

ACADEMIA DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI
INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE

Cu titlu de manuscris

C.Z.U. 615.282: 616.095

OLTU IULIAN

**ACȚIUNEA ANTIFUNGICĂ *IN VITRO* A REMEDIILOR DE
ORIGINE BIOLOGICĂ ȘI CHIMICĂ ASUPRA UNOR AGENȚI
CAUZALI AI MICOZELOR**

313.02 – MICROBIOLOGIE, VIRUSOLOGIE MEDICALĂ

Autoreferatul tezei de doctor în științe medicale

CHIȘINĂU, 2017

Teza a fost elaborată în cadrul laboratorului Ficobiotehnologie și Colecției Naționale de Microorganisme Nepatogene ale Institutului de Microbiologie al Academiei de Științe a Moldovei, și a Catedrei de Microbiologie, Virusologie și Imunologie a Universității de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”.

Conducător științific:

Rudic Valeriu doctor în științe medicale, doctor habilitat în științe biologice, profesor universitar, academician, Om Emerit al Republicii Moldova

Consultant științific

Gulea Aurelian doctor habilitat în științe chimice, profesor universitar, academician, Om Emerit al Republicii Moldova

Referenți oficiali:

Roșcin Iurie doctor habilitat în științe medicale, profesor universitar

Balan Greta doctor în științe medicale, conferențiar universitar

Componența consiliului științific specializat:

Spînu Constantin **președinte**, doctor habilitat în științe medicale, profesor universitar
Sîrbu Tamara **secretar științific**, doctor în științe biologice, conferențiar cercetător
Mușet Gheorghe doctor habilitat în științe medicale, profesor universitar
Gudumac Valentin doctor habilitat în științe medicale, profesor universitar
Burduniuc Olga doctor în științe medicale, conferențiar cercetător

Susținerea va avea loc la 24 mai 2017, ora 14.00 în ședința Consiliului științific specializat D09.313.02-01 din cadrul Institutului de Microbiologie și Biotehnologie al AȘM, or. Chișinău, str. Academiei 1, birou 352.

Teza de doctor și autoreferatul pot fi consultate la Biblioteca Științifică Centrală a Academiei de Științe a Moldovei „A. Lupan”, la biblioteca Universității de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu” și pe pagina web a CNAA (www.cnaa.md).

Autoreferatul a fost expediat la 18 aprilie 2017.

Secretar științific al Consiliului științific specializat:

Sîrbu Tamara doctor în științe biologice, conferențiar cercetător

Conducător științific:

Rudic Valeriu doctor habilitat în științe biologice, profesor universitar, academician, Om Emerit al R. Moldova

Consultant științific

Gulea Aurelian doctor habilitat în științe chimice, profesor universitar, academician, Om Emerit al R. Moldova

Autor

OLTU Iulian

© Oltu Iulian, 2017

REPERELE CONCEPTUALE ALE CERCETĂRII

Actualitatea temei. Fungii sunt organisme omniprezente. Numărul de specii de fungi se estimează aproximativ la 1,5 milioane și doar 300 dintre ele pot afecta organismul uman. Cu toate acestea fungii se manifestă tot mai activ în calitate de agenți cauzali ai infecțiilor la om, fapt determinat, în primul rând, de numărul în creștere a persoanelor cu imunosupresie severă [6]. Cu toate că se lucrează foarte mult la elaborarea medicamentelor antifungice mai active și mai puțin toxice, se aplică măsuri de profilaxie practic în toată lumea, micozele (în special cele invazive) continuă să fie unele dintre cele mai grave complicații infecțioase, care cauzează o rată de mortalitate ridicată [13]. Conform estimărilor, aproximativ 25% din populația Terrei este afectată de micozele superficiale, cauzate în special de dermatofii din genurile *Microsporum*, *Trichophyton* și *Epidermophyton* [5, 12]. Analiza statistică a datelor privind morbiditatea polimicozelor în Republica Moldova (în special microfiție și tricofiție) arată, că în anii 2000-2015 se observă o prevalență absolută a fungilor zoofili (*Microsporum canis* – 100% din microsporii și *Trichophyton mentagrophytes* – 98,3% din cazurile de tricofiții). În anul 2015 microsporia zooantropofilă a constituit în Moldova 31 de cazuri la 100 000 populație [3].

Infecțiile fungice invazive (sistemice) au o incidență care este mult mai mică decât cea a infecțiilor superficiale, dar provoacă o îngrijorare mai mare, deoarece sunt asociate cu o rată de mortalitate inacceptabil de înaltă, acestea luând anual viața a aproximativ unui milion și jumătate de oameni [11]. Fungii care cauzează infecții oportuniste (*Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus* sp., *Mucor* sp. ș.a.) sunt periculoși în special pentru persoanele cu statut imun compromis, la care provoacă infecții grave (candidoză, meningită criptococală, aspergiloză, mucormicoză ș.a.) [7, 16].

Utilizarea pe scară largă a preparatelor antifungice (prioritar azolele, polienele și alilaminele/tiocarbamatele) este unul dintre factorii care facilitează apariția rezistenței, ceea ce reduce posibilitățile unui tratament eficace. Creșterea rezistenței antifungice implică sporirea morbidității și mortalității în rândurile populației, dar și ascensiunea costurilor de îngrijire și tratament a persoanelor afectate. Studiul mecanismelor de acțiune a preparatelor antifungice și a rezistenței la ele, în prezent, rămâne în urmă cu mult față de studiile similare pentru preparatele antibacteriene. Din aceste motive este necesară concentrarea atenției cercetătorilor pe studiul detaliat al mecanismelor de rezistență antifungică, perfecționarea metodelor de detectare a rezistenței, elaborarea de noi preparate antifungice pentru tratamentul infecțiilor cauzate de microorganisme rezistente și aplicarea metodelor de prevenire a apariției și răspândirii formelor rezistente de fungi patogeni [9, 17].

Situația în domeniul de cercetare. În prezent rămâne deosebit de actuală problema elaborării și implementării unor noi remedii cu acțiune antifungică relevantă și cu efecte adverse minime față de organismul-gazdă. În conceptul actual există mai multe direcții de perspectivă, printre care se numără sinteza compușilor chimici cu proprietăți predeterminate, depistarea compușilor naturali cu efect fungicid și aplicarea preparatelor complexe polivalente cu efecte asupra mai multor niveluri de rezistență, prezente la culturile de patogeni.

Au fost obținute rezultate remarcabile în sinteza compușilor cu proprietăți predeterminate – compuși coordinativi ai cuprului, zincului, cobaltului și nichelului cu proprietăți antifungice pronunțate față de tulpinile patogene de referință, în special de *Candida albicans* [10, 14]. Aceste substanțe sunt destul de importante pentru industria farmaceutică, fiind din start cunoscută structura chimică și, deci convenabil de gestionat procesul de absorbție și metabolizare a lor.

Preparatele de origine naturală ocupă o nișă aparte, fiind în centrul atenției atât pentru efectele biologice pronunțate, cât și pentru faptul, că sunt acceptate mai ușor de către pacienți. Biomasa diferitor plante, microalge, cianobacterii este examinată în calitate de materie primă pentru extragerea compușilor cu un potențial efect fungicid ori fungistatic [2, 8, 23].

Sursele naturale (extracte din biomasa diferitor organisme) sunt deosebit de prețioase pentru design-ul noilor molecule active cu proprietăți antifungice. Diverse molecule mici, cu schelet chimic unic și activitate pronunțată au fost obținute din diferite surse, cum ar fi plantele, produsele marine, microorganismele, etc. Acești compuși reprezintă o mare varietate structurală referindu-se la steroli, furanone, quinine, terpenoizi ș.a. [24].

Răspândirea tulpinilor multirezistente de fungi și numărul redus de medicamente disponibile dictează necesitatea de a descoperi noi clase de preparate antifungice și compuși care inhibă mecanismele de rezistență. Anume în baza acestei necesități este inițiat procesul de depistare a posibilităților terapeutice alternative, în special prin explorarea plantelor medicinale și compușilor izolați din ele. Accent se face pe preparatele complexe, care asigură nu numai acțiune antifungică, dar și efecte imunomodulatoare, care asigură restabilirea statutului imun al organismului afectat, iar prin aceasta – succesul terapiilor antifungice.

Problema de cercetare care reiese din analiza situației în domeniu constă în necesitatea elaborării compușilor chimici noi și selectarea remediilor naturale cu activitate antifungică față de agenții cauzali ai micozelor, precum și evidențierea elementelor comune ale răspunsului fungilor la acțiunea substanțelor selectate.

Scopul tezei a constat în evaluarea răspunsului *in vitro* a unor culturi de fungi patogeni și oportunist patogeni la acțiunea remediilor noi de origine biologică și chimică.

Obiectivele lucrării au fost următoarele:

1. Evidențierea acțiunii antifungice a unor compuși chimici noi, sintetizați de către cercetătorii din Republica Moldova;
2. Evaluarea acțiunii antifungice a unor extracte vegetale și cianobacteriene;
3. Elucidarea acțiunii antifungice a extractelor din biomasa de spirulină, crescută în condiții biotehnologice de acumulare a metalelor;
4. Stabilirea mecanismelor de acțiune posibile a compușilor chimici noi și extractelor din surse autohtone asupra fungilor patogeni.

Metodologia cercetării științifice. Pentru realizarea lucrării au fost utilizate metode de determinare a activității antifungice și metode de determinare a modificărilor biochimice, care au loc în culturile fungice sub influența compușilor testați. Din prima categorie au fost utilizate metodele clasice de determinare a concentrației minime de inhibiție și concentrației minime fungicide (difuzia în geloză și diluțiile succesive), precum și metodele standardizate EUCAST (7.1 și 9.1). Din a doua categorie au fost aplicate metodele de determinare a activității enzimelor (lactat dehidrogenazei eliberate, superoxiddismutazei, catalazei și glutatation peroxidazei), capacității antioxidante totale și a conținutului produselor finale ale peroxidării lipidelor (dialdehidei malonice). Modificările morfologice ale fungilor la acțiunea compușilor testați au fost urmărite microscopic. Calculul statistic a fost realizat prin aplicarea instrumentelor statisticii descriptive și inferențiale [15].

Noutatea și originalitatea științifică. Pentru prima dată a fost identificată acțiunea antifungică a unor noi compuși coordinativi cu conținut de tiosemicarbazone, dintre care unul a fost brevetat în calitate de substanță cu activitate antifungică față de *Candida albicans*; în calitate de lucrări de pionierat pot fi considerate cercetările complexe ale acțiunii extractelor cianobacteriene din biomasa standard și cea obținută în condiții biotehnologice de acumulare a metalelor asupra fungilor, care au permis de a elucidă unele mecanisme ce stau la baza acțiunii acestor extracte; în premieră a fost demonstrată acțiunea noilor substanțe asupra integrității învelișurilor celulare și asupra statutului redox al celulelor fungice.

Problema științifică importantă soluționată în lucrare constă în evaluarea acțiunii biologice *in vitro* a remediilor de natură biologică și chimică asupra unor tulpini de fungi patogeni și oportunist patogeni, ceea ce a dus la evidențierea elementelor comune și specifice ale răspunsului celular al fungilor, fapt ce a permis stabilirea unor mecanisme de acțiune a remediilor selectate.

Semnificația teoretică. Au fost acumulate date noi care permit de a lărgi spectrul de substanțe de perspectivă pentru descoperirea noilor medicamente antifungice; au fost conturate

unele dintre mecanismele de acțiune a noilor substanțe asupra tulpinilor studiate de fungi, bazate pe diminuarea capacității de protecție antioxidantă și deteriorarea învelișurilor celulare.

Valoarea aplicativă a lucrării. A fost propusă o nouă substanță chimică în calitate de produs cu proprietăți antifungice față de *Candida albicans*; a fost argumentată o cale nouă de cercetare orientată spre depistarea substanțelor noi cu proprietăți antifungice, și anume obținerea biomasei cianobacteriene cu conținut de metale și a extractelor din acest tip de biomasă.

Rezultatele științifice principale înaintate spre susținere.

1. Compușii coordinativi noi care conțin în structura lor segmentul tiosemicarbazonic posedă acțiune antifungică față de tulpina *Candida albicans* ATCC®10231™;
2. Extractele în etanol și etil acetat din frunze, pericarp și endocarp de nucă și cele hidroetanolicе din biomasă de spirulină și nostoc manifestă activitate antifungică față de *Candida albicans* ATCC®10231™ și fungii filamentoși Dermatofiți, iar extractele din biomasa de spirulină cu conținut de metale posedă acțiune antifungică față de toate tulpinile testate.
3. Unul din mecanismele de acțiune a compușilor antifungici noi constă în modificarea permeabilității membranelor celulare, fapt confirmat de eliberarea lactat dehidrogenazei în mediul extracelular și modificările morfologice corespunzătoare.
4. Stresul oxidativ confirmat prin acumularea produselor degradării oxidative în celulele fungilor, scăderea activității enzimelor antioxidante primare și diminuarea capacității antioxidante totale prezintă un alt mecanism al acțiunii noilor compuși antifungici.

Implementarea rezultatelor științifice. Rezultatele studiului au fost implementate la Catedra de Microbiologie, Virusologie și Imunologie a Universității de Stat de Medicină și Farmacie "N.Testemițanu" ca material didactic pentru instruirea universitară.

Aprobarea rezultatelor științifice. Materialele expuse în teză au fost prezentate și discutate în cadrul următoarelor manifestări științifice: Conferința Științifică (cu participare internațională) a Doctoranzilor, ediția a V-a, Chișinău, 2016; Conferința Științifică Internațională în domeniul Biotehnologiei microbiene, a 3-a ediție, Chișinău, 2016; Conferința Internațională "Științele vieții în dialogul dintre generații: Conexiune între Universități, mediul academic și Bussines" Chișinău, 2016; Congresul al V-lea Național de dermatologie cu participare internațională, Chișinău, 2016, precum și la Saloanele Internaționale de inventică: INOVA-Budi Uzor, Karlovac, Croația, 2015; INNOVA, Brussels, 2015; PALEXPO, Geneva, 2016; IWIS, Varșovia, 2016. Rezultatele tezei au fost discutate și aprobate în cadrul ședinței extinse a laboratorului Ficobiotehnologie al IMB din 14 noiembrie 2016 și Seminarului Științific de profil 163.04 - Microbiologie și 313.02 - Microbiologie, virusologie medicală din cadrul Institutului de Microbiologie și Biotehnologie al AȘM din 27 decembrie 2016.

Publicațiile la tema tezei. Rezultatele obținute pe durata elaborării acestei teze sunt reflectate în 11 publicații științifice: 3 articole, din ele 2 în reviste științifice, și unul în culegere (2 - în monoautorat), 3 rezumate ale comunicărilor științifice, un brevet de invenție și 4 materiale la saloane de invenții.

Volumul și structura tezei. Teza constă din 4 capitole; are un volum de bază de 133 pagini, conține 10 tabele și 47 figuri. Lista surselor bibliografice citate include 194 titluri.

Cuvintele cheie: Activitate antifungică, compuși coordinativi cu semicarbazone substitute, extracte din cianobacterii, extracte din *Juglans regia*, *Trichophyton*, *Microsporum*, *Candida*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*.

CONȚINUTUL TEZEI

1. AGENȚI ANTIFUNGICI: MOD DE ACȚIUNE, MECANISME DE REZISTENȚĂ ȘI STRATEGII DE CERCETARE

În primul capitol al lucrării este prezentată o amplă analiză a realizărilor științifice în domeniul studiului compușilor cu acțiune antifungică. Studiul bibliografic efectuat a inclus 194 lucrări relevante publicate de cercetări din domeniul medicinei, biomedicinii și biologiei din întreaga lume. Prima parte a capitolului include statistici ce țin de răspândirea și impactul micozelor, informații despre preparatele utilizate astăzi în clinică pentru tratarea acestor maladii, principalele ținte moleculare, asupra cărora acționează medicamentele antifungice. Sunt aduse mai multe tipuri de clasificare a preparatelor antifungice, cea mai utilă fiind cea, care este bazată pe mecanismele de acțiune ale substanțelor active.

Cea de-a doua parte a capitolului 1 este dedicată studiului literaturii în domeniul cercetării mecanismelor de dezvoltare a rezistenței la acțiunea preparatelor antifungice. Sunt descrise detaliat mai multe dintre elementele care asigură rezistența primară. Pentru rezistența secundară sunt aduse în primul rând, cauzele care duc la apariția ei. Este evidențiat rolul procesului mutagen și a superexpresiei enzimelor implicate în biosinteza ergosterolului. De asemenea, este arătat, că mulți cercetători asociază rezistența antifungică cu multiple modificări genomice, inclusiv pierderea caracterului heterozigot în anumite regiuni genomice specifice, creșterea numărului de copii ale cromozomilor, precum și aneuploidiile segmentare sau cromozomiale.

A treia parte a capitolului 1 este dedicată compușilor sintetici și celor naturali cu proprietăți antifungice și include multiple informații despre concentrațiile active, microorganismele - țintă și mecanismele, prin care compușii își realizează efectul antifungic. În calitate de materie primă pentru preparatele cu efect antifungic este examinată biomasa diferitor plante și microorganisme.

În următoarea parte sunt analizate strategiile actuale în design-ul noilor substanțe cu efect antifungic, care includ screening-ul compușilor deja cunoscuți, sinteza compușilor noi, formularea combinațiilor din două și mai multe componente antifungice, evidențierea țintelor moleculare potrivite pentru acțiunea selectivă a compușilor antifungici, cercetările genomice, care permit accelerarea tempoului de adaptare a strategiilor terapeutice în tratarea infecțiilor fungice. Capitolul se încheie cu concluzii, după care este formulată problema de cercetare și direcțiile de rezolvare a acesteia. De asemenea, sunt formulate scopul și sarcinile prezentei lucrări.

2. OBIECTELE DE STUDIU ȘI METODELE DE CERCETARE

În calitate de substanțe cu efect antifungic în studiu au fost incluși 22 compuși chimici noi, care conțin în structura lor fragmentul tiosemicarbazonic, sintetizați în cadrul Departamentului de Chimie (Universitatea de Stat din Moldova) sub conducerea academicianului Aurelian Gulea. În calitate de remedii de origine biologică în studiu au fost incluse extractele în metanol, etanol, acetonă și etil acetat din frunze, pericarp și endocarp de nucă (*Juglans regia*) și extracte hidroetanolicе de 20%, 50% și 70% din biomasa de *Arthrospira platensis* (spirulina) și *Nostoc linckia* (nostoc). O altă serie de extracte studiate au fost obținute din biomasa de spirulină crescută în condiții biotehnologice de bioacumulare a metalelor (Zn(II), Fe(II), Co(II), Cr(II), Cd(II)). Pe durata ciclului de dezvoltare metalele sunt acumulate în biomasa de spirulină, iar o parte din ele sunt incorporate în componentele biomasei (proteine, fracția oligoproteică, polizaharide, lipide). În procesul de extragere cu etanol și apă purificată metalele legate organic trec în extractele respective. Extractele hidrice (EH_{Me}) și extractele etanolice (EE_{Me}) testate au fost standardizate după masa uscată, după care au fost utilizate în cercetare.

În calitate de obiecte de studiu „*in vitro*” au fost incluse tulpinile fungice de referință: *Trichophyton rubrum* ATCC®28188™; *Trichophyton mentagrophytes* ATCC®9533™; *Microsporum canis* ATCC®36299™; *Microsporum gypseum* ATCC®24102™; *Candida albicans* ATCC®10231™; tulpinile depozitate în Colecția Națională de Microorganisme Nepatogene: *Aspergillus fumigatus* CNM-FA-02; *Penicillium expansum* CNMN-FD-05; *Mucor vulgaris* CNMN-FD-07. De asemenea au fost utilizate și izolate naturale care se referă la speciile *Fusarium oxysporum* - *Fusarium oxysporum* FO1 și *Fusarium solani* - *Fusarium solani* FS01.

Pentru realizarea lucrării au fost utilizate metode de determinare a activității antifungice: metoda difuziei în geloză, metoda diluțiilor succesive, metodele standardizate EUCAST (7.1 pentru *Candida albicans* și 9.1 pentru fungii filamentoși). Pentru a identifica efectele preparatelor examinate asupra fungilor dermatofiti și oportunist patogeni au fost aplicate un șir de metode biochimice: metodele de determinare a activității enzimelor (lactat dehidrogenazei

(LDH) eliberate, supeoxiddismutazei (SOD), catalazei (CT) și glutatation peroxidazei (GPx)), capacității antioxidante totale și a produselor finale ale peroxidării lipidelor (dialdehidei malonice). Pentru determinarea activității enzimelor antioxidante au fost utilizate kit-uri speciale (RANSOD pentru superoxiddismutază, producător Randox; RANSEL pentru glutatation peroxidază, producător Randox; Catalase Assay kit pentru catalază, producător Sigma-Aldrich), iar determinările au fost realizate în conformitate cu protocoalele oferite de producători. Activitatea lactat dehidrogenazei eliberate a fost determinată conform metodei bazate pe catalizarea de către LDH a reacției de transformare a L-lactatului în piruvat cu participarea NADH [1].

Modificările morfologice ale fungilor, induse de compușii testați, au fost înregistrate utilizând microscopul Axio Imager A2 (Zeiss) din dotarea Institutului de Zoologie al AȘM, laboratorul Ecotoxicologie.

Toate experiențele au fost efectuate în trei repetări. Rezultatele sunt prezentate în formă de $M(\text{medie}) \pm S(\text{deviația standard})$. Semnificația statistică a fost evaluată prin analiza unidirecțională a varianței urmată de t-testul Student.

3. INFLUENȚA EXTRACTELOR VEGETALE ȘI COMPUȘILOR COORDINATIVI ASUPRA VIABILITĂȚII TULPINILOR DE FUNGI

La prima etapă de cercetare a fost realizat screening-ul substanțelor chimice noi care conțin fragmentul tiosemicarbazonic și extractelor vegetale și cianobacteriene. În calitate de metodă de cercetare a fost aplicată metoda difuziei în geloză. În procesul de screening inițial au fost incluși 73 compuși coordinativi noi, dintre care în lucrare sunt incluși 22, pentru care au fost evidențiate efectele așteptate. 18 dintre aceștia sunt compuși coordinativi ai cuprului (II) cu tiosemicarbazone substituie. De asemenea, a mai fost testată o diamină aromatică (RGTM 64), un compus coordinativ al cobaltului cu 4-metiltiosemicarbazona 2-formilpiridinei (RGTM 37), un compus care este precursorul de sinteză pentru ceilalți compuși studiați - 4-feniltiosemicarbazona acidului piruvic (RGTM 85) și compusul N-(2,4-dimetilfenil) tiosemicarbazonei 2-hidroxibenzaldehidei (BREV 1), care nu conține metal. Toate substanțele incluse în cercetare au fost standardizate la concentrația de 10 mg/ml. În calitate de martori pozitivi în studiul dat au fost utilizați itraconazolul, ketoconazolul și clorhidratul de naftifină (exoderilul). Doar tulpina levuriformă *Candida albicans* ATCC®10231™ a prezentat sensibilitate față de compușii chimici noi. Astfel, acțiunea celor 22 compuși a dus la apariția zonelor de inhibiție a creșterii drojdiei pe mediul Sabouraud cu geloză. Rezultatele obținute sunt prezentate în figura 1.

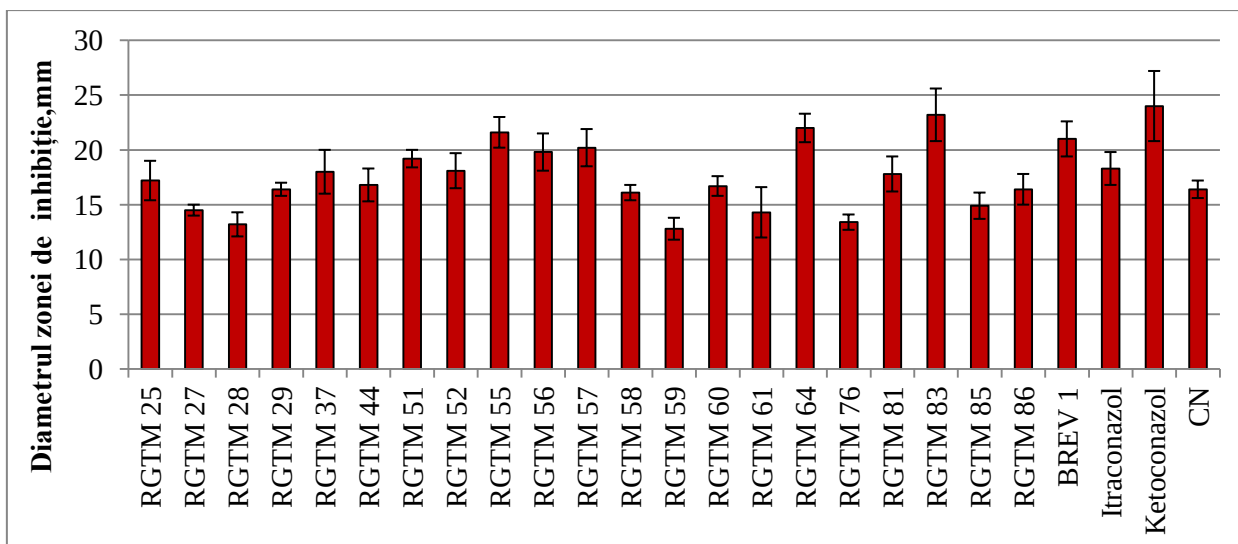


Fig. 1. Acțiunea antifungică a compușilor chimici noi față de *Candida albicans* ATCC®10231™, CN-Clorhidrat de naftifină)

În continuare au fost testate diferite tipuri de extracte din nuc și biomasa cianobacteriană. Extractele din țesuturile de nuc au manifestat activitate antifungică diferită asupra tulpinilor de fungi. Rezultatele pentru tulpina *Candida albicans* ATCC®10231™ sunt prezentate în figura 2. Activitate antifungică importantă a manifestat extractul în etil acetat din frunzele mature de nuc, zonele de inhibiție depășind cu 34,3% valorile obținute pentru itraconazol, cu 54,3 – pe cele obținute pentru clorhidratul de naftifină și fiind de aceleași dimensiuni ca în cazul ketokonazolului.

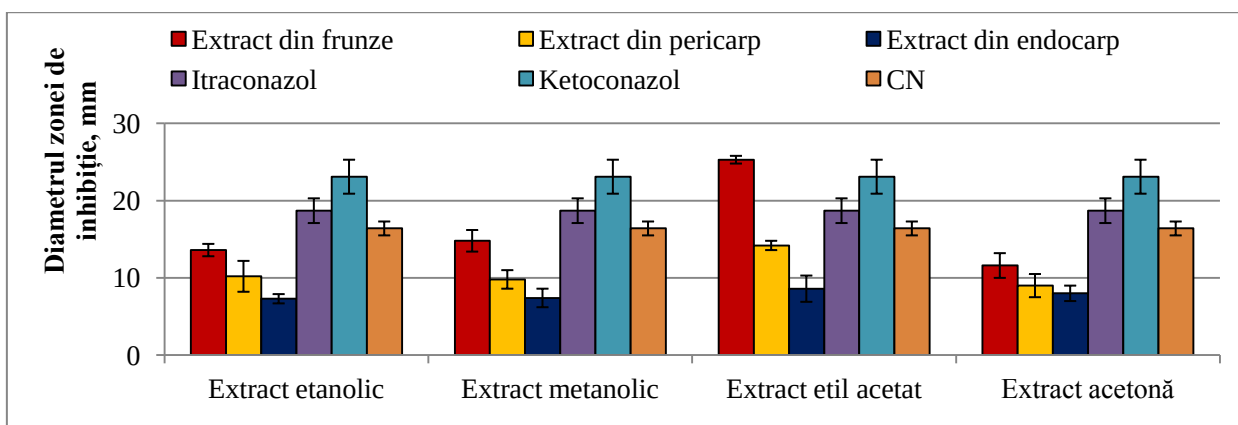


Fig.2. Acțiunea antifungică a extractelor din frunze, pericarp și endocarp de nucă față de *Candida albicans* ATCC®10231™ (CN- clorhidrat de naftifină)

Extractele din frunze și pericarp de nuc de asemenea au fost active contra dermatofitelor. Extractul în etil acetat din frunze a fost cel mai activ față de tulpinile de *Trichophyton*, iar extractul etanolic din frunze a provocat cea mai extinsă zonă de inhibiție a creșterii tulpinii de *Microsporum canis*. Astfel, în cazul tulpinii *Trichophyton mentagrophytes* ATCC®9533™ activitatea antifungică a extractului în etil acetat din frunze a fost semnificativ mai înaltă - cu 23,8% față de itraconazol și cu 30,5% față de ketoconazol. Extractul etanolic din frunze de nuc

posedă activitate antifungică semnificativ mai înaltă ca cea a ketoconazolului față de tulpina *Microsporum canis* ATCC®36299™. Față de celelalte tulpini studiate extractele din nuc nu au avut efecte comparabile cu cele ale preparatelor antifungice de referință.

În continuare au fost testate extractele hidro etanolice din cianofitele *Arthrospira platensis* și *Nostoc linckia*. Extractele hidro etanolice din biomasa de spirulină au manifestat activitate antifungică față de *Trichophyton*, *Microsporum* și *Candida* (figura 3). Cea mai semnificativă activitate antifungică a fost înregistrată pentru extractul hidro etanolic de 20%, care în cazul *Candida albicans* ATCC®10231™ este mai activ decât cea a preparatelor antifungice de referință incluse în studiu, iar în cazul tulpinii *Microsporum gypseum* ATCC®24102™ este la fel de activ ca ketoconazolul. Extractul hidro etanolic de 50% a manifestat activitate echivalentă cu cea a ketoconazolului față de tulpina de referință, *Trichophyton mentagrophytes* ATCC®9533™, iar extractul de 70% a demonstrat activitate antifungică egală cu cea a itraconazolului și clorhidratului de naftifină față *Candida albicans* ATCC®10231™.

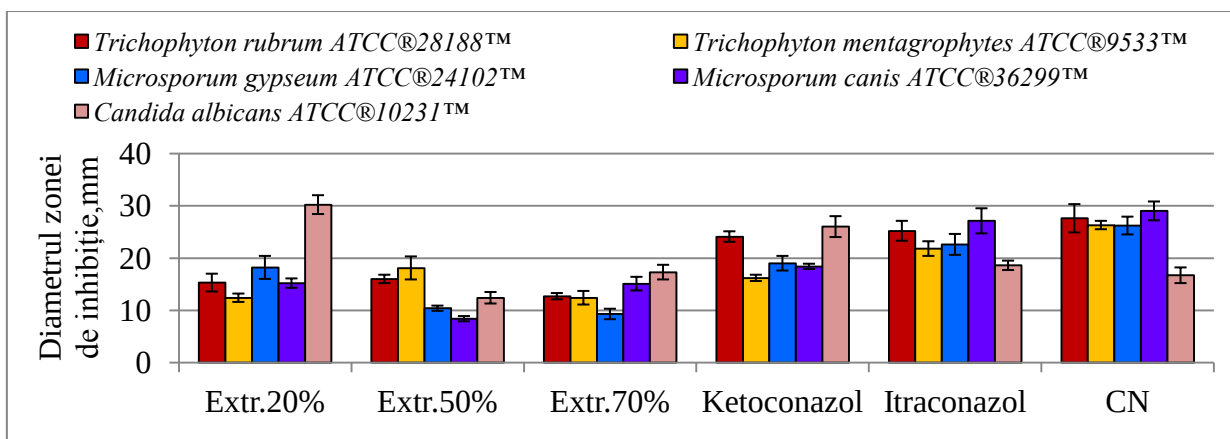


Fig. 3. Acțiunea antifungică a extractelor hidro etanolice din biomasa de *Arthrospira plantensis*

Extractele hidro etanolice din biomasa de *Nostoc linckia* CNM-CB-03 au demonstrat activitate biologică înaltă. Cea mai semnificativă activitate antifungică au avut-o extractele hidro etanolice de 20%, valorile obținute fiind semnificativ mai înalte față de cele obținute pentru ketoconazol la *M. canis* ATCC®36299™, *M. gypseum* ATCC®24102™ și *C. albicans* ATCC®10231™; față de itraconazol – la *M. gypseum* ATCC®24102™ și *C. albicans* ATCC®10231™; iar față de clorhidratul de naftifină – la *C. albicans* ATCC®10231™. Extractele hidro etanolice de 50% și 70% de asemenea posedă activitate antifungică, dar mai puțin pronunțată. În același timp, extractul hidro etanolic de 50% a avut activitate antifungică echivalentă cu cea a ketoconazolului față de tulpina *Trichophyton mentagrophytes* ATCC®9533™, iar cel de 70% - față de tulpina *Trichophyton rubrum* ATCC®28188™.

În continuarea cercetărilor au fost evaluate proprietățile antifungice ale unor extracte obținute din biomasa de spirulină îmbogățită cu metale (Zn, Fe, Cu, Cd, Co și Cr) față de fungii studiați. Dacă dintre fungii filamentoși oportunist patogeni doar o singură tulpină - *Aspergillus fumigatus* CNM-FA-02 - a manifestat sensibilitate față de extractele hidro etanolice din spirulină și nostoc, extractele etanolice din biomasa cu conținut de metale au arătat efect antifungic de diferită intensitate față de toți fungii studiați. Cele mai modeste efecte au fost înregistrare față de tulpina *Penicillium expansum* CNMN-FD-05 și izolatele naturale *Fusarium oxysporum* și *Fusarium solani*. În cazul tulpinii *Mucor vulgaris* CNMN-FD-07 4 din 6 extracte etanolice din biomasa cu conținut de metale au manifestat un efect antifungic mai pronunțat decât substanța de referință clorhidratul de naftifină (tabelul 1). Extractele hidrice au fost mai puțin active în calitate de produse cu activitate antifungică. S-au evidențiat cele cu conținut de cadmiu, cobalt și crom, care au avut efect antifungic asupra a câte 3-4 tulpini, în două cazuri efectul fiind veridic mai pronunțat față de efectul exoderilului.

Tabelul 1. Evaluarea acțiunii antifungice a extractelor etanolice și hidrice din biomasa de spirulină cu conținut de metale față de unele tulpini de fungi filamentoși

Extractul/ Substanța	Diametrul zonei de inhibiție, mm				
	<i>Aspergillus fumigatus</i> CNM-FA-02,	<i>Mucor vulgaris</i> CNMN-FD-07	<i>Penicillium expansum</i> CNMN-FD-05	<i>Fusarium oxysporum</i> FO1	<i>Fusarium solani</i> FS01
EE _{Zn}	11,66±0,58	14,23±1,12 <i>P</i> ₂ =0,019**	10,63±0,72	10,73±0,64	9,70±0,31
EE _{Fe}	0	10,27±0,67	10,37±0,57	11,70±0,79	11,40±0,62
EE _{Cu}	19,33±0,81 <i>P</i> ₁ =0,005*	0	10,20±0,91	11,67±0,60	10,03±0,35
EE _{Cd}	20,33±1,00 <i>P</i> ₁ =0,005	13,63±0,74 <i>P</i> ₂ =0,013	19,13±1,15	14,23±0,59	13,23±0,89
EE _{Co}	11,2±0,79	23,30±1,05 <i>P</i> ₂ =0,001	11,37±0,25	11,70±0,30	11,40±0,90
EE _{Cr}	15,87±0,83 <i>P</i> ₁ =0,008	18,43±0,61 <i>P</i> ₂ =0,003	16,70±0,55	12,67±1,52	10,83±0,56
EE	12,76±0,74	0	0	0	0
EH _{Zn}	0	0	0	0	0
EH _{Fe}	0	0	0	10,0±0,26	0
EH _{Cu}	0	0	0	0	0
EH _{Cd}	28,67±0,58	0	27,33±0,64	16,67±0,64	21,6±0,53
EH _{Co}	0	19,2±0,72 <i>P</i> ₂ =0,001	16,07±0,90	29,67±0,577 <i>P</i> ₂ =0,001	0
EH _{Cr}	15,1±0,17	0	21,33±0,58	24,67±0,57	0
EH	0	0	0	0	0
Clorhidrat de naftifină	34,5±1,08	11,63±0,35	34,67±0,31	24,17±0,76	31,10±0,85
Itraconazol	23,30±1,53	19,00±0,91	26,30±1,05	24,50±0,96	26,10±1,62
Ketoconazol	17,23±0,86	15,80±1,34	18,32±0,96	15,44±2,02	19,80±1,35

*P*₁* - veridicitatea deosebirilor dintre variantele EE_{Me} și varianta EE

*P*₂** - veridicitatea deosebirilor dintre variantele cu extracte și cea cu clorhidratul de naftifină.

Extracțele hidrice din biomasa de spirulină nu au manifestat activitate antifungică față de tulpinile de dermatofiți filamentoși, iar dintre extracțele etanolice s-au evidențiat cele obținute din biomasa cu conținut de cobalt, cadmiu și crom. Cele mai performante rezultate au fost obținute în cazul aplicării extractului etanolic din biomasa de spirulină cu conținut de cobalt. La trei dintre tulpinile testate: *Microsporium canis* ATCC®36299™, *Microsporium gypseum* ATCC®24102™ și *Trichophyton mentagrophytes* ATCC®9533™, diametrele zonelor de inhibiție obținute sub influența acestui extract au fost veridic mai extinse comparativ cu cele obținute sub influența ketoconazolului ($P < 0,001$) (figura 4).

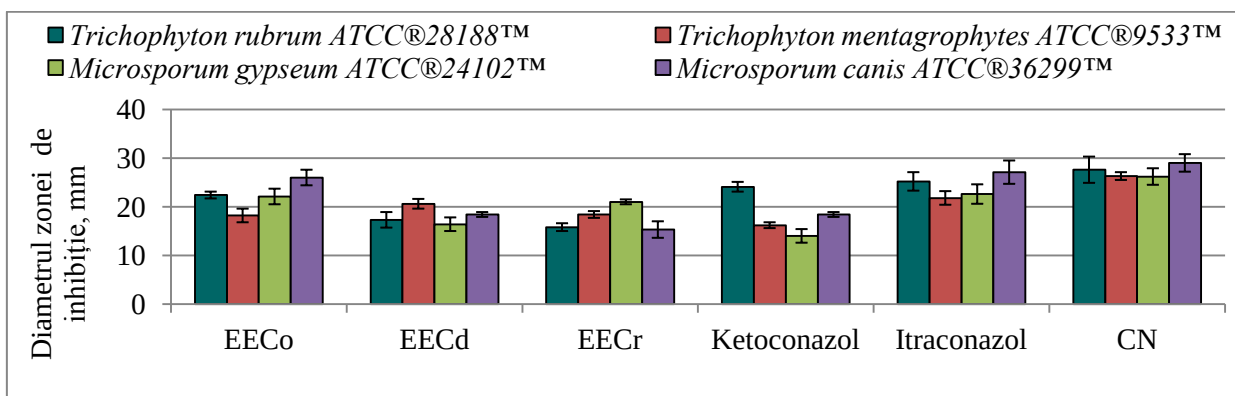


Fig. 4. Acțiunea antifungică a extractelor din biomasa de *Arthrospira platensis* cu conținut de metale.

În continuare pentru toate substanțele cu efect antifungic au fost determinate concentrațiile minimă de inhibiție și minimă fungicidă. Pentru fungii filamentoși dermatofiți și candida a fost aplicată metoda standardizată EUCAST (7.1 și 9.1), iar pentru fungii filamentoși oportuniști a fost aplicată metoda diluțiilor succesive. Tabelul 2 conține o selecție dintre cele mai bune rezultate obținute pentru substanțele testate în dependență de tulpina utilizată ca obiect.

Au fost depistate două substanțe cu activitate mai pronunțată ca cea a itraconazolului asupra tulpinii *Candida albicans* ATCC®10231™. În baza acestor rezultate a fost un brevet de invenție.

Extracțele etanolice din biomasa de spirulină cu conținut de cobalt și cadmiu au manifestat activitate antifungică înaltă față de tulpinile *Trichophyton mentagrophytes* ATCC®9533™, *Trichophyton rubrum* ATCC®28188™ și *Microsporium canis* ATCC®36299™. Față de tulpina *Microsporium gypseum* ATCC®24102™ a fost activ și extractul etanolic din biomasa cu conținut de crom. În cazul fungilor filamentoși *Aspergillus fumigatus* CNM-FA-02, *Mucor vulgaris* CNMN-FD-07, *Penicillium expansum* CNMN-FD-05 concentrații minime de inhibiție joase au fost obținute pentru extracțele hidrice și etanolice din biomasa de spirulină cu conținut de cadmiu și crom. Asupra ambelor izolate naturale din genul *Fusarium* au acționat de asemenea extracțele etanolice din biomasa de spirulină cu conținut de cadmiu și crom.

Tabelul 2. Concentrațiile minim inhibitoare (CMI) și minim fungicide (CMF) ale substanțelor selectate față de tulpinile studiate

Substanța	CMI	CMF	Substanța	CMI	CMF
<i>Candida albicans</i> ATCC®10231™			<i>Aspergillus fumigatus</i> CNM-FA-02		
BREV 1	0,7 µg/ml	0,7 µg/ml	EH _{Cd}	1 mg/ml	-
RGTM 83	0,58 µg/ml	1.17 µg/ml	EH _{Cr}	0,25 mg/ml	-
Intraconazol	0,78 µg/ml	6,25 µg/ml	CN*	1,0 µg/ml	-
<i>Trichophyton mentagrophytes</i> ATCC®9533™			<i>Mucor vulgaris</i> CNMN –FD-07		
EE _{Co}	0,125 mg/ml	1 mg/ml	EH _{Co}	0,125 mg/ml	-
EE _{Cd}	0,065 mg/ml	0,5 mg/ml	EE _{Cd}	0,125 mg/ml	1,0 mg/ml
Intraconazol	0,25 µg/ml	1,0 µg/ml	CN*	0,25µg/ml	-
<i>Trichophyton rubrum</i> ATCC®28188™			<i>Penicillium expansum</i> CNMN-FD-05		
EE _{Co}	0,125 mg/ml	1 mg/ml	EH _{Co}	0,125 mg/ml	-
EE _{Cd}	0,065 mg/ml	0,5 mg/ml	EE _{Cd}	0,125 mg/ml	1,0 mg/ml
Intraconazol	0,125 µg/ml	0,5 µg/ml	CN*	0,50 µg/ml	-
<i>Microsporum canis</i> ATCC®36299™			<i>Fusarium oxysporum</i>		
EE _{Co}	0,125 mg/ml	1 mg/ml	EE _{Cd}	0,25 mg/ml	1,0 mg/ml
EE _{Cd}	0,065 mg/ml	0,5 mg/ml	EE _{Cr}	0,25 mg/ml	0,5 mg/ml
Intraconazol	0.125 µg/ml	0,5 µg/ml	CN*	0,5 µg/ml	1,0 µg/ml
<i>Microsporum gypseum</i> ATCC®24102™			<i>Fusarium solani</i>		
EE _{Co}	0,125 mg/ml	1 mg/ml	EE _{Cd}	0,50 mg/ml	1,0 mg/ml
EE _{Cr}	0,065 mg/ml	0,5 mg/ml	EE _{Cr}	0,25 mg/ml	0,5 mg/ml
Intraconazol	0.065 µg/ml	0,5 µg/ml	CN*	0,5 µg/ml	1,0 µg/ml

CN* - clorhidrat de naftifină

4. MODIFICĂRILE BIOCHIMICE INDUSE DE REMEDIILE BIOLOGICE ȘI CHIMICE LA TULPINILE DE FUNGI

În scopul identificării mecanismelor de acțiune a substanțelor cu efect antifungic asupra celulelor - țintă au fost realizate mai multe teste biochimice, primul dintre care este testul de determinare a lactat dehidrogenazei (LDH) eliberate. Astfel, creșterea activității lactat dehidrogenazei în mediul extracelular este un indicator al acțiunii toxice asupra celulelor și a dereglării permeabilității și structurii membranare. Efectul remediilor testate a fost comparat cu cel al preparatelor antifungice de referință. Figura 5 conține rezultatele obținute la tratarea culturii de *Candida albicans* ATCC®10231™ cu concentrații ce corespund CMI ale substanțelor evidențiate. Cu excepția extractelor hidro etanolice din biomasa cianobacteriilor, celelalte remedii au provocat o creștere a activității LDH de 2,03-2,58 ori față de martor.

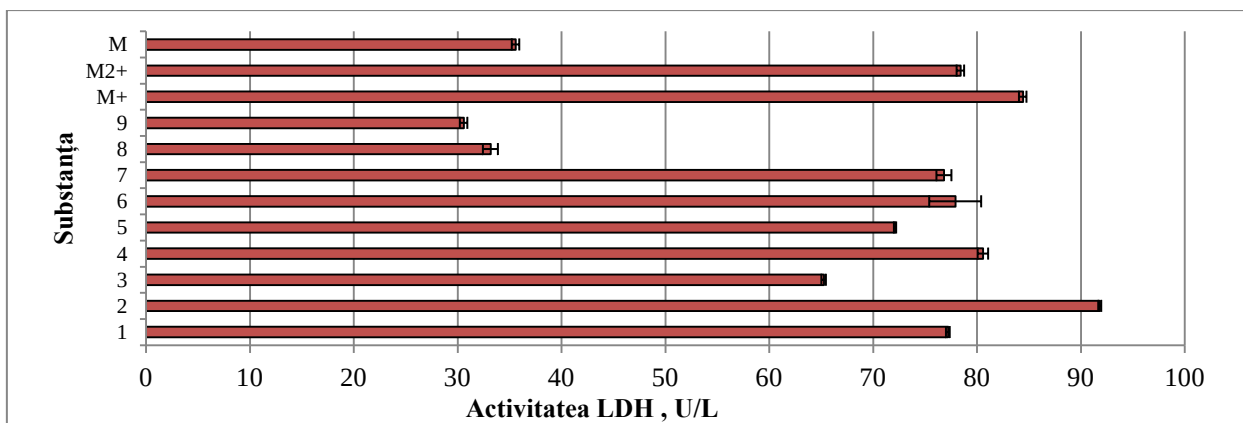


Fig. 5. Activitatea lactat dehidrogenazei eliberate la *Candida albicans* ATCC 10231 sub acțiunea substanțelor cu efect antifungic: 1. Extract frunze *J. regia* (etil-acetat); 2. BREV 1; 3. RGTM 55; 4. RGTM 56; 5. RGTM 57; 6. RGTM 64; 7. RGTM 83; 8. Extract hidro etanolic 20% *A.platensis*; 9. Extract hidro etanolic 20% *N.linckia*; M₊₁ - Itraconazol; M₊₂ - Ketaconazol

În cazul tulpinilor de dermatofiți *Trichophyton mentagrophytes* ATCC®9533™, *Trichophyton rubrum* ATCC®28188™, *Microsporum canis* ATCC®36299™ și *Microsporum gypseum* ATCC®24102™, precum și a fungilor oportunist patogeni *Aspergillus fumigatus* CNM-FA-02; *Penicillium expansum* CNMN-FD-05; *Mucor vulgaris* CNMN-FD-07, *Fusarium oxysporum* FO1 și *Fusarium solani* FS01 rezultatele sunt asemănătoare: substanțele cu efect antifungic provoacă eliberarea LGH din celule. Ca și în cazul candidiei, extractele hidro etanolice din spirulină și nostoc nu măresc esențial activitatea LDH eliberate. Figura 6 conține rezultatele obținute pentru cultura de *Microsporum canis* ATCC®36299™.

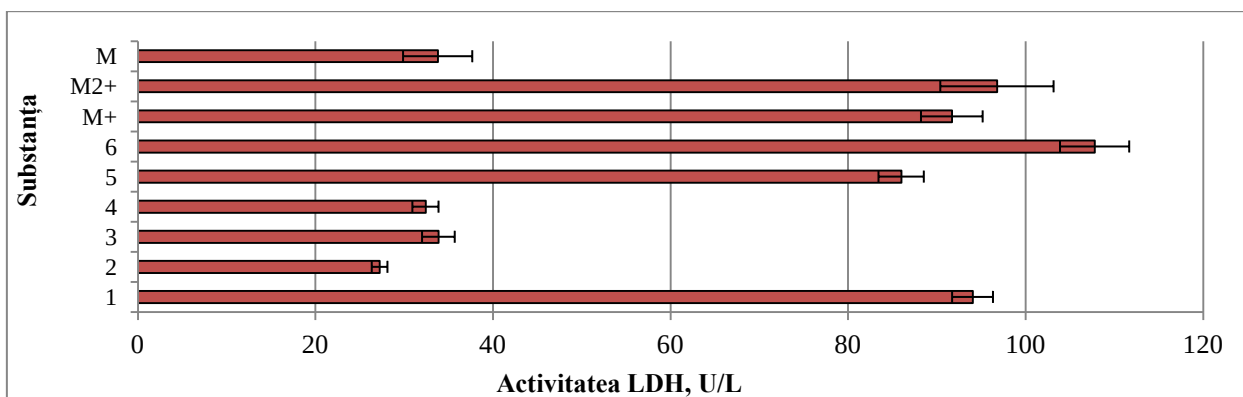


Fig. 6. Activitatea lactat dehidrogenazei eliberate la *Microsporum canis* ATCC®36299™ sub acțiunea substanțelor selectate. 1. Extract frunze *J. regia* (etanol); 2. Extract hidro etanolic 70% *S. platensis*; 3 Extract hidro etanolic 20% *N. linckia*; 4. Extract hidro etanolic 70% *N. linckia*; 5. EE Co; 6. EE Cd; M₊₁ - Itraconazol; M₊₂ - Clorhidrat de naftifină ; M – Martor netratat

Compromiterea integrității învelișurilor celulare a fost confirmată și prin examenul microscopic (figura 7). Cea mai des întâlnită modificare constă în fragmentarea miceliului. În figura 7 sunt prezentate imaginile tipice pentru cultura netratată și alături – imaginile tipice ale culturii după contactul cu remediile antifungice selectate pe durata a 24 ore.

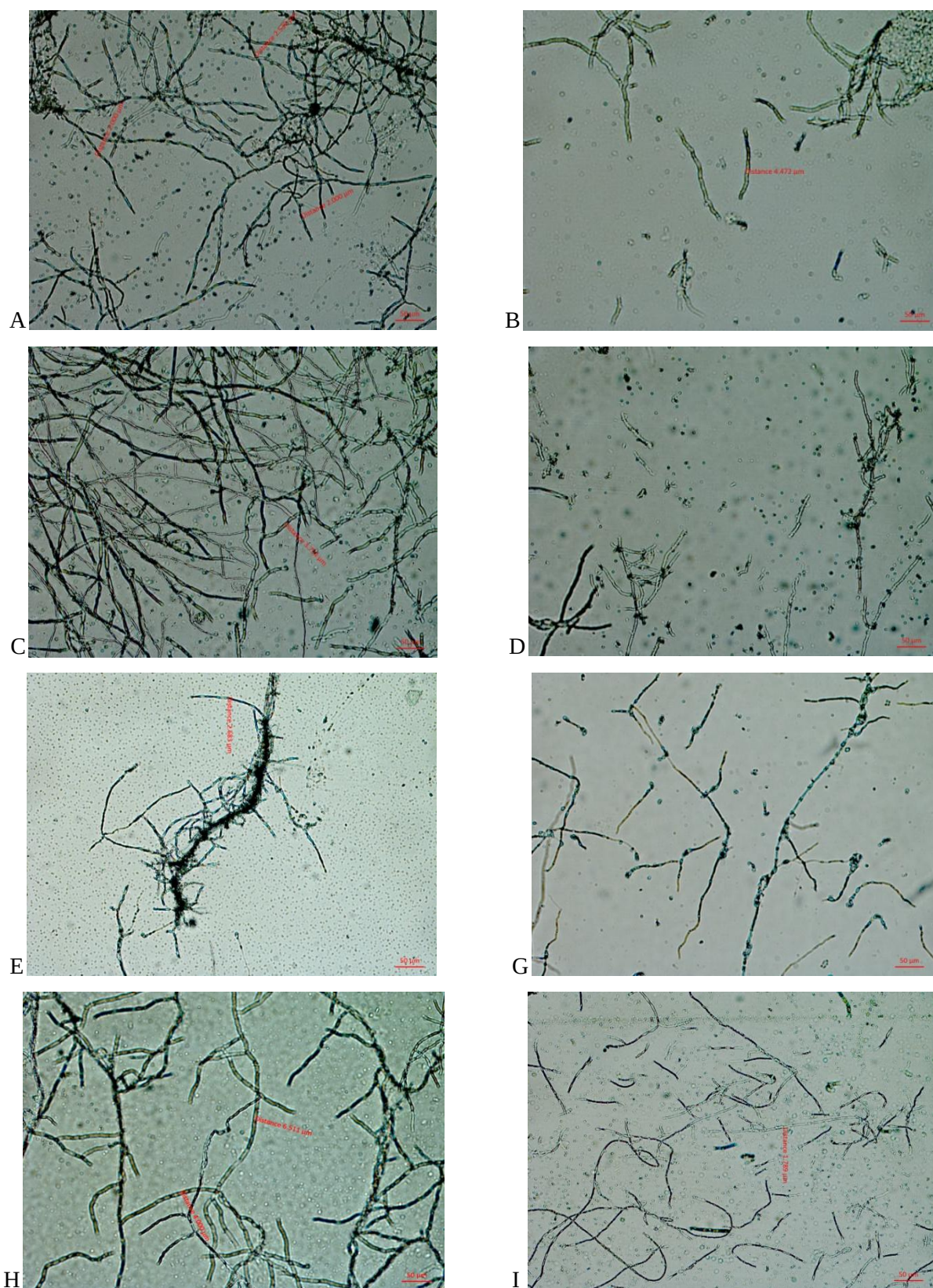


Fig. 7. Modificări morfologice ale miceliului fungilor oportunist patogeni, provocate de acțiunea remediilor cu efect antifungic. *Aspergillus fumigatus* CNM-FA-02: A - Martor; B – Tratat cu EE_{Cd} , *Mucor vulgaris* CNMN-FD-07: C - Martor, D – Tratat cu EE_{Cd} , *Fusarium oxysporum* FO1: E - Martor; G – Tratat cu EE_{Cd} ; *Penicillium expansum* CNMN-FD-05: H – Martor; I – Tratat cu EH_{Cd} (Autori foto Lebedenco L., Oltu Iu.);

Statutul antioxidant al culturilor de fungi patogeni și oportunist patogeni a fost apreciat în baza a 2 parametri - capacitatea de reducere a radicalilor liberi și cantitatea produselor finale ale peroxidării lipidelor. Figura 8 reflectă modificarea cantității de dialdehidei malonice (DAM) și a capacității antioxidante totale în cultura de *Candida albicans* ATCC®10231™ sub influența remediilor antifungice testate. Cantitatea de DAM în proba martor a constituit $5,26 \pm 0,38$ nM/g, iar capacitatea antioxidantă a constituit $36,57 \pm 0,86$ % inhibiție ABTS⁺. În biomasa de candida, tratată cu dozele ce corespund CMI ale remediilor antifungice selectate, DAM a crescut comparativ cu martorul netratat cu 21,96-103,59%, iar capacitatea de reducere a ABTS⁺ a scăzut substanțial - cu 14,64-44,3%.

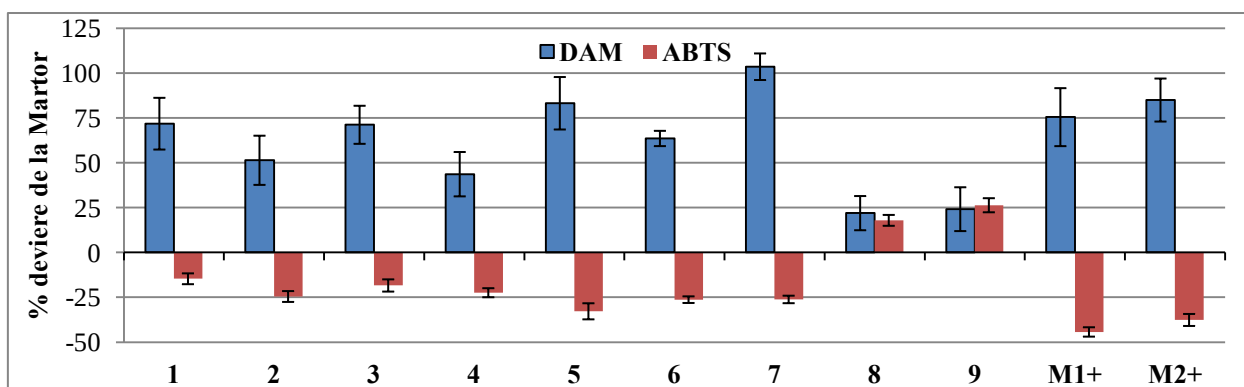


Fig. 8. Activitatea antioxidantă totală (test reducere ABTS⁺) și cantitatea dialdehidei malonice la *Candida albicans* ATCC®10231™ sub influența substanțelor selectate. 1. Extract frunze *J. regia* (etil-acetat); 2. Brev 1; 3. RGTM 55; 4. RGTM 56; 5. RGTM 57; 6. RGTM 64; 7. RGTM 83; 8. Extract hidro etanolic 20% *S.platensis*; 9. Extract hidro etanolic 20% *N.linckia*; M₁₊ Itraconazol; M₂₊ Ketoconazol

O situație similară a fost observată și în cazul fungilor miceliali dermatofiți și oportunist patogeni. Atât martorii pozitivi utilizați, cât și substanțele selectate au provocat micșorarea capacității antiradicalice și supraacumularea produselor peroxidării lipidice. În figura 9 drept exemplu sunt prezentate rezultatele obținute pentru cultura *Trichophyton mentagrophytes* ATCC®9533™ la acțiunea remediilor antifungice. Cantitatea de dialdehidă malonică în martor a fost de $2,50 \pm 0,12$ nM/g, iar capacitatea antioxidantă totală a fost de $35,05 \pm$ % inhibiție ABTS⁺. Cel mai pronunțat efect de intensificare a peroxidării lipidice l-a avut itraconazolul (creșterea DAM cu 115,6% față de martorul netratat). Efecte valorice apropiate au manifestat clorhidratul de naftifină și extractul în etil acetat din frunzele de nuc, care au produs o creștere DAM cu 62,6 și 65,3% respectiv. Extractele etanolice din biomasa de spirulină cu conținut de cadmiu, cobalt și crom au produs o creștere a cantității DAM cu 25,9-45,2% față de martorul netratat. Extractele hidro etanolice din biomasa de spirulina și nostoc nu au produs modificarea cantității DAM. La fel, aceste extracte nu au modificat veridic nici capacitatea antioxidantă totală a biomasei de

Trichophyton mentagrophytes ATCC®9533™. Ambii martori pozitivi și extractul etanolic din biomasa de spirulină cu conținut de crom au avut efecte asemănătoare asupra capacității antioxidante totale a biomasei, reducând-o cu 64,2-66,7% față de martorul pozitiv.

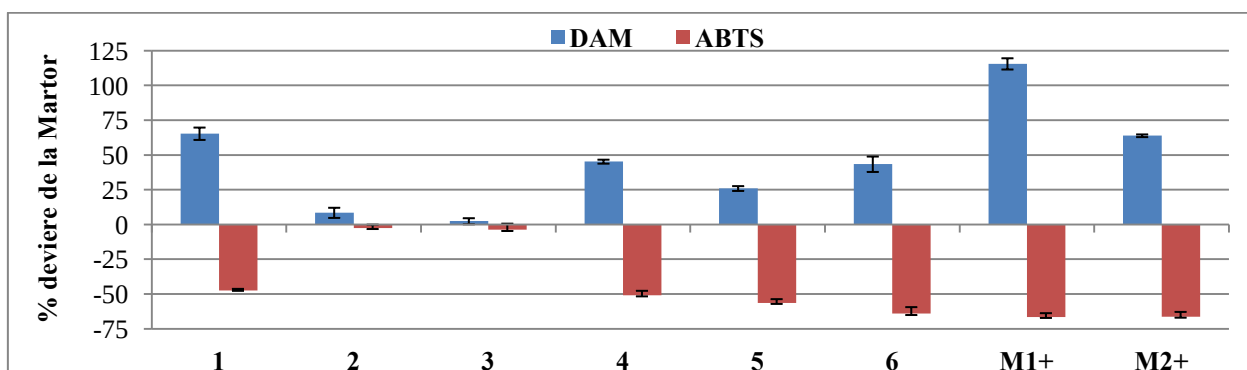


Fig. 9. Activitatea antioxidantă (test reducere ABTS^{•+}) și cantitatea dialhidei malonice la *Trichophyton mentagrophytes* ATCC®9533™ sub influența substanțelor selectate. 1. Extract frunze *J. regia* (etil acetat); 2. Extract hidro etanolic 50% *S. platensis*; 3. Extract hidro etanolic 20% *N. linckia*; 4. EE_{Co}; 5. EE_{Cd}; 6. EE_{Cr}; M1+ - Itraconazol; M2+ - Clorhidrat de naftifină.

Rezultate destul de uniforme au fost obținute și în cazul culturii *Mucor vulgaris* CNMN-FD-07 (figura 10). În biomasa martorului cantitatea de dialdehydă malonică a fost de 3,95±0,23 nM/g, iar capacitatea antioxidantă totală a constituit 24,62±1,16% inhibiție ABTS^{•+}. Martorul pozitiv a provocat o creștere a cantității DAM cu 82,66%, iar acțiunea extractelor din biomasa de spirulină cu conținut de metale a provocat creșterea acestui parametru cu 76,92 – 99,52% față de martor. În cazul extractelor hidric din biomasa cu conținut de cadmiu și etanolic din biomasa cu conținut de fier cantitatea de DAM în biomasa de *Mucor vulgaris* a fost veridic mai înaltă decât în cazul martorului pozitiv (P<0,01). Capacitatea antioxidantă totală a biomasei a scăzut mai puțin decât la celelalte tulpini examinate – cu 21,87 – 29,62% față de nivelul martorului netratat. Aceste valori nu se deosebesc statistic semnificativ între ele.

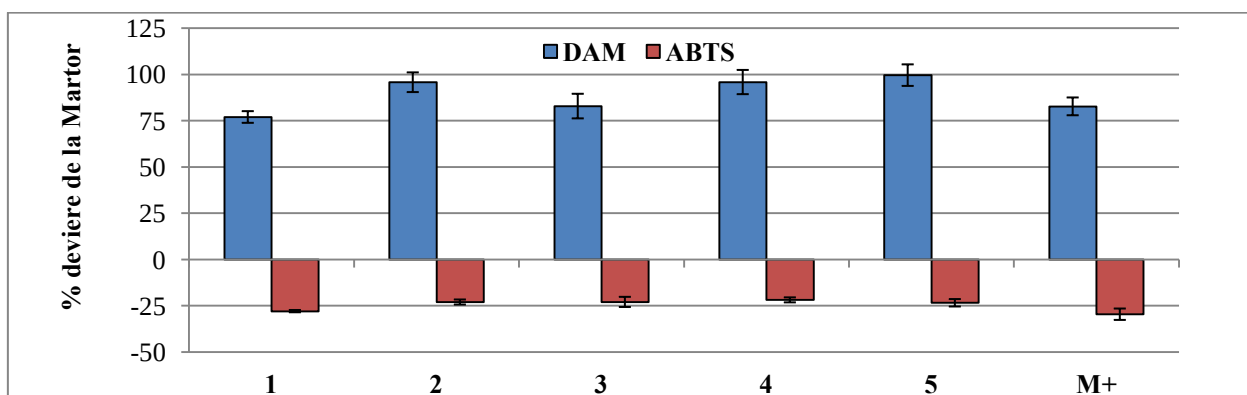


Fig. 10. Activitatea antioxidantă totală (test reducere ABTS^{•+}) și cantitatea dialhidei malonice la *Mucor vulgaris* CNMN-FD-07 sub influența substanțelor selectate. 1. EH_{Co}; 2. EE_{Cd}; 3. EE_{Cr}; 4. EE_{Zn}; 5. EE_{Fe}, M+ - clorhidrat de naftifină

Analizând efectul remediilor antifungice de origine chimică și biologică asupra fungilor dermatofiți și cei oportunist patogeni putem menționa, că cu excepția extractelor hidro etanolice din biomasa de spirulină și nostoc, remediile studiate au provocat intensificarea semnificativă a procesului de peroxidare a lipidelor, exprimată prin creșterea cantității de dialdehidă malonică în biomasa patogenilor. La fel, cu excepția extractelor menționate, toate celelalte remedii testate au provocat o scădere substanțială a capacității antioxidante. Aceste efecte duc la diminuarea capacității vitale a culturilor de fungi studiați, ceea ce explică într-o anumită măsură efectul antifungic al remediilor de origine chimică și biologică testate.

Unul dintre factorii de protecție a fungilor față de mecanismele de apărare ale gazdei sunt enzimele antioxidante – în special cele primare – superoxiddismutaza (SOD), catalaza (CT) și peroxidazele. Acestea înlătură speciile reactive ale oxigenului generate de celulele gazdei și asigură răspândirea infecției. Scăderea activității acestor enzime duce la micșorarea viabilității patogenilor. De aceea, în continuare a fost studiată modificarea activității SOD, CT și glutathionperoxidazei (GPx) intracelulare la fungii testați sub influența substanțelor cu efect antifungic. Culturile de fungi în faza creșterii exponențiale au fost puse în contact pe termen de 24 ore cu substanțele selectate în concentrațiile corespunzătoare CMI. Rezultatele obținute au demonstrat, că practic în toate variantele experimentale au fost înregistrate abateri substanțiale de la valorile normale în activitatea enzimelor antioxidante primare.

În figura 11 drept exemplu sunt reflectate rezultatele care confirmă modificarea activității enzimelor antioxidante sub influența remediilor de origine chimică și biologică, care posedă acțiune antifungică față de tulpina *Candida albicans* ATCC®10231™.

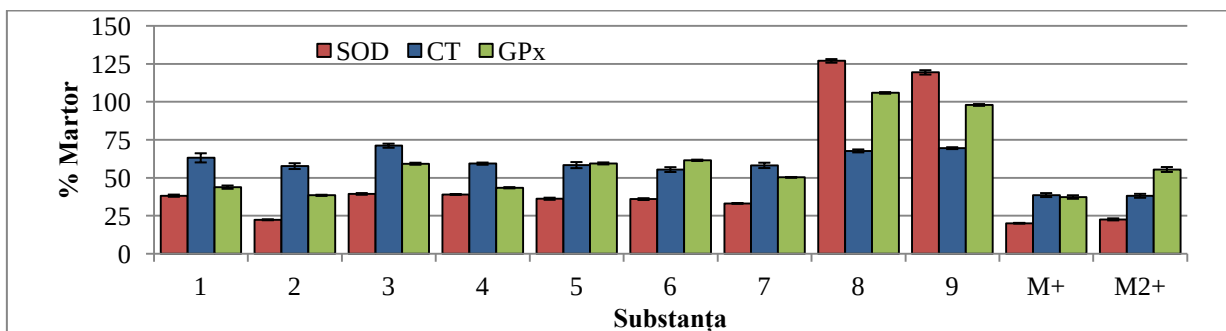


Fig. 11. Activitatea enzimelor antioxidante la *Candida albicans* ATCC®10231™ sub influența substanțelor studiate. 1. Extract frunze *J. regia* (etil acetat); 2. BREV 1; 3. RGTM 55; 4. RGTM 56; 5. RGTM 57; 6. RGTM 64; 7. RGTM 83; 8. Extract hidro etanolic 20% *S.platensis*; 9. Extract hidro etanolic 20% *N.linckia*; M₊ - Itraconazol; M₂₊ - Ketoconazol

Valoarea absolută a activității SOD la matorul culturii *Candida albicans* ATCC®10231™ a constituit 210,5±1,13 U/ml, a CT - 8,02±0,11 U/L, iar a GPx - 2317±101 U/L. Extractele hidro etanolice din biomasa de spirulină și nostoc au provocat o creștere a activității SOD cu 26,9 și

19,4% respectiv față de martorul netratat. În toate celelalte cazuri are loc o diminuare foarte puternică a activității acestei enzime cu 20,1% - 38,20% din nivelul specific martorului netratat. Activitatea CT în variantele experimentale a fost mai înaltă decât în cazul itraconazolului și ketoconazolului, dar semnificativ mai joasă ($P < 0,001$ în toate variantele) decât în martorul netratat, având valori de până la 55,38 – 71,11% din valoarea respectivă la martor. Activitatea GPx a constituit între 37,32 și 59,14% din valoarea înregistrată în martorul netratat. Cel mai jos nivel al activității GPx a fost în biomasa tratată cu itraconazol (37,32% M). Extractele hidro etanolice din spirulina și nostoc au provocat reducerea activității doar la catalază, în timp ce alte remedii testate au provocat diminuări esențiale în activitatea tuturor celor 3 enzime antioxidante primare la *Candida albicans* ATCC®10231™. La această tulpină cel mai puternic a fost afectată activitatea SOD.

În cazul fungilor miceliali dermatofiți rezultatele sunt asemănătoare: substanțele cu efect antifungic provoacă scăderea activității enzimelor antioxidante de prima linie, iarăși, cu excepția extractelor hidro etanolice din biomasa standard de cianobacterii, care provoacă scăderea activității doar la CT, și creșterea activității SOD. În Figura 12 drept exemplu sunt prezentate rezultatele pentru tulpina *Trichophyton mentagrophytes* ATCC®9533™.

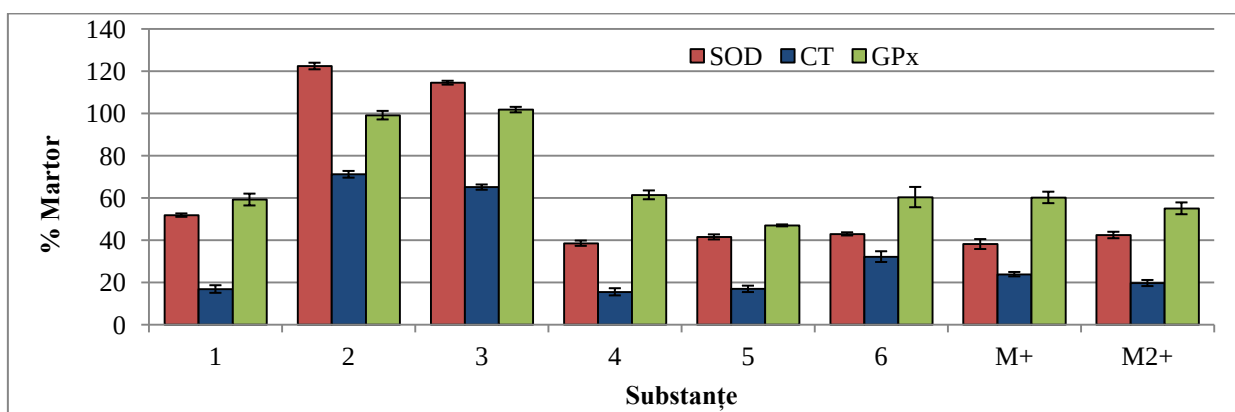


Fig. 12. Activitatea enzimelor antioxidante la *Trichophyton mentagrophytes* ATCC®9533™ sub influența substanțelor studiate. 1. Extract frunze *J. regia* (etil acetat); 2. Extract hidro etanolic 50% *S. platensis*; 3. Extract hidro etanolic 20% *N. linckia*; 4. EE Co; 5. EE Cd; 6. EE Cr; M+ - Itraconazol; M2+ - Clorhidrat de naftifină.

Asupra fungilor filamentoși oportunist patogeni efectul antifungic a fost realizat de către extractele din biomasa de spirulină cu conținut de metale. În toate cazurile examinate a fost înregistrată scăderea activității enzimelor antioxidante primare. În figura 13 sunt prezentate rezultatele obținute pentru cultura *Aspergillus fumigatus* CNM-FA-02. Valorile absolute ale activității enzimelor antioxidante în biomasa netratată de *Aspergillus fumigatus* CNM-FA-02 au fost următoarele: SOD – $89,19 \pm 2,1$ U/ml; CT – $8,13 \pm 0,14$ U/L; GPx - $2823 \pm 9,8$ U/L. Sub

acțiunea clorhidratului de naftifină și a extractelor hidrice și etanolice din biomasa de spirulină cu conținut de cadmiu și crom aceste valori au scăzut cu până la 60%.

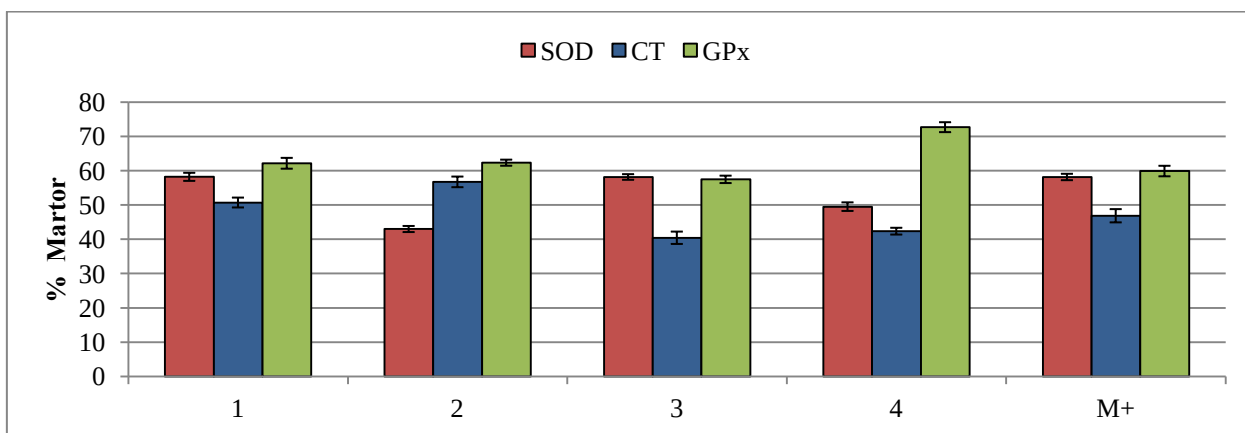


Fig. 13. Activitatea enzimelor antioxidante la *Aspergillus fumigatus* CNM-FA-02 sub influența substanțelor studiate. 1. EH_{Cd}; 2. EH_{Cr}; 3. EE_{Cd}; 4. EE_{Cr}; M+ - Clorhidrat de naftifină

Astfel, pentru extractele din frunze și pericarp de nuci, extractele din biomasa de spirulină cu conținut de metale și compuși chimici noi a fost demonstrat efectul de diminuare semnificativă a activității enzimelor antioxidante. Extractele hidro etanolice din biomasa de spirulină și nostoc de regulă, nu modifică substanțial activitatea GPx, scad activitatea CT și o măresc pe cea a SOD, fapt ce se explică în primul rând, prin lipsa potențialului toxic la aceste culturi. În același timp extractele date, s-au manifestat în calitate de agenți antifungici asupra candidiei și dermatofitelor studiate. În calitate de elemente active ale extractelor hidrice sunt considerate ficobiliproteinele cianobacteriene. Aceste substanțe, în special ficocianina și ficoeritrina sunt prezente în extractele hidro etanolice de nostoc, iar în extractele din spirulină sunt prezente ficocianina și aloficocianina. Unele dintre componentele active ale extractelor etanolice din cianobacterii sunt fenolii, care sunt prezenți și în extractele hidro etanolice de 50 și 70% utilizate în această lucrare. Astfel, este cert, că extractele din biomasa standard de spirulină și nostoc, datorită siguranței pentru consumul uman, dar și datorită efectelor specifice față de unii agenți cauzali ai micozelor merită a fi obiectul unor studii separate.

Rezultatele obținute sugerează, că unul dintre mecanismele care asigură acțiunea antifungică a remediilor de origine chimică și biologică examinate constă în reducerea activității enzimelor antioxidante primare, care de fapt sunt considerate factori de patogenitate ai fungilor patogeni și oportunist patogeni. În culturile studiate sub influența substanțelor de origine chimică și biologică a fost înregistrată scăderea esențială a activității catalazei, superoxiddismutazei și glutatation peroxidazei, astfel celulele fungice rămân vulnerabile în fața factorilor de protecție eliminați de celulele gazdei.

CONCLUZII GENERALE ȘI RECOMANDĂRI

1. Compușii coordinativi noi care conțin în structura lor segmentul tiosemicarbazonic posedă acțiune antifungică față de fungii bimorfi *Candida albicans*, tulpina ATCC®10231™. CMI a acestor compuși a fost cuprinsă între 0,58 și 2,34 μg/ml, iar CMF – 0,7-4,69 μg/ml [4].
2. Extractele în etil acetat din frunzele de nuc în concentrațiile de 0,1-0,4 mg/ml și cele hidroetanolicе din biomasa de spirulină și nostoc în concentrația de 5-10 mg/ml au efect antifungic asupra a 5 tulpini - *Candida albicans* ATCC®10231™, *Trichophyton mentagrophytes* ATCC®9533™, *Trichophyton rubrum* ATCC®28188™, *Microsporum canis* ATCC®36299™ și *Microsporum gypseum* ATCC®24102™ [19 - 21].
3. Extractele hidrice și etanolice din biomasa de spirulină, obținută în condiții biotehnologice de acumulare a metalelor au manifestat acțiune antifungică față de toate tulpinile testate de fungi patogeni și oportunist patogeni, cele mai active fiind extractele din biomasa cu conținut de cobalt, cadmiu și crom [22].
4. Compușii chimici noi, extractele din țesuturile de nuc și cele din biomasa de spirulină cu conținut de metale provoacă creșterea activității lactat dehidrogenazei eliberate, scăderea capacității antioxidante totale, scăderea activității enzimelor antioxidante primare și creșterea nivelului produselor finale ale peroxidării lipidelor la agenții cauzali ai micozelor [22].
5. Unul dintre mecanismele posibile de acțiune a remediilor testate este bazat pe generarea stresului oxidativ, care se soldează cu degradarea intensă a componentelor celulare, în primul rând a membranelor. Ca urmare este compromisă permeabilitatea normală și integritatea fizică a învelișurilor celulare ale fungilor [22].
6. Reducerea activității enzimelor antioxidante primare, care sunt considerate factori de patogenitate, și a capacității antioxidante totale la agenții cauzali ai micozelor sub influența remediilor studiate, duce la incapacitatea fungilor de a se proteja de consecințele stresului oxidativ și la diminuarea viabilității acestora.

Problema științifică importantă soluționată în lucrare constă în *elucidarea* activității antifungice *in vitro* a remediilor de natură biologică și chimică asupra unor agenți cauzali ai micozelor, ceea ce *a dus la* evidențierea efectelor produse asupra patogenilor, fapt ce *a permis* stabilirea mecanismelor de acțiune a lor.

Aportul personal. Rezultatele obținute, analiza și interpretarea lor, generalizările și concluziile aparțin autorului.

Recomandări practice

1. Se recomandă compusul metil-N'-[(2-hidroxinaftalen-1-il)metiliden]-N-prop-2-en-1-ilhidrazonotioatului în calitate de substanță cu activitate antifungică față de *Candida albicans*.
2. Se recomandă extractele din frunze de nuc în calitate de remedii cu activitate antifungică față de fungii miceliali dermatofiți.
3. Se recomandă biomasa de *Arthrospira platensis* obținută în condiții biotehnologice de acumulare a metalelor în calitate de materie primă pentru obținerea remediilor cu o potențială activitate antifungică. .

Sugestii privind cercetări de perspectivă

1. Este necesar de a iniția testările preclinice ale remediilor chimice și biologice noi selectate în calitate de compuși cu acțiune antifungică *in vivo*.
2. Sunt necesare cercetări orientate spre evidențierea mecanismelor de acțiune a extractelor hidro etanolice din biomasa de *Arthrospira platensis* și *Nostoc linckia* asupra agenților cauzali ai micozelor.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. Arokiyaraj S., et al. Rapid green synthesis of silver nanoparticles from *Chrysanthemum indicum* L and its antibacterial and cytotoxic effects: an in vitro study. În: Int J Nanomedicine. 2014; v. 9(1), p. 379–388.
2. Battah MG, Ibrahim HAH, El-Naggar MM, Abdel Gawad FK, Amer MS. Antifungal Agent from *Spirulina maxima*: Extraction and Characterization. În: Glob J Pharmacol. 2014, v. 8(2), p. 228–36.
3. Bețiu M., Muset Gh., **Oltu Iu.**, Calistru V., Fiodorova N., Savin A., Rubanovici D., Emeț Iu., Grib E. Particularitățile epidemiologice ale polimicozelor în Republica Moldova. În: Materialele Congresului al V-lea Național de dermatologie cu participare internațională. Curierul medical, 2016, v.59, n 3., p. 10.
4. Brevet de invenție 4452 B1, MD. Utilizarea n-(2,4-dimetilfenil)-2-(2-hidroxibenziliden)-hidrazincarbonatamidei în calitate de inhibitor al proliferării fungilor din genul *Candida*. / **Oltu Iulian**, Guțu Tatiana, Gulea Aurelian, Țapcov Victor (MD). Cererea depusa la 29.02.2016:
5. Brown G.D. et. al. Hidden killers: Human fungal infections. În: Sci Transl Med, 2012, v. 4, 165rv113.

6. Caggiano G. Fungal infection in patients of paediatric age. În: Contemporary pediatrics (ed. Oner Ozdemir), Tech, 2012, p. 385-402.
7. Cowen L.E. et al. Mechanisms of antifungal drug resistance. În: Cold Spring Harb Perspect Med, published online November 10, 2014, doi: 10.1101/cshperspect.a019752.
8. El-Baz F.K., et al. *In vitro* antiviral and antimicrobial activities of *Spirulina platensis* extract. În: J Appl Pharm Sci. 2013, v. 3(12), p.52–56.
9. Ghannoum M., Rice L. Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. În: Clinical Microbiology Reviews, 1999, 12(4), p. 501–517.
10. Gulea A.P. et al. Coordination Compounds of Copper with 2-Formylpyridine 4-(Dimethylphenyl) thiosemicarbazones. În: Журнал Общей Химии 2012, v. 82 , p. 1880–1884.
11. Harrison B.D. et al. A tetraploid intermediate precedes aneuploid formation in yeasts exposed to fluconazole. În: PLoS Biol , 2014, v. 12, p. e1001815.
12. Havlickova B., Czaika V. A., Friedrich M. Epidemiological trends in skin mycoses worldwide. În: Mycoses, 2008, v. 51 (Suppl. 4), p. 2–15.
13. Lehrnbecher T. al. Trends in the postmortem epidemiology of invasive infections at a university hospital. În: J. Infect., 2010, 61(3), p. 259-265
14. Lozan-Tîrșu C. Efectul antimicrobian al compușilor coordinativi ai cuprului, zincului, cobaltului și nichelului cu n-piridin-2-iltiosemicarbazonă 2 piridincarboxi-aldehydei și derivații ei. În: Curierul medical 2012, v. 3 (327), p. 308-310
15. Marușteri Ș.M. Noțiuni fundamentale de biostatistică: note de curs. Târgu Mureș: University Press. 2006, 220 p.
16. Myers, R. S. Antifungal agents. În: Immunizing and Antimicrobial Agents. Washington, MEDCH-401,2006; http://courses.washington.edu/medch401/pdf_text/401_06_VI_Antifungal.pdf (accessed 2.09.2015).
17. Odds F., Brown F., Gow N. Antifungal agents: mechanisms of action. În: Trends Microbiol. 2003, 11(6), p. 272-279.
18. **Oltu Iu.** Abordări contemporane în sensibilitatea și rezistența antifungică. În:Buletitul Academiei de Științe a Moldovei. Științele vieții. 2015, v. 3(327), p. 163-170.
19. **Oltu Iu.** Activitatea antioxidantă și antifungică a extractelor din cianobacterii. În:Tendințe contemporane ale dezvoltării științei: viziuni ale tinerilor cercetători, Materialele Conferinței Științifice (cu participare internațională) a Doctoranzilor, ediția a V-a, 25 mai 2016, Chișinău, v. II, p. 212-217.

20. **Oltu Iu.** Antifungal activity of *Juglans regia* (L) extracts against *Candida albicans*. În: Live sciences in the dialogue of generation: "Connections between Universities, Academia and Business community". The International Conference dedicated to the 70-th anniversary of foundation of first research institutes of ASM. Abstract book, Chişinău, Moldova, march 25, 2016, p. 91.
21. **Oltu Iu.** Antifungal extracts from *Spirulina* biomass. În: International Scientific Conference on Microbial Biotechnology, 3-rd edition, October 12-13, 2016, Chişinău, Moldova, p. 78.
22. **Oltu Iu., Rudic V.** Antifungal activity of extracts from *Arthrospira platensis* against some pathogens, causing invasive mycoses. În: Curierul medical, 2016, v. 59, nr 6, p.
23. Pugazhendhi A., Rathinam M., Sheela J. Antifungal Activity of Cell Extract of *Spirulina platensis* against Aflatoxin Producing *Aspergillus* Species. În: Int J Curr Microbiol App Sci. 2015, v. 4(8), p.1025–1029
24. Vengurlekar S., Sharna R., Trivedi P. Efficacy of some natural compounds as antifungal agents. În: Pharmacogn Rev. 2012, v. 6(12), p.91–99.

Publicațiile autorului la tema tezei:

2. Articole în diferite reviste științifice

2.3. în reviste din Registrul Național al revistelor de profil

Categoria B

1. **Oltu Iu.** Abordări contemporane în sensibilitatea și rezistența antifungică. În: Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științele vieții. 2015, v.3(327), p. 163-170.
2. **Oltu Iu., Rudic V.** Antifungal activity of extracts from *Arthrospira platensis* against some pathogens, causing invasive mycoses. În: Curierul medical, 2016, v. 59, nr.6, p.

3. Articole în culegeri științifice

3.1. culegeri de lucrări ale conferințelor naționale

1. **Oltu Iu.** Activitatea antioxidantă și antifungică a extractelor din cianobacterii. În: Tendințe contemporane ale dezvoltării științei: viziuni ale tinerilor cercetători, Materialele Conferinței Științifice (cu participare internațională) a Doctoranzilor, ediția a V-a, 25 mai 2016, Chişinău, vol.II, p. 212-217.

4. Materiale / teze la forurile științifice

4.2. conferințe internaționale în republică

1. **Oltu Iu.** Antifungal extracts from Spirulina biomass. În: International Scientific Conference on Microbial Biotechnology, 3-rd edition, Chișinău, Moldova, october 12-13, 2016, p.78.
2. **Oltu Iu.** Antifungal activity of Juglans regia (L) extracts against Candida albicans. În: Live sciences in the dialogue of generation: "Connections between Universities, Academia and Business community". The International Conference dedicated to the 70-th anniversary offoundation of first research institutes of ASM. Abstract book, Chișinău, Moldova, march 25, 2016, p. 91.

4.3. conferințe cu participare internațională

1. Bețiu M., Muset Gh., **Oltu Iu.**, Calistru V., Fiodorova N., Savin A., Rubanovici D., Emeț Iu., Grib E. Particularitățile epidemiologice ale polimicozelor în Republica Moldova. În: Materialele Congresului V Național de dermatologie cu participare internațională. Curierul medical, 2016, vol.59, Nr.3., p. 10.

7. Brevete de invenții, patente, certificate de înregistrare, materiale la saloanele de invenții

1. Brevet de invenție 4452 B1, MD. Utilizarea n-(2,4-dimetilfenil)-2-(2-hidroxibenziliden)-hidrazincarbotoamidae în calitate de inhibitor al proliferării fungilor din genul *Candida*. / **Oltu Iulian**, Guțu Tatiana, Gulea Aurelian, Țapcov Victor (MD). Cererea depusa la 29.02.2016:
2. Gulea A.; Lozan-Tirshu, C.; **Oltu Iu.**; Zariciuc E.; Tapcov V.; Gudumac V. New antifungal inhibitors. 40th international invention show, 11th invention and prototype show and student business plan competition Inova-Budi Uzor 2015, Karlovac, Croatia, 5-7 November, 2015, Katalog p. 131-132
3. Gulea, A.; **Oltu Iu.**; Graur, V.; Zariciuc E.; Tapcov V.; Gudumac V. New antifungal inhibitor. Brussels INNOVA . Brussel, Belgium, 19-21 november 2015 . List of the inventions. p. 23
4. Gulea A., **Oltu Iu.** and others. N-(2,4-dimethylphenyl)-2-(2-hydroxy) benziliden-Hydrazine carbothiamide as an inhibitor of the fungus *Candida albicans*. În: 44th International exhibition of inventions of Geneva, 13th-17th April 2016-Palexpo, p. 122.
5. Gulea A.; **Oltu Iu.**; Graur V; Zariciuc E.; Tapcov V.; Gudumac V. New antifungal inhibitors. International Warsaw Invention Show IWIS 2016, Warsaw, Poland, 10-12 October, p. 25-26.

ADNOTARE

Oltu Iulian „Acțiunea antifungică *in vitro* a remediilor de origine biologică și chimică asupra unor agenți cauzali ai micozelor”. Teză de doctor în științe medicale, Chișinău, 2017.

Teza conține introducere, patru capitole, concluzii și recomandări, bibliografie cu 194 titluri, 3 anexe, 133 pagini text de bază, 47 figuri, 10 tabele. Rezultatele sunt reflectate în 11 publicații științifice.

Cuvintele cheie: Activitate antifungică, extracte din cianobacterii, extracte din *Juglans regia*, *Trichophyton*, *Microsporum*, *Candida*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*.

Domeniul de studiu: 313.02 – Microbiologie, virusologie medicală.

Scopul lucrării: evaluarea răspunsului *in vitro* a unor tulpini de fungi patogeni și oportunist patogeni la acțiunea remediilor noi de origine biologică și chimică.

Obiectivele lucrării: evidențierea acțiunii antifungice a unor compuși chimici noi, sintetizați de către cercetătorii din Moldova; evaluarea acțiunii antifungice a unor extracte vegetale și cianobacteriene; elucidarea acțiunii antifungice a extractelor din biomasa de spirulină, crescută în condiții biotehnologice de acumulare a metalelor; stabilirea mecanismelor de acțiune posibile a compușilor chimici noi și extractelor din surse autohtone asupra fungilor patogeni.

Noutatea și originalitatea științifică. Pentru prima dată a fost identificată acțiunea antifungică a unor noi compuși coordonativi cu tiosemicarbazone, dintre care unul a fost brevetat în calitate de substanță cu activitate antifungică față de *Candida albicans*; au fost realizate cercetări complexe ale acțiunii extractelor cianobacteriene din biomasa standard și cea obținută în condiții biotehnologice de acumulare a metalelor asupra fungilor; în premieră a fost demonstrată acțiunea noilor substanțe asupra integrității învelișurilor celulare și asupra statutului redox al celulelor fungice.

Problema științifică importantă soluționată în lucrare constă în evaluarea acțiunii biologice *in vitro* a remediilor de natură biologică și chimică asupra unor tulpini de fungi patogeni și oportunist patogeni, ceea ce a dus la evidențierea elementelor comune și specifice ale răspunsului celular al fungilor, fapt ce a permis stabilirea unor mecanisme de acțiune a remediilor selectate.

Semnificația teoretică. Au fost acumulate date noi care permit de a lărgi spectrul de substanțe de perspectivă pentru descoperirea noilor medicamente antifungice; au fost conturate unele dintre mecanismele de acțiune a noilor substanțe asupra tulpinilor studiate de fungi, bazate pe diminuarea capacității de protecție antioxidantă și deteriorarea învelișurilor celulare.

Valoarea aplicativă a lucrării. A fost propusă o nouă substanță chimică în calitate de produs cu proprietăți antifungice față de *Candida albicans*; a fost argumentată o cale nouă de cercetare orientată spre depistarea substanțelor noi cu proprietăți antifungice, și anume obținerea biomasei cianobacteriene cu conținut de metale și a extractelor din acest tip de biomasă.

Implementarea rezultatelor științifice. Rezultatele studiului au fost implementate la catedra de Microbiologie, Virusologie și Imunologie a Universității de Stat de Medicină și Farmacie ”N. Testemițanu” ca material didactic pentru instruirea universitară.

АННОТАЦИЯ

Олту Юлиан “Антифунгальное действие *in vitro* биологических и химических веществ на некоторые возбудители микозов”. Диссертация кандидата медицинских наук, Кишинев, 2017.

Диссертация состоит из введения, четырех глав, заключения и рекомендаций, библиографического списка из 194 наименований, 3 приложений, 133 страниц основного текста, содержит 47 рисунков и 10 таблиц. Результаты исследований опубликованы в 11 научных работах.

Ключевые слова: антифунгальная активность, экстракты из цианобактерий, экстракты из *Juglans regia*, *Trichophyton*, *Microsporum*, *Candida*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*.

Область исследования: 313.02 – Медицинская микробиология и вирусология.

Цель работы: оценка *in vitro* ответа культур патогенных и условно-патогенных грибов на воздействие новых препаратов химического и биологического происхождения.

Задачи работы: выявление антифунгальной активности новых химических соединений, созданных молдавскими химиками; оценка антифунгальной активности некоторых растительных экстрактов и экстрактов из цианобактерий; оценка антифунгальной активности экстрактов из биомассы спироулины, выращенной в условиях аккумуляции металлов; определение возможных механизмов антифунгальной активности отобранных веществ.

Научная новизна и оригинальность. Впервые было определено антифунгальное действие *in vitro* новых координационных соединений, содержащих замещенный тиосемикарбазон, по отношению к *Candida albicans*; были проведены комплексные исследования направленные на выявление влияния экстрактов биомассы цианобактерий, выращенных в биотехнологических условиях аккумуляции металлов на возбудителей микозов; впервые было доказано действие новых веществ на целостность клеточных оболочек и состояние окислительно-восстановительного статуса фунгальных клеток.

Решенная научная проблема состоит в оценке биологического действия *in vitro* химических и биологических веществ на некоторые штаммы патогенных и условно патогенных грибов, что привело к выявлению общих и специфических элементов клеточного ответа грибов и позволило определить некоторые механизмы воздействия выбранных веществ на грибы.

Теоретическое значение работы. Были накоплены новые данные, которые позволяют расширить спектр веществ, перспективных для открытия новых антифунгальных препаратов; были выявлены некоторые из механизмов действия новых веществ на исследуемые штаммы грибов, основанные на снижении уровня антиоксидантной защиты и повреждении клеточных оболочек.

Практическое значение. Было предложено новое химическое вещество, обладающее антифунгальной активностью по отношению к *Candida albicans*; был обоснован новый подход к обнаружению новых веществ с антифунгальными свойствами, а именно получение биомассы цианобактерий, содержащей металлы, и экстрактов из этого вида биомассы.

Внедрение результатов. Результаты исследования внедрены на Кафедре Микробиологии, Вирусологии и Иммунологии Молдавского Государственного Университета Медицины и Фармации им. Н. Тестемицану в качестве дидактического материала.

ANNOTATION

Oltu Iulian „In vitro antifungal activity of remedies of biological and chemical origin against some causative agents of mycoses”. PhD thesis in medical sciences, Chisinau, 2017

The thesis consists of an introduction, four chapters, conclusions and recommendations, bibliography list with 194 references. It comprises 133 pages of main content, 47 figures, 10 tables and 3 annexes. The results were published in 11 scientific papers.

Keywords: antifungal activity, extracts from cyanobacteria, extracts from *Juglans regia*, *Trichophyton*, *Microsporum*, *Candida*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*.

Field of study: 313.02 – Microbiology, Medical Virology.

Research goal: assessing the *in vitro* response of the cultures of pathogenic and opportunistic fungus to action of new chemical and biological remedies

Objectives: highlighting the antifungal action of some new chemical compounds, synthesized by researchers from the Republic of Moldova; evaluation of antifungal activity of some vegetal and cyanobacterial extracts; elucidation of antifungal activity of extracts from *Spirulina* biomass, grown under biotechnological conditions of metal accumulation; setting possible mechanisms of action of new chemical compounds and extracts from indigenous sources against pathogenic fungi.

Scientific novelty of research. For the first time, there was identified antifungal activity of new coordination compounds containing thiosemicarbazone towards *Candida albicans*; there have been carried out complex researches of action of cyanobacterial extracts from standard biomass and that obtained under biotechnological conditions of metal accumulation against fungi; there was demonstrated the action of new substances on the integrity of cell membranes and redox status of fungal cells.

Important scientific problem solved in the present work consists in elucidation of *in vitro* antifungal activity of remedies of biological and chemical origin against some causative agents of mycoses. This led to highlighting the effects produced against pathogens, which allowed the establishment of several mechanisms of their action.

Theoretical value. There have been obtained new data, which allow expanding the range of perspective substances for the discovery of new antifungal drugs; there were outlined some of the mechanisms of action of new substances against studied fungi strains, based on diminishing the ability of antioxidant protection and cell membrane damage.

Practical value. It was proposed a new chemical substance as product with antifungal properties towards *Candida albicans*; it has been argued a new path of research directed towards the detection of new substances with antifungal properties, namely obtaining the cyanobacterial biomass with metal-containing extracts from this type of biomass.

Implementation of scientific results. Results of the study have been implemented at the Department of Microbiology, Virology and Immunology of the State University of Medicine and Pharmacy "N. Testemitanu" as teaching material for university training.

OLTU IULIAN

**ACȚIUNEA ANTIFUNGICĂ *IN VITRO* A REMEDIILOR DE
ORIGINE BIOLOGICĂ ȘI CHIMICĂ ASUPRA UNOR AGENȚI
CAUZALI AI MICOZELOR**

313.02 – MICROBIOLOGIE, VIRUSOLOGIE MEDICALĂ

Autoreferatul tezei de doctor în științe medicale

Aprobat spre tipar:	Formatul hârtiei 60x84 1/16
Hârtie ofset. Tipar ofset.	Tirajul 50 ex.
Coli de tipar: 1,0	Comanda nr. 951

Tipografia Artpoligraf, Republica Moldova, Chișinău, str. Pușkin, 8