

Invenția se referă la chimie și medicină, în particular la un compus coordinativ de cupru biologic activ din clasa tiosemicarbazonaților metalelor de tranziție. Acest complex poate găsi aplicare în medicină în calitate de activator sintetic al catalazei, care, activând producerea importantă a catalazei în organism, poate preveni și/sau reduce instalarea patologiilor neurodegenerative, renale, cardiovasculare, aterosclerozei și carcinogenezei, proceselor inflamatorii, dezvoltarea leziunilor celulare și tisulare, legate de acumularea excesivă a radicalilor liberi ai oxigenului (RLO).

Catalaza (CAT) este una dintre enzimele antioxidante cruciale care într-o măsură considerabilă atenuază stresul oxidativ prin distrugerea peroxidului de hidrogen celular. Deficiența sau funcționarea deficitară a catalazei este legată de patogeneza mai multor boli degenerative asociate vârstei, cum ar fi diabetul zaharat, hipertensiunea arterială, anemia, vitiligo, boala Alzheimer, boala Parkinson, tulburarea bipolară, cancerul și schizofrenia (Ankita Nandi et al. Role of Catalase in Oxidative Stress- and Age-Associated Degenerative Diseases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, vol. 2019, Article ID 9613090).

CAT poate fi o țintă terapeutică atrăgătoare în contextul unor forme de cancer, reieșind din faptul că modificarea expresiei catalazei în celulele canceroase favorizează proliferarea celulară prin inducerea instabilității genetice și activarea oncogenelor (Glorieux Christophe, Calderon Pedro Buc. Catalase, a remarkable enzyme: targeting the oldest antioxidant enzyme to find a new cancer treatment approach. *Biological Chemistry*, vol. 398 (10), 2017, p. 1095-1108). Astfel, sinteza și studierea proprietăților unor agenți farmacologici selectivi care ar induce sinteza catalazei, oferă noi instrumente pentru protejarea țesuturilor de leziuni, îmbunătățirea reparării celulelor și țesuturilor, tratarea unei varietăți de boli metabolice prin utilizarea acestor inductori/activatori ai acestei enzime.

Prin urmare, activarea terapeutică a producerii CAT sau menținerea la un nivel fiziologic optimal al biosintezei catalazei este o contribuție nouă, deoarece substanțele bioactive care influențează asupra capacității de producere sau activizare endogenă a catalazei pot fi folosite în calitate de remedii pentru prevenirea și medicația diferitor boli.

Inducerea enzimatică este un proces în care o moleculă (de exemplu un medicament) induce creșterea activității unei enzime fie prin legarea de enzimă și activizarea acesteia, fie prin creșterea expresiei genei care codifică enzima (Stanbury P. F. et al. *Principles of Fermentation Technology*, second edition, Elsevier, 2013). Inducerea enzimatică este inclusă atunci când molecula (numită inductor) permite expresarea genei. Modul în care se întâmplă acest lucru depinde de mecanismele de control, precum și de diferențele dintre celulele procariote și eucariote. Catalaza (E.C. 1.11.1.6) este una dintre cele mai importante enzime antioxidante. Este prezentă în aproape toate organismele aere. În 1937, CAT a fost cristalizată pentru prima dată din ficat de bovină în laboratorul lui Sumner și Dounce. Gena care codifică CAT este poziționată în cromozomul 11 la om (Nandi A. et al. Role of Catalase in Oxidative Stress- and Age-Associated Degenerative Diseases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019, article ID 9613090). Deficiența CAT este asociată cu multe boli precum diabetul zaharat, vitiligo, bolile cardiovasculare, boala Wilson, hipertensiunea arterială, anemia, unele tulburări dermatologice, boala Alzheimer, boala Parkinson, demența, tulburarea bipolară și schizofrenia, etc.

S-a observat că o creștere de 60 de ori a activității CAT ar putea reduce drastic caracteristicile obișnuite ale cardiomiopatiei diabetice la modelul de șoarece (Gang Ye et al. Catalase protects cardiomyocyte function in models of type 1 and type 2 diabetes. *Diabetes*, 2004, vol. 53 (5), p. 1336-1343). Deci, această abordare ar putea fi o abordare terapeutică eficientă pentru tratamentul cardiomiopatiei diabetice.

Sepsisul este sindromul de răspuns inflamator sistemic cauzat de infecții care pot duce la disfuncție de organ cu mortalitate ridicată (rata letalității depășind 25%). Persoanele cu vârsta peste 65 de ani, sugarii, pacienții imunocompromiși și pacienții cu boli autoimune, tumori, boli de rinichi și boli pulmonare sunt cei mai susceptibili la sepsis. Odată cu creșterea rapidă a îmbătrânirii populației și a rezistenței antimicrobiene, dezvoltarea de terapii pentru tratamentul sepsisului este foarte importantă. Șocul septic este, de asemenea, una dintre manifestările clinice comune ale pacienților severi cu COVID-19 (Huang Rui et al. Clinical findings of patients with coronavirus disease 2019 in Jiangsu province, China: A retrospective, multi-center study. *PloS Negl Trop Dis*, 2020, 14(5): e0008280; Xiaolong Qi et al. Clinical course and risk factors for mortality of COVID-19 patients with pre-existing cirrhosis: a multicentre cohort study. *Gut*. 2021 Feb, 70 (2):433-436).

Catalaza este cea mai abundentă enzimă antioxidantă întâlnită în mod obișnuit în ficat, eritrocite și celulele epiteliale alveolare și este cel mai eficient catalizator pentru descompunerea H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Principalul neajuns al catalazei exogene purificate din diferite țesuturi și organe constă în stabilitatea ei foarte joasă la administrarea in vivo (aceasta demonstrând un timp de înjumătățire plasmatică, de doar 6-10 minute), ceea ce împiedică utilizarea pe scară largă ca remediu terapeutic.

Este cunoscută o metodă de creștere a activității catalazei în țesutul hepatic în carcinogeneza experimentală prin infuzii de cafea încorporată în hrana animalelor, fapt manifestat prin activizarea catalazei hepatice, valorile acestei enzime apropiindu-se de condițiile animalelor sănătoase [1]. Dezavantajul acestei metode constă în faptul că ea este puțin eficientă, deoarece nu asigură o creștere suficient de înaltă a activității catalazei în țesutul hepatic.

Este cunoscută o metodă de creștere a activității catalazei în inimă, creier și ficat prin administrarea intravenoasă a noradrenalinei, sau după ischemia intestinală regională, fapt manifestat prin activizarea catalazei miocardice, cerebrale și hepatice [2].

Dezavantajul acestei metode constă în faptul că ea este puțin eficientă, deoarece nu asigură activizarea stabilă, suficient de înaltă a catalazei în țesuturile indicate. Un alt neajuns al metodei indicate constă în faptul că utilizarea

noradrenalinei sau aplicarea ischemiei intestinale regionale au multe contraindicații, și, mai mult decât atât, poate crește riscul apariției unor complicații severe.

Este cunoscută o metodă de inducere a catalazei în fibroblastele gingivale umane prin administrarea derivatului fenilureei, N-[2-(2-oxo-1-imidazolindinil)etil]-N-feniluree (EDU) într-un model experimental cu paraquat (PQ), care a servit drept control pozitiv, fapt manifestat prin inducerea/activizarea catalazei în celulele indicate [3].

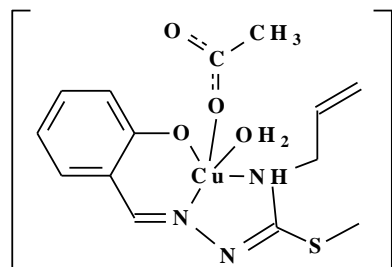
Dezavantajul acestei metode constă în faptul că ea este puțin eficientă, deoarece nu asigură inducerea/activizarea stabilă, suficient de înaltă a catalazei în țesutul indicat. Un alt neajuns al acestei metode constă în faptul că derivații fenilureei influențează negativ asupra mediului ambiant. De aceea, Uniunea Europeană a interzis folosirea lor ca erbicide prin Decizia 2007/417/CE. În ceea ce privește toxicitatea, pot provoca efecte negative considerabile asupra sănătății umane: sănătății reproductive, efecte toxice manifestate prin dermatite iritante, arsuri și iritații ale ochilor, precum și sensibilizare a pielii și altele.

Cea mai apropiată soluție după esența tehnică și rezultatul obținut al invenției date este metoda care se bazează pe creșterea producerii sau activizării catalazei în organism prin administrarea vitaminei D3 sau a derivaților ei [4].

Neajunsul acestei metode constă în aceea că ea nu asigură creșterea suficient de înaltă a producerii sau activizării catalazei, iar utilizarea vitaminei D3 împreună cu alți analogi ai vitaminei D3 crește riscul apariției hipervitaminozei D.

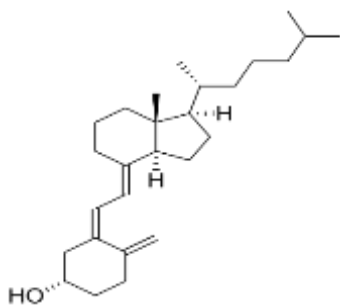
Problema pe care o rezolvă prezenta invenție constă în obținerea unui compus coordinativ autohton nou, care extinde arsenalul de compuși sintetici cu activitate înaltă de activizare a catalazei cu specificitate înaltă, cost-eficientă.

Esența invenției constă în obținerea unui activator sintetic al catalazei în baza acetato-2-[(metilsulfanil)(prop-2-en-1-il)amino]metiliden}hidraziniliden)metil]fenolatoaquacupru cu formula:



Compusul dat, proprietățile lui și procedeul de sinteză nu sunt descrise în literatură.

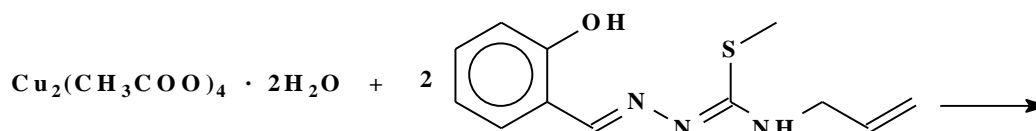
În calitate de etalon pentru determinarea activității de inducere/activizare a catalazei se utilizează vitamina D3 cu formula:

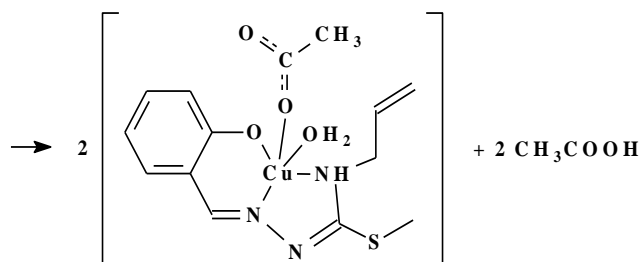


Rezultatul tehnic al invenției constă în stabilirea la compusul revendicat a activității înalte de activizare a catalazei eritrocitare, care este de 1,9 ori mai înaltă în comparație cu martorul și de 1,25 ori mai înaltă, decât activitatea vitaminei D3 (cea mai apropiată soluție). Proprietatea stabilită a acetato-2-[(metilsulfanil)(prop-2-en-1-il)amino]metiliden}hidraziniliden)metil]fenolatoaquacuprului sus-numit este nouă, fiindcă până acum nu este descrisă utilizarea lui în calitate de activator al catalazei.

Analiza comparativă a acetato-2-[(metilsulfanil)(prop-2-en-1-il)amino]metiliden}hidraziniliden)metil]fenolatoaquacupru cu cea mai apropiată soluție demonstrează că ei se deosebesc prin aceea, că aparțin diferitor clase de compuși chimici și în compusul revendicat se realizează o combinație nouă de legături chimice deja cunoscute.

Acetato-2-[(metilsulfanil)(prop-2-en-1-il)amino]metiliden}hidraziniliden)metil]fenolatoaquacupru revendicat se obține la interacțiunea suspensiei etanolicе fierbinți (50-60°C) ale acetatului de cupru(II)  $\text{Cu}_2(\text{CH}_3\text{COO})_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  cu metil-N'-(2-hidroxifenil)metiliden]-N-prop-2-en-1-ilcarbamohidrazonotioat (4-alil-S-metilizotiosemicarbazona 2-hidroxibenzaldehidei), luate în raport molar 1:2. Reacția decurge în 40-50 min conform următoarei scheme:





Mecanismul prezentei reacții este legat de faptul, că în timpul sintezei, în amestecul reactant, are loc adiția la ionul de cupru(2+) a moleculei de 4-alil-S-metilizotiosemicarbazona a 2-hidroxibenzaldehidei, care joacă rolul de ligand-O,N,N tridentat monodeprotonat. Al patrulea loc în sfera internă este ocupat de atomul de oxigen al moleculei de apă, iar al cincilea loc este ocupat de un atom de oxigen al acetat-ionului monodentat.

Exemplu de obținere al acetato-2-[(metilsulfanil)[(prop-2-en-1-il)amino]metiliden}hidraziniliden)metil]fenolatoaquacupru. Se amestecă 20 mL de soluție etanolică, care conține 10 mmol de metil-N'-[(2-hidroxifenil)metiliden]-N-prop-2-en-1-ilcarbamohidrazonotioat (4-alil-S-metilizotiosemicarbazona 2-hidroxibenzaldehidei) cu 5 mmol de  $\text{Cu}_2(\text{CH}_3\text{COO})_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , sub formă de suspensie în 10 mL de alcool. Amestecul reactant este încălzit ( $50\text{-}60^\circ\text{C}$ ) și amestecat în permanență cu ajutorul agitatorului magnetic timp de 40-50 min. La răcire din soluție se depun cristale mărunte de culoare verde, care sunt filtrate prin filtru de sticlă, spălate cu o cantitate mică de etanol, eter și uscate la aer. Randamentul produsului final alcătuiește 72% de la cel calculat teoretic.

S-a determinat, % : C – 43,04; H – 4,70; Cu – 16,47; N – 10,87; S – 8,07.

Pentru  $\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{CuN}_3\text{O}_4\text{S}$  s-a calculat, % : C – 43,23; H – 4,92; Cu – 16,34; N – 10,80; S – 8,24.

Procedeele de obținere al compusului declarat este simplu în executare, substanțele inițiale sunt accesibile. Metil-N'-[(2-hidroxifenil)metiliden]-N-prop-2-en-1-ilcarbamohidrazonotioat (4-alil-S-metilizotiosemicarbazona 2-hidroxibenzaldehidei) a fost sintetizat după metoda descrisă în literatură (Pahontu E., Usataia I., Graur V., Chumakov Yu., Petrenko P., Gudumac V., Gulea A. Synthesis, characterization, crystal structure of novel Cu(II), Co(III), Fe(III) and Cr(III) complexes with 2-hydroxybenzaldehyde-4-allyl-S-methylisothiosemicarbazone: Antimicrobial, antioxidant and in vitro antiproliferative activity. Applied Organometallic Chemistry, 2018, vol. 32(12), e4544). Complexul revendicat este stabil în contact cu aerul, puțin solubil în apă și alcooli alifatici, este solubil în dimetilformamidă și dimetilsulfoxid, practic insolubil în eter.

Cercetarea vizuală sub microscop a compusului declarat demonstrează că el posedă omogenitate fazică. Din cauza dimensiunilor mici și absența monocristalelor de acest compus, pentru determinarea individualității componenței lui și structurii au fost utilizate metodele analizei elementelor, conductibilității electrice molare, magnetochimiei și spectroscopiei IR.

În baza determinării în dimetilformamidă a conductibilității electrice molare a compusului declarat s-a determinat, că el este un neelectrolit [ $\kappa=3 \text{ Ohm}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{mol}^{-1}$ ,  $20^\circ\text{C}$ ,  $C_m=0.001 \text{ M}$ ].

Studiul magnetochimic la temperatura camerei (293 K) a compusului cercetat a demonstrat, că valoarea calculată a momentului magnetic efectiv este apropiată ( $\mu_{\text{ef}} = 1,84\text{M.B.}$ ) de valoarea de spin pentru un electron necuplat. Deci în condițiile efectuării măsurărilor nu se realizează interacțiunea de schimb între ionii de cupru (2+) paramagnetici și complexul studiat are structura monomerică.

În scopul determinării modului de coordonare a liganzilor cu ionul de cupru(2+) a fost efectuată analiza comparativă a spectrelor IR ale compusului declarat și a metil-N'-[(2-hidroxifenil)metiliden]-N-prop-2-en-1-ilcarbamohidrazonotioat (4-alil-S-metilizotiosemicarbazona 2-hidroxibenzaldehidei).

S-a stabilit, că izotiosemicarbazona în complexul investigat se comportă ca un ligand tridentat monodeprotonat, unindu-se cu ionul central prin intermediul atomului de oxigen fenolic și a atomilor de azot azometinic și tiocarbamidic N4, formând metalocicluri din cinci și șase atomi. În favoarea acestui fapt vorbește dispariția în spectrele IR ale substanței declarate a benzii de absorbție  $\delta(\text{OH})$ , care în izotiosemicarbazona liberă se observă în domeniu  $1245\text{-}1240 \text{ cm}^{-1}$ . În cazul complexului declarat în spectrul IR banda  $\nu(\text{C}=\text{N})$  scindează în două benzi și se deplasează cu  $25\text{-}30 \text{ cm}^{-1}$  spre frecvențe mai mici (în izotiosemicarbazona inițială  $\nu(\text{C}=\text{N})$  se observă în domeniul  $1630\text{-}1610 \text{ cm}^{-1}$ ). În afară de aceasta în spectrele IR ale complexului în domeniul  $600\text{-}405 \text{ cm}^{-1}$  apar o serie de noi benzi de absorbție, care conform datelor luate din literatură, se detectează ca  $\nu(\text{Cu}-\text{N})$  și  $\nu(\text{Cu}-\text{O})$ . Prezența în complexul declarat a acetat-ionului se confirmă prin existența în spectru a benzilor de absorbție caracteristice [ $\nu_s(\text{CO}) = 1605$  și  $\nu_{\text{as}}(\text{CO}) = 1358 \text{ cm}^{-1}$ ].

Astfel, în baza rezultatelor analizei elementelor și a cercetărilor fizico-chimice, a fost stabilită compoziția și structura compusului declarat.

Esența invenției poate fi confirmată prin următoarele date experimentale.

Exemplu al utilizării a acetato-2-[(metilsulfanil)[(prop-2-en-1-il)amino]metiliden}hidraziniliden)metil]fenolatoaquacupru în calitate de activator al catalazei.

Acțiunea acetato-2-[(metilsulfanil)[(prop-2-en-1-il)amino]metiliden}hidraziniliden)metil]fenolatoaquacupru asupra catalazei eritrocitare a fost evaluată în experiențe pe un lot de 30 de șobolani albi masculi cu masa 180–230

g, divizați în 3 loturi a câte 10 animale în fiecare. Primul lot – martorul, a fost constituit din 10 animale, întreținute la un regim obișnuit alimentar de vivariu și cărora li s-a injectat subcutanat de 3 ori pe săptămână soluție fiziologică timp de 4 săptămâni.

Animalelor din lotul 2 li s-a administrat subcutanat compusul complex revendicat - acetato-2-[(metilsulfanil)(prop-2-en-1-il)amino]metiliden}hidraziniliden)metil]fenolatoaquacupru (în doza 0,10  $\mu\text{M/kg}$ ) de 3 ori pe săptămână pe parcursul a 4 săptămâni, iar celor din lotul 3 (cea mai apropiată soluție) li s-a administrat subcutanat vitamina D3 (în doza 20,0  $\mu\text{M/kg}$ ).

După 24 ore de la expirarea termenului experiențelor, a fost colectat sângele pentru evaluarea catalazei. Masa eritrocitară, obținută după decantarea plasmei sanguine, a fost spălată de 3 ori cu ser fiziologic. Activitatea catalazei (CAT) a fost determinată conform metodei descrise în literatură (Gudumac V., Rîvneac V., Tagadiuc O., Sardari V., Rîvneac E., Andronache L., Știrba O., Pantea V., Popa V. Metode de cercetare a metabolismului hepatic. Elaborare metodică. Univ. de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”, 2012, p.105-106). Mai pe scurt, în microplăcile fotometrice cu 96 de godeuri se măsoară câte 0,01 mL masă eritrocitară diluată de 1000 ori cu apă distilată și, apoi, se adaugă câte 0,18 mL sol. 0,03% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. În probele martor în loc de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se adaugă aceeași cantitate de apă distilată. Paralel se pregătesc 3 probe de referință, care conțin numai H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> și apă distilată. Apoi probele se incubează timp de 10 min la temperatura de 37°C, apoi se adaugă câte 0,10 mL de soluție de 4% de molibdat de amoniu, se agită și se măsoară absorbanta la 410 nm. Se calculează diferența dintre absorbanta probei de referință și celei experimentale. Calcularea activității enzimatică se efectuează utilizând curba de calibrare și se exprimă în  $\mu\text{mol pe s la 1 g Hb}$  ( $\mu\text{mol/s}\cdot\text{g Hb}$ ).

Evaluarea statistică a datelor obținute a fost efectuată cu ajutorul programului computerizat StatsDirect. A fost calculată media aritmetică  $\pm$  eroarea mediei ( $M \pm m$ ). Pentru testarea diferenței semnificative dintre indicii studiați ai loturilor comparate s-a utilizat testul statistic nonparametric „U Mann-Whitney” și pragul de semnificație - „ $p < 0,05$ ”.

Datele experimentale obținute privind studierea proprietăților de activizare a catalazei de către acetato-2-[(metilsulfanil)(prop-2-en-1-il)amino]metiliden}hidraziniliden)metil]fenolatoaquacupru sunt prezentate în tabel din care se observă, că compusul menționat manifestă proprietăți mai înalte, decât cea produsă de vitamina D3, utilizată în calitate de cea mai apropiată soluție.

Tabel

Influența acetato-2-[(metilsulfanil)(prop-2-en-1-il)amino]metiliden}hidraziniliden)metil]fenolatoaquacupru, precum și a vitaminei D3 asupra proprietăților de activizare a catalazei eritrocitare

Notă: \* - diferență statistic semnificativă cu lotul martor (\*\* -  $p < 0,01$ ; \*\*\* -  $p < 0,001$ );

Grupurile de studiu	Catalaza, $\mu\text{M/s}\cdot\text{g.Hb}$
Lotul martor (grupul de control)	18,80 $\pm$ 1,34 (100%)
Acetato-2-[(metilsulfanil)(prop-2-en-1-il)amino]metiliden}hidraziniliden)metil]fenolatoaquacupru (0,1 $\mu\text{M/kg}$ )	35,7 $\pm$ 1,87***## (190%)
Vitamina D3 (20 $\mu\text{M/kg}$ )	28,6 $\pm$ 1,42** (152%)

# - diferență statistic semnificativă cu cea mai apropiată soluție (#-  $p < 0,05$ ; ## -  $p < 0,01$ ).

La animalele expuse acțiunii acetato-2-[(metilsulfanil)(prop-2-en-1-il)amino]metiliden}hidraziniliden)metil]fenolatoaquacuprului, s-a constatat o creștere importantă a proprietăților de activizare a catalazei eritrocitare, care este de 1,9 ori mai înaltă în comparație cu martorul și de 1,25 ori mai înaltă decât cea a vitaminei D3, utilizată în medicină în calitate de etalon pentru determinarea activității de inducere/activizare a catalazei. Aceasta indică existența unei sinteze excesive a catalazei după expunerea cu acest compus, fapt deosebit de important, stabilit de noi în premieră.

Proprietățile depistate ale acetato-2-[(metilsulfanil)(prop-2-en-1-il)amino]metiliden}hidraziniliden)metil]fenolatoaquacuprului prezintă interes pentru medicină din punct de vedere al extinderii arsenalului de activatori sintetici ai catalazei.

Compusul revendicat poate fi folosit pentru obținerea unor remedii eficiente pentru creșterea producerii catalazei în mai multe boli multifactoriale, cum ar fi diabetul zaharat, cancerul, procesele inflamatorii, hipertensiunea arterială, anemia, vitiligo, bolile neurodegenerative (cum ar fi boala Alzheimer, boala Parkinson, tulburarea bipolară și schizofrenia), infecția COVID-19, tulburările induse de ischemie-reperfuție, și altele. Luând în considerare că expresia catalazei în creier este redusă în îmbătrânire compusul revendicat ar putea fi folosit, de asemenea, pentru obținerea unor remedii cu proprietăți antiîmbătrânire. Metoda indicată ne permite de a considera că îmbătrânirea nu este inevitabilă, ea este o oportunitate.