

# TEZĂ DE ABILITARE

## CONTRIBUȚII LA STUDII PRIVIND NOI MOLECULE ȘI MEDICAMENTE CU STRUCTURĂ HETEROCICLICĂ

Conf. Dr. Ovidiu Crișan

### REZUMAT TEZĂ

Această teză de abilitare prezintă într-o manieră sintetică, principalele realizări ale autorului științifice, profesionale și academice în perioada 2003-prezent după obținerea titlului de doctor. Obiectul principal al cercetării mele este obținerea și caracterizarea unor compuși poliheterociclici cu heterocicluri izolate și condensate: tiazoli, tiazolo-triazoli, bis-tiazolo-triazoli. Studiul comportamentului chimic al compușilor heterociclici obținuți; evaluarea potențialului biologic al compușilor heterociclici sintetizați: activitate antimicrobiană, antifungică, antiinflamatorie, studii privind toxicitatea compușilor sintetizați dar și stabilirea relațiilor calitative și cantitative între structura chimică – activitate biologică.

Primul studiu prezentat este obținerea unor noi compuși, cu structură de 5-((2-feniletiazol-4-yl)-metilen)-tiazolidină-2,4-dionă, 5-(2,6-diclorbenziliden)tiazolidină-2,4-dionă și derivații lor substituiți. Elucidarea structurală a compușilor nou-sintetizați s-a bazat pe analiza elementară, pe date spectroscopice (MS,  $^1\text{H}$ -RMN,  $^{13}\text{C}$ -RMN), iar activitățile lor antimicrobiene au fost evaluate in vitro pe mai multor tulpini de bacterii Gram-pozitive și Gram-negative și a unei tulpini fungice (*Candida albicans*) măsurându-se diametru de inhibiție a creșterii. Unele dintre ele au arătat activități modeste dar câțiva dintre compuși au o bună activitate antibacteriană pe tulpini Gram-negative (*E. coli*, *S. typhimurium*) și Gram-pozitive (*S. aureus*, *B. cereus*, *E. faecalis*), în timp ce aproape toți compușii au fost inactivi împotriva *L. monocytogenes*. Toți compușii sintetizați au arătat o activitate moderată până la foarte bună împotriva *C. albicans*.

Al doilea studiu descrie rezultatele recente vizează sinteza unei serii de noi acil-hidrazone grefate pe unele structuri de 2-aril-tiazol obținute prin condensarea unor derivați de 4-[2-(4-metil-2-fenil-tiazol-5-yl)-2-etoxi]-benzaldehydă sau 4-(2-aril-tiazol-4-yl-metoxi)-benzaldehydă cu hidrazidele unor diferiți acizi carboxilici. Structurile compușilor nou sintetizați au fost stabilite prin utilizarea combinată a IR,  $^1\text{H}$ -RMN, MS și analiză elementară. Acești compuși au fost testați in vivo pentru activitatea lor antiinflamatorie, prin inducerea unei inflamații experimentale acută. De asemenea a fost evaluat răspunsul măduvei osoase în fază acută urmărind activitatea fagocitelor și sinteza NO. Unii compuși sintetizați au redus numărul absolut de leucocite datorită procentului mai mic de neutrofile. Indicele fagocitar a fost scăzut pentru toți compușii. Cinci dintre compușii sintetizați au inhibat inflamația acută, mai puternic decât Meloxicam, medicamentul antiinflamator de referință.

În cel de-al treilea studiu, s-au sintetizat unii derivați noi dar și cunoscuți de benziiliden-hidrazil-tiazol printr-o condensare Hantzsch, structurile lor au fost atribuite pe baza spectrelor  $^1\text{H}$ -NMR,  $^{13}\text{C}$ -NMR și MS. Toți compușii au fost evaluați pentru citotoxicitatea lor in vitro pe două linii celulare de carcinom MDA-MB231 și HELA, iar capacitatea de inhibare a fost relevantă pentru cinci dintre derivați. Interacțiunea ADN cu cei mai antiproliferativi tiazoli activi a fost de asemenea, investigată folosind ADN plasmid (pTZ57R).

Al patrulea studiu prezintă o nouă serie de 2-(acetofenon-hidrazino)-tiazoli și 2-(4-tiazolil-hidrazino)-tiazoli fiind sintetizați pornind de la diferite tiosemicarbazone prin reacția cu diferiți compuși  $\alpha$ -halocarbonilici. Compușii nou sintetizați au fost caracterizați prin IR,

<sup>1</sup>H-RMN și studii spectrale de masă.

Ultimul studiu prezentat se referă la unii derivați de hidrazino-tiazol respectiv 2-(clorobenziliden)hidrazinil-tiazol care au fost preparați convenabil printr-un protocolul de reacție Hantzsch, pornind de la unele tiosemicarbazone supuse condensării cu etil-2-bromo-3-oxo-3-fenilpropanoatul. Capacitatea lor antioxidantă a fost testată prin teste pe baza unor reacții cu de transfer de electroni, având ca reactiv DPPH (1,1-Difenil-2-picrylhydrazyl), precum și ionul feric, s-a observat o acțiune puternică antioxidantă calculându-se (FRAP). La concentrația de 9,5 μg/ml, s-a constatat că activitatea de inhibare a radicalilor liberi a 2-(2-(3-clorobenziliden)hidrazinil)-4-fenil-tiazol-5-carboxilatul de etil a fost mai mare de 93%.

În ultimii ani am căutat noi domenii de cercetare și am fost cooptat în calitate de colaborator în echipa de cercetare a Botanicii Farmaceutice a Facultății de Farmacie, activitatea de cercetare a avut ca scop, optimizarea unor metode de extracție a compușilor bioactivi din matricele vegetale, identificarea și determinarea cantitativă a unor clase de compuși relevanți pentru acțiunea terapeutică, evaluarea activității biologice și terapeutice, in vitro și in vivo, a extractelor naturale obținute din matrice vegetale, precum și evaluarea răspunsului biochimic.

Studiul "Perspective biologice și chimice ale scoarței de (*Fagus Sylvatica* L.): o sursă de compuși bioactivi" a avut ca scop îmbunătățirea randamentului extracției a polifenolilor din scoarță, utilizând o tehnică cu microunde (MAE) și realizarea unui design experimental de abordare (DoE). Pe de altă parte, extractele din scoarță de (BBE) au fost caracterizate în ceea ce privește profilul lor fitochimic și evaluate pentru potențialul biologic (antioxidant, antibacterian, antifungic, antimutagen, anti- $\alpha$ -glucozidază și anti-tirozinază). Timpul de extracție variază în funcție de cantitatea de conținut fenolic total extras (TPC). Puterea cuptorului cu microunde favorizează extracția TPC, dar în proporții diferite. Condițiile optime care au dat cel mai mare TPC (76,57 mg GAE/ g material vegetal uscat) au fost atinse atunci când puterea cuptorului cu microunde a fost de 300 W, timpul de extracție a fost de 4 min, iar solventul a fost un amestec etanol-apă (50:50). Valoarea practică a TPC după un experiment controlat a fost de 76,49 mg GAE/g material vegetal. Compușii identificați au fost acidul vanilic, acidul galic, epicatechina, catechina, acidul protocatehuic, acidul clorogenic, acidul ferulic și quercitrina. Potențialul antioxidant a extractelor de scoarță (BBE) a fost demonstrat prin experimente in vitro. Extractele au fost active împotriva *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* și *Candida*. Toate extractele au avut o activitate antimutagenică modestă observându-se o minimă inhibare a activității  $\alpha$ -glucozidazei și tirozinazei.

Medicina tradițională românească descrie utilizarea unor părți aeriene din specia *Fumaria* pentru tratarea bolilor hepatobiliare, precum și efectul lor diuretic. Studiu prezentat își propune să investigheze compoziția chimică, proprietățile antioxidante și efectele diuretice ale mai multor specii de *Fumaria*. Analiza LC/MS a arătat că speciile *Fumaria* conțin acizi fenolici și cantități mari de flavonoide rutină și izoquercitrină compuși principali. În ceea ce privește capacitatea antioxidantă, cele mai semnificative rezultate au fost obținute pentru *F. capreolata* și *F. vailantii*. Ambele specii au arătat o corelație bună între capacitatea antioxidantă și un număr mare de flavonoide. În plus, extractele de *F. officinalis* și *F. schleicheri* au produs o creștere puternică a excreției volumetrică urinare a șobolanilor încărcăți cu soluție salină, la 24 de ore după administrarea orală a unei singure doze de 250 mg/kg g.c.. În plus, ambele extracte de *F. officinalis* și *F. schleicheri* au crescut excreția urinară a  $\text{Na}^+$  și  $\text{K}^+$ . Rezultatele prezentului studiu oferă o nouă perspectivă asupra compoziției chimice și a bioactivității speciilor de *Fumaria* utilizate în mod tradițional.

Tulpinile de cireșe (CS) reprezintă un produs secundar utilizat intens în țările est-europene ca remediu tradițional pentru tulburările tractului urinar. Dovezile etnofarmacologice susțin utilizarea CS ca preparate apoase (perfuzie, decoct), dar puține date

au fost raportate anterior despre profilul fitochimic și potențialul farmacologic al extractelor hidroalcoolice CS. În acest sens, ne-am propus să evaluăm profilul fenolic, potențialul antioxidant in vitro, efectul de inhibiție al tirozinazei și activitatea diuretică in vivo a extractului hidroetanolic de tulpini de cireșe 70% (CSE) și a decoctului de tulpini de cireșe (CSD). Analiza LC-DAD-ESI/MSN a evidențiat prezența flavonoidelor, constituenți principali pentru ambele preparate, în special flavanone (glicozide ale naringeninei). Activitatea antioxidantă evaluată prin PPH, ABTS și FRAP este superioară pentru CSE, probabil datorită prezenței compușilor fenolici în cantități mai mari decât CSD-ul. Pe de altă parte, potențialul inhibitor al tirozinazei și efectul diuretic exercitat de CSD este mai puternic, datorită unor metaboliți secundari hidrofili. În general, constatările noastre indică faptul că preparatele CS ar putea fi utilizate ca agenți diuretici promițători și încurajează realizarea unor investigații suplimentare cu privire la corelarea dintre compoziția lor chimică și potențialul bioactiv.

În ultimii ani am participat ca membru în echipa de cercetare a IOCN "Constantin Chiricuță" condusă de profesorul Călin Căinap. Cercetarea s-a axat pe terapia cancerului gastric și a cancerului colono-rectal.

Bevacizumab sau cetuximab reprezintă tratamentul standard în asociere cu chimioterapia clasică în cancerul colorectal metastatic (mCRC). Tratamentul cu Bevacizumab ar putea fi continuat și după prima progresie a bolii cu un avantaj general de supraviețuire (OS), comparativ cu chimioterapia neasociată cu inhibitori monoclonali, dar doza optimă rămâne o problemă discutabilă. Într-o analiză retrospectivă a pacienților cu mCRC tratați cu bevacizumab, am selectat pacienții cu evoluție în progresie și i-am stratificat în funcție de doza primită: doza primită de bevacizumab (SDB) asociată cu chimioterapia de primă linie și o doză dublă de bevacizumab (DDB) de asemenea asociată cu chimioterapia de primă linie. Pentru fiecare grup, s-a evaluat statistic, timpul de eșec al tratamentului (TTF) și supraviețuirea fără progresie în prima linie (PFS1) și în a doua linie (PFS2). În terapia de primă linie, s-a utilizat oxaliplatină la 73% SDB, comparativ cu 22,5% pacienți DDB, în timp ce irinotecanul a fost utilizat la 75% DDB și 27% pacienți SDB. Oxaliplatină de linia a doua a fost administrată la 50% DDB și 29,7% pacienți SDB, în timp ce irinotecanul a fost administrat la 47,5% pacienți DDB și 70,3% SDB. Valorile mediane au fost OS - 41 luni în grupul DDB și 25 de luni în grupul SDB ( $p = 0,01$ ); TTF - 24 de luni în grupul DDB și 19 luni în grupul SDB ( $p=0.009$ ); PFS1 - 17 luni în grupul DDB și 12 luni în grupul SDB ( $p=0,008$ ); PFS2 - 9 luni în grupul DDB și 5 luni în grupul SDB ( $p = 0,03$ ). Dublarea dozei de bevacizumab la progresie pare să ofere un avantaj OS și PFS pentru pacienții cu mCRC.

Secvența optimă a terapiilor țintite în cancerul colorectal metastatic nu este stabilită. Ne-am propus să analizăm dacă administrarea anterioară de bevacizumab are un impact asupra răspunsului la inhibitorii receptorilor factorului de creștere epidermică în liniile ulterioare de terapie. S-a efectuat o analiză retrospectivă a pacienților cu cancer colorectal metastatic KRAS sau KRAS/NRAS care au primit un inhibitor al receptorilor factorului de creștere epidermică în a doua sau mai târziu linie de terapie, iar rezultatele lor au fost analizate în funcție de expunerea anterioară la bevacizumab. Au fost incluși 85 de pacienți cu cancer colorectal metastatic, dintre care 22 au primit chimioterapie anterioară (grupa A) și 63 chimioterapie anterioară, plus bevacizumab (grupa B). Supraviețuirea globală a fost semnificativ mai mare în grupa B (35,6 luni față de 24,8 luni,  $p = 0,01$ ). Supraviețuirea generală și supraviețuirea fără progresie calculată de la începutul inhibitorului receptorilor factorului de creștere epidermică nu diferă semnificativ între grupuri. Analiza multivariată a arătat că utilizarea bevacizumab nu a avut un impact semnificativ asupra supraviețuirii. Rezultatele noastre arată că administrarea anterioară de bevacizumab nu influențează eficacitatea inhibitorilor receptorilor factorului de creștere epidermică în liniile ulterioare de tratament.

Cancerul colorectal a devenit una dintre cele mai frecvente tumori maligne la nivel mondial, datorită schimbărilor semnificative în obiceiurile alimentare moderne. Aproximativ jumătate dintre pacienți dezvoltă metastaze în timpul bolii lor. Arsenalul terapeutic disponibil este în continuă evoluție, ridicând întrebări cu privire la cea mai bună abordare pentru îmbunătățirea supraviețuirii. Bevacizumab rămâne una dintre cele mai utilizate terapii pentru tratarea cancerului colorectal metastatic și poate fi utilizat și după progresie. Acest studiu a avut ca scop identificarea celui mai bun partener de chimioterapie pentru bevacizumab după progresie. Am efectuat o analiză retrospectivă a pacienților cu cancer colorectal metastatic care au fost tratați cu bevacizumab ca chimioterapie de prima și a doua linie. Datele au fost colectate pentru 151 de pacienți, dintre care 40 au fost tratați cu bevacizumab cu doză dublă după prima progresie. Cele două regimuri standard de chimioterapie combinate cu bevacizumab au fost FOLFIRI/CAPIRI și FOLFOX4/CAPEOX. Inițierea tratamentului de primă linie cu chimioterapie pe bază de irinotecan a îmbunătățit supraviețuirea fără progresie și timpul de eșec al tratamentului, dar nu și supraviețuirea generală. După prima progresie, utilizarea aceluiași regim ca cel utilizat în faza de inducție a fost cea mai bună abordare pentru îmbunătățirea supraviețuirii globale (supraviețuirea globală mediană: 46,5 vs. 27,0 luni pentru aceeași strategie respectiv față de cea schimbată). Nu s-au observat corelații între intensitatea dozei de irinotecan, oxaliplatină, 5-fluorouracil sau bevacizumab și supraviețuirea generală, supraviețuirea fără progresie în tratamentul de prima/a doua linie și timpul până la eșecul tratamentului. Interacțiunea dintre un regim pe bază de irinotecan ca tratament de linia a doua și un bevacizumab cu doză dublă după progresie a fost asociată cu o supraviețuire generală îmbunătățită ( $p = 0,06$ ). Inițierea tratamentului sistemic cu un regim pe bază de irinotecan în combinație cu bevacizumab a îmbunătățit supraviețuirea fără progresie în tratamentul de primă linie și timpul până la eșecul tratamentului. În ceea ce privește supraviețuirea generală, tratamentul cu bevacizumab după prima progresie este mai bine asociat cu același regim ca cel utilizat în faza de inducție.

Punctând principalele realizări ale activității didactice, am scris 12 manuale de chimie organică, pentru admiterea la Facultatea de Medicină, Medicină Dentară și Farmacie, în calitate de coautor, material bibliografic pentru viitorii studenți și 3 cărți de specialitate: una ca prim autor: "*SYNTHÈSE ORGANIQUE DE LABORATOIRE*" una ca coautor: "*PRODUȘI NATURALI HETEROCICLICI*" și una colaborator, "*PRODUȘI NATURALI*", utile studenților ca material bibliografic.

Activitatea de cercetare s-a materializat prin participarea la proiecte științifice naționale și publicarea rezultatelor în reviste recunoscute la nivel național și internațional. Ca membru al echipei de cercetare, am fost implicat în 9 granturi obținute prin competiție națională, rezultatele cercetărilor au fost publicate în 38 de lucrări științifice în extenso, după cum urmează: 25 lucrări ISI, 8 BDI, 5 neindexate, 31 de lucrări științifice în extenso au fost publicate după obținerea gradului de doctorat, 25 ISI(13 autor principal) și 6 BDI (3 autor principal).

Obiectivele viitoarei activități științifice vizează sinteza de noi compuși cu structură hidrazidică având ca precursor dihidrazidă malonică și caracterizarea lor din punct de vedere chimic și spectral (IR, MS,  $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-RMN}$ ) având în vedere ca hidrazidele obținute tratate cu molecule care conțin două centre electrofile pot forma atât compuși heterociclici, cât și compuși de policondensare, ne propunem efectuarea: unui studiu cinetic al reacțiilor de condensare și/sau policondensare, andocare moleculară, studii de lipofilie și screening in vitro privind activitatea antiinfecțioasă, antiinflamatorie și anticancerigenă de asemenea vrem să realizăm și un studiu toxicologic al compușilor sintetizați.

Un alt obiectiv pe care mi-l propun este continuarea studiilor în domeniul fitochimiei pe o serie de matrice obținute din plante medicinale și continuarea cercetării în legătură cu

politicile de sănătate și educaționale de asemenea vreau să continui implicarea în proiectele de cercetare dezvoltate pe molecule active deja introduse în terapia anticanceră.