

**UNIVERSITATEA DIN BUCUREȘTI
FACULTATEA DE CHIMIE
ȘCOALA DOCTORALĂ ÎN CHIMIE**

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

**SINTEZE DE NOI DERIVAȚI AI IZONIAZIDEI CU POSIBILE
IMPLICAȚII ÎN TERAPIA INDIVIDUALIZATĂ A
TUBERCULOZEI**

Doctorand:

LILIA MATEI

Conducător doctorat:

Prof. Dr. ION BACIU

2015

Cuprins

(numerotarea paginilor este cea din teza de doctorat)

INTRODUCERE.....	6
CAPITOLUL I. TUBERCULOZA	9
1.1 Istoria tuberculozei și situația epidemiologică	9
1.2 Etiologia tuberculozei. <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	11
1.3 Transmiterea și patogeneza tuberculozei.....	14
1.4 Manifestarea clinică a bolii	15
1.5 Latența <i>M. tuberculosis</i> și reactivarea bacililor/bolii	15
1.6 Tratatamentul tuberculozei.....	16
1.7 Rezistența la medicamente	19
CAPITOLUL II. IZONIAZIDA ȘI DERIVAȚI AI IZONIAZIDEI	21
2.1 Considerații generale.....	21
2.2 Farmacocinetica izoniazidei.....	21
2.3 Mecanismul de acțiune.....	22
2.4 Rezistența la izoniazidă.....	24
2.5 Metabolismul izoniazidei	24
2.6 Efectele adverse ale izoniazidei și ale metaboliților săi	26
2.7 Statutul acetilator și efectele adverse ale izoniazidei	27
2.8 Derivați ai izoniazidei	28
2.8.1 Influența structurii asupra activității biologice a derivaților de izoniazidă	29
2.8.2 Metode de sinteză ale derivaților izoniazidei	30
2.8.3 Modificări simple ale izoniazidei	40
2.8.4 Analogi hidrazidici ai izoniazidei.....	41
2.8.5 Analogi hidrazonici ai izoniazidei.....	46
2.8.6 Analogi cianoboranici ai izoniazidei	64
2.8.7 Analogi chelați ai izoniazidei	65
CAPITOLUL III. METABOLISMUL MEDICAMENTELOR.....	67
3.1 Considerații generale.....	67
3.2 Metabolismul medicamentelor - faza I.....	68
3.3 Metabolismul medicamentelor - faza II	70
3.4 Factorii ce influențează metabolismul.....	72

3.5 Rolul metabolismului în toxicitatea indusă de un medicament.....	75
3.6 Metode de studiu ale metabolismului medicamentelor	76
3.6.1 Identificarea metaboliților. Tehnici analitice.....	76
3.6.2 Sisteme biologice utilizate pentru evaluarea biotransformării și toxicității unui medicament.	77
3.6.3 Metode de evaluare a toxicității induse de metabolism.....	82
CAPITOLUL IV. POLIMORFISMELE NAT ȘI STATUTUL ACETILATOR AL PACIENȚILOR CU TUBERCULOZĂ	87
4.1 Analiza polimorfismelor genelor NAT	87
4.1.1 Polimorfismele genei <i>NAT1</i>	88
4.1.2 Polimorfismele genei <i>NAT2</i>	92
4.2 Analiza influenței parametrilor de farmacogenetică asupra relației doză – răspuns la terapie....	96
4.3 Analiza corelațiilor genotip / fenotip / parametri farmacocinetici la pacienți cu tuberculoză și afecțiuni asociate, comparativ cu pacienți cu tuberculoză, dar fără alte afecțiuni	98
4.4 Analiza critică a efectelor adverse prin prisma investigațiilor de farmacogenetică	101
4.5 Selectarea liniilor celulare folosite pentru studiul mecanismului de metabolizare a unor noi derivați ai izoniazidei	102
CAPITOLUL V. SINTEZA UNOR NOI COMPUȘI CU POTENȚIALĂ ACTIVITATE ANTITUBERCULOASĂ ȘI CARACTERIZAREA LOR STRUCTURALĂ	107
5.1 Sinteza și analiza structurală a N'-[1-amino-1-mercapto-3-(fenil-p-substituit)-alil]-hidrazidelor acidului izonicotinic (INH-TCA)	109
5.2 Sinteza și analiza structurală a derivaților izoniazidici ai acizilor 2-(fenoximetil-4-substituit)- benzoici (INH-AC).....	112
5.3 Sinteza și analiza structurală a N-(1,5-dimetil-3-oxo-2-fenil-2,3-dihidro-1H-pirazol-4-il)-3,5- dinitro-4-[N-(piridin-4-carbonil)hidrazino]-benzamidei (INH-AP).....	118
5.4 Sinteza și analiza structurală a hidrazidelor 2-hidroxi-triciclo[7.3.1.0 ^{2,7}]tridec-13-ilidenice ale acidului izonicotinic (INH-TCT).....	120
CAPITOLUL VI. STUDIUL ACTIVITĂȚII ANTIBACTERIENE	123
6.1 Activitatea anti- <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	123
6.2 Activitatea asupra bacteriilor non-tuberculoase	129
CAPITOLUL VII. STUDII ASUPRA MECANISMULUI DE METABOLIZARE A NOILOR DERIVAȚI AI IZONIAZIDEI.....	136
7.1 Influența noilor derivați ai izoniazidei asupra expresiei genelor NAT.....	136
7.2 Influența noilor derivați ai izoniazidei asupra expresiei altor enzime implicate în metabolismul medicamentelor	142
7.2.1 Enzime implicate în prima fază a metabolismului	142
7.2.2 Enzime implicate în a doua fază a metabolismului	149
7.3 Evaluarea căilor posibile de metabolizare a noilor derivați ai izoniazidei.....	153
CAPITOLUL VIII. STUDIUL ACTIVITĂȚII CITOTOXICE A NOILOR COMPUȘI SINTETIZAȚI	161

8.1 Evaluarea prin citometrie în flux a apoptozei induse de noii compuși sintetizați	162
8.2 Mecanismul de inducere al apoptozei de către noii derivați ai izoniazidei	168
8.2.1 Evaluarea căilor de inducere a apoptozei de către noii derivați ai izoniazidei.....	170
8.2.2 Influența noilor derivați asupra nivelului de expresie al proteinelor reglatoare a apoptozei	175
8.3 Frația citosolică vs. fracția mitocondrială a citocromului c.....	179
CAPITOLUL IX. INFLUENȚA NOILOR DERIVAȚI AI IZONIAZIDEI ASUPRA CICLULUI CELULAR	182
9.1 Determinarea influenței noilor compuși asupra ciclului celular prin citometrie de flux.....	183
9.2 Determinarea expresiei genelor implicate în ciclul celular	189
9.3 Evaluarea expresiei genice a AMPK și implicații în blocarea ciclului celular.....	196
CAPITOLUL X. MATERIALE ȘI METODE.....	201
10.1 Sinteza unor noi substanțe cu potențial antituberculos și caracterizarea lor structurală.....	201
10.2 Evaluarea activității antibacteriene a noilor compuși sintetizați	215
10.3 Lotul de pacienți investigat și liniile celulare utilizate.....	217
10.4 Tehnici de izolare și de estimare cantitativă /calitativă a ARN/ADN total.....	219
10.5 Evaluarea genotipului NAT.....	225
10.6 Evaluarea expresiei genice prin reacție de amplificare polimerazică cantitativă	227
10.7 Evaluarea expresiei markerilor fenotipici celulari utilizând tehnica citometriei de flux.....	230
10.8 Determinarea concentrației citocromului c în fracția mitocondrială vs. fracția citosolică utilizând tehnica ELISA	232
CONCLUZII	234
Bibliografie.....	238
Abrevieri.....	264

(numerotarea tabelor, figurilor și a trimiterilor bibliografice este cea din teza de doctorat)

Tuberculoza este o boală infecțioasă contagioasă cauzată de *Mycobacterium tuberculosis*, o bacterie patogenă aerobă. Boala evoluează în funcție de integritatea sistemului imun al gazdei către eliminarea imediată a agentului patogen și/sau inducerea unei stări latente, sau dezvoltarea unei boli active. În 1993, OMS a declarat tuberculoza o problemă urgentă de sănătate publică la nivel mondial.³

În prezent, tratamentul tuberculozei se bazează pe două grupe de medicamente: tuberculostatice majore caracterizate de o eficacitate crescută și toxicitate acceptabilă (izoniazida, rifampicina, streptomycină, etambutol și pirazinamidă) și tuberculostatice minore caracterizate de o eficacitate mai redusă sau o toxicitate mai mare (de ex. kanamicina, etionamidă, tiacetazonă, rifabutin ș.a.).

Izoniazida (INH), hidrazida acidului izonicotinic, este unul dintre medicamentele cu eficacitate crescută împotriva bacteriilor *M. tuberculosis* cu metabolism activ și/sau aflate în faza de multiplicare,⁵ și este mai puțin activă împotriva bacteriilor dormante.⁷ Izoniazida pătrunde în celula micobacteriană prin difuzie pasivă prin peretele celular. În interiorul celulei, ea este activată de către catalază-peroxidază micobacteriană (KatG).⁹ Formele active ale izoniazidei manifestă efecte diferite asupra sintezei acizilor micolici care intră în componența peretelui bacterian, asupra replicării și transcripției acizilor nucleici și asupra metabolismului respirator bacterian. Mecanismul de acțiune al izoniazidei este foarte complex și, până în prezent, nu este complet elucidat.¹³

Activitatea izoniazidei și toxicitatea ei este influențată de metabolismul ei în organismul uman. Calea principală de metabolizare a acestui medicament presupune acetilarea de către *N*-acetiltransferaze (NAT). Metabolitul format, acetilizoniazida (AcINH), este metabolizat în continuare în acetilhidrazină și în diacetilhidrazină, ultima fiind considerată non-toxică.²³ Metabolismul izoniazidei este influențat de polimorfismele genelor ce codifică NAT. Prezența diferitelor polimorfisme determină diferențe în activitatea enzimatică a NAT-ilor și un profil acetilator individual. Astfel, populația umană poate fi clasificată în acetilatori lenți, intermediari și rapizi.¹⁵ Acetilarea rapidă a izoniazidei micșorează concentrația substanței active și afectează eficiența terapiei, în special în cazul pacienților cu doze săptămânale unice. La polul opus, în cazul acetilatorilor lenți crește riscul apariției efectelor adverse determinate de acumularea metaboliților toxici ai izoniazidei, de exemplu hepatotoxicitatea.¹⁷

Conform datelor din literatură, modificarea moleculei izoniazidei prin adăugarea unei grupări funcționale la unitatea hidrazinică ar putea bloca acetilarea acestui medicament de către NAT, influențându-i activitatea și toxicitatea.²⁰

Scopul acestei teze a constat în sinteza și caracterizarea de noi derivați ai izoniazidei pentru îmbunătățirea terapiei antituberculoase a acetilatorilor lenți.

Obiective:

1. Analiza corelațiilor genotip / fenotip / parametri farmacocinetici privind genele implicate în metabolizarea medicamentelor antituberculoase.
2. Sinteza și bioevaluarea unor noi compuși derivați ai izoniazidei cu potențială activitate antimicobacteriană.

Teza de doctorat este structurată în două părți: partea teoretică care cuprinde datele din literatura de specialitate, reprezentative pentru tema abordată, și partea originală care prezintă rezultatele cercetării realizate în cadrul temei de doctorat.

Partea teoretică este constituită din trei capitole. În capitolul I sunt redate date referitoare la tuberculoză, agentul său etiologic, *Mycobacterium tuberculosis*, și particularitățile sale, transmiterea și mecanismul bolii, dar și schemele actuale de tratament, medicamentele utilizate și rezistența la acestea. Al doilea capitol este dedicat izoniazidei, medicamentul cel mai des utilizat în tratamentul tuberculozei, mecanismul său de acțiune și rezistența la acest medicament, dar și metabolismul izoniazidei și implicațiile lui în dezvoltarea unor efecte adverse care influențează tratamentul antituberculos administrat, la fel ca și factorii determinanți. De asemenea, în acest capitol sunt prezentați diferiți derivați ai izoniazidei descriși în literatura de specialitate, metodele de obținere și activitatea lor biologică. Cel de-al III-lea capitol este dedicat metabolismului medicamentelor, fiind descrise pe scurt reacțiile principale ale celor două faze convenționale ale metabolismului xenobioticelor, factorii care influențează metabolismul medicamentelor și rolul metabolismului în toxicitatea indusă de medicamente. De asemenea, sunt prezentate metodele de studiu a metabolismului medicamentelor și a toxicității induse de acesta.

În partea a doua a tezei de doctorat sunt prezentate rezultatele originale obținute în cadrul tezei de doctorat. Aceasta parte a tezei este constituită din șapte capitole, ultimul capitol fiind dedicat materialelor și metodelor utilizate.

Capitolul IV. Polimorfismele NAT și Statutul Acetilator al Pacienților cu Tuberculoză

Acest capitol prezintă în prima parte analiza corelațiilor genotip / fenotip / parametrii farmacocinetici privind genele implicate în metabolizarea medicamentelor antituberculoase și stabilirea polimorfismelor genelor *NAT* responsabile de efectele adverse ale izoniazidei în populația din România. A doua parte a acestui capitol descrie selectarea unor linii celulare ce pot fi utilizate în evaluarea biotransformării și eliminării substanțelor noi sintetizate în cazul pacienților cu un profil acetilator responsabil de efectele adverse ale izoniazidei.

Polimorfismele genetice ale *N*-acetiltransferazelor influențează puternic timpul de înjumătățire al izoniazidei, rata de acetilare având un efect semnificativ asupra concentrației de medicament liber în plasmă și asupra timpului de înjumătățire în circulație, dar și asupra efectul bactericid timpuriu al izoniazidei asupra *M. tuberculosis*. De asemenea, tratamentul tuberculozei cu izoniazidă poate determina apariția unor efecte adverse cum sunt tulburările hepatice și neurotoxicitatea periferică. Astfel, pentru realizarea primului obiectiv am evaluat polimorfismele genelor *NAT* responsabile de efectele adverse induse de izoniazidă la 37 de pacienți diagnosticați cu tuberculoză pulmonară, cu sau fără efecte adverse.

Evaluarea polimorfismelor genei *NAT1* a evidențiat prezența a două polimorfisme situate în regiunea promotoare, C⁻³⁴⁴→T și C⁻⁴⁰→T, a polimorfismelor non-sinonime G⁴⁴⁵→A (Val¹⁴⁹→Ile), G⁵⁶⁰→A (Arg¹⁸⁷→Gln) și G⁶⁴⁰→T (Ser²¹⁴→Ala) și a polimorfismului sinonim G⁴⁵⁹→A (Thr¹⁵³→Thr). Polimorfismele C⁻³⁴⁴→T, C⁻⁴⁰→T, G⁴⁴⁵→A, G⁶⁴⁰→T și G⁴⁵⁹→A au fost asociate alelei *NAT1*11*, iar a polimorfismul G⁵⁶⁰→A alelei *NAT1*14*. Astfel, 16,22% din pacienții studiați prezintă un genotip heterozigot *NAT1*11/*4*, iar 2,7% – genotip heterozigot *NAT1*14/*4*, ceilalți pacienți (81,08%) fiind homozigoți *NAT1*4*. În cazul a doi pacienți au fost detectate mutații ale genei *NAT1* în pozițiile C³⁰⁹→T (heterozigot) și C³⁸³→T (homozigot).

În cazul genei *NAT2* s-a evidențiat prezența a polimorfismului C²⁸²→T (Ile⁹⁴→Ile) la 51,35% din pacienți, a polimorfismelor T³⁴¹→C (Ile¹¹⁴→Thr) și C⁴⁸¹→T (Leu¹⁶¹→Leu) în

72,97% din cazuri și a polimorfismului $G^{590} \rightarrow A$ ($Arg^{197} \rightarrow Gln$) la 45,95%. Astfel, 27,03% din lotul de studiu prezintă genotip $NAT2^*5$ homozigot și 10,81% – genotip $NAT2^*6$ homozigot, doar 5,4% fiind homozigoți pentru $NAT2^*4$. Ceilalți pacienți au prezentat genotip heterozigot pentru $NAT2^*5/^*4$ (27,03%), $NAT2^*6/^*4$ (10,81%) și $NAT2^*5/^*6$ (18,92%).

Conform datelor din literatură, genotipul $NAT2^*4$, considerat tipul sălbatic, este asociat cu un fenotip acetilator rapid. Prezența polimorfismelor $NAT2$ (heterozigot/homozigot) modifică acest fenotip în intermediar/lent.

Din cei 37 de pacienți cu tuberculoză luați în studiu, 24 au prezentat reacții hepatotoxice după administrarea medicației antituberculoase. Analiza genetică a constatat modificări față de gena de referință $NAT2$ care încadrează 21 de pacienți în genotipul acetilator lent, în timp ce doi pacienți au prezentat genotip acetilator intermediar, unul prezentând genotip acetilator rapid. În ceea ce privește genotipul $NAT1$, doar 18,92% din pacienții genotipați au prezentat polimorfisme heterogene, înregistrându-se, de asemenea, și două cazuri de mutații ale genei $NAT1$, în pozițiile 309 și 383, prezența acestor polimorfisme nefiind corelate cu efectele adverse induse de tratamentul antituberculos administrat.

Deși majoritatea pacienților care au prezentat efecte adverse hepatotoxice prezintă și un genotip acetilator lent, în unele cazuri hepatotoxicitatea pare a fi determinată de alți factori. Analiza modificărilor genetice la nivelul altor gene implicate în metabolizarea medicamentelor antituberculoase ar putea releva posibilele cauze de modificare a vitezei de metabolizare a izoniazidei în cazul celor trei pacienți ce nu prezintă un genotip acetilator lent, însă prezintă reacții hepatotoxice. De asemenea, hepatotoxicitatea indusă de izoniazidă poate fi amplificată și de terapiile asociate.¹⁰⁴ Pe de altă parte, fenotipul este rezultatul interacțiunilor dintre structura genetică și mediu, astfel, acesta nu este întotdeauna în concordanță cu genotipul.⁵²³

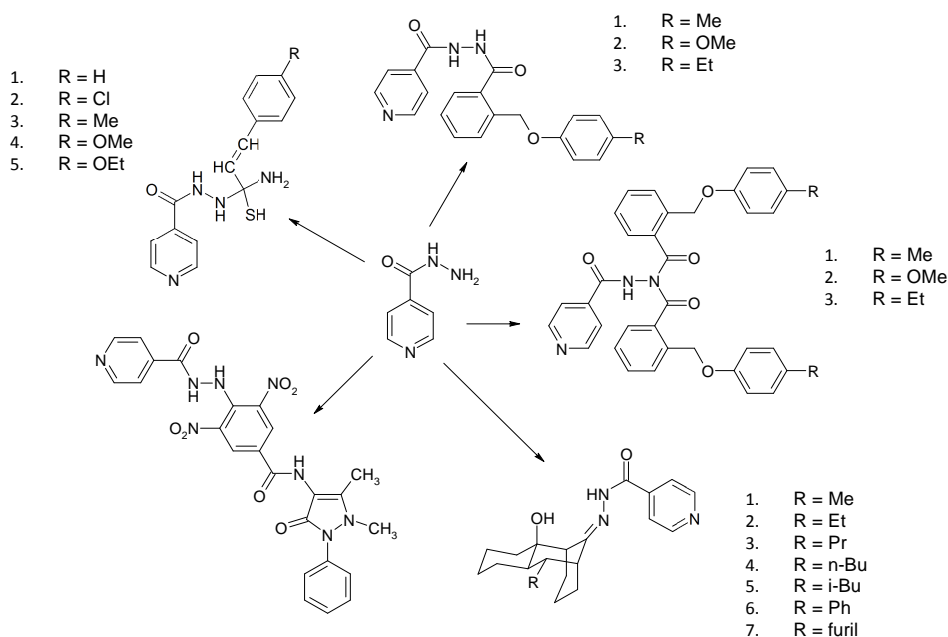
În scopul selectării unui model de studiu pentru evaluarea biotransformării și eliminării substanțelor noi sintetizate în cazul unor profile acetilatoare responsabile de efectele adverse ale izoniazidei am determinat polimorfismele genelor $NAT1$ și $NAT2$ în trei linii celulare derivate din țesut intestinal, Caco-2, HCT-8 și HT-29, și o cultură celulară nou-inițiată, 1002_TACI.

Cele patru linii celulare analizate conțin alele de tip sălbatic pentru $NAT1$. În cazul genei $NAT2$, au fost detectate diferite polimorfisme. În liniile celulare HT-29 și 1002_TACI au fost detectate 2 polimorfisme homozigote $T^{341} \rightarrow C$ și $C^{481} \rightarrow T$, caracteristice pentru alela $NAT2^*5$, în timp ce în liniile celulare Caco-2 și HCT-8 au fost detectate polimorfismele homozigote $C^{282} \rightarrow T$ și $G^{590} \rightarrow A$, caracteristice pentru alela $NAT2^*6$. Astfel, cele patru linii celulare analizate au un genotip acetilator lent, două dintre ele conținând alele $NAT2^*5$, iar celelalte două – alele $NAT2^*6$. Aceleași alele au fost detectate în cazul pacienților din România cu tuberculoză ce prezintă efecte adverse hepatotoxice la administrarea tratamentului antituberculos. Deoarece cele patru linii celulare analizate prezintă două variante alelice diferite, $NAT2^*5$ și $NAT2^*6$, pentru studierea potențialelor căi metabolice a noilor derivați ai izoniazidei au fost selectate doar două linii celulare. Linia celulară inițializată, 1002_TACI, nefiind o linie stabilă, prezintă o populație celulară eterogenă cu un timp mare de dublare a populației. Linia celulară Caco-2, deși este mai des utilizată în cadrul studiilor de metabolism, are o perioadă de dublare a populației de aproximativ 62 de ore, spre deosebire de liniile HCT-8 și HT-29 care sunt caracterizate de un timp de dublare a populației de 18 ore și, respectiv, de 19 ore. Astfel, s-a considerat că utilizarea liniilor celulare HCT-8,

homozigotă pentru alela NAT2*6, și HT-29, homozigotă pentru alela NAT2*5, reduce numărul variabilelor în realizarea experimentelor ce urmează.

Capitolul V. Sinteza unor Noi Compuși cu Potențială Activitate Antituberculoasă și Caracterizarea lor Structurală

Majoritatea derivaților izoniazidei raportați în literatură manifestă activitate antituberculoasă, inclusiv împotriva tulpinilor de *M. tuberculosis* rezistente la izoniazidă, după hidroliza acestora și eliberarea principiului activ în micromediul bacterian.^{557,558} Deoarece, în majoritatea cazurilor aceștia sunt evaluați doar din punct de vedere al activității lor antimicobacteriene sau antimicrobiene, fără a se analiza impactul lor asupra celulelor eucariote, unul dintre obiectivele propuse în această teză este sinteza de noi compuși, derivați ai izoniazidei, cu potențială activitate antimicobacteriană, și bioevaluarea lor. Pentru realizarea acestui obiectiv au fost sintetizați 19 noi derivați ai izoniazidei (schema 35) care au fost evaluați din punct de vedere al activității antibacteriene (*M. tuberculosis* și alte tulpini non-tuberculoase), a posibilelor căi de metabolizare, a citotoxicității (prin evaluarea capacității de inducere a apoptozei) și a influenței asupra ciclului celular.



Schema 35. Derivați ai izoniazidei noi sintetizați

Derivații *N'*-[1-amino-1-mercapto-3-(fenil-*p*-substituit)-alil]-hidrazidici (**INH-TCA**) ai acidului izonicotinic au fost obținuți printr-o reacție simplă de cuplare a izoniazidei cu tioamide α,β -nesaturate (obținute conform metodei descrise de Pappalardo⁵⁶⁰). Structura chimică a derivaților **INH-TCA 1-5** a fost confirmată prin spectroscopie de rezonanță magnetică nucleară și prin analiza elementală. Spectrele protonice ale *N'*-[1-amino-1-mercapto-3-(fenil-*p*-substituit)-al-1-il]-hidrazilor acidului izonicotinic **INH-TCA 1-5** prezintă semnale caracteristice protonilor hidrazidici (NH-NH) sub formă de doi singleți la $\delta = 10,06 - 10,10$ ppm și $\delta = 9,52 - 9,56$ ppm, respectiv. Acești protoni sunt deuterabili. Pe lângă aceste semnale, se disting, de asemenea, singleții protonului grupării tiolice (SH) la $\delta = 9,23 - 9,30$ ppm și a grupării amino (NH₂) la $\delta = 4,52 - 4,57$ ppm.

Izonicotinoilhidrazidele acizilor 2-(fenoximetil-4-substituit)-benzoici (**INH-AC**) au fost obținute ca rezultat al tratării izoniazidei cu cloruri acide brute la temperatura camerei în diclorometan. Producții de reacție au fost separați și purificați pe coloane cromatografice cu silica gel, utilizând un amestec de diclorometan și acetat de etil în gradient de concentrație. Structura compușilor formați a fost determinată prin spectroscopie de rezonanță magnetică nucleară, spectroscopie în infraroșu și prin analiza elementală. Spectrele ^1H RMN ale compușilor **INH-AC 1** – **INH-AC 3** prezintă semnale caracteristice protonilor hidrazidici (NH-NH) sub formă de doi singleteți la $\delta = 10,11 - 10,96$ ppm și respectiv $\delta = 9,72 - 10,55$ ppm, în timp ce în cazul compușilor **INH AC 4** – **INH-AC 6** se observă un singur semnal corespunzător protonului din gruparea hidrazidică (NH-N), $\delta = 8,53 - 11,97$ ppm. Astfel, compusul majoritar format în cadrul fiecărei reacții este o hidrazidă *N*-substituită a acizilor 2-(fenoximetil-4-substituit)-benzoici, în timp ce produsul secundar este o hidrazidă *N,N'*-disubstituită. Pentru confirmarea structurii derivaților *N,N'*-disubstituiți, compusul **INH-AC 6** a fost analizat și prin spectroscopie de masă, fiind observată apariția unui pic corespunzător ionului molecular 614,1 [M+H], ceea ce confirmă masa moleculară a acestui compus.

Derivatul izoniazidei *N*-(1,5-dimetil-3-oxo-2-fenil-2,3-dihidro-1*H*-pirazol-4-il)-3,5-dinitro-4-[*N*-(piridin-4-carbonil)hidrazino]-benzamide (**INH-AP**) a fost obținut în urma unei reacții de cuplare a 4-cloro-*N*-(1,5-dimetil-3-oxo-2-fenil-2,3-dihidro-1*H*-pirazol-4-il)-3,5-dinitro-benzamidei cu izoniazida. Structura acestui compus a fost confirmată prin spectroscopie de rezonanță magnetică nucleară, spectroscopie în infraroșu și prin analiza elementală.

Hidrazidele 2-hidroxi-triciclo[7.3.1.0^{2,7}]tridec-13-ilidenice ale acidului izonicotinic au fost obținute prin condensarea unor 2-hidroxi-triciclo[7.3.1.0^{2,7}]tridecan-13-one (obținute prin reacția Michael⁵⁹¹) cu izoniazida prin refluxare în metanol. Structura chimică a noilor derivați ai izoniazidei a fost confirmată prin spectroscopie de rezonanță magnetică nucleară și spectroscopie în infraroșu. Spectrele ^1H -RMN ale tuturor compușilor au prezentat câte un singlet la $\delta = 10,25 - 10,47$ ppm, care corespunde protonului hidrazidic NH și un singlet la $\delta = 4,09 - 4,45$ ppm ce corespunde protonului din gruparea hidroxilică.

Capitolul VI. Studiul Activității Antibacteriene

Activitatea antimicobacteriană a noilor compuși sintetizați a fost testată pe o tulpină clinică de *M. tuberculosis* conform metodei raportate de către Franzblau și colaboratorii.⁵⁷⁴

La testarea activității antimicobacteriene a *N'*-[1-amino-1-mercapto-3-(fenil-*p*-substituit)-alil]-hidrazidelor acidului izonicotinic (**INH-TCA**) s-a evidențiat compusul **INH-TCA 1** care a prezentat cea mai bună activitate anti-*Mycobacterium tuberculosis* (concentrația minimă inhibitorie (CMI) fiind de 0,391 $\mu\text{g/mL}$), urmat de compușii **INH-TCA 3** și **INH-TCA 5** (CMI = 0,0781 $\mu\text{g/mL}$). Din această serie de compuși, **INH-TCA 2** a prezentat cea mai slabă activitate (CMI = 6,25 $\mu\text{g/mL}$). Peretele celular al micobacteriilor prezintă un gradient de fluiditate orientat opus în comparație cu alte bacterii gram-negative, stratul interior fiind caracterizat de o fluiditate scăzută determinată de modul de împachetare și de structura acizilor micolici, iar stratul exterior – de o fluiditate mai mare datorită prezenței glicolipidelor,⁴⁰ ceea ce asigură permeabilitatea scăzută a peretelui celular micobacterian. Astfel, deoarece atomul de clor determină creșterea lipofilității moleculei, inducând o partiție mai mare a compusului clorurat în faza lipofilă a membranei celulare, activitatea

antimicobacteriană scăzută a compusului **INH-TCA 2** poate fi explicată parțial prin lipofilicitatea acestuia.

În cazul derivaților izoniazidici ai acizilor 2-(fenoximetil-4-substituit)-benzoici (**INH-AC**), nici unul dintre compușii testați nu a prezentat activitate antimicobacteriană la concentrațiile testate, cu excepția compusului **INH-AC 6** care a inhibat dezvoltarea *M. tuberculosis* la o concentrație de 6,25 µg/mL. *N*-(1,5-dimetil-3-oxo-2-fenil-2,3-dihidro-1*H*-pirazol-4-il)-3,5-dinitro-4-[*N*-(piridin-4-carbonil)hidrazino]-benzamidă (**INH-AP**) a prezentat, de asemenea, o activitate antimicobacteriană moderată (CMI = 6,25 µg/mL), fapt ce poate fi explicat prin volumul mare al radicalului din poziția *para* a inelului benzenic și prin prezența a două grupări nitro (acceptoare de electroni).

Hidrazidele 2-hidroxi-triciclo[7.3.1.0^{2,7}]tridec-13-ilidenice ale acidului izonicotinic **INH-TCT** au prezentat cea mai bună activitate antimicobacteriană dintre derivații noi sintetizați în cadrul studiului nostru. Din această serie de compuși, cea mai bună activitate a fost observată în cazul compușilor **INH-TCT 2**, **INH-TCT 3**, **INH-TCT 4** și **INH-TCT 5** (CMI = 0,195 µg/mL), urmați de compusul **INH-TCT 7** (CMI = 0,391 µg/mL), cei mai puțin activi fiind compușii **INH-TCT 1** și **INH-TCT 6** (CMI = 0,781 µg/mL). Majoritatea derivaților de izoniazidă sunt activați înainte de a ajunge în mediul intracelular micobacterian, activarea lor implicând formarea unor specii intermediare electrofile, care se transformă în radicali acil și acționează similar formelor active ale izoniazidei.^{557,584} Prezența legăturii duble în hidrazone crește eficiența antituberculoasă datorită hidrolizei ușoare a acestora și eliberarea izoniazidei în celulă, fapt ce poate explica activitatea mai mare a derivaților 2-hidroxi-triciclo[7.3.1.0^{2,7}]tridec-13-onici (**INH-TCT**) în comparație cu ceilalți derivați ai izoniazidei sintetizați și evaluați în cadrul studiului nostru.

Astfel, compușii noi sintetizați prezintă o activitate anti-*Mycobacterium tuberculosis* bună, comparabilă cu cea a altor derivați ai izoniazidei prezentați în literatură, majoritatea inhibând dezvoltarea micobacteriilor la concentrații mai mici de 6,25 µg/mL, concentrație care este considerată de către Programul Global pentru Descoperirea de Noi Medicamente AntiTuberculoase (*Global Program for the Discovery of New Anti-Tuberculosis Drugs*) drept pragul superior pentru evaluarea noilor agenți anti-*M. tuberculosis*.²⁵⁶

Pentru a stabili dacă compușii noi sintetizați acționează și asupra altor specii de bacterii decât cele ce cauzează tuberculoză aceștia au fost testați pe alte tulpini de bacterii, non-tuberculoase, Gram-pozitive și Gram-negative, izolate din specimene clinice.

Dintre derivații tiocinamamidici, compusul cu activitatea antibacteriană cea mai mare a fost **INH-TCA 2**, substituit cu un atom de clor în poziția *para* (activ împotriva tuturor tulpinilor bacteriene testate), urmat de **INH-TCA 1** și **INH-TCA 4**. Toți compușii din această serie, **INH-TCA**, au eficacitate crescută comparativ cu izoniazida și tioamidele din care au derivat, cu excepția compusului **INH-TCA 5**.

Compusul **INH-AC 6** a fost cel mai eficient dintre derivații acizilor 2-fenoximetilbenzoici 4-substituiți, inhibând dezvoltarea majorității tulpinilor testate. Activitatea antibacteriană a scăzut în sensul **INH-AC 6** > **INH-AC 3** > **INH-AC 4** > **INH-AC 5** > **INH-AC 2** > **INH-AC 1**. Hidrazidele *N,N'*-disubstituie ale acizilor 2-(4-substituit-fenoximetil)-benzoici **INH-AC 4** – **INH-AC 6** au prezentat o activitate antibacteriană mai bună decât hidrazidele **INH-AC 1** – **INH-AC 3** *N*-monosubstituie corespunzătoare.

N-(1,5-dimetil-3-oxo-2-fenil-2,3-dihidro-1*H*-pirazol-4-il)-3,5-dinitro-4-[*N*-(piridin-4-carbonil)hidrazino]-benzamidă (**INH-AP**) nu a prezentat activitate antibacteriană pe tulpinile testate.

Dintre derivații 2-hidroxi-triciclo[7.3.1.0^{2,7}]tridecan-13-onici, **INH-TCT**, cea mai bună activitate antibacteriană a fost demonstrată de către compusul **INH-TCT 6**, urmat de compușii **INH-TCT 3**, **INH-TCT 4** și **INH-TCT 5**. Activitate antibacteriană mai slabă au avut compușii **INH-TCT 1** și **INH-TCT 7**.

În concluzie, compusul **INH-AC 6** a prezentat cea mai bună activitate antibacteriană dintre noii derivați ai izoniazidei sintetizați în cadrul studiului nostru.

Capitolul VII. Studii asupra Mecanismului de Metabolizare a Noilor Derivați ai Izoniazidei

Analiza influenței unui compus asupra nivelului de expresie al enzimelor metabolizatoare permite evaluarea primară a căilor de metabolizare a acestuia. Astfel, pentru identificarea modurilor posibile de degradare și eliminare a noilor compuși sintetizați, am evaluat efectul acestora asupra nivelului de expresie al unor gene implicate în metabolismul substanțelor farmacologice în cele două modele de studiu selectate, HCT-8 și HT-29.

Noii compuși au influențat în mod diferit nivelul de expresie al genelor *NAT1* și *NAT2* în liniile celulare HT-29 și HCT-8. **INH-TCA 1**, **INH-TCA 2** și **INH-TCA 3** au determinat creșterea nivelului de expresie al genelor *NAT1* și *NAT2* în ambele linii celulare, în timp ce **INH-TCA 4** a crescut expresia genelor *NAT* în celulele HT-29, iar **INH-TCA 5** a determinat creșterea nivelului de expresie al genei *NAT2* în celulele HCT-8. Expresia genei *NAT1* a fost crescută de majoritatea derivaților acizilor 2-fenoximetilbenzoici, **INH-AC**, în linia celulară HCT-8 (excepție făcând **INH-AC 1**) și de compușii **INH-AC 2**, **INH-AC 3** și **INH-AC 6** în linia celulară HT-29. Expresia *NAT2* a fost crescută de către toți compușii, cu excepția **INH-AC 2** în celulele HCT-8 și **INH-AC 1** în ambele linii testate. În general, expresia genei *NAT2* a fost mai puternic influențată de către derivații acizilor 2-fenoximetilbenzoici 4-substituiți în linia celulară HCT-8, *NAT2**6 homozigotă, decât în linia celulară HT-29, *NAT2**5 homozigotă, cu excepția compusului **INH-AC 6**. În cazul derivatului antipirinic (**INH-AP**) s-a remarcat creșterea semnificativă a nivelului de expresie *NAT2* în linia HCT-8 comparativ cu HT-29. Derivații triciclo[7.3.1.0^{2,7}]tridecan-13-onici au crescut nivelul de expresie al genelor *NAT1* și *NAT2* în linia celulară HT-29, nivelul *NAT2* fiind foarte puțin afectat de compusul **INH-TCT 4**. În linia celulară HCT-8, expresia *NAT1* a fost crescută de către compușii **INH-TCT 2**, **INH-TCT 3**, **INH-TCT 4** și **INH-TCT 6**, în timp ce nivelul de expresie al genei *NAT2* a fost crescut de către **INH-TCT 4**, **INH-TCT 5** și **INH-TCT 6**.

Astfel, compușii **INH-TCA 1**, **INH-TCA 2**, **INH-TCA 3**, **INH-AC 3**, **INH-AC 4**, **INH-AC 5**, **INH-AC 6**, **INH-AP**, **INH-TCT 5** și **INH-TCT 6** ar putea fi utilizați pentru îmbunătățirea metabolizării izoniazidei la acetilatorii lenți, în special derivații **INH-TCA 3**, **INH-AC 5** și **INH-AP** care au indus o creștere mai mare a expresiei genei *NAT2*. Dintre derivații ce au prezentat o activitate antimicobacteriană bună, compușii **INH-TCT 4**, **INH-TCT 5** și **INH-TCA 1** au indus o ușoară creștere a expresiei genelor *NAT1* și *NAT2*, sugerând o rată mai bună de metabolizare decât izoniazida și, prin urmare, poate fi asociat cu un risc mai scăzut de apariție a efectelor secundare ce ar putea fi induse de acumularea metaboliților formați. Un comportament similar a fost observat și în cazul compușilor **INH-TCA 3** și **INH-**

TCT 6, care prezintă, de asemenea, o valoare CMI bună contra *M. tuberculosis*. Aceste rezultate sugerează că acești compuși ar putea fi mai bine tolerați decât izoniazida.

Pentru a determina alte căi posibile de metabolizare a noilor compuși sintetizați, diferite de cele ale izoniazidei, am evaluat expresia și a altor gene implicate metabolismul medicamentelor.

Enzimele citocromului P450 sunt responsabile de metabolismul a două treimi din medicamente.⁶⁰⁸ Ele joacă un rol important atât în reglarea duratei și a intensității acțiunii medicamentelor, cât și în detoxifierea sau activarea lor. În organismul uman, izoniazida inhibă mai multe enzime ale complexului CYP450 de tip 1A, 2A, 2C, 2E și 3A, crescând concentrația plasmatică a altor medicamente potențial hepatotoxice. Isoniazida inhibă reversibil activitatea CYP2C19 și CYP3A4 la concentrații relevante clinic (picul concentrației plasmatică al izoniazidei plasându-se în jur de 30 – 50 μM) și inactivează mecanic CYP1A2, CYP2A6, CYP2C19 și CYP3A4 în microsomi umani (metaboliții formați de către aceste enzime se leagă direct și inhibă ireversibil enzima, blocând situsul catalitic).⁶²⁴ Astfel, izoniazida interferă în metabolismul a numeroase medicamente cum sunt fenitoina, warfarina, carbamazepina, primidonul, tolbutamida, benzodiazepinele, etc., inhibând activitatea enzimelor CYP1A1,¹⁸⁰ CYP1A2, CYP2A6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2E1 și CYP3A4.⁶³⁰ Analiza efectului izoniazidei asupra nivelului de expresie al izoformelor CYP în liniile celulare HT-29 și HCT-8 a evidențiat o scădere a nivelului de expresie al genelor *CYP1A1* și *CYP2C19* în ambele linii celulare utilizate și o creștere a nivelului de expresie a *CYP3A4* în linia celulară HCT-8 în urma unui tratament cu 50 μg/mL izoniazidă timp de 24 de ore.

În ceea ce privește acțiunea compușilor evaluați în cadrul studiului nostru, cel mai puternic a fost influențată expresia genei *CYP1A1*. Expresia acestei izoforme a fost indusă de majoritatea compușilor în ambele linii celulare analizate, *CYP1A1* fiind implicată în biotransformarea moleculelor aromatice, cu excepția **INH-TCA 5**, care a determinat o scădere a expresiei genice a *CYP1A1* în ambele linii celulare similar izoniazidei, și a **INH-TCA 1** care a indus o scădere a expresiei acestei gene doar în celulele HT-29.

În ceea ce privește nivelul de expresie al izoformei *CYP2C19*, implicată, de asemenea, în metabolismul compușilor aromatici, acesta a fost influențat în mod diferit în cele două linii celulare. Derivații tioamidici au determinat o creștere a nivelului de expresie al genei ce codifică *CYP2C19* în ambele linii analizate, cu excepția compusului **INH-TCA 5** care a determinat o ușoară scădere a expresiei *CYP2C19* în celulele HT-29. Totuși, expresia acestei gene a fost mai puternic indusă în celulele HCT-8, decât în celulele HT-29. **INH-AC 1** a determinat o creștere a expresiei *CYP2C19* în linia celulară HT-29, iar **INH-AP** și **INH-TCT 1** au indus scăderea acesteia în linia celulară HCT-8. Ceilalți derivați izoniazidici analizați au indus creșterea expresiei genice a *CYP2C19* în celulele HCT-8 și scăderea acesteia în celulele HT-29. Influența diferită asupra expresiei genice a *CYP2C19* în cele două linii celulare utilizate poate fi cauzată de prezența unor locusuri polimorfice diferite.

Deși celulele HCT-8 netratate nu exprimă *CYP3A4*, compușii **INH-TCA 2**, **INH-TCA 4**, **INH-TCA 5**, **INH-AC 6**, **INH-TCT 1**, **INH-TCT 6**, **INH-TCT 7**, inclusiv izoniazida, au determinat o creștere a nivelului de expresie al acestei gene. În cazul celulelor HT-29, care exprimă izoforma *CYP3A4*, nivelul de expresie al acestei gene a fost crescut de către **INH-TCA 3**, **INH-TCA 4**, **INH-TCA 5**, **INH-AC 1** și **INH-AC 6**, și scăzut de compușii **INH-AC 2** și **INH-AC 5**, derivații **INH-TCT** neinfluențând expresia acestei gene.

Creșterea expresiei genice a enzimelor CYP determinată de noii derivați analizați indică o posibilă implicare a acestor izoforme în metabolismul respectivilor compuși. Enzimele citocromului P450 sunt responsabile de majoritatea reacțiilor ce au loc în I fază a metabolismului medicamentelor și au drept scop introducerea în molecula compusului a unor grupări funcționale noi care ar facilita eliminarea acestuia.⁶³³ Astfel, una din căile posibile de metabolizare a noilor derivați ai izoniazidei implică oxidarea sau reducerea acestora de către enzimele citocromului P450.

Dintre enzimele implicate în faza a II a metabolismului, s-a analizat nivelul de expresie al glutatonei *S*-transferazei 3 (*GSTA3*), glutatonei *S*-transferazele (*GST*) fiind responsabile de conjugarea medicamentelor cu glutatonele, reacție ce reprezintă una din căile majore de metabolizare a medicamentelor, metabolitul rezultat caracterizându-se printr-o hidrofilicitate mărită și o eliminare rapidă din organism.³⁷¹ În ambele tipuri de culturi celulare expresia *GSTA3* a fost indusă de derivații tioamidici, cu excepția compușilor **INH-TCA 4** și **INH-TCA 5** în linia celulară HT-29. Dintre ceilalți compuși studiați, expresia *GSTA3* a fost crescută de către **INH-AC 5** și **INH-TCT 3** în HT-29 și de către **INH-AC 6**, **INH-TCT 4** și **INH-TCT 6** în HCT-8. Efectul derivaților tioamidici asupra expresiei *GST* poate fi explicat prin faptul că aceste enzime catalizează reacții de izomerizare,⁶⁴³ derivații **INH-TCA** fiind obținuți și analizați sub forma unor amestecuri *E/Z*. Enzimele *GST* sunt implicate, de asemenea, și în reacții de conjugare a substanțelor cu glutatonele, facilitând eliminarea acestora din organism, inclusiv a derivaților acidului cinamic.⁶⁵¹ Pe de altă parte, enzimele *GST* sunt implicate și în alte procese non-enzimatice, printre care sunt și proliferarea celulară și apoptoza.⁶⁵²

Capitolul VIII. Studiul Activității Citotoxice a Noilor Compuși Sintetizați

Citotoxicitatea noilor derivați ai izoniazidei a fost analizată prin evaluarea capacității de inducere a apoptozei, discriminarea dintre celule intacte și cele apoptotice fiind realizată prin citometrie de flux utilizându-se marcarea cu anexină V-FITC și iodură de propidiu.

Dintre *N'*-[1-amino-1-mercapto-3-(fenil-*p*-substituit)-alil]-hidrazidele acidului izonicotinic (**INH-TCA**), compusul cel mai toxic a fost **INH-TCA 2**, care a indus necroza în 23,7% celule și apoptoza în 20,93% la concentrația de 25 μg/mL, urmat de compusul **INH-TCA 5** (necroza – 28,3%; apoptoza – 24,41%) și compusul **INH-TCA 3** (necroza – 28,5%; apoptoza – 17,16%), ambele fiind testate la o concentrație de 50 μg/mL. Cel mai puțin toxic a fost compusul **INH-TCA 4**. Toxicitatea compușilor derivaților izoniazidici ai acizilor 2-(fenoximetil-4-substituit)-benzoici (**INH-AC**) a fost evaluată la 24, 48 și 72 de ore. Cel mai toxic a fost compusul **INH-AC 4**, urmat de compușii **INH-AC 6** și **INH-AC 5**. Tratamentul celulelor HT-29 cu **INH-AC 4** timp de 24 de ore nu a evidențiat un efect toxic. Totuși, la 48 de ore, numai 70,6% dintre celule erau viabile, iar la 72 de ore viabilitatea celulelor a scăzut până la 43%. Tratamentul celulelor cu 100 μg/mL *N*-(1,5-dimetil-3-oxo-2-fenil-2,3-dihidro-1*H*-pirazol-4-il)-3,5-dinitro-4-[*N*-(piridin-4-carbonil)hidrazino]-benzamida (**INH-AP**) timp de 24 ore a indus necroza în 88,0% și apoptoza în 10,04% din celule tratate, fiind mult mai toxic decât precursorii săi. Dintre hidrazidele 2-hidroxi-triciclo[7.3.1.0^{2,7}]tridec-13-ilidenice ale acidului izonicotinic (**INH-TCT**) cel mai toxic a fost compusul **INH-TCT 6**, care a indus apoptoza în 35% din celulele tratate, urmat de compușii **INH-TCT 4** (induce apoptoză în 12,41% celule) și **INH-TCT 2** (induce necroza în 13,6% celule). Cel mai puțin toxic este compusul **INH-TCT 3**.

Citotoxicitatea acestor compuși a fost evaluată și la nivel molecular prin analiza nivelului de expresie al caspazelor 3, 7, 8 și 9, implicate în inițierea și propagarea apoptozei, și a proteinelor Bax, Bcl-2 și Mcl-1, implicate în procesul de reglare a acestora. Activarea caspazei efectoare 3 poate fi indusă pe calea extrinsecă prin intermediul familiei de receptori TNF, FADD și caspaza 8, sau pe calea intrinsecă prin intermediul caspazei 9 activată de către citocromul c, eliberat din mitocondrii, și APAF-1.

În cadrul studiului nostru, influența izoniazidei asupra nivelului de expresie al caspazelor analizate este minoră ceea ce se corelează cu toxicitatea ei scăzută. Pe de altă parte, creșterea nivelului caspazei 9 de către toți derivații tioamidici indică o activare a apoptozei pe calea intrinsecă. Toxicitatea compusului **INH-TCA 2** poate fi explicată prin creșterea nivelului de expresie al caspazelor 3 și 7, acest compus determinând și cel mai mare nivel de expresie al caspazei 9 ca rezultat al tratamentului cu 25 μg/mL de compus timp de 24 de ore, spre deosebire de ceilalți derivați izoniazidici testați la o concentrație de 50 μg/mL.

Dintre derivații acizilor carboxilici, compusul **INH-AC 4** a determinat expresia crescută a caspazei 9 care poate fi asociată cu activarea apoptozei pe calea intrinsecă. Deși tratamentul celulelor cu compusul **INH-AC 4** timp de 24 de ore induce modificări fenotipice minore, expresia crescută a nivelului de ARNm a caspazelor 3 și 7 prezice fenomenul de apoptoză observat la 48 și 72 de ore.

În cazul compusului **INH-AP** nivelul crescut al caspazei 3 indus de tratamentul cu 50 μg/mL compus poate explica parțial efectul toxic (apoptoză târzie) al acestui compus observat prin citometrie în flux. Totuși, tratamentul cu 100 μg/ml **INH-AP** a determinat necroza a 88% din celule, acest proces fiind mediat prin alte căi de semnalizare decât cele analizate.

Derivații triclotridecanonici au determinat o creștere a nivelului de expresie al caspazelor 3 și 9, cu excepția compusului **INH-TCT 3** care a determinat scăderea nivelului de expresie al caspazei 3. Creșterea nivelului caspazei 9 determinată de acești compuși indică, de asemenea, o posibilă activare a apoptozei pe calea intrinsecă. Compusul **INH-TCT-6**, care a prezentat cea mai mare citotoxicitate din această serie, a determinat creșterea nivelului de expresie al tuturor caspazelor analizate, inclusiv a caspazei 8 ceea ce indică o posibilă activare a apoptozei pe cale extrinsecă. Citotoxicitatea scăzută a compusului **INH-TCT 3** poate fi explicată prin nivelul scăzut de expresie al caspazei 3, unul dintre efectorii principali ai apoptozei.

Mecanismul de acțiune al proteinelor Bax implică capacitatea lor de a forma pori sau canale la nivelul membranei mitocondriale. Mitocondriile sunt implicate în procesele biochimice ale apoptozei și au capacitatea de a elibera citocromul c în cursul apoptozei. În citoplasmă, citocromul c, împreună cu APAF-1, formează apoptozomul care activează caspaza-9, aceasta din urmă determinând declanșarea cascadei caspazice. Spre deosebire de Bax, proteinele Bcl-2 acționează asupra membranelor mitocondriale blocând formarea porilor și eliminarea citocromului c în citoplasma. Mcl-1 blochează apoptoză prin prevenirea disfuncției mitocondriale determinate de activarea Bax și Bak.

În ceea ce privește influența izoniazidei asupra proteinelor reglatoare ale apoptozei, acest medicament a determinat o scădere a nivelului de expresie al genei *Bax* și *Mcl-1* și o ușoară creștere a nivelului de expresie al genei anti-apoptotice *Bcl-2*, dar raportul dintre genele *Bax* și *Bcl-2*, implicate în permeabilizarea membranei mitocondriale, indică lipsa inițierii unui proces apoptotic.

În schimb, toți derivații tioamidici au determinat scăderea nivelului de expresie al genelor *Bax* și *Bcl-2*, iar raportul *Bax/Bcl-2* indică o inducere a programului apoptotic, gena *Bcl-2* prezentând un nivel de expresie mai mic decât *Bax*. Toxicitatea mai mare a compusului **INH-TCA 5** decât cea a **INH-TCA 3** poate fi explicată prin nivelul de expresie al genei *Mcl-1*, implicate în prevenirea disfuncției mitocondriale. Nivelul crescut de expresie al *Mcl-1*, împreună cu raportul *Bax/Bcl-2*, poate explica, de asemenea, și citotoxicitatea mică a compusului **INH-TCA 4**, deși acest compus induce o creștere a expresiei caspazei 9.

Similar derivaților tioamidici, și derivații acizilor carboxilici au determinat scăderea nivelului de expresiei genelor *Bax* și *Bcl-2*, iar raportul *Bax/Bcl-2* indică o inducere a programului apoptotic. Nivelul crescut de expresie al genei *Mcl-1* în cazul compusului **INH-AC-4** indică o activare a mecanismului de protecție anti-apoptotică a celulei și poate fi cauza lipsei unui efect apoptotic după 24 de ore. Totuși acest compus determină o creștere a nivelului de expresie al caspazelor analizate, iar nivelul de expresie al genei *Bax* este superior nivelului de expresie al genei *Bcl-2* și indică inițierea procesului apoptotic.

În cazul compusului **INH-AP**, acesta a influențat puțin nivelul de expresie al proteinelor implicate în reglarea procesului de apoptoză.

Influența derivaților triclotridecanonici, **INH-TCT**, asupra nivelului de expresie al genei *Bax* și *Mcl-1* este diferită, toți compușii din această serie determinând o scădere a nivelului de expresiei al genei *Bcl-2*. Totuși, acest tip de compuși au determinat o scădere mai mare a nivelului de expresie al genei *Bcl-2* decât a genei *Bax*, ceea ce indică o inducere a apoptozei pe cale intrinsecă.

Citotoxicitatea și capacitatea de inducere a apoptozei de către noii derivați sintetizați a fost evaluată și prin analiza cantității de citocrom c din fracția citosolică raportată la cea mitocondrială. Eliberarea citocromului c din mitocondrii poate fi realizată de către Bid sau Bax. Eliberat în citosol, citocromul c se leagă de APAF-1 și formează apoptosomul care activează caspaza 9 (caspază inițiatoare). Eliberarea citocromului c poate amplifica cascada caspazică în timpul apoptozei.

Toți compușii testați au prezentat o concentrație mai mare de citocrom c în fracția mitocondrială, comparativ cu fracția citosolică, cu excepția compușilor **INH-TCA 2** și **INH-TCA 3**. Compusul **INH-TCA 2** a determinat eliberarea unei cantități mult mai mari de citocrom c în fracția citosolică comparativ cu cea mitocondrială, ceea ce indică toxicitatea mărită a acestui compus. Analiza prin citometrie în flux indică că acest compus induce moartea celulară a mai mult de 60% din celule la o concentrație de 50 μg/mL timp de 24 de ore. Aceste rezultate se corelează cu creșterea nivelului de expresie al caspazelor 9 și 3 observate în urma tratării celulelor cu 25 μg/mL **INH-TCA 2** timp de 24 de ore.

Toxicitatea derivaților izoniazidici sintetizați și analizați în cadrul studiului nostru poate fi explicată prin activitatea posibililor metaboliți. Astfel, în cazul compusului **INH-TCA 2**, acesta conține un atom de clor în poziția *para* al inelului benzenic. Activitatea compușilor clorurați este determinată de reactivitatea electrofilă a centrului carbonic adiacent atomului de clor. Acesta facilitează înlocuirea atomului de clor cu biomolecule nucleofile, reacție ce determină atașarea ireversibilă a moleculei compusului clorurat de bazele ADN sau de proteine, determinând apariția mutațiilor sau dereglarea funcțiilor.

De asemenea, atomul de clor determină creșterea lipofilicității moleculei ceea ce cauzează o partiție mai mare a compusului clorurat în faza lipofilă a membranei celulare sau în domeniul lipofil al unei proteine și o concentrație mai mare a compusului clorurat în

celule.⁵⁸² Pe de altă parte, proprietățile atomului de clor, cum sunt electronegativitatea nucleului, prezența a 3 perechi de electroni neimplicate în legături chimice și dimensiunea geometrică a atomului, determină efecte sterice și/sau electronice care induc atracții sau repulsii electronice locale sau interferențe sterice cu resturile de aminoacizi care înconjoară atomul de clor în buzunarul de legare al proteinei. Aceasta poate determina o interacțiune strânsă sau o relaxare a legăturilor dintre aminoacizii în apropierea atomului de clor sau în alte zone ale moleculei active. Oricare din aceste situații poate afecta funcția proteinei țintă și poate duce la o creștere sau scădere a activității biologice. În alte cazuri, însă, prezența atomului de clor poate să nu afecteze în nici un mod proprietățile biologice primare ale moleculei de care acesta este atașat prin forțe electrostatice.⁵⁸²

În cazul derivatului antipirinic, **INH-AP**, toxicitatea acestuia poate fi determinată de radicalii intermediari care se formează în rezultatul reducerii grupărilor nitro la metaboliții anilnici corespunzători. Acești radicali pot deteriora moleculele de ADN prin ruperea lanțului dublucatenar. Deteriorări suplimentare ale ADN-ului pot fi cauzate și de formarea unor legături covalente cu unii metaboliți activați, cum sunt *N*-hidroxilamina și derivatul *O*-esterificat care rezultă din sulfatarea enzimatică a hidroxilaminei. Calea de detoxifiere a metaboliților formați implică *N*-acetilarea azotului anilnic la amida corespunzătoare.⁶⁵⁴ Deoarece linia celulară utilizată în evaluarea efectului citotoxic, HCT-8, prezintă un genotip acetilator lent, procesul de detoxifiere pe această cale are loc mai încet, ceea ce determină o acumulare a metaboliților toxici în celule.

Compușii ce conțin substituenți benzenici prezintă toxicitate variabilă. Cea mai mare toxicitate este prezentată de derivații ce conțin o grupare metil în poziția para a inelului benzenic, **INH-TCA 3** și **INH-AC 4**. Gruparea tolii este oxidată la alcoolul și acidul carboxilic corespunzători și la *o*-cresil.⁶⁶⁹ Prezența grupării hidroxilice în poziția *orto* a inelului benzenic joacă un rol important în citotoxicitatea și activitatea antitumorală a derivaților izoniazidici, fiind un ligand bun pentru metale. Astfel, mecanismul de acțiune al acestui tip de compuși se poate baza pe formarea compușilor complecși care par a inactiva enzimele din celule.⁷⁶¹ Derivatul ce conține o grupare etil în poziția *para* a inelului benzenic (**INH-AC 5**) este mai puțin toxic. Metabolismul acestui compus presupune, de asemenea, oxidarea grupării alchil și/sau introducerea unei grupări hidroxilice în poziția *orto*, însă rata de formare a acestor compuși poate fi mai mică. Derivații ce conțin grupări *p*-metoxi/etil-fenil (**INH-TCA 4**, **INH-TCA 5** și **INH-AC 6**) sunt mai puțin toxici, biotransformarea acestor compuși implicând *O*-dealchilarea și formarea grupării *p*-hidroxifenil. Aceste rezultate sunt în acord cu studiile realizate în cazul altor derivați ai izoniazidei care au fost evaluați în vederea stabilirii citotoxicității lor.^{761,762} Totuși, derivații **INH-AC** sunt mai puțin toxici decât **INH-TCA**. Acest fapt poate fi explicat prin posibilitatea *O*-dealchilării **INH-AC**, fiind eliminate grupările fenoxi, în timp ce în cazul derivaților **INH-TCA**, aceștia conțin grupări tiolice care au capacitatea de a modifica covalent proteinele prin interacțiunea cu legăturile cistenil-disulfidice.⁶⁵⁴

În cazul derivatului **INH-TCT 6**, cel mai toxic dintre derivații tricyclotridecanonici, acesta conține un inel benzenic care poate fi oxidat enzimatic la oxizi arenici intermediari, biotransformați în continuare în metaboliți fenolici stabili. Oxizii arenici formați sunt considerați a fi responsabili de formarea unor legături covalente cu macromoleculele celulare și, respectiv, de toxicitatea indusă de acest tip de compuși.⁶⁵⁴

În cadrul studiului nostru, deși mai mulți compuși analizați au indus apoptoza, doar compusul **INH-TCA 2** a determinat o creștere substanțială a citocromului c în fracția citosolică, și o scădere a acestuia în fracția mitocondrială, ceea ce indică toxicitatea mare a acestui compus și ireversibilitatea procesului apoptotic indus.

Capitolul IX. Influența Noilor Derivați ai Izoniazidei asupra Ciclului Celular

Ciclul celular reprezintă suma de evenimente care guvernează tranziția celulei din starea de repaos spre proliferare și asigură fidelitatea transcriptului genetic. Analiza ciclului celular prin citometrie în flux presupune cuantificarea cantității de ADN conținut în nucleu și repartizarea celulelor în fazele ciclului celular în funcție de aceasta.

Tratamentul celulelor cu **INH-TCA 3** a determinat creșterea numărului de celule aflate în faza G0/G1, de la 46,43% în martor la 72,35%, și micșorarea numărului de celule în faza S, de la 39,43% în martor la 13,1%. Precursorul INH-AP, 4-cloro-*N*-(1,5-dimetil-3-oxo-2-fenil-2,3-dihidro-1*H*-pirazol-4-il)-3,5-dinitro-benzamida, determină o acumulare a celulelor în faza G2/M după un tratament cu 10 μg/mL timp de 24 de ore. Totuși, deși unii derivați antipirinic determină blocarea ciclului celular, inclusiv 4-cloro-*N*-(1,5-dimetil-3-oxo-2-fenil-2,3-dihidro-1*H*-pirazol-4-il)-3,5-dinitro-benzamida utilizată în sinteza noului derivat izoniazidic, influența **INH-AP** asupra ciclului celular este minoră. Hidrazidele **INH-AC 4** – **INH-AC 6** *N,N'*-disubstituie ale acizilor 2-(fenoximetil-4-substituit)-benzoici au indus o creștere a numărului de celule aflate în faza G0/G1 și o micșorare a celor aflate în faza S, în timp ce derivații **INH-AC 1** – **INH-AC 3** au crescut puțin numărul de celule aflate în faza G2/M. În cazul derivaților triciclotridecanonici nou sintetizați, **INH-TCT 3**, **INH-TCT 4** și **INH-TCT 6** au determinat o creștere a procentului de celule în faza G0/G1 și o micșorare a acestuia în fazele S și G2/M.

În consecință, compușii **INH-AC 4**, **INH-AC 5**, **INH-AC 6**, **INH-TCT 3** și **INH-TCT 6** au determinat o blocare a celulelor în faza G0/G1 a ciclului celular ceea ce poate fi asociat cu o potențială activitate antiumorală.

La nivel molecular, ciclul celular este controlat de o serie de căi de semnalizare intra- și extracelulare interconectate bazate pe activitatea unor kinaze dependente de ciclone (Cdk).⁷⁸² Studiul la nivel molecular al influenței noilor derivați sintetizați asupra progresiei ciclului celular a cuprins analiza nivelului de expresie al genelor: ciclina A (implicată în progresia prin faza S), ciclina B (mediază trecerea prin G2 și M), CDK1 (interacționează cu ciclina B1 și formează “factorul promotor mitotic”, care determină momentul mitozei în ciclul celular) și Cdc20 (în combinație cu complexul de promovare al anafazei/ciclosom (APC/C), este implicată în tranziția metafază-anafază).

Derivații tiocinamidici au determinat o reducere a nivelurilor de expresie ale ciclonei A, ciclonei B, CDK1 și Cdc20, implicate în reglarea fazelor S și G2/M. Derivatul antipirinic, **INH-AP**, a demonstrat o influență slabă asupra nivelurilor de expresie a genelor implicate în reglarea ciclului celular, fapt ce se corelează cu efectul acestui compus observat prin citometrie în flux.

În cazul **INH-AC 1** și **INH-AC 2** s-a observat reducerea minoră a nivelului de expresie al ciclonei A, CDK1 și Cdc20 și creșterea slabă a expresiei ciclonei B. Compusul **INH-AC 3** a influențat slab expresia genelor implicate în ciclul celular prin creșterea ușoară a nivelului de expresie al ciclonei A, ciclonei B și CDK1 și prin scădere ușoară a nivelului de expresie al Cdc20. Hidrazidele *N,N'*-disubstituie ale acizilor 2-fenoximetilbenzoici, **INH-AC 4** – **INH-**

AC 6, au redus nivelul de expresie al ciclului A, ciclului B, CDK1 și Cdc20 indicând o inhibare a progresiei ciclului celular, ceea ce este în concordanță cu micșorarea procentului de celule aflate în fazele S și G2/M observate prin citometrie în flux.

Dintre derivații triciclotridecanonici, compușii **INH-TCT 3**, **INH-TCT 4** și **INH-TCT 6** determină o scădere a nivelului de expresie al genelor analizate. **INH-TCT 3** afectează cel mai puternic nivelul de expresie a ciclului A, ceea ce este în concordanță cu reducerea puternică a numărului de celule aflate în faza S observată prin citometrie în flux. Compusul **INH-TCT 6** a indus o scădere a nivelului de expresie a ciclului A și CDK1, fapt ce se corelează cu micșorarea numărului de celule în faza G2 observată prin citometrie în flux în cazul acestui compus. Astfel, compușii **INH-TCT 3** și **INH-TCT 6** determină blocarea ciclului celular în faza G1.

În consecință, **INH-AC 4**, **INH-AC 5**, **INH-AC 6**, **INH-TCT 3** și **INH-TCT 6** au determinat scăderea nivelului de expresie al celor două cicluri analizate, ciclul A și ciclul B, și a genelor Cdk1 și Cdc20, fapt ce se corelează cu blocarea celulelor în faza G0/G1 observată prin citometrie în flux.

Majoritatea mutațiilor care determină apariția tumorilor sunt în gene ce codifică proteinele implicate în faza G1 a ciclului celular.⁷⁷¹ În cazul studiului nostru, unii din derivații de izoniazidă noi sintetizați determină blocarea progresiei ciclului celular, determinând acumularea celulelor în faza G0/G1. De asemenea, unii dintre compușii analizați au efect citotoxic prin inducerea apoptozei. Toxicitatea acestor compuși poate fi explicată parțial de formarea unor metaboliți toxici, dar care în același timp pot fi eliminați din organism, evitându-se acumularea lor. Totuși, elucidarea potențialului antitumoral al acestor compuși necesită studii mai aprofundate în ceea ce privește mecanismul lor de acțiune.

În scopul evaluării modificărilor induse de noile substanțe sintetizate, asupra nivelului energetic în celule, am analizat nivelul de expresie al genelor ce codifică subunitatea alfa a AMPK, *PRKAA1* și *PRKAA2*, în celulele tratate timp de 24 de ore cu noii derivați. AMPK protejează celula de stresul care determină depleția ATP prin deconectarea căilor biosintetice consumatoare de energie, activează căile de producere a energiei și inhibă procesele consumatoare în răspuns la micșorarea nivelului de ATP intracelular, reglează polaritatea celulară prin remodelarea citoscheletului actinic și, posibil, prin activarea indirectă a miozei. Această proteină acționează prin fosforilarea directă a enzimelor metabolizatoare și, printr-un efect de durată mai mare, prin fosforilarea reglatorilor de transcripție.

Toți derivații tiocinamamidici au determinat o creștere a nivelului de expresie al genei *PRKAA2*, și o scădere ușoară a nivelului de expresie al genei *PRKAA1*. Raportul *PRKAA1/PRKAA2* indică o creștere a nivelului de expresie al subunității alfa a proteinei AMPK indusă de compușii **INH-TCA**, cu excepția **INH-TCA 5** care determină o scădere a nivelului de expresie al acestei subunități. În cazul derivaților acilați ai izoniazidei, s-a observat o creștere semnificativă a nivelului de expresie al genei *PRKAA2* de către compușii **INH-AC 4**, **INH-AC 5** și **INH-AC 6**. Raportul *PRKAA1/PRKAA2* în cazul acestor compuși indică o creștere a nivelului de expresie al subunității alfa a proteinei AMPK. Derivatul antipirinic **INH-AP** nu a influențat semnificativ nivelul de expresie al genelor *PRKAA1* și *PRKAA2*, fapt ce se corelează cu influența slabă a acestui compus asupra progresiei ciclului celular observată prin citometria în flux. În cazul derivaților triciclotridecanonici, nivelul de expresie al genei *PRKAA2* a fost crescut în urma tratamentului celulelor cu compușii **INH-**

TCT 2, INH-TCT 3 și INH-TCT 6. Raportul *PRKAA1/PRKAA2* indică o creștere a nivelului de expresie al subunității alfa a proteinei AMPK indusă de acești compuși.

Creșterea nivelului de expresie al subunității alfa a AMPK induse de compușii **INH-AC 4, INH-AC 5, INH-AC 6, INH-TCT 3 și INH-TCT 6** poate fi corelată cu blocarea ciclului celular în faza G0/G1, și anume în punctul de control metabolic, creșterea nivelului de expresie al genelor *PRKAA1* și/sau *PRKAA2* indicând activarea AMPK care determină inhibarea mTOR și blocarea ciclului celular.⁸⁴² Pe de altă parte, modularea apoptozei prin p53 de către AMPK⁸⁴⁶ poate explica creșterea nivelului de expresie indus de compușii **INH-TCA 1, INH-TCA 2, INH-TCA 3, INH-TCA 4, INH-AC 4, INH-AC 5, INH-AC6 și INH-TCT 6**. De asemenea, creșterea expresiei genice a *PRKAA* induse de compușii **INH-TCA** poate fi determinată de creșterea nivelului de expresie al *GSTA3*, condiție în care formarea complexului GST/AMPK determină activarea enzimatică a AMPK *in vitro*.⁸⁴⁴

CONCLUZII

Obiectiv 1. Analiza corelațiilor genotip / fenotip / parametrii farmacocinetici privind genele implicate în metabolizarea medicamentelor antituberculoase

1. Rezultatele obținute în urma determinării genotipului *NAT1* și *NAT2* la pacienți cu tuberculoză, cu sau fără efecte adverse, au evidențiat:

- 16,22% prezintă un genotip heterozigot *NAT1*11/*4* și 2,7% – genotip heterozigot *NAT1*14/*4*, ceilalți pacienți (81,08%) fiind homozigoți *NAT1*4*;
- nu s-a stabilit nici o corelație între polimorfismele genei *NAT1* și efectele hepatotoxice induse de tratamentul antituberculos;
- 27,03% prezintă un genotip *NAT2*5* homozigot și 10,81% – genotip homozigot *NAT2*6*, și doar 5,4% fiind homozigoți pentru *NAT2*4*. Ceilalți pacienți sunt heterozigoți pentru *NAT2*5/*4* (27,03%), *NAT2*6/*4* (10,81%) și *NAT2*5/*6* (18,92%);
- genotipul acetilator lent determinat de polimorfismele genei *NAT2* este responsabil de efectele adverse hepatotoxice induse de tratamentul tuberculozei.

Hepatotoxicitatea poate fi determinată și de alți factori, de exemplu prezența unor polimorfisme în alte gene implicate în metabolismul altor medicamente antituberculoase sau de terapiile concurente (rifampicina induce amidaza).

Obiectiv 2. Sinteza și bioevaluarea unor noi compuși derivați ai izoniazidei cu potențială activitate antimicobacteriană

2. Au fost sintetizați 19 noi derivați ai izoniazidei: 5 *N'*-[1-amino-1-mercapto-3-(fenil-*p*-substituit)-alil]-hidrazide ale acidului izonicotinic, 6 hidrazide *N*-substituite și *N,N'*-disubstituite ale acizilor 2-(fenoximetil-4-substituit)-benzoici, *N*-(1,5-dimetil-3-oxo-2-fenil-2,3-dihidro-1*H*-pirazol-4-il)-3,5-dinitro-4-[*N*-(piridin-4-carbonil)hidrazino]-benzamida și 7 (2-hidroxi-8-substituit-triciclo[7.3.1.0^{2,7}]tridec-13-iliden)-hidrazide ale acidului izonicotinic,

iar structura lor a fost confirmată prin analize fizico-chimice. În privința studiilor biologice, rezultatele obținute au sugerat că noii derivați ai izoniazidei prezintă diferite activități biologice în funcție de structura lor.

3. Studiul activității biologice a *N'*-[1-amino-1-mercapto-3-(fenil-*p*-substituit)-alil]-hidrazidelor acidului izonicotinic a evidențiat:

- cel mai activ compus în ceea ce privește efectul anti-*Mycobacterium tuberculosis*, a fost *N'*-(1-amino-1-mercapto-3-fenil-alil)-hidrazida acidului izonicotinic (**INH-TCA 1**). Acest compus a crescut și expresia genelor *NAT1* și *NAT2*, implicate în metabolismul izoniazidei, demonstrând că poate fi ușor metabolizat și astfel bine tolerat de gazda umană;
- spectrul cel mai larg de activitate antibacteriană a fost observat în cazul *N'*-(1-amino-1-mercapto-3-(4-clor-fenil)-alil)-hidrazidei acidului izonicotinic (**INH-TCA 2**);
- derivații tioamidici au determinat o creștere a nivelului de expresie al genelor *CYP1A1*, *CYP2C19*, *CYP3A4* și *GSTA3* analizate în ambele linii celulare indicând posibila implicare a acestora în metabolizarea noilor compuși;
- *N'*-[1-amino-1-mercapto-3-(fenil-*p*-substituit)-alil]-hidrazidele acidului izonicotinic induc apoptoza pe cale intrinsecă, cel mai toxic compus fiind *N'*-(1-amino-1-mercapto-3-(4-clor-fenil)-alil)-hidrazidei acidului izonicotinic (**INH-TCA 2**), iar cel mai puțin toxic compus este *N'*-(1-amino-1-mercapto-3-(4-metoxi-fenil)-alil)-hidrazida acidului izonicotinic (**INH-TCA 4**).

4. Studiul activității biologice a hidrazidelor *N*-substituie și *N,N'*-disubstituie ale acizilor 2-(fenoximetil-4-substituit)-benzoici a evidențiat:

- cea mai bună activitate antibacteriană (inclusiv efect anti-*Mycobacterium tuberculosis*) a fost prezentată de către compusul *N*-[2-(4-etil-fenoximetil)-benzoil]-*N'*-(piridin-4-carbonil)-hidrazida acidului 2-(4-etil-fenoximetil)-benzoic (**INH-AC 6**);
- toți compușii induc expresia genelor *NAT2*, *CYP1A1* și *CYP2C19* în celulele HCT-8 indicând faptul că noii compuși ar putea fi metabolizați pe alte căi decât izoniazida;
- *N*-[2-(4-metil-fenoximetil)-benzoil]-*N'*-(piridin-4-carbonil)-hidrazida acidului 2-(4-metil-fenoximetil)-benzoic (**INH-AC 4**) este cel mai toxic din această serie de compuși și induce apoptoza în 54% din celule după 72 de ore, efect care poate fi prezis de creșterea expresiei genelor caspaza 3 și 7 după un tratament de 24 de ore;
- *N*-[2-(4-metil-fenoximetil)-benzoil]-*N'*-(piridin-4-carbonil)-hidrazida acidului 2-(4-metil-fenoximetil)-benzoic (**INH-AC 4**), *N*-[2-(4-metoxi-fenoximetil)-benzoil]-*N'*-(piridin-4-carbonil)-hidrazida acidului 2-(4-metoxi-fenoximetil)-benzoic (**INH-AC 5**) și *N*-[2-(4-etil-fenoximetil)-benzoil]-*N'*-(piridin-4-carbonil)-hidrazida acidului 2-(4-etil-fenoximetil)-benzoic (**INH-AC 6**) determină o blocare a ciclului celular în faza G1, ceea ce ar putea indica posibila lor utilizare ca citostatice.

5. Studiul activității biologice a *N*-(1,5-dimetil-3-oxo-2-fenil-2,3-dihidro-1*H*-pirazol-4-il)-3,5-dinitro-4-[*N*-(piridin-4-carbonil)hidrazino]-benzamidei a evidențiat:

- acest compus are o activitate antimicobacteriană moderată și nu prezintă nici o activitate antibacteriană împotriva altor tulpini non-tuberculoase testate;
- **INH-AP** determină o creștere a nivelului de expresie al genelor *NAT1* și *NAT2* în ambele linii studiate, o creștere a nivelului de expresie al genei *CYP1A1* și o scădere a nivelului de expresie al izoformei *CYP2C19* în ambele linii celulare utilizate;
- **INH-AP** este mai toxic decât precursorii săi, izoniazida și 4-aminoantipirina, fără să afecteze semnificativ fazele ciclului celular.

6. Studiul activității biologice a (2-hidroxi-8-substituit-triciclo[7.3.1.0^{2,7}]tridec-13-iliden)-hidrazidele acidului izonicotinic a evidențiat:

- cea mai bună activitate antimicobacteriană a fost prezentată de către compușii conțin grupările etil (**INH-TCT 2**), propil (**INH-TCT 3**), butil (**INH-TCT 4**) și izobutil (**INH-TCT 5**) în poziția 8 a restului 2-hidroxi-triciclo[7.3.1.0^{2,7}]tridec-13-ilidenic;
- (8-fenil-2-hidroxi-triciclo[7.3.1.0^{2,7}]tridec-13-iliden)-hidrazida acidului izonicotinic (**INH-TCT 6**) este cel mai eficient compus antibacterian, dar are o activitate slabă contra tulpinii *M. tuberculosis* utilizate;
- această serie de compuși induce expresia genelor *CYP1A1* în liniile celulare HT-29 și HCT-8, și a genei *CYP2C19* în linia celulară HCT-8;
- cel mai toxic compus din această serie este (8-fenil-2-hidroxi-triciclo[7.3.1.0^{2,7}]tridec-13-iliden)-hidrazida acidului izonicotinic (**INH-TCT 6**) care induce apoptoza pe cale extrinsecă și determină blocarea celulelor în faza G1 a ciclului celular;
- cel mai puțin toxic este compusul (2-hidroxi-8-propil-triciclo[7.3.1.0^{2,7}]tridec-13-iliden)-hidrazida acidului izonicotinic (**INH-TCT 3**) care are o activitate antibacteriană bună, atât contra *M. tuberculosis*, cât și contra tulpinilor non-tuberculoase, dar care, de asemenea, afectează progresia ciclului celular în celulele eucariote prin blocarea acestora în faza G1.

7. Astfel, dintre cei 19 derivați ai izoniazidei sintetizați:

- cea mai bună activitate anti-*M. tuberculosis* a fost prezentată de (2-hidroxi-8-substituit-triciclo[7.3.1.0^{2,7}]tridec-13-iliden)-hidrazidele acidului izonicotinic (**INH-TCT**);
- Cel mai activ compus antibacterian este derivatul *N*-[2-(4-etil-fenoximetil)-benzoil]-*N'*-(piridin-4-carbonil)-hidrazida acidului 2-(4-etil-fenoximetil)-benzoic (**INH-AC 6**) care a inhibat creșterea majorității tulpinilor bacteriene non-tuberculoase testate;
- Majoritatea derivaților de izoniazidă nou sintetizați au determinat o creștere atât a nivelului de expresie al genelor *NAT* în cele două linii celulare utilizate, HT-29 și HCT-8, cât și a altor gene implicate în metabolism, sugerând faptul că noii compuși ar putea fi metabolizați pe alte căi decât izoniazida, ceea ce indică

- posibilitatea utilizării lor în combinație cu izoniazida cu scopul de îmbunătăți rata de metabolizare a acesteia în acetilatorii lenți, evitând efectele adverse.
- *N*-[2-(4-metil-fenoximetil)-benzoil]-*N'*-(piridin-4-carbonil)-hidrazida acidului 2-(4-metil-fenoximetil)-benzoic (**INH-AC 4**), *N*-[2-(4-metoxi-fenoximetil)-benzoil]-*N'*-(piridin-4-carbonil)-hidrazida acidului 2-(4-metoxi-fenoximetil)-benzoic (**INH-AC 5**), *N*-[2-(4-etil-fenoximetil)-benzoil]-*N'*-(piridin-4-carbonil)-hidrazida acidului 2-(4-etil-fenoximetil)-benzoic (**INH-AC 6**), (2-hidroxi-8-propil-triciclo[7.3.1.0^{2,7}]tridec-13-iliden)-hidrazida acidului izonicotinic (**INH-TCT 3**) și (8-fenil-2-hidroxi-triciclo[7.3.1.0^{2,7}]tridec-13-iliden)-hidrazida acidului izonicotinic (**INH-TCT 6**) determină o blocare a ciclului celular în faza G1 și au potențial anti-tumoral.
 - Deși unii compuși cu activitate antibacterială sau antitumorală prezintă toxicitate crescută, aceasta poate fi explicată parțial de formarea unor metaboliți toxici, dar care, în același timp, pot fi eliminați din organism, evitându-se acumularea lor.
8. O parte din rezultatele cuprinse în teză au făcut obiectul a trei articole publicate și a șapte comunicări științifice.

Bibliografie selectivă:

- (3) Harries, A.D.; Dye, C. *Annals of tropical medicine and parasitology* 2006, 100, 415.
- (7) Karakousis, P.C.; Williams, E.P.; Bishai, W.R. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 2008, 61, 323.
- (9) Zhang, Y.; Heym, B.; Allen, B.; Young, D.; Cole, S. *Nature* 1992, 358, 591.
- (13) Sekiguchi, J.; Miyoshi-Akiyama, T.; Augustynowicz-Kopec, E. et al. *Journal of clinical microbiology* 2007, 45, 179.
- (15) Parkin, D.P.; Vandenplas, S.; Botha, F.J. et al. *American journal of respiratory and critical care medicine* 1997, 155, 1717.
- (17) Saukkonen, J.J.; Cohn, D.L.; Jasmer, R.M. et al. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2006, 174, 935.
- (20) Hearn, M.J.; Cynamon, M.H. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 2004, 53, 185.
- (23) Herzog, H. *Respiration; international review of thoracic diseases* 1998, 65, 5.
- (40) McEvoy, C.R.; Falmer, A.A.; Gey van Pittius, N.C. et al. *Tuberculosis* 2007, 87, 393.
- (104) Blumberg, H.M.; Burman, W.J.; Chaisson, R.E. et al. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2003, 167, 603.
- (180) Sarich, T.C.; Adams, S.P.; Petricca, G.; Wright, J.M. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 1999, 289, 695.
- (256) Boechat, N.; Ferreira, V.F.; Ferreira, S.B. et al. *Journal of medicinal chemistry* 2011, 54, 5988.
- (371) Commandeur, J.N.; Stijntjes, G.J.; Vermeulen, N.P. *Pharmacological reviews* 1995, 47, 271.
- (523) Shenfield, G.M. *The Clinical biochemist. Reviews / Australian Association of Clinical Biochemists* 2004, 25, 203.
- (557) Ventura, C.; Martins, F. *Journal of medicinal chemistry* 2008, 51, 612.
- (558) Scior, T.; Garces-Eisele, S.J. *Current medicinal chemistry* 2006, 13, 2205.
- (560) Pappalardo, G.; Tornetta, B.; Condorelli, P.; Bernardini, A. *Il Farmaco; edizione scientifica* 1967, 22, 808.
- (574) Franzblau, S.G.; Witzig, R.S.; McLaughlin, J.C. et al. *Journal of clinical microbiology* 1998, 36, 362.

- (582) Naumann, K. How Chlorine in Molecules Affects Biological Activity; Euro Chlor Science Dossier: Brussels, 2003.
- (584) Judge, V.; Narasimhan, B.; Ahuja, M. Med Chem Res 2012, 21, 3940.
- (591) Grant, D.M.; Blum, M.; Beer, M.; Meyer, U.A. Molecular pharmacology 1991, 39, 184.
- (608) Wienkers, L.C.; Heath, T.G. Nature reviews. Drug discovery 2005, 4, 825.
- (624) Desta, Z.; Soukhova, N.V.; Flockhart, D.A. Antimicrobial agents and chemotherapy 2001, 45, 382.
- (630) Nishimura, Y.; Kurata, N.; Sakurai, E.; Yasuhara, H. Journal of pharmacological sciences 2004, 96, 293.
- (643) Benson, A.M.; Talalay, P.; Keen, J.H.; Jakoby, W.B. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 1977, 74, 158.
- (651) De, P.; Baltas, M.; Bedos-Belval, F. Current medicinal chemistry 2011, 18, 1672.
- (652) Lo, H.W.; Ali-Osman, F. Current opinion in pharmacology 2007, 7, 367.
- (654) Kalgutkar, A.S.; Gardner, I.; Obach, R.S. et al. Current drug metabolism 2005, 6, 161.
- (669) Nakajima, T.; Wang, R.S.; Elovaara, E. et al. Biochemical pharmacology 1997, 53, 271.
- (761) Rodrigues, F.A.; Oliveira, A.C.; Cavalcanti, B.C. et al. Scientia pharmaceutica 2014, 82, 21.
- (762) Kumar, H.; Malhotra, D.; Sharma, R.; Sausville, E.; Malhotra, M. Pharmacologyonline 2011, 3, 337.
- (771) Foster, D.A.; Yellen, P.; Xu, L.; Saqena, M. Genes & cancer 2010, 1, 1124.
- (844) Klaus, A.; Zorman, S.; Berthier, A. et al. PloS one 2013, 8, e62497.

LISTA DE LUCRĂRI

Lista de lucrări publicate pe tema tezei de doctorat:

1. Remes C., Paun A., Zarafu I., Tudose M., Caproiu M.T., Ionita G., Bleotu C., Matei L., Ionita P. Bioorg Chem. 2012; 41-42:6-12. IF = 2.141
2. Matei L., Bleotu C., Baciu I., Draghici C., Ionita P., Paun A., Chifiriuc M.C., Sbarcea A., Zarafu I. Bioorg. Med. Chem. 2013; 21: 5355–5361. IF = 2.951
3. Matei L., Bleotu C., Baciu I., Diaconu C.C., Hanganu A., Banu O., Ionita P., Paun A., Tatibouet A., Zarafu I. Bioorg. Med. Chem. 2015; 23: 401–410. IF = 2.951

Lista de lucrări publicate pe alte teme:

1. Brehar F. M., Bleotu C., Stefan L.M., Buzgariu W., Chivu M., Gherghina E., Matei L., Ciurea A.V., Tascu A., Chirurgia 2009, 104(4):453-61. IF = 0.78
2. Brehar F.M., Ciurea A.V., Zarnescu O., Bleotu C., Gorgan R.M., Dragu D., Matei L. Chirurgia 2010, 105(5):685-694. IF = 0.78
3. Sonmez M., Ficai D., Stan A., Bleotu C., Matei L., Ficai A., Andronescu E., Materials Letters 2012, 74:132–136. IF = 2.29
4. Diaconu C.C., Neagu A.I., Lungu R., Tardei G., Alexiu I., Chivu Economescu M., Bleotu C., Bumbacea S.R., Aldea I., Matei L., Necula L., Pele I., Dragu D., Stancu I.C., Nastasie A., Ataman M., Bumbacea D., Romanian Biotechnological Letters 2012, 17(1):6862-6869. IF = 0.11
5. Limban C., Grumezescu A.M., Chirea M., Matei L., Chifiriuc M.C. Current Organic Chemistry 2013; 17(2):162-175. IF = 3.04.
6. Nitulescu G.M.; Draghici C.; Olaru O.T.; Matei L.; Ioana A.; Dragu L.D.; Bleotu C. Bioorg. Med. Chem. 2015; 23(17):5799-5808. IF = 2,951

Comunicări științifice:

1. *In vitro investigation of the intercellular cross-talk between opportunistic bacteria and eukaryotic cells.* Bleotu C., Balotescu Chifiriuc M., Iordache C., Dracea O., Bucur M., Larion C., Matei L., Banu O., Cernat R., Lazar V. 18th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), 19-22 Apr. 2008, Barcelona, Spania
2. *Synthesis and anti-tubercular activity of the new isoniazid derivatives.* Zarafu I., Matei L., Bleotu C., Petre I., Ivan L. International Conference of the Chemical Societies of the South-Eastern European Countries, 15-17 Sept. 2010, Bucharest, Romania
3. *Synthesis and anti-tubercular activity of the new isoniazid derivatives with the thioamides.* Zarafu I., Matei L., Bleotu C., Paun A.A., Ivan L. International Symposium Research and Education in Innovation Era, 3rd Edition, 11-12 Nov. 2010, Arad, Romania
4. *Synthesis and evaluation of biological activity of some new isoniazid derivatives.* Matei L., Zarafu I., Balotescu C., Lazar V., Caproiu T., Paun A.L., Ivan L.V., Diaconu C.C., Bleotu C. 7th Romanian Congress of Cytometry, 5-7 May 2011, Bucharest, Romania
5. *Genotype and adverse effects in tuberculosis patients with / without related diseases.* Matei L., Ghiciuc C., Bleotu C., Moldoveanu B., Diaconu C.C., Lupusoru C., Mircioiu C. 36th FEBS Congress Biochemistry of Tomorrow's Medicine, 25-30 Jun. 2011, Torino, Italia
6. *Synthesis of new hydrazides of carboxylic acids with potential biological activity.* Matei L., Paun A., Bleotu C., Hanganu A.M., Caproiu T., Limban C., Ionita P., Zarafu I. A XXXII-a Conferință Națională De Chimie Călimănești – Căciulata, 3 – 5 Oct. 2012, Valcea, Romania
7. *New insights into the molecular etiology of gastric cancer.* Chivu-Economescu M., Necula L.G., Dragu D., Bleotu C., Matei L., Dima S.O., Dumitru A., Constantinescu G., Popescu I., Diaconu C.C., Congresul National de Oncologie Medicala si Radioterapie organizat in cooperare cu ESMO, 18-20 octombrie 2012, Sinaia, Romania
8. *Synthesis and evaluation of antitumoral activity of some new pyrazolic compounds.* Matei L., Nitulescu G.M., Aldea I.M., Bleotu C., Chivu-Economescu M., Diaconu C.C. 38th FEBS Congress Mechanisms in Biology, 6-11 Jul. 2013, St. Petersburg, Russia
9. *Synthesis and bioevaluation of new carboxylic acids hydrazides with potential biologic activity.* Matei L., Bleotu C., Baciu I., Hanganu A.M., Draghici C., Ionita P., Paun A., Limban C., Zarafu I., Diaconu C.C. Academician Nicolae Cajal Symposium, 12 – 13 May 2014, Bucharest, Romania
10. *Synthese et l'évaluation de l'activité biologique des dérivés d'isoniazide et cycloctoles.* Matei L., Muțescu M., Bleotu C., Baciu I., Banu O., Păun A., Ioniță P., Zarafu I. Le Huitième Colloque Franco – Roumain De Chimie Appliquée, 15 - 18 Sept. 2014, Montpellier, France