0,68 **
%	100%	94%	97%	97%

Notă: Veridicitatea statistică, față de lotul martor, conform testului nonparametric Kruskal Wallis:

* – p< 0,05; ** – p< 0,01; *** – p< 0,001.

Studiul *in vitro* efectuat de Bash M.T. și coaut. (2015) [239] a stabilit mecanismul molecular al oxidării hemoglobinei de către tiosemicarbazone. Cercetarea prin spectroscopie de absorbție UV-vizibilă rezolvată în timp a identificat implicarea grupării terminale amino a tiosemicarbazonei în oxidarea oxihemoglobinei cu formarea methemoglobinei. Un impact asupra menținerii stării funcționale a hemoglobinei sub acțiunea tiosemicarbazonei poate avea modificarea activității unor enzime eritrocitare, precum glucozo-6-fosfat dehidrogenaza și glutatión peroxidaza, efecte raportate, respectiv, de Temel Y. și coaut. (2019), și Karatepe M. și colab. (2006) [240-241]. Echipa Temel Y. a stabilit, că efectul inhibitor al derivaților de aza-ilidă pe bază de tiosemicarbazonă 3a-3e se manifestă la concentrația de la 40,77 μ M până la 58,0 μ M.

Rezultatele unui studiu al efectelor antiinflamatoare ale tiosemicarbazonei, realizat de Jacob Í.T.T. și colab. (2021), au relevat că unii compuși, codificați ca LT76, LT81 și LT87, au demonstrat o capacitate de inhibare a proliferării limfocitelor mai eficientă decât indometacina, cu o CC50 (concentrația medie de citotoxicitate) de $0,56 \pm 0,036$, $0,9 \pm 0,01$ și, respectiv, $0,5 \pm 0,07$ μ M.

Efecte suplimentare asupra compoziției sangvine poate exercita și cuprul prezent în compuși coordinativi, inclusiv cei studiați de noi, dat fiind importanța fiziologică a cuprului și implicarea lui în mecanismele patobiochimice ale diverselor maladii relatate detaliat în capitolul 1 (pag. 16-18).

Studiul acțiunii compușilor coordinativi ai cuprului cu tiosemicarbazone asupra indicilor hemoleucogramei șobolanilor sănătoși efectuat în cadrul cercetării actuale a relevat efecte minore, care au fost dependente de tipul compusului tiosemicarbazonic – benzotiazolic, fenil sau alil, și de sexul animalului de laborator.

Markerii seriei eritrocitare

Conform dicționarului Merriam-Webster hematocritul reprezintă raportul dintre volumul globulelor roșii din sânge și volumul total de sânge determinat prin separarea globulelor roșii din plasmă, de obicei prin centrifugare [<https://www.merriam-webster.com/dictionary/hematocrit>]. Micșorarea hematocritului este asociată cu micșorarea numărului de eritrocite normale sau creșterea pe o perioadă mai îndelungată a numărului de leucocite, iar creșterea se atestă în deshidratări, *policitemia vera*, maladii pulmonare sau cardiace [242].

Cercetarea noastră a relevat că CCT luați în studiu nu exercită efecte semnificative statistic asupra hematocritului, modificările fiind în limitele de (-14%) – (+13%), cu excepția compușilor alitiosemicarbazonici TIA-123 și TIA-160, care au indus creșterea HCT cu 13% ($p < 0,01$) și, respectiv, 16% ($p < 0,001$) la femele. Efecte similare au fost constatate la analiza acțiunii CCT asupra numărului de eritrocite în sângele periferic al șobolanilor sănătoși de ambele sexe, fiind identificate

variații între (-1) – (-8)%. Doar compușii TIA – compuși coordinativi ai cuprului cu aliltiosemicarbazone, au indus creșterea statistic semnificativă a numărului de eritrocite (+3% +6%, $p < 0,01$) la femele.

Capacitatea de transport al oxigenului de la pulmoni la țesuturile extrapulmonare depinde de mai mulți factori, dintre care pot fi evidențiați în contextul cercetării actuale conținutul total de hemoglobină, MCHC, MCV și RDW-CV. Unii autori consideră volumul eritrocitelor circulante drept un indicator mai precis al capacității totale de livrare a oxigenului în corp decât HCT sau concentrația de HGB din sângele total [243].

Conținutul total de hemoglobină a fost majorat veridic doar de MG-22 și ambii compuși TIA la femele (cca + 3%) și diminuat concludent de CMA-18 și MG-22 la masculi (cca -8% -9%), pe când în restul loturilor de studiu nu s-au înregistrat schimbări statistic semnificative ale indicelui. Impactul CCT asupra conținutului mediu de hemoglobină per eritrocit (MCHC) a fost variabil și s-a constatat atât majorarea sau scăderea indicelui, cât și lipsa acțiunii. S-a atestat majorarea statistic semnificativă a MCHC în toate loturile de studiu ce au inclus femele, cu excepția TIA-160 – modificarea fiind neconcludentă. La masculi a prevalat diminuarea statistic semnificativă a MCHC cu excepția a 2 loturi: CMA-18 nu a produs schimbări veridice, iar CMD-8 a menținut markerul statistic veridic la limita valorilor lotului martor. În pofida faptului că majoritatea modificărilor au fost statistic concludente, amplasarea lor a fost discretă, în limitele a câteva procente, comparativ cu valorile identificate la animalele din lotul martor.

Sinteza de hemoglobină este un proces reglat foarte fin din 2 puncte de vedere. În primul rând, are loc corelarea exactă a numărului de globine alfa și beta produse (a câte două) cu numărul de hemuri sintetizate (nr. 4) pentru a garanta formarea unei molecule structural corecte. În al doilea rând, procesul va asigura o cantitate optimă de hemoglobină în eritrocit, ce corespunde unei concentrații de aproximativ 33%. La acest nivel HGB este solubilă în mediul celular și posedă funcționalitate optimă.

Creșterea fiziologică a MCHC poate fi determinată de schimbări ale formei eritrocitului, în special la apariția sferocitelor ce, ca regulă, se atestă la acumularea HGB până la cca 42% (limita fiziologică de concentrare a HGB în eritrocit) [242]. În studiul nostru, nivelul de HGB și MCHC nu a atins valori critice pentru funcționarea corespunzătoare a celulei și transportul oxigenului, din perspectivă cantitativă.

Volumul eritocitar mediu (MCV) relevă dimensiunea și volumul mediu al eritrocitelor și este util în evaluarea anemiilor împreună cu evaluarea nivelului de hemoglobină și valorii hematocritului.

În general, este un indice de diferențiere între diferite tipuri de anemii: micro-, normo- și macrocitare, cele microcitare fiind determinate, de regulă, de sinteza defectuoasă a HGB, iar cele macrocitare de anomalii ale eritropoiezei în cazul asocierii cu niveluri scăzute [244]. Cercetările noastre au stabilit modificări minore, dar statistic veridice ale volumului mediu al eritrocitului (MCV) la femele, pe când la masculi markerul a oscilat la valori apropiate de valorile medii specifice masculilor din lotul martor (variații de maxim $\pm 6\%$). CCT benzotiazolică CMD-8, toți compușii fenil și 2 compuși alil (CMG-41 și TIA-123) au micșorat statistic semnificativ MCV la femelele sănătoase cu 2-10%, comparativ cu valorile martor.

Lățimea distribuției globulelor roșii (RDW) reflectă distribuția dimensiunii eritrocitelor și este un indice fiabil al anizocitozei. RDW este utilizat pe larg pentru diagnosticul diferențial al anemiilor micro- și normocitare, precum anemiile fierodeficitare și cele determinate de hipovitaminoza B12 și/sau acidul folic, hemolitice, talasemii și sferocitoza ereditară etc. [245]. Rezultatele cercetărilor noastre au constatat doar o singură modificare statistic veridică la femele, care a survenit ca urmare a administrării MG-22 (-17% , $p < 0,001$), pe când la masculi modificări concludente au fost induse de 2 compuși benzotiazolici ai CCT (CMD-8 și MG-22) și de toți compușii alil.

Analizând comparativ la femele și masculi modificările identificate ale markerilor seriei eritrocitare, putem conchide că femelele sănătoase sunt mai sensibile la acțiunea CCT testați față de masculi. La masculi numărul modificărilor a fost discret, fiind stabilit impactul CMA-18 și MG-22 asupra conținutului total de hemoglobină, a CMD-8, MG-22, CMC-34, CMJ-33, CMT-67, CMG-41, TIA-123 și TIA-160 asupra MCHC și a CMD-8, MG-22, CMG-41, TIA-123 și TIA-160 asupra RDW. În loturile de femele au fost identificate devieri semnificative ale:

- HCT produse de TIA-123, TIA-160,
- numărului de eritrocite – TIA-123, TIA-160,
- cantității totale de HGB – TIA-123, TIA-160, MG-22,
- MCHC – CMA-18, CMD-8, MG-22, CMC-34, CMJ-33, CMT-67, CMG-41, TIA-123,
- MCV – CMD-8, CMC-34, CMJ-33, CMT-67, CMG-41, TIA-123,
- RDW – MG-22, CMG-41.

Ca urmare a analizei comparative a impactului CCT în funcție de natura chimică, putem concluziona că aliltiosemicarbazonele produc cele mai multe modificări statistic semnificative ale markerilor eritrocitari, în special TIA-123. Aliltiosemicarbazonele sunt urmate de tiosemicarbazonele benzotiazolice, cu efecte deosebit de evidente ale MG-22. Cele mai neînsemnate modificări au fost produse de feniltiosemicarbazone, fără deosebiri între compușii individuali.

Markerii seriei leucocitare

Analiza rezultatelor obținute a relevat că atât la femele, cât și la masculi compusul MG-22 (CCT benztiazolic) a diminuat numărul de leucocite, pe când cei TIA-123 și TIA-160 (aliltiosemicarbazone) au majorat numărul lor. Compușii feniltiosemicarbazonici au indus modificări doar la femele, care au fost de sens opus – CMJ-33 a produs leucocitoză, CMT-67 – leucopenie, iar CMC-34 nu a influențat în nici un fel WBC.

Neutrofilele reprezintă între 50% și 70% din leucocitele circulante și reprezintă linia inițială de apărare a organismului, fiind complet implicate în răspunsul inflamator acut la infecția bacteriană și în îndepărtarea bacteriilor prin fagocitoză. De asemenea, ele ajung prin diapedeză la locul leziunii sau infecției unde participă la recunoașterea, fagocitoza și degradarea bacteriilor, a diferitor agenți infecțioși, celule moarte etc. [246].

Modificări statistic semnificative, de amploare majoră a numărului de neutrofile segmentate au produs toți CCT cercetați. La femele toți CCT cu excepția TIA-123, au majorat numărul neutrofilelor segmentate cu cca 18-117%, iar la masculi absolut toți CCT au produs diminuarea markerului de la 12% până la 54%. În același timp, numărul neutrofilelor nesegmentate nu s-a modificat statistic semnificativ, dar a fost indusă o tendință generală de majorare a indicelui de toți CCT, indiferent de natura lor chimică.

Numărul eozinofilelor a fost potent, statistic veridic majorat la masculi de majoritatea CCT (cu excepția CMA-18 și MG-22 s-au micșorat), pe când la femele modificările au fost induse de 4 din cei 9 CCT cercetați – CMA-18, CMD-8, CMJ-33, CMT-67 a diminuat markerul, iar CMC-34, MG-22, CMG-41, TIA-123 și TIA-160 – l-au majorat. Limitele variațiilor au fost între 4 și 50%, comparativ cu valorile stabilite la animalele martor de sexul respectiv.

Eozinofilele sunt implicate în mecanismele inflamației cronice, reacțiile alergice și protecția gazdei de infecțiile parazitare. De asemenea, modulează efectele potențial dăunătoare ale mediatorilor vasoactivi inflamatori prin reducerea nivelului de leucotriene și histamină datorită activării enzimelor ce le activează – arilsulfataza și histaminaza, precum și prin eliminarea complexelor antigen-anticorp prin fagocitoza lor [247].

Efect concludent asupra numărului de bazofile au exercitat doar la femele CCT CMT-67, care au micșorat markerul cu 25%, pe când CMA-18, CMD-8, CMC-34, CMJ-33 și MG-22 l-a majorat cu 25% - 50%. Totodată, CMG-41, TIA-123 și TIA-160 au menținut numărul de bazofile la nivelul valorilor lotului-martor. Bazofilele nu manifestă capacități de fagocitare, dar au funcții similare cu celulele mastocite și le completează activitatea, deci sunt implicate în reacțiile de inflamație și în cele

alergice. Medierea alergiilor este corelată cu atașarea IgE de receptorii de suprafață ai bazofilelor și degranularea celulelor cu eliberarea de mediatori specifici (histamina, factorul chemotactic al eozinofilelor, factorul de activare a trombocitelor și fosfolipaza A2 [248].

Numărul de limfocite a demonstrat schimbări opuse ca sens celor ale numărului de neutrofile segmentate. Astfel, la femele 2 compuși benzotiazolici (CMA-18 și CMD-8), toți compușii feniltiosemicarbazonici și CMG-41 (aliltiosemicarbazonă) au diminuat numărul de limfocite cu 8%-39%, comparativ cu valorile identificate la animalele sănătoase de același sex. La masculi toți CCT au produs creșterea sugestiv statistică a numărului de limfocite cu cca 11%-54%. Limfocitele sunt parte majoră a mecanismelor adaptive de protecție imună, reprezentând componenta sangvină, circulatorie. Limfocitele în calitate de celule imunocompetente au capacitatea de a recunoaște și de a reacționa la antigeni și de a iniția și susține mecanismele imune de eliminare [249].

Monocitele au fost influențate semnificativ statistic de TIA-123 la masculi (+36%) și de 8 CCT la femele, care produc majorarea indicelui (CMA-18, CMD-8, MG-22, CMC-34, CMJ-33, CMT-67, CMG-41 și TIA-160), iar TIA-123 – îl micșorează. Monocitele contribuie major la procesele de eliminare a bacteriilor, celulelor moarte/deteriorate prin mecanismul de fagocitare odată ajunse în țesutul afectat, unde are loc transformarea lor în macrofage/osteoclaste/celule Kupffer (de ex. în pulmoni, țesutul conjunctiv și osos etc.) [250].

Analiza comparativă a acțiunii compușilor coordinativi ai cuprului cu tiosemicarbazone la femelele și masculii sănătoși a relevat dependența de sexul animalelor, atestându-se efecte numeroase la femele și un număr redus la masculi. Astfel, markerii leucogramei au fost influențați la femele de:

- nr. de leucocite – MG-22, CMT-67, CMJ-33, TIA-123, TIA-160;
- nr. de neutrofile segmentate – CMA-18, CMD-8, MG-22, CMC-34, CMJ-33, CMT-67, CMG-41, TIA-123, TIA-160;
- nr. de limfocite – CMA-18, CMD-8, CMC-34, CMJ-33, CMT-67, CMG-41;
- nr. de monocite – CMA-18, CMD-8, CMC-34, CMG-41;
- nr. de eozinofile – CMD-8, CMJ-33, CMT-67, MG-22, CMG-41, TIA-123, TIA-160.

La masculi s-a înregistrat impactul CCT asupra următorilor markeri ai leucogramei:

- nr. de leucocite – MG-22, TIA-123, TIA-160;
- nr. de neutrofile segmentate – CMA-18, CMD-8, MG-22, CMC-34, CMJ-33, CMT-67, CMG-41, TIA-123, TIA-160;
- nr. de limfocite – CMA-18, CMD-8, MG-22, CMC-34, CMJ-33, CMT-67, CMG-41, TIA-123, TIA-160;

–nr. de monocite – TIA-123;

–nr. de eozinofile – CMA-18, CMD-8, MG-22, CMJ-33, CMT-67, CMG-41, TIA-123.

Efectuând analiza comparativă a impactului CCT în funcție de natura chimică asupra indicilor leucogramei, putem concluziona că nu s-au identificat diferențe importante în numărul de efecte produse de compușii unui anumit tip de CCT.

Trombocitele reprezintă celule sangvine cu structură particulară și responsabile de o multitudine de funcții, în primul rând, fiind implicate în procesele de fibroză și menținere a hemostazei normale. Studiul MPV (volumul mediu al trombocitului) poate oferi informații importante despre evoluția și prognosticul multor afecțiuni inflamatorii. MPV ar trebui întotdeauna evaluat împreună cu numărul de trombocite, deoarece există o relație inversă neliniară între PLT și MPV [251].

Studiul nostru a identificat modificări evidente, statistic veridice, de sens opus al celor 2 indici la femele și un număr discret de schimbări la masculi la administrarea CCT, ce denotă sensibilitatea mare a femelelor la aceste substanțe. În urma studiului s-a înregistrat creșterea semnificativă a numărului de trombocite la administrarea a 2 compuși CCT benzotiazolici – CMA-18 și CMD-8, precum și a tuturor substanțelor fenil- și aliltiosemicarbazone cu variații între 14% și 72%. În același timp, toți compușii benzotiazolici și aliltiosemicarbazonici și 2 feniltiosemicarbazone (CMJ-33 și CMT-67) au diminuat concludent MPV până la 9%, comparativ cu valorile specifice animalelor sănătoase de același sex. La masculi s-a atestat doar creșterea numărului de trombocite la administrarea TIA-160 (27%) și diminuarea MPV – MG-22 și TIA-123 (până la 4%). În urma cercetărilor putem concluziona că toți CCT cercetați exercită un număr similar de acțiuni asupra indicilor trombocitari, fără diferențe asociate de tipul CCT – benzotiazolice, fenil sau alil.

În general, studiul a relevat un impact mai mare al CCT asupra indicilor hemoleucogramei la femele, precum și un număr puțin evident de efecte ale compușilor feniltiosemicarbazone.

5. INFLUENȚA COMPUȘILOR COORDINATIVI AI CUPRULUI CU TIOSEMICARBAZONE ASUPRA INDICILOR STRESULUI OXIDATIV ȘI AI SISTEMULUI ANTIOXIDANT ÎN SERUL SANGVIN AL ȘOBOLANILOR SĂNĂTOȘI

5.1. Evaluarea activității compușilor coordinativi ai cuprului cu tiosemicarbazone asupra markerilor stresului oxidativ *in vivo*

Dezvoltarea unor procese degenerative este corelată cu existența unui surplus nociv de radicali liberi, promotori ai unor procese oxidative dezastruoase pentru organism. Pentru a evalua proprietățile CCT incluși în studiu și a determina caracterul lor – prooxidant, antioxidant sau modulator - s-au evaluat capacitatea de a induce SO și acumularea produșilor lui. Analiza rezultatelor obținute s-a efectuat luând în considerare grupul CCT (benzotiazolici, fenil și alil), precum și sexul animalelor de laborator.

Derivații benzotiazolici ai CCT nu au exercitat acțiune prooxidantă, cu excepția inducerii amplificării MRO de către CMA-18 (+83%, $p < 0,05$) și CMD-8 (+21%, $p < 0,05$) la femele. Concomitent CMD-8 a diminuat BPA la femele până la 23% ($p < 0,001$) din valorile specifice animalelor martor. CMA-18 a indus și o tendință neconcludentă de creștere a DAM (+30%, $p > 0,05$) și a PPOA (+12%, $p > 0,05$) la femele, iar în cazul CMD-8 această tendință a fost de 21% pentru ambii indici ($p > 0,05$) la femele (tabelul 9).

Derivații fenil ai CCT au avut, la fel, impact nesemnificativ asupra stresului oxidativ. Modificările identificate, ca și în cazul derivaților benzotiazolici, au fost specifice doar pentru femele. Compusul CMJ-33 a amplificat semnificativ MRO (+24%, $p > 0,05$) inducând concomitent o tendință veridică de creștere a BPA (+99%, $p < 0,001$), DAM (+15%) și PPOA (+13%). CMT-67 a determinat tendințe de majorare a MRO (+13%), BPA (+15%) și PPOA (+12%), afectând concludent lipidele care s-au atestat prin creșterea veridică a DAM (+36%, $p < 0,01$). Dezechilibre în procesele pro- și anti-oxidante la femele a indus CMC-34, caracterizate prin tendința de creștere a MRO (+26%) și diminuare neveridic statistic a BPA (-18%, $p > 0,05$).

Derivații alil ai CCT au indus modificări statistic veridice doar ale BPA. S-a stabilit creșterea statistic semnificativă a indicelui la femele ca urmare a administrării CMG-41 (+19%, $p < 0,01$) și la masculi la tratamentul cu TIA-123 (+31%, $p < 0,05$) și TIA-160 (+33%, $p < 0,05$), comparativ cu valorile martor. Creșterea atestată la femele a fost asociată cu tendințe de majorare a MRO (+17%), DAM (+20%) și PPOA (+16%), pe când la masculi modificările au fost neunivoce.

Tabelul 9. Nivelul indicilor stresului oxidativ și al balanței prooxidante-antioxidante (PAB) în serul de șobolani la acțiunea compușilor coordinativi ai cuprului cu tiosemicarbazone

Grupurile de studiu		MRO tret-butyl hydropoxide, μM/L	BPA, unitati arbitrare	PPOA, μM/L	DAM, μM/L
Martor	M	450,30 ; IQR 124,43 100%	103,69 ; IQR 13,10 100%	29,25 ; IQR 9,29 100%	6,96 ; IQR 1,89 100%
	F	276,50 ; IQR 29,63 100%	98,83 ; IQR 2,35 100%	33,67 ; IQR 8,67 100%	7,85 ; IQR 1,49 100%
CCT cu benzotiazolici					
CMA – 18	M	604,35 ; IQR 231,08 134%	105,39 ; IQR 28,94 102%	38,90 ; IQR 23,34 133%	7,71 ; IQR 3,08 111%
	F	505,60; IQR 150,10 * 183%	95,14 ; IQR 9,97 96%	37,59 ; IQR 3,98 112%	10,23 ; IQR 2,29 130%
CMD – 8	M	438,45 ; IQR 65,18 97%	102,08 ; IQR 29,39 98%	36,82 ; IQR 8,23 126%	8,48 ; IQR 3,42 122%
	F	335,75 ; IQR 51,35 * 121%	76,33 ; IQR 6,40 *** 77%	40,60 ; IQR 6,15 121%	9,54 ; IQR 2,34 121%
MG – 22	M	438,45 ; IQR 88,88 79%	147,81; QR33,89 142%	37,77 ; IQR 34,66 129%	6,36 ; IQR 1,89 91%
	F	363,40 ; IQR 100,73 131%	115,02 ; IQR 36,63 116%	39,54 ; IQR 4,07 117%	8,84 ; IQR 3,48 113%
CCT cu fenil					
CMC – 34	M	533,25 ; IQR 189,60 118%	98,43 ; IQR 12,95 95%	37,39 ; IQR 11,84 128%	7,79 ; IQR 2,49 112%
	F	347,60; IQR 37,53 ** 126%	81,57 ; IQR 27,16 82%	36,10 ; IQR 5,21 107%	9,24; IQR 1,99 118%
CMJ – 33	M	485,85 ; IQR 106,65 108%	120,63 ; IQR 86,01 116%	37,39 ; IQR 6,54 128%	7,10 ; IQR 3,43 102%
	F	343,65 ; IQR 33,58 124%	196,44; IQR 25,69*** 199%	38,03 ; IQR 2,81 113%	9,04 ; IQR 2,34 115%
CMT – 67	M	438,45 ; IQR 77,03 97%	111,25 ; IQR 16,98 107%	33,10 ; IQR 4,52 113%	9,68 ; IQR 3,93 139%
	F	316,00 ; IQR 73,08 113%	114,09 ; IQR 19,05 115%	37,70 ; IQR 5,17 112%	10,73 ; IQR 1,30 ** 136%
CCT cu alil					
CMG – 41	M	485,85 ; IQR 124,43 108%	132,52 ; IQR 53,10 128%	33,50 ; IQR 7,37 114%	6,92 ; IQR 1,79 99%
	F	323,90 ; IQR 37,53 117%	118,03; IQR 12,65 ** 119%	39,03 ; IQR 6,51 116%	9,44 ; IQR 1,25 120%
TIA – 123	M	426,60 ; IQR 100,73 95%	135,73 ; IQR 26,66 * 131%	27,40 ; IQR 3,90 94%	6,12 ; IQR 1,00 88%
	F	221,20 ; IQR 15,80 80%	111,68 ; IQR 19,88 113%	40,01 ; IQR 3,00 119%	8,05 ; IQR 1,64 102%
TIA – 160	M	474,00 ; IQR 82,95 105%	138,13 ; IQR 14,87 * 133%	32,98 ; IQR 10,76 113%	7,85 ; IQR 2,02 113%
	F	248,85 ; IQR 57,28 90%	130,22 ; IQR 41,15 132%	35,30 ; IQR 5,93 105%	9,54 ; IQR 1,94 121%

Notă: Veridicitatea statistică față de lotul-control: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$.

TIA-123 a indus tendințe de micșorare a tuturor markerilor – MRO (-5%), DAM (-12%) și PPOA (-6%), iar TIA-160 – de amplificare – MRO (+5%), DAM și PPOA cu 13%.

S-a stabilit că derivații benzotiazolici ai CCT au efecte selective, dependente de sex, asupra nivelului metaboliților NO (figura 17). Astfel, CMA-18 a produs o creștere de 7% ($p < 0,05$) a indicelui la femele, MG-22 – de 9,6% ($p < 0,05$) la masculi, iar CMD-8 nu a produs modificări veridice statistic.

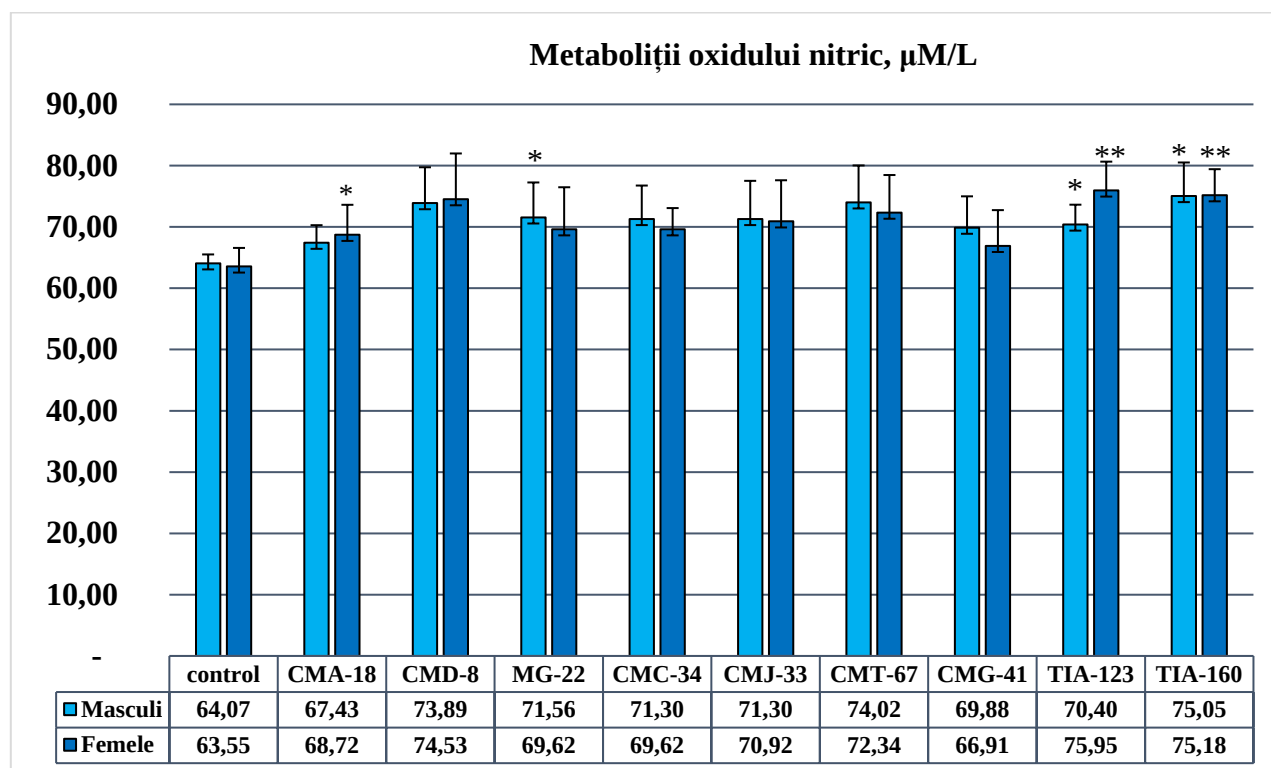


Figura 17. **Aprecierea metaboliților oxidului nitric în serul sagvin la șobolani după administrarea compușilor coordinativi ai cuprului cu tiosemicarbazone**

Notă: Veridicitatea statistică față de lotul-control: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$.

Nici un derivat fenil al CCT nu a modificat nivelul metaboliților NO în serul șobolanilor comparativ cu martorul, totuși tendințele manifestate au fost de majorare atât la femele, cât și la masculi.

Derivații alil ai CCT TIA-123 și TIA-160 au indus mărirea statistic veridică a valorilor NO în ser atât la femele (+20%, $p < 0,001$ și, respectiv, +18%, $p < 0,01$), cât și la masculi (+10%, $p < 0,05$ și, respectiv, +17%, $p < 0,01$), pe când CMG-41 a determinat doar tendințe nesemnificative de creștere.

5.2. Evaluarea acțiunii compușilor coordinativi ai cuprului cu tiosemicarbazone asupra indicilor sistemului antioxidant în serul sangvin al șobolanilor sănătoși

Sistemul de protecție antioxidantă (SAO) este esențial pentru a menține în limitele fiziologice intensitatea proceselor prooxidante și pentru a preveni declanșarea stresului oxidativ (SO). Evaluarea indicilor ce caracterizează SAO per total permite de a aprecia posibilitățile organismului de a rezista agresiunii oxidative, iar studiul unor markeri individuali – de a stabili mecanismele prin care se realizează apărarea antioxidantă.

Pornind de la aceste premise, s-au cercetat indicii generali (capacitatea antioxidantă totală, antioxidanții totali evaluați prin metoda cu ABTS, activitatea medie a antioxidanților, masa substanțelor antioxidante) și individuali ai SAO (SOD, CAT, GPO, GST, GR, glutatationul total, conținutul de grupări tiolice), pentru a evalua impactul administrării CCT asupra proceselor pro- și antioxidante din organismul animalelor sănătoase.

5.2.1. Evaluarea acțiunii compușilor coordinativi ai cuprului cu tiosemicarbazone asupra indicilor generali ai sistemului antioxidant în serul sangvin al șobolanilor sănătoși

Analiza influenței exercitate de compușii coordinativi ai cuprului, derivați ai tiosemicarbazonei asupra indicilor generali ai sistemului antioxidant în serul sangvin al șobolanilor sănătoși, a relevat lipsa unor influențe majore (tabelul 10). S-au identificat doar două modificări statistic semnificative la masculi – diminuarea antioxidanților totali evaluați prin metoda cu ABTS cu 30% ($p < 0,001$) la administrarea CMA-18 și cu 22% ($p < 0,05$) la administrarea CMC-34.

Totuși, este necesar de a menționa că toți compușii studiați au indus la femele tendințe de micșorare a AAT evaluată cu ABTS cu 9-11%, cu excepția TIA-160. Au fost atestate și tendințe statistic neveridice de majorare a TAC la animalele de ambele sexe la administrarea CMA-18 (17-19%) și CMC-34 (15-18%), precum și a AMA cu, respectiv, 15-17% și 14-15%.

Nu au fost constatate modificări sugestiv statistice sau tendințe de modificări ce merită de a fi menționate ale masei substanțelor antioxidante la administrarea tuturor CCT, a capacității antioxidante totale și activității medii a antioxidanților la administrarea CMD-8, MG-22, CMJ-33, CMT-67, CMG-41, TIA-123 și TIA-160. Ultimul compus nu a afectat nici nivelul antioxidanților totali evaluați prin metoda cu ABTS.

5.2.2. Evaluarea acțiunii compușilor coordinativi ai cuprului cu tiosemicarbazone asupra indicilor individuali ai sistemului antioxidant în serul sanguin al șobolanilor sănătoși

Evaluarea markerilor individuali ai SAO ne permite de a identifica acțiunea compușilor studiați asupra diferitor verigi ale protecției antioxidante. Astfel, SOD este implicată în neutralizarea radicalului superoxid și în prevenția inițierii proceselor de peroxidare, CAT și sistemul glutatationului (GPO, G-S-T, GR, glutatationul total, conținutul de grupări tiolice) intervin în detoxifierea peroxizilor (de hidrogen și organici) și în blocarea propagării proceselor oxidative atipice cu declanșarea stresului oxidativ și deteriorarea macromoleculelor și structurilor celulare.

Analiza rezultatelor obținute la evaluarea activității SOD și a CAT a relevat modificări de diferită amploare și direcție la administrarea CCT, doar un număr redus din ele fiind statistic semnificative (tabelul 11).

În urma cercetărilor, CMD-8 la administrarea masculilor s-a atestat diminuarea veridică a activității SOD (-36%, $p < 0,01$) și creșterea concomitentă a activității CAT (+22%, $p < 0,05$), iar la administrarea CMC-34, respectiv, diminuarea enzimooactivității SOD cu 48% ($p < 0,01$) și majorarea CAT cu 38% ($p < 0,05$), pe când CMA-18 și TIA-123 nu au modificat nivelul funcțional SOD, dar au amplificat activitatea CAT la masculi cu, respectiv, 18% ($p < 0,05$) și 34% ($p < 0,05$).

Tendențe similare, dar nu identice s-au identificat ca urmare a administrării altor CTT. Astfel, tendința de micșorare a activității SOD a fost indusă la masculi de CMJ-33 cu 16% ($p > 0,05$), de CMT-67 cu 15% ($p > 0,05$) și de CMG-41 cu 30% ($p > 0,05$), pe când la femele acești compuși au determinat creșterea neveridică a activității CAT – cu 11% ($p > 0,05$) de către CMJ-33 și TIA-160, pe când TIA-123 cu 16% ($p > 0,05$).

Tendențe de amplificare a activității ambelor enzime au fost produse de către MG-22 atât la masculi, cât și la femele și de TIA-160 la masculi. MG-22 a indus tendințe de majorare a enzimooactivității SOD cu 25% la masculi și totodată s-a micșorat cu 4% la femele, iar a activității CAT – cu 12% la masculi și 17% la femele ($p > 0,05$, în toate cazurile). TIA-160 a crescut activitatea SOD la masculi cu 14% ($p > 0,05$) și a CAT cu 29%, ($p < 0,01$).

Putem conchide că CCT induc diminuarea veridică sau tendințe de diminuare a activității SOD cu excepția MG-22 și TIA-160 la masculi. Activitatea CAT este majorată mai mult sau mai puțin pronunțat de toți CCT studiați comparativ cu nivelul stabilit la animalele martor. Modificările atestate pot demonstra o modulare a activității enzimatice adaptate la creșterea nivelului de MRO (descrisă în subcapitolul 5.1) cu scopul de a stopa declanșarea stresului oxidativ la etapele inițiale. În cadrul acțiunii CTT asupra activității SOD și CAT nu au fost remarcate diferențe semnificative între ei dictate de structura chimică, fiind atestate doar unele efecte individuale condiționate de sexul animalelor.

Tabelul 10. Influența compușilor coordinativi ai cuprului cu tiosemicarbazone asupra indicilor generali ai sistemului antioxidant în serul sangvin al șobolanilor sănătoși

Grupurile de studiu		AAT cu ABTS, $\mu\text{M/L}$	TAC, u/c	MA, u/c	AMA, u/c
Martor	M	445,82 ; IQR 49,88 100%	9,18 ; IQR 0,96 100%	1,66 ; IQR 0,03 100%	5,54 ; IQR 0,47 100%
	F	483,72 ; IQR 57,43 100%	11,75 ; IQR 1,06 100%	1,94 ; IQR 0,01 100%	6,07 ; IQR 0,53 100%
CCT cu benzotiazolici					
CMA-18	M	311,49 ; IQR 41,84*** 70%	10,91 ; IQR 1,45 119%	1,73 ; IQR 0,09 104%	6,35 ; IQR 0,76 115%
	F	438,81 ; IQR 32,26 91%	13,70 ; IQR 1,82 117%	1,93 ; IQR 0,02 99,5%	7,09 ; IQR 0,93 117%
CMD-8	M	455,11 ; IQR 28,91 102%	9,55 ; IQR 1,13 104%	1,67 ; IQR 0,03 101%	5,77 ; IQR 0,59 104%
	F	430,70 ; IQR 7,92 89%	12,41 ; IQR 1,13 106%	1,94 ; IQR 0,02 100%	6,35 ; IQR 0,51 105%
MG-22	M	435,13; IQR 133,46 98%	9,47 ; IQR 1,62 103%	1,68 ; IQR 0,04 101%	5,72 ; IQR 0,82 103%
	F	437,70 ; IQR 23,78 90%	11,67 ; IQR 0,81 99%	1,95 ; IQR 0,01 100,5%	5,99 ; IQR 0,40 99%
CCT cu fenil					
CMC-34	M	348,84; IQR 80,10* 78%	10,80 ; IQR 2,07 118%	1,70 ; IQR 0,04 102%	6,39 ; IQR 1,00 115%
	F	426,66 ; IQR 25,56 88%	13,49 ; IQR 1,80 115%	1,94 ; IQR 0,01 100%	6,94 ; IQR 0,96 114%
CMJ-33	M	417,50 ; IQR 48,25 94%	9,76 ; IQR 0,88 106%	1,68 ; IQR 0,04 101%	5,83 ; IQR 0,51 105%
	F	436,22 ; IQR 45,73 90%	11,95 ; IQR 0,64 102%	1,94 ; IQR 0,01 100%	6,17 ; IQR 0,27 102%
CMT-67	M	429,26 ; IQR 27,62 96%	9,48 ; IQR 1,18 103%	1,67 ; IQR 0,05 101%	5,67 ; IQR 0,62 102%
	F	438,44 ; IQR 27,42 91%	12,44 ; IQR 1,93 106%	1,94 ; IQR 0,01 100%	6,43 ; IQR 0,96 106%
CCT cu alil					
CMG-41	M	434,38 ; IQR 6,41 97%	9,82 ; IQR 1,04 107%	1,68 ; IQR 0,02 101%	5,89 ; IQR 0,52 106%
	F	432,17 ; IQR 9,74 89%	12,14 ; IQR 0,82 103%	1,94 ; IQR 0,01 100%	6,26 ; IQR 0,41 103%
TIA-123	M	463,80 ; IQR 27,27 104%	8,99 ; IQR 0,32 98%	1,64 ; IQR 0,01 99%	5,47 ; IQR 0,21 99%
	F	433,28 ; IQR 16,58 90%	11,28 ; IQR 1,06 96%	1,94 ; IQR 0,01 100%	5,83 ; IQR 0,52 96%
TIA-160	M	451,08 ; IQR 17,77 101%	8,91 ; IQR 0,96 97%	1,65 ; IQR 0,03 99%	5,40 ; IQR 0,52 97%
	F	487,44 ; IQR 40,28 101%	11,66 ; IQR 0,57 99%	1,94 ; IQR 0,01 100%	6,04 ; IQR 0,29 99%

Notă: Veridicitatea statistică comparativă cu lotul-martor: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; ***– $p < 0,001$.

Rolul pivotal al *glutathionului și al enzimelor glutatitionice* în sistemul de protecție antioxidantă este incontestabil. Analiza rezultatelor studiului acțiunii CTT asupra activității enzimelor ciclului glutatitionic – GPO, GST și GR, în serul sangvin al șobolanilor sănătoși a relevat modificări în raport cu dinamica indicilor stresului oxidativ și a SOD și CAT (tabelul 12), totuși un număr mai mare de schimbări sunt statistic veridice.

Tabelul 11. Acțiunea compușilor coordinativi ai cuprului, derivați ai tiosemicarbazone, asupra indicilor ce reflectă capacitatea de neutralizare a radicalilor în serul sagvin al șobolanilor

Grupurile de studiu		SOD, u/c	Catalaza, $\mu\text{M/L}$
Martor	M	55,36 ; IQR 8,93 ; 100%	18,10 ; IQR 1,9 ; 100%
	F	67,28 ; IQR 9,37 ; 100%	17,50 ; IQR 3,41 ; 100%
CCT cu benzotiazolici			
CMA-18	M	49,82 ; IQR 9,22 ; 90%	21,40 ; IQR 1,65 ; 118% *
	F	64,16 ; IQR 8,48 ; 95%	19,60 ; IQR 5,25 ; 112%
CMD-8	M	35,68 ; IQR 9,15 ; 64% **	22,07 ; IQR 1,92 ; 122% *
	F	67,95 ; IQR 4,24 ; 101%	19,30 ; IQR 5,67 ; 110%
MG-22	M	69,15 ; IQR 25,77 ; 125%	20,27 ; IQR 2,33 ; 112%
	M	64,38 ; IQR 4,47 ; 116%	20,57 ; IQR 3,83 ; 117%
CCT cu fenil			
CMC-34	M	28,71 ; IQR 14,22 ; 52% **	25,00 ; IQR 3,46 ; 138% *
	F	65,05 ; IQR 3,35 ; 97%	19,00 ; IQR 2,36 ; 109%
CMJ-33	M	46,51 ; IQR 21,76 ; 84%	19,37 ; IQR 1,99 ; 107%
	F	67,51 ; IQR 8,26 ; 100,3%	19,52 ; IQR 4,13 ; 111%
CMT-67	M	46,86 ; IQR 11,40 ; 85%	19,15 ; IQR 1,05 ; 106%
	F	65,94 ; IQR 4,35 ; 98%	20,87 ; IQR 5,70 ; 119%
CCT cu alil			
CMG-41	M	38,79 ; IQR 12,85 ; 70%	22,07 ; IQR 3,90 ; 122%
	F	63,71 ; IQR 4,13 ; 95%	18,40 ; IQR 5,67 ; 105%
TIA-123	M	57,63 ; IQR 17,12 ; 104%	24,25 ; IQR 5,56 ; 134% *
	F	64,38 ; IQR 6,69 ; 96%	20,27 ; IQR 3,71 ; 116%
TIA-160	M	63,17 ; IQR 11,98 ; 114%	23,42 ; IQR 2,63 ; 129% **
	F	63,49 ; IQR 10,93 ; 94%	19,45 ; IQR 1,95 ; 111%

Notă: Veridicitatea statistică față de lotul-martor: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$.

Toți CCT studiați au indus creșterea activității GPO la șobolani, în majoritatea cazurilor statistic semnificativ. La femele majorări concludente, comparativ cu valorile specifice grupului martor, au fost identificate după administrarea CMD-8 (+51%, $p < 0,01$), MG-22 (+35%, $p < 0,05$) și CMJ-33 (+35%, $p < 0,01$), CMG-41 (+42%, $p < 0,01$), TIA-123 (+48%, $p < 0,001$), TIA-160 (+39%, $p < 0,001$), pe când la masculi asemenea schimbări au fost produse de CMC-34 (+39%, $p < 0,01$), MG-22 (+36%,

$p < 0,01$), TIA-123 (+36%, $p < 0,05$) și CMJ-33 (+26%, $p < 0,05$). În toate celelalte cazuri s-au stabilit tendințe neveridice de amplificare a activității GPO în limitele de la 16% până la 36%, cu excepția TIA-160, care a produs o diminuare neconcludentă de 5%.

Modificări similare, dar de amploare mai mică au fost relevate la evaluarea activității G-S-T în serul sangvin al șobolanilor sănătoși după administrarea CCT. O altă deosebire a constat în manifestarea concludentă a efectului preponderent la masculi.

La analiza rezultatelor obținute la evaluarea modificărilor nivelului de G-S-T s-a constatat lipsa modificărilor statistic veridice ale indicatorului (tabelul 12). Au fost atestate tendințe considerabile de majorare a conținutului glutatationului total la femele la administrarea TIA-123 (+83%, $p < 0,001$), CMC-34 (+83%, $p < 0,05$) și CMT-67 (+87%), concomitent s-a atestat o creștere veridică la administrarea CMD-8 (+94%, $p < 0,01$), TIA-160 (+98%, $p < 0,001$), moderat la administrarea CMA-18 și CMG-41 (câte 52%, $p < 0,05$). La masculi au prevalat tendințele de creștere a conținutului de glutatation total, ele fiind înregistrate la grupul benzotiazolice cu (96% - 140%, $p < 0,01$), pe când la grupul fenil s-a evidențiat o majorare veridică la administrarea CMC-34 și CMJ-33 cu (61% - 125%, $p < 0,05$), la administrarea TIA-123 (+101%, $p < 0,001$), CMG-41 (+91%, $p < 0,01$), TIA-160 (+86%, $p < 0,01$), față de lotul-martor (tabelul 13).

Funcționalitatea atât a GPO cât și a G-S-T depinde de disponibilitatea glutatationului redus (GSH), care este regenerat din cel oxidat (GSSG) de către GR. Toți compușii studiați au avut un impact minim asupra activității acestei enzime, fiind atestate variații minime, în limitele comparative cu valorile specifice animalelor din lotul-martor de ambele sexe. Menținerea la nivel fiziologic a activității GR asigură regenerarea eficientă a GSSG la GSH ce susține nivelul sporit de funcționare a GPO și GST.

Activitatea GR a fost semnificativ majorată la masculi de CMA-18 (+41%, $p < 0,01$), CMD-8 (+22%, $p < 0,05$), MG-22 (+37%, $p < 0,05$), CMC-34 (+40%, $p < 0,001$), CMJ-33 (+25%, $p < 0,01$), iar TIA-123 a acționat asupra activității enzimei atât la masculi (+50%, $p < 0,001$), cât și la femele (+86%, $p < 0,01$). În toate celelalte cazuri s-au atestat tendințe nesugestive statistic de majorare a activității enzimei în limitele de la 10% până la 41% (tabelul 12).

Rezultatele descrise confirmă eficiența funcționării mecanismelor glutatation-dependente de menținere a echilibrului pro-și antioxidant.

Tabelul 12. Modificările activității enzimelor metabolismului glutationului în serul sangvin de șobolan la administrarea compuşilor coordinativi ai cuprului cu tiosemicarbazone

Grup de studiu		GPO, nM/s.L	G-S-T, nM/s.L	GR, nM/s.L
Martor	M	625,22 ; IQR 89,32 100%	89,90 ; IQR 8,4 100%	893,20 ; IQR 156,30 100%
	F	560,27 ; IQR 93,37 100%	114,40 ; IQR 11,72 100%	1.045,02 ; IQR 58,06 100%
CCT cu benzotiazolici				
CMA-18	M	730,78 ; IQR 170,52 117%	84,36 ; IQR 14,57 94%	1.259,35 ; IQR 272,40 ** 141%
	F	763,26 ; IQR 190,82 136%	107,51 ; IQR 10,34 94%	1.393,36 ; IQR 602,90 133%
CMD-8	M	747,02 ; IQR 158,34 119%	96,76 ; IQR 22,01 108%	1.089,65 ; IQR 236,68 * 122%
	F	844,46 ; IQR 182,70 ** 151%	122,67 ; IQR 17,23 107%	1.312,97 ; IQR 455,52 126%
MG-22	M	852,58 ; IQR 109,62 ** 136%	84,74 ; IQR 17,77 94%	1.223,65 ; IQR 250,08 * 137%
	F	755,14 ; IQR 186,76 * 135%	121,30 ; IQR 18,61 106%	1.473,74 ; IQR 361,74 141%
CCT cu fenil				
CMC-34	M	868,82 ; IQR 142,09 ** 139%	78,78 ; IQR 9,93 88%	1.250,40 ; IQR 174,15 *** 140%
	F	828,22 ; IQR 272,02 148%	118,54 ; IQR 11,72 104%	1.607,72 ; IQR 902,11 154%
CMJ-33	M	787,62 ; IQR 146,16 * 126%	81,47 ; IQR 18,60 91%	1.116,45 ; IQR 67,05 ** 125%
	F	755,14 ; IQR 150,22 ** 135%	104,75 ; IQR 9,65 92%	1.286,18 ; IQR 535,90 123%
CMT-67	M	730,78 ; IQR 113,68 117%	82,63 ; IQR 19,74 92%	1.170,05 ; IQR 267,98 131%
	F	673,94 ; IQR 146,16 120%	115,78 ; IQR 24,12 101%	1.152,20 ; IQR 330,48 110%
CCT cu alil				
CMG-41	M	722,66 ; IQR 194,88 116%	95,07 ; IQR 9,09 106%	1.143,25 ; IQR 326,03 128%
	F	795,74 ; IQR 109,62 ** 142%	119,92 ; IQR 8,27 105%	1.384,43 ; IQR 415,33 132%
TIA-123	M	852,58 ; IQR 203,00 * 136%	79,15 ; IQR 19,95 88%	1.339,80 ; IQR 133,95 *** 150%
	F	828,22 ; IQR 109,62 *** 148%	119,92 ; IQR 40,66 105%	1.947,13 ; IQR 451,06 ** 186%
TIA-160	M	592,74 ; IQR 117,73 95%	82,34 ; IQR 18,19 92%	1.179,00 ; IQR 326,00 132%
	F	779,50 ; IQR 85,26 *** 139%	119,92 ; IQR 51,00 105%	1.259,38 ; IQR 763,67 120%

Notă: Veridicitatea statistică a diferențelor față de lotul-martor: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$;

*** – $p < 0,001$.

La administrarea tuturor CCT s-a identificat majorarea concludent statistică a conținutului total de grupări tiolice la masculi (tabelul 13). Creșterile au fost importante ca amploare, astfel derivații

benzotiazolici au determinat majorări de 27-32% ($p < 0,001$), derivații fenil – de 26-41% ($p < 0,001$) și cei alil – de 31-40% ($p < 0,001$). La femele toți compușii au indus tendințe neveridice de diminuare a nivelului total de grupări tiolice (-8-12%, $p > 0,05$), cu excepția TIA-160 care a majorat valorile grupărilor tiolice totale cu 32% ($p < 0,001$).

Creșterile descrise nu sunt determinate de creșterile corespunzătoare ale grupărilor tiolice libere totale și/sau ale grupărilor tiolice ale proteinelor, modificările acestor indici fiind statistic neveridice (tabelul 13). Analiza rezultatelor evaluării markerilor respectivi relevă, totuși, unele schimbări ce trebuie considerate ca valoare informativă. Astfel, grupările tiolice libere totale denotă o tendință de majorare la administrarea tuturor CCT benzotiazolici femelelor cu cca 8-13% ($p > 0,05$), concomitent majorându-se și conținutul de grupări tiolice libere proteice cu cca 5-15% ($p > 0,05$). Derivații fenil ai CCT induc tendința de diminuare a valorilor grupărilor tiolice libere proteice atât la masculi, cât și la femele (-8-30%, $p > 0,05$), cu excepția CMT-67 care a majorat conținutul acestor grupări cu 21% ($p > 0,05$) și, concomitent, a indus tendința de creștere a conținutului de grupări tiolice libere cu 14% ($p > 0,05$). Derivații alil ai CCT au manifestat acțiune similară cu cea a derivaților fenil la masculi, inducând tendința de micșorare a grupărilor tiolice libere proteice (-5-17%, $p > 0,05$), pe când la femele a fost indusă majorarea lor cu cca +12-32% ($p > 0,05$), cu excepția TIA-160 care a determinat diminuarea acestora cu 27%.

Putem concluziona că CCT studiate induc modificări în acord ale markerilor individuali ai sistemului antioxidant care denotă o influență adaptivă orientată spre potențarea activității enzimelor antioxidante majore, fenomen asociat cu modularea cantității tiolilor necesari pentru funcționarea lor optimă și menținerea echilibrului tiol-disulfidic asociat și cu funcționalitatea altor biomolecule esențiale.

5.3. Sinteza impactului acțiunii compușilor coordinativi ai cuprului cu tiosemicarbazone asupra indicilor stresului oxidativ și ai sistemului antioxidant în serul sangvin al șobolanilor sănătoși

Speciile reactive de oxigen (SRO) și de azot (SRN) sunt indispensabile pentru realizarea a numeroase procese metabolice și fiziologice celulare, cum ar fi regenerarea membranelor, semnalizarea celulară, distrugerea compușilor fagocitați, apoptoza etc. [252-253]. Stresul oxidativ se dezvoltă în condiții de dezechilibru între viteza de producție a speciilor reactive de oxigen/azot și eficiența mecanismelor antioxidante endogene ce contracarează efectele SRO și/sau repară daunele oxidative produse [254].

Tabelul 13. Modificările nivelului glutationului total și al grupărilor tiolice în serul sangvin de șobolan la administrarea compușilor coordinativi ai cuprului cu tiosemicarbazone

Grupurile de studiu		Glutation total, $\mu\text{M/L}$	Grupe tiolice totale, $\mu\text{M/L}$	Grupe tiolice libere, $\mu\text{M/L}$	Grupe tiolice a protein., $\mu\text{M/g.prot}$
Martor	M	291,46 ; IQR 83,01 100%	77,38 ; IQR 6,21 100%	74,38 ; IQR 3,94 100%	4,47 ; IQR 1,48 100%
	F	366,71 ; IQR 104,07 100%	80,40 ; IQR 19,18 100%	59,7 ; IQR 14,9 100%	5,88 ; IQR 1,63 100%
CCT cu benzotiazolici					
CMA-18	M	614,51; IQR 78,31*** 211%	98,44 ; IQR 9,21*** 127%	70,24 ; IQR 8,46 94%	4,66 ; IQR 0,83 104%
	F	557,31 ; IQR 106,99 * 152%	70,62 ; IQR 13,36 88%	64,60 ; IQR 5,07 108%	6,18 ; IQR 5,56 105%
CMD-8	M	699,03; IQR 161,68*** 240%	100,70; IQR 3,39*** 130%	74,00 ; IQR 9,41 99%	4,28 ; IQR 0,72 96%
	F	712,99 ; IQR 117,11 ** 194%	75,13 ; IQR 7,90 93%	64,22 ; IQR 3,39 107%	6,78 ; IQR 1,66 115%
MG-22	M	571,69; IQR 121,30*** 196%	102,20; IQR 7,71*** 132%	75,13 ; IQR 3,39 101%	4,14 ; IQR 2,21 93%
	F	614,51 ; IQR 98,91 *** 168%	77,01 ; IQR 6,39 96%	67,23 ; IQR 5,07 113%	6,61 ; IQR 0,78 112%
CCT cu fenil					
CMC-34	M	470,23 ; IQR 139,05 * 161%	97,31 ; IQR 6,77*** 126%	73,25 ; IQR 4,32 98%	4,10 ; IQR 1,05 92%
	F	670,86 ; IQR 187,80* 183%	75,51 ; IQR 11,84 94%	66,86 ; IQR 11,85 112%	7,51 ; IQR 1,34 70%
CMJ-33	M	655,62 ; IQR 275,78 * 225%	108,97; IQR 2,41*** 141%	77,39 ; IQR 11,5 104%	3,92 ; IQR 1,12 88%
	F	600,29 ; IQR 134,79 ** 164%	73,63 ; IQR 6,76 92%	63,47 ; IQR 4,52 106%	5,68 ; IQR 1,99 97%
CMT-67	M	542,84 ; IQR 265,06 186%	100,32; IQR 3,76*** 130%	72,50 ; IQR 22,0 97%	3,99 ; IQR 1,17 89%
	F	684,99 ; IQR 187,80** 187%	78,14 ; IQR 5,45 97%	67,98 ; IQR 2,07 114%	7,10 ; IQR 1,19 121%
CCT cu alil					
CMG-41	M	557,31 ; IQR 121,76** 191%	108,22 ; IQR 5,27*** 140%	68,74 ; IQR 3,01 86%	3,76 ; IQR 0,67 84%
	F	557,31 ; IQR 129,08 * 152%	75,13 ; IQR 4,14 93%	65,36 ; IQR 4,51 109%	6,61 ; IQR 2,60 112%
TIA-123	M	585,82; IQR 135,81 *** 201%	102,20; IQR 8,65*** 132%	80,02 ; IQR 5,26 108%	3,71 ; IQR 0,63 83%
	F	670,86 ; IQR 119,21 *** 183%	78,14 ; IQR 16,55 97%	71,37 ; IQR 8,27 119%	7,75 ; IQR 0,79 132%
TIA-160	M	542,84 ; IQR 135,59 ** 186%	101,45; IQR 10,15*** 131%	71,74 ; IQR 2,07 96%	4,27 ; IQR 0,64 95%
	F	726,86 ; IQR 171,71 *** 198%	102,20; IQR 8,65*** 132%	80,02 ; IQR 5,26 108%	3,71 ; IQR 0,63 63%

Notă: Veridicitatea statistică a diferențelor față de lotul-martor: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$;

*** – $p < 0,001$.

Severitatea leziunilor oxidative este în directă corelare cu nivelul de specii reactive, care la rândul său depinde de gradul de implicare a sistemului de protecție antioxidantă. Capacitatea sistemului antioxidant al organismului, reflectată în indicatorii sangvini, este direct corelată cu conținutul de substanțe antioxidante din ser sau cu activitatea lor, sau cu o combinație a ambelor [255-257].

Celulele canceroase se caracterizează prin rolul amfipatic al SRO/SRN, care în cantități scăzute activează în calitate de mesageri secunzi ce propagă dezvoltarea tumorii și pot declanșa mecanismele de metastazare, iar în concentrații mari, specifice stresului oxidativ, pot declanșa moartea celulelor canceroase [258]. Astfel, este evident că compușii chimici ce stimulează producerea SRO/SRN și ulterior SO în celulele canceroase denotă potențial terapeutic anticanceros și necesită a fi studiați și incluși în lista de substanțe ce sunt potențiale medicamente antineoplazice. În același timp, amplificarea stresului oxidativ în celulele sănătoase este asociată cu dereglarea funcțiilor lor și fundamentează efectele adverse ale numeroaselor medicamente chimioterapeutice, ce scoate în prim plan necesitatea creării compușilor chimici cu efecte selective – citotoxice față de celulele tumorale și citoprotectoare sau inofensive față de celulele sănătoase.

Au fost atestate mai multe mecanisme moleculare prin care CCT își exercită acțiunea asupra celulelor canceroase, cum ar fi inducerea apoptozei, modularea ciclului celular și stoparea celulelor în faza G2/M, supresia exprimării Bcl-XL și Bcl-2 și hiperexpresia caspazei-3 [259], amplificarea expresiei proteinei supresoare de metastaze – N-myc downstream regulated gene-1 (NDRG1) [260], chelarea ionilor metalici ca unul din mecanismele efectelor antiproliferative [261] etc. Gutierrez E. M. și coaut. (2016) au raportat capacitatea CCT de a determina distrugerea celulelor canceroase (MCF7) datorită inducerii generării radicalilor liberi ai oxigenului și deteriorarea membranelor [262]. Totuși, numărul studiilor acțiunii CCT asupra celulelor sănătoase și/sau organismului sănătos sunt limitate și necesită a fi aprofundate [263-265].

Rezultatele cercetării noastre privind influența compușilor coordinativi ai cuprului, derivați ai tiosemicarbazonelor asupra parametrilor stresului oxidativ și ai sistemului antioxidant evaluați *in vivo* pe animale de laborator sănătoase (*Rattus albicans*) semnifică în general efecte pozitive, adesea sinergice, care oferă posibilitatea de a modula statutul redox al organismului.

Analiza sistemică a rezultatelor noastre a remarcant că cele mai numeroase și pronunțate efecte asupra markerilor stresului oxidativ/nitrozativ și ai sistemului antioxidant l-au exercitat derivații alii ai CCT. S-a atestat creșterea valorilor balanței pro- și antioxidante (BPA), ce denotă majorarea nivelului sumar de radicali liberi și peroxizi, deci deplasarea echilibrului spre un statut prooxidant.

Ambii compuși TIA au determinat atât la masculi, cât și la femele acumularea metaboliților oxidului nitric, ce poate induce stresul nitrozativ prin generarea de peroxinitrit. La femele substanțele acestui grup au indus tendințe de majorare a nivelului produșilor stresului oxidativ derivați din peroxidarea lipidelor (DAM) și oxidarea atipică a proteinelor (PPOA). Concomitent nu s-au înregistrat modificări ale indicilor ce caracterizează la general eficiența răspunsului antioxidant – AAT, TAC, MA și AMA. Creșterea activității componente enzimice a SAO, manifestată prin sporirea activității GPO la femele de către toți derivații alil ai CCT, iar de către TIA-123 și la masculi, a asigurat neutralizarea peroxidului de hidrogen și a celor organici. Efect susținut de TIA-123 atât la femele, cât și la masculi prin amplificarea activității G-S-T. La animalele a 4 loturi (CMG-41 și TIA-123 – masculi, TIA-160 – masculi și femele) activitatea enzimelor glutacionice s-a majorat cu cca 31-40% ($p < 0,001$ în toate cazurile), inclusiv conținutul total de grupări tiolice, concomitent cu tendința de diminuare a grupelor tiolice libere și grupelor tiolice proteice, totodată se atestă o majorare al nivelului glutationului total, ce atestă un dezechilibru al homeostaziei tiol-disulfidice. Astfel, per total sistemul antioxidant a manifestat suficientă capacitate de a contracara efectele prooxidante și în final s-au atestat doar tendințe de creștere a produșilor stresului oxidativ, care au fost menționate anterior.

Derivații benzotiazolici ai CCT testați în cercetare au avut un impact mai puțin pronunțat asupra indicilor stresului oxidativ și ai sistemului antioxidant comparativ cu cei fenil. La administrarea CMD-8 femelelor s-a atestat o diminuare deosebit de mare, semnificativă statistic a BPA asociată cu creșterea concludentă a nivelului MRO și cu tendințe de majorare a produșilor stresului oxidativ – PPOA și DAM. Efectele menționate au fost contracarate de creșterea semnificativă a activității GPO asociată cu tendințe de modificări de același direcție ale activității CAT, G-S-T și GR și conținutului de glutation total și grupări tiolice totale. La femele ceilalți CCT nu au produs modificări statistic semnificative, cu excepția creșterii MRO și derivaților NO la administrarea CMA-18 și a activității GPO la administrarea MG-22. La masculi, toți cei 3 CCT derivați benzotiazolici au produs unele schimbări ale markerilor analizați. Astfel, CMA-18 a determinat diminuarea capacității antiradicalice concomitent cu creșterea activității G-S-T și nivelului de grupe tiolice totale, asociate cu tendințe neveridice de sporire a statutului prooxidant (creșterea BPA, PPOA și DAM) și a activității SAO (TAC, AMA, CAT, GPO și GR), iar MG-22 a indus creșterea concludentă a derivaților NO, a activității GPO și GR, precum și a nivelului de grupe tiolice totale. Sumar, toți compușii acestui grup au amplificat la masculi activitatea GR și nivelul de grupe tiolice totale.

Derivații fenil ai tiosemicarbazonelor au produs cele mai mici modificări ale indicilor stresului oxidativ și ai sistemului antioxidant la animalele sănătoase, dar mai puține veridic comparativ cu

derivații benzotiazolici. Doar CMC-34 a produs modificări numeroase la masculi – s-a micșorat semnificativ activitatea antiradicalică și cea a SOD, ce relevă o diminuare importantă a capacității de neutralizare a radicalilor liberi, ce în pofida majorării concludente a activității CAT, CPO și GR nu a contracarat complet efectele SRO/SRN și a determinat tendințe de sporire a PPOA și DAM, a glutatationului total și creșterea nesemnificativă a grupelor tiolice libere. De asemenea, la masculi CMJ-33 a majorat activitatea GPO și GR și cantitatea grupelor tiolice totale. La femele acest compus a majorat 2 indici – nivelul MRO și activitatea GPO. CMT-67 a influențat câte un marker la masculi – grupele tiolice totale, și la femele – DAM, ambii demonstrând majorări.

Literatura de specialitate nu ne oferă suficientă informație cu privire la proprietățile și efectele metabolice/biologice ale derivaților alil și benzotiazolici ai tiosemicarbazonelor. Puținele studii accesibile în bazele de date relevante atestă practic doar efectele antimicrobiene (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* și *Pseudomonas aeruginosa*), antituberculoase (*Mycobacterium tuberculosis*), antifungice (*Candida albicans*) și antiparazitare (*Schistosoma mansoni*) ale acestei grupe de compuși chimici. Totodată, Singh M. și coaut. (2016) au raportat nivelul jos de citotoxicitate al compușilor cercetați evaluat prin teste de hemoliză [266-269].

Unele studii privind acțiunea biologică a derivaților fenil ai tiosemicarbazonelor au relevat în studii *in vitro* potențialul lor antitumoral semnificativ în cazul a diferite tipuri de culturi celulare tumorale. Kotian A. și coaut. (2021) au raportat că complexe Co(III), Ni(II) and Cu(II) ale derivaților 8-hidroxiquinoline ai p-halo N4-fenil tiosemicarbazonelor manifestă activitate antiproliferativă față de linia celulară MCF-7 de cancer mamar [270]. Complexele polimerice de cupru(II) cu tiosemicarbazone de 3-metil-5-oxo-1-fenil-3-pirazolin-4-carboxaldehidă și 5-oxo-3-fenil-3-pirazolin-4-carboxaldehidă au un potențial citotoxic mai mare față de mai multe linii celulare de cancer (HL60, REH, C6, L929 și B16) în comparație cu cisplatina, sugerând astfel că apoptoza ar putea fi un posibil mecanism de inducere a morții celulare [271]. Totodată, Lukmantara A.Y. și coaut. au evaluat impactul comparativ al 2'-benzoilpiridine tiosemicarbazonelor 4-fenil-substituite asupra celulelor canceroase vs cele sănătoase, au comunicat efectul mai pronunțat asupra celulelor tumorale *in vitro* [272]. Soares M. A. și coaut. au relatat lipsa efectului hemolitic al unui șir de 2-acetilpiridin tiosemicarbazide N⁴-fenil-substituite în concentrație de până la 10⁻⁵M care au fost mai eficiente decât etoposidul la testarea în culturile celulare de cancer mamar (MCF-7) și gliom (T98G și U87) [273].

Putem concluziona că CCT cercetați în studiul dat exercită efecte moderate sau minore asupra stresului oxidativ/nitrozativ și sistemului antioxidant, cu predilecție activând enzimele antioxidante (GPO și GR) și majorând conținutul total de grupe tiolice, ce poate fi considerat un răspuns adaptiv

favorabil al organismului la acțiunea CCT. Pentru a detalia cunoștințele privind efectele intime metabolice ce condiționează modificările sangvine este necesar de a extinde cercetările markerilor analizați în acest capitol *in vivo* în organe individuale (ficat, rinichi, inimă, pulmoni etc.) ale animalelor sănătoase, precum și *in vitro* – în culturi de celule normale și canceroase de diferite tipuri.

CONCLUZII GENERALE

1. Majoritatea CCT testați exercită citotoxicitate selectivă în funcție de doza utilizată (10,0 $\mu\text{M/L}$ vs 1,0 $\mu\text{M/L}$) și tipul de celulă – gliom de șobolan C6 vs hepatocite normale de șobolan.
 - a) Toți CCT au indus scăderea viabilității celulelor de glioblastom C6 atât în concentrație de 10,0 $\mu\text{M/L}$ (15-27%), cât și de 1,0 $\mu\text{M/L}$ (3-35%) după o incubare de 24 de ore. Proliferarea celulelor de glioblastom C6 a fost stimulată de CCT similar cu DOXO la doza de 10 $\mu\text{M/L}$, iar la doza de 1 $\mu\text{M/L}$ cinci dintre substanțele testate (CMA-18, CMC-34, CMT-67, CMG-41 și TIA-160) nu au indus proliferarea celulară în cultura de gliom. Cumulativ CMA-18, CMC-34, CMT-67 și CMG-41 au scăzut semnificativ viabilitatea, în timp ce nu au stimulat proliferarea celulelor gliomului C6.
 - b) În doză de 10,0 $\mu\text{M/L}$ CCT nu au avut un efect semnificativ asupra viabilității și proliferării celulelor hepatice, iar în concentrație redusă (1,0 $\mu\text{M/L}$) toți CCT au diminuat statistic semnificativ viabilitatea hepatocitelor la nivel similar cu cel produs de DOXO, precum și au micșorat concludent proliferarea lor (25-38%), cu excepția CMA-18 care a indus procesul.
2. S-au relevat efecte de amplasare redusă ale compușilor coordinativi ai cuprului cu tiosemicarbazone asupra indicilor hemoleucogramei șobolanilor sănătoși, care au fost dependente major de sexul animalului de laborator și în măsură mică de tipul compusului tiosemicarbazonic – benzotiazolic, fenil sau alil. Femelele sănătoase sunt mai sensibile la acțiunea CCT testați comparativ cu masculii, la ele atestându-se semnificativ mai multe modificări veridice ale hemoleucogramei. Nu s-au identificat diferențe importante în numărul de efecte produse de compușii unui anumit tip de CCT, cu excepția impactului asupra markerilor eritrocitari, care nu au fost semnificativ modificați de feniltiosemicarbazone.
3. Rezultatele cercetării influenței compușilor coordinativi ai cuprului cu tiosemicarbazone asupra parametrilor stresului oxidativ și ai sistemului antioxidant evaluați *in vivo* pe animale de laborator sănătoase au relevat în general efecte pozitive, adesea sinergice, care oferă posibilitatea de modulare a statutului redox al organismului. CCT cercetați au exercitat efecte moderate sau minore asupra stresului oxidativ/nitrozativ și sistemului antioxidant, cu predilecție activând enzimele antioxidante (GPO și GR) și majorând conținutul total de grupe tiolice, ce poate fi considerat un răspuns adaptiv favorabil al organismului la acțiunea CCT.

4. Studiul mecanismelor biochimice de acțiune al compușilor coordinativi ai cuprului cu tiosemicarbazone pentru selectarea celor cu efecte toxice minime nu au identificat deosebiri semnificative ale efectelor lor, toți CCT exercitând influența de amploare mică sau moderată asupra markerilor cercetați.

RECOMANDĂRI PRACTICE

1. Se recomandă aplicarea metodelor optimizate de evaluare a indicilor biochimici în cercetarea efectelor compușilor chimici sintetici și naturali, potențiale medicamente, deoarece modificările propuse au permis de a simplifica procedeul analitic, de a micșora cheltuielile de reactivi costisitori și timpul de efectuare a analizelor prin procesarea concomitentă a unui număr mare de probe biologice și de a mări reproductibilitatea și precizia micrometodei de determinare.
2. Se recomandă extinderea cercetărilor acțiunii compușilor coordinativi ai cuprului cu tiosemicarbazone benzotiazolice, fenil și alil pentru evaluarea:
 - ✓ *in vitro* a impactului asupra stresului oxidativ și a sistemului antioxidant în culturile celulare de gliom C6 și hepatocite normale de șobolan, pentru a stabili rolul proceselor în modificările viabilității și proliferării stabilite în studiul curent;
 - ✓ *in vivo* a acțiunii asupra stresului oxidativ și a sistemului antioxidant în creierul și ficatul animalelor de laborator sănătoase, precum și în alte organe și țesuturi;
 - ✓ *in vivo* a acțiunii asupra stresului oxidativ și a sistemului antioxidant în glioamele induse în animalele de laborator sănătoase.

BIBLIOGRAFIE

1. Falzone L., Salomone S., Libra M. Evolution of Cancer Pharmacological Treatments at the Turn of the Third Millennium. *Front Pharmacol.* 2018 Nov 13; 9:1300. doi: [10.3389/fphar.2018.01300](https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01300). PMID: 30483135; PMCID: PMC6243123 [accesat 11.04.2018].
2. Pantea V., Lesnic E. The anti-neoplastic activity of the coordinative compounds, thiosemicarbazide derivates. *Arta Medica*, vol. 86 No. 1 (2023), doi: [10.5281/zenodo.7830773](https://doi.org/10.5281/zenodo.7830773), p.19 – 24.
3. Hale K. E. Toxicities of Chemotherapy. In: Hall J. B., Schmidt G. A., Kress J. P. eds. *Principles of Critical Care, 4e.* McGraw Hill; 2014. Accessed August 11, 2022. Available from: <https://accessmedicine.mhmedical.com/Content.aspx?bookid=1340§ionid=80037088>. [accesat 11.04.2018].
4. Ramasubbu S. K., Pasricha R. K., Nath U. K., Das B. Frequency, nature, severity and preventability of adverse drug reactions arising from cancer chemotherapy in a teaching hospital. *J Family Med Prim Care.* 2020 Jul 30; 9 (7): 3349-3355. doi: [10.4103/jfmprc.jfmprc_352_20](https://doi.org/10.4103/jfmprc.jfmprc_352_20). PMID: 33102295; PMCID: PMC7567243. [accesat 15.05.2018].
5. Xu J., Xu B., Shou D., Qin F., Xu Y., Hu Y. Characterization and evaluation of a folic acid receptor-targeted cyclodextrin complex as an anticancer drug delivery system. *Eur J Pharm Sci.* 2016 Feb 15; 83: 132-42. doi: [10.1016/j.ejps.2015.11.008](https://doi.org/10.1016/j.ejps.2015.11.008). Epub 2015 Nov 12. PMID: 26577995. [accesat 15.05.2018].
6. Biswas S., Kumari P., Lakhani P. M., Ghosh B. Recent advances in polymeric micelles for anti-cancer drug delivery. *Eur J Pharm Sci.* 2016; 83: 184-202. doi:[10.1016/j.ejps.2015.12.031](https://doi.org/10.1016/j.ejps.2015.12.031).
7. Dingjan T., Spendlove I., Durrant L. G., Scott A. M., Yuriev E., Ramsland P. A. Structural biology of antibody recognition of carbohydrate epitopes and potential uses for targeted cancer immunotherapies. *Mol Immunol.* 2015; 67 (2 Pt A): 75-88. doi:[10.1016/j.molimm.2015.02.028](https://doi.org/10.1016/j.molimm.2015.02.028). [accesat 19.06.2018].
8. Al-Hakimi A. N., Alminderej F., Aroua L. et al. Design, synthesis, characterization of zirconium (IV), cadmium (II) and iron (III) complexes derived from Schiff base 2-aminomethylbenzimidazole, 2-hydroxynaphthaldehyde and evaluation of their biological activity. *Arab J Chem.* 2020; 13 (10): 7378-7389. doi:[10.1016/j.arabjc.2020.08.014](https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2020.08.014). [accesat 19.06.2018].
9. Pahontu E., Fala V., Gulea A., Poirier D., Tapcov V., Rosu T. Synthesis and characterization of some new Cu(II), Ni(II) and Zn(II) complexes with salicylidene thiosemicarbazones: antibacterial, antifungal and in vitro antileukemia activity. *Molecules.* 2013 Jul 24; 18 (8): 8812-36. doi: [10.3390/molecules18088812](https://doi.org/10.3390/molecules18088812). PMID: 23887722; PMCID: PMC6269917. [accesat 21.09.2019].
10. Riaz I. B., Hussain S. A. Perioperative Treatment in Muscle-invasive Bladder Cancer: Analysis of Secondary Endpoints in a Randomized Trial Comparing Gemcitabine and Cisplatin Versus Dose-dense Methotrexate, Vinblastine, Adriamycin, and Cisplatin. *Eur Urol.* 2021 Feb; 79 (2): 222-224. doi: [10.1016/j.eururo.2020.09.018](https://doi.org/10.1016/j.eururo.2020.09.018). Epub 2020 Oct 2. PMID: 33012577. [accesat 21.09.2019].

11. Aroua L. M., Al-Hakimi A. N., Abdulghani M. A. M., Ihag S. K. Cytotoxic urea Schiff base complexes for multidrug discovery as anticancer activity and low in vivo oral assessing toxicity. *Arab J Chem.* 2022; 15 (8): 103986. doi:10.1016/j.arabjc.2022.103986. [accesat 21.09.2019].
12. El-saied F. A., Shakdofa M. M. E., Al-Hakimi A. N., Shakdofa A. M. E. Transition metal complexes derived from N'-(4-fluorobenzylidene)-2-(quinolin-2-yloxy) acetohydrazide: Synthesis, structural characterization, and biocidal evaluation. *Appl Organomet Chem.* 2020; 34 (11). doi:10.1002/aoc.5898. [accesat 21.10.2019].
13. Aroua L. M., Alhag S. K., Al-Shuraym L. A., Messaoudi S., Mahyoub J. A. et al. Synthesis and characterization of different complexes derived from Schiff base and evaluation as a potential anticancer, antimicrobial, and insecticide agent. *Saudi J Biol Sci.* 2023 Mar; 30 (3): 103598. doi: 10.1016/j.sjbs.2023.103598. Epub 2023 Feb 14. PMID: 36874197; PMCID: PMC9982043. [accesat 21.10.2019].
14. Ahmed M. F., Almalki A. H. Design, synthesis, antiproliferative activity, and cell cycle analysis of new thiosemicarbazone derivatives targeting ribonucleotide reductase. *Arab J Chem.* 2021; 14 (3): 102989. doi:10.1016/j.arabjc.2021.102989. [accesat 12.11.2019].
15. Bianchini C. Methisazone (Marboran) in the prevention of smallpox and in the treatment of the complications of smallpox vaccination. Review. *Arch Ital Sci Med Trop Parassitol.* 1969; 50 (1): 29-38. Italian. PMID: 5770701. [accesat 12.11.2019].
16. Finch R. A., Liu M., Grill S. P., Rose W. C., Loomis R., Vasquez K. M. et al. Triapine (3-aminopyridine-2-carboxaldehyde- thiosemicarbazone): A potent inhibitor of ribonucleotide reductase activity with broad spectrum antitumor activity. *Biochem Pharmacol.* 2000 Apr 15; 59 (8): 983-91. doi: 10.1016/s0006-2952(99)00419-0. PMID: 10692563. [accesat 12.11.2019].
17. Khan T., Ahmad R., Joshi S., Khan A. R. Anticancer potential of metal thiosemicarbazone complexes: A review . *Pelagia Research Library. Der Chemica Sinica*, 2015, 6 (12): 1-11. ISSN: 0976-8505.
18. Lobana T. S., Kumari P., Hundal G., Butcher R. J. Metal derivatives of N1-substituted thiosemicarbazones with divalent metal ions (Ni, Cu): Synthesis and structures. *Polyhedron.* 2010; 29 (3): 1130-1136. doi:10.1016/j.poly.2009.12.013. [accesat 12.11.2019].
19. Gulea A., Poirier D., Roy J., et al. In vitro antileukemia, antibacterial and antifungal activities of some 3d metal complexes: chemical synthesis and structure - activity relationships. *J Enzyme Inhib Med Chem.* 2008; 23 (6): 806-818. doi:10.1080/14756360701743002. [accesat 22.12.2019].
20. Karatepe M., Karatas F. Antioxidant, pro-oxidant effect of the thiosemicarbazone derivative Schiff base (4-(1-phenylmethylcyclobutane-3-yl)-2-(2-hydroxybenzylidenehydrazino) thiazole) and its metal complexes on rats. *Cell Biochem Funct.* 2006 Nov-Dec; 24 (6): 547-54. doi: 10.1002/cbf.1266. PMID: 16143962. [accesat 22.12.2019].
21. Bal-Demirci T., Şahin M., Kondakçı E., Özyürek M., Ülküseven B., Apak R. Synthesis and antioxidant activities of transition metal complexes based 3-hydroxysalicylaldehyde-S-methylthiosemicarbazone. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 2015; 138: 866-872. doi:10.1016/j.saa.2014.10.088. [accesat 22.12.2019].

22. McClendon A. K., Osheroff N. DNA topoisomerase II, genotoxicity, and cancer. *Mutat Res.* 2007 Oct 1; 623 (1-2): 83-97. doi: [10.1016/j.mrfmmm.2007.06.009](https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2007.06.009). Epub 2007 Jul 3. PMID: 17681352; PMCID: PMC2679583. [accesat 22.12.2019].
23. Wei L., Easmon J., Nagi R. K., Muegge B. D., Meyer L. A., Lewis J. S. ⁶⁴Cu-azabicyclo[3.2.2]nonane thiosemicarbazone complexes: radiopharmaceuticals for PET of topoisomerase II expression in tumors. *J Nucl Med.* 2006 Dec; 47 (12): 2034-41. PMID: 17138747. [accesat 26.12.2019].
24. Hanif M., Hartinger C. G. Anticancer metallodrugs: where is the next cisplatin? *Future Med Chem.* 2018 Mar 1; 10 (6): 615-617. doi: [10.4155/fmc-2017-0317](https://doi.org/10.4155/fmc-2017-0317). Epub 2018 Feb 7. PMID: 29411994. [accesat 26.12.2019].
25. Polo-Cerón D. Cu(II) and Ni(II) Complexes with New Tridentate NNS Thiosemicarbazones: Synthesis, Characterisation, DNA Interaction, and Antibacterial Activity. *Bioinorg Chem Appl.* 2019 Jul 1; 2019: 3520837. doi: [10.1155/2019/3520837](https://doi.org/10.1155/2019/3520837). PMID: 31354798; PMCID: PMC6636485. [accesat 26.12.2019].
26. Tarushi A., Kakoulidou C., Raptopoulou C. P. et al. Zinc complexes of diflunisal: synthesis, characterization, structure, antioxidant activity, and in vitro and in silico study of the interaction with DNA and albumins,” *Journal of Inorganic Biochemistry*, vol. 170, doi:[10.1016/j.jinorgbio](https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio), 2017. [accesat 03.01.2020].
27. Pahontu E., Paraschivescu C., Ilies C. D., Poirier D., Oprean C. et al. Synthesis and Characterization of Novel Cu(II), Pd(II) and Pt(II) Complexes with 8-Ethyl-2-hydroxytricyclo(7.3.1.0^{2,7})tridecan-13-onethiosemicarbazone: Antimicrobial and in Vitro Antiproliferative Activity. *Molecules* 2016, 21, 674; doi:[10.3390/molecules21050674](https://doi.org/10.3390/molecules21050674). [accesat 03.01.2020].
28. Afrasiabi Z., Sinn E., Lin W., Ma Y., Campana C., Padhye S. Nickel (II) complexes of naphthaquinone thiosemicarbazone and semicarbazone: synthesis, structure, spectroscopy, and biological activity. *J Inorg Biochem.* 2005 Jul; 99 (7): 1526-31. doi: [10.1016/j.jinorgbio.2005.04.012](https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2005.04.012). PMID: 15927263. [accesat 03.01.2020].
29. Brodowska K., Correia I., Garribba E., Marques F., Klewicka E. et al. Coordination ability and biological activity of a naringenin thiosemicarbazone. *J Inorg Biochem.* 2016 Dec; 165: 36-48. doi: [10.1016/j.jinorgbio.2016.09.014](https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2016.09.014). Epub 2016 Sep 30. PMID: 27764708. [accesat 03.01.2020].
30. Pelosi G. Thiosemicarbazone metal complexes: From Structure to Activity, *Open Crystallography Journal*, vol. 3, no. 2, pp. 16–28, 2010. doi: [10.2174/1874846501003010016](https://doi.org/10.2174/1874846501003010016). [accesat 11.01.2020].
31. Gómez-Saiz P., García-Tojal J., Mendia A. et al. Coordination modes in a tridentate NNS -iosemicarbazonato)copper(II) system containing oxygen-donor coligands—structures of [{Cu(L)(X)}₂] (X = formato, propionato, nitrito), *European Journal of Inorganic Chemistry*, vol. 3, pp. 518–527, 2003. doi:[10.1002/ejic.200390074](https://doi.org/10.1002/ejic.200390074). [accesat 11.01.2020].
32. Tahghighi A. Importance of metal complexes for development of potential leishmanicidal agents. *Journal of Organometallic Chemistry*, vol. 770, pp. 51–60, 2014. doi.org/[10.1016/j.jorganchem.2014.08.007](https://doi.org/10.1016/j.jorganchem.2014.08.007). [accesat 13.01.2020].

31. Fan X., Dong J., Min R. et al. Cobalt(II) complexes with thiosemicarbazone as potential antitumor agents: synthesis, crystal structures, DNA interactions, and cytotoxicity. *Journal of Coordination Chemistry*, vol. 66, no. 24, pp. 4268–4279, 2013.
32. Kalinowski D. S., Yu Y., Sharpe P. C., Islam M., Liao Y. T. et al. Design, synthesis, and characterization of novel iron chelators: structure-activity relationships of the 2-benzoylpyridine thiosemicarbazone series and their 3-nitrobenzoyl analogues as potent antitumor agents. *J Med Chem*. 2007 Jul 26; 50 (15): 3716-29. doi: [10.1021/jm070445z](https://doi.org/10.1021/jm070445z). Epub 2007 Jun 30. PMID: 17602603. [accesat 13.01.2020].
33. Jayakumar K., Sithambaresan M., Aiswarya N., Kurup M. R. Synthesis and spectral characterization of mono- and binuclear copper(II) complexes derived from 2-benzoylpyridine- N^4 -methyl-3-thiosemicarbazone: crystal structure of a novel sulfur bridged copper(II) box-dimer. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*. 2015 Mar 15; 139: 28-36. doi: [10.1016/j.saa.2014.11.042](https://doi.org/10.1016/j.saa.2014.11.042). Epub 2014 Dec 9. PMID: 25546494. [accesat 13.01.2020].
34. Taylor M. R., Gabe E. J., Glusker J. P., Minkin J. A., Patterson A. L. The crystal structures of compounds with antitumor activity. 2-keto-3-ethoxybutyraldehyde bis(thiosemicarbazone) and its cupric complex. *J Am Chem Soc*. 1966 Apr 20; 88 (8): 1845-6. doi: [10.1021/ja00960a067](https://doi.org/10.1021/ja00960a067). PMID: 5942994. [accesat 20.01.2020].
35. Crim J. A., Petering H. G. The antitumor activity of Cu(II)KTS, the copper (II) chelate of 3-ethoxy-2-oxobutyraldehyde bis(thiosemicarbazone). *Cancer Res*. 1967 Jul; 27 (7): 1278-85. PMID: 4952520. [accesat 20.01.2020].
36. Lovejoy D. B., Richardson D. R. Novel "hybrid" iron chelators derived from aroylhydrazones and thiosemicarbazones demonstrate selective antiproliferative activity against tumor cells. *Blood*. 2002 Jul 15; 100 (2): 666-76. doi: [10.1182/blood.v100.2.666](https://doi.org/10.1182/blood.v100.2.666). PMID: 12091363. [accesat 20.01.2020].
37. Ming L. J. Structure and function of "metalloantibiotics". *Med Res Rev*. 2003 Nov; 23 (6): 697-762. doi: [10.1002/med.10052](https://doi.org/10.1002/med.10052). PMID: 12939790. [accesat 20.01.2020].
38. Wolohan P., Yoo J., Welch M. J., Reichert D. E. QSAR studies of copper azamacrocycles and thiosemicarbazones: MM3 parameter development and prediction of biological properties. *J Med Chem*. 2005 Aug 25; 48 (17): 5561-9. doi: [10.1021/jm0501376](https://doi.org/10.1021/jm0501376). PMID: 16107156; PMCID: PMC 2566539.
39. Pogni R., Baratto M. C., Diaz A., Basosi R. EPR characterization of mono(thiosemicarbazones) copper(II) complexes. Note II. *J Inorg Biochem*. 2000 Apr; 79 (1-4): 333-7. doi: [10.1016/s0162-0134\(99\)00166-x](https://doi.org/10.1016/s0162-0134(99)00166-x). PMID: 10830885. [accesat 20.01.2020].
40. Zhang H., Thomas R., Oupicky D., Peng F. Synthesis and characterization of new copper thiosemicarbazone complexes with an ONNS quadridentate system: cell growth inhibition, S-phase cell cycle arrest and proapoptotic activities on cisplatin-resistant neuroblastoma cells. *J Biol Inorg Chem*. 2008 Jan; 13 (1): 47-55. doi: [10.1007/s00775-007-0299-6](https://doi.org/10.1007/s00775-007-0299-6). Epub 2007 Oct 2. PMID: 17909866. [accesat 10.02.2020].
41. Feun L., Modiano M., Lee K., Mao J., Marini A. et al. Phase I and pharmacokinetic study of 3-aminopyridine-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone (3-AP) using a single intravenous dose schedule. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2002 Sep; 50 (3): 223-9. doi: [10.1007/s00280-002-0480-0](https://doi.org/10.1007/s00280-002-0480-0). Epub 2002 Aug 1. PMID: 12203104. [accesat 10.02.2020].

42. Hambley T. W. Chemistry. Metal-based therapeutics. *Science*. 2007 Nov 30; 318 (5855): 1392-3. doi: [10.1126/science.1150504](https://doi.org/10.1126/science.1150504). PMID: 180486. [accesat 13.02.2020].
43. Gielen M., Tiekink E. R.T. Metallotherapeutic Drugs and Metal-Based Diagnostic Agents, The Use of Metals in Medicine. *Pharmaceutical & Medicinal Chemistry*, 2005. ISBN: 978-0-470-86403-6, p.656.
44. Zhang C. X., Lippard S. J. New metal complexes as potential therapeutics. *Curr Opin Chem Biol*. 2003 Aug; 7 (4): 481-9. doi: [10.1016/s1367-5931\(03\)00081-4](https://doi.org/10.1016/s1367-5931(03)00081-4). PMID: 12941423. [accesat 13.02.2020].
45. Maity M., Pramanik U., Hathwar V. R., Brandao P., Mukherjee S. et al. Biophysical insights into the binding capability of Cu(II) schiff base complex with BSA protein and cytotoxicity studies against SiHa. *Heliyon*. 2022 Nov 2; 8 (11): e11345. doi: [10.1016/j.heliyon.2022.e11345](https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e11345). PMID: 36387430; PMCID: PMC9647205. [accesat 14.02.2020].
46. Linder M. C., Hazegh-Azam M. Copper biochemistry and molecular biology. *Am J Clin Nutr*. 1996 May; 63 (5): 797S-811S. doi: [10.1093/ajcn/63.5.797](https://doi.org/10.1093/ajcn/63.5.797). PMID: 8615367. [accesat 14.02.2020].
47. Halliwell B., Gutteridge J. M. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol*. 1990; 186:1-85. doi: [10.1016/0076-6879\(90\)86093-b](https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)86093-b). PMID: 2172697. [accesat 14.02.2020].
48. Aust S. D., Morehouse L. A., Thomas C. E. Role of metals in oxygen radical reactions. *J Free Radic Biol Med*. 1985; 1 (1): 3-25. doi: [10.1016/0748-5514\(85\)90025-x](https://doi.org/10.1016/0748-5514(85)90025-x). PMID: 3013969. [accesat 14.02.2020].
49. Turnlund J. R., Keyes W. R., Anderson H. L., Acord L. L. Copper absorption and retention in young men at three levels of dietary copper by use of the stable isotope ⁶⁵Cu. *Am J Clin Nutr*. 1989 May; 49 (5): 870-8. doi: [10.1093/ajcn/49.5.870](https://doi.org/10.1093/ajcn/49.5.870). PMID: 2718922. [accesat 14.02.2020].
50. Wang T., Guo Z. Copper in medicine: homeostasis, chelation therapy and antitumor drug design. *Curr Med Chem*. 2006; 13 (5): 525-37. doi: [10.2174/092986706776055742](https://doi.org/10.2174/092986706776055742). PMID: 16515519. [accesat 12.03.2020].
51. Denoyer D., Clatworthy S. A. S., Cater M. A. Copper Complexes in Cancer Therapy. *Met Ions Life Sci*. 2018 Feb 5; 18: /books/9783110470734/9783110470734-022/9783110470734-022.xml. doi: [10.1515/9783110470734-022](https://doi.org/10.1515/9783110470734-022). PMID: 29394035. [accesat 12.03.2020].
52. Daniel K. G., Harbach R. H., Guida W. C., Dou Q. P. Copper storage diseases: Menkes, Wilsons, and cancer. *Front Biosci*. 2004 Sep 1; 9: 2652-62. doi: [10.2741/1424](https://doi.org/10.2741/1424). PMID: 15358588. [accesat 12.03.2020].
53. Goodman V. L., Brewer G. J., Merajver S. D. Copper deficiency as an anti-cancer strategy. *Endocr Relat Cancer*. 2004 Jun; 11 (2): 255-63. doi: [10.1677/erc.0.0110255](https://doi.org/10.1677/erc.0.0110255). PMID: 15163301. [accesat 12.03.2020].
54. Safaei R., Holzer A. K., Katano K., Samimi G., Howell S. B. The role of copper transporters in the development of resistance to Pt drugs. *J Inorg Biochem*. 2004 Oct; 98 (10): 1607-13. doi: [10.1016/j.jinorgbio.2004.05.006](https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2004.05.006). PMID: 15458823. [accesat 18.03.2020].
55. Laussac J. P., Sarkar B. Characterization of the copper(II)- and nickel(II)-transport site of human serum albumin. Studies of copper(II) and nickel(II) binding to peptide 1-24 of human serum

- albumin by ^{13}C and ^1H NMR spectroscopy. *Biochemistry*. 1984 Jun 5; 23 (12): 2832-8. doi: [10.1021/bi00307a046](https://doi.org/10.1021/bi00307a046). PMID: 6547847. [accesat 18.03.2020].
56. Lau S. J., Sarkar B. Ternary coordination complex between human serum albumin, copper (II), and L-histidine. *J Biol Chem*. 1971 Oct 10; 246 (19): 5938-43. PMID: 5165635. [accesat 18.03.2020].
 57. Tabata M.; Sarkar B. Kinetic mechanism of copper(II)-transfer between the native sequence peptide representing the copper(II)-transport site of human serum albumin and L-histidine. *Can. J. Chem.*, 2011, 89 (11), 3111-3116, doi:[10.1139/v85-513](https://doi.org/10.1139/v85-513). [accesat 17.04.2020].
 58. Galaris D., Evangelou A. The role of oxidative stress in mechanisms of metal-induced carcinogenesis. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2002 Apr; 42 (1): 93-103. doi: [10.1016/s1040-8428\(01\)00212-8](https://doi.org/10.1016/s1040-8428(01)00212-8). PMID: 11923071. [accesat 17.04.2020].
 59. Deneke S. M., Fanburg B. L. Regulation of cellular glutathione. *Am J Physiol*. 1989 Oct; 257 (4 Pt 1): L163-73. doi: [10.1152/ajplung.1989.257.4.L163](https://doi.org/10.1152/ajplung.1989.257.4.L163). PMID: 2572174. [accesat 17.04.2020].
 60. Ferreira A. M., Ciriolo M. R., Marcocci L., Rotilio G. Copper(I) transfer into metallothionein mediated by glutathione. *Biochem J*. 1993 Jun 15; 292 (Pt 3): 673-6. doi: [10.1042/bj2920673](https://doi.org/10.1042/bj2920673). PMID: 8317998; PMCID: PMC1134166. [accesat 18.04.2020].
 61. Freedman J. H., Peisach J. Intracellular copper transport in cultured hepatoma cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1989 Oct 16; 164 (1): 134-40. doi: [10.1016/0006-291x\(89\)91693-8](https://doi.org/10.1016/0006-291x(89)91693-8). PMID: 2553012. [accesat 18.04.2020].
 62. Freedman J. H., Ciriolo M. R., Peisach J. The role of glutathione in copper metabolism and toxicity. *J Biol Chem*. 1989 Apr 5; 264 (10): 5598-605. PMID: 2564391. [accesat 18.04.2020].
 63. Culotta V. C., Klomp L. W., Strain J., Casareno R. L., Krems B., Gitlin J. D. The copper chaperone for superoxide dismutase. *J Biol Chem*. 1997 Sep 19; 272 (38): 23469-72. doi: [10.1074/jbc.27238.23469](https://doi.org/10.1074/jbc.27238.23469). PMID: 9295278. [accesat 19.04.2020].
 64. Murata Y., Kodama H., Abe T., Ishida N., Nishimura M. et al. Mutation analysis and expression of the mottled gene in the macular mouse model of Menkes disease. *Pediatr Res*. 1997 Oct; 42 (4): 436-42. doi: [10.1203/00006450-199710000-00003](https://doi.org/10.1203/00006450-199710000-00003). PMID: 9380433. [accesat 19.04.2020].
 65. Vulpe C., Levinson B., Whitney S., Packman S., Gitschier J. Isolation of a candidate gene for Menkes disease and evidence that it encodes a copper-transporting ATPase. *Nat Genet*. 1993 Jan; 3 (1): 7-13. doi: [10.1038/ng0193-7](https://doi.org/10.1038/ng0193-7). Erratum in: *Nat Genet* 1993 Mar; 3 (3): 273. PMID: 8490659. [accesat 19.04.2020].
 66. Tanzi R. E., Petrukhin K., Chernov I., Pellequer J. ., Wasco W. et al. The Wilson disease gene is a copper transporting ATPase with homology to the Menkes disease gene. *Nat Genet*. 1993 Dec; 5 (4): 344-50. doi: [10.1038/ng1293-344](https://doi.org/10.1038/ng1293-344). PMID: 8298641. [accesat 19.04.2020].
 67. Safaei R., Holzer A. K., Katano K., Samimi G., Howell S. B. The role of copper transporters in the development of resistance to Pt drugs. *J Inorg Biochem*. 2004 Oct; 98 (10): 1607-13. doi: [10.1016/j.jinorgbio.2004.05.006](https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2004.05.006). PMID: 15458823. [accesat 19.04.2020].
 68. Wang T., Guo Z. Copper in medicine: homeostasis, chelation therapy and antitumor drug design. *Curr Med Chem*. 2006; 13 (5): 525-37. doi: [10.2174/092986706776055742](https://doi.org/10.2174/092986706776055742). PMID: 16515519. [accesat 22.04.2020].

69. Pena M. M., Lee J., Thiele D. J. A delicate balance: homeostatic control of copper uptake and distribution. *J Nutr.* 1999 Jul; 129 (7): 1251-60. doi: [10.1093/jn/129.7.1251](https://doi.org/10.1093/jn/129.7.1251). PMID: 10395584. [accesat la 31.04.2020].
70. Harris E. D. Cellular copper transport and metabolism. *Annu Rev Nutr.* 2000; 20: 291-310. doi: [10.1146/annurev.nutr.20.1.291](https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.20.1.291). PMID: 10940336. [accesat la 31.04.2020].
71. Uauy R., Olivares M., Gonzalez M. Essentiality of copper in humans. *Am J Clin Nutr.* 1998 May; 67 (5 Suppl): 952S-959S. doi: [10.1093/ajcn/67.5.952S](https://doi.org/10.1093/ajcn/67.5.952S). PMID: 9587135. [accesat la 31.04.2020].
72. Yuzbasiyan-Gurkan V., Grider A., Nostrant T., Cousins R. J., Brewer G. J. Treatment of Wilson's disease with zinc: X. Intestinal metallothionein induction. *J Lab Clin Med.* 1992 Sep; 120 (3): 380-6. PMID: 1517684. [accesat 02.05.2020].
73. Fischer P. W., Giroux A., L'Abbé M. R. The effect of dietary zinc on intestinal copper absorption. *Am J Clin Nutr.* 1981 Sep; 34 (9): 1670-5. doi: [10.1093/ajcn/34.9.1670](https://doi.org/10.1093/ajcn/34.9.1670). PMID: 7282591. [accesat 02.05.2020].
74. Kawata M., Suzuki K. T. Relation between metal and glutathione concentrations in mouse liver after cadmium, zinc or copper loading. *Toxicol Lett.* 1983 Feb; 15 (2-3): 131-7. doi: [10.1016/0378-4274\(83\)90206-0](https://doi.org/10.1016/0378-4274(83)90206-0). PMID: 6829037. [accesat 02.05.2020].
75. Chao P. Y., Allen K. G. Glutathione production in copper-deficient isolated rat hepatocytes. *Free Radic Biol Med.* 1992; 12 (2): 145-50. doi: [10.1016/0891-5849\(92\)90008-5](https://doi.org/10.1016/0891-5849(92)90008-5). PMID: 1559618. [accesat 02.05.2020].
76. Tong K. K., McArdle H. J. Copper uptake by cultured trophoblast cells isolated from human term placenta. *Biochim Biophys Acta.* 1995 Nov 30; 1269 (3): 233-6. doi: [10.1016/0167-4889\(95\)00123-6](https://doi.org/10.1016/0167-4889(95)00123-6). PMID: 7495875. [accesat 02.05.2020].
77. Goodman V. L., Brewer G. J., Merajver S. D. Copper deficiency as an anti-cancer strategy. *Endocr Relat Cancer.* 2004 Jun; 11 (2): 255-63. doi: [10.1677/erc.0.0110255](https://doi.org/10.1677/erc.0.0110255). PMID: 15163301. [accesat 02.05.2020].
78. Murugkar A., Unnikrishnan B., Padhye S., Bhonde R., Teat S. et al. Hormone anchored metal complexes. 1. Synthesis, structure, spectroscopy and in vitro antitumor activity of testosterone acetate thiosemicarbazone and its metal complexes. *Met Based Drugs.* 1999; 6 (3): 177-82. doi: [10.1155/MBD.1999.177](https://doi.org/10.1155/MBD.1999.177). PMID: 18472909; PMCID: PMC2366831. [accesat 20.05.2020].
79. Saryan L. A., Ankel E., Krishnamurti C., Petering D. H., Elford H. Comparative cytotoxic and biochemical effects of ligands and metal complexes of alpha-N-heterocyclic carboxaldehyde thiosemicarbazones. *J Med Chem.* 1979 Oct; 22 (10): 1218-21. doi: [10.1021/jm00196a013](https://doi.org/10.1021/jm00196a013). PMID: 513069. [accesat 20.05.2020].
80. Antholine W. E., Knight J. M., Petering D. H. Inhibition of tumor cell transplantability by iron and copper complexes of 5-substituted 2-formylpyridine thiosemicarbazones. *J Med Chem.* 1976 Feb; 19 (2): 339-41. doi: [10.1021/jm00224a030](https://doi.org/10.1021/jm00224a030). PMID: 1249818. [accesat 20.05.2020].
81. Scovill J. P., Klayman D. L., Franchino C. F. 2-Acetylpyridine thiosemicarbazones. 4. Complexes with transition metals as antimalarial and antileukemic agents. *J Med Chem.* 1982 Oct; 25 (10): 1261-4. doi: [10.1021/jm00352a036](https://doi.org/10.1021/jm00352a036). PMID: 6754934. [accesat 20.05.2020].
82. Jayanthi K., Meena R., Chithra K. et al. Synthesis And Microbial Evaluation of Copper(II) Complexes of Schiff Base Ligand Derived From 3-Methoxysalicylaldehyde With

- Semicarbazide and Thiosemicarbazide. *J Pharm Chem Biol Sci*, September-November 2017; 5 (3): 205-215.
83. Haque M. M., Kudrat-E-Zahan Md., Banu L. A., Islam M. S., M. Islam S. Synthesis and Characterization with Antineoplastic, Biochemical, Cytotoxic, and Antimicrobial Studies of Schiff Base Cu(II) Ion Complexes. January 2015, - *Bioinorganic Chemistry and Applications*. doi.org/10.1155/2015/923087. [accesat 20.05.2020].
 84. Rostas A. M., Badea M., Ruta L. L., Farcasanu I. C., Maxim C., Chifiriuc M. C. et al. Copper(II) Complexes with Mixed Heterocycle Ligands as Promising Antibacterial and Antitumor Species. *Molecules*. 2020 Aug 19; 25 (17): 3777. [doi: 10.3390/molecules25173777](https://doi.org/10.3390/molecules25173777). PMID: 32825156; PMCID: PMC7504215. [accesat 22.05.2020].
 85. Finch R. A., Liu M., Grill S. P., Rose W. C., Loomis R., Vasquez K. M. et al. Triapine (3-aminopyridine-2-carboxaldehyde- thiosemicarbazone): A potent inhibitor of ribonucleotide reductase activity with broad spectrum antitumor activity. *Biochem Pharmacol*. 2000 Apr 15; 59 (8): 983-91. [doi: 10.1016/s0006-2952\(99\)00419-0](https://doi.org/10.1016/s0006-2952(99)00419-0). PMID: 10692563. . [accesat 22.05.2020].
 86. Larsen A. K., Skladanowski A. Cellular resistance to topoisomerase-targeted drugs: from drug uptake to cell death. *Biochim Biophys Acta*. 1998 Oct 1; 1400 (1-3): 257-74. [doi: 10.1016/s0167-4781\(98\)00140-7](https://doi.org/10.1016/s0167-4781(98)00140-7). PMID: 9748618. [accesat 22.05.2020].
 87. Zeglis B. M., Divilov V., Lewis J. S. Role of metalation in the topoisomerase II α inhibition and antiproliferation activity of a series of α -heterocyclic-N4-substituted thiosemicarbazones and their Cu(II) complexes. *J Med Chem*. 2011 Apr 14; 54 (7): 2391-8. [doi: 10.1021/jm101532u](https://doi.org/10.1021/jm101532u). Epub 2011 Mar 10. PMID: 21391686; PMCID: PMC4151564. [accesat 22.05.2020].
 88. Wilson J. T., Jiang X., McGill B. C., Lisic E. C., Dewese J. E. Examination of the Impact of Copper(II) α -(N)-Heterocyclic Thiosemicarbazone Complexes on DNA Topoisomerase II α . *Chem Res Toxicol*. 2016 Apr 18; 29 (4): 649-58. [doi: 10.1021/acs.chemrestox.5b00471](https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.5b00471). Epub 2016 Mar 23. PMID: 26982206. [accesat 24.05.2020].
 89. Shakya B., Yadav P. N. Thiosemicarbazones as Potent Anticancer Agents and their Modes of Action. *Mini Rev Med Chem*. 2020; 20 (8): 638-661. [doi: 10.2174/1389557519666191029130310](https://doi.org/10.2174/1389557519666191029130310). PMID: 31660812. [accesat 24.05.2020].
 90. Larsen A. K., Escargueil A. E., Skladanowski A. Catalytic topoisomerase II inhibitors in cancer therapy. *Pharmacol Ther*. 2003 Aug; 99 (2): 167-81. [doi: 10.1016/s0163-7258\(03\)00058-5](https://doi.org/10.1016/s0163-7258(03)00058-5). PMID: 12888111. [accesat 26.05.2020].
 91. Tanaka K. The proteasome: overview of structure and functions. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*. 2009; 85 (1): 12-36. [doi: 10.2183/pjab.85.12](https://doi.org/10.2183/pjab.85.12). PMID: 19145068; PMCID: PMC3524306. [accesat 26.05.2020].
 92. Morozov A. V., Karpov V. L. Proteasomes and Several Aspects of Their Heterogeneity Relevant to Cancer. *Front Oncol*. 2019 Aug 13; 9: 761. [doi: 10.3389/fonc.2019.00761](https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00761). PMID: 31456945; PMCID: PMC6700291. [accesat 26.05.2020].
 93. Chen D., Peng F., Cui Q. C., Daniel K. G., Orlu S., Liu J., Dou Q. P. Inhibition of prostate cancer cellular proteasome activity by a pyrrolidine dithiocarbamate-copper complex is associated with suppression of proliferation and induction of apoptosis. *Front Biosci*. 2005 Sep 1; 10: 2932-9. [doi: 10.2741/1749](https://doi.org/10.2741/1749). PMID: 15970547. [accesat 26.05.2020].

94. Pang H., Chen D., Cui Q. C., Dou Q. P. Sodium diethyldithiocarbamate, an AIDS progression inhibitor and a copper-binding compound, has proteasome-inhibitory and apoptosis-inducing activities in cancer cells. *Int J Mol Med*. 2007 May;19 (5): 809-16. PMID: 17390087. [accesat 29.05.2020].
95. Hindo S. S., Frezza M., Tomco D., Heeg M. J., Hryhorczuk L. et al. Metals in anticancer therapy: copper(II) complexes as inhibitors of the 20S proteasome. *Eur J Med Chem*. 2009 Nov; 44 (11): 4353-61. doi: [10.1016/j.ejmech.2009.05.019](https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2009.05.019). Epub 2009 May 24. PMID: 19559507; PMCID: PMC2759842. [accesat 29.05.2020].
96. Zhang Z., Wang H., Yan M., Wang H., Zhang C. Novel copper complexes as potential proteasome inhibitors for cancer treatment (Review). *Mol Med Rep*. 2017 Jan; 15 (1): 3-11. doi: [10.3892/mmr.2016.6022](https://doi.org/10.3892/mmr.2016.6022). Epub 2016 Dec 9. PMID: 27959411. [accesat 29.05.2020].
97. Singh S., Bharti N., Mohapatra P. P. Chemistry and biology of synthetic and naturally occurring antiamoebic agents. *Chem Rev*. 2009 May; 109 (5): 1900-47. doi: [10.1021/cr068217k](https://doi.org/10.1021/cr068217k). PMID: 19374335. [accesat 31.05.2020].
98. Booth B. A., Agrawal K. C., Moore E. C., Sartorelli A. C. Alpha-(N)-heterocyclic carboxaldehyde thiosemicarbazone inhibitors of ribonucleoside diphosphate reductase. *Cancer Res*. 1974 Jun; 34 (6): 1308-14. PMID: 4363653. [accesat 31.05.2020].
99. Pitucha M., Korga-Plewko A., Czyłkowska A., Rogalewicz B., Drozd M., Iwan M. et al. Influence of Complexation of Thiosemicarbazone Derivatives with Cu (II) Ions on Their Antitumor Activity against Melanoma Cells. *Int J Mol Sci*. 2021 Mar 18; 22 (6): 3104. doi: [10.3390/ijms22063104](https://doi.org/10.3390/ijms22063104). PMID: 33803618; PMCID: PMC8002893. [accesat 31.05.2020].
100. Fu Q., Gao Z. Y., Zhang J., Sun H. Y., Liu C., Ren J. H. Copper thiosemicarbazones: Anti -proliferative action against C6 glioma cells. *Bangladesh J Pharmacol*. 2017; 12: 466-73. [accesat 02.06.2020].
101. Winterbourn C. C. Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. *Nat Chem Biol*. 2008 May; 4 (5): 278-86. doi: [10.1038/nchembio.85](https://doi.org/10.1038/nchembio.85). PMID: 18421291. [accesat 02.06.2020].
102. Cairns R. A., Harris I. S., Mak T. W. Regulation of cancer cell metabolism. *Nat Rev Cancer*. 2011 Feb; 11 (2): 85-95. doi: [10.1038/nrc2981](https://doi.org/10.1038/nrc2981). PMID: 21258394. [accesat 02.06.2020].
103. Sies H., Jones D. P. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2020 Jul; 21 (7): 363-383. doi: [10.1038/s41580-020-0230-3](https://doi.org/10.1038/s41580-020-0230-3). Epub 2020 Mar 30. PMID: 32231263. [accesat 02.06.2020].
104. Zhang J., Wang X. V., Vikash Ye Q., Wu D. et al. ROS and ROS-Mediated Cellular Signaling. *Oxid Med Cell Longev*. 2016; 2016: 4350965. doi: [10.1155/2016/4350965](https://doi.org/10.1155/2016/4350965). Epub 2016 Feb 22. PMID: 26998193; PMCID: PMC4779832. [accesat 05.06.2020].
105. Malarz K., Mrozek-Wilczkiewicz A., Serda M., Rejmund M., Polanski J., Musiol R. The role of oxidative stress in activity of anticancer thiosemicarbazones. *Oncotarget*. 2018 Apr 3; 9 (25): 17689-17710. doi: [10.18632/oncotarget.24844](https://doi.org/10.18632/oncotarget.24844). PMID: 29707141; PMCID: PMC5915149. [accesat 05.06.2020].
106. Gupte A., Mumper R. J. Elevated copper and oxidative stress in cancer cells as a target for cancer treatment. *Cancer Treat Rev*. 2009 Feb; 35 (1): 32-46. doi: [10.1016/j.ctrv.2008.07.004](https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2008.07.004). Epub 2008 Sep 6. PMID: 18774652. [accesat 05.06.2020].

107. Kalinowski D. S., Yu Y., Sharpe P. C., Islam M., Liao Y. T. et al. Design, synthesis, and characterization of novel iron chelators: structure-activity relationships of the 2-benzoylpyridine thiosemicarbazone series and their 3-nitrobenzoyl analogues as potent antitumor agents. *J Med Chem*. 2007 Jul 26; 50 (15): 3716-29. doi: [10.1021/jm070445z](https://doi.org/10.1021/jm070445z). Epub 2007 Jun 30. PMID: 17602603. [accesat 05.06.2020].
108. Richardson D. R., Sharpe P. C., Lovejoy D., Senaratne D., Kalinowski D. S. et al. Dipyriddy thiosemicarbazone chelators with potent and selective antitumor activity form iron complexes with redox activity. *J Med Chem*. 2006 Nov 2; 49 (22): 6510-21. doi: [10.1021/jm0606342](https://doi.org/10.1021/jm0606342). PMID: 17064069. [accesat 08.06.2020].
109. Yuan J., Lovejoy D. B., Richardson D. R. Novel di-2-pyridyl-derived iron chelators with marked and selective antitumor activity: in vitro and in vivo assessment. *Blood*. 2004 Sep 1; 104 (5): 1450-8. doi: [10.1182/blood-2004-03-0868](https://doi.org/10.1182/blood-2004-03-0868). Epub 2004 May 18. PMID: 15150082. [accesat 08.06.2020].
110. Lovejoy D. B., Jansson P. J., Brunk U. T., Wong J., Ponka P., Richardson D. R. Antitumor activity of metal-chelating compound Dp44mT is mediated by formation of a redox-active copper complex that accumulates in lysosomes. *Cancer Res*. 2011 Sep 1; 71 (17): 5871-80. doi: [10.1158/0008-5472](https://doi.org/10.1158/0008-5472). CAN-11-1218. Epub 2011 Jul 12. PMID: 21750178. [accesat 08.06.2020].
111. Bernhardt P. V., Sharpe P. C., Islam M., Lovejoy D. B., Kalinowski D. S. et al. Iron chelators of the dipyriddyketone thiosemicarbazone class: precomplexation and transmetalation effects on anticancer activity. *J Med Chem*. 2009 Jan 22; 52 (2): 407-15. doi: [10.1021/jm801012z](https://doi.org/10.1021/jm801012z). PMID: 19090766. [accesat 11.06.2020].
112. Marzano C., Pellei M., Tisato F., Santini C. Copper complexes as anticancer agents. *Anticancer Agents Med Chem*. 2009 Feb; 9 (2): 185-211. doi: [10.2174/187152009787313837](https://doi.org/10.2174/187152009787313837). PMID: 19199864. [accesat 11.06.2020].
113. Richardson D., Baker E. (1992) Two mechanisms of iron uptake from transferrin by melanoma cells. The effect of desferrioxamine and ferric ammonium citrate. *J Biol Chem* 267: 13972–13979. [accesat 11.06.2020].
114. Trinder D., Zak O., Aisen P. Transferrin receptor-independent uptake of differic transferrin by human hepatoma cells with antisense inhibition of receptor expression. *Hepatology*. 1996 Jun; 23 (6): 1512-20. doi: [10.1053/jhep.1996.v23.pm0008675172](https://doi.org/10.1053/jhep.1996.v23.pm0008675172). PMID: 8675172. [accesat 21.06.2020].
115. Kalinowski D. S., Yu Y., Sharpe P. C., Islam M., Liao T. et al. Design, synthesis, and characterization of novel iron chelators: structure-activity relationships of the 2-benzoylpyridine thiosemicarbazone series and their 3-nitrobenzoyl analogues as potent antitumor agents. *J Med Chem*. 2007 Jul 26; 50 (15): 3716-29. doi: [10.1021/jm070445z](https://doi.org/10.1021/jm070445z). Epub 2007 Jun 30. PMID: 17602603. [accesat 21.06.2020].
116. Lukmantara A. Y., Kalinowski D. S., Kumar N., Richardson D. R. Synthesis and biological evaluation of substituted 2-benzoylpyridine thiosemicarbazones: novel structure-activity relationships underpinning their anti-proliferative and chelation efficacy. *Bioorg Med Chem Lett*. 2013 Feb 15; 23 (4): 967-74. doi: [10.1016/j.bmcl.2012.12.044](https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2012.12.044). Epub 2012 Dec 21. PMID: 23312948. [accesat 21.06.2020].

117. Stefani C., Punnia-Moorthy G., Lovejoy D. B., Jansson P. J., Kalinowski D. S. et al. Halogenated 2'-benzoylpyridine thiosemicarbazone (XBpT) chelators with potent and selective anti-neoplastic activity: relationship to intracellular redox activity. *J Med Chem*. 2011 Oct 13; 54 (19): 6936-48. doi: 10.1021/jm200924c. Epub 2011 Sep 15. PMID: 21846118. [accesat 21.06.2020].
118. El-wakiel N., El-keiy M., Gaber M. Synthesis, spectral, antitumor, antioxidant and antimicrobial studies on Cu(II), Ni(II) and Co(II) complexes of 4-[(1H-Benzoimidazol-2-ylimino)-methyl]-benzene-1,3-diol. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*. 2015 Aug 5; 147: 117-23. doi: 10.1016/j.saa.2015.03.020. Epub 2015 Mar 19. PMID: 25827773. [accesat 21.06.2020].
119. Pereira R. M., Andrades N. E., Paulino N., Sawaya A. C., Eberlin M. N. et al. Synthesis and characterization of a metal complex containing naringin and Cu, and its antioxidant, antimicrobial, antiinflammatory and tumor cell cytotoxicity. *Molecules*. 2007 Jul 9; 12 (7): 1352-66. doi: 10.3390/12071352. PMID: 17909491; PMCID: PMC6149475. [accesat 21.06.2020].
120. Anitha P., Chitrapriya N., Jang Y. J., Viswanathamurthi P. Synthesis, characterization, DNA interaction, antioxidant and anticancer activity of new ruthenium(II) complexes of thiosemicarbazone/semicarbazone bearing 9,10-phenanthrenequinone. *J Photochem Photobiol B*. 2013 Dec 5; 129: 17-26. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2013.09.005. Epub 2013 Oct 4. PMID: 24144689. [accesat 25.06.2020].
121. Gujarathi J. R., Pawar N. S., Bendre R. S. Synthesis, spectral and antioxidant assay of Nickel (II) adducts with heterocyclic bases derived from 5-chloro-2-hydroxy acetophenone N methyl thiosemicarbazone. *Pharm Chem*; 2013, 5 (4): 120-125. *Scholars Research Library*. [accesat 25.06.2020].
122. Pahontu E., Fala V., Gulea A., Poirier D., Tapcov V., Rosu T. Synthesis and characterization of some new Cu(II), Ni(II) and Zn(II) complexes with salicylidene thiosemicarbazones: antibacterial, antifungal and in vitro antileukemia activity. *Molecules*. 2013 Jul 24; 18 (8): 8812-36. doi: 10.3390/molecules18088812. PMID: 23887722; PMCID: PMC6269917. [accesat 25.06.2023].
123. Ott I. On the medicinal chemistry of gold complexes as anticancer drugs. *Coord Chem Rev* 2009; 253: 1670–81. doi:10.1016/j.ccr.2009.02.019. [accesat 25.06.2023].
124. Asha K. R., Heggodu G. R., Gudasi K. B., Advi Rao G. M. In Vitro Cytotoxicity And Free Radical Scavenging Potential of Ethyl Pyruvate Derived Copper Complexes of Thiosemicarbazone. *Int J Pharm Pharm Sci*, 2015, Vol 7, Supple 1, 128-132. [accesat 28.06.2020].
125. Malik M. A., Dar O. A., Gull P., Wani M. Y., Hashmi A. A. Heterocyclic Schiff base transition metal complexes in antimicrobial and anticancer chemotherapy. *Medchemcomm*. 2017 Dec 6; 9 (3): 409-436. doi: 10.1039/c7md00526a. PMID: 30108933; PMCID: PMC6071736. [accesat 28.06.2020].
126. Yang F., Pei R., Zhang Z., Liao J., Yu W. et al. Copper induces oxidative stress and apoptosis through mitochondria-mediated pathway in chicken hepatocytes. *Toxicol In Vitro*. 2019 Feb; 54: 310-316. doi: 10.1016/j.tiv.2018.10.017. Epub 2018 Oct 30. PMID: 30389602. [accesat 29.06.2020].

127. Aishajiang R., Liu Z., Wang T., Zhou L., Yu D. Recent Advances in Cancer Therapeutic Copper-Based Nanomaterials for Antitumor Therapy. *Molecules*. 2023 Mar 1; 28 (5): 2303. doi: [10.3390/molecules28052303](https://doi.org/10.3390/molecules28052303). PMID: 36903549; PMCID: PMC10005215. [accesat 29.06.2020].
128. Maiuri M. C., Zalckvar E., Kimchi A., Kroemer G. Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007 Sep; 8 (9): 741-52. doi: [10.1038/nrm2239](https://doi.org/10.1038/nrm2239). PMID: 17717517. [accesat 29.06.2020].
129. Tsvetkov P., Coy S., Petrova B., Dreishpoon M., Verma A., Abdusamad M..et al. Copper induces cell death by targeting lipoylated TCA cycle proteins. *Science*. 2022 Mar 18; 375 (6586): 1254-1261. doi: [10.1126/science.abf0529](https://doi.org/10.1126/science.abf0529). Epub 2022 Mar 17. *Erratum in: Science*. 2022 Apr 22; 376 (6591): eabq 4855. PMID: 35298263; PMCID: PMC9273333. [accesat 15.07.2020].
130. Daniel K. G., Chen D., Orlu S., Cui Q. C., Miller F. R. et al. Clioquinol and pyrrolidine dithiocarbamate complex with copper to form proteasome inhibitors and apoptosis inducers in human breast cancer cells. *Breast Cancer Res*. 2005; 7 (6): R897-908. doi: [10.1186/bcr1322](https://doi.org/10.1186/bcr1322). Epub 2005 Sep 20. PMID: 16280039; PMCID: PMC1410741. [accesat 15.07.2020].
131. Chen D., Peng F., Cui Q. C., Daniel K. G., Orlu S. et al. Inhibition of prostate cancer cellular proteasome activity by a pyrrolidine dithiocarbamate-copper complex is associated with suppression of proliferation and induction of apoptosis. *Front Biosci*. 2005 Sep 1; 10: 2932-9. doi: [10.2741/1749](https://doi.org/10.2741/1749). PMID: 15970547. [accesat 15.07.2020].
132. Milacic V., Chen D., Giovagnini L., Diez A., Fregona D. et al. Pyrrolidine dithiocarbamate-zinc(II) and -copper(II) complexes induce apoptosis in tumor cells by inhibiting the proteasomal activity. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2008 Aug 15; 231 (1): 24-33. doi: [10.1016/j.taap.2008.03.009](https://doi.org/10.1016/j.taap.2008.03.009). Epub 2008 Mar 28. PMID: 18501397; PMCID: PMC3763700. [accesat 15.07.2020].
133. Rabbab O., Yvonne E. M., Nial J. W. The side effects of platinum-based chemotherapy drugs: a review for chemists. *Dalton Trans*. 2018; 47 (19): 8845-6653. doi: [10.1039/c8DT00838H](https://doi.org/10.1039/c8DT00838H). [accesat 17.07.2020].
134. Krasnovskaya O., Naumov A., Guk D., Gorelkin P., Erofeev A. et al. Copper Coordination Compounds as Biologically Active Agents. *Int J Mol Sci*. 2020 May 31; 21 (11): 3965. doi: [10.3390/ijms21113965](https://doi.org/10.3390/ijms21113965). PMID: 32486510; PMCID: PMC7312030. [accesat 17.07.2020].
135. Gaál A., Orgován G., Mihucz V. G., Pape I., Ingerle D., et al. Metal transport capabilities of anticancer copper chelators. *J Trace Elem Med Biol*. 2018 May; 47: 79-88. doi: [10.1016/j.jtemb.2018.01.011](https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2018.01.011). Epub 2018 Feb 16. PMID: 29544811. [accesat 17.07.2020].
136. Chen X., Zhang X., Chen J., Yang Q., Yang L. et al. Hinokitiol copper complex inhibits proteasomal deubiquitination and induces paraptosis-like cell death in human cancer cells. *Eur J Pharmacol*. 2017 Nov 15; 815: 147-155. doi: [10.1016/j.ejphar.2017.09.003](https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2017.09.003). Epub 2017 Sep 5. PMID: 28887042. [accesat 17.07.2020].
137. Qin Q. P., Meng T., Tan M. X., Liu Y. C., Luo X. J. et al. Synthesis, crystal structure and biological evaluation of a new dasatinib copper(II) complex as telomerase inhibitor. *Eur J Med Chem*. 2018 Jan 1; 143: 1597-1603. doi: [10.1016/j.ejmech.2017.10.058](https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.10.058). Epub 2017 Oct 25. PMID: 29133054. [accesat 17.07.2020].

138. Fatfat M., Merhi R. A., Rahal O., Stoyanovsky D. A., Zaki A. et al. Copper chelation selectively kills colon cancer cells through redox cycling and generation of reactive oxygen species. *BMC Cancer*. 2014 Jul 21; 14:527. doi: [10.1186/1471-2407-14-527](https://doi.org/10.1186/1471-2407-14-527). PMID: 25047035; PMCID: PMC4223620. [accesat 17.07.2020].
139. Sangeetha S., Murali M. Non-covalent DNA binding, protein interaction, DNA cleavage and cytotoxicity of [Cu(quamol)Cl]·H₂O. *Int J Biol Macromol*. 2018 Feb; 107 (Pt B): 2501-2511. doi: [10.1016/j.ijbiomac.2017.10.131](https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.10.131). Epub 2017 Nov 11. PMID: 29104051. [accesat 17.07.2020].
140. Martinez-Bulit P., Garza-Ortíz A. Mijangos E., Barrón-Sosa L., Sánchez-Bartéz F. et al. 2,6-Bis(2,6-diethylphenyliminomethyl)pyridine coordination compounds with cobalt(II), nickel(II), copper(II), and zinc(II): synthesis, spectroscopic characterization, X-ray study and *in vitro* cytotoxicity. *J Inorg Biochem*. 2015 Jan; 142: 1-7. doi: [10.1016/j.jinorgbio.2014.09.007](https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2014.09.007). Epub 2014 Sep 22. PMID: 25282405. [accesat 17.07.2020].
141. Zhao F., Wang W., Lu W., Xu L., Yang S. et al. High anticancer potency on tumor cells of dehydroabietylamine Schiff-base derivatives and a copper(II) complex. *Eur J Med Chem*. 2018 Feb 25; 146: 451-459. doi: [10.1016/j.ejmech.2018.01.041](https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.01.041). Epub 2018 Feb 4. PMID: 29407970. [accesat 27.07.2020].
142. Chudal L., Pandey N. K., Phan J., Johnson O., Lin L. et al. Copper-Cysteamine Nanoparticles as a Heterogeneous Fenton-Like Catalyst for Highly Selective Cancer Treatment. *ACS Appl Bio Mater*. 2020 Mar 16; 3 (3): 1804-1814. doi: [10.1021/acsabm.0c00098](https://doi.org/10.1021/acsabm.0c00098). Epub 2020 Feb 21. PMID: 35021670. [accesat 27.07.2020].
143. Russell W. M. S., Burch R. L. 1959. (as reprinted 1992). The principles of humane experimental technique. Wheathampstead (UK): *Universities Federation for Animal Welfare*.
144. Graur V., Savcin S., Tsapkov V., Gulea A. Synthesis and antitumor activity of copper, nickel and cobalt coordination compounds with 1-(2-hydroxyphenyl)ethanone N(4)-allyl-3-thiosemicarbazone. In: *Studia Universitatis Moldaviae (Seria Științe Reale și ale Naturii)*, 2015, nr. 1 (81), pp. 210-215. ISSN 1814-3237.
145. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 1983, 65, 55–63.
146. Pantea V., Andronache L., Șveț I., Popușoi C. Procedeu pentru măsurarea citotoxicității celulare. *Certificat de inovator* nr. 5960 din 21.10.2022.
147. Riss T. L., Moravec R. A., Niles A. L. et al. Cell Viability Assays. 2013 May 1 [updated 2016 Jul 1].
148. Markossian S., Grossman A., Brimacombe K., Arkin M., Auld D., Austin C., Baell J. etc. Assay Guidance Manual [Internet]. Bethesda (MD): *Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences*; 2004–. PMID: 22553861. [accesat la 27.01.2023].
149. Andronache L., Șveț I., Sardari V., Gudumac V., Pantea V. Metoda de apreciere a citotoxicității. *Certificat de inovator* nr. 5668 din 24.10.2018.
150. Severgnin, M., Sherman J., Sehgal A., Narayanannair K.J., Aubin J. et al., A rapid two-step method for isolation of functional primary mouse hepatocytes: cell characterization and asialoglycoprotein receptor based assay development, *Cytotechnology*, 2012; 64 (2): 187–95.

- doi: 10.1007/s10616-011-9407-0. Epub 2011 Nov 22. PMID: 22105762; PMCID: PMC3279583. [accesat la 29.07.2020].
151. Strober W. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. *Curr Protoc Immunol.* 2015 Nov 2; 111: A3.B.1-A3.B.3. doi: 10.1002/0471142735.ima03bs111. PMID: 26529666; PMCID: PMC6716531. [accesat la 29.07.2020].
 152. Jain A., Singh D., Dubey K., Maurya R., Mittal S., et al. Models and methods for in vitro toxicology. *In In Vitro Toxicology*; doi - 10.1016/B978-0-2-804667-8.00003-1. [accesat la 29.07.2020].
 153. Pantea V., Cobzac V., Tagadiuc O., Palarie V., and Valentin Gudumac. In Vitro Evaluation of the Cytotoxic Potential of Thiosemicarbazide Coordinating Compounds in Hepatocyte Cell Culture. *MDPI Journal. Biomedicines* 2023, 11, 366. <https://doi.org/10.3390/biomedicines11020366>.
 154. Itco F., Itco T., Suzuki C., Yahata T., Ikeda K., and Hamoka K. The Application of a Modified d-ROMs Test for Measurement of Oxidative Stress and Oxidized High-Density Lipoprotein. *Int. J. Mol. Sci.* 2017, 18 (2), 454; <https://doi.org/10.3390/ijms18020454>.
 155. Andronache L., Gudumac V., Pantea V., Sardari V., Șveț I. Procedeu de determinare a metaboliților reactivi ai oxigenului. *Certificat de inovator* nr. 5671 din 24.10.2018.
 156. Toloue Pouya V., Hashemy S. I., Shoeibi A., Nosrati Tirkani A., Tavallaie S. et al. Serum Pro-Oxidant-Antioxidant Balance, Advanced Oxidized Protein Products (AOPP) and Protein Carbonyl in Patients With Stroke, *Razavi Int J Med.* 2016, 4. (2): e38203.
 157. Pantea V., Șveț I., Tagadiuc O., Gudumac V., Andronache L. Procedeu de determinare a balanței pro-oxidante –antioxidante. *Certificat de inovator* nr. 5669 din 24.10.2018.
 158. Capeillère-Blandin C., Gausson V., Descamps-Latscha B., Witko-Sarsat V. Biochemical and spectrophotometric significance of advanced oxidized protein products. *Biochim Biophys Acta.* 2004; 1689 (2): p. 91-102; <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0925443904000237?via%3Dihub>. [accesat la 06.08.2020].
 159. Gudumac V., Tagadiuc O., Andronache L., Ștîrba O., Sardari V. Procedeu de dozare a produșilor proteici de oxidare avansată. *Certificat de inovator* nr. 5164 din 14.12.2012.
 160. Галактионова Л. П., Молчанов А. В., Ельчанинова С. А., Варшавский Б. Я. Состояние перекисного окисления у больных с язвенной болезнью желудка и двенадцатиперстной кишки. *Лаб. Дело.* 1998; 6: p. 10-14.
 161. Gudumac V., Tagadiuc O., Andronache L., Ștîrba O., Pantea V. Procedeu de dozare a dialdehidei malonice în materialul biologic. *Certificat de inovator* nr. 5157 din 14.12.2012.
 162. Метельская В. А., Гуманова Н. Г. Скрининг-метод определения уровня метаболитов оксида азота в сыворотке крови человека. *Клин. лаб. д-ка.* 2005; 6: p. 15-18.
 163. Gudumac V., Tagadiuc O., Rîvneac V., Sardari V., Pantea V. et al. Investigații biochimice. Volumul II. Micrometode. *Elaborare metodică.* Tipogr. “Elena-VI”, 2010, 97 p. ISBN 978-9975-106-06-1.
 164. Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med.* 1999 May; 26 (9-10): 1231-7. doi: 10.1016/s0891-5849(98)00315-3. PMID: 10381194. [accesat la 06.08.2020].

165. Gudumac V., Rîvneac V., Tagadiuc O. et al. Metode de cercetare a metabolismului hepatic. Elaborare metodică USMF „Nicolae Testemițanu”. *Tipografia „Tehnica-Info”*. Chișinău, 2012; 162 p.
166. Zhang M., Liu N., Liu H. Determination of the total mass of antioxidant substances and antioxidant capacity per unit mass in serum using redox titration. *Bioinorg Chem Appl.* 2014; 2014:928595. doi: 10.1155/2014/928595. Epub 2014 Jul 20. PMID: 25140122; PMCID: PMC4129143. [accesat la 06.08.2020].
167. Tagadiuc O., Andronache L., Pantea V., Gudumac V., Șveț I., Sardari V. Metodă pentru determinarea capacității antioxidante totale, masei substanțelor antioxidante și a activității medii a antioxidantilor în probele biologice. *Certificat de inovator* nr. 5641 din 26.03.2018.
168. Матюшин Б. Н., Логинов А. С., Ткачев В. Д. Определение супероксиддисмутазной активности в материале пункционной биопсии печени при ее хроническом поражении. *Лаб. дело.* 1991; 10: p. 30-35.
169. Дубинина Е. Е., Сальникова Л. А., Ефимова Л. Ф. Активность и изоферментный спектр супероксиддисмутазы эритроцитов и плазмы крови. *Лаб. дело.* 1983; 10: p. 30-33.
170. Tagadiuc O., Gudumac V., Pantea V. Procedeu de dozare a activității superoxid dismutazei. *Certificat de inovator* nr. 4891 din 15.07.2010.
171. Королюк М. А., Иванова Л. И., Майорова И. Г., Токарев В. Е. Метод определения активности каталазы. *Лаб. Дело.* 1988; 1: p. 16-19.
172. Baciuc E., Nastas I. Procedeu de determinare a activității catalazei. *Certificat de inovator* nr. 3122 din 09.11.1996.
173. Wendel A. Glutathione peroxidase. In: Jakoby W. B., editor. *Enzymatic basis of detoxication.* Academic Press NY. 1980; 1: p. 333-353.
174. Tagadiuc O., Andronache L., Știrba O., Sardari V., Pantea V. Determinarea glutathione peroxidazei. *Certificat de inovator* nr. 5161 din 26.10.2012.
175. Habig W. H., Pabst M. J., Jakoby W. B. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem.* 1974; 249 (22): p. 7130-7139. Disponibil la: <https://www.jbc.org/content/249/22/7130.long>. [accesat la 06.08.2020].
176. Tagadiuc O., Sardari V., Andronache L., Știrba O., Pantea V. Determinarea glutathione-S-transferazei (GST). *Certificat de inovator* nr. 5163 din 29.10.2012.
177. Власова С. Н., Шабунина Е. И., Переслегина И. А. Активность глутатионзависимых ферментов эритроцитов при хронических заболеваниях печени у детей. *Лаб. Дело.* 1990; 8: p. 19-22.
178. Gudumac V., Tagadiuc O., Andronache L., Știrba O., Sardari V. Determinarea glutathione reductazei în eritrocite și ser sangvin. *Certificat de inovator* nr. 5172 din 06.11.2012.
179. Akerboom T. P., Sies H. Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. *Methods Enzymol.* 1981; 77: p. 373-382. Disponibil la: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0076687981770502>. [accesat la 09.08.2020].
180. Andronache L. Protocoale standardizate de cercetare a metabolismului glutationic (ghid practic). *Tipogr. “Elan Poligraf”*, 2014, 44 p. ISBN 978-9975-66-432-5.

181. Erel O., Neselioglu S. A novel and automated assay for thiol/disulphide homeostasis. *Clin Biochem.* 2014 Dec; 47 (18): 326-32. doi: [10.1016/j.clinbiochem.2014.09.026](https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2014.09.026). Epub 2014 Oct 7. PMID: 25304913. [accesat la 15.08.2020].
182. Ellman G. L. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys*, 1959; 82 (1): 70-77. Disponibil la: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/13650640/>. [accesat la 16.08.2020].
183. Hu M. L. Measurement of protein thiol groups and glutathione in plasma. *Methods Enzymol.* 1994; 233: 380-5. doi: [10.1016/s0076-6879\(94\)33044-1](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(94)33044-1). PMID: 8015473. [accesat la 16.08.2020].
184. Gudumac V., Tagadiuc O., Andronache L., Pantea V. Determinarea conținutului de grupe tiolice ale proteinelor. *Certificat de inovator* nr. 5173 din 07.11.2012.
185. McDonald J. H. Handbook of biological statistics (3rd ed.). *Sparky House Publishing, Baltimore, Maryland.* 2014. Disponibil la: <http://www.biostathandbook.com/index.html> [accesat la 17.08.2020].
186. Bogush T. A., Ravcheeva A. B., Bogush, E. A. et al. Extracellular concentration of anticancer drugs that regulates their intracellular distribution and binding to DNA in cells with multidrug resistant phenotype. *Dokl Biochem Biophys* 410, 273–277 (2006).
187. Ksenia S., Egorova and Valentine P. A. Toxicity of Metal Compounds: *Knowledge and Myths. Organometallics* 2017 36 (21), 4071 – 4090. doi :[10.1021/acs.organomet.7b00605](https://doi.org/10.1021/acs.organomet.7b00605). [accesat la 17.08.2020].
188. Kopeckova K., Eckschlager T., Sirc J., Hobzova R., Plch J. et al. Nanodrugs used in cancer therapy. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2019 Jun; 163 (2): 122-131. doi: [10.5507/bp.2019.010](https://doi.org/10.5507/bp.2019.010). Epub 2019 Apr 9. PMID: 30967685. [accesat la 17.08.2020].
189. Yuan K., Wang X., Dong H., Min W., Hao H., et al. Selective inhibition of CDK4/6: A safe and effective strategy for developing anticancer drugs. *Acta Pharm Sin B.* 2021 Jan; 11 (1): 30-54. doi: [10.1016/j.apsb.2020.05.001](https://doi.org/10.1016/j.apsb.2020.05.001). Epub 2020 May 23. PMID: 33532179; PMCID: PMC7838032. [accesat la 26.08.2020].
190. Zinn S., Vazquez-Lombardi R., Zimmermann C., Sapra P., Jermutus L. et al. Advances in antibody-based therapy in oncology. *Nat Cancer.* 2023 Feb; 4 (2): 165-180. doi: [10.1038/s43018-023-00516-z](https://doi.org/10.1038/s43018-023-00516-z). Epub 2023 Feb 20. PMID: 36806801. [accesat la 26.08.2020].
191. Pósa V., Stefanelli A., Nunes J. H. B., Hager S., Mathuber M. et al. Thiosemicarbazone Derivatives Developed to Overcome COTI-2 Resistance. *Cancers (Basel).* 2022 Sep 14; 14 (18): 4455. doi: [10.3390/cancers14184455](https://doi.org/10.3390/cancers14184455). PMID: 36139615; PMCID: PMC9497102. [accesat la 26.08.2020].
192. Sousa G., de Almeida M. C. F., Lócio L. L., Dos Santos V. L., Bezerra D. P. et al. Synthesis and Evaluation of Antiproliferative Activity, Topoisomerase II α Inhibition, DNA Binding and Non-Clinical Toxicity of New Acridine-Thiosemicarbazone Derivatives. *Pharmaceuticals (Basel).* 2022 Sep 2; 15 (9): 1098. doi: [10.3390/ph15091098](https://doi.org/10.3390/ph15091098). PMID: 36145320; PMCID: PMC9506480. [accesat la 26.08.2020].
193. Lovejoy D. B., Richardson D. R. Novel "hybrid" iron chelators derived from aroylhydrazones and thiosemicarbazones demonstrate selective antiproliferative activity against tumor cells. *Blood.* 2002 Jul 15; 100 (2): 666-76. doi: [10.1182/blood.v100.2.666](https://doi.org/10.1182/blood.v100.2.666). PMID: 12091363. [accesat la 26.08.2020].

194. Lovejoy D. B., Sharp D. M., Seebacher N., Obeidy P., Prichard T. et al. Novel second-generation di-2-pyridylketone thiosemicarbazones show synergism with standard chemotherapeutics and demonstrate potent activity against lung cancer xenografts after oral and intravenous administration in vivo. *J Med Chem.* 2012 Aug 23; 55 (16): 7230-44. doi: [10.1021/jm300768u](https://doi.org/10.1021/jm300768u). Epub 2012 Aug 3. PMID: 22861499. [accesat la 26.08.2020].
195. Ma L., Wang H., Wang J., Liu L., Zhang S. et al. Novel Steroidal 5 α ,8 α -Endoperoxide Derivatives with Semicarbazone/Thiosemicarbazone Side-chain as Apoptotic Inducers through an Intrinsic Apoptosis Pathway: Design, Synthesis and Biological Studies. *Molecules.* 2020 Mar 7; 25 (5): 1209. doi: [10.3390/molecules25051209](https://doi.org/10.3390/molecules25051209). PMID: 32156024; PMCID: PMC7179397. [accesat la 26.08.2020].
196. Niso M., Kopecka J., Abatematteo F. S., Berardi F., Riganti C. et al. Multifunctional thiosemicarbazones targeting sigma receptors: in vitro and in vivo antitumor activities in pancreatic cancer models. *Cell Oncol (Dordr).* 2021 Dec; 44 (6): 1307-1323. doi: [10.1007/s13402-021-00638-5](https://doi.org/10.1007/s13402-021-00638-5). Epub 2021 Sep 29. PMID: 34586588; PMCID: PMC8648660. [accesat la 26.08.2020].
197. Rosu T., Negoiu M., Pasculescu S., Pahontu E., Poirier D., Gulea A. Metal-based biologically active agents: Synthesis, characterization, antibacterial and antileukemia activity evaluation of Cu(II), V(IV) and Ni(II) complexes with antipyrine-derived compounds. *Eur J Med Chem.* 2010 Feb; 45 (2): 774-81. doi: [10.1016/j.ejmech.2009.10.034](https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2009.10.034). Epub 2009 Nov 4. PMID: 19944498. [accesat la 26.08.2020].
198. Berridge M. V., Herst P. M., Tan A. S. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnol Annu Rev.* 2005; 11: 127-52. doi: [10.1016/S1387-2656\(05\)11004-7](https://doi.org/10.1016/S1387-2656(05)11004-7). PMID: 16216776. [accesat la 28.08.2028].
199. Stockert J. C., Horobin R. W., Colombo L. L., Blázquez-Castro A. Tetrazolium salts and formazan products in Cell Biology: Viability assessment, fluorescence imaging, and labeling perspectives. *Acta Histochem.* 2018 Apr; 120 (3): 159-167. doi: [10.1016/j.acthis.2018.02.005](https://doi.org/10.1016/j.acthis.2018.02.005). Epub 2018 Feb 26. PMID: 29496266. [accesat la 28.08.2020].
200. Liu Y., Peterson D. A., Kimura H., Schubert D. Mechanism of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. *J Neurochem.* 1997 Aug; 69 (2): 581-93. doi: [10.1046/j.1471-4159.1997.69020581.x](https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1997.69020581.x). PMID: 9231715. [accesat la 28.08.2020].
201. Bernas T., Dobrucki J. W. The role of plasma membrane in bioreduction of two tetrazolium salts, MTT, and CTC. *Arch Biochem Biophys.* 2000 Aug 1;380(1):108-16. doi: [10.1006/abbi.2000.1907](https://doi.org/10.1006/abbi.2000.1907). PMID: 10900139. [accesat la 16.09.2020].
202. O'Brien J., Wilson., Orton T., Pognan F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur J Biochem.* 2000 Sep; 267 (17): 5421-6. doi: [10.1046/j.1432-1327.2000.01606.x](https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01606.x). PMID: 10951200. [accesat la 17.01.2021].
203. Zhang S. Z., Lipsky M. M., Trump B. F., Hsu I. C. Neutral red (NR) assay for cell viability and xenobiotic-induced cytotoxicity in primary cultures of human and rat hepatocytes. *Cell Biol Toxicol.* 1990 Apr; 6 (2): 219-34. doi: [10.1007/BF00249595](https://doi.org/10.1007/BF00249595). PMID: 2113829. [accesat la 27.02.2021].

204. Rampersad S. N. Multiple applications of Alamar Blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays. *Sensors (Basel)*. 2012; 12 (9): 12347-60. doi: [10.3390/s120912347](https://doi.org/10.3390/s120912347). Epub 2012 Sep 10. PMID: 23112716; PMCID: PMC3478843. [accesat la 27.02.2021].
205. Turan-Zitouni G., Altıntop M. D., Özdemir A., Kaplancıklı Z. A., Çiftçi G. A. et al. Synthesis and evaluation of bis-thiazole derivatives as new anticancer agents. *Eur J Med Chem*. 2016 Jan 1; 107: 288-94. doi: [10.1016/j.ejmech.2015.11.002](https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.11.002). Epub 2015 Nov 5. PMID: 26599534. [accesat la 27.02.2021].
206. Tumosienė I., Kantminienė K., Klevinskas A., Petrikaitė V., Jonuškienė I. et al. Antioxidant and Anticancer Activity of Novel Derivatives of 3-[(4-Methoxyphenyl)amino]propane-hydrazide. *Molecules*. 2020 Jun 29; 25 (13): 2980. doi: [10.3390/molecules25132980](https://doi.org/10.3390/molecules25132980). PMID: 32610506; PMCID: PMC7412228. [accesat la 17.03.2021].
207. Han J., Jun Y., Kim S. H., Hoang H. H., Jung Y., Kim S. et al. Rapid emergence and mechanisms of resistance by U87 glioblastoma cells to doxorubicin in an in vitro tumor microfluidic ecology. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016 Dec 13; 113 (50): 14283-14288. doi: [10.1073/pnas.1614898113](https://doi.org/10.1073/pnas.1614898113). Epub 2016 Nov 22. PMID: 27911816; PMCID: PMC5167174. [accesat la 17.03.2021].
208. Harford-Wright E., Bidère N., Gavard J. β -escin selectively targets the glioblastoma-initiating cell population and reduces cell viability. *Oncotarget*. 2016 Oct 11; 7 (41): 66865-66879. doi: [10.18632/oncotarget.11784](https://doi.org/10.18632/oncotarget.11784). PMID: 27589691; PMCID: PMC5341843. [accesat la 17.03.2021].
209. Soares M. A., Lessa J. A., Mendes I. C., Da Silva J. G., Dos Santos R. G. et al. N⁴-Phenyl-substituted 2-acetylpyridine thiosemicarbazones: cytotoxicity against human tumor cells, structure-activity relationship studies and investigation on the mechanism of action. *Bioorg Med Chem*. 2012 Jun 1; 20 (11): 3396-409. doi: [10.1016/j.bmc.2012.04.027](https://doi.org/10.1016/j.bmc.2012.04.027). Epub 2012 Apr 19. PMID: 22564383. [accesat la 25.02.2022].
210. Kaproń B., Czarnomysy R., Radomska D., Bielawski K., Plech T. Thiosemicarbazide Derivatives Targeting Human TopoII α and IDO-1 as Small-Molecule Drug Candidates for Breast Cancer Treatment. *Int J Mol Sci*. 2023 Mar 18; 24 (6): 5812. doi: [10.3390/ijms24065812](https://doi.org/10.3390/ijms24065812). PMID: 36982886; PMCID: PMC10051798. [accesat la 25.02.2022].
211. Khan A. A., Ahmad R., Alanazi A. M., Alsaif N., Abdullah M. et al. Determination of anticancer potential of a novel pharmacologically active thiosemicarbazone derivative against colorectal cancer cell lines. *Saudi Pharm J*. 2022 Jun; 30 (6): 815-824. doi: [10.1016/j.jsps.2022.03.011](https://doi.org/10.1016/j.jsps.2022.03.011). Epub 2022 Mar 31. PMID: 35812146; PMCID: PMC9257852. [accesat la 25.02.2022].
212. Pitucha M., Korga-Plewko A., Czyłkowska A., Rogalewicz B., Drozd M. et al. Influence of Complexation of Thiosemicarbazone Derivatives with Cu (II) Ions on Their Antitumor Activity against Melanoma Cells. *Int J Mol Sci*. 2021 Mar 18; 22 (6): 3104. doi: [10.3390/ijms22063104](https://doi.org/10.3390/ijms22063104). PMID: 33803618; PMCID: PMC8002893. [accesat la 28.03.2021].
213. Juszczak M., Matysiak J., Niewiadomy A., Rzeski W. The activity of a new 2-amino-1,3,4-thiadiazole derivative 4ClABT in cancer and normal cells. *Folia Histochem Cytobiol*. 2011; 49 (3): 436-44. doi: [10.5603/fhc.2011.0062](https://doi.org/10.5603/fhc.2011.0062). PMID: 22038223. [accesat la 28.03.2021].
214. Calabrese E. J., Mattson M. P. How does hormesis impact biology, toxicology, and medicine? *NPJ Aging Mech Dis*. 2017 Sep 15; 3: 13. doi: [10.1038/s41514-017-0013-z](https://doi.org/10.1038/s41514-017-0013-z). Erratum in: *NPJ*

- Aging*. 2023 Mar 31; 9 (1): 6. PMID: 28944077; PMCID: PMC5601424. [accesat la 28.03.2021].
215. Mattson M. P. Hormesis defined. *Ageing Res Rev*. 2008 Jan; 7 (1): 1-7. doi: [10.1016/j.arr.2007.08.007](https://doi.org/10.1016/j.arr.2007.08.007). Epub 2007 Dec 5. PMID: 18162444; PMCID: PMC2248601. [accesat la 27.04.2021].
 216. Sinopoli A., Magri A., Milardi D., Pappalardo M., Pucci P. et al. The role of copper(II) in the aggregation of human amylin. *Metallomics*. 2014 Oct; 6 (10): 1841-52. doi: [10.1039/c4mt00130c](https://doi.org/10.1039/c4mt00130c). Epub 2014 Aug 1. PMID: 25080969. [accesat la 27.04.2021].
 217. MacPherson I. S., Murphy M. E. Type-2 copper-containing enzymes. *Cell Mol Life Sci*. 2007 Nov; 64 (22): 2887-99. doi: [10.1007/s00018-007-7310-9](https://doi.org/10.1007/s00018-007-7310-9). PMID: 17876515. [accesat la 17.06.2021].
 218. Chen X., Zhang X., Chen J., Yang Q., Yang L., Xu D. et al. Hinokitiol copper complex inhibits proteasomal deubiquitination and induces paraptosis-like cell death in human cancer cells. *Eur J Pharmacol*. 2017 Nov 15; 815: 147-155. doi: [10.1016/j.ejphar.2017.09.003](https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2017.09.003). Epub 2017 Sep 5. PMID: 28887042. [accesat la 17.06.2021].
 219. Zeeshan M., Murugadas A., Ghaskadbi S., Rajendran R. B., Akbarsha M. A. ROS dependent copper toxicity in Hydra-biochemical and molecular study. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 2016 Jul-Aug; 185-186: 1-12. doi: [10.1016/j.cbpc.2016.02.008](https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2016.02.008). Epub 2016 Mar 3. PMID: 26945520. [accesat la 17.06.2021].
 220. Qin Q. P., Meng T., Tan M. X., Liu Y. C., Luo X. J. et al. Synthesis, crystal structure and biological evaluation of a new dasatinib copper(II) complex as telomerase inhibitor. *Eur J Med Chem*. 2018 Jan 1; 143: 1597-1603. doi: [10.1016/j.ejmech.2017.10.058](https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.10.058). Epub 2017 Oct 25. PMID: 29133054. [accesat la 22.08.2021].
 221. Liao Y., Zhao J., Bulek K., Tang F., Chen X. et al. Inflammation mobilizes copper metabolism to promote colon tumorigenesis via an IL-17-STEAP4-XIAP axis. *Nat Commun*. 2020 Feb 14; 11(1): 900. doi: [10.1038/s41467-020-14698-y](https://doi.org/10.1038/s41467-020-14698-y). PMID: 32060280; PMCID: PMC7021685. [accesat la 22.08.2021].
 222. Jamwal M., Sharma P., Das R. Laboratory Approach to Hemolytic Anemia. *Indian J Pediatr*. 2020 Jan; 87 (1): 66-74. doi: [10.1007/s12098-019-03119-8](https://doi.org/10.1007/s12098-019-03119-8). Epub 2019 Dec 10. PMID: 31823208. [accesat la 14.03.2022].
 223. Ali S., Mumtaz S., Shakir H. A., Khan M., Tahir H. M. et al. Current status of beta-thalassemia and its treatment strategies. *Mol Genet Genomic Med*. 2021 Dec; 9 (12): e1788. doi: [10.1002/mgg3.1788](https://doi.org/10.1002/mgg3.1788). Epub 2021 Nov 5. PMID: 34738740; PMCID: PMC8683628. [accesat la 14.03.2022].
 224. James A. H. Iron Deficiency Anemia in Pregnancy. *Obstet Gynecol*. 2021 Oct 1; 138 (4): 663-674. doi: [10.1097/AOG.0000000000004559](https://doi.org/10.1097/AOG.0000000000004559). PMID: 34623079. [accesat la 14.03.2023].
 225. Gasparyan A. Y., Ayvazyan L., Mukanova U., Yessirkepov M., Kitas G. D. The Platelet-to-Lymphocyte Ratio as an Inflammatory Marker in Rheumatic Diseases. *Ann Lab Med*. 2019 Jul; 39 (4): 345-357. doi: [10.3343/alm.2019.39.4.345](https://doi.org/10.3343/alm.2019.39.4.345). PMID: 30809980; PMCID: PMC6400713. [accesat la 14.03.2022].
 226. Pan L., Du J., Li T., Liao H. Platelet-to-lymphocyte ratio and neutrophil-to-lymphocyte ratio associated with disease activity in patients with Takayasu's arteritis: a case-control study. *BMJ*

- Open*. 2017 May 4; 7 (4): e014451. doi: 10.1136/bmjopen-2016-014451. PMID: 28473512; PMCID: PMC5623399. [accesat la 14.03.2022].
227. Qin B., Ma N., Tang Q., Wei T., Yang M. et al. Neutrophil to lymphocyte ratio (NLR) and platelet to lymphocyte ratio (PLR) were useful markers in assessment of inflammatory response and disease activity in SLE patients. *Mod Rheumatol*. 2016; 26 (3): 372-6. doi: 10.3109/14397595.2015.1091136. Epub 2016 Mar 4. PMID: 26403379. [accesat la 19.04.2022].
 228. Tural K., Kara F., Avcı S., Erdoğan H. İ. Can complete blood cell count parameters predict deep vein thrombosis? *Acta Clin Croat*. 2020 Dec; 59 (4): 661-666. doi: 10.20471/acc.2020.59.04.12. PMID: 34285436; PMCID: PMC8253064. [accesat la 19.04.2022].
 229. Stockklausner C., Duffert C. M., Cario H., Knöfler R., Streif W. et al. THROMKID-Plus Studiengruppe der Gesellschaft für Thrombose- und Hämostaseforschung (GTH) and of Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie (GPOH). Thrombocytosis in children and adolescents-classification, diagnostic approach, and clinical management. *Ann Hematol*. 2021 Jul; 100 (7): 1647-1665. doi: 10.1007/s00277-021-04485-0. Epub 2021 Mar 12. PMID: 33712866; PMCID: PMC8195939. [accesat la 19.04.2022].
 230. Papaioannou A. I., Loukides S., Bakakos P. Identification of asthma phenotypes using blood cell count. *EBioMedicine*. 2022 Mar; 77: 103907. doi: 10.1016/j.ebiom.2022.103907. Epub 2022 Feb 25. PMID: 35228016; PMCID: PMC8889126. [accesat la 19.04.2022].
 231. Palladino M. Complete blood count alterations in COVID-19 patients: A narrative review. *Biochem Med (Zagreb)*. 2021 Oct 15; 31 (3): 030501. doi: 10.11613/BM.2021.030501. PMID: 34658642; PMCID: PMC8495616. [accesat la 24.05.2022].
 232. Lavoignet C. E., Le Borgne P., Chabrier S., Bidoire J., Slimani H. et al. White blood cell count and eosinopenia as valuable tools for the diagnosis of bacterial infections in the ED. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2019 Aug; 38 (8): 1523-1532. doi: 10.1007/s10096-019-03583-2. Epub 2019 May 22. PMID: 31119578. [accesat la 24.05.2022].
 233. Tfaily M. A., Ghanem P., Farran S. H., Dabdoub F., Kanafani Z. A. The role of preoperative albumin and white blood cell count in surgical site infections following whipple surgery. *Sci Rep*. 2022 Nov 10; 12 (1): 19184. doi: 10.1038/s41598-022-21849-2. PMID: 36357432; PMCID: PMC9649662. [accesat la 24.05.2022].
 234. Pati M. L., Niso M., Spitzer D., Berardi F., Contino M. et al. Multifunctional thiosemicarbazones and deconstructed analogues as a strategy to study the involvement of metal chelation, Sigma-2 (σ_2) receptor and P-gp protein in the cytotoxic action: In vitro and in vivo activity in pancreatic tumors. *Eur J Med Chem*. 2018 Jan 20; 144: 359-371. doi: 10.1016/j.ejmech.2017.12.024. Epub 2017 Dec 8. PMID: 29287249; PMCID: PMC5801006. [accesat la 24.05.2022].
 235. Fayed E. A., Ragab A., Ezz Eldin R. R., Bayoumi A. H., Ammar Y. A. In vivo screening and toxicity studies of indolinone incorporated thiosemicarbazone, thiazole and piperidinosulfonyl moieties as anticonvulsant agents. *Bioorg Chem*. 2021 Nov; 116: 105300. doi: 10.1016/j.bioorg.2021.105300. Epub 2021 Aug 24. PMID: 34525393. [accesat la 14.06.2022].

236. Farias R. L., Polez A. M. R., Silva D. E. S., Zanetti R. D., Moreira M. B. et al. In vitro and in silico assessment of antitumor properties and biomolecular binding studies for two new complexes based on NiII bearing k²N,S-donor ligands. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2021 Feb; 121: 111815. doi: [10.1016/j.msec.2020.111815](https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111815). Epub 2020 Dec 29. PMID: 33579459. [accesat la 14.06.2022].
237. Ma B., Goh B. C., Tan E. H., Lam K. C., Soo R. et al. A multicenter phase II trial of 3-aminopyridine-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone (3-AP, Triapine) and gemcitabine in advanced non-small-cell lung cancer with pharmacokinetic evaluation using peripheral blood mononuclear cells. *Invest New Drugs*. 2008 Apr; 26 (2): 169-73. doi: [10.1007/s10637-007-9085-0](https://doi.org/10.1007/s10637-007-9085-0). Epub 2007 Sep 12. PMID: 17851637. [accesat la 14.06.2022].
238. Odenike O. M., Larson R. A., Gajria D., Dolan M. E., Delaney S. M. et al. Phase I study of the ribonucleotide reductase inhibitor 3-aminopyridine-2-carboxaldehyde-thiosemicarbazone (3-AP) in combination with high dose cytarabine in patients with advanced myeloid leukemia. *Invest New Drugs*. 2008 Jun; 26 (3): 233-9. doi: [10.1007/s10637-008-9115-6](https://doi.org/10.1007/s10637-008-9115-6). Epub 2008 Jan 24. PMID: 18217206; PMCID: PMC4283497. [accesat la 14.06.2022].
239. Basha M. T., Bordini J., Richardson D. R., Martinez M., Bernhardt P. V. Kinetico-mechanistic studies on methemoglobin generation by biologically active thiosemicarbazone iron(III) complexes. *J Inorg Biochem*. 2016 Sep; 162: 326-333. doi: [10.1016/j.jinorgbio.2015.12.004](https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2015.12.004). Epub 2015 Dec 9. PMID: 27079328. [accesat la 18.06.2022].
240. Temel Y., Bayındır S. The Synthesis of Thiosemicarbazone-Based Aza-Ylides as Inhibitors of Rat Erythrocyte Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase Enzyme. *J. Inst. Sci. and Tech*. 2019; 9(3): 1503-1512. doi: [10.21597/jist.518012](https://doi.org/10.21597/jist.518012). [accesat la 18.06.2022].
241. Karatepe M., Karatas F. Antioxidant, pro-oxidant effect of the thiosemicarbazone derivative Schiff base 4-(1-phenylmethylcyclobutane-3-yl)-2-(2-hydroxybenzylidenehydrazino)thiazole and its metal complexes on rats. *Cell Biochem Funct*. 2006 Nov-Dec; 24 (6): 547-54. doi: [10.1002/cbf.1266](https://doi.org/10.1002/cbf.1266). PMID: 16143962. [accesat la 14.09.2022].
242. Doig K., Zhang B. A Methodical Approach to Interpreting the Red Blood Cell Parameters of the Complete Blood Count. *American Society for Clinical Laboratory Science*. 2017, 30 (3) 173-185; doi: [10.29074/ascls.30.3.173](https://doi.org/10.29074/ascls.30.3.173). [accesat la 14.09.2022].
243. Mock D. M., Bell E. F., Lankford G. L., Widness J. A. Hematocrit correlates well with circulating red blood cell volume in very low birth weight infants. *Pediatr Res*. 2001 Oct; 50 (4): 525-31. doi: [10.1203/00006450-200110000-00017](https://doi.org/10.1203/00006450-200110000-00017). PMID: 11568298. [accesat la 14.09.2022].
244. Maner B. S., Moosavi L. Mean Corpuscular Volume. [Updated 2022 Jul 4]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK545275/>. [accesat la 14.09.2022].
245. Fava C., Cattazzo F., Hu Z. D., Lippi G., Montagnana M. The role of red blood cell distribution width (RDW) in cardiovascular risk assessment: useful or hype? *Ann Transl Med*. 2019 Oct; 7 (20): 581. doi: [10.21037/atm.2019.09.58](https://doi.org/10.21037/atm.2019.09.58). PMID: 31807562; PMCID: PMC6861793. [accesat la 18.10.2022].

246. Tigner A., Ibrahim S. A., Murray I. V. Histology, White Blood Cell. [Updated 2022 Nov 14]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): *StatPearls Publishing*; 2023 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK563148/> [accesat la 18.10.2022].
247. Kita H. Eosinophils: multifaceted biological properties and roles in health and disease. *Immunol Rev.* 2011 Jul; 242 (1): 161-77. doi: 10.1111/j.1600-065X.2011.01026.x. PMID: 21682744; PMCID: PMC3139217. [accesat la 18.10.2022].
248. Karasuyama H., Obata K., Wada T., Tsujimura Y., Mukai K. Newly appreciated roles for basophils in allergy and protective immunity. *Allergy.* 2011 Sep; 66 (9): 1133-41. doi: 10.1111/j.1398-9995.2011.02613.x. Epub 2011 May 5. PMID: 21545430. [accesat la 18.10.2022].
249. Alberts B., Johnson A., Lewis J. et al. Molecular Biology of the Cell. 4th edition. New York: Garland Science; 2002. Lymphocytes and the Cellular Basis of Adaptive Immunity. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26921/> [accesat la 24.11.2022].
250. Guillemins M., Mildner A., Yona S. Developmental and Functional Heterogeneity of Monocytes. *Immunity.* 2018 Oct 16; 49 (4): 595-613. doi: 10.1016/j.immuni.2018.10.005. PMID: 30332628. [accesat la 14.11.2022].
251. Butkiewicz A. M., Kemona H., Dymicka-Piekarska V., Matowicka-Karna J., Radziwon P. et al. Platelet count, mean platelet volume and thrombocytopoietic indices in healthy women and men. *Thromb Res.* 2006; 118 (2): 199-204. doi: 10.1016/j.thromres.2005.06.021. Epub 2005 Sep 1. PMID: 16139337. [accesat la 14.11.2022].
252. Winterbourn C. C. Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. *Nat Chem Biol.* 2008 May; 4 (5): 278-86. doi: 10.1038/nchembio.85. PMID: 18421291. [accesat 16.11.2022].
253. Sies H., Jones D. P. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2020 Jul; 21 (7): 363-383. doi: 10.1038/s41580-020-0230-3. Epub 2020 Mar 30. PMID: 32231263. [accesat 16.11.2022].
254. Lee R., Margaritis M., Channon K. M., Antoniades C. Evaluating oxidative stress in human cardiovascular disease: methodological aspects and considerations. *Curr Med Chem.* 2012; 19 (16): 2504-20. doi: 10.2174/092986712800493057. PMID: 22489713; PMCID: PMC3412204. [accesat 18.12.2022].
255. Chen J., Geissler C., Parpia B., Li J., Campbell T. C. Antioxidant status and cancer mortality in China. *Int J Epidemiol.* 1992 Aug; 21 (4): 625-35. doi: 10.1093/ije/21.4.625. PMID: 1521964. [accesat 18.12.2022].
256. Gorrini C., Harris I. S., Mak T. W. Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. *Nat Rev Drug Discov.* 2013 Dec; 12 (12): 931-47. doi: 10.1038/nrd4002. PMID: 24287781. [accesat 18.12.2022].
257. Nogueira V., Hay N. Molecular pathways: reactive oxygen species homeostasis in cancer cells and implications for cancer therapy. *Clin Cancer Res.* 2013 Aug 15; 19 (16): 4309-14. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-1424. Epub 2013 May 29. PMID: 23719265; PMCID: PMC3933310. [accesat 08.01.2023].
258. Lewandowski Ł., Kepinska M., Milnerowicz H. Inhibition of copper-zinc superoxide dismutase activity by selected environmental xenobiotics. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2018 Mar; 58: 105-

113. doi: [10.1016/j.etap.2017.12.022](https://doi.org/10.1016/j.etap.2017.12.022). Epub 2017 Dec 29. PMID: 29310006. [accesat la 08.01.2023].
259. Khan A. A., Ahmad R., Alanazi A. M. et al. Determination of anticancer potential of a novel pharmacologically active thiosemicarbazone derivative against colorectal cancer cell lines. *Saudi Pharm J.* 2022 Jun; 30 (6): 815-824. doi: [10.1016/j.jsps.2022.03.011](https://doi.org/10.1016/j.jsps.2022.03.011). Epub 2022 Mar 31. PMID: 35812146; PMCID: PMC9257852. [accesat la 08.01.2023].
260. Park K. C., Fouani L., Jansson P. J., Wooi D., Sahni S. et al. Copper and conquer: copper complexes of di-2-pyridylketone thiosemicarbazones as novel anti-cancer therapeutics. *Metallomics.* 2016 Sep 1; 8 (9): 874-86. doi: [10.1039/c6mt00105j](https://doi.org/10.1039/c6mt00105j). Epub 2016 Jun 23. PMID: 27334916. [accesat la 08.01.2023].
261. Kalinowski D. S., Quach P., Richardson D. R. Thiosemicarbazones: the new wave in cancer treatment. *Future Med Chem.* 2009 Sep; 1 (6): 1143-51. doi: [10.4155/fmc.09.80](https://doi.org/10.4155/fmc.09.80). PMID: 21425997. [accesat la 08.01.2023].
262. Gutierrez E. M., Seebacher N. A., Arzuman L., Kovacevic Z., Lane D. J. et al. Lysosomal membrane stability plays a major role in the cytotoxic activity of the anti-proliferative agent, di-2-pyridylketone 4,4-dimethyl-3-thiosemicarbazone (Dp44mT). *Biochim Biophys Acta.* 2016 Jul; 1863 (7 Pt A): 1665-81. doi: [10.1016/j.bbamcr.2016.04.017](https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.04.017). Epub 2016 Apr 19. PMID: 27102538. [accesat la 08.01.2023].
263. Altıntop M. D., Temel H. E., Sever B., Akalın Çiftçi G. et al. Synthesis and Evaluation of New Benzodioxole- Based Thiosemicarbazone Derivatives as Potential Antitumor Agents. *Molecules.* 2016 Nov 22; 21 (11): 1598. doi: [10.3390/molecules21111598](https://doi.org/10.3390/molecules21111598). PMID: 27879683; PMCID: PMC6273715. [accesat la 08.01.2023].
264. Stepanenko I., Babak M. V., Spengler G., Hammerstad M., Popovic-Bijelic A. et al. Coumarin-Based Triapine Derivatives and Their Copper(II) Complexes: Synthesis, Cytotoxicity and mR2 RNR Inhibition Activity. *Biomolecules.* 2021 Jun 9; 11 (6): 862. doi: [10.3390/biom11060862](https://doi.org/10.3390/biom11060862). PMID: 34207929; PMCID: PMC8230303. [accesat la 18.01.2023].
265. Lopes Ede O., Oliveira C. G., Silva P. B., Eismann C. E., Suárez C. A. et al. Novel Zinc(II) Complexes [Zn(atc-Et)₂] and [Zn(atc-Ph)₂]: In Vitro and in Vivo Antiproliferative Studies. *Int J Mol Sci.* 2016 May 21; 17 (5): 781. doi: [10.3390/ijms17050781](https://doi.org/10.3390/ijms17050781). PMID: 27213368; PMCID: PMC4881598. [accesat la 18.01.2023].
266. Singh M., Singh S. K., Gangwar M. et al. Design, synthesis and mode of action of novel 2-(4-aminophenyl)benzothiazole derivatives bearing semicarbazone Menegário AA, Leite CQ, Deflon VM, Pavan FR and thiosemicarbazone moiety as potent antimicrobial agents. *Med Chem Res* 25, 263–282 (2016). <https://doi.org/10.1007/s00044-015-1479-5>. [accesat la 18.01.2023].
267. Singh A., Singh K., Sharma A., Joshi K., Singh B. et al. 1,2,3-Triazole Derivatives as an Emerging Scaffold for Antifungal Drug Development against *Candida albicans*: A Comprehensive Review. *Chem Biodivers.* 2023 May; 20 (5): e202300024. doi: [10.1002/cbdv.202300024](https://doi.org/10.1002/cbdv.202300024). Epub 2023 Apr 25. PMID: 37017338. [accesat la 18.01.2023].
268. Mahran M. A., William S., Ramzy F., Sembel A. M. Synthesis and in vitro evaluation of new benzothiazole derivatives as schistosomicidal agents. *Molecules.* 2007 Mar 26; 12 (3): 622-33. doi: [10.3390/12030622](https://doi.org/10.3390/12030622). PMID: 17851416; PMCID: PMC6270298. [accesat la 18.03.2023].

269. Mir I., Siddiqui M. T., Comrie A. M. Antituberculosis agents. V: Alpha-[5-(5-nitro-2-furyl)-1,3,4-oxadiazol-2-ylthio]acethydrazide and related compounds. *J Pharm Sci.* 1991 Jun; 80 (6): 548-50. doi: [10.1002/jps.2600800610](https://doi.org/10.1002/jps.2600800610). PMID: 1941546. [accesat la 18.01.2023].
270. Kotian A., Kamat V., Naik K., Kokare D. G., Kumara K. et al. 8-Hydroxyquinoline derived p-halo N4-phenyl substituted thiosemicarbazones: Crystal structures, spectral characterization and in vitro cytotoxic studies of their Co(III), Ni(II) and Cu(II) complexes. *Bioorg Chem.* 2021 Jul; 112: 104962. doi: [10.1016/j.bioorg.2021.104962](https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2021.104962). Epub 2021 May 5. PMID: 33992968. [accesat la 18.01.2023].
271. Leovac V. M., Bogdanović G. A., Jovanović L. S., Joksović L., Marković V. et al. Synthesis, characterization and antitumor activity of polymeric copper(II) complexes with thiosemicarbazones of 3-methyl-5-oxo-1-phenyl-3-pyrazolin-4-carboxaldehyde and 5-oxo-3-phenyl-3-pyrazolin-4-carboxaldehyde. *J Inorg Biochem.* 2011 Nov; 105 (11): 1413-21. doi: [10.1016/j.jinorgbio.2011.07.021](https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2011.07.021). Epub 2011 Aug 2. PMID: 21955843. [accesat la 22.01.2023].
272. Lukmantara A. Y., Kalinowski D. S., Kumar N., Richardson D. R. Structure-activity studies of 4-phenyl-substituted 2'-benzoylpyridine thiosemicarbazones with potent and selective anti-tumour activity. *Org Biomol Chem.* 2013 Oct 7; 11 (37): 6414-25. doi: [10.1039/c3ob41109e](https://doi.org/10.1039/c3ob41109e). PMID: 23963445. [accesat la 22.01.2023].
273. Soares M. A., Lessa J. A., Mendes I. C., Da Silva J. G., Dos Santos R. G. et al. N⁴-Phenyl-substituted 2-acetylpyridine thiosemicarbazones: cytotoxicity against human tumor cells, structure-activity relationship studies and investigation on the mechanism of action. *Bioorg Med Chem.* 2012 Jun 1; 20 (11): 3396-409. doi: [10.1016/j.bmc.2012.04.027](https://doi.org/10.1016/j.bmc.2012.04.027). Epub 2012 Apr 19. PMID: 22564383. [accesat la 22.01.2023].

INFORMAȚII PRIVIND VALORIFICAREA REZULTATELOR CERCETĂRII

LISTA PUBLICAȚIILOR ȘI MANIFESTĂRILOR ȘTIINȚIFICE

la care au fost prezentate rezultatele cercetărilor la teza de doctor în științe medicale
cu tema „Efectele metabolice ale compușilor biologic activi autohtoni cu acțiune antitumorală”,
realizată în cadrul Laboratorului de biochimie a dnei Pantea Valeriana,
Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie ”Nicolae Testemițanu”

✓ **Articole în reviste științifice peste hotare:**

✓ **articole în reviste ISI, SCOPUS și alte baze de date internaționale***

1. **Pantea V.**, Cobzac V., Tagadiuc O., Palarie V., Gudumac V. *In Vitro* Evaluation of the Cytotoxic Potential of Thiosemicarbazide Coordinating Compounds in Hepatocyte Cell Culture. In: *Biomedicines*. 2023, nr. 2(11), pp. 1-9. **IF - 4,757**.
<https://doi.org/10.3390/biomedicines11020366>.
2. **Pantea V.**, Andronache L., Globa P., Pavlovschi E., Gulea A., Tagadiuc O., Gudumac V. Copper coordination compounds with thiosemicarbazones: *in vitro* assessment of their potential in inhibiting glioma viability and proliferation. In: *Archives of the Balkan Medical Union*. 2023 nr.3(58) pp. 234-244. **IF - 0,13**. <https://umbalk.org/copper-coordination-compounds-with-thiosemicarbazones-in-vitro-assessment-of-their-potential-in-inhibiting-glioma-viability-and-proliferation/>.

✓ **articole în reviste din străinătate recenzate**

3. Шве́ц И., **Пантеа В.**, Гинда С., Михальчук О., Цапков В., Аурелиан Г., Гудумак В. Влияние некоторых новых координационных соединений меди на показатели гемограммы у крыс. In: *International Research Journal*, Екатеринбург, 2019, часть 1 № 4(82), с. 98-102. ISSN 2303-9868 Print, ISSN 2227-6017 Online. РИНЦ **IF: 0.03**.
<https://doi.org/10.23670/IRJ.2019.82.4.019>

✓ **Articole în reviste științifice naționale acreditate:**

✓ **articole în reviste de categoria B**

4. **Pantea V.**, Popa V., Fulga A., Șveț I., Tagadiuc O. Modificările activității glutatión peroxidazei în serul sangvin la administrarea unor compuși coordinativi autohtoni. În: *Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științe Medicale*. 2020, nr. 2(66), pp. 125-129. ISSN 1857-0011.
https://ibn.idsi.md/vizualizare_articol/114776
5. **Pantea V.**, Popa V., Tagadiuc O., Andronache L., Gudumac V. Changes of oxidative stress indices and antioxidant system in the liver tissue on the administration of some coordination

- compound of copper, derivatives of thiosemicarbazide. În: *Revista de Științe ale Sănătății din Moldova*. 2022, nr. 3(29), pp. 7-12. ISSN 2345-1467. <https://doi.org/10.52645/MJHS.2022.3.02>
6. **Pantea V.**, Lesnic E. The anti-neoplastic activity of the coordinative compounds, thiosemicarbazide derivatives. In: *Arta Medica*. 2023, nr. 1(86), pp. 19-24. ISSN 1810-1852. <https://doi.org/10.5281/zenodo.7830773>.
 - ✓ **Rezumate/abstracte/teze în lucrările conferințelor științifice naționale și internaționale**
 7. **Pantea V.**, Fulga A., Șveț I. Influence of coordinating compounds of copper, derivatives of thiosemicarbazide, on nitric oxide homeostasis in hepatic tissue. In: *MedEspera the 8th International Medical Congress for Students and Young Doctors*. Chisinau, 2020, p. 268-269. ISBN 978-9975-151-11-5. https://ibn.idsi.md/vizualizare_articol/120581.
 8. **Pantea V.**, Sardari V., Andronache L., Gamanuc M., Gudumac V. Influence of new bioactive compounds on the intensity of the protein metabolism in animals in the blood serum under physiological conditions. În: *Biotehnologii moderne - soluții pentru provocările lumii contemporane*. Chișinău, 2021, p. 76. ISBN 978-9975-3498-7-1. <https://doi.org/10.52757/imb21.042>.
 9. **Pantea V.**, Lesnic E., Andronache L. The impact of the coordinative compounds, thiosemicarbazide derivatives on the oxidative stress indices in *ex vivo* experiments. In: *Microbial Biotechnology*. Ediția 5, Chișinău, 2022, p. 97. ISBN 978-9975-3555-6-8. Disponibil: <https://doi.org/10.52757/imb22.65>.
 10. **Pantea V.**, Andronache L., Tagadiuc O., Gudumac V. Cytotoxic action of thiosemicarbazone-derived coordination compounds on glioma cell culture (P-08.2-74). *FEBS Open Bio*, 2023; 13 (S2): 227. <https://doi.org/10.1002/2211-5463.13646>.
 11. Andronache L., **Pantea V.**, Ceban E., Gulea A., Graur V., Țapcov V., Matcovschii V., and Gudumac V. Method for Increasing the Production or Activity of Catalase in the Body. In: *6th International Conference on Nanotechnologies and Biomedical Engineering and New Technologies for Diagnosis, Treatment, and Rehabilitation*. ICNBME-2023, Chisinau, Republic of Moldova. p. 92. ISSN 1433-9277, ISBN 978-3-031-42781-7. <https://doi.org/10.1007/978-3-031-42782-4>.
 - ✓ **Brevete de invenții, patente, certificate de înregistrare, materiale la saloanele de invenții**
 12. Jian M., Nacu V., Cobzac V., Paladi C., **Pantea V.** Metodă de prelucrare a matricei decelularizate a ficatului pentru sporirea adeziunii celulare. Brevet de invenție MD 1171Y nr. 7/2017, 2017.07.30. https://agepi.gov.md/sites/default/files/bopi/BOPI_07_2017.pdf.

13. **Pantea V.**, Tagadiuc E., Gudumac V. Metodă de apreciere a activității antiinflamatoare a substanțelor biologice active. Brevet de invenție MD 1233 Y BOPI nr.2/2018, 2018.02.30. https://agepi.gov.md/sites/default/files/bopi/BOPI_02_2018.pdf.
14. **Pantea V.**, Corețchi I., Ghinda S., Gudumac V., Tagadiuc E. Metodă de apreciere a activității antiinflamatoare a substanțelor biologice active. Brevet de invenție MD 1301Y nr. 1/2019, 2019.01.30. https://agepi.gov.md/sites/default/files/bopi/BOPI_02_2018.pdf.

✓ **Inovații**

15. Tagadiuc O., Andronache L., **Pantea V.**, Gudumac V., Șveț I., Sardari V. Metodă pentru determinarea capacității antioxidante totale, masei substanțelor antioxidante și a activității medii a antioxidantilor în probele biologice. Certificat de inovator nr. 5641 din 26.03.2018.
16. Șveț I., Gudumac V., **Pantea V.**, Andronache L., Sardari V. Procedeu de determinare a balanței pro-oxidante-antioxidante. Certificat de inovator nr. 5647 din 24.04.2018.
17. **Pantea V.**, Șveț I., Tagadiuc O., Gudumac V., Andronache L. Procedeu de determinare a balanței pro-oxidante-antioxidante. Certificat de inovator Nr. 5669 din 24 octombrie 2018.
18. Andronache L., Gudumac V., **Pantea V.**, Sardari V., Șveț I. Procedeu de determinare a metaboliților reactivi ai oxigenului. Certificat de inovator Nr. 5671 din 24 octombrie 2018.
19. **Pantea V.**, Andronache L., Șveț I., Popușoi C. Procedeu pentru măsurarea citotoxicității celulare. Certificat de inovator nr. 5960 din 21.10.2022.

✓ **Participări cu comunicări la forumuri științifice:**

✓ **Internaționale**

20. **Pantea V.**, Sardari V., Fulga A., Tagadiuc O. The effect of local biologically active compounds on liver biochemical markers in blood serum in rats *in vivo*. Medical drugs for humans. Modern issues of pharmacotherapy and prescription of medicine. *The V International Scientific and Practical Conference*, Kharkiv, Ukraine, 11-12 March 2021, p. 110-111. УДК 615: 616-08. <https://nni.nuph.edu.ua/wpcontent/uploads/2021/03/%D0%97%D0%B1%D1%96%D1%80%D0%BD%D0%B8%D0%BA.pdf>.
21. **Pantea V.**, Gamaniuc M., Popușoi C., Fulga A., Popa V. Impact of New Thiosemicarbazone Derivatives for Erythrocytes Antioxidant System Indices: An *Ex Vivo* Study. *Virtual International Scientific Conference on “Applications of Chemistry in Nanosciences and Biomaterials Engineering – NanoBioMat 2021”*, University Politehnica of Bucharest, 25-26 June 2021, p. 87. https://www.micronanotech.ro/wp-content/uploads/2021/08/Program_NanoBioMat2021.pdf.

22. **Pantea V.**, Andronache L., Tagadiuc O. The malondialdehyde level in the liver tissue is influenced by new compound of copper, derivatives of thiosemicarbazide. *The 4th International European conference on interdisciplinary scientific research*. 8-9 August 2021/ Warsaw, Poland, 2021, p. 321. ISBN: 978-1-955094-13-9.
<https://vb.vgtu.lt/object/elaba:102320009/102320009.pdf>.
 23. **Pantea V.**, Lesnic E., Fulga A. The influence of coordinative compounds, thiosemicarbazide derivatives on the thiol-disulfide groups in human red blood cells. *Virtual International Scientific Conference on Applications of Chemistry in Nanosciences and Biomaterials Engineering” NanoBioMat 2022 – Summer Edition*, University Politehnica of Bucharest Romania, 22-24 June 2022, p. 87. <https://nanobiomat.eu/download/book-of-abstracts-nanobiomat-2022-summer-edition/>.
 24. **Pantea V.**, Lesnic E., Sardari V., Fulga A., Popa V. *In vitro* testing of influence of some copper coordination compounds, thiosemicarbazide derivatives on the level of malondialdehyde. *Virtual International Scientific Conference on Applications of Chemistry in Nanosciences and Biomaterials Engineering NanoBioMat 2022 – Autumn Edition*, University Politehnica of Bucharest Romania, 22-23.11.2022, p. 89. <https://nanobiomat.eu/download/book-of-abstracts-nanobiomat-2021-winter-edition/edition>
- ✓ **naționale**
25. **Pantea V.**, Șveț I., Popa V. Efectele unor compuși biologici activi autohtoni cu proprietăți antitumorale asupra intensității stresului oxidativ (cercetări *in vitro*). În: *Culegere de rezumate științifice ale studenților, rezidenților și tinerilor cercetători*. Chișinău, 2018, p. 89. ISBN 978-9975-82-103-2. https://ibn.idsi.md/vizualizare_articol/129472.
 26. **Pantea V.**, Popa V., Fulga A., Șveț I., Tagadiuc O. Modificările enzimei glutatión peroxidazei în serul sanguin la administrarea unor compuși coordinativi autohtoni. *Congresul consacrat aniversării a 75-a de la fondarea Universității de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”*. Chișinău, 2020, p. 50. https://ibn.idsi.md/vizualizare_articol/125655.
 27. **Pantea V.**, Gamaniuc M., Popa V. Modifications of the erythrocytic antioxidant system in the administration of new coordinative compounds. În: *Cercetarea în biomedicină și sănătate: calitate, excelență și performanță*. Chișinău, 2021, p. 27. ISBN 978-9975-82-223-7.
https://ibn.idsi.md/vizualizare_articol/144047.
 28. **Pantea V.**, Lesnic E., Popa V. *In vitro* action of some coordinative compounds, thiosemicarbazide derivatives on the thiol-disulfidic system. În: *Revista de Științe ale Sănătății din Moldova*.

Chişinău, 2022, nr. 3(29), p. 44. ISSN 2345-1467. [https:// ibn.idsi. md/ vizualizare _articol/167922](https://ibn.idsi.md/vizualizare_articol/167922).

✓ **Participări cu postere la foruri științifice:**

✓ **Internaționale**

- 29. Pantea V.,** Andronache L., Tagadiuc O., Gudumac V. Cytotoxic action of thiosemicarbazone-derived coordination compounds on glioma cell culture. P-08.2-74. FEBS Congress – ‘Together in bioscience for a better future’, Tours, France, 8-12 july 2023. FEBS Open Bio, 2023; 13 (S2): 227. <https://doi.org/10.1002/2211-5463.13646>.

Declarația privind asumarea răspunderii

Subsemnata Pantea Valeriana, declar pe răspundere personală, că materialele prezentate în teza de doctorat sunt rezultatul propriilor cercetări și realizări științifice. Conștientizez că, în caz contrar, urmează să suport consecințele în conformitate cu legislația în vigoare.

Pantea Valeriana

Semnătura

Data

Declaration on accountability

I declare the personal responsibility that information presented in this thesis are the result of my own research and scientific achievements. I realize that, otherwise, will suffer the consequences in accordance with law.

Pantea Valeriana

Signature

Date

Déclaration sur la responsabilité

Je déclare la responsabilité personnelle que les informations présentées dans cette thèse sont le résultat de mes propres recherches et réalisations scientifiques. Je me rends compte que, sinon, en subiront les conséquences conformément à la loi.

Pantea Valeriana

Signature

Date

ANEXE

Anexa 1. Brevete de invenție și certificate de inovator

REPUBLICA MOLDOVA
Agenția de Stat pentru
Proprietatea Intelectuală

**BREVET
DE INVENȚIE
DE SCURTĂ DURATĂ**

Nr. 1171

Eliberat în temeiul Legii nr. 50/2008 privind protecția invențiilor

Titlul: Metodă de prelucrare a matricei decelularizate a ficatului pentru sporirea adeziunii celulare

Titular: UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE "NICOLAE TESTEMIȚANU" DIN REPUBLICA MOLDOVA, MD

Data depozit: 2016.12.23

Durata brevetului : 6 ani

Descrierea invenției, revendicările și desenele constituie parte integrantă a prezentului brevet de invenție de scurtă durată

Director General

CHIȘINĂU

REPUBLICA MOLDOVA
Agenția de Stat pentru
Proprietatea Intelectuală

**BREVET
DE INVENȚIE
DE SCURTĂ DURATĂ**

Nr. 1233

Eliberat în temeiul Legii nr. 50/2008 privind protecția invențiilor

Titlul: Metodă de apreciere a activității antiinflamatoare a substanțelor biologice active

Titular: UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE "NICOLAE TESTEMIȚANU" DIN REPUBLICA MOLDOVA, MD

Data depozit: 2017.10.12

Durata brevetului : 6 ani

Descrierea invenției, revendicările și desenele constituie parte integrantă a prezentului brevet de invenție de scurtă durată

Director General

CHIȘINĂU

REPUBLICA MOLDOVA
Agenția de Stat pentru
Proprietatea Intelectuală

**BREVET
DE INVENȚIE
DE SCURTĂ DURATĂ**

Nr. 1301

Eliberat în temeiul Legii nr. 50/2008 privind protecția invențiilor

Titlul: Metodă de apreciere a activității antiinflamatoare a substanțelor biologice active

Titulari: UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE "NICOLAE TESTEMIȚANU" DIN REPUBLICA MOLDOVA, MD; IMSP INSTITUTUL DE FTIZIOPNEUMOLOGIE "CHIRIL DRAGANIUC", MD

Data depozit: 2018.04.11

Durata brevetului : 6 ani

Descrierea invenției, revendicările și desenele constituie parte integrantă a prezentului brevet de invenție de scurtă durată

Director General

CHIȘINĂU

COPIE

Republica Moldova
Ministerul Sănătății,
Muncii și Protecției Sociale

CERTIFICAT DE INOVATOR

Nr. 5641

Pentru inovația cu titlul
METODĂ PENTRU DETERMINAREA CAPACITĂȚII
ANTIOXIDANTE TOTALE, MASEI SUBSTANȚELOR
ANTIOXIDANTE ȘI A ACTIVITĂȚII MEDII A
ANTIOXIDANȚILOR ÎN PROBELE BIOLOGICE

Inovația a fost înregistrată pe data de 26 martie 2018
la Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie
"Nicolae Testemițanu"

Se recunoaște calitatea de autor(i)
Tagadiuc Olga, Andronache Lilia,
Pantea Valeriana, Gudumac Valentin,
Șveț Inna, Sardari Veronica

Data eliberării 26 martie 2018

L.S.



Anexa 2. Acte de implementare a invențiilor și certificatelor de inovator

	Instituție Publică USMF „Nicolae Testemițanu” din Republica Moldova Institutul Național de Cercetare în Medicină și Sănătate	Pag. 1 / 1
APROB Prorector pentru activitate de cercetare, USMF „Nicolae Testemițanu” din RM academician al AȘM, prof. univ., dr. hab. șt. med. Stanislav GROPPA 2023		
ACTUL nr. 10 DE IMPLEMENTARE A INVENȚIEI (In procesul științifico-practic)		
1. Denumirea ofertei pentru implementare: "METODĂ DE PRELUCRARE A MATRICEI DECELULARIZATE A FICATULUI PENTRU SPORIREA ADEZIUNII CELULARE" 2. Autori: JIAN Mariana, cercet.șt.: NACU Viorel, dr.hab.șt.med., prof.univ.; COBZAC Vitalie, cercet.șt.: PALADI Constantin, cercet.șt.: PANTEA Valeriana, cercet.șt. 3. Numărul inovației: MD 1171 din 23 decembrie 2016. 4. Unde și când a fost implementată: În laboratorul de Inginerie tisulară și culturi celulare, USMF „Nicolae Testemițanu” în perioada anilor 2016 – 2023. 5. Eficacitatea implementării: constă în utilizarea unei metode noi, ce permite amplificarea adeziunii hepatocitelor de matricea decelularizată a ficatului și împiedică pierderea lor excesivă după injectare. 6. Rezultatele: Rezultatul constă în aceea că respectiva metodă este eficientă, sigură, economică și ușor de implementat, permite o adeziune mai rapidă, evitându-se pierderi excesive de hepatocite injectate în matricea hepatică decelularizată în timpul procesului de recelularizare. 7. Obiecții/Propuneri: Propunerea se prezintă a fi una utilă și se va utiliza în practică în Laboratorul de Inginerie tisulară și culturi celulare. <i>Prezenta invenție este implementată conform descrierii în cerere.</i> Șef Departament Cercetare, dr. hab. șt. med., conf. univ. <u>Elena RAEVSCI</u> Șef Centru, CCDSB, dr. hab. șt. med., prof. univ. <u>Mihail TODIRAS</u> Șef lab. Inginerie tisulară și culturi celulare, dr. hab. șt. med., prof. univ. <u>Viorel NACU</u> Coordonat: <u>E. Groza</u>		

	INSTITUȚIA PUBLICĂ UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE „NICOLAE TESTEMIȚANU” DIN REPUBLICA MOLDOVA	Pag. 1 / 1
APROB Prorector pentru activitate de cercetare, USMF „Nicolae Testemițanu” din RM academician al AȘM, prof. univ., dr. hab. șt. med. Stanislav GROPPA 2023		
ACTUL nr. 1-2 DE IMPLEMENTARE A INVENȚIEI (In procesul științifico-experimental)		
1. Denumirea ofertei pentru implementare: Metoda de apreciere a activității antiinflamatoare a substanțelor biologice active 2. Autori: Pantea Valeriana, Tagadiuc Elena, Gudumac Valentin. 3. Numărul invenției: MD 1233. 4. Unde și când a fost implementată invenția: Laboratorul de biochimie, USMF „Nicolae Testemițanu”, în perioada 2017-2018. 5. Eficacitatea implementării: Invenția se referă la medicină și biochimie, și constă în metoda de apreciere a activității antiinflamatoare a substanțelor biologice active. 6. Rezultatul implementării: La folosirea metodei descrise se micșorează timpul de efectuare a analizei de ~ 2 ori, se reduce cheltuielile de reagenți, se mărește precizia și reproductibilitatea metodei de determinare, în comparație cu prototipul. Aceasta permite de a depista mai precis activitatea antiprotează care reflectă efectele antiinflamatoare ale substanțelor testate, se micșorează cheltuielile de reagenți, crește productivitatea muncii cu un efect economic apreciabil <i>Prezenta invenție este implementată conform revendicărilor descrise în brevet.</i> Șef laborator de biochimie, dr. hab. șt. med., prof. univ. <u>Valentin GUDUMAC</u> Șef centru, CCDSB, dr. hab. șt. med., prof. univ. <u>Mihail TODIRAS</u> Șef Departament Cercetare, dr. hab. șt. med., conf. univ. <u>Elena RAEVSCI</u> Coordonat: <u>E. Groza</u>		

	INSTITUȚIA PUBLICĂ UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE „NICOLAE TESTEMIȚANU” DIN REPUBLICA MOLDOVA	Pag. 1 / 1
APROB Prorector pentru activitate de cercetare, USMF „Nicolae Testemițanu” din RM academician al AȘM, prof. univ., dr. hab. șt. med. Stanislav GROPPA 2023		
ACTUL nr. 83 DE IMPLEMENTARE A INVENȚIEI (In procesul științifico-experimental)		
1. Denumirea ofertei pentru implementare: Metodă de apreciere a activității anti-inflamatoare a substanțelor biologice active. 2. Autori: Pantea Valeriana, Corețchi Ianoș, Ghinda Sergiu, Gudumac Valentin, Tagadiuc Elena. 3. Numărul invenției: MD 1301. 4. Unde și când a fost implementată invenția: Laboratorul de biochimie, USMF „Nicolae Testemițanu”, în perioada 2018-2019. 5. Eficacitatea implementării: Invenția se referă la medicină, biochimie și farmacologie, în special la o metodă de apreciere a activității antiinflamatoare a substanțelor biologice active prin determinarea activității de inhibare a producerii de oxid nitric de către celulele macrofage. 6. Rezultatul implementării: Problema pe care o rezolvă invenția constă în eliminarea dezavantajelor menționate și anume elaborarea unei metode mai exacte și care ar permite de a mări sensibilitatea, precizia și reproductibilitatea metodei, reducerea cheltuielilor de timp, creșterea productivității muncii și eficienței economice. <i>Prezenta invenție este implementată conform revendicărilor descrise în brevet.</i> Șef Departament Cercetare, dr. hab. șt. med., conf. univ. <u>Elena RAEVSCI</u> Șef centru, CCDSB, dr. hab. șt. med., prof. univ. <u>Mihail TODIRAS</u> Șef laborator de biochimie, dr. hab. șt. med., prof. univ. <u>Valentin GUDUMAC</u> Coordonat: <u>E. Groza</u>		

	Instituție Publică USMF „Nicolae Testemițanu” din Republica Moldova Institutul Național de Cercetare în Medicină și Sănătate	Pag. 5 / 5
APROB Prorector pentru activitate de cercetare, USMF „Nicolae Testemițanu” din RM academician al AȘM, prof. univ., dr. hab. șt. med. Stanislav GROPPA 2022		
ACTUL nr. 83 DE IMPLEMENTARE A INOVAȚIEI (In procesul științifico-practic)		
1. Denumirea ofertei pentru implementare: „PROCEDEU PENTRU MĂSURAREA CITOTOXICITĂȚII CELULARE” 2. Autori: PANTEA Valeriana, cerc. șt., ANDRONACHE Lilia, cerc. șt. superior., SVET Inna, cercet. șt., POPUȘOI Cristina, cercet. șt. stagiar. 3. Numărul inovației: Nr. 5960 din 21 octombrie 2022 4. Unde și când a fost implementată: În laboratorul de Biochimie, Catedra de Biochimie și Catedra medicină de laborator IP USMF „Nicolae Testemițanu” în perioada anilor 2021 – 2022. 5. Eficacitatea implementării: Procedul propus este avantajos din punct de vedere economic, deoarece prevede standardizarea maximală a etapelor realizării analizei, creșterea reproductibilității și precizității metodei, micșorarea timpului de efectuare a analizei. Propunerea descrisă poate fi folosită la evaluarea citotoxicității compușilor (remediilor) noi și screening-ul remediilor anti-neoplazice. 6. Rezultatele: Procedul propus permite de a mări precizitatea și reproductibilitatea determinărilor, productivitatea muncii și eficiența economică. 7. Obiecții/Propuneri: Propunerea se prezintă a fi una utilă la realizarea cercetărilor științifice în laboratorul de Biochimie privind evaluarea citotoxicității compușilor (remediilor) noi și screening-ul remediilor anti-neoplazice. <i>Prezenta inovație este implementată conform descrierii în cerere.</i> Șef lab. Biochimie, dr. hab. șt. med., prof. univ. <u>Valentin GUDUMAC</u> Șef Catedră. Biochimie, dr. hab. șt. med., prof. univ. <u>Olga TAGADIUC</u> Șef lab. Catedra medicină de laborator, dr. hab. șt. med., prof. univ. <u>Anatol VIȘNEVȘCHI</u> Șef Departament Cercetare, dr. hab. șt. med., conf. univ. <u>Elena RAEVSCI</u> Coordonat: <u>E. Groza</u>		



UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
„NICOLAE TESTEMIȚANU”

“APROB”
Prorector pentru activitatea științifică
IP USMF „Nicolae Testemițanu” din RM
Prof. univ., dr. hab. în șt. med.,
Gh. ROJNOVEANU
2018
ACTUL nr. 54

DE IMPLEMENTARE A INOVAȚIEI
(în procesul științifico-practic)

1. **Denumirea ofertei pentru implementare:** “PROCEDEU DE DETERMINARE A METABOLIȚILOR REACTIVI AI OXIGENULUI”.

2. **Autorii:** ANDRONACHE Lilia, cerc. șt., GUDUMAC Valentin, dr. hab. în șt. med., prof. univ., șef. lab., PANTEA Valeriana, cerc. șt., SARDARI Veronica, cerc. șt. superior, ȘVEȚ Inna, cerc. șt.

3. **Numarul inovației:** Nr. 5671 din 24 octombrie, 2018

4. **Unde și când a fost implementată:** În laboratorul de Biochimie, USMF „Nicolae Testemițanu” în perioada 2017 – 2018.

5. **Eficacitatea implementării:** Problema pe care o rezolvă procedeul optimizat propus constă în simplificarea metodei, reducerea duratei de timp cheltuit la realizarea metodei, iar pentru mărirea performanței analitice - reproductibilității și precizității metodei, procesarea probelor se efectuează în condiții de standardizare maximă, în loc de cuve de cuarț se folosesc microplăci fotometrice obișnuite, fapt ce permite procesarea concomitentă a unui număr mare de probe.

6. **Obiecți/Propuneri:** Avantajul propunerii menționate constă în standardizarea maximală a etapelor realizării analizei, creșterea reproductibilității și precizității metodei, micșorarea timpului de efectuare a analizei.

Prezenta inovație este implementată conform descrierii în cerere

Sef lab. Biochimie,
dr. hab. în șt. med., prof. univ.

Valentin Gudumac
Valentin GUDUMAC

Șef Departament Știință,
Prof. univ., dr. hab. în șt. med.

Ghenadie Curocichin
Ghenadie CUROCICHIN

5



UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
„NICOLAE TESTEMIȚANU”

“APROB”
Prorector pentru activitatea științifică
IP USMF „Nicolae Testemițanu” din RM
Prof. univ., dr. hab. în șt. med.,
Gh. ROJNOVEANU
2018
ACTUL nr. 52

DE IMPLEMENTARE A INOVAȚIEI
(în procesul științifico-practic)

1. **Denumirea ofertei pentru implementare:** “PROCEDEU DE DETERMINARE A BALANȚEI PRO-OXIDANTE-ANTIOXIDANTE”.

2. **Autorii:** PANTEA Valeriana, doctorand, cerc. șt., ȘVEȚ Inna, cerc. șt., GUDUMAC Valentin, dr. hab. în șt. med., prof. univ., șef. lab., TAGADIUC Olga, dr. hab. în șt. med., conf. univ., șef. catedră Biochimie, conf. univ., ANDRONACHE Lilia, dr. șt. med., cerc. șt.

3. **Numarul inovației:** Nr. 5669 din 24 octombrie 2018

4. **Unde și când a fost implementată:** În laboratorul de Biochimie, USMF „Nicolae Testemițanu” în perioada 2017 – 2018.

5. **Eficacitatea implementării:** Problema pe care o rezolvă procedeul optimizat propus constă în simplificarea metodei, reducerea cantității de reagenți cheltuiți la realizarea analizei, duratei de timp cheltuit la realizarea metodei.

6. **Obiecți/Propuneri:** Procedeul posedă noutate și până la momentul actual în USMF „Nicolae Testemițanu” nu s-a aplicat. Avantajul propunerii menționate constă în simplificarea procedurii analitice, micșorarea timpului de efectuare și a costului analizei.

Prezenta inovație este implementată conform descrierii în cerere

Sef lab. Biochimie,
Prof. univ., dr. hab. în șt. med. *Valentin Gudumac* Valentin GUDUMAC

Șef Departament Știință,
Prof. univ., dr. hab. în șt. med. *Ghenadie Curocichin* Ghenadie CUROCICHIN



UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
„NICOLAE TESTEMIȚANU”

“APROB”
Prorector pentru activitatea științifică
IP USMF „Nicolae Testemițanu” din RM
Prof. univ., dr. hab. șt. med.,
Gh. ROJNOVEANU
2018
ACTUL nr. 51

DE IMPLEMENTARE A INOVAȚIEI
(în procesul științifico-practic)

1. **Denumirea ofertei pentru implementare:** “METODĂ DE APRECIERE A CITOTOXICITĂȚII”.

2. **Autorii:** ANDRONACHE Lilia, cerc. șt., ȘVEȚ Inna, cerc. șt., GUDUMAC Valentin, dr. hab. în șt. med., prof. univ., șef. lab., SARDARI Veronica, cerc. șt. superior, PANTEA Valeriana, cerc. șt.

3. **Numarul inovației:** Nr. 5668, din 24 octombrie 2018

4. **Unde și când a fost implementată:** În laboratorul de Biochimie, USMF „Nicolae Testemițanu” în perioada 2017 – 2018.

5. **Eficacitatea implementării:** Problema pe care o rezolvă procedeul optimizat propus constă în simplificarea metodei, reducerea duratei de timp cheltuit la realizarea metodei și se bazează pe metoda spectrofotometrică de măsurare a citotoxicității (proliferării celulare).

6. **Obiecți/Propuneri:** Avantajul propunerii menționate constă în standardizarea maximală a etapelor realizării analizei, creșterea reproductibilității și precizității metodei, micșorarea timpului de efectuare a analizei.

Prezenta inovație este implementată conform descrierii în cerere

Sef lab. Biochimie,
dr. hab. șt. med., prof. univ.

Valentin Gudumac Valentin GUDUMAC

Șef Departament Știință,
Prof. univ., dr. hab. șt. med.

Ghenadie Curocichin Ghenadie CUROCICHIN



UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
„NICOLAE TESTEMIȚANU”

“APROB”
Prorector pentru activitatea științifică
IP USMF „Nicolae Testemițanu” din RM
Prof. univ., dr. hab. în șt. med.,
Gh. ROJNOVEANU
2018
ACTUL nr. 19

DE IMPLEMENTARE A INOVAȚIEI
(în procesul științifico-practic)

1. **Denumirea ofertei pentru implementare:** “METODĂ PENTRU DETERMINAREA CAPACITĂȚII ANTIOXIDANTE TOTALE, MASEI SUBSTANȚELOR ANTIOXIDANTE ȘI A ACTIVITĂȚII MEDII A ANTIOXIDANȚILOR ÎN PROBELE BIOLOGICE”.

2. **Autorii:** TAGADIUC Olga, dr. hab. în șt. med., prof. univ., ANDRONACHE Lilia, cerc. șt., PANTEA Valeriana, cerc. șt., GUDUMAC Valentin, dr. hab. în șt. med., prof. univ., șef. lab., ȘVEȚ Inna, cerc. șt., SARDARI Veronica, cerc. șt. Superior.

3. **Numarul inovației:** Nr. 5641, din 26 martie 2018

4. **Unde și când a fost implementată:** În laboratorul de Biochimie, USMF „Nicolae Testemițanu” în perioada 2016 – 2018.

5. **Eficacitatea implementării:** Problema pe care o rezolvă procedeul optimizat propus constă în simplificarea metodei, reducerea cantității de reagenți cheltuiți la realizarea analizei, duratei de timp cheltuit la realizarea metodei. Antioxidanții prezenți în proba de cercetat suprimă formarea colorației într-un grad proporțional cu concentrațiile lor, iar pentru mărirea performanței analitice - reproductibilității și precizității metodei, procesarea probelor se efectuează în condiții de standardizare maximă, fapt ce permite procesarea concomitentă a unui număr mare de probe.

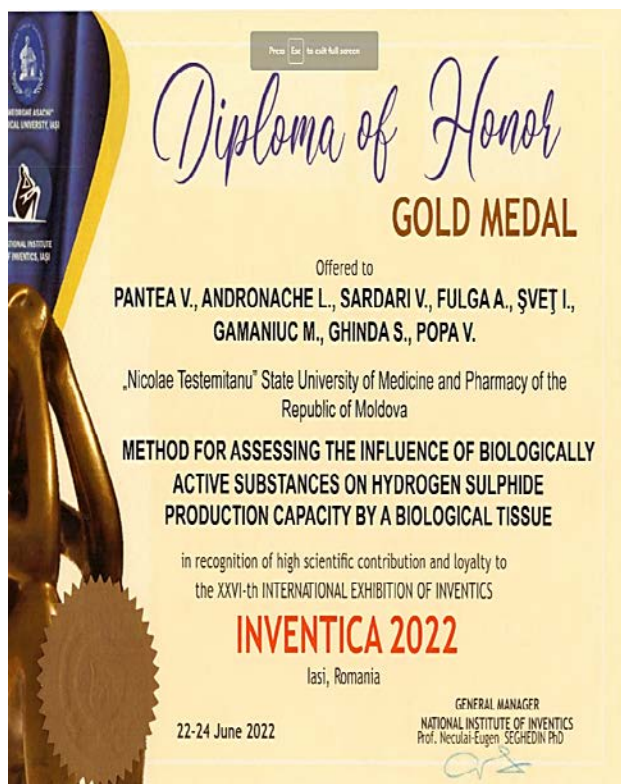
6. **Obiecți/Propuneri:** Avantajul propunerii menționate constă în standardizarea maximală a etapelor realizării analizei, creșterea reproductibilității, precizității și informativității metodei, posibilitatea procesării concomitente a probelor în serie, micșorarea timpului de efectuare a analizei.

Prezenta inovație este implementată conform descrierii în cerere

Sef lab. Biochimie,
Prof. univ., dr. hab. în șt. med. *Valentin Gudumac* Valentin GUDUMAC

Șef Departament Știință,
Prof. univ., dr. hab. în șt. med. *Ghenadie Curocichin* Ghenadie CUROCICHIN

Anexa 3. Distincții: Premii speciale





Confederația
Națională
a Sindicatelor
din Moldova

AGEPI

AGENȚIA DE STAT
PENTRU PROPRIETATEA
INTELECTUALĂ
A REPUBLICII MOLDOVA



Uniunea Inventatorilor
și Raționalizatorilor
din Republica Moldova
„Inovatori”

DIPLOMĂ

SE DECERNEAZĂ

Dnei Valeriana PANTEA

TITLUL ONORIFIC

„CEL MAI BUN RAȚIONALIZATOR AL ANULUI DIN REPUBLICA MOLDOVA”

Oleg BUDZA, Președinte,
Confederația Națională
a Sindicatelor din Moldova

Lilia BOLOCAN, Director General,
Agenția de Stat pentru Proprietatea Intelectuală
a Republicii Moldova

Nicanor SOLCAN, Președinte,
Uniunea Inventatorilor și Raționalizatorilor
din Republica Moldova „Inovatori”

28 iunie 2019, Chișinău



UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
„NICOLAE TESTEMIȚANU” DIN REPUBLICA MOLDOVA

LUCENDO ALIIS EGO IPSE ARDEO!

DIPLOMĂ



Se decernează

Dnei Valeriana Pantea,

***cercetător științific,
Laboratorul de biochimie,***

***în semn de apreciere și recunoaștere a excelenței
și a performanței în activitatea de cercetare și inovare,
și cu prilejul Zilei internaționale a fetelor și a femeilor
cu activități în domeniul științei.***

11.02.2021

Rector

E. Ceban Emil Ceban,
profesor universitar,
dr. hab. șt. med.



CV-UL AUTORULUI



INFORMAȚII PERSONALE **Pantea Valeriana**

LOCUL DE MUNCA

Cercetător științific, Laboratorul Biochimie, Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu“

EXPERIENȚA PROFESIONALĂ

2015 - 2023 prezent – cercetător științific, Laboratorul Biochimie, Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu“;

2014 – 2015 – cercetător științific stagiar, Laboratorul Biochimie, Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu“;

1997 – 2014 – laborant, Laboratorul Biochimie, Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu“.

EDUCAȚIE ȘI FORMARE

1994 – 1997 – studii medii de specialitate, Colegiul de medicină din or. Chișinău

2008 – 2012 – studii superioare de licență, Universitatea de Stat din Tiraspol, specialitatea Biologie și Sanologie, facultatea Biologie și Chimie;

2012 – 2014 – STUDII masterandă la Universitatea de Stat din Tiraspol, specialitatea Biologie aplicată;

2017 – continu teza de doctor în științe medicale, specialitatea – 315.01. Biochimie medicală.

PUBLICAȚII

Capitole în monografie –nr. 2

Articole în reviste:

Scopus, Web of Science – nr. 6

Internaționale recenzate – nr. 15

Naționale – nr. 29

OPI

Brevete –nr. 13

Certificate de inovator nr. 76

PROIECTE DE CERCETARE

5 NUMĂR