

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

Teză de doctor în științe medicale

Conducător științific:



RUDIC Valeriu, doctor în științe medicale,
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

CHIȘINĂU, 2017

© Oltu Iulian, 2017

CUPRINS

ADNOTĂRI (în limbile română, rusă și engleză).....	5
LISTA ABREVIERILOR	8
INTRODUCERE.....	9
1. AGENȚI ANTIFUNGICI: MOD DE ACȚIUNE, MECANISME DE REZISTENȚĂ ȘI STRATEGII DE CERCETARE.....	18
1.1. Preparate antifungice și mecanisme de acțiune a lor	19
1.2. Mecanisme de rezistență dezvoltate de fungii patogeni	28
1.3. Compuși sintetici și naturali cu acțiune antifungică	32
1.4. Noi strategii în design-ul substanțelor cu acțiune antifungică	38
1.5. Concluzii la capitolul 1	45
2. OBIECTELE DE STUDIU ȘI METODELE DE CERCETARE	47
2.1. Obiectele de studiu.....	47
2.2. Metode de lucru.....	56
2.3. Concluzii la capitolul 2.....	68
3. INFLUENȚA EXTRACTELOR VEGETALE ȘI COMPUȘILOR COORDINATIVI ASUPRA VIABILITĂȚII TULPINILOR DE FUNGI	70
3.1. Actualitatea și argumentarea cercetării	71
3.2. Acțiunea antifungică a compușilor coordinativi noi cu tiosemicarbazone substituie.....	74
3.3. Extractele din diferite țesuturi de <i>Juglans regia</i> în calitate de remedii antifungice	77
3.4. Potențialul antifungic al extractelor cianobacteriene	80
3.5. Stabilirea concentrațiilor minime de inhibiție și minime fungicide ale remediilor selectate față de tulpinile de referință de fungi.....	89
3.6. Concluzii la capitolul 3	97
4. MODIFICĂRILE INDUSE DE REMEDIILE BIOLOGICE ȘI CHIMICE LA TULPINILE DE FUNGI	99
4.1. Nivelul actual de cunoaștere	99
4.2. Modificarea permeabilității peretelui și membranei celulare la fungi sub acțiunea remediilor cu acțiune antifungică	101
4.3. Activitatea antioxidantă totală și intensitatea proceselor de oxidare la tulpinile de fungi sub influența remediilor chimice și biologice	113

4.4. Influența remediilor de origine chimică și biologică asupra activității enzimelor antioxidante	121
4.5. Concluzii la capitolul 4.....	131
CONCLUZII ȘI RECOMANDĂRI.....	132
BIBLIOGRAFIE.....	134
ANEXE.....	149
Anexa 1. Structura compușilor chimici utilizați în cercetare.....	150
Anexa 2. Brevet de invenție.....	154
Anexa 3. Diplome la Saloane de Invenții și Expoziții Internaționale	155
DECLARAȚIA PRIVIND ASUMAREA RĂSPUNDERII.....	160
CV-ul AUTORULUI.....	161

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 coordinați 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 peretelui și membranei 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 peretelui și membranei 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.

LISTA ABREVIERILOR

ABTS	2,2 azinobis 3-etilbenzotiazolina-6- acidului sulfonic
AMB	amfotericina B
ATCC	American Type Culture Collection
CMI	concentrația minimă de inhibiție
CMF	concentrația minimă fungicidă
CN	clorhidrat de naftifină
CNMN	Colecția Națională de Microorganisme Nepatogene
CT	catalaza
DAM	dialdehida malonică
EE _{Me}	extracte etanolice din biomasa de spirulină cu conținut de metale
EH _{Me}	extracte hidrice din biomasa de spirulină cu conținut de metale
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
GPx	glutation peroxidaza
LDH	lactat dehidrogenaza
PAM	peptide antimicrobiene
SOD	superoxiddismutaza
SRO	specii reactive ale oxigenului
TBA	acid tiobarbituric
TBARS	substanțele de reacție ale acidului tiobarbituric (thiobarbituric acid reacting substances)
TEAC	echivalentul trolox al activității antiradicalice (Trolox Equivalent of Antioxidant Capacity)

INTRODUCERE

Actualitatea și importanța cercetărilor. Fungii sunt organisme omniprezente. Numărul de specii de fungi se estimează aproximativ la 1,5 milioane și doar în jur de 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, ceea ce este determinat, în primul rând, de numărul în creștere a persoanelor cu imunosupresie severă [28]. Cu toate că se lucrează foarte mult la elaborarea medicamentelor antifungice mai active și mai puțin toxice și 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 [94]. Conform estimărilor, aproximativ 25% din populația Terrei este afectată de micozele superficiale, cauzate preferențial de dermatofitii din genurile *Microsporum*, *Trichophyton* și *Epidermophyton* [25, 73]. Analiza statistică a datelor privind morbiditatea polimicozelor în Republica Moldova (în special microfitie și trihofitie) 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 trihofitii). În anul 2015 microsporia zooantropofilă a constituit în medie pe Moldova 31 de cazuri la 100 000 populație [1].

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 ridicată, acestea luând anual viața a aproximativ unui milion și jumătate de oameni [72]. 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 (candidoze, meningită criptococală, aspergiloză, mucormicoză ș.a.) [39].

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 [57, 115].

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* [4, 62, 70, 71]. 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 [18, 49, 134].

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. [177].

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 compuși 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.

Astfel, elaborarea și testarea compușilor chimici noi și descoperirea remediilor de origine biologică cu potențial antifungic rămâne o direcție actuală la nivel mondial.

Scopul tezei de doctor a constat în evaluarea răspunsului *in vitro* a unor tulpini 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.

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 care stau la baza acțiunii acestor extracte; în premieră a fost demonstrată acțiunea noilor substanțe asupra integrității peretelui și membranei 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 peretelui și membranei 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.

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 invenție: INOVA-Budi Uzor, Karlovac, Croația, 2015; INNOVA, Brussels, 2015; PALEXPO, Geneva, 2016; IWIS, Warșovia, 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 și un brevet de invenție, 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*.

Sumarul compartimentelor tezei.

1. AGENȚI ANTIFUNGICI: MOD DE ACȚIUNE, MECANISME DE REZISTENȚĂ ȘI STRATEGII DE CERCETARE include analiza 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, organismele - țintă și mecanismele, prin care acestea 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 conține argumentarea și descrierea obiectelor de studiu și a metodelor de cercetare. În calitate de obiecte de studiu „*in vitro*” au fost incluse 5 tulpini de referință, care provin din American Type Culture Collection (ATCC) - *Trichophyton rubrum* ATCC®28188™; *Trichophyton mentagrophytes* ATCC®9533™; *Microsporum canis* ATCC®36299™; *Microsporum gypseum* ATCC®24102™; *Candida albicans* ATCC®10231™; 3 tulpini de fungi miceliali din Colecția Națională de Microorganisme Neputogene (CNMN) - *Aspergillus fumigatus* CNM-FA-02, *Penicillium expansum* CNMN-FD-05, *Mucor vulgaris* CNMN-FD-07; și două tulpini – izolate naturale ce aparțin speciilor *Fusarium solani* FS01 și *Fusarium oxysporum* FO1.

În calitate de substanțe cu efecte antimicrobiene au fost incluși 22 compuși chimici noi, care conțin în structura lor fragmentul tiosemicarbazonic, sintetizați la catedra Chimie Anorganică, actualmente Departamentul 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, coajă verde și coajă uscată de nuc (*Juglans regia*); extracte hidro etanolice 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 încorporate 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.

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 au fost aplicate un șir de metode biochimice: metodele de determinare a activității enzimelor (lactat dehidrogenazei eliberate, supeoxidismutazei, catalazei și glutatión peroxidazei), capacității antioxidante totale și a conținutului produselor finale ale peroxidării lipidelor (dialdehidei malonice). Pentru determinarea activității enzimelor antioxidante au fost utilizate kit-uri speciale (RANSOD pentru superoxidismutază, producător Randox; RANSEL pentru glutatión peroxidază, producător Randox; Catalase Assay kit, 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.

Modificările morfologice ale fungilor, induse de compușii testați, au fost înregistrate cu utilizarea microscopului 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 reflectă rezultatele screening-ul compușilor chimici noi, care conțin tiosemicarbazone substituie, și extractelor vegetale și cianobacteriene. În calitate de metodă de cercetare a fost aplicată difuzia în geloză. Activitatea antifungică a compușilor chimici și a remediilor de origine biologică a fost comparată cu cea a unor preparate antifungice cu activitatea înaltă, utilizate atât în clinică, cât și în cercetările biomedicale (itraconazolul, clorhidratul de naftifină). În total au fost testați 73

compuși chimici noi, sintetizați în cadrul Departamentului chimie al Universității de Stat din Moldova sub conducerea academicianului Aurelian Gulea. Dintre toate tulpinile de fungi doar *Candida albicans* ATCC®10231™ a manifestat sensibilitate față de unii dintre compușii chimici noi. Astfel, la etapa de screening au fost selectați 22 compuși cu activitate antifungică.

Extracțele din frunze și coajă verde a fructului de nuc de asemenea au manifestat activitate antifungică contra dermatofiților miceliali și a tulpinii *Candida albicans* ATCC®10231™. Dintre acestea se evidențiază extractul în etil acetat din frunze cu activitate înaltă față de tulpinile de *Trichophyton*, și față de *Candida albicans* ATCC®10231™ și extractul etanolic din frunze de nuc cu activitate antifungică înaltă față de *Microsporum canis* ATCC®36299™. Extracțele hidro etanolice din biomasa de spirulină și nostoc au manifestat activitate antifungică față de tulpinile *Trichophyton*, *Microsporum* și *Candida*. Cea mai semnificativă activitate a fost înregistrată pentru extracțele hidro etanolice de 20%. Biomasa de spirulină îmbogățită cu diferite metale a fost utilizată pentru obținerea unor extracțe, care au avut activitatea antifungică față de toți fungii studiați.

Pentru toate substanțele cu efect antifungic selectate la etapa de screening au fost determinate concentrațiile minimă inhibitoare și minimă fungicidă. Activitatea substanțelor studiate față de tulpinile incluse în cercetare a fost comparată cu activitatea inraconazolului și cea a clorhidratului de naftifină (CN). 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 elaborată o cerere de brevet de invenție și obținută Hotărârea pozitivă de acordare a brevetului de invenție. Extracțele etanolice din biomasa de spirulină cu conținut de cobalt și cadmiu au manifestat activitatea antifungică cea mai înaltă față de tulpinile *Trichophyton rubrum* ATCC®28188™; *Trichophyton mentagrophytes* ATCC®9533™ și *Microsporum canis* ATCC®36299™. Față de tulpina *Microsporum 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, CMI joase au fost obținute pentru extracțele hidrice și etanolice din biomasa de spirulină cu conținut de Cd și Cr. Asupra ambelor izolate naturale din genul *Fusarium* au acționat extracțele etanolice din biomasa de spirulină cu conținut de cadmiu și crom.

4. MODIFICĂRILE INDUSE DE REMEDIILE BIOLOGICE ȘI CHIMICE LA TULPINILE DE FUNGI include analiza rezultatelor cercetărilor, care au fost întreprinse pentru a elucida unele dintre mecanismele de acțiune a substanțelor selectate. În calitate de test relevant pentru aprecierea nivelului de toxicitate a substanțelor studiate față de fungi a fost aplicat testul

de determinare a activității lactat dehidrogenazei eliberate. Rezultatele obținute demonstrează, că remediile testate (cu excepția extractelor hidro etanolice din biomasa de spirulină și nostoc) provoacă eliberarea pronunțată a LDH în mediul extracelular. Astfel, ca rezultat al contactului culturilor de fungi cu concentrații corespunzătoare CMI ale substanțelor testate, are loc creșterea de 1,2-3,7 ori a activității LDH eliberate, ceea ce este un indicator al acțiunii toxice asupra celulelor și a dereglării permeabilității și structurii peretelui și membranei celulare. Rezultatele obținute pentru extractele etanolice din biomasa de spirulină cu conținut de metale (în special Co, Cr și Cd) sunt foarte apropiate de cele obținute pentru martorii pozitivi (itraconazol, ketoconazol și clorhidratul de naftifină). Compromiterea integrității peretelui și membranei celulare a fost confirmată și prin examenul microscopic, care a permis depistarea fragmentării miceliului, revărsarea totală sau parțială a conținutului hifelor în mediul extracelular.

De rând cu eliberarea LDH majoritatea substanțelor au indus o micșorare puternică a activității supeoxiddismutazei, catalazei și glutatión peroxidazei în biomasa fungilor, ceea ce duce la micșorarea viabilității patogenilor. Aceste efecte într-o măsură mai mare ori mai mică, pot fi urmărite la toate tulpinile de fungi luate în studiu. Excepție prezintă extractele hidro etanolice din biomasa de spirulină și nostoc, care nu modifică activitatea GPx, scad activitatea CT și măresc pe cea a SOD, astfel, fiind dezechilibrat sistemul enzimatic primar de protecție antioxidantă.

Activitatea antioxidantă în biomasa fungilor patogeni de asemenea se modifică sub influența substanțelor cu efect antifungic. Capacitatea de reducere a radicalului cation ABTS⁺ (2,2 azinobis 3-etilbenzotiazolină-6- acid sulfonic) scade cu până la 64% în biomasa fungilor tratați cu substanțele selectate față de valoarea indicatorului dat în biomasa netratată. În același timp în biomasa fungică crește semnificativ cantitatea de dialdehidă malonică, care este produsul final al peroxidării lipidice.

Astfel, atât compușii chimici noi, cât și extractele din frunzele și pericarpul de nuc și din biomasa de spirulină cu conținut de metale au generat același tip de reacții de răspuns a culturilor de fungi testați: eliberarea extracelulară a lactat dehidrogenazei, scăderea activității enzimelor antioxidante din prima linie de protecție – SOD, CT și GPx, scăderea activității antioxidante totale a biomasei fungice și mărirea cantității produselor peroxidării lipidice.

Rezultatele obținute sugerează, că unul dintre mecanismele posibile de acțiune a remediilor testate este bazat pe generarea stresului oxidativ, care soldează cu degradarea intensă a componentelor celulare, în primul rând a membranelor. Aceasta ar putea fi una din explicațiile pentru dereglarea permeabilității peretelui și membranei celulare, care duce la eliberarea intensă în mediul extracelular a lactat dehidrogenazei.

Un alt mecanism care asigură acțiunea antifungică a substanțelor menționate constă în reducerea activității enzimelor antioxidante primare, care de fapt sunt considerate factori de patogenitate, atât pentru culturile de bacterii patogene, cât și pentru cele fungice. 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.

Compartimentul **CONCLUZII GENERALE ȘI RECOMANDĂRI** conține chintesența lucrării, exprimată concis în concluziile generale, ce reflectă analiza rezultatelor obținute, exprimă valoarea practică a lucrării prin recomandările înaintate și schițează tematica unor cercetări ulterioare, care vor asigura continuarea logică a cercetărilor expuse în prezenta teză de doctorat.

BIBLIOGRAFIA include cele 194 surse citate în teză.

Compartimentul **ANEXE** conține lista compușilor chimici incluși în studiu cu abrevierile utilizate în lucrare, formulele liganzilor și masele lor moleculare; copiile titlului de brevet de invenție și a celor 5 diplome de însoțire a medaliilor, obținute la saloanele internaționale de inovații.

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

În ultimul timp fungii se manifestă tot mai activ în calitate de agenți cauzali ai infecțiilor umane, ceea ce este determinat, în primul rând, de numărul în creștere a persoanelor cu imunosupresie severă. Lista acestui tip de pacienți include persoanele care suferă de maladii hematologice și autoimune, au fost supuse transplantului de organ sau au un statut imun compromis [45]. Chiar și în cazul tratamentului adecvat cele mai multe infecții fungice invazive sunt asociate cu rate ridicate de mortalitate - de peste 50% [25, 35]. Prin aceasta se explică interesul major față de informația despre rolul fungilor în dezvoltarea diverselor stări patologice [28]. Cu toate că se lucrează foarte mult la elaborarea medicamentelor antifungice mai active și mai puțin toxice și 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 inacceptabil de înaltă [94]. Maladiile cauzate de fungi includ infecții superficiale (dermatofite), invazive (sistemice) și oportuniste. Infecțiile dermatofite sunt cauzate de infectarea straturilor superficiale ale pielii de către agenții dermatofiți. Noțiunea dată este bazată de fapt pe localizarea specifică a afecțiunilor și nu pe apartenența sistematică a agenților cauzali, cu toate că majoritatea dermatofiților fac parte din genurile *Microsporum*, *Trichophyton* și *Epidermophyton*. Conform unor autori aproximativ 25% din populația Terrei sunt infectați cu acești germeni [5, 25, 73].

Infecțiile fungice invazive (sistemice) au o incidență care este mult mai mică decât cea a infecțiilor superficiale, dar provoacă o îngrijorare mai mare deoarece acestea sunt asociate cu o rată de mortalitate inacceptabil de ridicată, acestea luând viața anual a aproximativ unui milion și jumătate de oameni [72]. Acest tip de infecții se produce prin inhalarea sporilor, ce cauzează pneumonii fungice, care nu pot fi transmise de la om la om, dar pot apărea și la persoane sănătoase. Multe dintre organismele care cauzează infecții fungice sistemice se caracterizează prin locații geografice specifice cu climat favorabil pentru proliferarea lor. Printre cele mai cunoscute infecții de acest fel se numără coccidioidomicoza (*Coccidioides immitis*), histoplazmoza (*Histoplasma capsulatum*), blastomicoza (*Blastomyces dermatitidis*) ș.a. [5], iar 90% din cazurile de deces sunt cauzate de speciile din genurile *Cryptococcus*, *Candida* și *Aspergillus* [72].

Fungii, care cauzează infecții oportuniste (*Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus* sp., *Mucor* sp. ș.a.) nu prezintă pericol pentru persoanele sănătoase, dar le afectează în special pe acele cu statut imun compromis, la care provoacă infecții grave (candidoze,

meningita criptococală, aspergiloza, mucormicoza ș.a). Pacienții deosebit de sensibili la aceste infecții includ persoane cu diabet, leucemie, cancer, HIV și alte tipuri de imunodeficiență [5, 39, 119]. Evoluția practicilor medicale cu introducerea unor noi proceduri terapeutice, cum sunt utilizarea unor chimioterapii mai agresive sau noi medicamente imunosupresoare, cum ar fi antagoniștii factorului de necroză tumorală, anticorpi anti-CD52 (alemtuzumab), și anticorpii antagoniști receptorilor de interleukină (basiliximab), a favorizat creșterea incidenței micozelor invazive [45].

Proporții îngrijorătoare a atins numărul de pacienți susceptibili la infecții invazive provocate de fungi filamentoși, caracteristici diferitor habitate naturale cum sunt solul și diferite substraturi organice, care continuă să crească în mod constant. Cei mai cunoscuți agenți ai micozelor invazive fac parte din genurile *Aspergillus* și *Mucor*. În ultimii ani această listă a fost completată cu fungi filamentoși mai puțin frecvenți în mediul ambiant, cum sunt *Fusarium spp.* și *Penicillium spp.* La fel s-au extins și limitele de aplicare a termenului de invazie fungică de la boală invazivă, la entități mai puțin recunoscute anterior, cum ar fi astmul sever cu sensibilizare fungică, tusea cronică asociată cu infecțiile fungice, micoza alergică bronhopulmonară, și rinosinuzita fungică alergică [35, 116, 159].

Astfel, problemele ce țin de elucidarea mecanismelor de acțiune a preparatelor antifungice, evidențierea căilor de dobândire a rezistenței la acțiunea acestora și strategiile de cercetare care au drept scop descoperirea de noi compuși cu proprietăți antifungice rămân în centrul atenției cercetătorilor din domeniul biomedicinii și farmaceuticii contemporane.

1.1. Preparate antifungice și mecanismele de acțiune a lor

Terapia antifungică adecvată este prescrisă în dependență de statutul imun al pacientului, site-ul de infecție, caracteristicile biologice ale agentului patogen și caracteristicile farmacocinetice ale medicamentului aplicat. Preparatele antifungice, care pot fi aplicate cu succes în tratamentul micozelor la om trebuie să acționeze în baza diferențelor între celulele fungice și cele proprii corpului uman. În același timp fungii ca și mamiferele sunt organisme eucariote, și deci, elaborarea preparatelor care atacă celulele fungice fără a provoca daune organismului uman, este o sarcină extrem de dificilă. Una dintre deosebirile, care pot fi exploatate în designul farmaceutic al preparatelor antifungice, este prezența unui sterol specific în membrana celulară a drojdiilor - și anume ergosterolul (la mamifere în locul acestuia este prezent colesterolul) [125]. O țintă specifică pentru acțiunea preparatelor antifungice sunt și componentele peretelui celular – manoproteinele și β -glucanii. Marea majoritate a

medicamentelor active contra fungilor patogeni sunt elaborate anume în baza acestor diferențe esențiale.

Preparatele care sunt utilizate în prezent pentru tratarea maladiilor provocate de fungi pot fi divizate după mai multe criterii, principalele dintre care sunt: mecanismul de acțiune și structura chimică [5]. După mecanismul de acțiune toate medicamentele antifungice se divid în următoarele grupuri:

1. Inhibitori ai sintezei peretelui celular (de ex. caspofungina, micafungina și anidulafungina);
2. Preparate ce fixează ergosterolul din componența membranei citoplasmatică (de ex. nistatina, amfotericina –B);
3. Inhibitori ai sintezei ergosterolului și lanosterolului concomitent (de ex. terbinafina, naftifina, butenafina ș.a);
4. Inhibitori ai sintezei ergosterolului (din acest grup fac parte azolele);
5. Inhibitori ai sintezei acizilor nucleici (de ex. 5-flucitozina);
6. Inhibitori ai mitozei fungale (de ex. griseofulvina);
7. Preparate cu un alte mecanisme de acțiune (de ex. ciclopiroxul, haloprogina ș.a.)

Inhibitori ai sintezei peretelui celular.

Peretele celular fungic este o structură dinamică, care protejează celula de modificările presiunii osmotice și acțiunea altor factori de mediu, dar și calea de interacțiune a celulei cu mediul. Structura și biosinteza peretelui celular fungic sunt unice și caracteristice doar acestui regn, și prin urmare, acesta este un obiectiv excelent pentru dezvoltarea de medicamente antifungice. În componența peretelui la fungi intră mananele, chitina, α - și β -glucanii, fiecare în parte fiind potențiale ținte pentru terapia antifungică [24].

Chitina, un homopolimer liniar lung, format din resturi de β -1,4-N-acetilglucozamină, este considerată a fi componenta relativ minoră din punct de vedere cantitativ al peretelui celular fungic. La fungii levuriformi cantitatea de chitină în peretele celular este de 1-2%, în timp ce pereții celulari ai fungilor filamentoși, conțin 10-20% chitină. Microfibrilele de chitină la fungi sunt formate de legăturile de hidrogen dintre catenele vecine ale polimerului. Sinteza chitinei este mediată de către chitin - sintaza, o enzimă membranară, care catalizează transferul de N-acetilglucozamină din componența difosfat uridin (UDP) – N - acetilglucozaminei într-un lanț de chitina în procesul de creștere. Alungirea lanțurilor de chitină se realizează prin intermediul sintezei vectoriale, astfel încât lanțurile în formare sunt expulzate prin membrana plasmatică. După aceasta urmează formarea legăturilor de hidrogen între moleculele noi formate și

cristalizarea ulterioară a chitinei în spațiul extramembranar, în imediata vecinătate a membranei plasmactice. Acest proces este localizat în zonele de creștere activă și remodelare a peretelui celular, cum ar fi zona formării mugurelui la drojdii, ori zonele apicale ale hifelor la fungii filamentoși. Atunci când sinteza chitinei este perturbată, peretele celular degradează, iar celula fungică devine osmotically instabilă. Astfel, procesul de biosinteză a chitinei este considerat o țintă excelentă pentru agenții antifungici. Printre cei mai cunoscuți inhibitori ai chitin - sintazei sunt compușii naturali nikkomicina și polioxinele, precum și derivații lor sintetici. Nikkomicina și polioxinele sunt analogi ai substratului chitin - sintazei, și funcționează ca inhibitori competitivi [135]. Cu toate că efectul lor *in vitro* este foarte înalt, *in vivo* ele nu se manifestă la fel. Se consideră, că ineficacitatea lor este determinată de absorbția limitată a inhibitorilor în citoplasma agenților patogeni fungici. În prezent, fungicidele, care vizează în mod specific sinteza chitinei au o utilizare limitată în clinică. În prezent se caută activ agenți noi cu efect de inhibiție a chitin - sintazei. De perspectivă par a fi derivatele fosforamidate ale cumarinei, care au activitate de inhibiție a enzimei la mai multe specii de fungi patogeni [56, 79]. De asemenea se lucrează asupra sintezei a noi derivați monomerici ai uridinei în calitate de inhibitori competitivi ai activității chitin - sintazei [86].

Glucanii sunt polizaharidele structurale majore ale peretelui celular la fungi, constituind aproximativ 50-60% din greutatea lui. Polimerii glucanici sunt compuși din reziduuri de glucoză, care sunt asamblate în lanțuri printr-o varietate de legături chimice. Între 65% și 90% din structura lor glucanii sunt prezentați prin β -1,3-glucan. Afară de acest tip de legături mai sunt legăturile β -1,6; β -1,4; α -1,3 și α -1,4. Sinteza β -1,3-glucanului este necesară pentru o structură adecvată a peretelui celular, precum și pentru creșterea și dezvoltarea normală a fungilor miceliali [24]. În cazul fungilor bimorfi sinteza acestui compus este esențială pentru realizarea potențialului patogen invaziv la trecerea de la forma levuriană la cea hifală [46]. Inhibarea sintezei de β -1,3-glucan este examinată ca un mijloc de a perturba formarea peretelui celular și a preveni dezvoltarea fungilor. A fost descoperită și propusă pentru utilizare în clinică o familie de agenți antifungici, cunoscuți sub numele de echinocandine, care includ caspofungina, micafungina și anidulafungina - inhibitori non-concurențiali ai complexului de sinteză a β -1,3-glucanului [130,131]. Ca urmare, celulele tratate cu echinocandine devin osmotically sensibile, formează pseudohife, au un perete celular hipertrofiat și zone de liză evidentă. Este cunoscut, că echinocandinele se leagă de unitatea catalitică a sintazei β -1,3-glucanului, inactivându-o. Tratatamentul cu echinocandine prezintă o terapie promițătoare a aspergilozei și candidozei [74,187].

Manoproteinele sunt componente interstițiale ale pereților celulelor fungice. Structural, acestea sunt lanțuri complexe formate din monomeri de manoză legați de proteine prin N-acetilglucozamină și resturile de asparagină. Manoproteinele pot fi implicate în recunoașterea celulă-celulă și procesele de reproducere. Mecanismul de acțiune al inhibitorilor biosintezei manoproteinelor implică aparent complexarea grupărilor carboxil ale acestora cu partea zaharidică a manoproteinelor de la suprafața peretelui celular. Agenții de tipul benanomicinei, pradimicinei și chinonei benzonafacene fac parte din grupul de inhibitori ai biosintezei manoproteinelor la fungi [104].

Preparate ce fixează ergosterolul din componența membranei citoplasmatică.

Ergosterolul, sterolul major al membranelor fungice, este esențial pentru creșterea și dezvoltarea fungilor. Este implicat în numeroase funcții biologice, cum ar fi asigurarea fluidității membranei, reglementarea activității și distribuției proteinelor membranare integrate, precum și controlul ciclului celular [78]. Rolul esențial al ergosterolului în menținerea membranelor celulare face ca ergosterolul și procesul de biosinteză a lui să fie esențiale pentru creșterea fungilor. Totodată acest compus și căile de sinteză a lui devin și un obiectiv principal pentru multe dintre medicamentele disponibile în prezent, destinate tratamentului infecțiilor fungice umane severe. Acestea vizează direct ergosterolul, sau etapele enzimatică ale căii sale de biosinteză. Amfotericină B (AMB), un preparat din grupul polienelor a reprezentat, timp de mai mult de 30 de ani, terapia antifungică standard a aspergilozei invazive. Cu toate acestea mecanismul complet de acțiune încă nu este descifrat. Este unanim acceptat faptul că AMB provoacă moartea fungilor în principal prin permeabilizarea membranei mediată de formarea canalelor prin care are loc scurgerea componentelor celulare. Cercetările recente sugerează că AMB produce moartea celulelor prin formarea legăturilor cu ergosterolul, astfel încât formarea canalelor transmembranare reprezintă un mecanism complementar, care sporește eficiența preparatelor antifungice [9, 58].

Preparatele din acest grup, pot fi examinate ca parte componentă a terapiilor complexe ale infecțiilor fungice. Astfel, se consideră, că majoritatea preparatelor nu se pot manifesta ca antifungice din simplu motiv, că nu pot penetra peretele și membrana celulei. Utilizarea compușilor care formează legături cu ergosterolul din componența membranei celulare, și ca consecință – apariția porilor, facilitează pătrunderea mai multor preparate și substanțe active în interiorul celulelor fungice, ceea ce în final duce la moartea acestora. Sunt cunoscute rezultatele cercetărilor în care aplicarea prealabilă a nistatinei a dus la amplificarea efectelor antifungice ale acidului helvolic și teramidei A din extractele obținute din entomopatogeni [85]. Astfel, această

categorie de preparate antifungice este de perspectivă pentru terapia combinată a micozelor invazive fatale.

Inhibitori ai sintezei ergosterolului și lanosterolului.

Alilaminele, ca de exemplu terbinafina și naftifina, precum și tiocarbamații au fost concepuți ca noi inhibitori specifici ai biosintezei ergosterolului, care se deosebesc semnificativ de alte categorii de astfel de inhibitori. Mecanismul de acțiune al acestor substanțe este descris ca un proces de inhibare necompetitivă reversibilă a scualen epoxidazei, o enzimă, care, împreună cu ciclaza (2,3)-oxidosqualenei, este responsabilă pentru ciclizarea scualenei în lanosterol. Ca rezultat, are loc epuizarea ergosterolului în celulă și acumularea de squalenă. Aceste procese afectează structura și funcțiile membranei celulare, inclusiv dereglează procesul de absorbție a nutrienților. Din acest grup de substanțe aplicate în clinică fac parte alilaminele naftifina și terbinafina, și tiocarbamatul tolnaftat. Mai sunt cunoscute benzilamina și butenafina, care au un mecanism de acțiune similar cu cel al alilaminelor și, în plus, mai produc efecte membranare directe în celulele cu insuficiență gravă de ergosterol [104]. Astfel, preparatele din această categorie inhibă etapele cele mai timpurii de sinteză a ergosterolului, care finalizează cu formarea de lanosterol. Ca rezultat, celulele nu numai că sunt lipsite de ergosterolul necesar procesului de formare a membranei celulare, dar și de oricare alți steroli intermediari. Anume lipsa acestora a sugerat că mecanismul de acțiune a acestor preparate antifungice constă în inhibarea sintezei sterolilor în punctul de epoxidare a scualenei, o reacție catalizată de scualen epoxidaza. Studiile efectuate pe enzima pură indică faptul că aceasta este ținta alilaminelor. În acest caz moartea celulelor fungice este legată în primul rând de acumularea de squalenă, iar deficitul de ergosterol este un factor secundar. Nivelurile ridicate de squalenă duc la creșterea permeabilității membranare, ceea ce provoacă perturbarea organizării celulare a fungilor [95].

Inhibitori ai sintezei ergosterolului.

Spre deosebire de categoria precedentă, acest grup de preparate antifungice provoacă inhibiția sintezei ergosterolului la etape mai târzii. Reprezentanți tipici ai acestui grup sunt azolele, care au revoluționat domeniul micologiei medicale datorită spectrului lor larg de acțiune și toxicității reduse în comparație cu AMB [80, 104]. Primii derivați azolici au fost descoperiți la sfârșitul anilor 1960. Aceștia sunt în totalitate sintetici și în prezent sunt într-un proces de dezvoltare și extindere, care nu se mai întâlnește în alte grupuri de preparate antifungice [83]. Azolele sunt clasificate ca imidazoli sau triazoli în dependență dacă acestea au doi sau trei atomi de azot în inelul azolic. Marea majoritate au efecte pronunțate contra fungilor levuriformi și

filamentoși. Inhibarea biosintezei ergosterolului de către această categorie de agenți are loc la etapa de demetilare C-14 [133, 147]. Ca rezultat, se înregistrează epuizarea ergosterolului și acumularea de lanosterol și alți steroli 14-metilați, care nu pot asigura funcțiile ergosterolului în calitate de component al membranei celulare. Perturbarea structurii membranei plasmatică duce la intensificarea proceselor de distrucție, inclusiv prin modificarea activității mai multor enzime fixate de membrană, cum ar fi cele asociate cu transportul nutrienților, sinteza de chitină, creșterea și proliferarea celulelor. Dintre imidazoli: miconazolul, ketoconazolul, clotrimazolul, econazolul, bifonazolul, butoconazolul, fenticonazolul, izoconazolul, oxiconazolul, sertaconazolul, sulconazolul și tioconazolul sunt sau au fost printre cei mai des utilizați agenți antifungici, care produc deteriorarea membranelor celulare, manifestând în același timp, un potențial toxic foarte înalt. Triazolii sunt compuși de generație mai nouă, mai puțin toxici și mai eficienți. Printre aceștia se numără fluconazolul, itraconazolul, isavuconazolul, ravuconazolul, voriconazolul și terconazolul.

În aceeași categorie de inhibitori ai sintezei ergosterolului mai intră și compuși non-azolici, în special inhibitori ai dimetilazei P-450DM. La fel, pe durata a mai multor ani au apărut publicații despre anumiți compuși, cum ar fi triazolul SCH-56592 (posaconazolul), triazolul optic activ TAK-187, triazolul ER-30346, amida triazolică T-8581 cu efecte mai pronunțate decât cele ale itraconazolului împotriva *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata*, *Trichosporon beigelli*, *Aspergillus fumigatus*, și *Candida neoformans* [104].

Inhibitori ai sintezei acizilor nucleici.

Ca urmare a apartenenței fungilor patogeni și gazdelor atacate la același domen – Eukaria, asemănările dintre structura ADN / ARN și procesele legate de transcriere-translare, aceste verigi metabolice au fost ținte dificile pentru dezvoltarea noilor preparate antifungice. Mai recent, datorită dezvoltării biologiei moleculare, au fost evidențiate diferențe importante între tipurile de celule, ceea ce a permis elaborarea de noi preparate care acționează asupra procesului de realizare a informației ereditare.

Strategia selectată de către elaboratorii noilor medicamente antifungice constă în redirecționarea proceselor metabolice normale. Astfel, compușii cu activitate antifungică din această categorie trebuie să se asemeneze structural cu metaboliții cheie, astfel încât aceștia să fie utilizați în mod eronat în căile metabolice ale celulei fungice. Este important, ca aceste preparate să nu intervină și în metabolismul celulelor gazdei. Flucitozina (5-fluorocitosina - 5-FC) este un exemplu elocvent în acest sens. Dezvoltat în anii 1950 ca un agent antineoplazic potențial, s-a dovedit a fi inefficient contra tumorilor, dar s-a manifestat ca agent metabolic antifungic.

Compusul pătrunde în interiorul celulei fungice prin intermediul unei permeaze citozinice, după care este supus acțiunii diaminazei citozinice, care îl transformă în 5-fluorouracil (5-FU). Fosforilarea ulterioară și încorporarea acestuia în structura ARN, conduce la apariția erorilor în sinteza proteinelor. Suplimentar la aceasta, 5-FU supus fosforilării este convertit în dezoxinucleozida respectivă, care blochează sinteza ADN prin inhibarea enzimei timidilat sintetaza. Ca rezultat este compromis procesul de replicare a ADN-ului în celula fungică [36, 178].

Printre alte ținte, se numără și topoizomeraza I, care participă la replicarea, transcrierea, repararea și segregarea cromozomială la celulele fungice. Deși nu este considerată o enzimă esențială, topoizomeraza fungică I a stat la baza elaborării inhibitorilor de tipul camptotecinei. Aceste preparate formează complexe cu enzimele implicate în replicare și reorientează acest proces în sens invers [164]. Factorul de elongare 3 și factorul de elongare 2 (EF-3 și EF-2) de asemenea sunt specifici celulelor fungice și servesc drept ținte convenabile pentru astfel de preparate cum sunt sordarinele [165]. Tot la această categorie de preparate antifungice se referă și unele produse naturale care prin diferite mecanisme moleculare blochează biosinteza moleculei de ADN, a aminoacizilor, a poliaminelor și a acidului folic. Toate substanțele de acest tip în cele din urmă afectează procesul de biosinteză a acizilor nucleici în celulele fungice, ceea ce duce la moartea lor [104].

Inhibitori ai mitozei fungale.

Inhibarea procesului de diviziune celulară este o țintă foarte râvnită de către cercetători și medicii practicieni pentru a elabora noi preparate cu efecte antifungice. Cu părere de rău, din cauza similarității procesului mitotic la celulele fungice și celulele gazdei, această opțiune rămâne până în prezent o sarcină de viitor. Cu toate acestea, de foarte mult timp sunt cunoscuți agenți antifungici, care își realizează efectul anume prin influența lor asupra mitozei fungice. Una dintre verigile cheie ale procesului de mitoză, asupra căreia se poate influența specific cu diferiți agenți chimici sunt microtubulii – polimeri formați din dimeri ai α - și β -tubulinei. Procesul de agregare și dezagregare a microtubulilor are un rol crucial în procesul de diviziune celulară. Majoritatea agenților antifungici cunoscuți pentru acest mecanism de acțiune (în special griseofulvina și derivatele ei) interacționează cu β -tubulina și inhibă procesul de agregare a acesteia. Cu toate că β -tubulina este o proteină conservativă pentru eucariote, au fost descoperite unele deosebiri între structura acesteia la mamifere și la fungi, care asigură selectivitatea preparatelor antifungale care acționează pe aceste verigi.

Griseofulvina – unul din cele mai frecvent prescrise medicamente în dermatomicoze, se caracterizează prin acțiune fungistatică. Substanța activă a fost izolată din *Penicillium griseofulvum* în 1939. Acest medicament este, de asemenea, un vasodilatator slab și inhibă chemotaxia leucocitelor, având eficacitate într-o varietate de boli, inclusiv nonfungale cum este boala Raynaud, scleroza sistemică progresivă, rozaceea, fasciita eozinofilică și gutta.

Modul de acțiune al griseofulvinei asupra celulelor fungice constă în blocarea procesului de formare a fusului cromatic și axului mitotic, și oprirea mitozei la etapa de metafază [88, 97, 167]. În prezent se cercetează în special posibilitatea de a obține derivați mai activi ai griseofulvinei prin sinteză ori din surse naturale, în special din fungi.

Preparate cu alte mecanisme de acțiune

Există numeroase preparate cu efect antifungic care nu pot fi atribuite la nici unul dintre mecanismele descrise anterior. Printre acestea se numără și ciclopiroxul - un agent antimicotic topic care aparține clasei chimice a hidroxipiridonelor și care nu are legătură cu azoli sau orice altă clasă de medicamente antifungice. Profilul său antifungic include aproape toți dermatofizii relevanți clinic, drojdiile și mucozitățile, și este, prin urmare, mai larg decât profilul majorității antimicoticelor. Este activ împotriva anumitor tulpini de *Candida albicans* azol-rezistente și împotriva unor bacterii. Mecanismul de acțiune al ciclopiroxului este diferit de cel al altor medicamente antifungice topice, care acționează în general prin inhibarea sintezei ergosterolului. Ciclopiroxul are afinitate ridicată față de cationii metalici trivalenți. Cuplarea lui cu aceștia are ca rezultat inhibarea enzimelor metal - dependente care sunt responsabile de degradarea peroxizilor din interiorul celulei fungice. Ca rezultat celula fungică este distrusă prin acțiunea peroxizilor endogeni. Acest mecanism unic oferă un potențial foarte redus pentru dezvoltarea rezistenței față de acest preparat [166]

Printre compușii cu un alt mecanism de acțiune antifungică decât cele descrise sunt și acizii organici cum ar fi acizii caprilic, salicilic, undecilic, propionic și benzoic. Aceștia prezintă activitate antifungică prin interacțiunea cu componentele nespecifice din membranele celulare. Acizii organici cu catenă medie și scurtă sunt cunoscuți ca compuși antimicrobieni, iar acizii aromatici cum ar fi acidul benzoic, și-au găsit aplicare în calitate de conservanți în produsele alimentare pe baza proprietăților lor antifungice. Acidul sorbic este un agent antimicotic, care demonstrează activitate cu spectru larg împotriva drojdiilor și mucozităților. O mare parte dintre compușii nominalizați au în calitate de țintă de acțiune diferite etape de sinteză a biotinei, care este esențială pentru metabolismul fungic [104].

Unele preparate naturale, ca haloprogina, partea activă a căreia este alicina, pare să aibă un mod de acțiune bazat pe capacitatea sa de a traversa membrana celulară și de a se combina cu grupări care conțin sulf din structura aminoacizilor și proteinelor. Mai des efectele acestui preparat sunt asociate cu faptul, că alicina blochează activitatea glutatationului [42].

O parte din mecanismele de activitate antifungică se referă nu atât la acțiunea directă asupra fungilor, cât la modelarea interacțiunii gazdă – patogen. În special printre agenții antifungici naturali foarte des este remarcat faptul că aceștia stimulează imunitatea celulară a macroorganismului afectat. Aceste efecte au fost urmărite în procesul de studiu a acțiunii uleiului de arbore de ceai, uleiului de citroneală, uleiului din portocale, uleiului de palmarosa, uleiurilor de lămâie și mirt, uleiului de nucă de cocos - toate prezentând activitate antifungică pronunțată. Se presupune că aceste substanțe ar putea acționa prin modificarea proprietăților membranare și compromiterea funcțiilor asociate membranei. Extractul din frunze de olive stimulează procesul de fagocitoză a fungilor în organism [173].

La această categorie de preparate putem adăuga încă foarte multe, pentru care este cunoscut că acționează asupra ATP-azelor membranare, asupra diferitor verigi ale procesului transducției de semnal, lanțurilor transportoare de electroni și altor etape metabolice de importanță vitală, dar toate acestea necesită cercetări suplimentare, deoarece afectează elemente comune ale metabolismului fungic și cel uman, și deci, nu întrunesc cerințele față de un agent antifungic ideal.

Clasificarea preparatelor antifungice în baza structurii chimice permite evidențierea următoarelor grupuri [59, 83]:

1. Polienele (afotericina, nistatina, hamicina);
2. Azolele (ketoconazolul, clotrimazolul, oxiconazolul, miconazolul, itraconazolul, voriconazolul ș.a.);
3. Alilaminele (terbinafina, butenafina);
4. Flucitozina;
5. Echinocandinele (caspongina, anidulafungina, micafungina ș.a);
6. Alți agenți antifungali topici (tolnaftatul, acidul benzoic ș.a).

Această clasificare, spre deosebire de prima, este bazată pe structura componentei active a medicamentului, și nu pe modul lor de acțiune. Din această cauză, mai multe grupuri structurale de compuși antifungici au aceeași țintă și mecanisme foarte similare de acțiune. Primele trei grupuri (polienele, azolele și alilaminele) au drept țintă ergosterolul, asupra căruia acționează pe diferite căi. Astfel, azolele (de ex. fluconazolul, voriconazolul și posaconazolul) și alilaminele

(de ex. terbinafina) inhibă biosinteza ergosterolului, în timp ce polienele (de ex. amfotericina B) se leagă de ergosterolul din componența membranei citoplasmatică, ceea ce duce la formarea porilor și modificarea permeabilității membranare [5].

Flucitozina (5-fluorocitozina) inhibă metabolismul pirimidinic și sinteza ADN-ului, iar echinocandinele (caspofungina, anidulafungina, micafungina) sunt agenți cu activitate vis-a-vis de peretele celular, blocând sinteza β -1,3-D glucanului, care este componentul structural major al peretelui celular la fungi [39, 51, 57].

În tratamentul infecțiilor fungice sistemice se utilizează un număr limitat de medicamente antimicotice disponibile, care formează patru clase diferite [99]: (a) macrolide polienice care modifică funcțiile membranare ale agentului patogen; (b) derivați azolici care inhibă demetilaza 14 α -lanosterolului, o enzimă cheie în biosinteza ergosterolului; (c) inhibitori ai sintezei ADN-ului și ARN; și (d) inhibitori ai sintezei 1,3- β -glucanului.

1.2. Mecanisme de rezistență dezvoltate de fungii patogeni

Utilizarea pe scară largă a preparatelor antifungice este unul dintre factorii care facilitează apariția rezistenței. Apariția rezistenței dobândite la speciile prevalente de fungi patogeni 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 rezistenței la preparatele antifungice în prezent rămâne în urmă cu mult față de cel al rezistenței la preparatele antibacteriene. Din aceste motive atenția cercetătorilor este concentrată 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 [57, 115].

Rezistența antifungică este specifică atât tulpinilor de patogeni primar rezistente (care sunt din start insusceptibile ori puțin susceptibile la acțiunea anumitor agenți), cât și celor secundar rezistente (care capătă această rezistență ca urmare a expunerii la acțiunea agenților antifungici). Printre factorii care duc la formarea rezistenței secundare sunt:

- aplicarea tratamentelor antifungice persoanelor cu statut imun compromis, la care cel mai des aceste tratamente eșuează, iar infecția fungică este combătută fără a beneficia de un răspuns imun al organismului [20];
- prezența în corp a cateterelor, valvelor artificiale și altor dispozitive chirurgicale favorizează aderarea fungilor patogeni și formarea filmelor rezistente [23];

- aplicarea în tratamente a dozelor improprii - mai mici decât cele suficiente pentru a se manifesta ca fungicide [38].

Microorganismele dezvoltă mecanisme comune pentru a contracara efectele fungicide sau fungistatice ale preparatelor antifungice din toate clasele. În prezent se consideră, că rezistența la medicamente a fungilor se bazează pe trei mecanisme principale, și anume: (a) reducerea acumulării medicamentului în interiorul celulei fungice, (b) reducerea afinității medicamentului față de ținta sa și (c) modificarea metabolismului în scopul de a contrabalansa efectul medicamentului [176].

Mecanismele moleculare ale rezistenței primare sunt extrem de diverse și specifice fiecărui agent antifungic. În prezent sunt acumulate numeroase date despre rezistența fungilor patogeni la acțiunea diverselor preparate medicamentoase. Unul dintre cele mai răspândite mecanisme de rezistență antifungică este procesul mutagen ori superexpresia enzimelor implicate în biosinteza ergosterolului: enzima lanosterol 14a-demetilaza citocrom P450-dependentă (cunoscută ca Erg11 la drojdii, de ex. la *Candida albicans* și *Cryptococcus neoformans*, și ca Cyp51A la fungii miceliali, ca de ex. *Aspergillus fumigatus*). Azolele se leagă cu fragmentele ferice ale site-urilor de legare a hemului și blochează substratul natural al enzimei - lanosterolul, perturbând astfel procesul de biosinteză [115]. Rezistența la azole care vizează membrana celulară poate apărea prin mai multe mecanisme, inclusiv superexpresia sau modificarea țintei preparatului, suprareglarea activității transportatorilor, sau inducerea modificărilor celulare care reduc toxicitatea medicamentului sau induc toleranță față de medicament. În caz de suprareglare a transportorilor membranari are loc o superexpresie a genelor Cdr1, Cdr2 și Mdr1, iar în cazul răspunsului la stresul celular se înregistrează mutații în Erg3 ori în mediatorii răspunsului celular Hsp90, Sgt1, KDACs, PKC [38].

Mecanismele moleculare de rezistență la poliene (de ex. amfotericină B) sunt diferite de cele descrise pentru azole. Polienele se leagă de ergosterolul din membrana celulară. Ca urmare, se formează pori, care afectează permeabilitatea și în cele din urmă provoacă moartea celulei. Mecanismele de rezistență la amfotericina B nu sunt bine înțelese, dar s-a stabilit, că epuizarea conținutului de ergosterol în membrana celulei fungice este asociată cu rezistența la acțiunea preparatului, fără a afecta viabilitatea celulară. Aceste deficiențe ar putea fi rezultatul mutațiilor în genele care codifică unele dintre enzimele implicate în sinteza ergosterolului. Astfel, defectarea genei ERG3 conduce la acumularea altor steroli în loc de ergosterol [82].

Flucitozina după pătrundere în celula fungică este convertită în 5-fluorouracil (forma metabolic activă), care inhibă replicarea ADN-ului și sinteza proteinelor. Mecanismele moleculare de rezistență la flucitozină se datorează mutațiilor în enzima permeaza purin-

citozinică (codificată de gena *FCY2*), care este responsabilă pentru gradul de utilizare a medicamentului în celulă; sau mutațiilor enzimei citozin-deaminaza (codificată de gena *FCY1*), care este responsabilă pentru transformarea în 5-fluorouracil. Un alt mecanism molecular al acestui tip de rezistență este mutația enzimei uracil fosforiboziltransferaza, care este responsabilă pentru transformarea 5-fluorouracilului în 5-fluorouridină monofosfat (codificată de gena *FUR1*). Aceste mecanisme au fost stabilite în special pentru *C. albicans* [51, 186].

Acțiunea antifungică a alilaminelor, dintre care și terbinafina se bazează pe inhibarea sintezei ergosterolului prin blocarea enzimei squalen epoxidaza. Ca rezultat are loc o supraacumulare a squalenei în membrana celulară a fungilor care provoacă mărirea permeabilității membranare și moartea celulelor. Rezistența la terbinafină se datorează unei mutații în gena squalen epoxidaza care conduce la substituția aminoacidică L393F și F397L; această mutație a fost depistată la tulpinile de *Trichophyton rubrum* rezistente la terbinafină [120,121]. Înlocuirea fenilalaninei cu leucină în poziția 391, în squalen epoxidază la *Aspergillus nidulans* și mutația echivalentă în gena *ERGA* la *Aspergillus fumigatus*, rezultând dintr-o substituție F389L, conferă rezistență la terbinafină [144].

Peliclele biologice (biofilmele) sunt una dintre formele cele mai prevalente de creștere microbiană în natură, și multe dintre speciile patogene de drojdii și fungi miceliali se caracterizează prin asemenea tip de creștere. Biofilmele prezintă o structură tridimensională ce cuprinde o rețea densă de celule de drojdii și fungi filamentoși, celulele fiind încorporate într-o matrice exopolimerică, ce constă din carbohidrați, proteine și acizi nucleici. Matricea este o caracteristică majoră care distinge biofilmele de celulele solitare. Biofilmele sunt intrinsec rezistente la acțiunea preparatelor antifungice, în special la cea a azolelor, iar mecanismele rezistenței sunt multifactoriale și implică inducerea transportatorilor de eflux de preparate, precum și sechestrarea acestora în matricea externă [138]. Efluxul activ al preparatelor antifungice poate fi indus prin suprareglarea genelor *CDR* și *MDR* [109, 137]. Cu toate acestea, sechestrarea medicamentelor în matricea extracelulară este factorul determinant în fenotipurile cu rezistență multiplă [112]. Un element constitutiv esențial al biofilmelor este β -1,3-glucanul, care este produs de către enzima glucan sintaza. Componentele *Smi1*, *Rlm1*, *Rho1* și *Fsk1*, reglementează biosinteza β -1,3-glucanului și producția de matrice. Alte proteine celulare, cum ar fi factorul de transcriere *ZAP1*, alcool - dehidrogenazele *Adh5*, *Csh1* și *Ifd6*, precum și glucoamilazele, *CaGca1* și *CaGca2*, de asemenea, sunt implicate în generarea rezistenței antifungice determinate de matrice [38].

Rezistența antifungică este asociată cu multiple modificări genomice, inclusiv pierderea caracterului heterozigot (loss of heterozygosity - LOH) în anumite regiuni genomice specifice,

creșterea numărului de copii ale cromozomilor, precum și aneuploidiile segmentare sau cromozomiale. LOH este specifică pentru regiunile care conțin elemente de rezistență, inclusiv *ERG11*, *TAC1*, sau *MRR1* [37, 149]. Prevalența aneuploidiilor în izolate azol-rezistente indică asupra unei posibile selecții a variantelor aneuploide mai rezistente în condiții de expunere la azole, ori asupra generării *de novo* a aneuploidiilor [72].

Modificări cromozomiale au fost, de asemenea, asociate cu rezistența la *Candida glabrata* și *Candida neoformans*, care achiziționează rezistența față de azole prin creșterea numărului de copii *ERG11*. Formarea de aneuploidii noi este asociată cu disomii ale cromozomilor 1 și 4. Cromozomul 1 conține două determinante ale rezistenței și anume gena *ERG11* și gena *AFR1* [161].

Rezistența la preparatele antifungice la unele dintre tulpinile de *Candida glabrata* este asociată cu disfuncții mitocondriale, exprimate în pierderea parțială ori completă a ADN-ului mitocondrial [67]. Acești mutanți sunt înzestrați cu rezistență intrinsecă la preparatele antifungice generată de suprareglarea activatorilor de transcripție (CgPDR1 în *Candida glabrata*) și genelor ținta.

Unul dintre mecanismele de rezistență la acțiunea preparatelor antifungice este intensificarea sintezei chitinei care este un mecanism important prin care celulele fungice supraviețuiesc în caz de expunere la echinocandină. Expunerea *Candida albicans* la acțiunea nivelurilor scăzute de echinocandină induce supraexpresia genei chitin sintaza și conduce la un conținut de chitină ridicat, reducând din eficacitatea echinocandinei [182]. Această creștere compensatorie a conținutului de chitină în peretele celular este coordonată de elementele *PKC*, *HOG* și calea de semnalizare a calcineurinei [110]. Activarea chitin sintazelor *Chs2* și *Chs8* permite supraviețuirea celulelor fungale la acțiunea dozelor letale de echinocandină [39]. Conținut sporit de chitină ca urmare a expunerii la acțiunea echinocandinei a fost, de asemenea, observat în *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida guilliermondii* și *Candida krusei* [183]. Rezistența la acțiunea echinocandinei este atribuită mutațiilor în gena *FKS1* și este asociată de asemenea cu un nivel ridicat de chitină, chiar și în lipsa creșterii compensatorii a nivelului acestui component ca rezultat al expunerii la acțiunea echinocandinei [183]. Creșterea conținutului de chitină conferă, de asemenea, sensibilitate redusă la echinocandină în caz de infecție sistemică [93]. Același mecanism de supersinteză a chitinei este specific și pentru genul *Aspergillus*, însă în acest caz aceasta duce la dezorganizarea structurii peretelui celular și la un efect invers, de reducere a rezistenței la echinocandină [81].

Semnalizarea în domeniul integrității peretelui celular este reglată de *Hsp90* și este esențială pentru sinteza chitinei, cu efecte profunde asupra toleranței la echinocandină.

Eliminarea genelor care codifică componentele de integritate ale peretelui celular, cum ar fi *WSC1*, *PKC1*, *BCK1* și *SLT2*, conferă hipersusceptibilitate la echinocandină [102, 142]. Defectele în integritatea peretelui celular, cum ar fi cele induse de echinocandine, sunt determinate de defectarea proteinelor transmembranare ale familiei *WSC* și *Mid2*, care apoi activează *GTP-aza Rho1*. *Rho1* efectuează reglarea pozitivă a mai multor efectori, inclusiv *Pkc1*, și țintele echinocandinelor *Fks1* și *Fks2* [155].

În concordanță cu importanța semnalizării despre integritatea peretelui celular în rezistența la echinocandină, a fost stabilit, că inhibitorii selectivi ai kinazei *Pkc1* fungice sunt sinergici cu echinocandina împotriva *C. albicans* [168]. Inhibitorul protein kinazei staurosporina este de asemenea sinergic cu echinocandina împotriva genurilor *Candida* și *Aspergillus* [91, 101, 102]. Astfel transducția de semnal care apreciază integritatea peretelui celular este esențială pentru formularea răspunsului peretelui la stresul indus de echinocandină, dar și pentru formularea răspunsului membranei celulare la stresul indus de azole [91], fiind elementul central în medierea rezistenței la acțiunea preparatelor antifungice.

Astfel, putem conchide, că în prezent culturile fungilor patogeni posedă un arsenal impresionant de mecanisme intrinseci și dobândite de asigurare a rezistenței față de acțiunea celor mai eficiente preparate antifungice. Din aceste motive rămâne deosebit de actuală problema elaborării și implementării unor noi remedii cu efect pronunțat asupra patogenilor și cu efecte adverse minime față de organismul-gazdă.

1.3. Compuși sintetici și naturali cu acțiune antifungică

Efectele adverse, adesea severe, ale tratamentului antifungic în asociere cu rata înaltă de rezistență multiplă a patogenilor dictează necesitatea creării unor noi preparate destinate tratamentului infecțiilor invazive provocate de fungi. Pe lângă acesta, aplicarea activă a fungicidelor în alte domenii decât medicina (agricultură, industria alimentară ș.a) provoacă daune esențiale atât mediului ambiant, cât și sănătății omului. Din aceste considerente, cercetările orientate spre evidențierea unor compuși naturali cu activitate antifungică au devenit deosebit de actuale în ultimele două decenii. Aplicarea compușilor fitochimici cu acțiune antifungică prezintă o alternativă atractivă atât pentru medici, cât și pentru pacienți. La moment se cunosc mai multe clase de compuși bioactivi cu rol de metaboliți secundari ai plantelor, care posedă activitate antifungică: terpenele, taninurile, flavonoidele, uleiurile esențiale, alcaloizii, lecitina, diverse polipeptide ș.a [31].

Evoluția filogenetică a plantelor ca parte componentă a ecosistemelor, din care fac parte și numeroase specii de fungi a dus la apariția mecanismelor naturale de protecție, inclusiv contra

fungilor fitopatogeni. Aceste mecanisme includ în primul rând, sinteza unor compuși care posedă proprietatea de a inhiba dezvoltarea miceliului, de a inhiba germinarea sau de a reduce intensitatea sporulării la fungii patogeni. Compușii cu activitate antifungică de obicei nu au funcții directe în procesul de transport, respirație, fotosinteză, creștere și multiplicare, biosinteza constituenților celulari ori alte procese vitale și sunt specifici anumitor grupuri sistematice aparte. Impresionează și diversitatea mecanismelor de acțiune ale acestor compuși, fiind acoperite toate domeniile asupra cărora acționează compușii chimici. Mai mult ca atât, deoarece de cele mai multe ori plantele conțin mai mulți agenți antifungici concomitent, acțiunea acestora asupra patogenilor este foarte complexă și multidimensională.

Cei mai numeroși compuși cu activitate antifungică de origine vegetală fac parte din categoria *fenolilor*. Acest grup este extrem de heterogen, incluzând peste 10 mii de compuși. Proprietățile lor sunt la fel, extrem de diverse. Unii sunt solubili numai în solvenți organici, alții sunt solubili în apă, iar o parte, care au structură polimerică sunt insolubili. În anumite structuri sunt incluse diferite grupuri funcționale active, care sporesc atât solubilitatea, cât și activitatea biologică a fenolilor respectivi. O mare parte a acestor substanțe sunt prezente în extractele de frunze, scoarța de copac, lemn, fructe și alte țesuturi de ferigi, plante gimnosperme și angiosperme. Fenolii îndeplinesc funcții importante în plante, iar una dintre acestea este rezistența la microorganisme (inclusiv fungi), insecte și animalele erbivore, care le pot afecta, astfel contribuind la păstrarea integrității plantelor în procesul de expunere continuă la factorii de stres din mediu, inclusiv radiații ultraviolete, temperaturi relativ ridicate și deshidratare. În special polifenolii au proprietăți antioxidante puternice, ceea ce îi face activi în lupta contra stresului și a radicalilor liberi.

Compușii fenolici din plante au acțiune antifungică înaltă față de diferite specii (*Penicillium italicum*, *Penicillium expansum*, *Monilinia laxa*, *Aspergillus carbonarius*, *Botrytis cinerea*, *Monilinia fructicola* ș.a.) [55]. Modul de acțiune a fenolilor asupra fungilor levuriformi și asupra celor filamentozii este diferit [11]. Astfel, fungii dimorfi din genul *Candida* sunt afectați de compușii fenolici la nivel de tranziție de la o formă la alta. De exemplu, compușii fenolici din frunzele de *Baseonema acuminatum*, din scoarța rădăcinii de *Lycium chinense*, *Sida urens* și din *Curcuma longa* au demonstrat acțiune antifungică pronunțată față de diferite tulpini de *Candida albicans*. Efectul acestora se asociază cu creșterea cantității de specii reactive ale oxigenului și azotului în celulele fungice, cu localizare preponderentă în zona membranelor, ceea ce induce apoptoza timpurie. Este foarte important, că efectele sunt ireversibile și nu pot fi înlăturate prin acțiunea antioxidantilor [11, 191]. *Arthrospira platensis* (spirulina) este o cianobacterie utilizată pe larg în calitate de sursă de proteină, dar și de substanțe cu activitate biologică înaltă, inclusiv

antivitală, antibacteriană și antifungică [18, 49, 134]. Extractul fenolic din *Spirulina platensis* are influență pronunțată asupra producerii de componenți structurali la *Aspergillus flavus*. La concentrația fenolilor de 1,15 mg la g de *Spirulina platensis*, are loc diminuarea cantității de glucozamină în biomasa fungică cu 56%. Astfel, biomasa de spirulină și extractele alcoolice din ea posedă acțiune antifungică față de *Aspergillus flavus* [106]. Extractele hidrice purificate și concentrate din spirulină au manifestat acțiune antifungică pronunțată față de fungii miceliali *Penicillium oxalicum* (91% inhibiție) și *Fusarium solani* (65% inhibiție) [18]. Extractul metanolic din biomasa uscată de spirulină posedă activitate antifungică față de *Aspergillus flavus* și *Aspergillus niger* [134]. Autorii sus menționați subliniază, că mecanismele de acțiune a extractelor din spirulina asupra fungilor filamentoși sunt bazate pe inhibarea sintezei ergosterolului, glucozaminei și proteinelor.

Extractul din *Curcuma longa* este extrem de eficient contra tulpinilor de *C. albicans*. Mecanismul care stă la baza efectului antifungic menționat și care este determinat de curcumină ca parte dominantă a extractului, este bazat de inhibarea expresiei desaturazei (ERG3), ceea ce duce la o reducere semnificativă a ergosterolului în celulele fungice. În celule se acumulează precursorii biosintetici ai ergosterolului, ceea ce duce la moartea celulelor prin generarea de specii reactive ale oxigenului (SRO). De asemenea efectul antifungic al curcuminei este susținut și de modificarea proprietăților ATP-azei membranare și acțiunea asupra farnesolului, o moleculă care joacă un rol important în sporirea cantității de SRO [194]. Astfel, pentru tratarea candidozelor au fost utilizați cu succes compușii curcumina, bisbibenzilul, carvacrolul și timolul, mecanismele de acțiune ale cărora constau în generarea de SRO, blocarea transferului dimorfic și formării biofilmelor [11].

Asupra fungilor filamentoși compușii fenolici de asemenea, au activitate antifungică. Structura compușilor fenolici este de așa natură, încât aceștia pot difuza prin membrana celulară și pătrunde în celulă, unde intervin în căile metabolice prin interferarea cu sinteza de ergosterol, glucan, chitină, proteine și glucozamină. Contra diferitor specii de *Aspergillus* au fost utilizați cu succes compușii fenolici eugenolul, carvacrolul și timolul, care și-au realizat acțiunea datorită modificării fluidității membranelor fungice [11, 191].

Dintre compușii fenolici taninele hidrolizabile sunt și ele recunoscute ca substanțe cu activitate antifungică. În special, a fost stabilit efectul lor asupra fungilor filamentoși *Epidermophyton floccosum*, *Microsporum canis*, *Microsporum gypseum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton tonsurans*, *Trichophyton terrestre*, *Penicillium italicum*, *Aspergillus fumigatus*, *Mucor racemosus*, *Rhizopus nigricans*, precum și asupra fungilor levuriformi oportunist patogeni *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida*

krusei, *Cryptococcus neoformans* [92]. Acțiunea biologică a acestor compuși asupra fungilor este asociată cu formarea legăturilor stabile dintre tanine și proteinele din componența celulelor fungice, care duce la inactivarea enzimelor și degradarea proteinelor structurale [111]. Taninele condensate (numite și proantocianidine) sunt polimeri ai 3-flavanolului și 3-4 flavan diolului (catehină și leucoantocianidine). Aceste substanțe cu solubilitate redusă manifestă proprietăți biologice, printre care și antifungice. Eficiența acestor substanțe este deosebit de pronunțată asupra speciilor de patogeni care formează filmuri, prin dezagregarea acestora.

Terpenozii sunt un alt grup de compuși naturali, care sunt cunoscuți pentru multiple efecte biologice, printre care și cel antifungic. Ei alcătuiesc cea mai mare clasă de produse secundare vegetale, majoritatea fiind insolubili în apă. Terpenozii sunt sintetizați din metaboliții primari prin intermediul a cel puțin două căi diferite. Una dintre ele este calea acidului mevalonic, în cadrul căreia trei molecule de acetyl CoA sunt condensate pas cu pas, pentru a forma acidul mevalonic. Această moleculă cu șase atomi de carbon este pirofosforilată și deshidratată pentru a forma izopentil difosfatul, care este unitatea de bază a terpenozilor. Cealaltă cale se numește calea metileritritol fosfatului și funcționează în cloroplaste și alte plastide. Toate terpenele sunt derivate din unirea a cinci atomi de carbon – elemente cu scheletul de carbon ramificat de tip izopentan. Elementul structural de bază al terpenelor se mai numește și izopren. La temperaturi înalte terpenozii se descompun cu formarea de izoprene. Terpenele sau isoprenozii sunt clasificați în funcție de numărul de unități formate din cinci de carbon pe care le conțin, de exemplu: terpenele cu 10 atomi de carbon, care conțin două C_5 unități, sunt numite monoterpene; terpenele cu 15 atomi de carbon (trei unități C_5) sunt sesquiterpene; și terpenele cu 20 atomi de carbon (patru unități C_5) sunt diterpene. Terpenele superioare mai includ triterpenele (30 atomi de carbon), tetraterpenele (40 atomi de carbon) și politerpenele ($[C_5]_n$ atomi de carbon, unde $n > 8$) [31].

Dintre monoterpene, o acțiune antifungică înaltă o au diferite substanțe cum sunt geraniolul, nerolul, citralul, neralul și geranialul. Aceste substanțe s-au dovedit a fi foarte active contra dermatofitelor filamentoși și levurilor oportuniste patogene, nivelul maxim de activitate fiind exprimat asupra dermatofitelor, în special asupra tulpinilor ce se referă la *Trichophyton rubrum*. Mecanismul de acțiune a acestor substanțe este explicat prin afinitatea lor față de ergosterol, ceea ce duce la modificarea fluidității membranelor fungice [13, 105].

O mare varietate de metaboliți secundari produși de plante au în structura lor atomi de azot. În această categorie intră numeroase substanțe cu funcții de protecție ca alcaloizii, aminele, glicozidele cianogenice, aminoacizii, glucosinolatele, alkamidele și peptidele. Cei mai mulți metaboliți secundari azotați sunt sintetizați din aminoacizi [31].

Multe specii de plante produc *alcaloizi*, care se caracterizează prin activitate antifungică. Una și aceeași specie poate produce uneori zeci de alcaloizi diferiți cu spectru larg de acțiune. De exemplu, plantă medicinală chineză *Kopsia hainanensis* produce 15 alcaloizi indolici, care manifestă activitate antifungică față de *Erwinia carotovora*, *Fusarium oxysporum* cu intensitate mai înaltă decât cea a preparatelor de referință [34]. Din părțile aeriene ale plantei *Waltheria indica* prin extracție în diclormetan au fost obținuți 11 alcaloizi quinolonici cu activitate antifungică față de *Candida albicans* (CMI <32 μg/ml). Examenul microscopic al fungilor levuriformi tratați cu acești compuși a pus în evidență multiple devieri de la structura morfologică normală [40]. Alcaloizii cu conținut de oxepină de origine microbiană posedă activitate antifungică înaltă față de fungii fitopatogeni, ceea ce îi face atractivi pentru dezvoltare în domeniul agrochimiei [185].

Peptidele antimicrobiene (PAM) naturale reprezintă, probabil, una dintre primele forme de succes în apărarea chimică a celulelor eucariote împotriva bacteriilor, protozoarelor, fungilor și virusurilor [158]. Peptidele antimicrobiene, inclusiv antifungice, fac parte din sistemul imunitar înăscut și practic toate organismele celulare – de la bacterii la om – produc aceste peptide, care asigură integritatea organismului. Clasificarea PAM se face în baza modului lor de acțiune. În special, acestea se divid în peptide antifungale litice și peptide care se implică în sinteza componentelor peretelui celular. Peptidele litice sunt de obicei amfipatice – adică conțin o componentă cu sarcină pozitivă și o a doua parte neutră și hidrofobă. Unele peptide amfipatice se leagă doar de suprafața membranei fungice și pot deteriora structura acesteia fără a pătrunde în interiorul celulei și deci, fără a traversa membrana citoplasmatică. Altele traversează membrana și interacționează în mod specific cu diferiți constituenți celulari. Mai sunt și peptide amfipatice care sunt capabile de a agrega, formând pori cu diametru variabil, prin care pot trece diferite substanțe solubile în apă și ioni metalici.

Cel de-al doilea grup de peptide include substanțe care se includ direct în structura peretelui celular, deteriorându-l, ori, implicându-se în procesele de biosinteză a manoproteinelor, glucanilor și chitinei [44]. Pe lângă acestea, au mai fost descrise și alte mecanisme de acțiune a peptidelor antifungice, cum ar fi internalizarea mediată de receptori cu inducerea cascadelor de semnalizare, interacțiunea cu țintele intracelulare, inclusiv formarea speciilor reactive ale oxigenului, care duce în cele din urmă la apoptoză [43, 158]. La acest grup al peptidelor antimicrobiene de substanțe se referă și peptidele cationice scurte. S-a demonstrat, că acestea posedă activitate nocivă față de un mare număr de virusuri, bacterii Gram-pozitive și Gram-negative, paraziți, dar și fungi. Pe lângă capacitatea de a ucide celulele agresorului, peptidele cationice sunt capabile să modifice răspunsul imun al organismului – de exemplu pot preveni

șocul septic în caz de infecție. Surse naturale de astfel de peptide sunt diferite țesuturi. De o popularitate înaltă se bucură învelișurile epiteliale ale amfibienilor, care conțin cantități însemnate ale acestor compuși, dar și o varietate mare de peptide individuale [100].

În ciuda acestor constatări despre acțiunea peptidelor antimicrobiene și importanța lor potențială pentru sănătatea umană, există doar o înțelegere limitată a modului antimicrobian de acțiune, în special pentru peptidele scurte. Se presupune că site-ul principal al interacțiunii dintre peptidele cationice și bacterii este membrana. Din ce în ce mai elocvent este dovedit că peptidele cationice au obiective de acțiune intracelulare. Cu toate acestea, interacțiunea cu membrana încărcată negativ, de asemenea, pare a fi un prim pas important în realizarea efectului lor biologic. Peptidele cationice scurte cu catena din 6 - 18 aminoacizi nu numai că posedă activitate antifungică înaltă, dar mai pot fi considerate modele perfecte pentru studiul proprietăților antifungice. A fost propus un model de evaluare rapidă a eficienței peptidelor cationice scurte naturale și modificate, utilizând în calitate de model fungii miceliali din specia *Aspergillus nidulans*, biologia cărora este practic similară cu cea a fungilor oportunist patogeni *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger*. Acest model a permis de a scoate în evidență proprietățile antifungice ale peptidelor, care anterior erau cunoscute doar ca antibacteriene [100].

Ultimele decenii se caracterizează prin acumularea intensă a noilor cunoștințe despre peptidele antimicrobiene. Dacă în trecut se considera, că acestea posedă doar acțiune antimicrobiană, în prezent se cunoaște un spectru larg de funcții fiziologice ale lor. Defensinele sunt cele mai des întâlnite peptide antimicrobiene, prezente în toate tipurile de organisme eucariote. Activitatea antifungică a acestei PAM a fost demonstrată de numeroase ori, astfel deschizând noi căi de aplicare practică a acestora în diferite domenii, dar prioritar – în medicină. Cu toate acestea, există anumite dificultăți obiective în ceea ce ține de elaborarea de noi medicamente în bază de defensină. În primul rând este vorba despre caracterul cationic amfifilic și labilitatea proteazică, care duce la eliminarea rapidă a medicamentului din lichidele circulate și limitează administrarea sistemică a acestuia. Cu toate acestea, defensina combină activitatea antimicrobiană, inclusiv antifungică cu capacitatea de a modula în mod pozitiv activitatea sistemului imunitar, și s-a dovedit a fi eficientă pe durata evoluției biologice, ceea ce face această peptidă extrem de atrăgătoare ca o strategie anti-infecțioasă [158].

Preparatele de origine naturală și derivatele lor sintetice ocupă o nișă aparte, fiind în centrul atenției atât pentru efectele biologice pronunțate și efectele adverse minime, cât și pentru faptul, că sunt acceptate mai ușor de către pacienți. Biomasa diferitor plante, animale și microorganisme este examinată în calitate de materie primă pentru extragerea compușilor cu un

potențial efect fungicid ori fungistatic, de perspectivă pentru elaborarea de medicamente de nouă generație.

1.4. Noi strategii în design-ul substanțelor cu acțiune antifungică

Cu toate că în ultimele două decenii calitatea terapiilor antifungice s-a îmbunătățit simțitor, fenomenul rezistenței rămâne în continuare o preocupare majoră în practica clinică. În ultimii 10 ani, mecanismele moleculare care stau la baza acestui fenomen au fost revăzute și au fost aprofundate cunoștințele în acest domeniu. Tratamentele antifungice curente sunt limitate în capacitatea lor de a trata infecțiile, în special cele sistemice, iar abordări principial noi în acest domeniu nu au apărut. Deci sunt necesare abordări noi în ceea ce ține terapiile eficiente, dar și arsenalul agenților antifungici. Cercetătorii sunt în permanentă căutare a unor soluții noi, care să îmbunătățească simțitor situația creată.

În cea mai mare parte eforturile științei sunt orientate spre descoperirea de noi medicamente antifungice, fie prin testarea compușilor deja existenți de origine chimică, a diferitor compuși din surse naturale, precum și prin combinarea preparatelor deja existente cu scopul de a descoperi efecte sinergiste, care să permită amplificarea proprietăților compușilor cunoscuți. Pe de altă parte, o importanță majoră o are cunoașterea biologiei fungilor, căile metabolice realizate în celula fungică și elemente unice, prezente doar în acest tip de celule, particularitățile de creștere în condiții de laborator și în condiții naturale, elementele esențiale ale interacțiunii dintre patogen și organismul gazdă. Toate aceste elemente, fiind întrunite într-o strategie comună, ar fi capabile să direcționeze procesele de cercetare în direcția elaborării unor terapii sigure care să ofere soluții pentru infecțiile grave provocate de fungi multirezistenți [176]. Identificarea de noi antimicotice se realizează în principal prin screening-ul colecțiilor de compuși chimici naturali sau sintetici. Descoperirea de noi obiective antifungice prezumtive se realizează prin intermediul unor abordări genomice pentru o mai bună înțelegere a biologiei fungilor patogeni umani.

În conceptul actual clasic 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 multirezistenți [5].

În compartimentul precedent am arătat marea varietate a compușilor naturali care posedă activitate antifungică. Este evident, că în prezent a fost studiată doar o mică parte a compușilor naturali, care ar putea servi în calitate de punct de pornire pentru elaborarea noilor preparate antifungice. Corespunzător, cele mai mari eforturi se întreprind anume pentru evidențierea

proprietăților antifungice a diferitor compuși naturali izolați din plante, animale, microorganisme, inclusiv marine [15, 27, 177, 193]. Strategiile în procesul de screening pot fi și ele diferite. Astfel, unii compuși pot fi investigați deoarece se cunosc mecanismele lor de acțiune, ori cel puțin se cunosc mecanismele de acțiune ale unor compuși din același grup chimic, sau din grupuri înrudite. O altă strategie este testarea oarbă, care uneori poate aduce rezultate spectaculoase. Cu părere de rău, însă, trebuie să menționăm, că până în prezent aceste strategii nu au oferit nici un compus, care prin proprietățile sale ar fi asigurat transferul de la idee, la un medicament introdus în terapia antifungică.

O altă serie de investigații care se realizează preferențial *in vitro*, este orientată spre utilizarea unor compuși chimici cunoscuți și aplicați în prezent în practica clinică în diferite combinații, astfel ca să fie evidențiate efecte sinergiste, iar mai apoi, să fie studiate mecanismele de realizare a acestora. Astfel, o serie de cercetări a fost orientată spre amplificarea efectului antifungic al fungistaticului fluconazolul asupra agentului cauzal al micozelor oportuniste *Candida albicans* [54, 96, 98]. În cadrul screening-ului de acest tip nu numai că se pun în evidență perechi sinergiste de medicamente, dar sunt descifrate uneori mecanisme principial noi, încă necunoscute ale efectelor comune generate de administrarea concomitentă a preparatelor. Astfel, a fost descoperită calitatea unor compuși - inhibitori ai calcineurinei și căii metabolice TOR, inhibitori ai pompei de eflux (derivații milbemicinei), anticorpi împotriva proteinei șocului termic (*Hsp90*). Inhibitorii calcineurinei au demonstrat efecte nu numai *in vitro*, dar și-au păstrat pe deplin activitatea și *in vivo*, sporind esențial eficiența fluconazolului [176].

Screening-ul substanțelor chimice deja cunoscute și aplicate în anumite domenii poate solda cu identificarea unor proprietăți noi ale acestora. Anume în acest mod a fost descoperit un nou grup de inhibitori al sintezei glucanilor la tulpinile de *Candida albicans* și *Candida glabrata* – cel al piperazinil-piridazinonelor [184].

O direcție foarte importantă de cercetare în screening-ul compușilor chimici pentru detectarea proprietăților antifungice ale acestora este utilizarea în calitate de obiecte de studiu nu a tulpinilor patogene naturale ori de colecție, ci a colecțiilor de mutanți ale speciilor respective. Creșterea tulpinilor de fungi - purtătoare de mutații determinate (cunoscute) în prezența compușilor chimici ori naturali – potențiali inhibitori fungici – asigură nu numai evidențierea compușilor antifungici noi, dar și a genelor implicate în realizarea acestui efect [146].

O altă abordare în screening-ul de noi compuși antifungici este aceea, când se studiază în paralel atât activitatea antifungică a compușilor cunoscuți, cât și nivelul de toxicitate a acestora pentru celulele gazdei. Pentru a realiza astfel de cercetări se recurge la utilizarea în calitate de obiecte de studiu a culturilor de celule infestate. Foarte comode din acest punct de vedere sunt

speciile endoparazitare de fungi – de exemplu, reprezentanții genului *Histoplasma*. În scopul detectării potențialilor candidați pentru tratamentul histoplasmozei, a fost realizat un mega screening, care a inclus peste 3500 compuși chimici disponibili pe piață. Dintre aceștia au fost identificați șapte compuși care au inhibat puternic creșterea drojdiei *Histoplasma*. Astfel, compusul 41F5 are activitate fungistatică împotriva reprezentanților genului *Histoplasma* la concentrații micromolare, cu o concentrație inhibitorie 50% (IC₅₀) de 0,87 pM, și are cea mai mare selectivitate pentru drojdie (cel puțin de 62 ori mai mare) decât față de celulele gazdă. Structural, compusul 41F5 constă dintr-un miez aminotiazolic cu un substituent aciclic în poziția 2 și un substituent aromatic în poziția 5. Compusul 41F5 inhibă creșterea patogenului *Histoplasma* în cultură lichidă și inhibă în mod similar, celulele de drojdie în interiorul macrofagelor, care sunt mediul gazdă real al acestui agent patogen fungic în timpul infecției. Mai mult ca atât, compusul 41F5 protejează celulele gazdă infectate de la moartea indusă de macrofage, ceea ce face acest aminotiazol un candidat excelent pentru dezvoltare de noi antifungice pentru infecțiile provocate de *Histoplasma* [48].

Sinteza de compuși naturali noi cu proprietăți antifungice este posibilă și prin intermediul influenței asupra producătorului. Un exemplu elocvent în acest sens este cazul obținerii nikkoxinelor. Polioxina și nikkomicina sunt antibiotice naturale, peptide nucleozidice cu acțiune antifungică. Ambele prezintă caracteristici structurale similare, având un schelet nucleozidic și unul sau două fragmente peptidil. Prin manipulări ce vizează producătorul de polioxină – actinomiceta *Streptomyces aureochromogenes* - cu importul de calea hidroxipiridil homotreoninei a nikkomicinei a fost posibil de a realiza sinteza a trei substanțe țintă noi – antibiotice nucleozidice, design-ul cărora a fost dirijat - nikkoxinele E, F, și G. Cercetătorii au demonstrat, că introducerea unei copii suplimentare a genei care codifică o Nik_S ligază ATP-dependentă îmbunătățește în mod semnificativ producția de antibiotice de acest tip. Mai mult decât atât, toate cele trei nikkoxine obținute prin procedură de inginerie au manifestat o activitate antifungică mai puternică față de fungii patogeni, decât antibioticele de referință [135].

Am menționat anterior, că structura peretelui celular la fungi este unică. Enzimele biosintetice care efectuează etapele implicate în sinteza chitinei și glucanului, precum și glicoziltransferazele care leagă acești polimeri în componența peretelui celular, nu au omologi la om. Singura etapă care este în prezent vizată de agenții antifungici disponibili comercial este complexul sintazic al β -1,3-glucanului, care este inhibat de echinocandine. Complexul sintazei chitinei este o altă țintă pentru agenții antifungici. Dezvoltarea agenților care afectează sintaza chitinei ca inhibitori necompetitivi, la fel cum echinocandinele afectează sintaza glucanului, ar fi un domeniu de perspectivă foarte util. Diferitele manoziltransferaze și alte glicoziltransferaze

utilizate în aparatul Golgi pentru a sintetiza oligozaharidele și mananele N-legate și O-legate, care sunt atașate la glicoproteinele peretelui celular reprezintă și ele țintă pentru dezvoltarea de medicamente antifungice. Mutanții care au suferit modificări ale genelor implicate în biosinteza acestor oligozaharide se caracterizează prin afectarea gravă a procesului de creștere și a patogenității lor [19].

O altă țintă de perspectivă pentru dezvoltarea domeniului preparatelor antifungice este procesul de generare și atașare a unei ancore GPI (glicozilfosfatidilinozitol) la proteinele peretelui celular. Mutațiile care afectează biosinteza ancorelor GPI și procesului de atașare a acestora sunt letale, demonstrând importanța procesului de ancorare GPI în biosinteza peretelui celular. Deși structura de bază a ancorelor GPI este identică la om și fungi, structurile auxiliare au unele deosebiri în ceea ce ține de numărul și aranjarea spațială a reziduurilor suplimentare de glucide. De exemplu, adăugarea celui de-al patrulea reziduu de manoză la structura de bază este obligatorie pentru sinteza ancorelor GPI în celulele de drojdii, dar nu și în celulele umane. Medicamente care vizează în mod specific anume acest pas în biosinteza ancorelor GPI ar putea fi eficiente în controlul creșterii fungice [27].

Modificarea nemijlocită a structurii peretelui celular la fungi este o altă țintă pentru viitoarele preparate antifungice. De exemplu agentul antifungic pradimicina, se leagă la manoză terminală a oligozaharidelor peretelui celular fungic într-un mod dependent de calciu și afectează membrana plasmatică. Cu toate acestea pradimicina nu este utilizată pentru tratamentul micozelor sistemice, deoarece aceasta poate duce la leziuni hepatice. Derivați pradimicinei dar și alte preparate care se leagă în mod specific la structurile peretelui celular fungic, sunt candidați potriviți pentru medicamente antifungice [189].

Una dintre cele mai perfecte ținte cu referire la peretele celular este grupul de glicoziltransferaze ale peretelui celular care funcționează în spațiul extracelular pentru a asambla și a lega componentele peretelui celular între ele. Agenții care inhibă activitatea transferazelor implicate în legarea β -1,3-glucanilor între ei și cu chitina și glicoproteinele peretelui celular pot fi candidați pentru medicamente cu nivel înalt de specificitate antifungică. Astfel de medicamente nu ar trebui să treacă prin membrana plasmatică pentru a ajunge la site-ul lor de acțiune și ar viza un pas critic în biosinteza peretelui celular [24].

Design-ul molecular și sinteza de noi molecule inspirate din structura și funcțiile defensinelor sau altor tipuri de PAM este de asemenea o abordare promițătoare pentru a dezvolta un domeniu nou și extins de aplicații ale noilor substanțe, nu numai pentru terapia antifungică, dar și pentru posibila lor utilizare ca adjuvanți în vaccinuri [158].

Astfel, identificarea noilor compuși cu proprietăți antifungice, modificarea celor existenți prin anumite procedee, crearea de combinații între compuși din diferite clase și cu diferite funcții, intervenția în mecanismele de interacțiune ale compușilor activi și țintele lor moleculare sunt doar unele direcții, care pot fi considerate clasice, în procesul de elaborare a noilor preparate cu efecte antifungice.

O altă abordare în elaborarea de preparate antifungice noi constă în realizarea cercetărilor genomice extensive. Cercetările de elaborare a preparatelor antifungice noi, îmbunătățirea esențială a celor existente și prevenirea ori limitarea proporțiilor rezistenței antifungice este imposibilă fără cunoașterea perfectă a biologiei fungilor studiați, a căilor metabolice utilizate de acestea și genelor implicate în realizarea reacțiilor din cadrul căilor date. Una dintre posibilitățile de realizare cu succes a acestei cercetări este testarea compușilor selectați nu doar pe tulpini clinice ori de colecție, ci pe colecțiile de mutanți despre care se știe cu exactitate unde este localizată mutația și ce domeniu biochimic atinge. Scopul cercetărilor orientate spre elaborarea de noi compuși antifungici în contextul cercetărilor genomice constă în evidențierea genelor care sunt esențiale pentru supraviețuirea fungilor, și deci sunt niște ținte posibile pentru noile medicamente antifungice [29, 147, 176].

Aplicând două tehnici contemporane GRACE (Gene replacement and conditional expression) și a CPR (conditional promoter replacement) câteva echipe de cercetători au stabilit genele esențiale pentru *Candida albicans* și *Aspergillus fumigatus*. Tehnica GRACE a fost aplicată pentru fungii diploizi *Candida albicans* și constă în eliminarea uneia dintre alele și plasarea celei rămase sub acțiunea condiționată de inducție/supresie. Cea de-a doua tehnică a fost aplicată pentru studiul fungilor haploizi *Aspergillus fumigatus*. După contrapunerea rezultatelor obținute pentru doi fungi diferiți s-a stabilit, că acestea au 57 gene esențiale comune, care mai târziu au fost depistate și în alți fungi patogeni și oportuniști. Zece dintre aceste gene au fost descoperite practic la toți fungii studiați în acest sens (specii de *Paracoccidioides*, *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum* și *Candida neoformans*) dar lipsesc în celulele umane. Funcțiile genelor esențiale se rezumă la asigurarea echilibrului redox, a biogenezei peretelui celular și a sistemelor de transport membranar, biosinteza ergosterolului și reglatorilor de pH [29].

Utilizând colecțiile de mutanți se realizează mai multe tipuri de cercetări orientate spre descoperirea de noi produse cu efect antifungic, dar toate au drept scop intermediar o mai bună înțelegere a modificărilor survenite în fungii studiați sub influența tratamentelor antifungice, precum și a relațiilor care se formează pe durata dezvoltării culturii fungice între aceasta și organismul gazdă pe tot parcursul procesului infectios. Cunoașterea acestor elemente cheie pot

asigura îmbunătățirea tratamentului real pentru a evita dezvoltarea rezistenței și modela relația fungi-gazdă astfel, ca să se perceapă îmbunătățirea procesului de recuperare a pacienților.

Primul tip de investigații vizează studiul acțiunii preparatelor antifungice asupra creșterii tulpinilor de fungi mutanți, modificările care intervin în procesul de transcriere. Rezultatele acestor cercetări de obicei furnizează informații despre mecanismele de acțiune a preparatelor testate, și despre posibilele interacțiuni sinergice între ele. Astfel, de exemplu a fost descoperită implicarea genei care codifică factorul de transcripție *Cas5* în răspunsul fungilor la acțiunea caspofunginei [32]. De asemenea a fost stabilită implicarea genei *AGE3*, care codifică un factor de ADP-ribozilare în toleranța față de fluconazol în *Candida albicans*. Tulpinile mutante în acest locus sunt deosebit de susceptibile la acțiunea acestui preparat antifungic, dar și față de alți inhibitori ai sintezei ergosterolului. Eliminarea genei *AGE3* în izolatele clinice rezistente la medicamente duce la restabilirea sensibilității față de fluconazol. A fost confirmată sensibilitatea dependentă de *AGE3* și un sinergism fungicidal puternic între fluconazol și brefeldina A (un inhibitor al factorului de schimb al nucleotidei guanina pentru factorul ADP-ribozilării) în tipul sălbatic de *Candida albicans* precum și în izolate clinice rezistente la medicamente. Adăugarea de inhibitori de calcineurină la combinația fluconazol / brefeldina A numai inițial mărește rata de distrugere a patogenului. Brefeldina este sinergică și cu alte preparate antifungice, inclusiv și în cazul altor fungi, de exemplu *Aspergillus fumigatus*. Potențialul terapeutic în condiții de inhibare a activităților factorilor de ribozilare (ARFs) a fost demonstrat prin studii *in vivo* care au arătat, că mutanții fungici *AGE3* sunt avirulenți la șoareci de tip sălbatic, și posedă virulență atenuată la șoareci imunocompromiși, iar tratamentul cu fluconazol a fost semnificativ mai eficient atunci când semnalizarea ARF a fost compromisă genetic. Astfel a fost descris un mecanism nou, puternic conservativ, cu un spectru larg, implicat în rezistența la preparatele fungice și nivelul de virulență, și o cale nouă pentru monoterapii și terapii antifungice combinate [50].

Cel de-al doilea tip de investigații cu utilizarea mutanților fungici sunt orientate spre elucidarea particularităților de acțiune a factorilor de mediu, printre care principalii sunt temperatura, pH-ul, salinitatea mediului nutritiv, sursele de carbon utilizate, conținutul de oxigen, asigurarea cu bioelemente metalice, cum sunt fierul, zincul, cuprul, molibdenul, magneziul, necesare pentru funcționarea enzimelor. Rezultatele cercetărilor de acest tip contribuie la completarea cunoștințelor despre biologia fungilor și implicarea anumitor gene în răspunsul la terapia antifungică combinată cu acțiunea factorilor fizici și chimici. De exemplu la *Candida albicans* au fost stabilite două gene implicate în procesul de adaptare la modificarea pH-ului, și anume β -glucozidazele *Phr1* și *Phr2*. Expresia genei *PHR1* are loc în mediu alcalin și neutru, pe

când a genei *PHR2* – în mediu acid. Astfel, gena *PHR1* este implicată în răspândirea infecțiilor sistemice, iar *PHR2* în cele locale, de exemplu – a celor vaginale [103].

Răspunsul la stresul osmotic se exprimă în acumularea intracelulară de glicerol pentru a contracara pierderea apei din cauza gradientului osmotic direcționat spre exterior. Biosinteza glicerolului este mediată de glicerol 3-fosfataza *Gpp1* și glicerol 3-fosfat dehidrogenaza *Gpd2*. Mutanții *gpp1Δ / S* și *gpd2Δ / S* s-au dovedit a avea o capacitate redusă de a distruge celulele epiteliale orale *in vitro*, din cauza incapacității de a genera presiune de turgescență suficientă în hifele, care trebuie să dezvolte o anumită forță mecanică pentru a pătrunde în celulele gazdei [181].

Temperaturile înalte sunt un factor de stres important pentru culturile fungice, iar răspunsul la acestea este modelat la mulți dintre fungii patogeni de proteinele șocului termic. La *Candida albicans* au fost depistate șase gene implicate în sinteza a șase proteine majore: *Hsp104*, *Hsp90*, *Hsp78*, două *Hsp70* (*Ssa1* și *Ssa2*) și *Hsp60*. Gena *HSP104* codifică o proteină a șocului termic, care este strict necesară pentru formarea biofilmelor adecvate, determinând astfel nivelul de virulență. Aceeași genă s-a dovedit a fi responsabilă de un efect similar în modelul de infecție la *Caenorhabditis elegans*. Expresia *HSP90* duce la acumularea proteinei *Hsp90* – o proteină majoră la *C. albicans* care reglează rezistența la preparatele antifungale, morfogeneza, formarea de biofilmuri și virulența [103].

A fost confirmată de asemenea și importanța genelor, care codifică enzimele antioxidante. Este cunoscut, că speciile reactive de oxigen, cum ar fi peroxidul, anionul superoxid și radicalii hidroxil, induc un stres oxidativ. Expresia adecvată a genelor ce codifică catalaza (*CTA1*) și superoxid dismutaza (*SOD1* și *SOD5*) este crucială pentru detoxifierea eficientă în celulele de *Candida albicans*, și sunt necesare pentru virulență. Aceleași enzime sunt strict necesare pentru realizarea virulenței, prin eliminarea SRO formate în mediul extern celulelor fungale [41].

Studiul relației dintre fungii patogeni și gazdă pe durata infecției poate oferi alte informații utile pentru îmbunătățirea tratamentului antifungic. În scopul de a analiza interacțiunile care apar între fungi și gazdă în timpul procesului infecțios, cercetătorii au examinat proprietățile de colonizare ale mutanților nemijlocit în interiorul organismului gazdă. Mai mult de 1200 mutanți diferiți de *Cryptococcus neoformans* au fost studiați *in vivo*, ceea ce a permis de a evidenția în jur de 40 de mutații implicate în realizarea virulenței. Studii similare au fost realizate și cu utilizare a mutanților de *Candida albicans*, ceea ce a făcut posibil de a evidenția numeroase gene implicate în medierea interacțiunii gazdă parazit, și care pot servi în calitate de ținte promițătoare pentru terapiile antifungice [176].

Astfel, în ultimele două decenii au fost completate cunoștințele despre metabolismul fungilor patogeni și despre bazele moleculare ale rezistenței antifungice. Cercetările genomice recente sugerează, că în mare parte rezistența la medicamentele antifungice este determinată de mutațiile punctiforme care vizează țintele moleculare ale preparatelor și factorii de transcriere implicați în interacțiunile preparat antifungic – celulă fungică. În viitorul apropiat, o serie de instrumente de diagnosticare moleculară ar putea fi puse la dispoziția medicilor, astfel ca în primul rând să fie clar din start nivelul de rezistență a patogenului. Aceasta ar permite selectarea adecvată a strategiilor terapeutice și o adaptare rapidă a tratamentului antifungic.

1.5. Concluzii la capitolul 1

1. În tratamentul infecțiilor fungice sistemice se utilizează un număr limitat de medicamente antimicotice disponibile, care formează patru clase diferite: (a) macrolide polienice care modifică funcțiile membranare ale agentului patogen; (b), derivații azolici care inhibă demetilaza 14 α -lanosterolului, o enzimă cheie în biosinteza ergosterolului; (c) inhibitori ai sintezei ADN-ului și ARN; și (d) inhibitori ai sintezei 1,3- β -glucanului.
2. Culturile fungilor patogeni posedă un arsenal impresionant de mecanisme intrinseci și dobândite de asigurare a rezistenței față de acțiunea celor mai eficiente preparate antifungice, ceea ce determină actualitatea problemei elaborării și implementării unor noi remedii cu efect pronunțat asupra patogenilor și cu efecte adverse minime față de organismul-gazdă.
3. Preparatele antifungice de origine naturală sunt apreciate atât pentru acțiunea biologică pronunțată și efectele adverse minime, cât și pentru faptul, că sunt acceptate mai ușor de către pacienți. Biomasa diferitor plante, animale și microorganisme este o materie primă potrivită pentru extragerea compușilor cu un potențial pentru elaborarea de medicamente antifungice de generație nouă.
4. În conceptul actual există mai multe direcții clasice de perspectivă în cercetările orientate spre elaborarea de noi preparate antifungice, printre care se numără sinteza compușilor chimici cu proprietăți predeterminate, depistarea compușilor naturali cu efect antifungic și aplicarea preparatelor complexe polivalente cu efecte asupra mai multor niveluri de rezistență, prezente la culturile de patogeni multirezistenți.
5. Abordarea genetico-moleculară poate oferi instrumente de diagnosticare care apreciază nivelul de rezistență a patogenului, permite selectarea adecvată a strategiilor terapeutice și o adaptare rapidă a tratamentului antifungic.

Analiza surselor bibliografice relevante la tema tezei a permis de a formula ***problema de cercetare*** care a fost pusă în fața acestei lucrări: 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.

Direcțiile de rezolvare a problemei de cercetare au constat în următoarele: realizarea screening-ului unei serii de compuși chimici noi cu conținut de tiosemicarbazone substituite și a unui număr de compuși de origine biologică în scopul depistării remediilor active față de fungii patogeni și oportunist patogeni; elucidarea modificării permeabilității peretelui și membranei celulare și a sistemului de protecție antioxidantă a fungilor sub acțiunea remediilor ce posedă activitate antifungică.

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.

2. OBIECTELE DE STUDIU ȘI METODELE APLICATE ÎN CERCETARE

Rezultatele investigațiilor prezentate în această lucrare au fost obținute pe durata anilor 2014 - 2016 în laboratorul Ficobiotehnologie și Colecția Națională de Microorganisme Nepatogene din cadrul Institutului de Microbiologie și Biotehnologie al Academiei de Științe a Moldovei, și la Catedra Microbiologie, Virusologie și Imunologie a Universității de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”.

2.1. Obiectele de studiu

În calitate de substanțe chimice cu posibile efecte antifungice au fost testați compuși coordinativi ai tiosemicarbazonelor substituite, sintetizați la catedra Chimie anorganică (Universitatea de Stat din Moldova) de către un colectiv de autori, specialiști în domeniul chimiei, condus de academicianul Aurelian Gulea. În calitate de substanțe de origine vegetală au fost testate extracte din frunze, pericarp și endocarp de nuci, precum și extracte din biomasa cianobacteriilor *Spirulina platensis* și *Nostoc linckia*.

În calitate de obiecte de studiu „*in vitro*” au fost incluse tulpinile 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.

2.1.1. Compuși chimici noi

În această lucrare au fost incluși 22 compuși chimici noi (Tabelul 2.1). Acești compuși au fost selectați în screening-ul prealabil, în cadrul căruia aceștia au demonstrat proprietăți anifungice față de tulpina *Candida albicans* ATCC®10231™. Majoritatea sunt compuși coordinativi ai cuprului cu tiosemicarbazone substituite și compuși coordinativi ai cuprului cu tiosemicarbazone substituite și sulfanilamide. Unul dintre compuși nu conține cupru, ci cobalt, iar trei dintre compuși nu conțin componenta metalică. Aceștia sunt: o diamină aromatică (RGTM 64), 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-hidroxibenzalhidei (BREV 1), care nu conține metal. Structurile liganzilor pentru compușii incluși în studiu sunt prezentate în Anexa 1.

Tabelul 2.1.

Compuși chimici noi utilizați în cercetare

№	Abrevierea utilizată în lucrare	Compusul	M, g/mol
Compuși coordinativi ai cuprului cu tiosemicarbazone substituite			
1	RGTM-25	Cu(L-H)Cl	306,5
2	RGTM-27	Cu(L-H)Cl	306,5
3	RGTM-28	Cu(L-H)NO ₃	347
4	RGTM-29	Cu(L-H)Cl	320,5
5	RGTM-44	Cu(L-H)Cl	365,5
6	RGTM-51	Cu(Sfdz)(L-H)Cl	632,5
7	RGTM-76	4-BrFtsa + Cu(CH ₃ COO) ₂ + PhenO ₂	637
8	RGTM-81	Cu(L-H)NO ₃	409
9	RGTM-83	Cu(L-H)Cl	382,5
10	RGMT-86	[Cu(Str)L ₁]*2H ₂ O	430,5
Compuși coordinativi ai cuprului cu tiosemicarbazone substituite și sulfanilamide			
1	RGTM-52	Cu(Sfc)(L-H)Cl	568,5
2	RGTM-55	Cu(Str)(L-H)Cl	526,5
3	RGTM-56	Cu(Ns)(L-H)Cl	609,5
4	RGTM-57	Cu(Sfdz)(L-H)NO ₃	659
5	RGTM-58	Cu(Sfc)(L-H) NO ₃	595
6	RGTM-59	Cu(Sfz)(L-H) NO ₃	631
7	RGTM-60	Cu(Etz)(L-H) NO ₃	665
8	RGTM-61	Cu(Str)(L-H) NO ₃	553
Alți compuși			
1	RGTM-37	Co(L-H) ₂ Cl	508,5
2	RGTM-64	PhenO ₂	210
3	RGMT-85	H ₂ L ₂ (precursorul de sinteză)	237
4	BREV 1	N-(2,4-dimetilfenil)-2-(2-hidroxibenziliden)-hidrazincarbotoamida	299

2.1.2. Extracte din *Juglans regia*

În cercetare au fost utilizate extractele în metanol, etanol, etil acetat și acetonă din frunze mature de nuc, pericarp de fruct de nuc imatur (coajă verde), și endocarp de fruct matur de nuc (coajă uscată). Pentru a obține extractele din materialul vegetal, acesta prealabil s-a mărunțit. Frunzele și coaja verde s-au prelucrat cu un malaxor cu cuțite până la obținerea masei omogene, iar cojile uscate s-au măcinat până la obținerea particulelor mici de 300-500 μm. La 1g de masă vegetală brută s-au adăugat 20 ml de solvent organic. Recipientele s-au instalat pe un agitator orbital setat la viteza de 250 rpm pentru o perioadă de 24 ore. Separarea reziduului vegetal de

extract s-a realizat prin filtrare în vid. Extractul s-a evaporat într-un sistem de evaporare cu vid și s-a standardizat după masa uscată extrasă, astfel ca să se obțină un concentrat de 10 mg/ml.

2.1.3. Extracte hidro etanolice din biomasa de *Spirulina platensis* CNMN-CB-11 și *Nostoc linckia* CNMN-CB-03

Biomasa cianobacteriilor *Spirulina platensis* CNMN-CB-11 și *Nostoc linckia* CNMN-CB-03 obținute în condiții optime de cultivare pentru fiecare tulpină s-a colectat prin filtrare în vid, s-a spălat cu soluție izotonică de acetat de amoniu. După înlăturarea soluției de spălare biomasa s-a supus înghețării-dezghețării repetate, după care s-a resuspendat în soluțiile hidro etanolice respective astfel ca concentrația biomasei în suspensie să constituie 10 mg/ml. Extragerea s-a realizat prin agitarea amestecului pe un agitator orbital setat la viteza de 250 rpm timp de 3 ore. La finele perioadei date de timp extractul s-a separat prin centrifugare, s-a standardizat după substanța uscată și s-a supus analizelor de rigoare.

2.1.4. Extracte hidrice și etanolice din biomasa de spirulină cu conținut de metale

În calitate de preparate cu efect antifungic au fost utilizate două tipuri de extracte din biomasa cianobacteriei *Spirulina platensis* CNMN-CB-11 crescută pe mediul nutritiv SP -1 cu adaosuri de compuși ai metalelor: Zn(II), Fe(III), Cu(II), Cd(II), Co(II) și Cr(III)). Primul tip de extracte (numite extracte etanolice - EE) a fost obținut prin extragere cu alcool etilic de 96% din biomasă (2 părți volum alcool la 1 parte biomasă) la temperatura camerei timp de 2 ore pe agitator. Cel de-al doilea tip de extracte (numite EH) a fost obținut prin extragere în apă fierbinte (90°C) timp de 1 oră, respectând același raport – 2 părți volum apă purificată și 1 parte biomasă. Extractele au fost standardizate după substanța uscată astfel ca 1 ml de extract să conțină 10 mg substanță uscată. Conținutul metalelor în extracte a fost următorul: EE_{Zn} – 0,15%; EH_{Zn} – 0,38%; EE_{Fe} – 0,09%; EH_{Fe} – 0,08%; EE_{Cu} – 0,35%; EH_{Cu} – 0,42%; EE_{Cd} – 0,09%; EH_{Cd} – 0,03%; EE_{Co} – 0,09%; EH_{Co} – 0,09%; EE_{Cr} – 0,11%; EH_{Cr} – 0, 15%.

2.1.5 *Trichophyton rubrum* ATCC®28188™

Poziția sistematică: Regnul Fungi, Filumul Ascomycota, Subfilumul Pezizomycotina; Clasa Eurotiomycetes, Ordinul Onygenales, Familia Arthrodermataceae, Genul *Trichophyton*, specia *Trichophyton rubrum*.

Coloniile tipice ale *T. rubrum* sunt albe, cu suprafața catifelată (Figura 2.1). Partea inferioară a majorității coloniilor este de obicei de culoare roșie, la unele – cu nuanță gălbuie, iar la altele cu nuanță maronie. *Trichophyton rubrum* crește încet, produce microconidii rare,

elipsoidale alungite aranjate lateral pe hifele germinative. Tulpina este destinată pentru realizarea cercetărilor biomedicale.

2.1.6. *Trichophyton mentagrophytes* ATCC®9533™

Poziția sistematică: Regnul Fungi, Filumul Ascomycota, Subfilumul Pezizomycotina; Clasa Eurotiomycetes, Ordinul Onygenales, Familia Arthrodermataceae, Genul *Trichophyton*, specia *Trichophyton mentagrophytes* (*interdigitale*).

Pe mediul Sabouraud cu geloză formează colonii plate cu aspect de piele întoarsă, de culoare albă cu nuanță crem și miros distinctiv (Figura 2.2). Reversul coloniilor este de obicei galben până la roșu cu nuanțe maro. Forma coloniilor - granulară, cu aspect pulverulent, datorită cantității mari de microconidii formate. Macroconidiile sunt netede, în formă de fus, cu pereți subțiri, formate din 4-5 celule separate prin pereți transversali paraleli. Tulpina crește destul de rapid.



Fig. 2.1. *Trichophyton rubrum* ATCC®28188™, creștere pe mediu Sabouraud cu geloză



Fig. 2.2. *Trichophyton mentagrophytes* ATCC®9533™, creștere pe mediu Sabouraud cu geloză

2.1.7. *Microsporum canis* ATCC®36299™

Poziția sistematică: Regnul Fungi, Filumul Ascomycota, Subfilumul Pezizomycotina; Clasa Eurotiomycetes, Ordinul Onygenales, Familia Arthrodermataceae, Genul *Microsporum*, Specia *Microsporum canis*.

Formează colonii albe, pufoase, cu aspect „păros” sau „cu pene” (Figura 2.3). Reversul coloniilor este de culoare galbenă intensă, datorită metaboliților eliminați de către fungi. Intensitatea pigmentului galben este maximală la a 6-a zi de creștere a coloniilor, după care culoarea devine mai pală. Se reproduce asexuat prin formarea macroconidiilor, care sunt asimetrice, de formă sferică, cu pereții groși și rugoși. Partea interioară a fiecărui macroconidiu

este de obicei împărțită în șase sau mai multe compartimente separate prin pereți transversali. Produce, de asemenea, microconidii.

2.1.8. *Microsporium gypseum* ATCC®24102™

Poziția sistematică: Regnul Fungi, Filumul Ascomycota, Subfilumul Pezizomycotina; Clasa Eurotiomycetes, Ordinul Onygenales, Familia Arthrodermataceae, Genul *Microsporium*, Specia *Microsporium gypseum*.

Coloniile au aspect catifelat pulverizant, de culoare albă cu diferite nuanțe, reversul coloniilor poate varia de la roz la roșu și galben, ocazional cu nuanțe de violet (Figura 2.4). Produce din abundență microconidii pe miceliul vechi. Marginile coloniei sunt zimțate și prezintă pleomorfism. Macroconidiile sunt pedunculate, apicale, solitare, în formă de ax, de dimensiuni mari ($40-150 \times 8-15 \mu\text{m}$), cu pereți groși netezi sau rugoși, situate direct pe hife sau pe ramuri scurte ale acestora. Hifele sunt septate și sunt ramificate. Microconidiile sunt în formă de picătură cu dimensiunile de $1,7-3,5 \times 3,3-8,3 \mu\text{m}$, unicelulare, foarte abundente. Hifele pot fi subțiri, cu pereți netezi, care pot crește până la $250 \mu\text{m}$ în lungime; cu diametrul de $2,5-4,0 \mu\text{m}$, sau spiralate, netede cu pereți septați, care au un diametru al bazei de $2,5-3,5 \mu\text{m}$, care se subțiază până la $1,5-2 \mu\text{m}$ în diametru la capete. Unele hife macroconidii cu pereți groși, elipsoidale sau fusiforme, cu dimensiuni de $35-55 \times 10-13,5 \mu\text{m}$, cu până la cinci septuri. Asca are pereți subțiri, $5-7 \mu\text{m}$ în diametru și conține opt ascospori. Ascosporii sunt netezi, lenticulari, au $1,5-2 \times 2,5-4 \mu\text{m}$ în diametru, iar atunci când se formează în masă dau culoare galbenă culturii.



Fig. 2.3. *Microsporium canis* ATCC®36299™, creștere pe mediu Sabouraud cu geloză



Fig.2.4. *Microsporium gypseum* ATCC®24102™, creștere pe mediu Sabouraud cu geloză

2.1.9. *Candida albicans* ATCC®10231™

Poziția sistematică: Regnul Fungi, Filumul Ascomycota, Clasa Saccharomycetes, Ordinul Saccharomycetales, Familia Saccharomycetaceae, Genul *Candida*, Specia *Candida albicans*. Prezintă microorganisme, care pot apărea sub 2 forme, în funcție de condițiile de mediu: forma de levuri se găsește la cultivarea la temperatura de 37°C „*in vitro*”, iar forma filamentoasă apare când sunt cultivate la temperatura camerei sau la 30°C, pe medii uzuale. Aceste două forme morfologice sunt denumite Forma de blastospori și Forma de pseudomicelii. Blastosporii formează filamente și se grupează cu formarea de aglomerări în formă de „pietre de pavaj”. La colorare se comportă ca microorganisme gram pozitive. Pe mediul Sabouraud cu geloză formează colonii untoase, bombate, cu margini netede, lucioase (Figura 2.5).

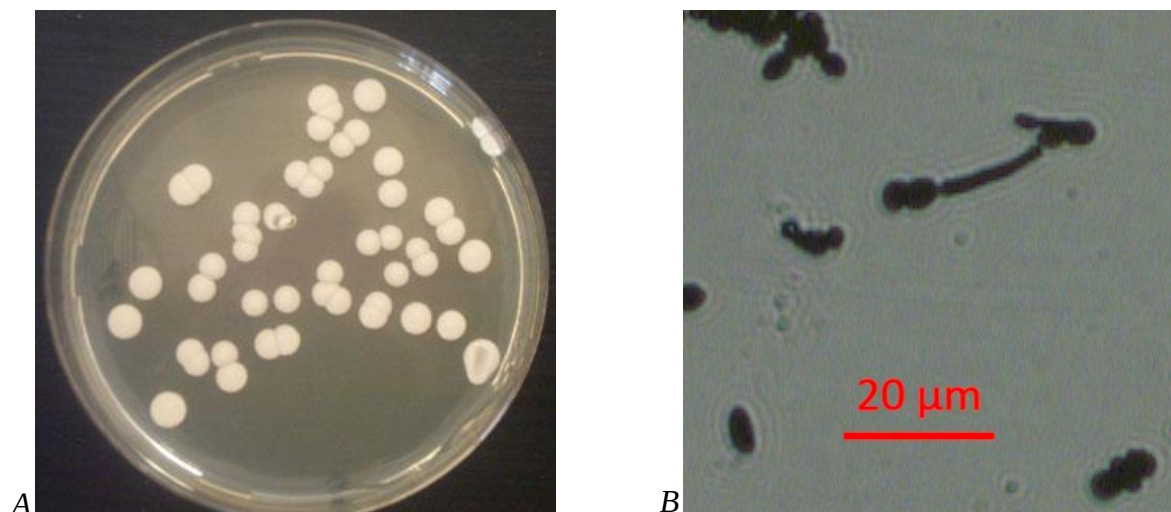


Fig. 2.5. *Candida albicans* ATCC®10231™, A. Creștere pe mediu Sabouraud cu geloză; B. Celule și pseudohife

2.1.10. *Aspergillus fumigatus* CNM-FA-02

Poziția sistematică: Regnul Fungi; Filumul Ascomycota; Clasa Eurotiomycetes; Ordinul Eurotiales; Familia Trichocomaceae; Genul *Aspergillus*; Specia *Aspergillus fumigatus*

Tulpina a fost obținută în condiții naturale prin izolarea din sol - cernoziom carbonatat din Zona Centrală a Republicii Moldova, anul 1983. Posedă capacitatea de descompunere a erbicidelor - derivați ai sim-triazinelor (atrazina, simazina), derivați ai sulfonilureelor (clorsulfuron) și ai acidului ariloxifenoxipropionic (fusilade, illoxan, zellek). Pe mediul Czapek cu geloză cultura formează colonii extinse, cu o suprafață ce variază între catifelată și pufoasă, inițial albe, care cu timpul devin albastru-verde-deschise până la cenușiu-verde-închise (Figura 2.1.A). Partea inversă a coloniei are nuanțe verzui și cafeniu-roșietice închise. Scleroțiile

formează colonii de circa 300 μm , dar de obicei mai mici. Conidioforii scurți și netezi, cu o lungime de 300 μm și diametrul 5-8 μm au o culoare verde, în special în partea superioară, provin nemijlocit de la hifele substratului sau din ramuri foarte scurte ale miceliului aerian, se largesc treptat în partea superioară și se transformă aproape neobservat într-o formație apicală conică de 20-30 μm în diametru (Figura 2.1.B), de aceeași culoare cu conidioforul, fertilă numai în partea superioară. Fialidele într-un rând, colorate identic, 6-8 x 2-3 μm , compacte, cu axa longitudinală paralelă axei conidioforului. Conidiile în majoritate verzui, sferice sau aproape sferice, 2,5-3,0 μm în diametru. Crește bine pe mediile obișnuite, inclusiv pe cel mineral. Tipul catabolismului - respirație, aerob, temperatura optimă este de 27-28 $^{\circ}\text{C}$, pH-ul mediului 5,5-5,6.

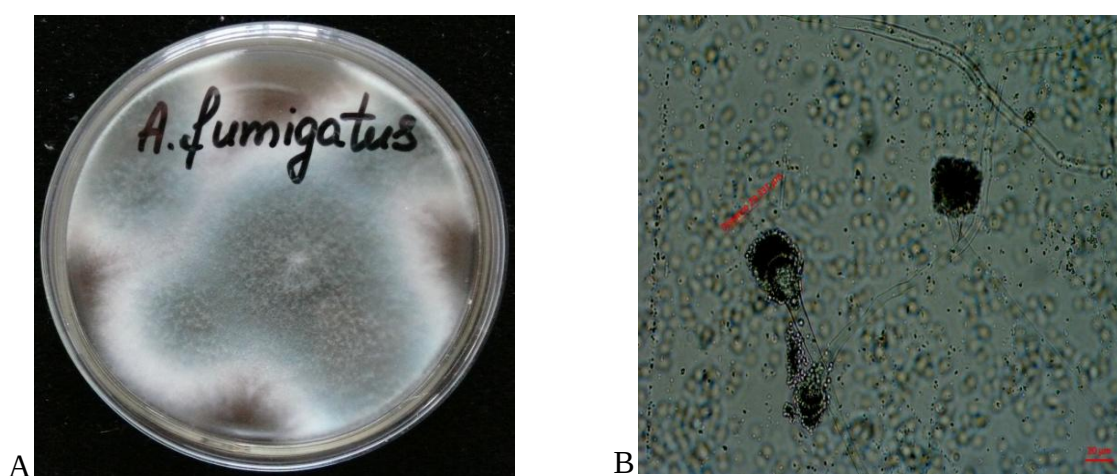


Fig. 2.6. *Aspergillus fumigatus* CNM-FA-02. A – colonii extinse, contopite. B – conidiofori

2.1.11. *Penicillium expansum* CNMN-FD-05

Tulpina a fost izolarea din sol - cernoziom carbonatat din Zona Centrală a Republicii Moldova. Pe mediul must de malț - geloză coloniile cresc rapid. Inițial acestea sunt de culoare albă, iar după trei zile când începe formarea conidioforilor coloniile capătă culoare cenușie cu nuanțe verzui, cu o suprafață uniformă, catifelată (Figura 2.7 A). Marginile coloniei rămân albe, mai rar gălbui. Reversul este de culoare brună. Hifele sunt foarte ramificate, conidioforii sunt numeroși (Figura 2.7 B).

Pe mediul Czapek cu zaharoză coloniile sunt de dimensiuni extinse, regiunea cu conidiofori are culoare verde-murdară. Conidiile sunt elipsoidale, aproape sferice, 3,0x3,4 μm , formează lanțuri. Crește pe mediile must de malț - geloză; cartof – geloză, în limitele de temperatură +15....+45 $^{\circ}\text{C}$. Temperatura optimă de creștere este de 28-30 $^{\circ}\text{C}$. Limitele acceptabile de pH 3,0-9,0. Crescută submers pe mediile Czapek cu 10 g/l hârtie de filtru, mediul Ghetsinson cu 15 g/L extract de porumb și 10 g/L celuloză cristalină sau alte surse

naturale de carbon (paie de porumb, tescovină de mere, borhot de sfeclă) în concentrație de 10-60 g/l tulpina crește intens și manifestă activitate endoglucanazică, celobiohidrolazică, β -glucozidazică. Pe mediul Ghetsinson cu surse ușor asimilabile de carbon (mono- și dizaharide) creșterea tulpinii este intensă, iar activitatea enzimatică menționată mai sus lipsește. Pe medii cu surse naturale de carbon (borhot de sfeclă) tulpina posedă activitate xilanazică și pectinazică.

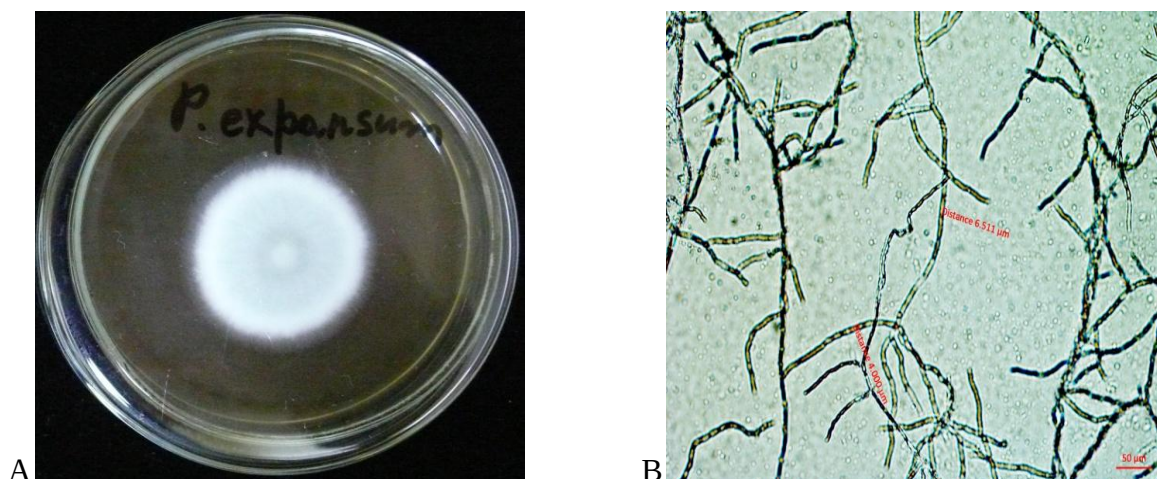


Fig. 2.7. *Penicillium expansum* CNMN-FD-05. A – colonie pe mediu malt -geloză. B – miceliu ramificat

2.1.5. *Mucor vulgaris* CNMN-FD-07

Tulpina a fost izolată în anul 2003 din solul Zonei Centrale a Republicii Moldova. Crește activ pe mediul must-geloză la temperatura $27 \pm 1^{\circ}\text{C}$. Coloniile sunt de culoare sură-albicioasă-verzuie (Figura 2.8 A).

Miceliul este foarte consistent, cu miros slab de mușcăi, deasupra lui pot fi observați sporangioforii. Sporii (sporangiosporii) se dezvoltă în sporangii de formă sferică la vârful sporangioforelor (Figura 2.8 B). Zigosporii sunt, de obicei de culoare neagră întunecată, unicelulari, și sunt conectați de filamente prin celule scurte numite suspensori. Pe mediul must-geloză miceliul crește abundent, bine dezvoltat decompactizat. Înălțimea coloniilor 1,0-2,0 mm, creșterea liniară 0,25-0,3 cm/zi. Pe mediul Czapek cu geloză coloniile sunt negre, au o creștere întârziată, atingând 2,5...3,0 cm în diametru în 10-14 zile la temperatura de $24...26^{\circ}\text{C}$. Tulpina se dezvoltă pe mediul de must de bere cu geloză în limitele de temperatură $+4...+34^{\circ}\text{C}$. Dezvoltarea optimă se manifestă la temperatura de $25...29^{\circ}\text{C}$. În calitate de sursă de carbon pe mediul Czapek tulpina asimilează monozaharide – glucoza, galactoză; dizaharide – maltoza, zaharoza, lactoza, precum și melasa. Ca sursă de azot asimilează azotul anorganic sub forma sărurilor de amoniu NH_4NO_3 , $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ și nitraților NaNO_3 , NH_4NO_3 .

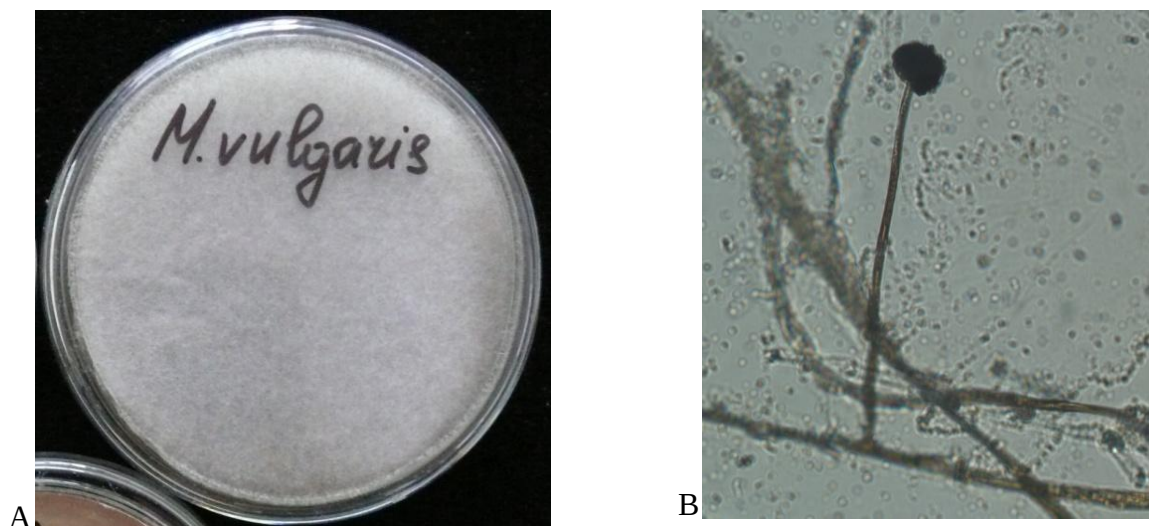


Fig. 2.8. *Mucor vulgaris* CNMN-FD-07. A – creștere pe geloză; B – conidiofori

2.1.6. *Fusarium oxysporum* FO1

Crește foarte rapid pe medii minerale. Temperatura de creștere 15-45°C, optimă la 25-30°C. Pe mediul malț-agar formează colonii de 3-5 cm, inițial albe, apoi roz cu nuanțe de violet, foarte pufoase (Figura 2.9 A). Hifele sunt foarte lungi, împleticite (Figura 2.9 B). Formează numeroase macroconidii și microconidii. Macroconidiile se formează în miceliul aerian, sunt aproape drepte sau puțin încovoiate la capete, cu diametrul egal pe aproape toată lungimea, spre capete subțindu-se și formând un picioruș pronunțat, cu 3-5 pereți transversali. Microconidiile pot avea sau nu perete transversal. Hlamidospori abundenți, netezi sau cu mici proeminente.

Pe mediul Czapek coloniile sunt mai mici de 2-3 cm, catifelate de culoare roz, puțin bombate la mijloc, foarte sporulente. Reversul cu nuanțe violete.

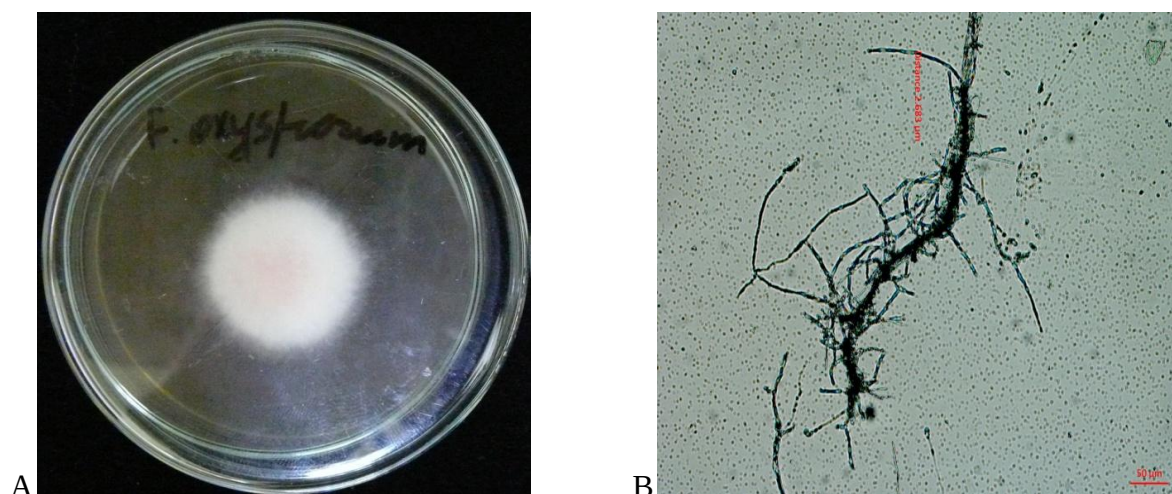


Fig. 2.9. *Fusarium oxysporum* FO1. A – colonie pe mediu malț -geloză. B – miceliu

2.1.7. *Fusarium solani* FS01

Crește foarte rapid pe diferite medii minerale. Pe mediul malț-geloză coloniile sunt mari cu diametrul de 4-5 cm, de culoare albă, foarte pufoase. În tuburi cu geloză se extinde rapid ocupând întreaga suprafață (Figura 2.10 A). Hifele sunt lungi (Figura 2.10 B). Macroconidiile se formează în sporogonii, pionote și miceliul aerian, elipsoidal încovoiate, uneori drepte, celula superioară uniformă sau puțin subțiată, 3-5 pereți transversali, diametrul egal aproape pe toată lungimea, de culoare crem-gălbui, alb-crem. Reversul coloniei incolor sau crem.

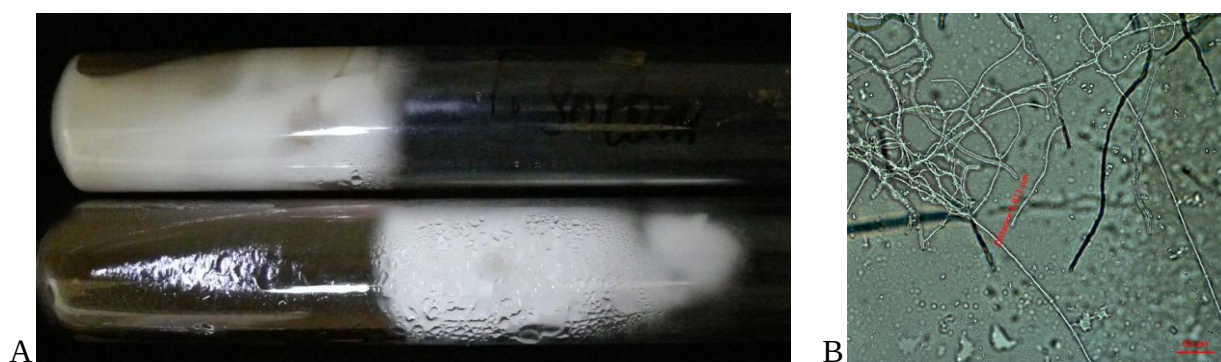


Fig. 2.10 . *Fusarium solani* FS01. A – creștere pe geloză în tub; B – miceliu

2.2. Metodele de cercetare

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 filamentozii). Pentru a identifica efectele preparatelor examinate au fost aplicate un șir de metode biochimice: metodele de determinare a activității enzimelor (lactat dehidrogenazei eliberate, superoxid-dismutazei, catalazei și glutatión peroxidazei), capacității antioxidante totale și a conținutului produselor finale ale peroxidării lipidelor (dialdehidei malonice). Pentru determinarea activității enzimelor antioxidante au fost utilizate kit-uri speciale (RANSOD pentru superoxid-dismutază, producător Randox; RANSEL pentru glutatión peroxidază, producător Randox; Catalase Assay kit, 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 lactat dehidrogenază a reacției de transformare a L-lactatului în piruvat cu participarea NADH [14].

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

2.2.1 Metoda de determinare a sensibilității fungilor la acțiunea compușilor cu activitate antifungică prin metoda difuziei în geloză

În lucrare au fost aplicate două variante ale acestei metode: cu aplicarea discurilor impregnate și cu aplicarea godeurilor.

a) metoda discurilor

Metoda de difuzie în geloză este bazată pe proprietatea substanțelor de origine biologică sau chimică de a pătrunde și a se răspândi în mediul nutritiv cu geloză de pe discurile impregnate cu aceste substanțe. Substanțele cu efect antifungic, la difuzionarea lor în zona adiacentă poziționării discurilor respective, inhibă dezvoltarea microorganismelor înșămânțate pe suprafața gelozei.

Mediul nutritiv utilizat în această metodă este selectat în dependență de cultura fungică. Pentru studiul dermatofiților a fost utilizat mediul Sabouraud, iar pentru culturile de fungi miceliali oportunist patogeni – mediul Czapek. În cercetare au fost utilizate cutii Petri cu diametrul de 90 mm. În fiecare cutie s-au turnat câte 20 ml mediu nutritiv, astfel ca să se obțină un strat de geloză de $4,0 \pm 0,5$ mm. Cutiile cu mediu s-au lăsat la temperatura camerei pentru solidificare, după care s-au utilizat imediat, sau pe durata a 10 zile cu imperativul păstrării lor în condiții sterile la 4°C.

Deoarece în cercetare s-au utilizat substanțe noi, care nu se produc industrial, prepararea discurilor s-a executat în laborator. Substanțele testate s-au impregnat pe discuri cu diametrul de 6 mm confecționate din hârtie de filtru de tip Munktell, grad 005 cu grosimea de 0,03 mm. Pentru o procedură de impregnare s-a utilizat un volum de 4 μ l din soluția testată. Discurile s-au preparat imediat înaintea efectuării experiențelor, sau pe durata a 10 zile de la impregnare cu condiția păstrării lor în flacoane închise ermetic în condiții sterile.

Pentru tulpina *Candida albicans* ATCC®MYA-1023™ inoculul final trebuie să conțină între 1×10^5 și $2,5 \times 10^5$ UFC/ml. Din subcultura obținută pe mediu Sabouraud cu geloză s-a preparat o suspensie în apă distilată sterilă până la o densitate de 0,5 după McFarland. După aceasta soluția obținută s-a mai diluat odată în proporție de 1:10, astfel fiind obținut inoculul final. Inoculul s-a utilizat timp de maxim 30 min din momentul pregătirii pentru a evita șocul osmotic și distrugerea culturii.

Pentru dermatofiții miceliali *Trichophyton rubrum* ATCC®28188™; *Trichophyton mentagrophytes* ATCC®9533™; *Microsporum canis* ATCC®36299™; *Microsporum gypseum* ATCC®24102™ prepararea inoculului s-a realizat din culturi proaspete și mature (2-10 zile, în dependență de specie), obținute pe mediul Sabouraud. Coloniile s-au acoperit cu aproximativ 5

ml apă sterilă suplimentată cu 0,1% Tween 20. Apoi, conidiile s-au detașat cu grijă cu un tampon steril și s-au transferat cu ajutorul unei pipete într-un tub steril. Suspensia s-a omogenizat timp de 15 sec. la un vortex la 2000 rpm. Inoculul s-a examinat pentru descoperirea diverselor hife și aglomerări de conidii. În cazul prezenței unui număr semnificativ de hife ($\geq 5\%$ din structurile fungice), 5 ml de suspensie s-au transferat într-o seringă sterilă la care s-a atașat un filtru steril cu diametrul porilor de $11\mu\text{m}$. După, inoculul astfel obținut s-a colectat și s-a transferat într-un tub steril. În cazul când, după verificarea repetată a calității inoculului (prezența hifelor) a fost depistată prezența hifelor în cantitate mai mare de 5%, filtrarea s-a repetat. Suspensia s-a ajustat cu apă distilată sterilă până la o concentrație de $2\text{-}5 \times 10^6$ UFC/ml. Apoi, s-a diluat iarăși cu apă distilată sterilă în proporție de 1:10 în rezultat obținându-se inoculul final.

Pentru fungii miceliali oportunist patogeni *Aspergillus fumigatus* CNM-FA-02; *Penicillium expansum* CNMN-FD-05; *Mucor vulgaris* CNMN-FD-07, *Fusarium oxysporum* FO1 și *Fusarium solani* FS01 prepararea inoculului a fost identică cu procedura perfectată în cazul dermatofiților filamentoși, cu excepția că mediul utilizat a fost mediul Czapek.

Inoculul standardizat în volum de maximum 2 ml s-a transferat pe cutiile Petri cu mediu nutritiv unde s-a distribuit uniform pe suprafața gelozei, iar excesul s-a înlăturat prin pipetare. Cutiile întredeschise s-au lăsat la temperatura camerei pentru uscare timp de 15 - 20 min. La expirarea acestui termen pe suprafața gelozei s-au aplicat discurile impregnate cu substanțele testate. Aplicarea discurilor s-a făcut cu ajutorul pensetei sterile. S-a respectat distanța de la discuri până la marginea cutiei, precum și între discuri de 15-20 mm. Discurile s-au ajustat prin apăsare pentru un contact uniform cu suprafața gelozei. După aplicarea discurilor impregnate cutiile Petri s-au pus pentru incubare la $35 - 37^\circ\text{C}$, timp de 24 de ore pentru candida și 48 ore pentru fungii miceliali. După incubare cutiile Petri s-au plasat pe hârtie mată de culoare închisă, astfel încât lumina să cadă sub un unghi de 45° . Diametrul zonelor de inhibiție a creșterii s-a măsurat cu o precizie de până la 0,1 mm, cu ajutorul unui șubler.

b) metoda cilindrelor sau godeurilor

În cutii Petri 20x100 mm sau 20x90 mm, puse pe o masă cu suprafața strict orizontală, s-a turnat mediu agarizat populat cu cultura respectivă de fungi într-un strat cu grosimea de $4,0 \pm 0,5\text{mm}$. Inoculul s-a introdus în mediu când acesta a atins temperatura de $49 \pm 1^\circ\text{C}$ în cazul tulpinii *Candida albicans* ATCC®MYA-1023™ unde s-au aplicat celule vegetative, ori de $65\text{-}70^\circ\text{C}$ în cazul celorlalte culturi de fungi, unde în calitate de inocul s-a utilizat suspensia de spori. Cantitatea de inocul aplicată trebuie să fie suficientă pentru a asigura creșterea optimă a culturilor de fungi și claritatea zonelor de inhibiție. Astfel, valorile optime pentru *Candida*

albicans ATCC®MYA-1023™ constituie aproximativ 40 mln celule/ml, iar pentru celelalte culturi utilizate - 20 mln spori la 1 ml.

În cazul metodei cilindrelor, pe fiecare cutie Petri s-au aplicat 6 cilindre sterile din inox ori aluminiu cu înălțimea de $10,0 \pm 0,1$ mm și diametrul interior de $6,0 \pm 0,1$ mm, astfel ca distanțele dintre cilindrele învecinate și până la marginea cutiei să fie egale. În cazul metodei godeurilor, acestea s-au sfredelit în agar cu sfredelul steril. Diametrul godeurilor - de la 6 la 8 mm.

În cilindre ori godeuri s-au introdus volume egale de soluții ale martorilor pozitivi respectivi și ale soluțiilor testate. În lucrare au fost utilizate soluțiile compușilor chimici noi, extractele din frunze și coajă de nucă, extractele hidro etanolice din biomasa de cianobacterii (*Spirulina platensis* și *Nostoc linckia*) și extractele hidrice și etanolice din biomasa de *Spirulina platensis* crescută în condiții biotehnologice de acumulare a metalelor. Pentru a diminua diferențele cauzate de intervalele de timp la care se fac introducerile de soluții, cutiile Petri s-au lăsat la temperatura camerei timp de 1-2 ore, apoi s-au incubat la 35 - 37°C timp de 24 - 48 ore. Diametrul zonelor de inhibare a creșterii culturilor de fungi s-au măsurat cu ajutorul șublerului cu exactitate de 0,1 mm.

2.2.2. Metoda de determinare a sensibilității fungilor la acțiunea compușilor cu activitate antifungică (determinarea CMI și CMF)

a) metoda diluțiilor succesive:

În această lucrare metoda diluțiilor succesive (de serie) a fost aplicată pentru determinarea directă a concentrației minime de inhibiție (CMI) a substanțelor testate față de fungii miceliali oportunist patogeni *Aspergillus fumigatus* CNM-FA-02, *Penicillium expansum* CNMN-FD-05, *Mucor vulgaris* CNMN-FD-07, *Fusarium oxysporum* FO1 și *Fusarium solani* FS01.

Metoda a fost realizată în modul următor. Substanțele testate în calitate de preparate cu efect antifungic s-au adăugat în cantități cunoscute la mediul de cultură, care apoi s-a inoculat cu cultura respectivă de fungi. După incubare a fost evaluată prezența sau absența unei creșteri vizibile. Pașii care au asigurat realizarea metodei, au fost următorii: prepararea mediilor nutritive; prepararea inoculului microorganismului testat; inocularea; incubarea; examinarea și interpretarea rezultatelor; formularea concluziilor în funcție de scopul cercetării.

Prepararea mediilor nutritive. Mediul standard pentru tulpinile respective a fost mediul Czapek, care după preparare a fost supus sterilizării prin autoclavizare, după care imediat a fost distribuit în eprubete sterile.

Prepararea inoculului s-a realizat conform metodei descrise mai sus. O atenție aparte s-a acordat standardizării inoculului.

Diluțiile de serie în mediu lichid. În lucrarea de față pentru culturile de fungi miceliali oportunist patogeni *Aspergillus fumigatus* CNM-FA-02, *Penicillium expansum* CNMN-FD-05, *Mucor vulgaris* CNMN-FD-07, *Fusarium oxysporum* FO1 și *Fusarium solani* FS01 a fost aplicată macrometoda de diluții de serie (în eprubete). Mediul nutritiv s-a turnat în cantitate de 0,5 ml în fiecare tub. Numărul de tuburi a fost determinat de numărul dorit de diluții cu luarea în calcul și a matorului negativ și a celor pozitivi.

Soluția de lucru a preparatelor cu acțiune antifungică s-a preparat din soluția standard cu utilizarea mediului nutritiv lichid. Concentrația soluțiilor de lucru s-a calculat pe baza concentrației maxime necesare într-o serie de diluții de serie, numărului de diluții necesare. Soluția de lucru într-o cantitate de 0,5 ml s-a introdus în primul tub ce conținea 0,5 ml de mediu nutritiv. După o agitare activă, s-a colectat 0,5 ml de mediu, care s-a transferat într-un al doilea tub ce conținea inițial 0,5 ml mediu. Această procedură s-a repetat până când s-a preparat numărul necesar de diluții. Astfel, în lucru au fost luate o serie de eprubete cu soluții ale preparatului cu proprietăți antifungice, concentrațiile cărora difereau în tuburile vecine de 2 ori.

Pentru inoculare s-a utilizat suspensia de spori ce conținea $1,5 \times 10^6$ UFC/ml. În fiecare tub ce conținea 0,5 ml a diluției corespunzătoare a preparatului antifungic testat s-au introdus câte 0,5 ml inocul. Aceeași cantitate de inocul s-a introdus și în tubul cu matorul negativ și cu matorii pozitivi corespunzători. Inoculul s-a introdus în tuburi cu diluții ale preparatului antifungic pe durata a 15-30 minute de la preparare. Tuburile s-au închis cu dopuri sterile din bumbac și tifon sau cu capace metalice, fiind apoi incubate la o temperatură de 35°C timp de 24-48 ore. Tubul cu un mator negativ a fost plasat în frigider la 4°C și păstrat până la citirea rezultatelor testului. Pentru a determina prezența creșterii tubul cu cultura testată și cel cu matorul negativ s-a examinat în flux emergent de lumină. Concentrația substanței corespunzătoare tubului cu cea mai mică concentrație, care inhibă creșterea vizibilă a culturii fungice, a reprezentat valoarea CMI pentru substanța și cultura respectivă.

Metoda dată permite de asemenea, determinarea valorii CMF (concentrația minimă fungicidă) pentru fiecare substanță testată. Pentru aceasta, s-au prelevat 0,1 ml din tuburile utilizate pentru tehnica diluțiilor în mediu lichid. Prelevarea s-a făcut din tubul în care se conținea concentrația substanței testate corespunzătoare valorii CMI și din tuburile anterioare care prezentau concentrații mai mari. Prelevatul s-a inoculat pe suprafața unor plăci cu mediu solid nesuplimentat cu inhibitori ai creșterii. După incubare în termostat s-a observat creșterea sau lipsa creșterii fungilor la diluția corespunzătoare CMI și celor mai mari ca aceasta. Valoarea

CMF a fost dată de cea mai mică concentrație de preparat antifungic, care a redus practic la 0 numărul coloniilor formate (cu până la 99,9%).

b) metoda standardizată EUCAST Def.7.1:

Această metodă a fost aplicată pentru a evalua efectul antifungic *in vitro* al substanțelor chimice și extractelor față de tulpina *Candida albicans* ATCC®MYA-1023™ cu respectarea standardului adoptat de European Committee of Antifungal Susceptibility Testing. Testul se efectuează folosind diluții binare descrescânde de antifungic.

Mediul de testare recomandat este RPMI 1640 (cu glutamină, un indicator de pH și fără bicarbonat, suplimentat cu glucoză la o concentrație finală de 2%). Pentru pregătirea mediului nutritiv dublu concentrat s-a utilizat concentrația de 20,8 g/l. Utilizarea MOPS (acid 3-(N-morpholino) propanesulfonic) la o concentrație finală de 0,165 M menține pH-ul optim pe durata testului. Acest component s-a aplicat în concentrația de 69,06 g/l.

În varianta aplicată în această lucrare testele au fost realizate în tuburi de sticlă cu capacitatea de 5 ml. Pentru fiecare substanță s-au utilizat 10 tuburi, dintre care în 8 s-au introdus câte 1,5 ml din diluțiile binare corespunzătoare ale substanței testate în mediu nutritiv dublu concentrat, iar în ultimele 2 - doar aceeași cantitate de mediu dublu concentrat. Inoculul final utilizat trebuie să conțină între 1×10^5 și $2,5 \times 10^5$ UFC/ml. Pentru aceasta din subcultura obținută pe mediul Sabouraud cu geloză, s-a preparat o suspensie în apă distilată sterilă până la o densitate de 0,5 McFarland (cca. $2-5 \times 10^6$ UFC/ml). După, a urmat o a doua diluție tot cu apă distilată sterilă de 1:10, obținându-se inoculul final. Inocularea s-a realizat în maxim 30 min de la standardizarea suspensiei, pentru a menține viabilitatea culturii. Apoi, fiecare tub s-a inoculat cu 1,5 ml din suspensia de fungi. Incubarea tuburilor inoculate s-a realizat fără agitare, la 35-37°C, timp de 24 ore (uneori 48 ore). Rezultatul final s-a citit la spectrofotometru (PG Instruments UVVIS T80 - spectrofotometrul utilizat în laborator) la lungimea de undă de 530 nm. CMI-ul s-a calculat ca fiind cea mai mică concentrație care a inhibat creșterea (comparativ cu martorul pozitiv din tubul 9-10).

c) metoda standardizată EUCAST Def.9.1:

Metoda dată a fost aplicată în scopul evaluării efectului antifungic *in vitro* a substanțelor noi fata de fungi filamentoși dermatofiti. Se deosebește de metoda descrisă anterior (EUCAST Def.7.1) prin modul de preparare a inoculului și citirea rezultatelor (vizuală).

Prepararea inoculului s-a realizat din culturi mature, obținute pe mediul Sabouraud. În acest scop, coloniile s-au acoperit cu aproximativ 5 ml apă sterilă suplimentată cu 0,1% Tween

20. Apoi, s-au detașat cu grijă conidiile cu ajutorul unui tampon steril și s-au transferat cu ajutorul unei pipete într-un tub steril. După, suspensia s-a omogenizat timp de 15 secunde la un vortex la 2000 rpm. În cazul prezenței fragmentelor hifare suspensia s-a filtrat printr-un filtru cu dimensiunea porilor de 11 μm. Inoculul s-a ajustat cu apă distilată sterilă până la o concentrație de $2-5 \times 10^6$ UFC/ml. După, a urmat o a doua diluție tot cu apă distilată sterilă respectând raportul de 1:10, obținându-se inoculul final.

Repartizarea diluțiilor în tuburi s-a făcut ca în cazul descris anterior. Gradul de creștere în tuburile ce conțineau agent antifungic s-a interpretat prin comparație cu cel din tuburile martor.

Concentrația minimă de inhibiție (CMI) pentru substanțele testate s-a considerat a fi cea mai mică concentrație care produce inhibiția creșterii fungilor filamentosi.

2.2.3. Obținerea extractelor celulare din culturile de fungi

Biomasa fungică s-a separat de mediul nutritiv prin filtrare / centrifugare. După aceasta biomasa (cantitatea de 100 mg) s-a resuspendat în soluție de 0,1N HCl și s-a pus pe baie de apă încălzită până la 90°C pentru 5 minute după care s-a răcit sub jet de apă. Biomasa s-a filtrat, după care s-a spălat cu apă distilată, fiind apoi supusă distrugerii peretelui celular și a membranei citoplasmatică. În cercetare au fost utilizate extractele hidrice. La biomasa hidrolizată și spălată (100 mg) s-au adăugat 2 ml de apă distilată după care s-au aplicat perlele de sticlă cu dimensiunea 150-212 μm (Sigma) în cantitate de 0,1 g per probă. Perlele s-au amestecat cu suspensia celulară și s-au amestecat pe vortex timp de un minut, cu intervalul de 5 minute, cu răcire cu gheață. Lizatul s-a centrifugat la 8000 rpm, la temperatura de 4°C timp de 10 minute, iar supernatantul s-a depozitat în frigider la 4°C până la utilizare.

2.2.4. Determinarea capacității antioxidante totale cu utilizarea radicalului cation ABTS^{•+}

Metoda de determinare a capacității antioxidante totale, care a fost aplicată în această lucrare are la bază utilizarea reagentului ABTS (2,2 azinobis 3-etilbenzotiazolină-6- a acidului sulfonic). Este una dintre metodele care oferă rezultate bune în cazul studiului extractelor complexe din diferite tipuri de material biologic. Deoarece în lucrare sunt supuse testării extractele complexe din biomasa de fungi tratată cu substanțe cu efect antifungic și din biomasa standard, această metodă este adecvată.

Esența metodei constă în faptul, că prin oxidarea ABTS (2,2 azinobis 3-etilbenzotiazolina-6- a acidului sulfonic) are loc formarea radicalului cation ABTS^{•+}. Reducerea radicalului format are loc prin mecanismul de adăugare de electroni. Astfel, extractele care conțin substanțe capabile de a realiza o astfel de reacție manifestă activitate antioxidantă, care poate fi înregistrată

prin această metodă. În calitate de echivalent pentru calculul cantitativ în această metodă se utilizează troloxul, compus hidrosolubil cu activitate antiradicalică similară tocoferolului. Rezultatele testului pot fi exprimate în % inhibiție (pentru compararea rezultatelor în interiorul testului) și în TEAC (*trolox equivalent antioxidant activity*) pentru compararea cu antioxidanții de altă natură.

Oxidarea ABTS în scopul formării radicalului cation $ABTS^{+\cdot}$ s-a realizat cu utilizarea persulfatului de potasiu. Pentru aceasta s-a preparat soluția stoc a reagentului ABTS de 7 mM în apă deionizată, la care s-a adăugat persulfatul de potasiu în concentrație de 2,45 mM în raport de 1:1. Reacția de formare a radicalului $ABTS^{+\cdot}$ a decurs la întuneric, la temperatura camerei, timp de 16 ore. Soluția de lucru s-a preparat din soluția stoc de ABTS, care s-a dizolvat în etanol sau apă distilată până la stabilizarea valorii absorbantei la $0,700 \pm 0,020$ unități la lungimea de undă de 734 nm.

Pentru analiză s-au utilizat 0,3 ml extract bacterian și 2,7 ml soluție ABTS. Reacția de reducere a decurs la temperatura camerei timp de 6 minute, iar procentul de inhibiție s-a calculat conform formulei:

$$\% \text{ inhibiție} = (\text{Abs}_{t=0} - \text{Abs}_{t=6 \text{ min}}) / \text{Abs}_{t=0} * 100, \quad (2.1)$$

unde: $\text{Abs}_{t=0 \text{ min}}$ este valoarea absorbantei de $0,700 \pm 0,020$ la 734 nm a soluției ABTS, iar $\text{Abs}_{t=6 \text{ min}}$ este valoarea absorbantei după incubare.

Valoarea indicelui TEAC s-a exprimat în μM trolox/mg biomasă și s-a calculat utilizând curba de calibrare pentru trolox.

2.2.5. Testul de determinare a dialdehidei malonice

Acest test permite de a monitoriza nivelul de peroxidare a lipidelor în mod indirect, prin determinarea cantității produsului peroxidării acestora – dialdehidei malonice (DAM). Cantitatea de DAM este determinată în baza acumulării produsului de reacție al acesteia cu acidul tiobarbituric.

La 100 mg biomasă s-a adăugat 1 ml acid tricloracetic de 20% și s-a mojarizat la rece. Omogenatul s-a centrifugat timp de 5 minute la 12 000 g. Câte 0,4 ml supernatant s-au transferat în 2 eprubete cu dop. În prima eprubetă s-au adăugat 0,4 ml acid tricloracetic de 20% – această eprubetă servește în calitate de martor. În cealaltă eprubetă s-au adăugat 0,4 ml acid tiobarbituric de 0,5%. Probele s-au supus incubării pe baia de apă la temperatura de 100°C timp de 30 minute,

după care s-au răcit la temperatura camerei. Măsurările s-au efectuat la spectrofotometru la lungimea de undă de 532 nm și la 600 nm pentru corectarea absorbantei nespecifice.

Pentru efectuarea calculelor cantității de DAM s-a aplicat coeficientul de extincție $\epsilon=155 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Formula de calcul este următoarea:

$$C=(\Delta E/155) \cdot X \cdot V/m, \quad (2.2)$$

unde: C – concentrația de DAM în mM/g substanță uscată; ΔE – diferența de densitate optică la 532 și 600 nm; 155 – coeficientul de extincție (vezi mai sus); X – diluția probei; V – volumul de extract, masa uscată.

2.2.6. Metoda de determinare a activității lactat dehidrogenazei eliberate

Efectul antifungic a preparatelor testate a fost apreciat și după activitatea lactat dehidrogenazei (LDH). Eliberarea acestei enzime citoplasmatică care denotă instabilitatea peretelui și membranei celulare, a fost determinată aplicând procedura descrisă de Arokiyaraj și coautorii cu aplicare la tulpinile de fungi filamentoși [14]. În linii generale determinarea s-a realizat în modul următor: tulpinile menționate au fost crescute submers pe mediu Sabouraud standard. La trecerea fungilor în faza staționară a ciclului vital biomasa a fost separată de mediul nutritiv, spălată și resuspendată în apă purificată, la care în variantele experimentale au fost adăugate extracte vegetale sau compuși coordinativi. Incubarea s-a realizat la temperatura camerei timp de 4 ore. Câte 100 μL de supernatant al fiecărei culturi control și celor tratate cu extractele vegetale și compușii coordinativi au fost adăugate la amestecul de reacție ce conținea 0,5 ml de piruvat de 100 mM, 5 mg NADH în 20 ml soluție tampon de fosfat de potasiu de 500 mM cu pH 7.5. Absorbanța (A) a fost citită timp de 5 min la intervale de 30 sec la lungimea de undă de 340 nm la spectrofotometru UV-VIS PG Instrument T-80. Activitatea LDH în unități internaționale (U/L), care exprimă cantitatea de enzimă ce reduce 1 μM de NAD per minut, a fost calculată conform formulei:

$$\frac{U}{L} = \frac{\Delta A / \text{min} \times TV \times 1000}{d} \times d \times \epsilon \times SV \quad (2.3)$$

unde: $\Delta A / \text{min}$ reprezintă modificarea relativă a absorbantei la 340 nm, TV este volumul total de reacție, 1000 este coeficientul de trecere de la U/ml la U/L, d este calea fluxului luminos în cm, ϵ reprezintă coeficientul molar de extincție, iar SV este volumul probei în ml [124].

2.2.7. Metoda de determinare a activității superoxid dismutazei

Activitatea superoxid dismutazei (SOD) a fost determinată cu utilizarea kitului comercial RANSOD (RANDOX®LABORATORIES, Crumlin, UK) conform protocolului oferit de producător. Esența metodei constă în utilizarea xantinei și xantin oxidazei (XOD) pentru a genera radicali superoxid care reacționează cu clorura de 2- (4-iodofenil) -3- (4-nitrofenol) -5-feniltetrazolium (INT) pentru a forma un colorant roșu - formazanul. Activitatea superoxid dismutazei este măsurată prin gradul de inhibare a acestei reacții. O unitate de SOD este nivelul de activitate suficient pentru a produce o inhibare de 50% a ratei de reducere a INT în condițiile testului.



sau



Extracțele celulare sunt diluate cu tampon fosfat pH 7,0 de 0,01 mol / l, astfel încât procentul de inhibiție să fie între 30% și 60%. Factorul de diluție pentru extracțele fungice este de 200.

La 60 μl probă diluată s-au adăugat 2 ml substrat (0,05 mmol/l de Xantină, 0,025 mmol/l INT în tampon (CAPS – 40 mmol/l, pH 10,2 + EDTA 0,94 mmol/l). S-a amestecat bine și s-au adăugat 300 μl XOD (80 U/l). Proba standard s-a preparat la fel, doar că în loc de extract s-au pus 60 μl de standard. De asemenea, după aceeași schemă s-a preparat și diluantul de probă S₁ (tamponul fosfat de 0,01 mmol și pH 7,0) care s-a adăugat în cantitate de 60 μl, apoi ceilalți componenți ca și în probă și standard. Măsurarea absorbanței s-a făcut peste 30 min. de la adăugarea standardului (A₁) apoi peste 3 minute de la prima măsurare (A₂), contra aerului la temperatura de 37°C, în cuvă cu calea optică de 1 cm, la lungimea de undă de 505 nm. Calculul s-a efectuat în baza unei curbe de calibrare cu utilizarea standardului (SOD) inclus în kit.

Pentru fiecare probă, standard și diluantul de probă s-a calculat diferența de absorbanță la 3 min.:

$$\frac{A_2 - A_1}{3} = -A/\text{min} \quad (2.7)$$

% de inhibiție s-a calculat pentru standard și probe conform formulelor:

$$\% \text{ Inhibiție (standard)} = 100 - \frac{(-A_{std/min} \times 100)}{(-A_{S1/min})} \quad (2.8)$$

$$\% \text{ Inhibiție (probă)} = 100 - \frac{(-A_{prb/min} \times 100)}{(-A_{S1/min})} \quad (2.9)$$

În baza % de inhibiție calculat și a curbei de calibrare s-a făcut trecerea la unități SOD.

2.2.1. Metoda de determinare a activității glutatation peroxidazei

Activitatea glutatation peroxidazei a fost determinată cu utilizarea kitului comercial RANSEL (RANDOX®LABORATORIES, Crumlin, UK) conform protocolului oferit de producător.

Metoda se bazează pe faptul, că glutatation peroxidaza (GPX) catalizează oxidarea glutatationului (GSH) de către hidroperoxidul de cumen. În prezența glutatation reductazei (GR) și NADPH glutatationul oxydat (GSSG) este convertit imediat în forma redusă, iar concomitent are loc oxidarea NADPH în NADP^+ . Scăderea absorbanței la 340 nm indică activitatea glutatation reductazei. Principiul reacției poate fi exprimat prin ecuațiile:



Proba s-a pregătit în modul următor: la 0,05 ml extract s-a adăugat 1 ml agent de diluare. S-a incubat timp de 5 minute după care s-a adăugat 1 ml de reagent Drabkin dublu concentrat (fosfat de potasiu de 104 mmol/l, ferricianură de potasiu de 60,8 mmol/l și cianură de potasiu de 78,8 mmol/l). Testul s-a realizat într-un interval de timp de 20 minute din momentul adăugării reagentului Drabkin. Pentru analiză la proba s-au adăugat 2,5 ml din reagentul 1 (glutatation 4 mmol/l, glutatation reductaza $\geq 0,5$ U/l, NADH 0,34 mmol/l), apoi 0,1 ml hidroperoxid de cumen de 0,18 mmol/l. Proba martor s-a preparat la fel, cu excepția, că în loc de 0,05 ml probă s-au pus 0,05 ml apă distilată. La finele reacției s-a citit absorbanta la 340 nm în cuvă cu calea optică de 1cm la temperatura de 37°C contra aerului inițial, apoi peste un minut și peste 2 minute. Din vaoarea absorbantei probei s-a scăzut absorbanta probei blank.

Calculul activității GPX s-a făcut în baza formulei:

$$\text{U/l GPX} = 8412 \times \Delta A_{340 \text{ nm}} / \text{min} \quad (2.12)$$

2.2.2. Metoda de determinare a activității catalazei

Activitatea catalazei a fost determinată cu utilizarea kitului comercial Catalase Assay Kit (Sigma-Aldrich, St.Louis, USA) conform protocolului oferit de producător.

Enzima catalaza (CT) catalizează descompunerea peroxidului de hidrogen (H_2O_2) în apă și oxigen. Peroxidul de hidrogen este format în celula eucariotă ca un produs secundar al activității diferitelor oxidaze și a superoxid dismutazei. Peroxidul de hidrogen este extrem de dăunător pentru celulă, iar acumularea acestei molecule reactive provoacă oxidarea componentelor celulare, cum ar fi ADN-ul, proteinele și lipidele, ceea ce poate duce la moartea celulelor. Înlăturarea H_2O_2 din celula de catalază oferă protecție împotriva daunelor oxidative în celulă. Kit-ul utilizat în această cercetare asigură realizarea unui test colorimetric simplu și reprezentativ, care permite cuantificarea activității catalazei în diferite substraturi biologice.

Testul colorimetric de determinare a activității CT se bazează pe cuantificarea substratului – H_2O_2 care rămâne în amestecul reactant după acțiunea catalazei. În primul rând, catalaza transformă peroxidul de hidrogen în apă și oxigen (calea catalatică) și apoi această reacție enzimatică este oprită cu azidă de sodiu. O parte alicotă din amestecul de reacție este apoi analizat pentru a stabili cantitatea de apă oxigenată rămasă. Pentru aceasta se aplică o metodă colorimetrică, bazată pe cuplarea oxidativă a unui fenol substituit (acidul 3,5-diclor-2-hidroxi-benzensulfonic), cu 4-aminoantipirina în prezența peroxidului de hidrogen și peroxidazei (RP) în rezultatul căreia se obține un colorant roșu quinonic (N- (4-antipiril) -3-clor-5-sulfonatep-benzochinonă-monoimină) cu maximul de absorbție la 520 nm.

Activitatea catalazei se măsoară la o concentrație de substrat non-saturată (H_2O_2), deoarece nu este posibilă o saturare a enzimei cu substratul la mai mult de 1 M. De asemenea, la o concentrație de peste 100 mM H_2O_2 are loc o inactivare rapidă a catalazei de către substrat. Concentrația de peroxid de hidrogen folosită în această analiză (50 mM) furnizează un semnal măsurabil, dar nu produce inactivarea enzimei.

Reacția se efectuează la temperatura camerei ($\sim 25^\circ C$). Se lasă soluția tampon (tampon fosfat, 500 mmol, pH 7,0), soluția de substrat (200 mM H_2O_2) și reactivul de culoare să se echilibreze la temperatura camerei.

Pentru realizarea testului s-au luat 25 μ l extract de analizat la care s-au adăugat 50 μ l soluție tampon. Pentru a porni reacția s-au adăugat 25 μ l soluție substrat și 900 μ l soluție de stopare a reacției și din nou s-a mixat. Proba martor nu a avut extract, volumul soluției tampon fiind de 75 μ l. S-a mixat prin inversare și s-a lăsat la incubare timp de 5 min. 10 μ l din amestec s-au pus într-un tub Eppendorf peste care s-a turnat 1 ml soluție reagent de culoare. S-a mixat prin inversie. Procedura s-a efectuat pe durata a cel mult 15 minute din momentul stopării reacției.

Tuburile s-au lăsat apoi, la temperatura camerei pentru apariția culorii, după care s-a măsurat absorbanta la lungimea de undă de 520 nm.

Calculul s-a făcut cu utilizarea curbei de calibrare care s-a construit pentru fiecare procedură de determinare. În baza curbei s-a stabilit cantitatea de H_2O_2 (μmol) care a rămas în amestecul de reacție – în martor și în probă și s-a făcut diferența dintre ele.

Activitatea catalazei se calculează conform formulei:

$$A(CT)\mu\frac{\frac{mol}{min}}{ml} = \frac{\Delta\mu mol(H_2O_2) \times d \times 100}{V \times t} \quad (2.13)$$

unde: $\Delta\mu\text{mol}(H_2O_2)$ – diferența dintre cantitatea de H_2O_2 în martor și probă; d – diluția probei de analizat; t - durata reacției enzimaticе, min; V – volumul probei (în cazul nostru 25 μl); 100 – diluția alicotei din amestecul de reacție (10 μl din 1 ml).

Unitatea de activitate a catalazei exprimă cantitatea de catalază care descompune 1 μmol de peroxid de hidrogen în oxigen și apă într-un minut la pH 7,0 la temperatura camerei și la o concentrație a substratului de 50 mM de peroxid de hidrogen.

2.2.10. Analiza statistică a datelor

Toate rezultatele experimentale obținute au fost supuse analizei statistice uzuale cu aplicarea instrumentelor statisticii descriptive (calculul mediilor aritmetice, abaterii standarde, coeficientului de variație și limitelor fiduciale), statisticii inferențiale (testele de valabilitate și testele de semnificație) și analizei dispersionale (monofactorial). Calculul indicatorilor statistici a fost efectuat utilizând posibilitățile MS Excel. În calitate de test de semnificație a fost aplicat testul Student.

2.3. Concluzii la capitolul 2

1. În calitate de obiecte de studiu în această lucrare au fost utilizate culturi tip de referință ale fungilor miceliali dermatofiți din Colecția Americană de Culturi Tip, tulpini de fungi miceliali din Colecția Națională de Microorganisme Nepatogene, izolate naturale și o tulpină de referință de fungi levuriformi, care au permis de a evidenția activitatea antifungică a compușilor chimici noi și a remediilor de origine naturală atât asupra agenților cauzali ai micozelor superficiale, cât și a micozelor sistemice. Utilizarea tulpinilor de fungi izolate din site-uri naturale locale oferă rezultatelor o valoare practică mai pronunțată în aspect geografic zonal.

2. În calitate de inhibitori ai creșterii și dezvoltării fungilor patogeni și oportunist patogeni au fost testați numeroși compuși coordinativi cu tiosemicarbazone substituite, sintetizați de cercetătorii din Republica Moldova sub conducerea academicianului A. Gulea; extracte din materie vegetală locală – frunze, pericarp și endocarp de nuc (*Juglans regia*), extracte din diferite tipuri de biomasă cianobacteriană.
3. Metodele de evaluare a efectului antifungic „*in vitro*” a compușilor chimici noi și a remediilor de origine biologică asupra fungilor sunt orientate spre obținerea unor date calitative, care permit realizarea screeningului rapid, dar și a unor date cantitative, care permit aprecierea nivelului de activitate a remediilor selectate și de fezabilitate a continuării studiului lor detaliat.
4. Metodele de cuantificare a parametrilor biochimici ai biomasei fungice sunt orientate spre elucidarea mecanismelor de acțiune antifungică a remediilor testate în această lucrare.

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

Cercetările în domeniul studiului agenților cauzali ai micozelor, în special a celor invazive, a preparatelor eficiente pentru tratarea micozelor și strategiilor de tratament aplicate au marcat o înviorare simțitoare în ultimele două decenii. Tratamentul infecțiilor fungice s-a îmbunătățit semnificativ în ultimii câțiva ani. Au fost autorizați pentru utilizare noi agenți antifungici, iar indicațiile pentru utilizarea celor existenți au fost modificate substanțial. Introducerea a unor noi preparate din clasele echinocandinelor și azolelor, utilizarea tot mai răspândită a formulărilor lipidice ale amfotericinei B au creat premise pentru terapii mai sigure și mai eficiente în cazul infecțiilor fungice severe, în special la pacienții cu imunodepresie [17, 22, 60, 84, 130, 145]. Bazele științifice ale terapiei antifungice au fost îmbunătățite cu studii noi în domeniul farmacodinamicii și farmacocineticii acestor medicamente. Cu toate acestea, evoluțiile pozitive au fost temperate de creșterea rezistenței agenților cauzali la mai multe clase de medicamente antifungice. Recent au fost descoperite multiple forme de fungi patogeni, pentru care multirezistența la agenții antifungici este o capacitate inerentă fixată la nivel genetic [148]. Modul natural de creștere a multora dintre fungii patogeni, cu formare de biofilmuri este și el un mecanism de rezistență foarte specific. Un fenomen practic obișnuit a devenit rezistența la fluconazol, care este unul din preparatele aplicate pentru tratamentul candidozelor la bolnavii cu SIDA [140, 157]. Au fost raportate și multiple dovezi ale rezistenței față de agenții antifungici recent introduși - echinocandinele [21, 151].

Astfel, descoperirea de noi substanțe cu proprietăți antifungice rămâne a fi una dintre cele mai importante sarcini în acest domeniu. În comparație cu dezvoltarea de noi substanțe cu efecte antimicrobiene, problema elaborării preparatelor antifungice este complicată prin trei impedimente majore. Primul constă în similaritatea mult mai mare a celulelor patogenului cu cele ale gazdei atacate. Astfel, multe procese biologice și biochimice fundamentale sunt identice la om și fungi, și prin urmare, multe molecule mici, care sunt toxice pentru fungi, prezintă toxicitate și pentru om. De fapt aceasta este problema științifică majoră, care compromite succesul în special în ceea ce ține de elaborarea noilor compuși sintetici cu efecte nocive asupra fungilor patogeni. Cea de-a doua provocare este determinată de dificultățile care apar la nivel de proiectare a studiului clinic, ceea ce complică dezvoltarea de noi preparate antifungice. Cea de-a treia problemă este de ordin economic și procedural și ține de costurile înalte implicate în elaborarea de noi medicamente, dar și de reglementările legale, care sunt comune pentru procesul de elaborare a tuturor preparatelor antibiotice în general [33, 147, 150, 192].

Conform opiniei cercetătorilor și medicilor practicieni, în prezent nici unul dintre agenții antifungici existenți nu îmbină toate caracteristicile unui agent ideal [188]. Prin urmare, dezvoltarea unor medicamente antifungice mai eficiente și sigure este o prioritate de top în cercetare.

3.1. Actualitatea și argumentarea cercetării

Natura compușilor cu potențiale efecte antifungice este extrem de variată. Aceștia pot fi atât din categoria compușilor sintetici, cât și a celor naturali. Prin aceasta se explică duversitatea studiilor, care sunt orientate spre descoperirea de noi preparate cu activitate fungistatică și fungicidă.

Compușii coordinativi cu diferiți liganzi sunt recunoscuți tot mai mult în calitate de substanțe cu activitate biologică înaltă, inclusiv asupra liniilor de celule canceroase. Aceștia s-au recomandat în calitate de stimulatori sau inhibitori ai proceselor metabolice la diferite tipuri de celule. Printre efectele observate ale compușilor coordinativi este și cel antimicrobian și antifungic [4, 10, 47, 62, 65, 68-71, 89].

Atât natura ligandului, cât și cea a atomului central sunt importante în manifestarea efectelor biologice ale compușilor noi, dar de cele mai multe ori efectul acestora este determinat de structura finală. Vom prezenta în continuare mai multe exemple concrete de compuși noi cu activitate antifungică față de tulpini de colecție și izolate clinice ale fungilor patogeni și oportunist patogeni. Astfel, compușii cu structura $[\text{Sn}(\text{C}_4\text{H}_9)_3(\text{OOC}\text{C}_6\text{H}_4\text{SO}_3\text{H}-2)]$, $\text{Sn}(\text{C}_4\text{H}_9)_3\{\text{OOC}(\text{CH}_2)_3\text{P}(\text{C}_6\text{H}_5)_3\}\text{Br}$, $[\text{Sn}(\text{C}_6\text{H}_5)_3[\text{OOC}(\text{CH}_2)_3\text{N}(\text{CH}_3)_3]]\text{Cl}$ au demonstrat activitate antifungică față de multiple izolate clinice ale fungilor din genul *Candida* și a celor filamentoși. Concentrațiile minime inhibitoare determinate în cadrul testelor *in vitro* se înscriu în limitele de 0,25-4,68 μg/ml. Concentrațiile minime fungicide ale compușilor numiți pentru izolatele de candida sunt între 2,34 și 9,37 μg/ml, iar pentru cele ale fungilor filamentoși aceste limite sunt mai înalte – 18,74 – 50,00 μg/ml [47].

O serie de compuși noi derivați organotin (IV) ai bis(pirimidin-2-iltio)metanului, bis(pirimidin-2-iltio)etanului și bis(pirimidin-2-iltio)hexanului au fost testați contra a mai multor fungi oportunist patogeni prezenți în sol și pe masele vegetale. O activitate antifungică mai înaltă a fost demonstrată pentru derivații trifenil (IV) 5-coordinați, fungii fiind deosebit de susceptibili față de caracterul acid al precursorului de sinteză – organotin (IV) [10].

Compușii coordinativi noi ai metalelor de tranziție Cu(II), Co(II), Ni(II) și Zn(II) cu bazele Schiff, isooxazol-3-il aminele și salicilaldehidele pe lângă efectele antibacteriene înalte au manifestat efecte accentuate în calitate de inhibitori ai creșterii fungilor *Aspergillus niger* și

Cladosporium oxysporum [89]. În special se evidențiază compușii coordinativi care conțin în componența lor cupru. Această proprietate a compușilor cu cupru a fost menționată și de grupul de cercetători conduși de academicianul A.Gulea, care a demonstrat, că compușii cu acetat de cupru (II) și 2-{[2-(2-hidroxi-etilamino) etilamino]metil}fenolul substituit, chelații de cupru (II) ce conțin imidazol și produsele condensării α - aminoacizilor cu aldehida salicilică și derivații ei, compușii de cupru(II) cu 2-formilpiridine 4 - (dimetilfenil) tiosemicarbazonele manifestă activitate antifungică față de *Candida albicans* [68-71]. Complecșii metalelor de tranziție cu tiosemicarbazonele, la care se referă și cei menționați mai sus prezintă o enormă varietate de structuri și funcții biologice. Printre aceste efecte menționăm și efectul antifungic, în special față de anumite tulpini de *Candida albicans* [122, 136]. Din compușii chimici care conțin în componența lor fragmentul tiosemicarbazonic și care inhibă creșterea și multiplicarea fungilor din genul *Candida*, cel mai înalt efect a fost obținut în cazul metil-N'-[(2-hidroxinaftalen-1-il)metiliden]-N-prop-2-en-1-ilhidrazonotioatului. După activitatea antimicotică față de *Candida albicans* acest compus depășește de 110-115 ori caracteristicile respective ale nistatinei, care este utilizată în medicină pentru tratarea și profilaxia micozelor [2, 62].

Astfel, compușii coordinativi ai metalelor de tranziție (în special cupru, cobalt) cu tiosemicarbazone substituite sunt binevenite în studiile de depistare a noilor compuși de perspectivă pentru utilizare în calitate de substanțe cu efecte antifungice.

Cu toate că succesele chimiei în elaborarea preparatelor medicamentoase sunt incontestabile, medicamentele de origine vegetală sunt totuși cele mai fiabile și mai eficiente. Utilizarea plantelor superioare și produselor din ele pentru tratarea bolilor infecțioase și neinfecțioase constituie unele dintre cele mai vechi practici terapeutice și unica posibilitate disponibilă în trecut [190]. Produsele naturale, în special extractele vegetale sunt cunoscute pentru efectele biologice pe care le posedă, inclusiv, activitatea antifungică a unora dintre acestea. Dintre metaboliții plantelor sunt cunoscute de secole uleiurile eterice, care pe lângă multiple beneficii pentru sănătatea omului mai posedă și activitate antifungică față de fungii patogeni, în special – dermatofiți. O recunoaștere binemeritată o au diferite produse obținute din țesuturile nukului (*Juglans*). Multe specii de Juglandaceae au fost utilizate în mod tradițional de către diferite popoare pentru tratarea mai multor boli. Decoctul din *Juglans insularis* este utilizat de secole în băi pentru tratarea bolilor de piele la copii. Pericarpul verde, fructul, scoarța de copac și frunzele de nuc se utilizează în produsele cosmetice și farmaceutice [190]. Frunzele și pericarpul de *J. regia* se utilizează în medicina tradițională și farmacologie ca produse cu efecte terapeutice demonstrate și confirmate științific: anti-helmintic, astringent, antifungic,

hipoglicemiant, antidiareic și mai recent, sedativ și antiproliferativ [30, 75, 76, 139, 152, 170]. Cele mai aplicate forme de produse din nuc sunt extractele hidrice și cele în diferiți solvenți.

Astfel, extractele hidrice din fructele mai multor soiuri de nuc posedă o eficacitate antimicotică față de tulpina levuriformă *C. albicans* CECT 1394 [127]. De asemenea extractele în metanol, acetat de etil și acetonă din pericarpul și endocarpul fructelor de nuc se caracterizează prin activitate antifungică împotriva multor tulpini de *Candida* ssp. izolate din cavitatea orală a bolnavilor de candidoză [113]. Printre componentele care asigură aceste efecte sunt menționați acizii fenolici, flavonoidele, naftochinonele, juglona ș.a. [77, 114]. Extractele metanolice, în etil acetat, alcaloizii și fracția metanolică hidrolizată din frunzele de nuc sunt active contra izolatelor candidozice, iar modelul de rezistență față de acestea este diferit de cel care se formează față de alte medicamente antimicotice [169]. Extractele etanolice și cloroformice au efect antifungic asupra a mai multor dermatofiți, de exemplu asupra *Microsporum canis*, *Trichophyton mentagrophytes* și *Trichophyton rubrum*. Efectul pozitiv este atribuit juglonei, care este prezentă în extractele menționate [77].

În ultimul timp, printre sursele naturale de compuși cu activitate anticancerigenă, antivirală, antimicrobiană și antimicotică sunt studiate diferite grupuri taxonomice de cianobacterii - procariote fotosintetice ce populează diferite habitate. Cianobacteriile produc o gamă largă de compuși antifungici, care aparțin claselor structurale, cum ar fi peptidele, polichetidele și alcaloizii. În prezent există numeroase studii, care au evidențiat compușii extrași din biomasa diferitor tulpini de cianobacterii responsabili pentru efectele antifungice. Din biomasa de *Anabaena* sp. HAN21/1, *Anabaena cylindrica* PH133, *Nostoc* sp. HAN11/1 și *Scytonema* sp. HAN3/2 a fost izolată și descrisă o substanță din grupul macrolidelor – scitoficina, care manifestă activitate antifungică față de *Candida albicans* și *Aspergillus flavus*. Din *Anabaena* spp. BIR JV1, *Anabaena* spp. HAN 7/1 și *Nostoc* spp. CENA 219 a fost obținut un compus glicolipopeptidic – hassallidina, care de asemenea are activitate antifungică pronunțată [87, 156]. Printre substanțele cu efecte antifungice detectate în extractele cianobacteriene, au fost identificați următorii compuși: aufischerellina A, hapalindola, balticidina, carazostatina, fitoalexina, tolitoxina, scitofiycina, toiocamicina, tjipanazola, nostociclamida, nostodiona și nostofungicidina [8, 26, 179].

Extractele hidrice din biomasa de mai multe tulpini de *Nostoc commune* și *Spirulina platensis* sunt active contra *Aspergillus flavus*, activitatea acestora fiind determinată în mare măsură și de condițiile în care a fost obținută biomasa. Modificarea conținutului de azot în mediu este un factor care determină activitatea antifungică a extractelor din aceste două specii [153]. Din *Nostoc insulare* au fost extrași și caracterizați doi metaboliți: norharman (9H-pirido(3,4-

b)indol) și 4,4'-dihidroxibifenil, care au manifestat activitate antifungică față de tulpina *Candida albicans* ATCC 10231 în concentrații de la 32 la 40 μg/ml [180]. Dintre metaboliții citotoxici din diferite specii de *Nostoc*, mulți posedă activitate antifungică. La astfel de substanțe se referă, de exemplu, nostociclofanele și boroficina [141].

Extractele de diferită natură din biomasa de spirulină manifestă un anumit nivel de activitate față de diferite tulpini de fungi. Astfel, fracțiunile de terpenoizi și steroli extrase din biomasa de *Spirulina platensis* au demonstrat activitate antifungică față de *Candida albicans* [174]. Eficiența extractelor din *Spirulina platensis* a fost demonstrată și față de fungii *Aspergillus fumigatus* și *Aspergillus niger*. În special extractele în metanol din biomasa de spirulină sunt eficiente contra speciilor de fungi filamentoși indicate mai sus, dar și asupra speciei levuriforme *Candida albicans* [90].

Extractele în solvenți organici din biomasa de *Spirulina platensis*, principalii componenți activi ai cărora sunt compușii fenolici, posedă acțiune antifungică față de *Aspergillus flavus* și *Aspergillus niger* [106, 134]. Și extractele hidrice purificate și concentrate din spirulină au manifestat activitate antifungică față de *Penicillium oxalicum* și *Fusarium solani* [18]. Se consideră, că mecanismele de acțiune a extractelor din spirulină asupra fungilor filamentoși sunt bazate pe inhibarea sintezei ergosterolului, glucozaminei și proteinelor.

Astfel, în prezent există suficiente dovezi, care confirmă faptul, că căutarea de noi compuși cu acțiune antifungică trebuie să acopere cât mai multe grupuri de substanțe – atât de sinteză chimică, cât și naturale. O asemenea abordare permite selectarea unor noi remedii cu activitate înaltă și cu multiple mecanisme de acțiune asupra celulelor de fungi, ceea ce este o garanție a succesului în cercetările contemporane.

3.2. Acțiunea antifungică a compușilor coordinativi noi cu tiosemicarbazone substituite

Compușii coordinativi care conțin tiosemicarbazone sunt de perspectivă datorită faptului, că au efect combinat atât asupra bacteriilor patogene, atât și asupra fungilor patogeni și facultativi patogeni. Am considerat oportun de a realiza un studiu care să evidențieze particularitățile de acțiune a unor compuși de acest tip asupra unor agenți cauzali ai micozelor.

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 substituite, inclusiv 8 care conțin suplimentar și sulfanilamide, incluși cu codurile RGTM 52-61 (vezi cap.2, tabelul 2.1). De asemenea, au mai fost testați și 4 compuși care diferă de cei 18 – 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 [3].

La prima etapă de cercetare a fost realizat screening-ul substanțelor chimice noi (22 compuși nominalizați mai sus) asupra celor 10 tulpini de fungi – obiecte de cercetare în cadrul acestei lucrări. În calitate de metodă reprezentativă la această etapă a fost utilizată metoda difuziei în geloză. Toate substanțele incluse în cercetare au fost standardizate la concentrația de 10 mg/ml. În calitate de martor pozitiv în studiul dat au fost utilizați itraconazolul, ketoconazolul și clorhidratul de naftifină (exoderilul). Pentru studiu au fost preparate discuri care conțineau 1 mg substanță activă. În domeniul dat de concentrație fungii filamentoși nu au prezentat sensibilitate față de substanțele chimice noi, și doar tulpina levuriformă *Candida albicans* ATCC®10231™ a prezentat interes în acest sens. 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 3.1.

Martorii pozitivi utilizați în acest studiu au avut acțiune diferită asupra tulpinii de fungi levuriformi. Cel mai pronunțat efect antifungic l-a avut ketoconazolul, care a provocat apariția celei mai vaste zone de inhibiție, comparativ cu itraconazolul și cu clorhidratul de naftifină. Patru dintre noii compuși testați diferă nesemnificativ din punct de vedere statistic de cel mai activ martor pozitiv - ketoconazolul. Trei dintre aceștia sunt compuși cu conținut de cupru (II) și tiosemicarbazonele substituie (RGTM 55, 64, 83) și compusul N-(2,4-dimetilfenil) tiosemicarbazonei 2-hidroxibenzaldehidei (un compus organic cu tiosemibarbazonă și fără conținut de metale). Comparativ cu itraconazolul o activitate comparabilă sau mai înaltă au avut-o deja 9 dintre compușii noi selectați. Suplimentar la cele menționate anterior, activitate înaltă antifungică față de *Candida albicans* ATCC®10231™ o au și compușii RGTM 51, 52, 56, 57 și 81. Acțiunea celorlalți compuși chimici noi a fost comparabilă cu acțiunea clorhidratului de naftifină – componenta activă a preparatului exoderil, care este cunoscut ca fiind un fungistatic față de *Candida*, fără a provoca moartea celulelor.

Printre substanțele care s-au manifestat ca antifungice față de tulpina de *Candida* inclusă în studiu se numără și precursorul de sinteză - 4-feniltiosemicarbazona acidului piruvic (compusul RGTM 85), zona de inhibiție fiind de $14,9 \pm 1,2$ mm, fără deosebire veridică din punct de vedere statistic față de acțiunea clorhidratului de naftifină. În același timp, 11 dintre compușii coordinați noi (cei mai activi fiind compușii RGTM 55, 64, 83 și compusul BREV 1) sinteza cărora a pornit de la precursorul indicat au manifestat activitate antifungică față de tulpina

fungică veridic mai înaltă, decât substanța inițială [3]. Aceasta insuflă optimism în ceea ce ține de posibilitatea elaborării unor compuși mai eficienți utilizând schema de sinteză deja aplicată.

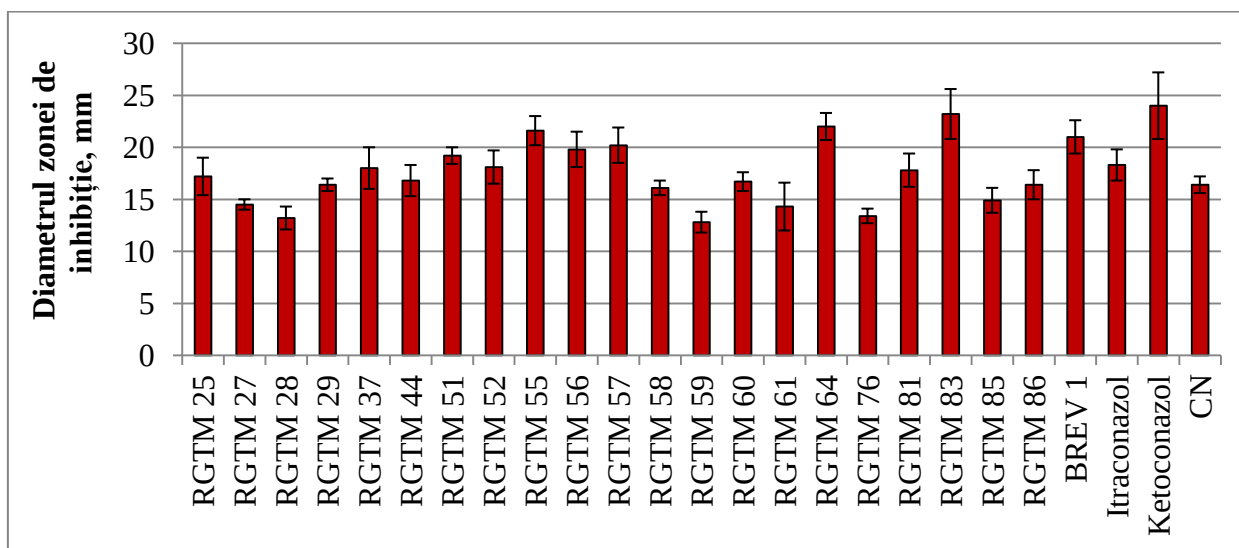


Fig. 3.1. Acțiunea antifungică a compușilor chimici noi față de tulpina de fungi levuriformi *Candida albicans* ATCC®10231™ (CN –clorhidrat de naftifină)

Amina aromatică inclusă în cercetare a fost foarte activă față de *Candida albicans* ATCC®10231™. Astfel, zona de inhibiție provocată de acțiunea acestei substanțe o depășește veridic ($P < 0,05$) pe cea provocată de acțiunea itraconazolului și a clorhidratului de naftifină și nu prezintă diferențe veridice față de zona de inhibiție provocată de ketoconazol. Compusul coordinativ în componența căruia intră cobaltul (RGTM 37) a avut o acțiune antifungică față de tulpina de fungi levuriformi foarte apropiată de acțiunea itraconazolului și cea a clorhidratului de naftifină, diametrul zonei de inhibiție fiind nesemnificativ diferită față de cele înregistrate pentru cei doi martori pozitivi. Doar ketoconazolul este veridic mai activ decât acest compus ($P < 0,05$ pentru diametrul zonei de inhibiție). De asemenea, nu putem afirma că prezența ori lipsa sulfanilamidelor este un factor care sporește activitatea antifungică a compușilor noi. Astfel printre compușii care conțin acest ligand sunt prezente substanțe cu activitate mai înaltă ca cea a martorilor pozitivi, cât și substanțe veridic mai puțin active față de aceștia.

Cu toate acestea, combinația unică între atomul central, tiosemicarbazone și sulfanilamine prezintă în componența compușilor menționați asigură în cele din urmă o anumită activitate biologică. Din acest punct de vedere este absolut clar, că explorarea acestui domeniu de sinteză chimică este de perspectivă pentru descoperirea de noi compuși chimici cu efecte antifungice. Mai mult ca atât, toxicitatea compușilor chimici de tipul celor evidențiați față de celulele gazdei este destul de joasă, comparativ cu toxicitatea martorilor pozitivi utilizați. De exemplu, pentru tiosemicarbazonele, care sunt parte componentă a compușilor selectați în studiu doza semiletală

(LD₅₀) este de peste 3,0 g per kg de masă corporală, în timp ce pentru ketoconazol această valoare este de 166 mg per kg, pentru itraconazol – de 300 mg per kg și 1 g per kg pentru clorhidratul de naftifină. Astfel, și din punct de vedere al siguranței, noile substanțe prezintă interes pentru cercetarea ulterioară.

3.3. Extractele din diferite țesuturi de *Juglans regia* în calitate de remedii antifungice

Studiul bibliografic realizat ne-a permis să concluzionăm, că extractele din frunzele mature de nuc (în diferiți solvenți) posedă activitate biologică, inclusiv antifungică. O altă sursă de substanțe cu efecte nocive asupra fungilor patogeni este pericarpul de nucă verde și endocarpul lemnos. Printre solvenții care permit obținerea extractelor cu activitate biologică înaltă sunt etanolul, metanolul, etil acetatul și acetona. În continuare sunt prezentate rezultatele testării acestor patru tipuri de extracte din frunze, pericarp și endocarp de nucă în calitate de remedii antifungice față de cele 10 tulpini de fungi filamentosi și levuriformi luate în cercetare.

Extractele din frunze de nuc, din pericarp și endocarp au fost luate în cantitate de 1 mg substanță uscată pe disc. În calitate de martori pozitivi au fost utilizate aceleași preparate de referință ca și în subcapitolul precedent (itraconazolul, ketoconazolul și clorhidratul de naftifină). Extractele din țesuturile de nuc au manifestat activitate antifungică diferită asupra tulpinilor de fungi. Rezultatele obținute pentru tulpina *Candida albicans* ATCC®10231™ sunt prezentate în figura 3.2.

Extractele etanolice, metanolice, în etil acetat și în acetonă din frunze mature de nuc au fost cele mai active și au manifestat efect de inhibiție a creșterii față de tulpina *Candida albicans* ATCC®10231™. Extractul etanolic din frunze provoacă apariția unei zone de inhibiție cu diametrul de 13,6 mm, ceea ce constituie 72,7 % din valoarea obținută pentru itraconazol, 58,9 % față de ketokonazol și 82,9% față de clorhidratul de naftifină. Extractul metanolic din frunze este puțin mai activ, diametrul zonei de inhibiție fiind de 14,8 mm, ceea ce constituie 79,1 % din valoarea obținută pentru itraconazol, 64,1 % față de ketokonazol și 90,2% față de clorhidratul de naftifină. Extractul în acetonă are cea mai mică valoare de activitate antifunțică, diametrul zonei de inhibiție fiind de 11,8 mm (62,0 % din valoarea obținută pentru itraconazol, 50,2 % față de ketokonazol și 70,7% față de clorhidratul de naftifină). Extractul în etil acetat din frunzele de nuc a fost mai activ decât itraconazolul, provocând o zonă de inhibiție mai vastă cu 35,3% și față de clorhidrat de naftifină – cu o creștere de 54,3%. Diferența față de ketoconazol este statistic neveridică. Extractele din pericarp sunt următoarele după activitatea antifungică față de *Candida*. Diametrul zonei de inhibiție a creșterii în dependență de solvent, este de 9,0 -14,2 mm, ceea ce este mai jos comparativ cu toți martorii pozitivi utilizați. Dintre extractele obținute din pericarpul

verde de nucă cel mai activ antifungic față de candida a fost extractul în etil acetat, dar și în cazul lui diametrul zonei de inhibiție a constituit 75,9% față de itraconazol, 61,5% față de ketoconazol și 86,6% față de clorhidratul de naftifină. Cea mai joasă activitate antifungică față de tulpina *Candida albicans* ATCC®10231™ a fost cea a extractelor din endocarpul lemnos. Cea mai pronunțată zonă de inhibiție a fost înregistrată sub acțiunea extractului în etil acetat, dar dimensiunile ei au fost cu mult sub valorile obținute pentru martorii pozitivi [117].

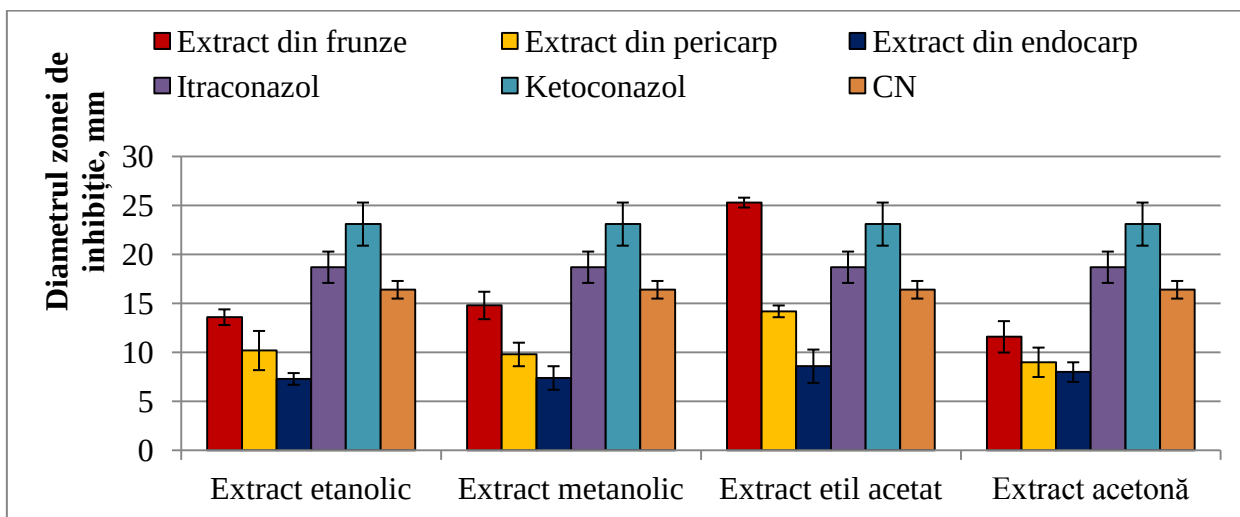


Fig.3.2. Acțiunea antifungică a extractelor din frunze, pericarp și endocarp de nucă față de tulpina *Candida albicans* ATCC®10231™

Astfel, față de tulpina *Candida albicans* ATCC®10231™ 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 la același nivel cu ketokonazolul.

Aceleași extracte au fost testate și față de tulpinile de *Trichophyton* (*Trichophyton rubrum* ATCC®28188™, *Trichophyton mentagrophytes* ATCC®9533™) și *Microsporum* (*Microsporum canis* ATCC®36299™, *Microsporum gypseum* ATCC®24102™). Extractele din endocarpul lemnos nu au avut activitate antifungică față de nici una dintre tulpinile de referință ale fungilor filamentoși. Ca și în cazul candidiei activitate antifungică au avut extractele din frunze mature, valori înalte au fost obținute pentru extractele în etil acetat și etanol (vezi Figura 3.3.). Față de tulpinile *Trichophyton rubrum* ATCC®28188™, *Trichophyton mentagrophytes* ATCC®9533™ o activitate antifungică semnificativ mai înaltă ($P < 0,05$) a fost înregistrată pentru extractele în etil acetat din frunze comparativ cu cel în etanol. În cazul tulpinii *Trichophyton rubrum* ATCC®28188™ extractul în etil acetat din frunze mature a avut o acțiune

antifungică la același nivel cu itraconazolul și ketoconazolul, și doar față de clorhidratul de naftifină această activitate a fost semnificativ mai joasă. Și mai elocvente au fost rezultatele obținute față de tulpina *Trichophyton mentagrophytes* ATCC®9533™, față de care activitatea antifungică a fost semnificativ mai înaltă - cu 23,8% față de itraconazol și cu 30,5% față de ketoconazol. Valori similare de inhibiție a creșterii fungilor *Trichophyton mentagrophytes* ATCC®9533™ au fost înregistrate la acțiunea extractului în etil acetat din frunze mature și a clorhidratului de naftifină.

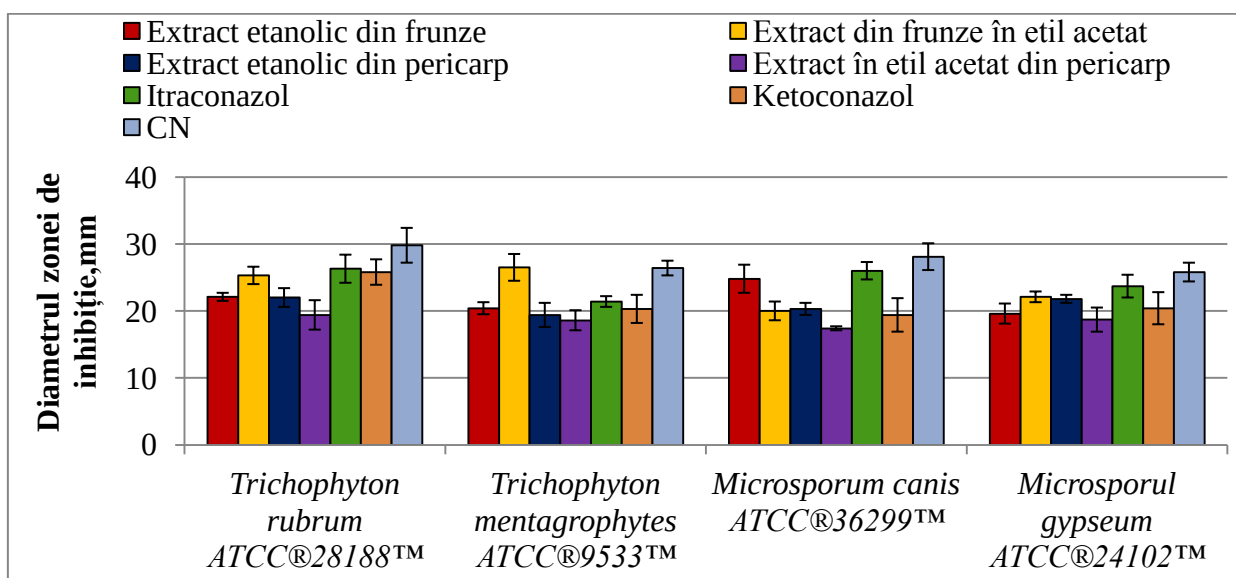


Fig. 3.3. Acțiunea antifungică a extractelor din frunze și pericarp verde de nucă față de tulpinile de fungi dermatofiți

Activitatea antifungică față de tulpina *Microsporum canis* ATCC®36299™ a fost semnificativ mai înaltă în cazul extractului etanolic din frunze de nuc, acest extract fiind mai activ comparativ cu ketoconazolul ($P < 0,05$), și nu se deosebește semnificativ din punct de vedere statistic de activitatea itraconazolului și a clorhidratului de naftifină asupra acestei tulpini. *Microsporum gypseum* ATCC®24102™ a manifestat același nivel de sensibilitate față de extractele din frunze de nuc în etanol și etil acetat ca și față de itraconazol și ketoconazol. Extractele din pericarpul verde de nucă au fost mai puțin active față de cele patru tulpini de dermatofiți filamentoși. În cazul tulpinii *Trichophyton rubrum* ATCC®28188™ acțiunea acestor extracte a dus la apariția unor zone de inhibiție semnificativ mai mici comparativ cu cele provocate de acțiunea martorilor pozitivi. Față de tulpina *Trichophyton mentagrophytes* ATCC®9533™ extractele din pericarp au avut activitate antifungică echivalentă cu cea a itraconazolului și ketoconazolului și semnificativ mai joasă comparativ cu cea a clorhidratului de

naftifină. Tulpinile de *Micrococcus* de asemenea au manifestat grade diferite de sensibilitate față de extractele din pericarpul verde, dar acțiunea martorilor pozitivi itraconazolul și clorhidratul de naftifină a fost mai pronunțată. Extractele din endocarpul lemnos de nucă în toți cei patru solvenți nu au avut efect de inhibare a creșterii dermatofiților filamentoși, din care cauză nu sunt incluse rezultatele respective în materialul ilustrativ. Față de tulpinile de fungi filamentoși oportuniști patogeni extractele din frunze, pericarpul verde și endocarpul lemnos de asemenea nu au manifestat activitate antifungică.

Astfel, dintre extractele obținute din diferite țesuturi de *Juglans regia*, extractul în etil acetat din frunze mature a fost cel mai activ față de tulpinile de *Trichophyton*, iar extractul etanolic din masa folială a provocat apariția celei mai extinse zone de inhibiție a creșterii tulpinii de *Microsporum canis* ATCC®36299™.

3.4. Potențialul antifungic al extractelor cianobacteriene

În continuare au fost testate mai multe tipuri de extracte din biomasa cianobacteriilor *Arthrospira (Spirulina) platensis* CNMN-CB-11 și *Nostoc linckia* CNM-CB-03. Argumentele pentru utilizarea acestora în calitate de produse antifungice au fost următoarele. Cianofitele sunt adaptate la diferite habitate - sol, ghețari, aer, mări, râuri, fiind componenta principală a fitoplanctonului în multe dintre ecosistemele acvatice. În aceste medii cianobacteriile suportă o presiune concurentă din partea altor organisme, inclusiv a fungilor. Evolutiv, ele și-au dezvoltat mecanisme de protecție prin sinteza compușilor antifungici, printre care fitoalexina, tolitoxina, toiocamicina, nostociclamida, nostodionul, nostofungicidina ș.a. [6].

În continuare sunt prezentate rezultatele obținute în cadrul evaluării activității antifungice a extractelor hidro etanolice de 20%, 50% și 70% obținute din biomasa de *Arthrospira (Spirulina) platensis* CNMN-CB-11 și *Nostoc linckia* CNM-CB-03 asupra dermatofiților filamentoși *Trichophyton* (*Trichophyton rubrum* ATCC®28188™, *Trichophyton mentagrophytes* ATCC®9533™) și *Microsporum* (*Microsporum canis* ATCC®36299™, *Microsporum gypseum* ATCC®24102™), precum și asupra tulpinii levuriforme *Candida albicans* ATCC®10231™. În calitate de martor pozitiv au fost utilizați ketoconazolul, itraconazolul și clorhidratul de naftifină. Rezultatele obținute pentru extractele hidro etanolice din biomasa de *Arthrospira (Spirulina) platensis* CNMN-CB-11 sunt prezentate în figura 3.4.

Extractele din biomasa de spirulină au manifestat activitate față de toate cele cinci tulpini fungice de referință, efectul de inhibiție a creșterii fiind diferit în dependență de tulpina de fungi și concentrația etanolului în soluția extractantă. Astfel, față de tulpina de fungi dermatofiți filamentoși *Trichophyton rubrum* ATCC®28188™ toate trei extracte hidro etanolice au avut

efect antifungic, dar diametrul zonelor de inhibiție obținute a fost semnificativ mai mic ($P < 0,01$) față de valorile obținute pentru cele trei preparate antifungice de referință. Extractul hidro etanolic de 50% din spirulină a avut efect antifungic față de tulpina *Trichophyton mentagrophytes* ATCC®9533™ la nivelul de activitate al ketoconazolului și itraconazolului (fără variații veridice din punct de vedere statistic).

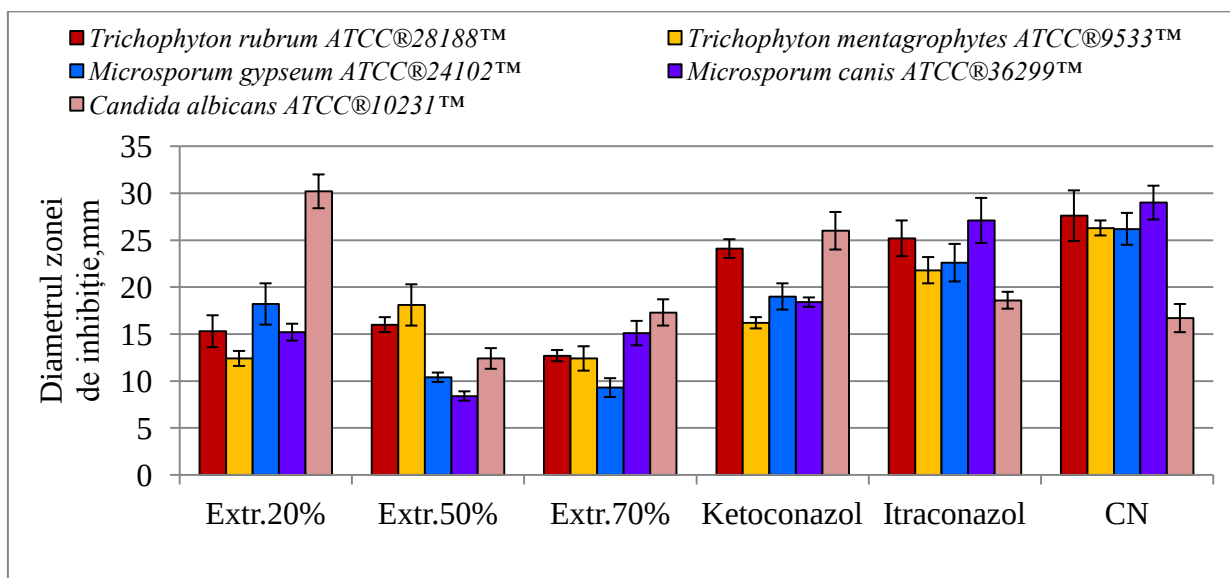


Fig.3.4. Acțiunea antifungică a extractelor din biomasa de *Arthrospira (Spirulina) plantesis* CNMN-CB-11 față de tulpinile de fungi dermatofiți filamentoși și levuriformi

Extractul hidro etanolic de 20% din biomasa de spirulină s-a dovedit a avea acțiune antifungică față de tulpina *Microsporum gypseum* ATCC®24102™ care nu se deosebește veridic de cea a ketoconazolului și itraconazolului. Și extractul hidro etanolic de 70% s-a manifestat în calitate de produs cu proprietăți antifungice față de tulpina de fungi *Candida albicans* ATCC®10231™. Astfel, conform zonelor de inhibiție obținute activitatea acestui extract este la nivelul itraconazolului și clorhidratului de naftifină. Asupra fungilor levuriformi cele mai semnificative rezultate au fost obținute în cazul acțiunii extractului hidro etanolic de 20% din spirulină. Diametrul zonei de inhibiție în acest caz este semnificativ mai mare comparativ cu toți trei martori pozitivi utilizați în experiențe ($P < 0.05$ pentru ketoconazol și $P < 0,001$ pentru itraconazol și clorhidratul de naftifină) [6].

Extractele hidro etanolice din biomasa de spirulină au manifestat activitate antifungică față de *Trichophyton*, *Microsporum* și *Candida*. Cea mai semnificativă activitate antifungică a fost înregistrată pentru extractul hidro etanolic de 20% , care în cazul candidiei 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 de *Candida*.

Rezultatele obținute pentru extractele hidro etanolice din biomasa de *Nostoc linckia* CNM-CB-03 sunt prezentate în figura 3.5. Cea mai semnificativă activitate antifungică au avut-o extractele hidro etanolice de 20% din biomasa de nostoc, valorile obținute fiind semnificativ mai înalte față de cele obținute pentru ketoconazol la trei dintre tulpinile studiate: *Microsporium canis* ATCC®36299™, *Microsporium gypseum* ATCC®24102™ și *Candida albicans* ATCC®10231™; față de itraconazol – la două tulpini: *Microsporium gypseum* ATCC®24102™ și *Candida albicans* ATCC®10231™; iar față de clorhidratul de naftifină – la o tulpină: *Candida 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™ [6].

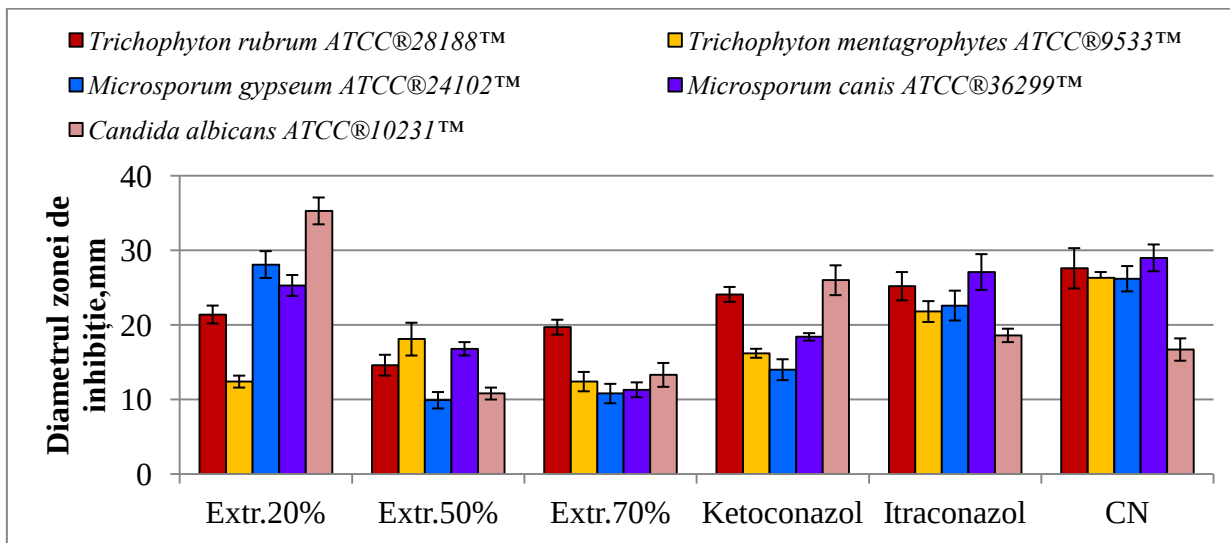


Fig. 3.5. Acțiunea antifungică a extractelor din biomasa de *Nostoc linckia* CNM-CB-03 față de tulpinile de fungi dermatofiti filamentoși și levuriformi

Față de fungii filamentoși oportunist patogeni extractele hidro etanolice din spirulină și nostoc nu au avut efect de inhibare a creșterii. Acest lucru poate fi probabil explicat prin faptul, că aceste tulpini au fost izolate din sol, unde sunt prezente numeroase specii de cianobacterii edafice, față de metaboliții cărora fungii puteau să dezvolte mecanisme eficiente de rezistență. În

cazul dermatofităilor și a candidiei, efectul extractului hidro etanolic de 20% cel mai probabil este determinat de prezența în componența acestuia a ficobiliproteinelor (ficocianinei și aloficocianinei în cazul spirulinei și a ficoeritrinei, ficocianinei și aloficocianinei în cazul nostocului). Aceste substanțe sunt cunoscute pentru multiplele lor efecte biologice, inclusiv cel antifungic. Soluția hidro etanolică de 20% este potrivită pentru extragerea pigmentilor numiți, care sunt hidrosolubili și trec cu ușurință în soluție.

Printre componentele active antifungice în extractele hidro etanolice de 50% și 70% cel mai probabil, sunt și compușii fenolici, care de asemenea posedă activitate antifungică dovedită. Spectrul acestor substanțe în biomasa de cianobacterii este extrem de variat, fapt prin care putem explica selectivitatea pronunțată a acțiunii acestor tipuri de extracte asupra tulpinilor de fungi studiate.

Este cunoscut că mulți compuși biologic activi utilizați ca medicamente manifestă proprietăți farmacologice și potențial toxic diferit, atunci când sunt administrați sub formă de compuși pe bază de metale [118, 119, 143]. Astfel, biomasa îmbogățită cu diferite metale ar putea servi în calitate de sursă de perspectivă pentru obținerea unor preparate benefice în cazul diferitor forme de micoze.

În continuarea cercetărilor au fost evaluate proprietățile antifungice a unor extracte obținute din biomasa de spirulină îmbogățită cu metale (Zn, Fe, Cu, Cd, Co și Cr) față de fungii filamentosi și candida. În cercetare au fost luate extractele hidrice și extractele etanolice din biomasa de spirulină, care este un obiect biotehnologic bine studiat, iar tehnologiile de obținere a biomasei sunt bine puse la punct și oferă rezultate reproductibile. În calitate de martor au fost luate extractele hidric și etanolic din biomasa standard de spirulină, iar în calitate de martori pozitivi au fost aplicate preparatele antifungice itraconazol, ketoconazol și clorhidrat de naftifină.

Rezultatele obținute la testarea acțiunii antifungice a extractelor etanolice și hidrice din biomasa standard de spirulină și cea cu conținut de metale prin metoda difuzimetrică sunt prezentate în tabelele 3.1, 3.2, și în figura 3.6, care includ diametrele zonelor de inhibiție a creșterii fungilor și valorile P doar pentru cazurile care exclud ipoteza nulă și indică diferență dintre variante în direcția măririi efectelor preparatelor testate. Din tabelul 3.1 se vede, că extractul etanolic din biomasa standard de spirulină a avut efect de inhibare a creșterii doar a uneia dintre tulpinile testate de fungi oportunist patogeni - *Aspergillus fumigatus* CNM-FA-02. Extractele din celelalte tipuri de biomasă de asemenea au avut un efect inhibitor asupra creșterii culturii de *A.fumigatus*. În cazul extractelor din biomasa de spirulină cu conținut de cupru și cadmiu efectul antifungic este mai pronunțat decât în cazul extractului etanolic din biomasa de spirulină standard, diametrele zonelor de inhibiție fiind veridic mai mari ($P=0,005$) decât în cazul

extractului standard. Cu toate acestea, chiar și aceste două extracte rămân semnificativ mai slabe decât preparatul antifungic de referință - clorhidratul de naftifină.

Tabelul 3.1.

Acțiunea antifungică a extractelor etanolice 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> FSO1
EE _{Zn}	11,66±0,58	14,23±1,12 $P_2=0,019^{**}$	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 $P_1=0,005^*$	0	10,20±0,91	11,67±0,60	10,03±0,35
EE _{Cd}	20,33±1,00 $P_1=0,005^*$	13,63±0,74 $P_2=0,013^{**}$	19,13±1,15	14,23±0,59	13,23±0,89
EE _{Co}	11,2±0,79	23,30±1,05 $P_2=0,001^{**}$	11,37±0,25	11,70±0,30	11,40±0,90
EE _{Cr}	15,87±0,83 $P_1=0,008^*$	18,43±0,61 $P_2=0,003^{**}$	16,70±0,55	12,67±1,52	10,83±0,56
EE	12,76±0,74	0	0	0	0
Clorhidrat de naftifină	34,50±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
Ketokonazol	17,23±0,86	15,80±1,34	18,32±0,96	15,44±2,02	19,80±1,35

Notă: P_1^* - veridicitatea deosebirilor dintre variantele EE_{Me} și varianta EE;

P_2^{**} – veridicitatea deosebirilor dintre variantele cu extracte și cu clorhidratul de naftifină.

În timp ce extractele etanolice din biomasa standard nu au produs inhibarea creșterii la celelalte tulpini de fungi testate, extractele din biomasa cu conținut de metale s-au manifestat ca componente cu efect antifungic de diferită intensitate față de toți fungii studiați. Efectul antifungic față de tulpinile *Penicillium expansum* CNMN-FD-05, *Fusarium oxysporum* FO1 și *Fusarium solani* FSO1 al extractelor din spirulină cu conținut de metale este mic comparativ cu cel al clorhidratului de naftifină în toate variantele experimentale analizate.

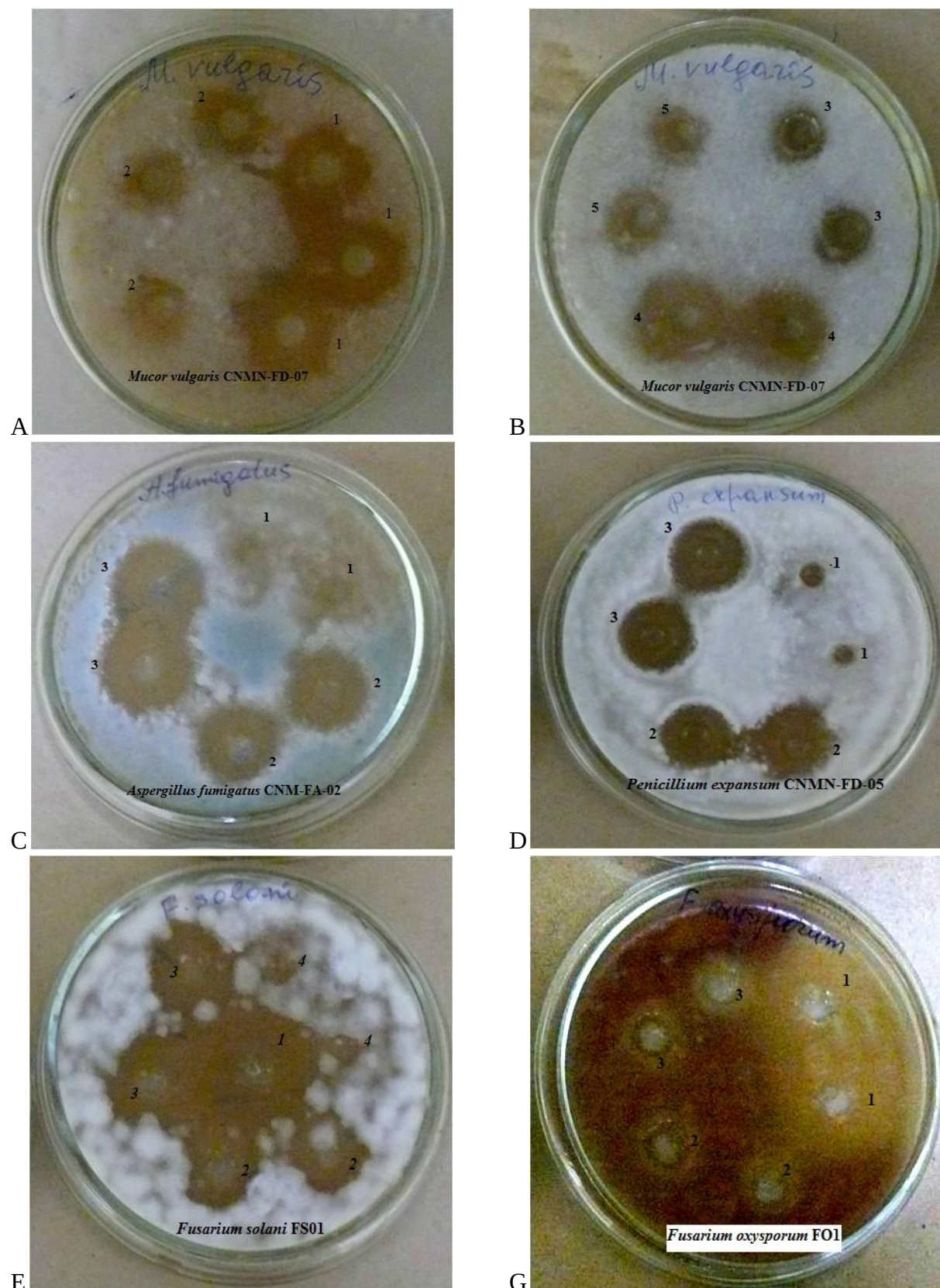


Fig. 3.6. Zonele de inhibiție a creșterii fungilor sub influența extractelor din biomasa de spirulină cu conținut de metale: A,B: *Mucor vulgaris* CNMN-FD-07, 1. EE_{Co}, 2.EE_{Zn}, 3.M, 4.EH_{Co}, 5.EE_{Cd}; C: *Aspergillus fumigatus* CNM-FA-02, 1. EE_{Co}, 2.EH_{Cd}, 3.M; D: *Penicillium expansum* CNMN-FD-05, 1. EH_{Cu}, 2. EH_{Cd}, 3.M; E: *Fusarium solani* FS01, 1.M, 2. EE_{Cd}, 3.EH_{Cd}, 4.EC_{Cu}; F: *Fusarium solani* FS01, 1.M, 2. EE_{Cd}, 3.EH_{Cd}, 4.EC_{Cu}; G: *Fusarium oxysporum* FO1, EH_{Co}, 2.EE_{Zn}, 3.EE_{Fe}

Din această categorie de rezultate se evidențiază cele înregistrate pentru tulpina de colecție *Mucor vulgaris* CNMN-FD-07. În cazul acestei culturi 4 din cele 6 extracte din biomasa cu conținut de metale au manifestat un efect antifungic mai pronunțat decât substanța de referință - clorhidratul de naftifină.

Cu excepția extractului din biomasa de spirulină cu conținut de cupru, care nu produce efect de inhibare, și cel din biomasa cu conținut de fier, zonele de inhibiție în variantele experimentale au fost veridic mai extinse comparativ cu cele obținute în cazul substanței de referință ($0,003 \leq P \leq 0,019$). Extractul etanolic din biomasa de spirulină cu conținut de cupru nu a inhibat creșterea culturii de *Mucor vulgaris* CNMN-FD-07.

Rezultatele obținute în cadrul testării extractelor hidrice din biomasa de spirulină cu conținut de metale sunt prezentate în tabelul 3.2.

Tabelul 3.2.

Acțiunea antifungică a extractelor 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
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	16,07±0,90	29,67±0,577 $P_2=0,001^{**}$	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
Ketokonazol	17,23±0,86	15,80±1,34	18,32±0,96	15,44±2,02	19,80±1,35

Notă: P_2^{**} – veridicitatea deosebiriilor dintre variantele cu extracte și cu clorhidratul de naftifină.

Extractele hidrice din biomasa de spirulină au fost mai puțin active în calitate de produse cu activitate antifungică. Extractul din biomasa standard nu a inhibat creșterea fungilor filamentoși luați în acest studiu. Același lucru se poate spune și despre extractele hidrice din

biomasa de spirulină cu conținut de zinc și de cupru – zone de inhibare a creșterilor de fungi miceliali nu au fost atestate. Extractul hidric cu fier a manifestat acțiune antifungică slabă doar față de tulpina izolată din microflora edafică spontană – *Fusarium oxysporum* FO1. Extractele hidrice din biomasa de spirulină cu conținut de cadmiu, cobalt și crom au avut efect antifungic asupra a 3-4 tulpini, într-un caz efectul fiind veridic mai pronunțat față de efectul clorhidratului de naftifină.

Varianta experimentală EH_{Cd} de extract cu conținut de cadmiu a manifestat efect antifungic față de 4 tulpini de fungi (cu excepția *Mucor vulgaris* CNMN-FD-07). Zonele de inhibare a creșterii fungilor *Penicillium expansum* CNMN-FD-05 și *Aspergillus fumigatus* CNM-FA-02 au avut dimensiuni apropiate cu zonele respective create sub acțiunea clorhidratului de naftifină, dar totuși veridic mai mici în diametru. Extractul hidric obținut din biomasa de spirulină cu conținut de cobalt a inhibat creșterea a trei tulpini de fungi - *Mucor vulgaris* CNMN-FD-07, *Penicillium expansum* CNMN-FD-05 și *Fusarium oxysporum* FO1. În cazul celui din urmă efectul antifungic al extractului a fost mai pronunțat decât cel al clorhidratului de naftifină, zona de inhibare fiind mai mare față de cea indusă de preparatul de referință cu 22,76%. Extractul hidric cu conținut de crom s-a manifestat prin inhibarea creșterii *Aspergillus fumigatus* CNM-FA-02, *Penicillium expansum* CNMN-FD-05 și *Fusarium oxysporum* FO1. Zona de inhibare a creșterii *Fusarium oxysporum* FO1 în acest caz este egală cu cea măsurată în varianta cu clorhidratul de naftifină [118, 119].

Aceleași extracte au fost testate și pe tulpinile de fungi dermatofiți filamentoși. Rezultatele obținute sunt prezentate în figura 3.7.

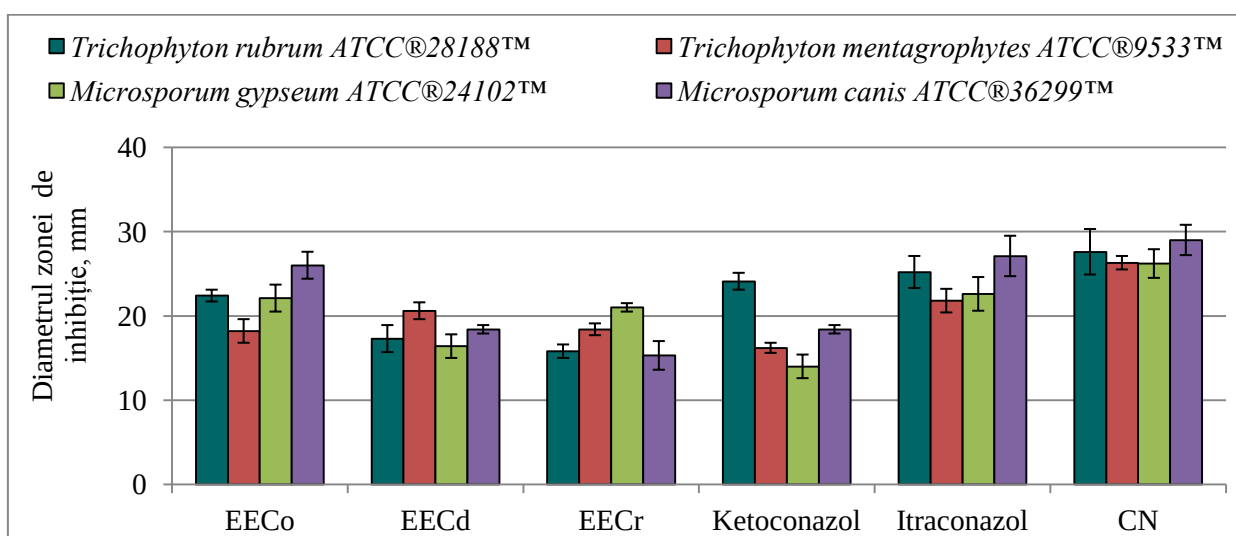


Fig. 3.7. Acțiunea antifungică a extractelor din biomasa de *Arthrospira* (*Spirulina*) *plantensis* CNMN-CB-11 cu conținut de metale față de tulpinile de fungi dermatofiți filamentoși

Extractele hidrice din biomasa de spirulină nu au manifestat activitate antifungică față de tulpinile de dermatofiți filamentoși, iar dintre extractele 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 obținut din biomasa de spirulină cu conținut de cobalt. La trei dintre tulpinile testate *Microsporum canis* ATCC®36299™, *Microsporum 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 ($P < 0,001$). În cazul tulpinilor *Microsporum canis* ATCC®36299™ și *Microsporum gypseum* ATCC®24102™ efectul extractului menționat nu se deosebește semnificativ de cel al itraconazolului. Comparativ cu clorhidratul de naftifină extractul etanolic din biomasa cu conținut de cobalt manifestă o activitate semnificativ mai joasă față de dermatofiții filamentoși, cu excepția *Microsporum canis* ATCC®36299™, față de care are aceeași acțiune ca și antifungicul de referință. Extractul etanolic din biomasa de spirulină cu conținut de crom are asupra tulpinilor *Trichophyton mentagrophytes* ATCC®9533™ și *Microsporum gypseum* ATCC®24102™ o acțiune antifungică mai pronunțată decât cea a ketoconazolului. Față de ceilalți martori pozitivi acțiunea extractului EE_{Cr} este mai slabă.

Astfel, prezentarea acestor rezultate finalizează etapa de screening a compușilor chimici și biologici cu activitatea antifungică față de unii agenți cauzali ai micozelor. Din gama compușilor testați au fost selectați acei, care au manifestat acțiune de inhibiție a creșterii fungilor. Față de *Candida albicans* ATCC®10231™ acțiune antifungică mai importantă au avut trei remedii biologice – extractul în etil acetat din frunze de nuc și extractele hidro etanolice de 20% din spirulină și nostoc și șase compuși chimici – RGTM 55-57, 64, 83 și BREV 1. Extractul în etil acetat din frunze de nuc a fost activ și față de tulpina de dermatofiți *Trichophyton mentagrophytes* ATCC®9533™, care a mai manifestat sensibilitate și față de extractele hidro etanolice de 50% din spirulină și nostoc, precum și față de extractele etanolice din biomasa de spirulină cu conținut de cobalt, cadmiu și crom. Tulpina *Trichophyton rubrum* ATCC®28188™ este sensibilă față de acțiunea extractelor în etanol și etil acetat din frunzele de nuc și a celui în etanol din pericarp. Și extractul hidro etanolic de 20% din nostoc are efect antifungic față de această tulpină, la fel ca și extractele etanolice din biomasa de spirulină cu conținut de cobalt, cadmiu și crom. Asupra tulpinii *Microsporum canis* ATCC®36299™ efect antifungic mai înalt au avut următoarele substanțe: extractul în etanol din frunze de nuci, extractul hidro etanolic de 70% din spirulină, extractele hidro etanolice de 20% și 70% din nostoc, precum și extractele etanolice din biomasa de spirulină cu conținut de cobalt și cadmiu. Tulpina *Microsporum gypseum* ATCC®24102™ este sensibilă față de acțiunea extractelor etanolice din biomasa de

spirulină cu conținut de cobalt și crom, extractelor hidro etanolice de 20% din nostoc și spirulină, extractului în etil acetat din frunze de nuc și extractului etanolic din pericarp. Asupra fungilor oportuniști din CNMN efect antifungic au manifestat doar extractele hidrice și etanolice din biomasa de spirulină cu conținut de metale. Astfel, pentru fiecare tulpină de fungi au fost evidențiate cei mai activi compuși de origine chimică și biologică care au fost incluși în cercetările ulterioare.

3.5. Stabilirea concentrațiilor minime de inhibiție și minime fungicide ale remediilor selectate față de tulpinile de referință de fungi

Concentrațiile minime de inhibiție (CMI) și minime fungicide (CMF) prezintă indicatori cantitativi valoroși pentru produsele noi cu activitate antifungică, care permit de a le plasa ușor în șirul remediilor aprobate, precum și de a aprecia nivelul lor de toxicitate. Anume din aceste considerente în continuare pentru substanțele selectate la etapa de screening au fost stabilite valorile respective. Cu referire la fungii filamentoși dermatofiți și candida au fost aplicate metode standardizate EUCAST (7.1 și 9.1), iar pentru fungii filamentosi oportuniști a fost aplicată metoda clasică a diluțiilor succesive.

La etapa de screening au fost selectate 9 substanțe cu efect antifungic față de tulpina de fungi levuriformi *Candida albicans* ATCC®10231™. Acestea sunt: extractul în etil acetat din frunze de nuc, extractele hidro etanolice de 20% din spirulină și nostoc, șase compuși chimici – RGTM 55-57, 64, 83 și BREV1 compusul N-(2,4-dimetilfenil)-2-(2-hidroxibenziliden)-hidrazincarbotoamida. Pentru aceste substanțe au fost realizate testele conform metodei standardizate EUCAST Def. 7.1. Activitatea substanțelor studiate față de tulpina *Candida albicans* ATCC®10231™ a fost comparată cu activitatea clorhidratului de naftifină, inraconazolului și cea a ketoconazolului. Concentrațiile minime de inhibiție ale extractelor naturale au variat între 0,1 și 10 mg/ml. Cel mai puternic dintre acestea a fost extractul în etil acetat din frunzele mature de nuc (vezi tabelul 3.3.). Acest extract la concentrația de 0,4 mg/ml are acțiune fungicidă asupra tulpinii de *Candida*. Substanțele chimice – compușii coordinativi ai cuprului (II) cu semitiocarbazonă substituie (RGTM 55, 56, 57 și 83) și diamina aromată (RGTM 64) au arătat valori CMI între 0,58 și 2,34 μg/ml și valori CMF între 1,17 și 4,69 μg/ml. În cazul substanțelor chimice este destul de simplu de comparat activitatea acestora cu activitatea martorilor pozitivi, deoarece în toate cazurile sunt substanțe pure dozate. Pentru compușii selectați putem menționa că doar comparativ cu itraconazolul aceștia înregistrează valori mai înalte ale CMI, pe când ceilalți doi martori pozitivi (ketoconazolul și clorhidratul de naftifină) sunt mai slabi în ceea ce ține de inhibarea creșterii fungilor *Candida albicans* ATCC®10231™.

Tabelul 3.3.

Concentrațiile minime de inhibiție (CMI) și minime fungicide (CMF) ale substanțelor selectate față de tulpina *Candida albicans* ATCC®10231™

Substanța	CMI	CMF
Extract frunze de <i>J. regia</i> (etil-acetat)	0,1 mg/ml	0,4 mg/ml
Extract hidro etanolic 20% din <i>S.platensis</i>	10 mg/ml	40 mg/ml
Extract hidro etanolic 20% din <i>N.linckia</i>	5 mg/ml	10 mg/ml
N-(2,4-dimetilfenil)-2-(2-hidroxibenziliden)-hidrazincarbotoamida	0,70 μg/ml	0,70 μg/ml
RGTM 55	1,17 μg/ml	2,34 μg/ml
RGTM 56	1,17 μg/ml	4,69 μg/ml
RGTM 57	2,34 μg/ml	4,69 μg/ml
RGTM 64	1,17 μg/ml	4,69 μg/ml
RGTM 83	0,58 μg/ml	1,17 μg/ml
Intraconazol	0,78 μg/ml	6,25 μg/ml
Ketaconazol	12,5 μg/ml	50 μg/ml
Clorhidrat de naftifină	25 μg/ml	100 μg/ml

Compusul N-(2,4-dimetilfenil)-2-(2-hidroxibenziliden)-hidrazincarbotoamida la aceeași concentrație de 0,7 μg/ml manifestă atât activitate de inhibare a creșterii, cât și efect fungicid. Activitatea antifungică a acestui compus (CMI) este comparabilă cu cea a itraconazolului, de 17,8 ori mai înaltă ca a ketoconazolului și de 35,7 ori mai înaltă ca cea a clorhidratului de naftifină. În baza acestor rezultate a fost depusă o cerere de brevet de invenție, pentru care a fost obținută hotărârea pozitivă de acordare a brevetului de invenție [3].

La etapa de screening au fost selectate 6 substanțe care au manifestat activitate față de tulpina *Trichophyton mentagrophytes* ATCC®9533™. Acestea sunt extractul în etil acetat din frunze de nuc, extractele hidro etanolice de 50% din spirulină și nostoc și extractele etanolice din biomasa de spirulină cu conținut de cobalt, cadmiu și crom. Rezultatele obținute sunt prezentate în tabelul 3.4, unde sunt de asemenea și rezultatele obținute pentru cei trei martori pozitivi utilizați. Este destul de complicat de a compara valorile CMI și CMF pentru preparatele antifungice (concentrațiile indicate sunt pentru substanța activă) și valorile respective pentru extractele din biomasa vegetală și cianobacteriană. Ultimele sunt standardizate nu după substanță activă ci după masa uscată extrasă. Standardizarea după componentele active la această etapă nici nu a fost preconizată, deoarece identificarea și purificarea componentelor cu activitate biologică înaltă va fi rațională doar după identificarea acestor efecte și aprecierea gradului de reproductibilitate a rezultatelor obținute. Mai mult, de cele mai multe ori efectele biologice

manifestate de preparatele policomponente sunt determinate de efectele sinergiste ale întregului complex de componente individuale. Astfel, cu toate că valorile CMI și CMF sunt destul de mari comparativ cu cele ale martorilor pozitivi, aceste rezultate sunt destul de relevante, deoarece este vorba de extracte naturale din frunze de nuc, spirulină și nostoc. Materiile utilizate pentru extragerea componentelor active în extractele nominalizate sunt lipsite de efecte toxice față de om, ceea ce este un plus în procesul de selectare a noilor compuși cu activitate antifungică.

Tabelul 3.4.

Concentrațiile minime de inhibiție (CMI) și minime fungicide (CMF) ale substanțelor selectate față de tulpina *Trichophyton mentagrophytes* ATCC®9533™

Substanța	CMI	CMF
Extract frunze de <i>J. regia</i> (etil acetat)	0,2 mg/ml	0,4 mg/ml
Extract hidro etanolic 50% din <i>S.platensis</i>	10 mg/ml	-
Extract hidro etanolic 50% din <i>N.linckia</i>	5 mg/ml	-
EE _{Co}	0,125 mg/ml	1 mg/ml
EE _{Cd}	0,065 mg/ml	0,5 mg/ml
EE _{Cr}	0,5 mg/ml	0,5 mg/ml
Intraconazol	0,25 μg/ml	1,0 μg/ml
Ketaconazol	0,5 μg/ml	4,0 μg/ml
Clorhidrat de naftifină	0,25 μg/ml	2,0 μg/ml

Valorile CMI pentru extractele selectate au fost între 0,065 și 10 mg/ml. Cele mai înalte valori sunt caracteristice pentru extractele hidro etanolice din biomasa de spirulină și nostoc. În domeniul de concentrații studiate nu a fost înregistrată CMF pentru aceste două tipuri de extract. Ambele culturi de cianobacterii sunt tulpini tehnologice, utilizate pentru obținerea biomasei destinate consumului uman și animal. Tulpinile nu produc toxine, iar rezultatul obținut este unul previzibil din acest punct de vedere. Extractul în etil acetat din frunzele de nuc a avut activitate antifungică înaltă față de *Trichophyton mentagrophytes* ATCC®9533™, CMI fiind de 0,2 mg/ml, iar CMF de doar 0,4 mg/ml. Extractele etanolice din biomasa de spirulină cu conținut de metale se manifestă ca inhibitori de creștere a fungilor la concentrația de 0,065 -0,5 mg/ml și ca fungicide la concentrația de 0,5 – 1,0 mg/ml. Cele mai joase valori ale CMI în cazul tulpinii *Trichophyton mentagrophytes* ATCC®9533™ au fost înregistrate la acțiunea extractelor etanolice din biomasa de spirulină cu conținut de cobalt (0,125 mg/ml) și cu conținut de cadmiu (0,065 mg/ml).

Tulpina *Trichophyton rubrum* ATCC®28188™ este sensibilă față de acțiunea a 7 substanțe din lista celor testate. Acestea sunt: extractele în etanol și etil acetat din frunzele de nuc, extractul în etanol din pericarp de nucă, extractul hidro etanolic de 20% din nostoc și extractele etanolice din biomasa de spirulină cu conținut de cobalt, cadmiu și crom. Rezultatele obținute pentru tulpina numită și substanțele selectate sunt prezentate în tabelul 3.5.

Tabelul 3.5.

Concentrațiile minime de inhibiție (CMI) și minime fungicide (CMF) ale substanțelor selectate față de tulpina *Trichophyton rubrum* ATCC®28188™

Substanța	CMI	CMF
Extract frunze de <i>J. regia</i> (etanol)	0,2 mg/ml	0,4 mg/ml
Extract frunze de <i>J. regia</i> (etil acetat)	0,1 mg/ml	0,4 mg/ml
Extract pericarp verde de <i>J. regia</i> (etanol)	0,05 mg/ml	0,2 mg/ml
Extract hidro etanolic 20% din <i>N.linckia</i>	10 mg/ml	-
EE _{Co}	0,125 mg/ml	1 mg/ml
EE _{Cd}	0,065 mg/ml	0,5 mg/ml
EE _{Cr}	0,5 mg/ml	0,5 mg/ml
Intraconazol	0,125 μg/ml	0,5 μg/ml
Ketaconazol	0,25 μg/ml	0,50 μg/ml
Clorhidrat de naftifină	0,25 μg/ml	2,0 μg/ml

Extractele din biomasa vegetală și cianobacteriană au demonstrat activitate antifungică semnificativă cu valori ale CMI de 0,2 mg/ml și mai puțin. Excepție prezintă extractul hidro etanolic din biomasa de nostoc, care s-a manifestat ca fungistatic la concentrația de 10 mg/ml, iar efect fungicid nu a fost depistat. Extractele etanolice din frunze mature și din pericarp verde au dat dovadă de activitate antifungică față de tulpina *Trichophyton rubrum* ATCC®28188™. Și extractul în etil acetat din frunze a fost destul de activ, CMI pentru el fiind de 0,1 mg/ml. Cele mai mici valori ale CMI față de tulpina dată au fost marcate în cazul extractelor etanolice din biomasa de spirulină cu conținut de cobalt și cadmiu (0,125 și 0,065 mg/ml respectiv), dar CMF al acestora a fost de 2-4 ori mai înalte decât în cazul extractelor din țesuturi de nuc.

Asupra tulpinii *Microsporum canis* ATCC®36299™ efect antifungic mai înalt au avut următoarele substanțe: extractul în etanol din frunze de nuci, extractul hidro etanolic de 70% din spirulină, extractele hidro etanolice de 20% și 70% din nostoc, precum și extractele etanolice din

biomasa de spirulină cu conținut de cobalt și cadmiu. Rezultatele pentru acțiunea antifungică a acestor substanțe asupra tulpinii menționate de dermatofiți sunt prezentate în figura 3.6.

Tabelul 3.6.

Concentrațiile minime de inhibiție (CMI) și minime fungicide (CMF) ale substanțelor selectate față de tulpina *Microsporium canis* ATCC®36299™

Substanța	CMI	CMF
Extract frunze de <i>J. regia</i> (etanol)	0,1 mg/ml	0,4 mg/ml
Extract hidro etanolic 70% din <i>S.platensis</i>	2,5 mg/ml	-
Extract hidro etanolic 20% din <i>N.linckia</i>	5 mg/ml	-
Extract hidro etanolic 70% din <i>N.linckia</i>	5 mg/ml	-
EE _{Co}	0,125 mg/ml	1 mg/ml
EE _{Cd}	0,065 mg/ml	0,5 mg/ml
Intraconazol	0.125 μg/ml	0,5 μg/ml
Ketaconazol	0,25 μg/ml	1,0 μg/ml
Clorhidrat de naftifină	0,25 μg/ml	4,0 μg/ml

Extracetele hidro etanoloce de 70% și 20% din biomasa de spirulină și nostoc au avut efect fungistatic la concentrații de 2,5 – 5,0 mg/ml, în timp ce efectul fungicid al acestora nu a fost depistat. O activitate înaltă față de tulpina *Microsporium canis* ATCC®36299™ a avut-o și extractul în etanol din frunzele mature de nuc (CMI=0,1 mg/ml, iar CMF=0,4 mg/ml). Ca și în cazul tulpinilor descrise anterior, cea mai pronunțată acțiune antifungică asupra *Microsporium canis* ATCC®36299™ a fost realizată de extracetele etanolicе din biomasa de spirulină cu conținut de cobalt și cadmiu, CMI fiind de 0,125 și 0,065 mg/ml respectiv. Concentrațiile fungicide au fost depistate doar pentru 3 dintre substanțele selectate. Cel mai bun rezultat – 0,4 mg/ml a fost în cazul extractului etanolic din frunze, după care urmează extractul etanolic din biomasa de spirulină cu conținut de cadmiu (0,5 mg/ml). Trei dintre substanțele selectate nu au avut acțiune fungicidă asupra tulpinii *Microsporium canis* ATCC®36299™.

Tulpina *Microsporium gypseum* ATCC®24102™ este sensibilă față de acțiunea extracetelor etanolicе din biomasa de spirulină cu conținut de cobalt și crom, extracetelor hidro etanolicе de 20% din nostoc și spirulină, extractului în etil acetat din frunze de nuc și extractului etanolic din pericarp. Rezultatele obținute pentru tulpina și substanțele menționate sunt prezentate în tabelul 3.7. Extracetele hidro etanolicе de 20% din biomasa de spirulină și nostoc au efect fungistatic la concentrația de 5 mg/ml, în timp ce efectul fungicid nu a fost depistat. Extractul în etanol din pericarpul verde inhibă creșterea fungilor *Microsporium gypseum* ATCC®24102™ la

concentrația de 0,25 mg/ml și are efect fungicid la concentrația de 1 mg/ml. Activitate antifungică și mai înaltă are extractul în etil acetat din frunzele mature de nuc, CMI fiind egal cu 0,125 mg/ml, iar CMF – 0,5 mg/ml. Aceeași valoare CMI a fost înregistrată și pentru extractul etanolic din biomasa de spirulină cu conținut de cobalt. Cea mai mică valoare CMI față de *Microsporum gypseum* ATCC®24102™ a fost semnalată în cazul extractului etanolic din biomasa de spirulină cu conținut de crom – 0,065 mg/ml, iar CMF pentru acest preparat este de 0,5 mg/ml.

Tabelul 3.7.

Concentrațiile minime de inhibiție (CMI) și minime fungicide (CMF) ale substanțelor selectate față de tulpina *Microsporum gypseum* ATCC®24102™

Substanța	CMI	CMF
Extract Frunze de <i>J. regia</i> (etil acetat)	0,125 mg/ml	0,5 mg/ml
Extract pericarp verde de <i>J. regia</i> (etanol)	0,25 mg/ml	1,0 mg/ml
Extract hidro etanolic 20% din <i>S.platensis</i>	5 mg/ml	-
Extract hidro etanolic 20% din <i>N.linckia</i>	5 mg/ml	-
EE _{Co}	0,125 mg/ml	1 mg/ml
EE _{Cr}	0,065 mg/ml	0,5 mg/ml
Intraconazol	0.065 μg/ml	0,5 μg/ml
Ketaconazol	0,25 μg/ml	1,0 μg/ml
Clorhidrat de naftifină	0,25 μg/ml	2,0 μg/ml

Fungii oportuniști izolați și identificați din solurile Moldovei, care au fost depuși în Colecția Națională de Microorganisme Nepatogene a Institutului de Microbiologie și Biotehnologie al AȘM s-au dovedit a fi mai rezistenți față de acțiunea extractelor vegetale și cianobacteriene. Astfel, extractele din frunze, pericarp și endocarp de nuci nu au avut acțiune marcantă asupra celor cinci tulpini incluse în studiu. Nici extractele hidro etanolice nu au manifestat activitate antifungică față de această categorie de fungi filamentoși. În cazul fungilor filamentoși *Aspergillus fumigatus* CNM-FA-02 , *Mucor vulgaris* CNMN –FD-07 și *Penicillium expansum* CNMN-FD-05 valori acceptabile pentru CMI au fost obținute pentru extractele hidrice și etanolice din biomasa de spirulină cu conținut de metale - cadmiu și crom. Rezultatele sunt prezentate în tabelul 3.8.

Tabelul 3.8.

Concentrațiile minime de inhibiție (CMI) și minime fungicide (CMF) ale substanțelor selectate față de tulpinile *Aspergillus fumigatus* CNM-FA-02 , *Mucor vulgaris* CNMN –FD-07 și *Penicillium expansum* CNMN-FD-05

Substanța	<i>Aspergillus fumigatus</i> CNM-FA-02		<i>Mucor vulgaris</i> CNMN –FD-07		<i>Penicillium expansum</i> CNMN-FD-05	
	CMI	CMF	CMI	CMF	CMI	CMF
EH _{Cd}	1,0 mg/ml	-			1,0 mg/ml	1,0 mg/ml
EH _{Cr}	0,25 mg/ml	-			0,5 mg/ml	-
EH _{Co}			0,125 mg/ml	-	0,125 mg/ml	-
EE _{Cd}	1,0 mg/ml	-	0,125 mg/ml	1,0 mg/ml	0,125 mg/ml	1,0 mg/ml
EE _{Cr}	0,5 mg/ml	1,0 mg/ml	0,25 mg/ml	1,0 mg/ml	1,0 mg/ml	-
EE _{Zn}			0,5 mg/ml	-		
EE _{Fe}			0,25 mg/ml	1,0 mg/ml		
Clorhidrat de naftifină	1,0 μg/ml	-	0,25 μg/ml	-	0,5 μg/ml	-

Tulpina *Aspergillus fumigatus* CNM-FA-02 a manifestat sensibilitate față extractele hidrice și cele etanolice din biomasa de spirulină cu conținut de cadmiu și crom. CMI ale acestor extracte a fost între 0,25 și 1,0 mg/ml, iar efect fungicid a fost depistat doar în unul dintre cazuri – pentru extractul etanolic din biomasa de spirulină cu crom, CMF fiind de 1,0 mg/ml. Creșterea tulpinii *Mucor vulgaris* CNMN-FD-07 a fost inhibată de extractele etanolice din biomasa de spirulină cu conținut de cadmiu, crom, zinc, fier, CMI având valori între 0,125 și 0,5 mg/ml. Acțiune fungică față de mucor a fost înregistrată la acțiunea extractelor etanolice din biomasa cu conținut de cadmiu, crom și fier, la concentrația de 1,0 mg/ml. Față de tulpina *Penicillium expansum* CNMN-FD-05 efect fungistatic au avut 5 extracte din spirulină: extractele hidrice cu conținut de cadmiu, crom și cobalt și extractele etanolice cu conținut de cadmiu și crom. Valorile CMI stabilite experimental au fost între 0,125 și 1,0 mg/ml. Efect fungicid a fost semnalat doar în cazul extractelor din ambele tipuri din biomasa cu conținut de cadmiu. CMF a extractului hidric cu conținut de cadmiu a fost egală cu CMI și a constituit 1,0 mg/ml. Aceeași valoare CMF a fost determinată și pentru extractul etanolic din biomasa de spirulină cu conținut de cadmiu.

Izolatele naturale *Fusarium oxysporum* FO1 și *Fusarium solani* FS01 la fel au prezentat sensibilitate doar față de extractele hidrice și etanolice din biomasa de spirulină cu conținut de metale. Rezultatele obținute sunt prezentate în tabelul 3.9. *Fusarium oxysporum* FO1 a dat

dovadă de sensibilitate la acțiunea extractelor hidrice din biomasa de spirulină cu conținut de cadmiu, crom și cobalt, precum și la acțiunea extractelor etanolice din biomasa de spirulină crescută în condiții de bioacumulare a cadmiului și cromului.

Tabelul 3.9.

Concentrațiile minime de inhibiție (CMI) și minime fungicide (CMF) ale substanțelor selectate față de izolatele naturale *Fusarium oxysporum* FO1 și *Fusarium solani* FS01

Substanța	<i>Fusarium oxysporum</i> FO1		<i>Fusarium solani</i> FS01	
	CMI	CMF	CMI	CMF
EH _{Cd}	1,0 mg/ml	-	0,5 mg/ml	0,5 mg/ml
EH _{Cr}	1,0 mg/ml	1,0 mg/ml		
EH _{Co}	0,125 mg/ml	0,25 mg/ml		
EE _{Cd}	0,25 mg/ml	1,0 mg/ml	0,5 mg/ml	1,0 mg/ml
EE _{Cr}	0,25 mg/ml	0,5 mg/ml	0,25 mg/ml	0,5 mg/ml
EE _{Co}			0,25 mg/ml	0,5 mg/ml
Clorhidrat de naftifină	0,5 μg/ml	1,0 μg/ml	0,5 μg/ml	1,0 μg/ml

Cele mai joase valori ale CMI și CMF au fost înregistrate pentru extractul hidric din biomasa cu cobalt. Astfel, la tratarea culturii de *Fusarium oxysporum* FO1 cu concentrația de 0,125 mg/ml se observă efectul fungistatic, iar la concentrația de 0,25 mg/ml se observă efectul fungicid. Următoarele după nivelul de activitate antifungică față de *Fusarium oxysporum* FO1 au fost extractele etanolice din biomasa de spirulină cu cadmiu și crom. În aceste două cazuri valoarea CMI a fost de 0,25 mg/ml, iar CMF – 1,0 și 0,5 mg/ml respectiv. Extractele hidrice din biomasa cu crom și cadmiu au avut efect fungistatic asupra *Fusarium oxysporum* FO1 la concentrația de 1,0 mg/ml. Pentru extractul cu conținut de cadmiu efect fungicid nu a fost stabilit, iar pentru extractul hidric cu crom valoarea CMF a fost egală cu valoarea respectivă CMI (1,0 mg/ml). Extractul hidric din biomasa cu cadmiu a manifestat acțiune antifungică și asupra izolatului natural *Fusarium solani* FS01. Valorile CMI și CNF au fost identice – 0,5 mg/ml. Tulpina a fost de asemenea sensibilă la acțiunea extractelor hidrice din biomasa de spirulină cu conținut de cobalt, cadmiu și crom. Pentru aceste trei tipuri de extracte valorile determinate ale CMI au fost de 0,25 și de 0,5 mg/ml. CMF în cazul izolatului *Fusarium solani* FS01 pentru toate extractele active a fost de 0,5 ori 1,0 mg/ml.

Astfel, extractele etanolice din biomasa de spirulină cu conținut de cobalt și cadmiu au manifestat activitate antifungică cea mai înaltă față de tulpinile *Trichophyton mentagrophytes* ATCC®9533™, *Trichophyton rubrum* ATCC®28188™ și *Microsporum canis* ATCC®36299™. Față de tulpina *Microsporum 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, CMI joase au fost obținute pentru extractele hidrice și etanolice din biomasa de spirulină cu conținut de cadmiu și crom. Asupra ambelor izolate naturale din genul *Fusarium* au acționat extractele etanolice din biomasa de spirulină cu conținut de cadmiu și crom.

3.6. Concluzii la capitolul 3.

1. Față de tulpina levuriformă *Candida albicans* ATCC®10231™ acțiune antifungică mai pronunțată au avut trei remedii biologice – extractul în etil acetat din frunze de nuc și extractele hidro etanolice de 20% din spirulină și nostoc și șase compuși chimici – RGTM 55, 56, 57, 64, 83 și BREV 1 (N-(2,4-dimetilfenil)-2-(2-hidroxibenziliden)-hidrazincar-botioamida), ultimul fiind brevetat în calitate de substanță activă contra levurilor din genul *Candida* [3], iar rezultatele fiind înalt apreciate la diferite foruri internaționale [61, 63, 64, 66].
2. Extractul în etil acetat din frunze de nuc, extractele hidro etanolice de 50% din spirulină și nostoc, precum și extractele etanolice din biomasa de spirulină cu conținut de cobalt, cadmiu și crom sunt de perspectivă în calitate de remedii cu efect antifungic față de tulpina de dermatofiți *Trichophyton mentagrophytes* ATCC®9533™.
3. Tulpina *Trichophyton rubrum* ATCC®28188™ este sensibilă față de acțiunea extractelor în etanol și etil acetat din frunzele de nuc, a extractului etanolic din pericarp verde de nucă, a extractului hidro etanolic de 20% din nostoc și a extractelor etanolice din biomasa de spirulină cu conținut de cobalt, cadmiu și crom.
4. Asupra tulpinii *Microsporum canis* ATCC®36299™ efect antifungic mai înalt au avut următoarele remedii: extractul în etanol din frunze de nuci, extractul hidro etanolic de 70% din spirulină, extractele hidro etanolice de 20% și 70% din nostoc, precum și extractele etanolice din biolasa de spirulină cu conținut de cobalt și cadmiu.
5. Tulpina *Microsporum gypseum* ATCC®24102™ este sensibilă față de acțiunea extractelor etanolice din biomasa de spirulină cu conținut de cobalt și crom, extractelor hidro etanolice de 20% din nostoc și spirulină, extractului în etil acetat din frunze de nuc și extractului etanolic din pericarp.

6. Asupra fungilor oportuniști din CNMN efect antifungic au manifestat extractele hidrice și etanolicе din biomasa de spirulină cu conținut de metale. În cazul fungilor filamentoși *Aspergillus fumigatus* CNM-FA-02, *Mucor vulgaris* CNMN-FD-07, *Penicillium expansum* CNMN-FD-05, CMI joase au fost obținute pentru extractele hidrice și etanolicе din biomasa de spirulină cu conținut de cadmiu și crom. Asupra ambelor izolate naturale din genul *Fusarium* au acționat extractele etanolicе din biomasa de spirulină cu conținut de cadmiu și crom.
7. Compușii coordinativi cu tiosemicarbazone substituie sunt de perspectivă în calitate de remedii antifungice față de fungii levuriformi *Candida albicans* ATCC®10231™.
8. Extractele din frunze și pericarp de nuc sunt de perspectivă în calitate de remedii antifungice față de fungii dermatofiți miceliali.
9. Extractele din biomasa de spirulină cu conținut de cobalt, crom și cadmiu sunt de perspectivă în calitate de remedii antifungice față de fungii filamentoși, agenți cauzali ai micozelor oportuniste.

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

Acțiunea compușilor cu activitate antifungică, fie chiar de scurtă durată, este asociată cu modificări serioase în funcționarea mecanismelor biochimice, ceea ce duce la inactivarea sistemelor de protecție sau la blocarea lor completă. Care dintre aceste două strategii va fi urmată – depinde de mulți factori, printre care este starea fiziologică a celulelor fungice afectate, proprietățile fizico-chimice ale substanțelor, parametrii sistemului de interacțiune ș.a. Chiar și în cazul celei de-a doua strategii, care se soldează cu moartea celulelor, la o acțiune de scurtă durată celulele dovedesc să reacționeze prin anumite modificări biochimice, care pot fi detectate și care pot furniza informații utile despre mecanismele de acțiune a agenților terapeutici. Din aceste considerente, monitorizarea modificărilor, care au loc la nivel biochimic constituie o parte importantă a cercetării în procesul de identificare a noilor agenți activi contra fungilor patogeni.

4.1. Nivelul actual de cunoaștere

De la primii agenți antifungici descoperiți – polienele - până la cele mai noi – echinocandinele – practic toate remediile terapeutice utilizate în tratamentul micozelor au ca țintă de acțiune peretele celular ori membrana celulară. Astfel, blocarea mecanismelor de sinteză a componentelor structurale ale anvelopelor celulare (în primul rând a ergosterolului, glicanilor și manoproteinelor), este unul din cele mai des întâlnite mecanisme de acțiune a preparatelor cu activitate antifungică. Sinteza insuficientă a elementelor de structură a membranei și peretelui celular, sinteza eronată a acestora, formarea legăturilor stabile dintre moleculele membranare și agenții terapeutici în cele din urmă compromit integritatea celulelor de fungi, ceea ce duce la moartea lor. Multe dintre preparatele cu efect antifungic sunt orientate spre blocarea mecanismelor de biosinteză a ergosterolului, ceea ce duce la degradarea membranelor și chiar la ruperea lor. Primele semne ale unor modificări de acest tip constau în dereglarea permeabilității membranei, care duce la eliberarea în mediul extracelular a unor componente, care în condiții normale ar trebui să se afle în interiorul celulelor. Printre astfel de substanțe este lactat dehidrogenaza (LDH) - o enzimă intracelulară, care este implicată în ciclul glicolitic, și care transformă acidul lactic în acid piruvic în prezența NADH. Deteriorarea peretelui și membranei celulare la fungii patogeni și oportunist patogeni sub influența diferitor extracte naturale, cum este cel din usturoi, sunt vizibile la examinare atât cu microscopul optic, cât și cel electronic. Lista de modificări morfologice provocate de preparatele cu efect antifungic la fungii *Apergillus niger*, *Botrytis cinerea*, *Botrytis paeoniae*, *Fusarium oxysporum*, *Heterosporium*

pruneti, *Penicillium gladioli*, *Penicillium expansum*, *Sclerotinia sclerotiorum*, include contracția hifelor, aplatizarea lor, apariția breșelor în structura peretelui celular și îngroșarea excesivă a unor regiuni ale acestuia, hipertrofia părții apicale a hifelor, coagularea conținutului citoplasmatic, degradarea organitelor celulare [7, 126]. La izolatele de *Trichophyton rubrum*, eugenolul, de exemplu, produce scurtarea, îngroșarea și răsucirea hifelor [128]. Și alți alcooli monoterpenoizi produc modificări morfologice ale hifelor fungilor miceliali dermatofiți de tipul celor menționate, precum și eliberarea conținutului lor în mediul de cultură [129].

Extractele din diferite materiale vegetale, cum este de exemplu, extractul din usturoi, extractele din frunzele de *Casearia sylvestris* și *Casearia decandra* reduc activitatea enzimatică la fungii fitopatogeni din componența rizosferei și rizoplanei, dar și a unor specii de fungi miceliali dermatofiți [108, 162]. La *Candida albicans* sub influența extractului în butanol din *Sapindus saponaria* au fost înregistrate multiple modificări calitative și cantitative în spectrul proteic. Printre proteinele/enzimele, expresia cărora se modifică substanțial în celulele de fungi se numără cele implicate în procesul de glicoliză (GPM1, ENO1, FBA1), metabolismul aminoacizilor (ILV5, PDC11) și sinteza proteinelor (ASC1) [53]. Influența eugenolului și altor alcooli monoterpenoizi asupra fungilor dermatofiți este asociată cu inhibarea biosintezei ergosterolului, ceea ce se manifestă printr-un nivel redus al acestui component important în biomasa tratată [128, 129].

Analiza ARN-seq la cultura de *Trichophyton rubrum*, tratată cu doze subletale de acriflavină a stabilit modificarea expresiei a 69 de gene, care din punct de vedere funcțional sunt implicate în reacțiile de oxidare-reducere, transportul transmembranar și legarea ionilor de metale. Expresia genelor care sunt considerate a fi implicate în patogenitatea dermatofitelor a fost inhibată, ceea ce sugerează că acest medicament interferează cu virulența dermatofitului *Trichophyton rubrum* [132].

Rezultatele obținute la tratarea culturii fungale de *Cryptococcus gatti* cu agenți antifungali în diferite doze și la diferită durată demonstrează, că în condițiile acțiunii de lungă durată în doze înalte preparatele antifungice duc la supraacumularea speciilor reactive de oxigen și azot, accelerarea procesului de peroxidare a lipidelor, diminuarea activității enzimelor antioxidante, în primul rând a catalazei și superoxiddismutazei [52].

Din exemplele prezentate mai sus este clar, că substanțele cu efecte antifungice pronunțate intervin în multiple verigi ale metabolismului fungal, dereglând anumite procese, care sunt vitale pentru patogenitatea culturilor și supraviețuirii lor în lupta cu sistemele de protecție ale macroorganismului atacat. În primul rând degradărilor este supus sistemul enzimatic al fungilor, efectele fiind cele mai diverse – de la inhibarea proceselor de biosinteză a componentelor

structurale, până la insuficiența gravă a factorilor de protecție. Pe de altă parte, se creează un dezechilibru pronunțat între procesul de formare a speciilor reactive ale oxigenului și procesul de anihilare a lor, ceea ce duce la starea de stres oxidativ și distrugerea prin oxidare a membranelor celulare. Aceste mecanisme sunt generale practic pentru toate substanțele, care posedă activitate antifungică, de aceea în continuare ne-am propus să studiem modificările induse de acțiunea remediilor antifungice selectate la etapa anterioară de cercetare. Astfel, în continuare vor fi prezentate rezultatele ce reflectă modificarea cantității de lactat dehidrogenază eliberată și de dialdehidă malonică ca produs final al peroxidării lipidelor, modificarea capacității antioxidante totale și a activității enzimelor antioxidante primare.

4.2. Modificarea permeabilității peretelui și membranei celulare la fungi sub acțiunea remediilor cu acțiune antifungică

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. Pentru *Candida albicans* ATCC®10231™ au fost luate itraconazolul și ketoconazolul, care au demonstrat efect antifungic foarte apropiat și superior celui demonstrat de clorhidratul de naftifină. Pentru dermatofii filamentoși au fost utilizați itraconazolul și clorhidratul de naftifină, care, de asemenea au avut asupra acestor tulpini acțiune antifungică foarte asemănătoare, iar în cazul fungilor filamentoși oportuniști a fost luat clorhidratul de naftifină, care a demonstrat acțiune antifungică asupra tuturor celor 5 tulpini luate în studiu. În această serie de experiențe cultura de fungi aflată la etapa de creștere exponențială a fost tratată cu substanțele evidențiate, aplicate pentru fiecare tulpină în concentrația care corespunde CMI. După separarea biomasei prin filtrare în lichidul cultural rămas a fost determinată activitatea LDH.

Rezultatele obținute pentru tulpina *Candida albicans* ATCC®10231™ sunt prezentate în figura 4.1. La etapa precedentă au fost evidențiate nouă substanțe cu acțiune antifungică față de această tulpină, dintre care trei extracte: din frunze de nuc și din biomasa de spirulină și nostoc și șase substanțe chimice noi, sintetizate de chimiștii din Moldova. Concentrațiile aplicate au fost cele care corespund CMI și pot fi văzute în tabelul 3.3. Activitatea LDH eliberate crește sub acțiunea majorității remediilor de origine chimică și biologică și sub acțiunea martorilor pozitivi (itraconazolul și ketoconazolul) de 2,03 - 2,58 ori față de martorul netratat (figura 4.1). Excepție

constituie extractele hidro etanolic din biomasa de spirulină și nostoc, care nu au provocat mărirea activității LDH la candida. În toate celelalte cazuri diferența dintre nivelul de activitate a LDH eliberate în variantele experimentale și în martorul netratat este veridică statistic la valori $P < 0,0001$. Trei dintre substanțele testate au demonstrat valori ale activității LDH eliberate la nivelul obținut pentru ketoconazol – extractul în etil acetat din frunze de nuc și substanțele chimice RGTM 64 și 83. Substanța BREV 1 și substanța RGTM 56 au indus o activitate veridică mai înaltă a LDH eliberate ($P < 0,002$) față de itraconazol, care este mai toxic pentru tulpina *Candida albicans* ATCC®10231™ comparativ cu ketoconazolul. O singură substanță a demonstrat valori mai înalte ale activității LDH eliberate - N-(2,4-dimetilfenil)-2-(2-hidroxi-benziliden)-hidrazincarbotioamidă (BREV1) decât a preparatului de referință itraconazolul. Astfel, cu excepția extractelor hidro etanolic de 20% din biomasa standard de spirulină și nostoc, toate substanțele selectate au demonstrat efect toxic asupra tulpinii de candida, exprimat prin creșterea de peste 2 ori a activității LDH eliberate în afara celulelor. Extractul în etil acetat din frunze de nuc a avut un efect foarte apropiat de cel demonstrat de martorii pozitivi. La fel s-au manifestat și compușii chimici noi RGTM 56, 64 și 83. Una dintre substanțele testate a demonstrat efect toxic veridic mai înalt decât ambii martori pozitivi – BREV1.

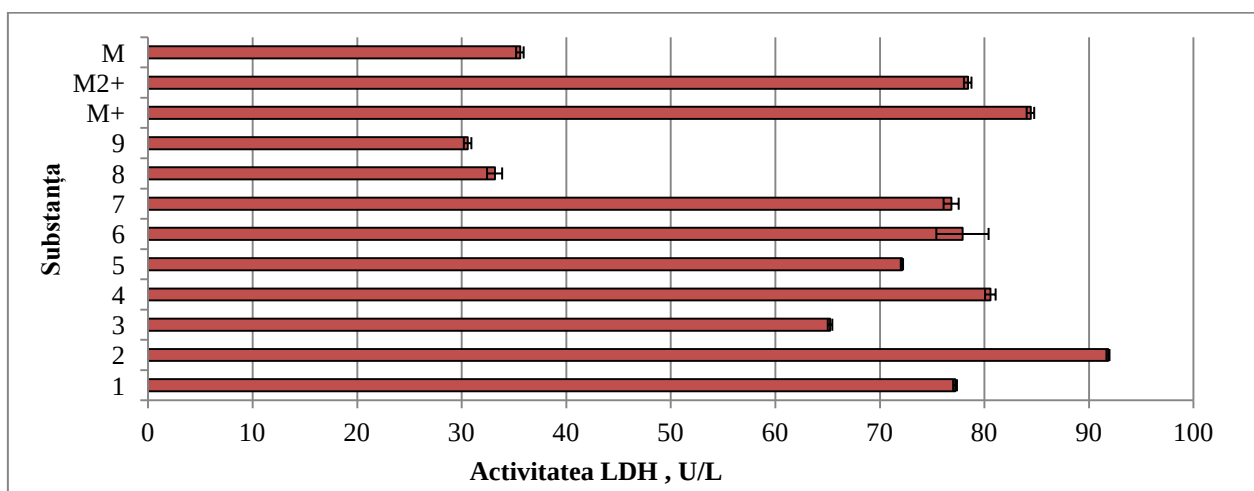


Fig. 4.1. Activitatea lactat dehidrogenazei eliberate la *Candida albicans* ATCC®10231™ la acțiunea substanțelor selectate. 1. Extract frunze *J. regia* (etil acetat, 0,1); 2. BREV 1; 3. RGTM 55; 4. RGTM 56; 5. RGTM 57; 6. RGTM 64; 7. RGTM 83; 8. Extract hidro etanolic 20% *S.platensis*; 9. Extract hidro etanolic 20% *N.linckia*; M₊₁ Itraconazol; M₊₂ Ketaconazol; M- Martor netratat

Cel mai activ compus, care a indus cel mai înalt nivel de activitate a LDH eliberate la *Candida albicans* ATCC®10231™ a fost N-(2,4-dimetilfenil)-2-(2-hidroxi-benziliden)-hidrazincarbotioamida – compus nou, fără conținut de cupru. Următorii după acțiunea de

eliberare extracelulară de LDH de către candida sunt compușii coordinativi ai cuprului cu tiosemicarbazone substituite (RGTM 56 și 83), și o diamină aromatică (RGTM 64). Menționăm, că toți compușii chimici selectați au avut efecte nocive pronunțate asupra celulelor de candida, inducând modificarea permeabilității peretelui și membranei celulare și eliberarea LDH în mediul extracelular. Cu toate că la unele dintre acestea efectul a fost mai puțin pronunțat comparativ cu cel al itraconazolului și a ketoconazolului, aceste substanțe merită a fi incluse și în cercetările ulterioare, grație nivelului scăzut de toxicitate a acestui tip de substanțe asupra organismului mamiferelor.

Asupra tulpinii de dermatofiți *Trichophyton mentagrophytes* ATCC®9533™ acțiune antifungică au demonstrat 6 remedii - toate fiind extracte din diferite tipuri de materii naturale – frunze de nuc, biomasa standard de nostoc și spirulină, biomasa de spirulină cu conținut de metale. Rezultatele obținute pentru activitatea LDH eliberate de celulele acestei tulpini sub influența substanțelor selectate sunt prezentate în figura 4.2.

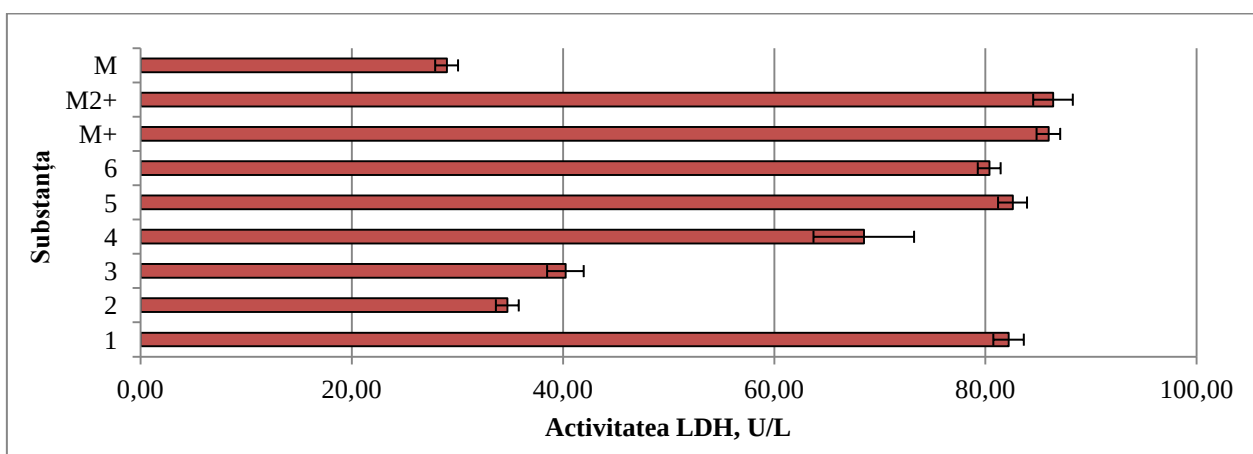


Fig. 4.2. Activitatea lactat dehidrogenazei eliberate la *Trichophyton mentagrophytes* ATCC®9533™ sub acțiunea substanțelor selectate. 1. Extract frunze *J. regia* (etil acetat); 2. Extract hidro etanolic 50% *S. platensis*; 3. Extract hidro etanolic 20% *N. linckia*; 4. EE Co; 5. EE Cd; 6. EE Cr; M+₁ - Itraconazol; M+₂ - Clorhidrat de naftifină ; M – Martor netratat

Comparativ cu martorul netratat, în toate variantele experimentale activitatea enzimei a fost veridic mai mare ($P < 0,005$ în toate cazurile) – de 1,20-1,39 ori în cazul extractelor hidro etanolic din spirulină și nostoc și de 2,36-2,85 ori în celelalte cazuri. Extractul în etil acetat din frunze mature de nuc aplicat în concentrație de 0,2 mg/ml (vezi tabelul 3.4) duce la mărirea de 2,83 ori a activității LDH eliberate. Extractele etanolic din biomasa de spirulină cu conținut de cadmiu și crom au asigurat obținerea unor rezultate similare – activitatea LDH eliberate a crescut de 2,85 și 2,77 ori respectiv. Extractul etanolic din biomasa de spirulină cu conținut de cobalt are un efect mai atenuat comparativ cu remediile deja analizate, dar toxicitatea lui față de

Trichophyton mentagrophytes ATCC®9533™ este evidentă – nivelul activității LDH extracelulare este de 2,36 ori mai mare comparativ cu martorul netratat. Ca și în cazul candidiei, extractele din biomasa standard de spirulină și nostoc nu au avut o acțiune pronunțată asupra culturii. Comparativ cu celelalte remedii creșterea activității LDH a fost doar de 1,20-1,39 ori.

Cu toate că în cazul tulpinii *Trichophyton mentagrophytes* ATCC®9533™ nu au fost depistate substanțe care să manifeste un efect mai înalt de eliberare a LDH în mediul extracelular comparativ cu martorii pozitivi utilizați (itraconazolul și clorhidratul de naftifină), totuși rezultatele obținute sunt destul de înalte. Extractul din frunze de nuc și cele din spirulina cu conținut de cadmiu și crom provoacă modificarea permeabilității membranare la tulpina analizată de intensitate comparabilă cu cea produsă de preparatele antifungice de refefință. Toxicitatea înaltă față de acest dermatofit a remediilor evidențiate este un motiv de a continua cercetările în această direcție.

În cazul tulpinii *Trichophyton rubrum* ATCC®28188™ efectul toxic al remediilor selectate s-a manifestat prin creșterea de 2,87-3,43 ori a activității LDH eliberate (Figura 4.3).

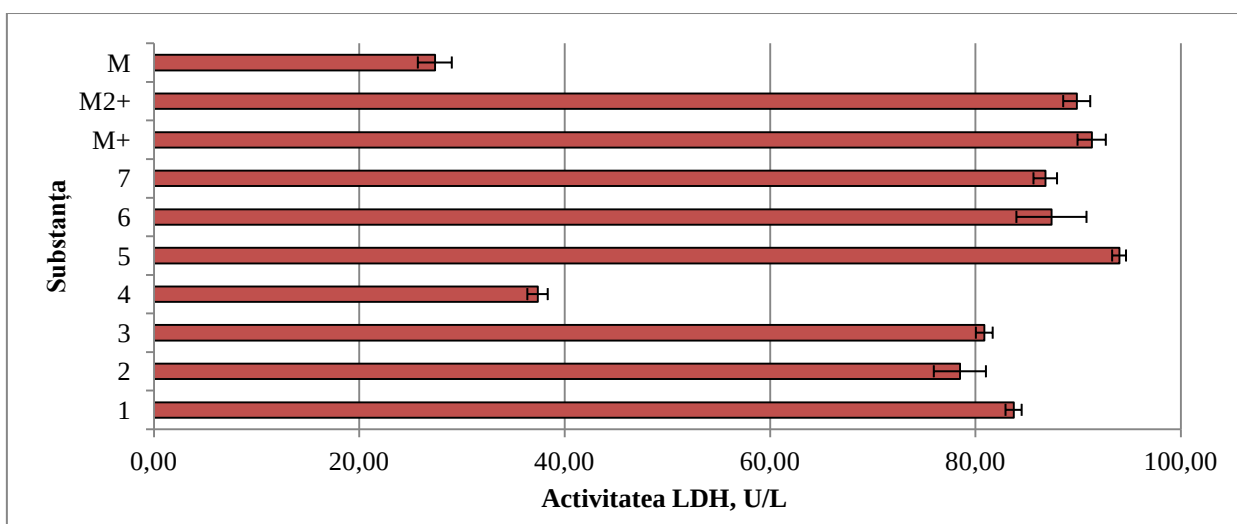


Fig. 4.3. Activitatea lactat dehidrogenazei eliberate la *Trichophyton rubrum* ATCC®28188™ sub acțiunea substanțelor selectate. 1. Extract frunze *J. regia* (etanol); 2. Extract frunze *J. regia* (etil acetat); 3 Extract pericarp *J. regia* (etanol); 4. Extract hidro-etanolic 50% *N. linckia*; 5. EE_{Co}; 6. EE_{Cd}; 7 EE_{Cr}; M₊₁ - Itraconazol; M₊₂ - Clorhidrat de naftifină ; M – Martor netratat

Doar în cazul extractului hidro etanolic din biomasa standard de nostoc creșterea activității LDH extracelulare a fost mai modestă – de 1,37 ori față de martorul netratat. Acțiunea extractelor din frunze de nuc (în etanol și etil acetat) și extractul în etanol din pericarpul verde au demonstrat un efect toxic asupra tulpinii de *Trichophyton rubrum* ATCC®28188™, exprimat prin creșterea de 2,87 – 3,06 ori a activității LDH eliberate. Cele mai active față de această tulpină au fost extractele etanolice din biomasa de spirulină cu conținut de metale (cobalt,

cadmiu și crom), creșterea activității LDH în aceste cazuri fiind de 3,17-3,43 ori. Doar în cazul extractului hidro etanolic din biomasa standard de nostoc creșterea activității LDH extracelulare a fost mai modestă – de 1,37 ori față de martorul netratat. Acțiunea extractelor din frunze de nuc (în etanol și etil acetat) și extractul în etanol din pericarpul verde au demonstrat un efect toxic asupra tulpinii de *Trichophyton rubrum* ATCC®28188™, exprimat în creșterea de 2,87 – 3,06 ori a activității LDH eliberate. Cele mai active față de această tulpină au fost extractele etanolice din biomasa de spirulină cu conținut de metale (cobalt, cadmiu și crom), creșterea activității LDH în aceste cazuri fiind de 3,17-3,43 ori. Extractul etanolic din biomasa de spirulină cu conținut de cobalt (EE_{Co}) a avut un efect mai pronunțat asupra culturii *Trichophyton rubrum* ATCC®28188™, activitatea LDH în acest caz fiind veridic mai înaltă decât în cazul itraconazolului (P=0,019) și a clorhidratului de naftifină (P=0,004).

Nivelul de activitate al LDH eliberate de către cultura *Microsporium canis* ATCC®36299™ sub influența remediilor selectate este prezentată în figura 4.4.

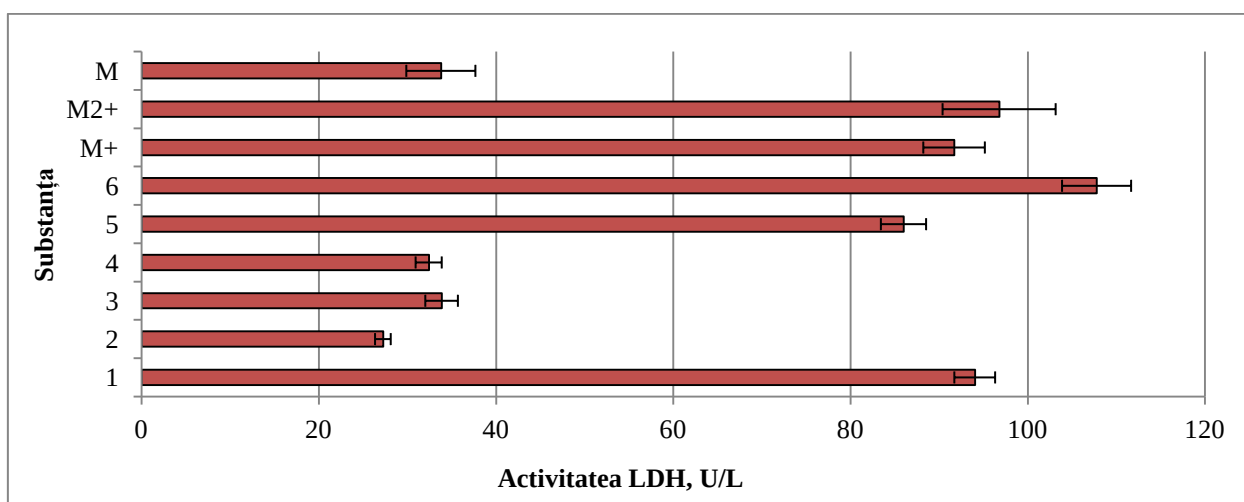


Fig. 4.4. Activitatea lactat dehidrogenazei eliberate la *Microsporium canis* ATCC®36299™ sub acțiunea substanțelor selectate. 1. Extract frunze *J. regia* (etanol); 2. Extract hidro etanolic 70% *S. platensis*; 3 Extract hidro etanolic 20% *N. linckia*; 4. Extract hidro etanolic 70% *N. linckia*; 5. EE_{Co}; 6. EE_{Co}; M+₁ - Itraconazol; M+₂ - Clorhidrat de naftifină ; M – Martor netratat

Cu excepția extractelor hidro etanolice din biomasa standard de spirulină și nostoc, care nu au modificat semnificativ activitatea LDH eliberate, remediile selectate au provocat o creștere a indicelui dat de 2,54 – 3,19 ori. Extractul în etanol din frunzele mature de nuc și extractele etanolice din biomasa de spirulină cu cobalt și cadmiu duc la o mărire a nivelului de activitate a LDH până la valori, care nu se deosebesc semnificativ de cele obținute la acțiunea itraconazolului. Rezultatele obținute la acțiunea extractului etanolic din biomasa de spirulină cu conținut de cadmiu sunt semnificativ mai înalte față de cele obținute la acțiunea celui de al doilea martor pozitiv – clorhidratul de naftifină (P<0,005).

Extractele hidro etanolic din biomasa de spirulină și nostoc, ca și în cazurile examinate anterior, nu au manifestat efect de dereglare a permeabilității peretelui și membranei celulare, astfel, că nu a fost înregistrată mărirea activității LDH eliberate. Prezintă interes extractul etanolic din frunzele de nuc, care la tulpina de dermatofiți *Microsporum canis* ATCC®36299™ produce efecte de aceeași intensitate ca și itraconazolul.

Tulpina *Microsporum gypseum* ATCC®24102™ este supusă acelorași modificări sub acțiunea remediilor selectate în experiențele descrise în capitolul 3. Șase substanțe au manifestat acțiune antifungică înaltă față de aceasta – extractul în etil acetat din frunzele mature de nuc, extractul etanolic din pericarpul verde de nucă, extractele hidro etanolic din biomasa de spirulină și nostoc și extractele etanolic din biomasa de spirulină, ce conține cobalt și crom. Concentrațiile aplicate în experiență sunt prezentate în tabelul 3.7. Rezultatele obținute pot fi văzute în figura 4.5. Extractele hidro etanolic din spirulină și nostoc nu au dus la modificarea activității lactat dehidrogenazei eliberate, iar în toate celelalte cazuri – remedii selectate și martorii pozitivi – mărirea acestui indicator a fost esențială – de 3,29 - 3,49 ori față de martorul netratat. Nivelul de activitate al lactat dehidrogenazei eliberate la tulpina *Microsporum gypseum* ATCC®24102™ sub acțiunea extractelor etanolic din biomasa de spirulină cu conținut de metale (cobalt și crom) nu s-a deosebit semnificativ de cel obținut sub acțiunea itraconazolului și a clorhidratului de naftifină.

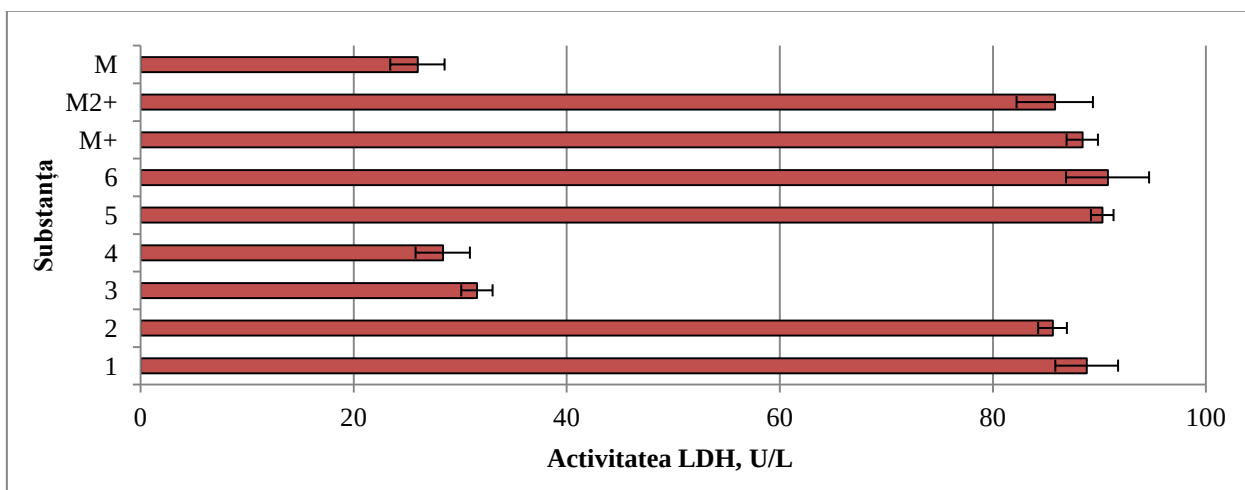


Fig. 4.5. Activitatea lactat dehidrogenazei eliberate la *Microsporum gypseum* ATCC®24102™ sub acțiunea substanțelor selectate. 1. Extract frunze *J. regia* (etil acetat); 2. Extract pericarp *J. regia* (etanol); 3. Extract hidro etanolic 20% *S. platensis*; 4. Extract hidro etanolic 20% *N. linckia*; 5. EE_{Co}; 6. EE_{Cr}; M₊₁ - Itraconazol; M₊₂ - Clorhidrat de naftifină; M – Martor netratat

La fel și extractele din frunze și pericarp de nuc produc sporirea activității LDH la *Microsporum gypseum* până la nivele, care nu se deosebesc semnificativ de cele obținute la acțiunea itraconazolului și a clorhidratului de naftifină. Așa dar, extractele din masa vegetală de

nuc și extractele din diferite tipuri de biomasă de spirulină și nostoc prezintă interes în calitate de remedii cu acțiune antifungică, exprimată inclusiv și prin dereglarea permeabilității peretelui și membranei celulare la funghi patogeni.

Acțiunea remediilor selectate asupra fungilor filamentoși oportunist patogeni a fost comparată cu cea a clorhidratului de naftifină. Față de tulpina de colecție *Aspergillus fumigatus* CNM-FA-02 acțiune antifungică înaltă au avut extractele hidrice și etanolice din biomasa de spirulină cu conținut de metale. Rezultatele obținute la determinarea activității LDH extracelulare sunt prezentate în figura 4.6.

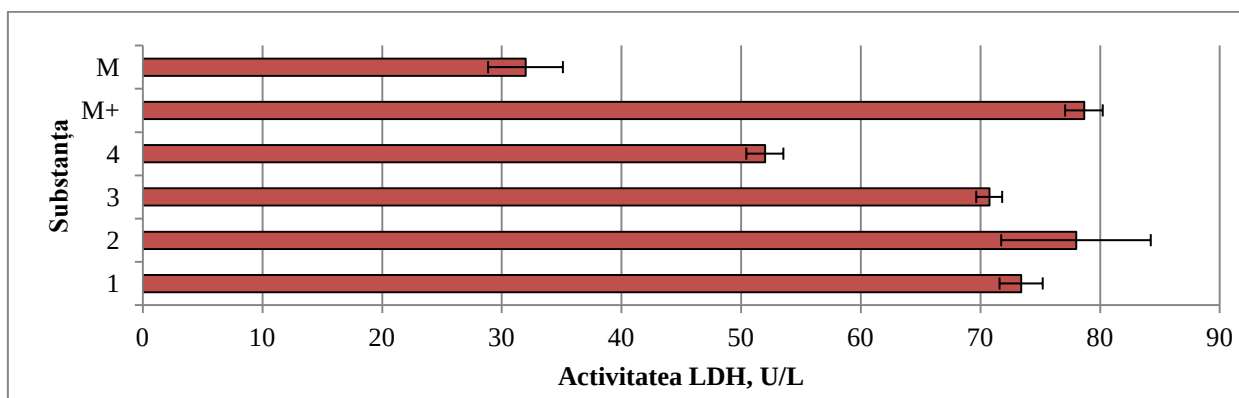


Fig. 4.6. Activitatea lactat dehidrogenazei eliberate la *Aspergillus fumigatus* CNM-FA-02 sub acțiunea substanțelor selectate. 1. EE_{Cd}; 2. EE_{Cr}; 3. EH_{Cd}; 4. EH_{Cr}; M₊ - Clorhidrat de naftifină; M – Martor netratat

Mărirea activității LDH eliberate la cultura de *Aspergillus fumigatus* CNM-FA-02 în mediul extracelular a fost observată la acțiunea tuturor celor 5 remedii selectate. Valorile obținute au fost de 1,63 - 2,44 ori mai mare la acțiunea extractelor din spirulină și de 2,45 mai mare la acțiunea matorului pozitiv – clorhidratul de naftifină – față de matorul netratat. Nici unul din extractele testate nu a avut o acțiune mai pronunțată asupra activității LDH decât matorul pozitiv, dar extractul etanolic din biomasa de spirulină cu conținut de crom provoacă o creștere a activității LDH eliberate la nivelul matorului pozitiv, fără deosebiri veridice din punct de vedere statistic. Cel mai puțin pronunțat efect toxic l-a avut asupra tulpinii *Aspergillus fumigatus* CNM-FA-02 extractul hidric din biomasa cu conținut de crom, dar și în acest caz diferența valorilor experienței și matorului netratat este semnificativă ($P < 0,001$).

Față de tulpina de colecție *Mucor vulgaris* CNMN-FD-07 au fost testate șapte extracte hidrice și etanolice din biomasa de spirulină cu conținut de metale. Acțiunea acestora asupra activității LDH eliberate a fost comparată cu acțiunea clorhidratului de naftifină. Toate remediile testate și matorul pozitiv au provocat o creștere substanțială a activității enzimei de 1,27 – 3,41 ori față de matorul netratat (pentru substanțele 1 și 2 $P = 0,019$ și $P = 0,010$ respectiv, iar în toate

celelalte cazuri $P < 0,001$). Acțiunea clorhidratului de naftifină a produs o mărire a activității LDH extracelulare de 1,91 ori.

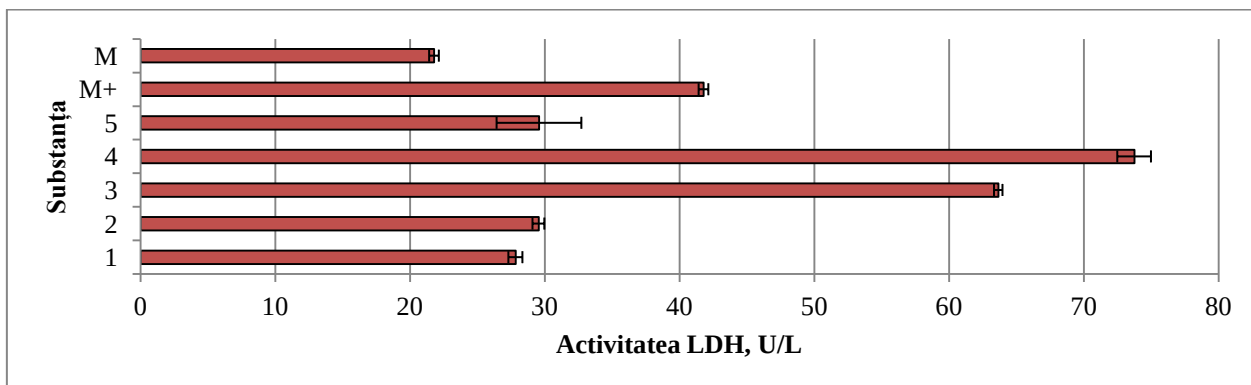


Fig. 4.7. Activitatea lactat dehidrogenazei eliberate la *Mucor vulgaris* CNMN-FD-07 sub acțiunea substanțelor selectate. 1. EE_{Zn} ; 2. EE_{Fe} ; 3. EE_{Cd} ; 4. EE_{Cr} ; 5. EH_{Co} ; M+ – Clorhidrat de naftitifină, M- Martor netratat

Două dintre remediile selectate, și anume extractele etanolice din biomasa de spirulină cu conținut de cadmiu și crom, fiind aplicate în concentrații care corespund CMI (vezi tabelul 3.8) au dus la o mărire a nivelului de activitate al lactat dehidrogenazei eliberare de 1,52 și 1,76 ori respectiv față de cea provocată de martorul pozitiv – preparatul antifungic clorhidratul de naftifină. Astfel, tulpina de colecție *Mucor vulgaris* CNMN-FD-07 s-a dovedit a fi foarte sensibilă la acțiunea extractelor din biomasa de spirulină cu conținut de metale. Aceste rezultate sunt cu atât mai îmbucurătoare, cu cât reprezentanții genului *Mucor* sunt cunoscuți în calitate de agenți ai infecțiilor oportuniste, care se supun cu greu tratamentelor.

Activitatea lactat dehidrogenazei eliberate la tulpina de colecție *Penicillium expansum* CNMN-FD-05 sub influența remediilor antifungice este prezentată în figura 4.8.

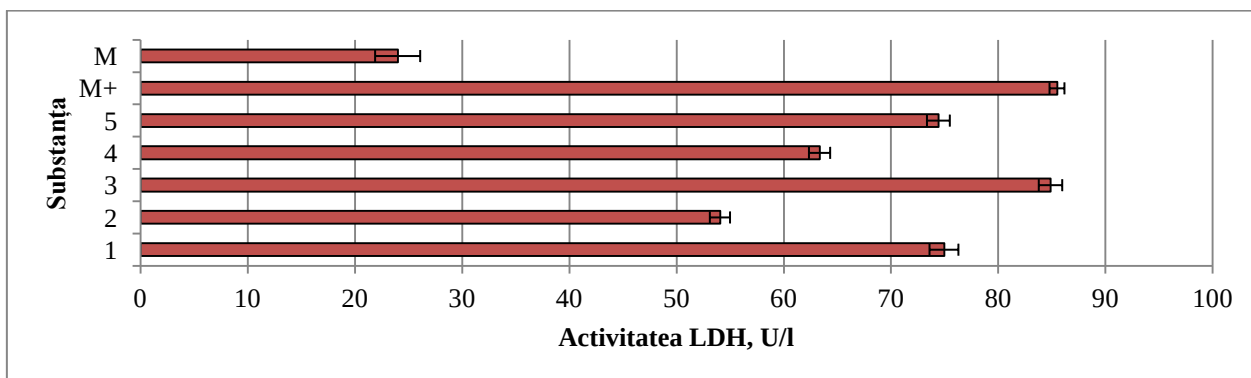


Fig. 4.8. Activitatea lactat dehidrogenazei eliberate la *Penicillium expansum* CNMN-FD-05 sub acțiunea substanțelor selectate. 1. EE_{Cd} ; 2. EE_{Cr} ; 3. EH_{Cd} ; 4. EH_{Co} ; 5. EH_{Cr} ; M+ – clorhidrat de naftitifină, M- martor netratat

Extractele hidrice și etanolice din biomasa cu conținut de cadmiu, cobalt și crom s-au manifestat ca preparate cu efecte antifungice față de tulpina *Penicillium expansum* CNMN-FD-05. La aplicarea extractelor etanolice din biomasa cu conținut de cadmiu și crom activitatea LDH eliberată în mediul extracelular a fost de 3,46 și 2,66 ori respectiv mai mare decât în cazul matorului, dar nici una dintre variantele testate nu a înregistrat valori mai înalte decât cele obținute la tratarea culturii cu clorhidratul de naftifină. Extractele hidrice cu conținut de cobalt, crom și cadmiu de asemenea au dus la dereglarea permeabilității membranare la peniciliu, exprimată prin eliminarea intensă a LDH. În cazul extractului hidric cu cadmiu activitatea LDH este la nivelul probei cu clorhidrat de naftifină (valorile obținute nu se deosebesc veridic).

Figurile 4.9 și 4.10 reprezintă activitatea lactat dehidrogenazei extracelulare la acțiunea extractelor de spirulină asupra tulpinilor izolate din microflora spontană *Fusarium oxysporum* FO1 și *Fusarium solani* FS01.

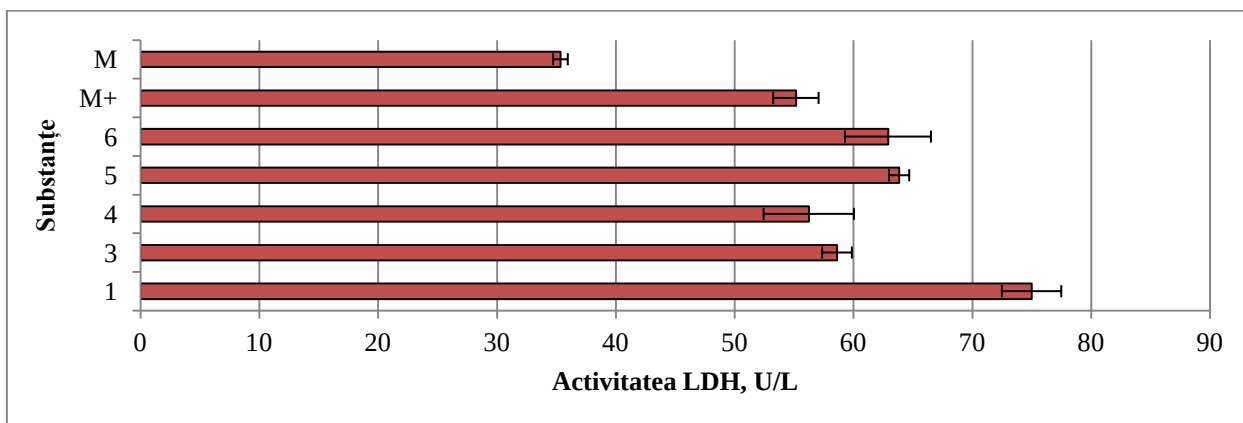


Fig. 4.9. Activitatea lactat dehidrogenazei eliberate la *Fusarium oxysporum* FO1 sub acțiunea substanțelor selectate. 1. EE_{Cd}; 2. EE_{Cr}; 3. EH_{Cd}; 4. EH_{Co}; 5. EH_{Cr}; M₊ – Clorhidrat de naftifină; M – Martor netratat

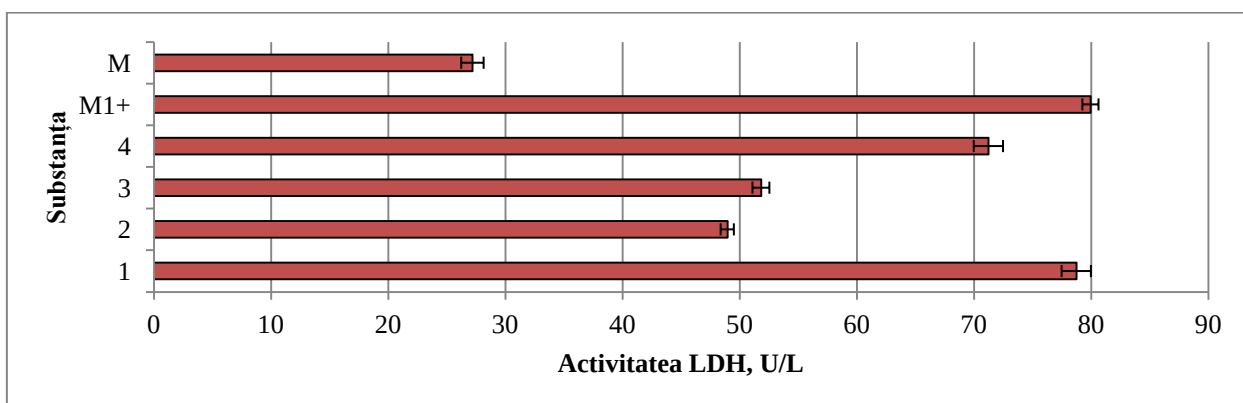


Fig. 4.10. Activitatea lactat dehidrogenazei eliberate la *Fusarium solani* FSO1 sub acțiunea substanțelor selectate. sol LDH. 1. EE_{Cd}; 2. EE_{Co}; 3. EE_{Cr}; 4. EH_{Cd}; M₊ - Clorhidrat de naftifină; M – Martor netratat

Extracțiile din biomasa de spirulină cu conținut de metale au provocat creșterea activității lactat dehidrogenazei eliberate de către cultura *Fusarium oxysporum* FO1, nivelul căreia îl depășește pe cel din martorul netratat de 1,59 -2,12 ori. Acțiunea preparatului antifungic de referință – clorhidratul de naftifină duce la mărirea acestui parametru de 1,56 ori față de martor. Trei dintre remediile testate (extractul etanolic din biomasa cu cadmiu și extracțiile hidrice din biomasa cu cobalt și crom) au demonstrat un nivel de toxicitate mai înalt decât cel al clorhidratului de naftifină veridic din punct de vedere statistic ($P < 0,001$ pentru toate trei cazuri). Față de izolatul natural *Fusarium solani* FSO1 efect toxic exprimat prin eliberarea lactat dehidrogenazei în mediul extracelular au avut patru extracții din biomasa de spirulină – extracțiile etanoliche din biomasa cu conținut de cadmiu, cobalt și crom și extractul hidric din biomasa de spirulină cu conținut de cadmiu. Acțiunea acestor remedii duce la mărirea de 1,8 – 2,9 ori a activității LDH eliberate. Cu toate că valorile obținute sunt destul de înalte, nici unul dintre extracții nu a atins valorile indicate de clorhidratul de naftifină, care cu excepția extractului etanolic din biomasa de spirulină cu conținut de cadmiu, au rămas veridic mai mici. În cazul extractului EE_{Cd} valorile activității LDH nu se deosebesc veridic din punct de vedere statistic ($P > 0,05$) de cele obținute în cazul clorhidratului de naftifină.

Că și în cazul acestor două culturi de fungi, potențial toxic mai înalt posedă extracțiile etanoliche cu conținut de cadmiu, cobalt și crom, și extractul hidric din biomasa cu conținut de cadmiu care provoacă eliminarea activă a LDH în mediul extracelular. Toate variantele experimentale au arătat valori de activitate LDH de până de 2,9 ori mai mari decât în proba martor, iar varianta de extract etanolic cu conținut de cadmiu asupra *Fusarium oxysporum* FO1 are un efect toxic mai înalt decât clorhidratul de naftifină, activitatea LDH eliberate fiind de 1,36 ori mai mare ca în cazul martorului pozitiv. Și extracțiile hidrice din aceste tipuri de biomasă au dus la creșterea activității LDH eliberate, dar numai în cazul culturii de *Fusarium oxysporum* FO1. Doar extractul hidric din biomasa cu conținut de cadmiu a avut efect toxic și asupra tulpinii *Fusarium solani* FS01.

Compromiterea integrității peretelui și membranei celulare a fost confirmată și prin examenul microscopic (Figurile 4.11 și 4.12). Timp de 24 ore de contact al culturii de fungi cu concentrații ce corespund CMI a remediilor antifungice selectate, au loc modificări morfologice, care pot fi observate la microscop. Cea mai des întâlnită modificare constă în fragmentarea miceliului. În figura 4.11 sunt prezentate imaginile tipice pentru cultura netratată și alături – imaginile tipice ale culturii după contactul cu remediile antifungice selectate.

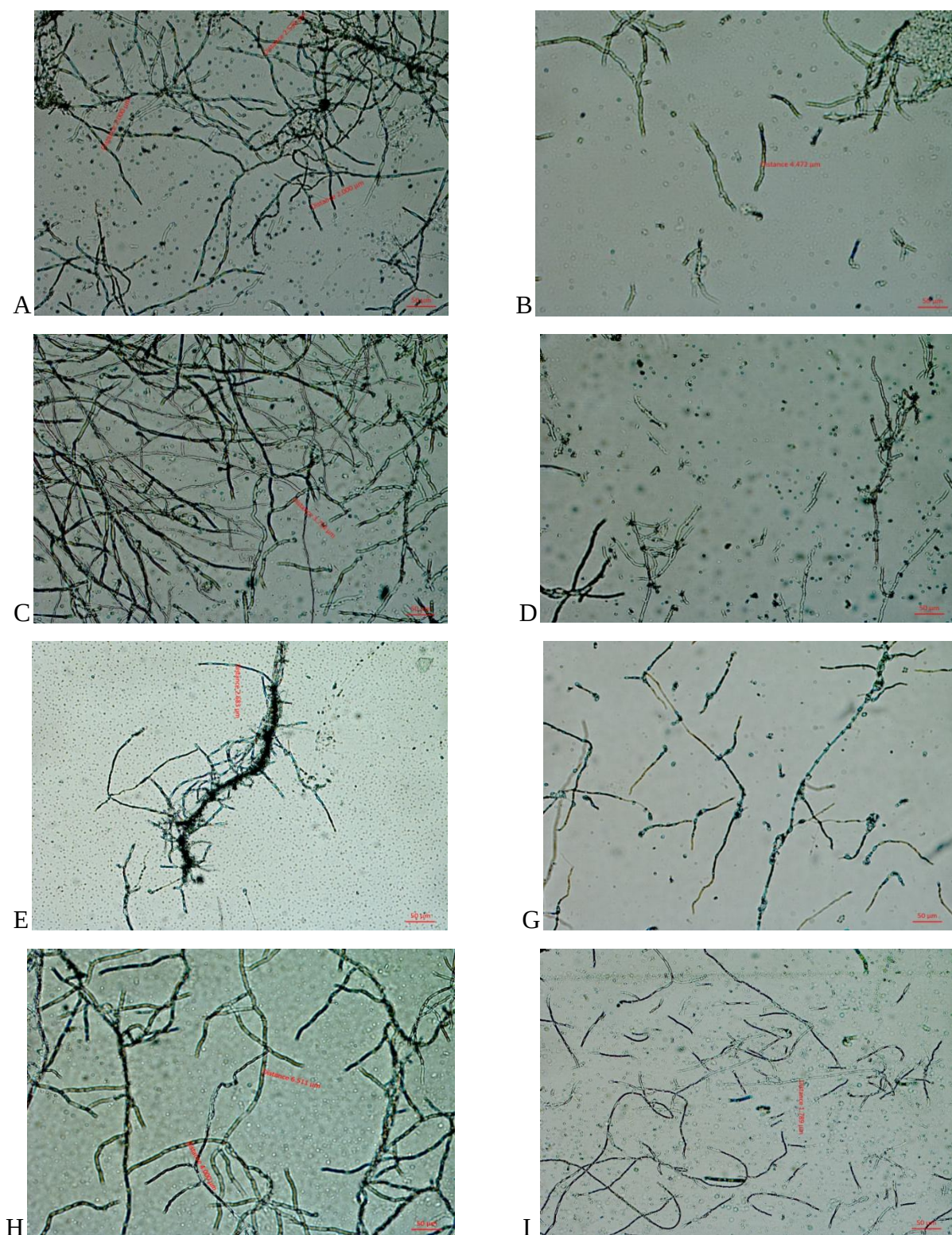


Fig. 4.11. Modificări morfologice ale fungilor miceliali oportunist patogeni, provocate de acțiunea remediilor cu efect antifungic.

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.);

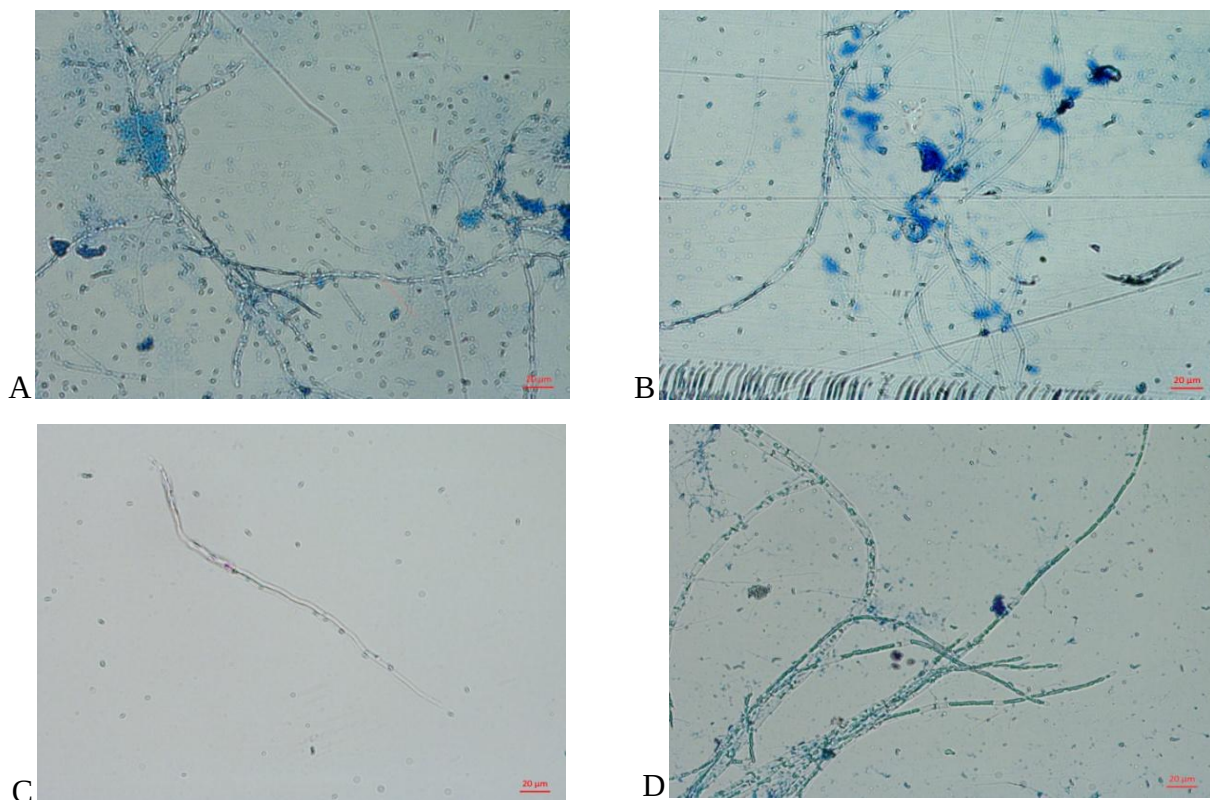


Fig. 4.12. Modificări morfologice ale miceliului fungilor dermatofiți, provocate de acțiunea acțiunea remediilor cu efect antifungic. A - *Trichophyton mentagrophytes* ATCC®9533™ tratat cu EEC_d; B – *Trichophyton mentagrophytes* ATCC®9533™ tratat cu EEC₀; C- *Trichophyton rubrum* ATCC®28188™ tratat cu EEC_d; D - *Trichophyton rubrum* ATCC®28188™ tratat cu EEC_r (Autori foto Lebedenco L., Oltu Iu.)

O altă categorie de modificări care pot fi ușor observate în culturile fungice tratate cu agenți antifungici este revărsarea parțială ori totală a conținutului celular ca urmare a deteriorărilor grave ale peretelui și membranei celulare. În imaginile din figura 4.12 pot fi văzute fragmente de hife lipsite de conținut total (figura 4.12, C) ori parțial (figura 4.12, A,B,D).

Modificarea permeabilității membranelor celulare și deteriorarea structurilor peretelui și membranelor celulare sunt niște mecanisme generale, comune pentru majoritatea substanțelor care au efect antifungic asupra tulpinilor testate. Indiferent de tulpina de fungi patogeni ori de tipul de remediu aplicat, în variantele experimentale a fost înregistrată o creștere semnificativă și veridică din punct de vedere statistic a activității LDH eliberate, ceea ce indică asupra modificării permeabilității și posibil, deteriorarea membranei celulare. Excepție au prezentat doar extractele hidro etanolice din biomasa de spirulină și nostoc, care au inhibat creșterea fungilor levuriformi și a celor filamentoși dermatofiți, dar nu au provocat mărirea activității LDH eliberate. Pentru acest tip de extracte sunt necesare cercetări suplimentare, care să permită evidențierea țintelor și mecanismelor posibile de acțiune.

4.3. Activitatea antioxidantă totală și intensitatea proceselor de oxidare la tulpinile de fungi sub influența remediilor chimice și biologice

Patogenitatea microorganismelor în mare măsură depinde de capacitatea acestora de a se proteja de factorii imuni eliberați de macroorganismul afectat. Unul dintre mecanismele generale de protecție contra patogenilor este producerea unor cantități importante de radicali liberi, care induc procese oxidative destructive în culturile agresoare. Ca rezultat se produc modificări oxidative care pot fi cuantificate în baza produselor finale ale oxidării, cum este dialdehida malonică. Capacitatea antiradicalică totală este un parametru care caracterizează abilitatea culturilor de fungi de a elimina radicalii liberi și de a supraviețui. Astfel, pentru a evalua efectele produse de remediile chimice și biologice, în lucrare s-a ținut cont atât de intensitatea proceselor oxidative, cât și de capacitatea de protecție antioxidantă în culturile de fungi patogeni.

În scopul determinării capacității antioxidante totale a fost selectat testul ABTS (testul de reducere a radicalului cation al 2,2 azinobis 3-etilbenzotiazolina-6 a acidului sulfonic). Acest test a fost selectat din mai multe considerente. În primul rând el poate fi aplicat pentru aprecierea activității antioxidante totale a extractelor complexe, care conțin mai multe componente active. În al doilea rând această metodă este considerată una dintre cele mai flexibile și poate fi aplicată în condiții variate de pH, inclusiv în medii acide. În al treilea rând reactivul ABTS este solubil atât în apă, cât și în solvenți organici, ceea ce extinde domeniile de aplicare a testului. Și nu în ultimul rând, reacția dintre reactiv și componentele antioxidante ale extractelor testate decurge destul de rapid, ceea ce este foarte comod din punct de vedere practic. Rezultatele testului de asemenea pot fi exprimate în mai multe moduri (% inhibiție ABTS⁺, TEAC – echivalentul trolox al capacității antioxidante), ceea ce permite compararea rezultatelor obținute de diferiți cercetători pentru diferite tipuri de materiale biologice analizate [12, 154, 171, 172, 175].

Pentru monitorizarea intensității proceselor de oxidare a fost ales un test care evidențiază produsele finale ale peroxidării lipidelor – testul TBARS (test care cuantifică produsele de reacție ale acidului tiobarbituric), și care permite de a determina cantitatea de dialdehidă malonică (DAM). Acest test este cel mai frecvent aplicat și prezintă cea mai simplă metodă utilizată ca indicator al intensității peroxidării lipidelor și activității radicalilor liberi în probele biologice. Testul se bazează pe reacția dintre două molecule de acid tiobarbituric cu o moleculă de dialdehidă malonică, o aldehydă cetonică produsă fiziologic prin descompunerea peroxidativă a acizilor grași nesaturați [123]. DAM este unul dintre cei mai cunoscuți și recunoscuți marcheri ai peroxidării lipidelor atât în experiențele biomedicale, cât și în cele clinice [107, 163]. Aici este vorba despre DAM produsă pe calea nonenzimatică, care este considerată a fi urmare a acțiunii condițiilor de stres și are capacitate mare de reacție cu mai multe biomolecule, cum ar fi

proteinele sau ADN [16]. Producția excesivă DAM este asociată cu diferite stări patologice [160]. Identificarea producției DAM ca rezultat al procesului de peroxidare a lipidelor este reflectată în numeroase cercetări. Astfel, în octombrie 2016 numărul de articole la această temă în baza de date PubMed era de peste 18 mii.

În continuare sunt prezentate rezultatele obținute la aplicarea testelor ABTS și TBARS asupra extractelor din culturile de fungi supuși acțiunii remediilor antifungice selectate. Pentru comoditatea interpretării rezultatelor obținute diagramele ce urmează au inclus valori relative (% față de martor), iar pentru o imagine corectă asupra rezultatelor pentru martor vor fi indicate și valorile absolute.

Figura 4.13 reflectă modificarea cantității de 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⁺.

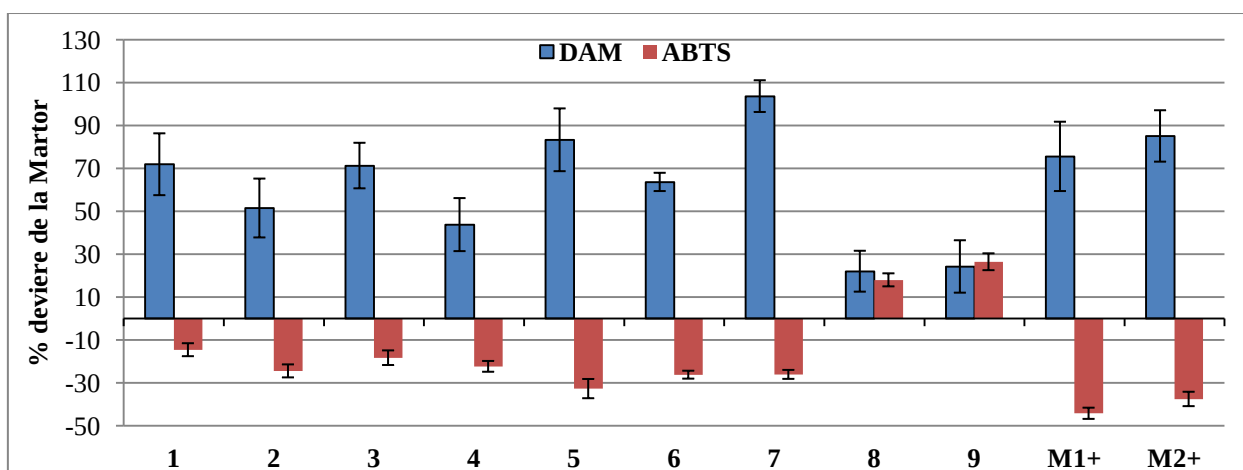


Fig. 4.13. Activitatea antioxidantă totală (test reducere ABTS⁺) și cantitatea dialdehidei malonice la *Candida albicans* ATCC®10231™ sub influența substanțelor selectate. 1. Extract frunze *J. regia* (etil-acetat); 2. Brev 1; 3. RGTM 55; 4. RGTM 56; 5. RGTM 57; 6. RGTM 64; 7. RGTM 83; 8. Extract hidro etanolic 20% *S.platensis*; 9. Extract hidro etanolic 20% *N.linckia*; M₁₊ Itraconazol; M₂₊ Ketoconazol

Cantitatea DAM în biomasa de candida, tratată cu dozele ce corespund CMI ale remediilor antifungice selectate a crescut comparativ cu martorul netratat cu 21,96-103,59%. Itraconazolul și ketoconazolul au indus creșterea cantității DAM de 1,75 și 1,85 ori respectiv. Cea mai mică creștere a cantității DAM a fost observată în biomasa tratată cu extractele hidro etanolice din biomasa de spirulină și nostoc (cu 21,96 și 24,17% respectiv). În toate celelalte cazuri creșterea cantității de dialdehidă malonică a fost de peste 1,5 ori comparativ cu martorul netratat. Unul dintre compuși a produs o creștere veridică mai înaltă a cantității DAM ($P < 0.01$) față de ambii

martori pozitivi. Acesta este compusul RGTM 83 – unul dintre compușii coordinativi ai cuprului cu o tiosemicarbazonă substituită (anexa 1).

Paralel cu creșterea cantității de DAM are loc o scădere substanțială a capacității antioxidante totale a biomasei de candida sub acțiunea substanțelor antifungice aplicate, cu excepția extractelor hidro etanolice din spirulină și nostoc. Aceste două remedii naturale au avut un efect de sporire a activității antioxidante la candida. Extractul în etil acetat din frunzele de nuc și compușii chimici ai cuprului cu tiosemicarbazonele substituite au provocat o scădere a activității antiradicalice cu 14,64 -26,28% față de martorul netratat. Cel mai semnificativ efect în acest sens l-au avut martorii pozitivi care au provocat reducerea capacității antioxidante totale în biomasa de *Candida albicans* ATCC®10231™ cu 37,6% - 44,3%.

Figura 4.14 reflectă 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⁺.

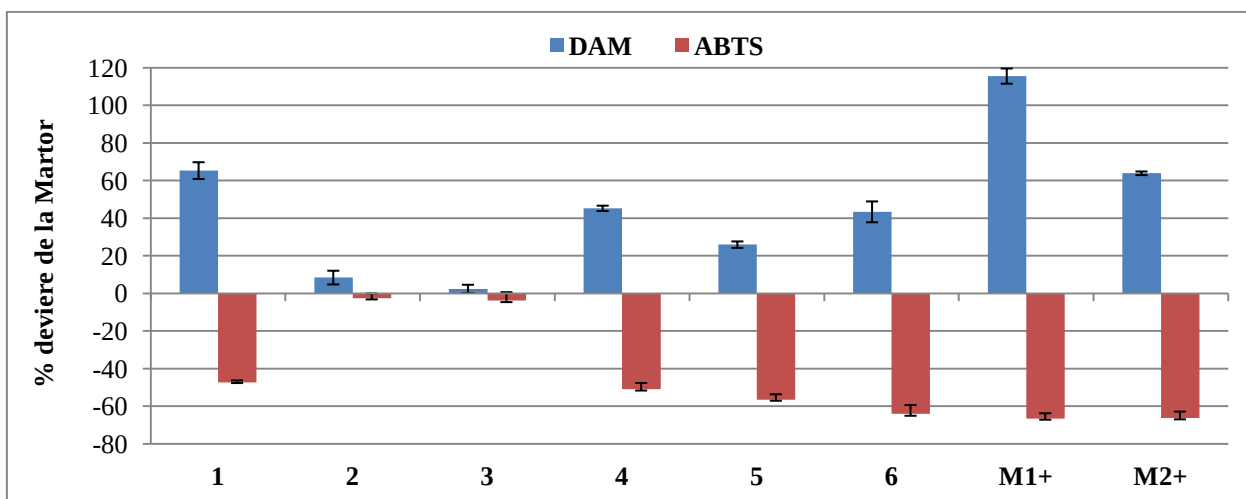


Fig. 4.14. Activitatea antioxidantă (test reducere ABTS⁺) și cantitatea dialdehidei malonice la *Trichophyton mentagrophytes* ATCC®9533™ sub influența substanțelor selectate. 1. Extract frunze *J. regia* (etil acetat); 2. Extract hidro etanolic 50% *S. platensis*; 3. Extract hidro etanolic 20% *N. linckia*; 4. EE Co; 5. EE Cd; 6. EE Cr; M1+ - Itraconazol; M2+ - Clorhidrat de naftifină ;

Cel mai pronunțat efect de intensificare a peroxidării lipidice la *Trichophyton mentagrophytes* ATCC®9533™ l-a avut itraconazolul, acțiunea căruia a produs o creștere a cantității DAM cu 115,6% față de martorul netratat. Efecte valorice foarte apropiate au manifestat clorhidratul de naftifină și extractul în etil acetat din frunzele de nuc, care au produs o creștere 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.

O creștere foarte importantă a cantității de dialdehidă malonică a fost înregistrată la tulpina *Trichophyton rubrum* ATCC®28188™ sub acțiunea remediilor antifungice selectate (figura 4.15). În biomasa martorului netratat cantitatea DAM a constituit $5,53 \pm 0,35$ nM/g, iar în biomasa tratată cu extracte din frunze și pericarp de nuci și din spirulină cu conținut de cobalt cadmiu și crom aceasta crește de 2,0 - 2,3 ori. Și în cazul acțiunii martorilor pozitivi valorile DAM au fost în limita acestor valori. Excepție a prezentat extractul hidro etanolic din biomasa de nostoc, care nu a produs intensificarea procesului de peroxidare lipidică.

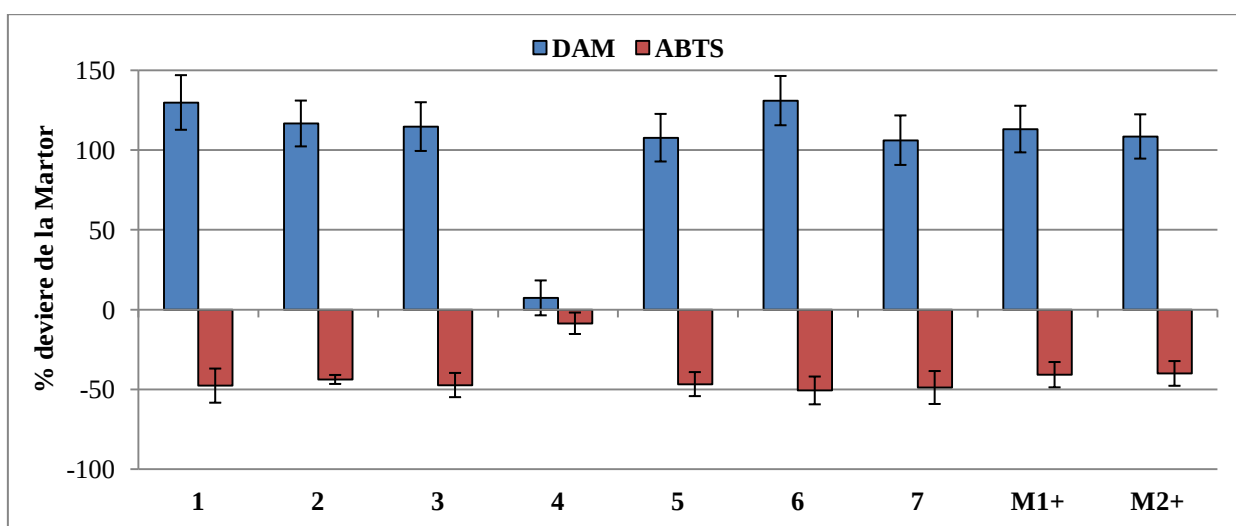


Fig. 4.15. Activitatea antioxidantă totală (test reducere ABTS⁺) și cantitatea dialdehidei malonice la *Trichophyton rubrum* ATCC®28188™ sub influența substanțelor selectate. 1. Extract frunze *J. regia* (etanol); 2. Extract frunze *J. regia* (etil acetat); 3 Extract pericarp *J. regia* (etanol); 4. Extract hidro etanolic 50% *N. linckia*; 5. EE_{Co}; 6. EE_{Cd}; 7 EE_{Cr}; M₁₊ - Itraconazol; M₂₊ - Clorhidrat de naftifină

La fel de omogen a fost efectul remediilor selectate și asupra capacității antioxidante totale la cultura de *Trichophyton rubrum* ATCC®28188™. Cu excepția extractului hidro etanolic din nostoc, substanțele testate au produs scăderea capacității de reducere a radicalilor cu 40,0 – 50,7% față de martorul netratat, în care capacitatea antioxidantă totală a fost de $31,38 \pm 0,50\%$ inhibiție ABTS⁺. Diferențele înregistrate pentru extractele din frunze și pericarp de nuci, din biomasa de spirulină cu conținut de metale și pentru ambii martori pozitivi au fost neveridice din punct de vedere statistic.

Figura 4.16 reflectă rezultatele obținute pentru cultura de fungi filamentoși dermatofiți *Microsporum canis* ATCC®36299™. În martorul netratat cantitatea de DAM a constituit $2,56 \pm 0,21$ nM/g, iar capacitatea antioxidantă totală a fost la nivelul de $35,10 \pm 1,23$ % inhibiție ABTS⁺.

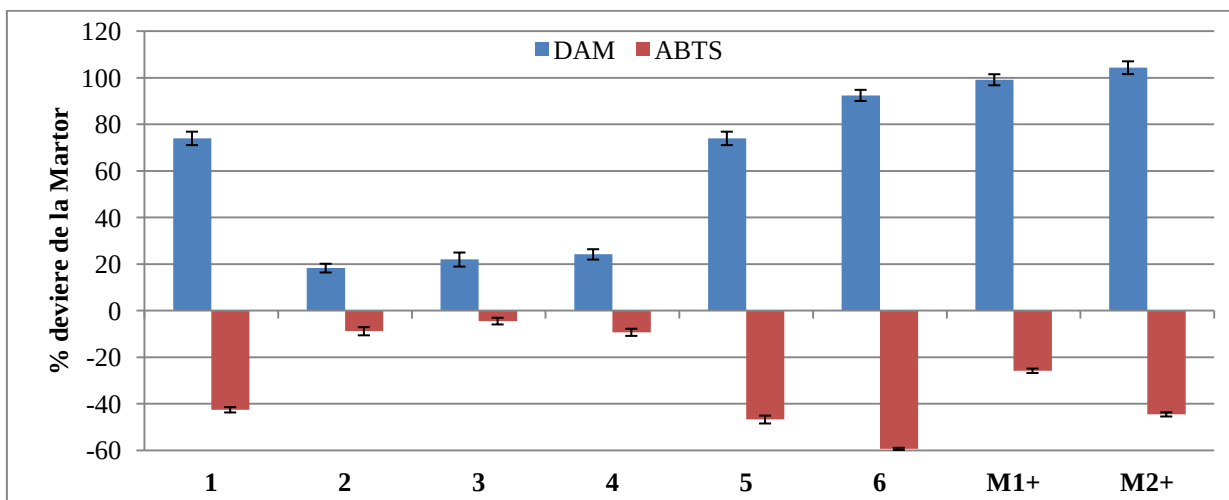


Fig. 4.16. Activitatea antioxidantă totală (test reducere ABTS⁺) și cantitatea dialdehidei malonice la *Microsporum canis* ATCC®36299™ sub influența substanțelor selectate. 1. Extract frunze *J. regia* (etanol); 2. Extract hidro etanolic 70% *S. platensis*; 3 Extract hidro etanolic 20% *N. linckia*; 4. Extract hidro etanolic 70% *N. linckia*; 5. EE Co; 6. EE Cd; M1+ - Itraconazol; M2+ - Clorhidrat de naftifină

În cazul culturii *Microsporum canis* ATCC®36299™ extractele hidro etanolice din biomasa de nostoc și spirulină au produs o creștere moderată, dar veridică din punct de vedere statistic ($P < 0.001$) cu 18,27 – 24,17% a cantității de DAM în biomasă. Itraconazolul și clorhidratul de naftifină au produs o creștere cu 99,16 și 104,33% a DAM față de martorul pozitiv. Și în cazul extractelor etanolice din frunze de nuc și biomasa de spirulină cu conținut de cobalt și cadmiu creșterea conținutului DAM a fost destul de importantă – cu 74,0 – 92,5% comparativ cu martorul netratat. Capacitatea antioxidantă totală a biomasei de *Microsporum canis* ATCC®36299™ sub influența remediilor selectate a scăzut. Extractele hidro etanolice au avut o acțiune moderată (cu o scădere de până la 10% a capacității de inhibiție a radicalului cation ABTS), iar martorii pozitivi au redus capacitatea antioxidantă a culturii cu 25,81% (itraconazolul) și 44,56% (clorhidratul de naftifină). Extractele etanolice au provocat reducerea cu peste 40% a capacității antioxidante a biomasei de fungi. Cel mai activ în acest sens a fost extractul etanolic din biomasa de spirulină cu conținut de cadmiu, care a produs o scădere a capacității antiradicalice cu 59,37% față de martorul netratat și veridică mai puternică ($P < 0,001$) față de ambii martori pozitivi.

Figura 4.17 conține rezultatele obținute în cadrul testelor TBARS și ABTS pentru cultura de fungi dermatofiți *Microsporum gypseum* ATCC®24102™. Martorul netratat a conținut

6,84±0,33 nM DAM pe gram de biomasă, iar în variantele experimentale a fost înregistrată o creștere veridică a nivelului dialdehidei malonice cu 7,39 -88,29%. Cel mai moderat efect asupra intensificării peroxidării lipidice l-au avut, ca și în cazurile precedente, extractele hidro etanolice din biomasa de spirulină și nostoc (7,39 -7,96%). Martorii pozitivi au demonstrat efecte foarte diferite. Astfel, itraconazolul a dus la creșterea DAM cu 13,32%, iar clorhidratul de naftifină – cu 88,29%. Extractele din frunze și pericarp de nucă au fost veridic mai active față de itraconazol ($P<0,001$), la fel și extractele etanolice din biomasa de spirulină cu conținut de cobalt și crom.

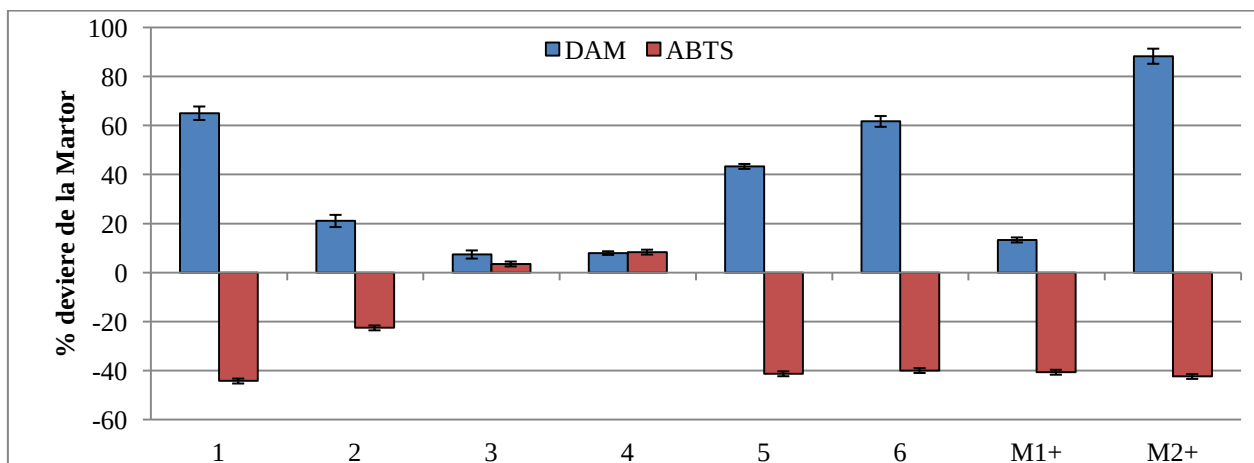


Fig. 4.17. Activitatea antioxidantă totală (test reducere ABTS^{•+}) și cantitatea dialdehidei malonice la *Microsporium gypseum* ATCC®24102™ sub influența substanțelor selectate.
1. Extract frunze *J. regia* (etil acetat); 2. Extract pericarp *J. regia* (etanol); 3. Extract hidro etanolic 20% *S. platensis*; 4. Extract hidro etanolic 20% *N. linckia*; 5. EE Co; 6. EE Cr;
M1+ - Itraconazol; M2+ - Clorhidrat de naftifină

Capacitatea antioxidantă totală a matorului netratat de *Microsporium gypseum* ATCC®24102™ a fost de 32,66±0,72% inhibiție ABTS^{•+}. Extractul hidro etanolic din spirulină nu a modificat veridic acest parametru, iar cel din nostoc l-a modificat prin creștere moderată cu 8,36%. În toate celelalte cazuri capacitatea antioxidantă a culturii de patogeni a fost redusă semnificativ cu 22,56 -44,25% față de matorul netratat. Extractul etanolic din pericarpul de nuci a provocat reducerea capacității antioxidante cu 22,56, iar în toate celelalte cazuri efectul de reducere a capacității antioxidante totale a fost destul de omogen, fără deosebiri semnificative între variante.

În biomasa matorului netratat de *Penicillium expansum* CNMN-FD-05 cantitatea DAM a constituit 6,50±0,13 nM/g, iar capacitatea antioxidantă – 31,14±2,38% reducere ABTS^{•+}. Devierile de la aceste valori sub influența extractelor din biomasa de spirulină cu conținut de metale sunt prezentate în figura 4.18.

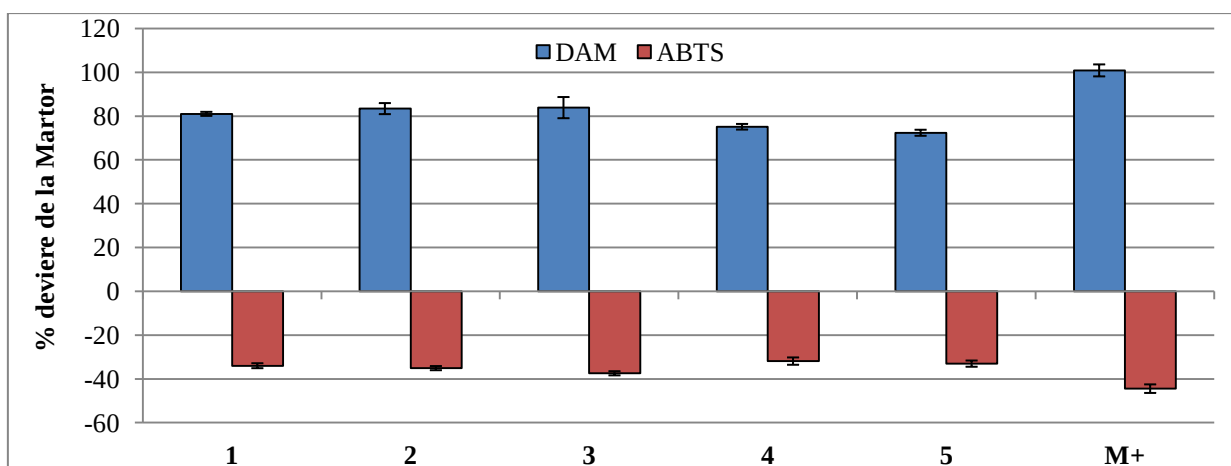


Fig. 4.18. Activitatea antioxidantă totală (test reducere ABTS^{•+}) și cantitatea dialdehidei malonice la *Penicillium expansum* CNMN-FD-05 sub influența substanțelor selectate. 1. EH_{Ca}; 2. EH_{Cr}; 3. EH_{Co}; 4. EE_{Ca}; 5. EE_{Cr}; M+ - Clorhidrat de naftifină

Cea mai mare cantitate de DAM – cu 100,85% mai mare decât în martorul netratat - a fost obținută în cultura de *Penicillium expansum* CNMN-FD-05 sub influența clorhidratului de naftifină. Extractele din biomasa de spirulină cu conținut de metale au avut efecte comparabile, ridicând conținutul de dialdehidă malonică cu 72,36 – 83,85% față de martorul netratat. Valorile obținute în cazul acțiunii remediilor biologice nu se deosebesc veridic între ele, dar sunt semnificativ mai mici ($P < 0,01$) decât cele obținute pentru martorul pozitiv. Capacitatea antioxidantă a fungilor filamentoși *Penicillium expansum* CNMN-FD-05 a scăzut la acțiunea extractelor din biomasa de spirulină cu conținut de metale cu 31,90 – 37,46%, iar la acțiunea clorhidratului de naftifină – cu 44,48% față de martorul netratat.

Rezultate destul de uniforme au fost obținute și în cazul culturii *Mucor vulgaris* CNMN-FD-07 (figura 4.19). În biomasa martorului cantitatea de dialdehidă malonică a fost de $3,95 \pm 0,23$ nM/g, iar capacitatea antioxidantă totală a constituit $24,62 \pm 1,16\%$ 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 martorul netratat. 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* CNMN-FD-07 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.

În biomasa martorului culturii de *Aspergillus fumigatus* CNM-FA-02 DAM constituie $5,17 \pm 0,39$ nM/g, iar capacitatea antioxidantă totală este de $74,0 \pm 1,94\%$ inhibiție ABTS^{•+}. Sub influența remediilor testate cantitatea de DAM crește cu 61,87 – 85,22% față de martorul netratat

(Figura 20 A). Dintre extractele utilizate efect maximal a avut extractul hidric din biomasa cu conținut de cadmiu. Creșterea DAM în acest caz nu se deosebește semnificativ de cea înregistrată la acțiunea clorhidratului de naftifină.

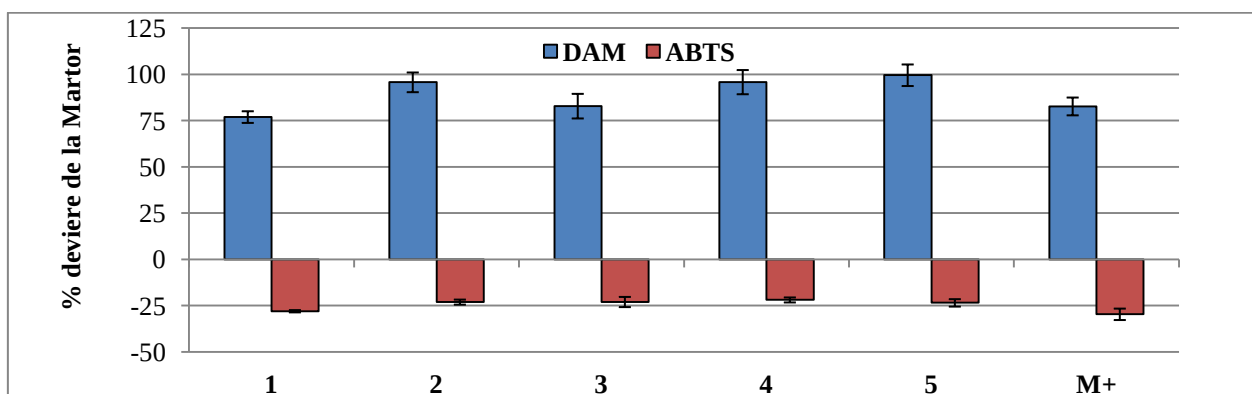


Fig. 4.19. Activitatea antioxidantă totală (test reducere ABTS^{•+}) și cantitatea dialdehidei malonice la *Mucor vulgaris* CNMN-FD-07 sub influența substanțelor selectate. 1. EH_{Co}; 2. EE_{Cd}; 3. EE_{Cr}; 4. EE_{Zn}; 5. EE_{Fe}, M+ - clorhidrat de naftifină

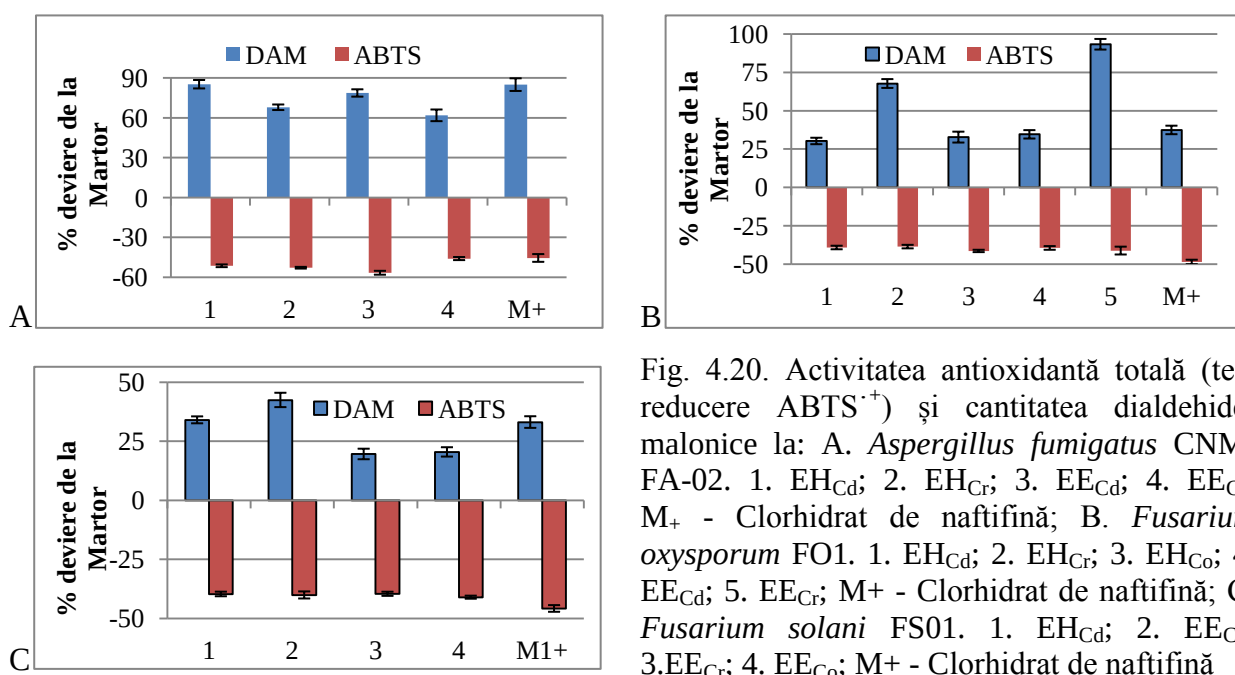


Fig. 4.20. Activitatea antioxidantă totală (test reducere ABTS^{•+}) și cantitatea dialdehidei malonice la: A. *Aspergillus fumigatus* CNM-FA-02. 1. EH_{Cd}; 2. EH_{Cr}; 3. EE_{Cd}; 4. EE_{Cr}; M+ - Clorhidrat de naftifină; B. *Fusarium oxysporum* FO1. 1. EH_{Cd}; 2. EH_{Cr}; 3. EH_{Co}; 4. EE_{Cd}; 5. EE_{Cr}; M+ - Clorhidrat de naftifină; C. *Fusarium solani* FS01. 1. EH_{Cd}; 2. EE_{Cd}; 3. EE_{Cr}; 4. EE_{Co}; M+ - Clorhidrat de naftifină

Extracțele din spirulina cu conținut de metale, la fel ca și clorhidratul de naftifină produc diminuarea semnificativă a activității antioxidante totale la *Aspergillus fumigatus* CNM-FA-02 – cu 45,98 – 56,64% față de martor. Izolatele naturale de *Fusarium* de asemenea au suferit anumite modificări sub influența extractelor din biomasa de spirulină cu conținut de metale. În cazul *Fusarium oxysporum* FO1 martorul conține 1,75±0,19 nM dialdehidă malonică la gram de biomasă, iar capacitatea antioxidantă totală constituie 33,76±0,73 % inhibiție radical cation ABTS (Figura 20 B). Creșterea cantității DAM a fost de 30,23 – 93,31% față de martor.

Clorhidratul de naftifină a dus la creșterea DAM cu 37,43%, iar extractele hidric și etanolic din biomasa de spirulină cu conținut de crom au dus la o creștere veridic mai înaltă decât în cazul matorului pozitiv ($P < 0,001$) de 67,72 și 93,31% respectiv. Scăderea capacității antioxidante totale la această tulpină a constituit 39,24 – 48,66%, cel mai semnificativ rezultat fiind în cazul matorului pozitiv.

La matorul culturii *Fusarium solani* FS01 valorile absolute ale DAM și testului TBARS au fost foarte asemănătoare cu cele obținute pentru precedenta cultură (DAM – $1,32 \pm 0,09$ nM/g, TBARS – $33,62 \pm 1,74\%$ inhibiție $ABTS^{\cdot+}$). Scăderea capacității antioxidante a constituit 39,6 – 45,8% față de mator, cea mai joasă valoare fiind în cazul matorului pozitiv (figura 20 C). Creșterea DAM a constituit 20,46 – 42,45%, cea mai importantă majorare fiind înregistrată în cazul extractului etanolic din biomasa de spirulină cu conținut de cadmiu, veridic superioară ($P < 0,001$) celei provocate de matorul pozitiv.

Analizând efectul remediilor antifungice de origine chimică și biologică asupra fungilor levuriformi și filamentoși în aspect de modificare a capacității antioxidante totale și intensității procesului de peroxidare lipidică putem menționa, că majoritatea acestora au avut efecte similare, care s-au deosebit în mare măsură doar prin intensitate. Astfel, 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.

4.4. Influența remediilor de origine chimică și biologică asupra activității enzimelor antioxidante

Activitatea echilibrată a enzimelor antioxidante primare asigură protecția celulelor de radicalii liberi care se formează pe durata proceselor fiziologice normale și a celor, care se acumulează ca urmare a acțiunii nefavorabile ale factorilor de mediu. Acestea sunt unele dintre primele componente ale biomasei, care reacționează la schimbările care intervin. De cele mai multe ori la stimuli de scurtă durată și de intensitate joasă are loc o expresie mărită a genelor respective, ceea ce accelerează procesele de eliminare a cantităților moderate de radicali liberi. În cazul acțiunii cronice a factorilor nocivi de intensitate înaltă se observă scăderea semnificativă a activității enzimelor respective, ceea ce compromite în mod serios capacitatea de supraviețuire a celulelor.

Rezultatele obținute de noi confirmă acest lucru – practic în toate variantele experimentale unde asupra fungilor levuriformi și filamentoși s-a acționat cu doze care corespund CMI a remediilor antifungice testate, au fost înregistrate abateri substanțiale de la valorile normale în activitatea a trei enzime antioxidante – superoxid dismutaza, catalaza și glutatyon peroxidaza.

În figura 4.21 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™.

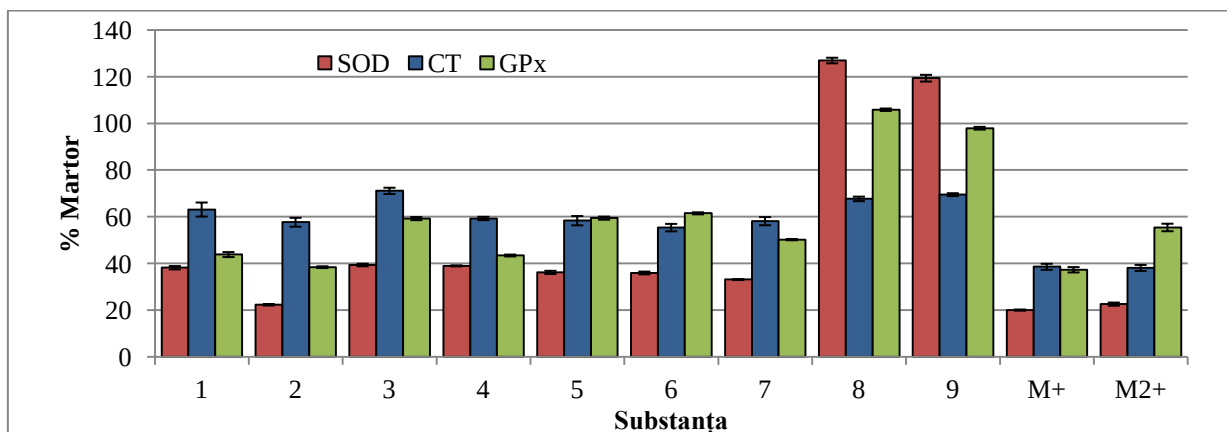


Fig. 4.21. Activitatea enzimelor antioxidante la *Candida albicans* ATCC®10231™ sub influența substanțelor studiate. 1. Extract frunze *J. regia* (etil acetat); 2. BREV 1; 3. RGTM 55; 4. RGTM 56; 5. RGTM 57; 6. RGTM 64; 7. RGTM 83; 8. Extract hidro etanolic 20% *S.platensis*; 9. Extract hidro etanolic 20% *N.linckia*; M₊ - Itraconazol; M₂₊ - Ketoconazol

Valoarea absolută a activității SOD la *Candida albicans* ATCC®10231™ a constituit 210,5±1,13 U/ml. 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. Cel mai jos nivel de activitate SOD a fost obținut în cazul acțiunii martorului pozitiv itraconazolul – 20,1% din nivelul martorului netratat. În cazul ketoconazolului activitatea SOD de asemenea s-a redus semnificativ și a atins cota de 22,6% din nivelul martorului. Activitatea enzimei SOD la *Candida* în cazul acțiunii extractului în etil acetat din frunze de nuc și a compușilor chimici noi a constituit între 22,35 și 38,20% din nivelul specific martorului netratat.

Activitatea catalazei la *Candida albicans* ATCC®10231™ de asemenea a fost afectată de influența remediilor antifungice, în toate variantele fiind semnificativ mai joasă comparativ cu martorul netratat, la care această activitate a constituit 8,02±0,11 U/L. La acțiunea martorilor pozitivi activitatea CT a fost de aproximativ 38% din nivelul martorului, fără deosebiri statistic semnificative. În cazul acțiunii celorlalte remedii selectate activitatea CT 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 în martorul netratat de *Candida albicans* ATCC®10231™ a constituit 2317 ± 101 U/L. Extractele hidro etanolice din biomasa de spirulină și nostoc nu au provocat modificări statistic semnificative ale activității enzimei respective. În toate celelalte variante 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). Astfel, 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.

Tulpina *Trichophyton mentagrophytes* ATCC®9533™ de asemenea a reacționat la prezența remediilor testate prin modificarea semnificativă a activității enzimelor antioxidante primare (figura 4.22). Activitatea SOD în biomasa martorului a constituit $141,36 \pm 18,7$ U/ml.

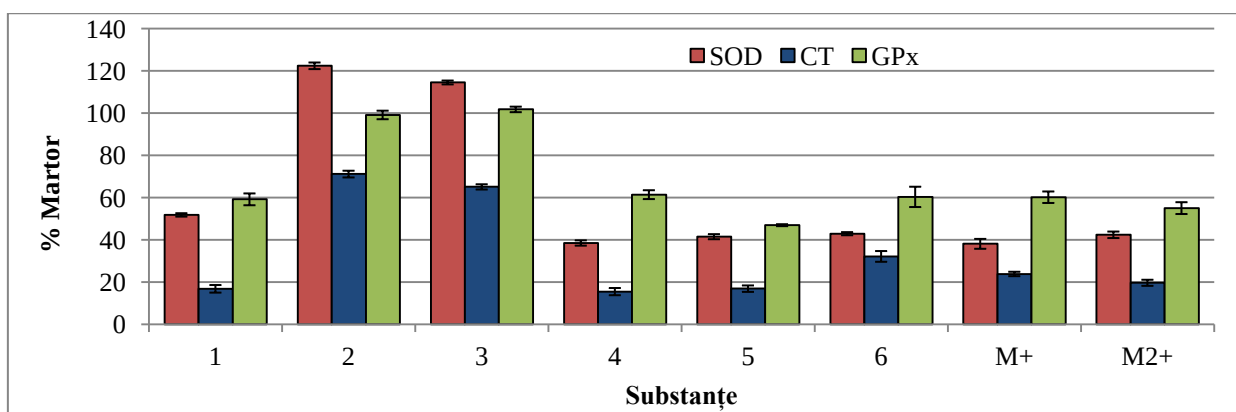


Fig. 4.22. Activitatea enzimelor antioxidante la *Trichophyton mentagrophytes* ATCC®9533™ sub influența substanțelor studiate. 1. Extract frunze *J. regia* (etil acetat); 2. Extract hidro etanolic 50% *S. platensis*; 3. Extract hidro etanolic 20% *N. linckia*; 4. EE Co; 5. EE Cd; 6. EE Cr; M+ - Itraconazol; M2+ - Clorhidrat de naftifină.

Extractele hidro etanolice din biomasa standard de spirulină și nostoc au provocat o creștere a activității acestei enzime – cu 14 și respectiv 22 % față de martorul netratat. În toate celelalte cazuri remediile chimice și biologice au provocat diminuarea activității SOD, aceasta fiind de 41-52% față de martor. Activitatea CT la tulpina *Trichophyton mentagrophytes* ATCC®9533™ în biomasa martorului a constituit $7,34 \pm 0,34$ U/L, iar remediile biologice selectate au provocat diminuarea semnificativă a activității enzimei până la valori de 17 – 71% din valoarea caracteristică martorului. Extractele în etil acetat din frunze de nuc și cele etanolice

din biomasa de spirulină cu conținut de cobalt și cadmiu au produs un efect de inhibiție a enzimei mai puternic decât itraconazolul ($P < 0,01$). Extractele hidro etanolice din biomasa de spirulina și nostoc au avut o acțiune mai moderată asupra activității CT la această tulpină, reducând activitatea cu 29-35% față de martor. Activitatea GPx nu a suferit modificări în cultura tratată cu extracte hidro etanolice din biomasa de spirulină și nostoc, dar s-a redus esențial în cazul celorlalte remedii aplicate. Valorile obținute au fost destul de omogene, activitatea GPx constituind în aceste cazuri 55 – 61 % din valoarea înregistrată în proba martor.

În cazul tulpinii *Trichophyton rubrum* ATCC®28188™ extractul hidro etanolic din nostoc nu a modificat activitatea SOD față de martorul netratat în care aceasta a constituit $114,92 \pm 3,0$ U/ml. În toate celelalte cazuri activitatea superoxiddismutazei a fost semnificativ mai joasă și a constituit 25 -53% din valoarea înregistrată în proba martor (figura 4.23). Acțiunea martorilor pozitivi a dus la diminuarea cu 64% (itraconazol) și 67% (clorhidrat de naftifină) a activității SOD. Trei dintre remediile testate (extractul din pericarp de nuci și extractele etanolice din biomasa de spirulină cu conținut de cobalt și cadmiu au produs o micșorare veridică mai pronunțată ($P < 0,005$) comparativ cu cea observată la acțiunea ambilor martori pozitivi.

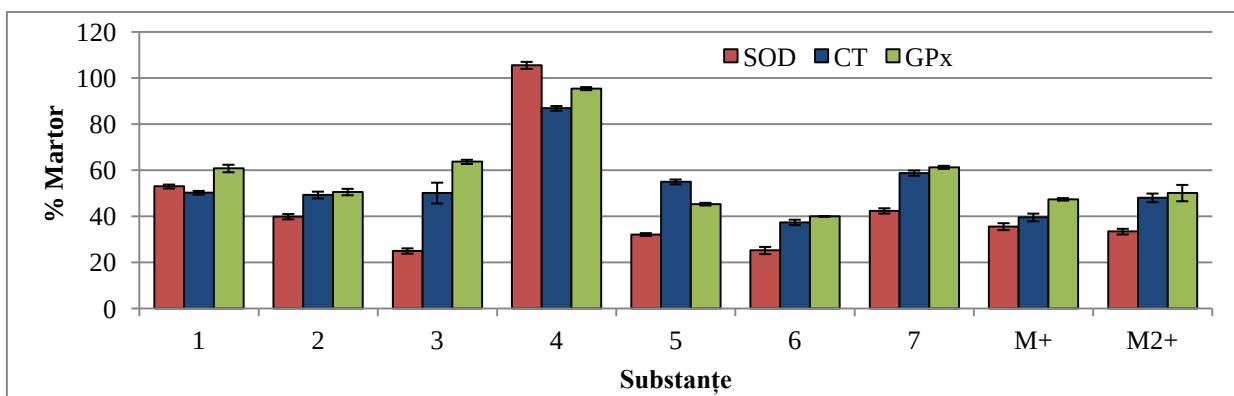


Fig. 4.23. Activitatea enzimelor antioxidante la *Trichophyton rubrum* ATCC®28188™ sub influența substanțelor studiate. 1. Extract frunze *J. regia* (etanol); 2. Extract frunze *J. regia* (etil acetat); 3. Extract pericarp *J. regia* (etanol); 4. Extract hidro etanolic 50% *N. linckia*; 5. EE Co; 6. EE Cd; 7. EE Cr; M+ - Itraconazol; M2+ - Clorhidrat de naftifină

Activitatea catalazei în biomasa de *Trichophyton rubrum* ATCC®28188™ de asemenea a fost diminuată semnificativ față de martorul pozitiv, în care aceasta a fost egală cu $7,33 \pm 0,31$ U/L. În biomasa tratată cu remediile antifungice selectate activitatea CT a constituit 37,36 – 86,83% din valoarea obținută pentru martor. Cea mai înaltă activitate CT a fost în biomasa tratată cu extract hidro etanolic din nostoc, iar cea mai joasă – în cea tratată cu extract etanolic din biomasa de spirulină cu cadmiu. În ultima variantă activitatea CT în *Trichophyton rubrum* ATCC®28188™ a fost la nivelul itraconazolului și semnificativ mai joasă decât în biomasa

tratată cu clorhidrat de naftifină ($P < 0,005$). Activitatea GPx de asemenea s-a modificat sub influența remediilor antifungice. În martorul pozitiv acest indicator a fost de 2294 ± 33 U/L. Cele mai neînsemnate modificări au fost în cazul extractului hidro etanolic de 50% din nostoc, unde activitatea GPx a fost de 95,41% față de valoarea martorului. În cazul acțiunii martorilor pozitivi activitatea GPx este practic aceeași și constituie 47,37 și 50,08 % din valoarea martorului netratat. Extractul din spirulina cu conținut de cadmiu a produs o diminuare veridic mai pronunțată a activității GPx comparativ cu ambii martori pozitivi.

Activitatea enzimelor antioxidante în biomasa martorului netratat al tulpinii *Microsporium canis* ATCC®36299™ a constituit: pentru SOD – $139,9 \pm 9,1$ U/ml; pentru CT – $7,37 \pm 0,13$ U/L; pentru GPx - $1876 \pm 27,1$ U/L. Activitatea SOD nu s-a modificat în cazul tratării culturii de dermatofiți cu extractul hidro etanolic de 20% din nostoc (figura 4.24). În cazul celorlalte extracte hidro etanolice cianobacteriene a avut loc o diminuare statistic semnificativă, dar mult mai modestă ca în cazul altor remedii testate pe această cultură de fungi. În cazul extractelor hidro etanolice cianobacteriene activitatea SOD a constituit 86,14 – 100, 87% din activitatea enzimei la martor, iar în celelalte cazuri – 24,46 – 34,12% din valoarea martorului.

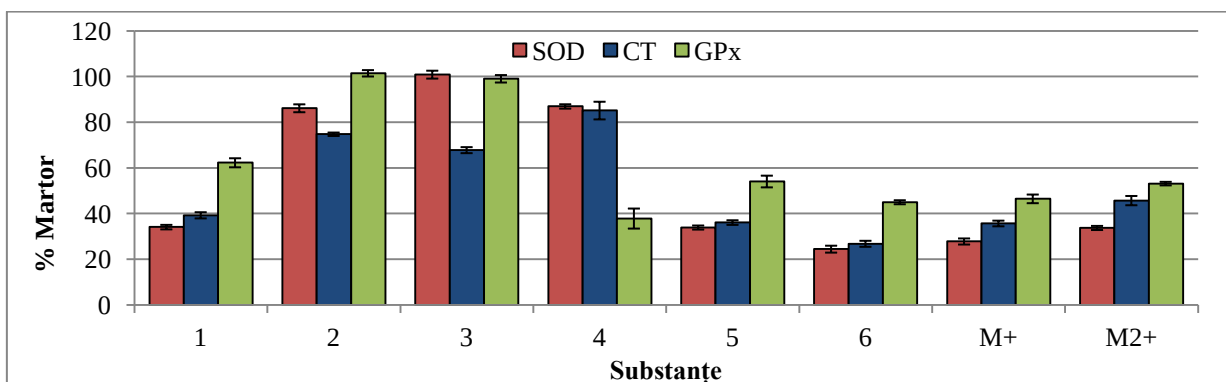


Fig. 4.24. Activitatea enzimelor antioxidante la *Microsporium canis* ATCC®36299™ sub influența substanțelor studiate. 1. Extract frunze *J. regia* (etanol); 2. Extract hidro etanolic 70% *S. platensis*; 3 Extract hidro etanolic 20% *N. linckia*; 4. Extract hidro etanolic 70% *N. linckia*; 5. EE_{Co}; 6. EE_{Cd}; M₊ - Itraconazol; M₂₊ - Clorhidrat de naftifină

Activitatea CT este mai joasă în toate variantele experimentale. Cea mai mică scădere a activității CT a fost în biomasa de *Microsporium canis* ATCC®36299™ tratată cu extractele hidro etanolice din biomasa cianobacteriană (67,81 – 85,14% din nivelul de activitate la martorul netratat). În celelalte variante activitatea CT a fost și mai joasă și a constituit 26,81 – 39,29% din valoarea martorului. Extractul etanolic din biomasa de spirulină cu conținut de cadmiu a provocat o scădere veridic mai pronunțată în comparație cu ambii martori pozitivi ($P < 0,01$). Cu excepția extracului hidro etanolic de 70% din *S. platensis* și extractul hidro etanolic de 20% din

N. linckia, care nu au modificat activitatea GPx, în toate celelalte cazuri s-a înregistrat o scădere importantă a activității enzimei, valorile ei fiind între 37,87 și 62,28% din valoarea caracteristică matorului netratat.

Rezultatele obținute pentru tulpina de fungi dermatofiți *Microsporum gypseum* ATCC®24102™ sunt prezentate în figura 4.25. Extractele hidro etanolice de 20% din spirulină și nostoc au dus la mărirea activității SOD cu 10,30 – 17,05% față de mator, iar în toate celelalte cazuri a fost înregistrată reducerea substanțială a activității acestei enzime. În biomasa matorului netratat valoarea activității SOD a fost de $113,94 \pm 3,32$ U/ml, iar în biomasa tratată cu remediile antifungice selectate (afară de extractele hidro etanolice cianobacteriene) activitatea SOD a constituit 28,9 – 58,0 % din valoarea matorului netratat. Nici unul dintre remediile testate nu au inhibat mai puternic decât matorii pozitivi activitatea superoxiddismutazei. Activitatea CT în biomasa matorului *Microsporum gypseum* ATCC®24102™ a fost de $7,30 \pm 0,30$ U/L, iar în cea tratată cu remedii antifungice selectate a scăzut substanțial până la valori de 25,40 – 77,21% din valoarea indicată.

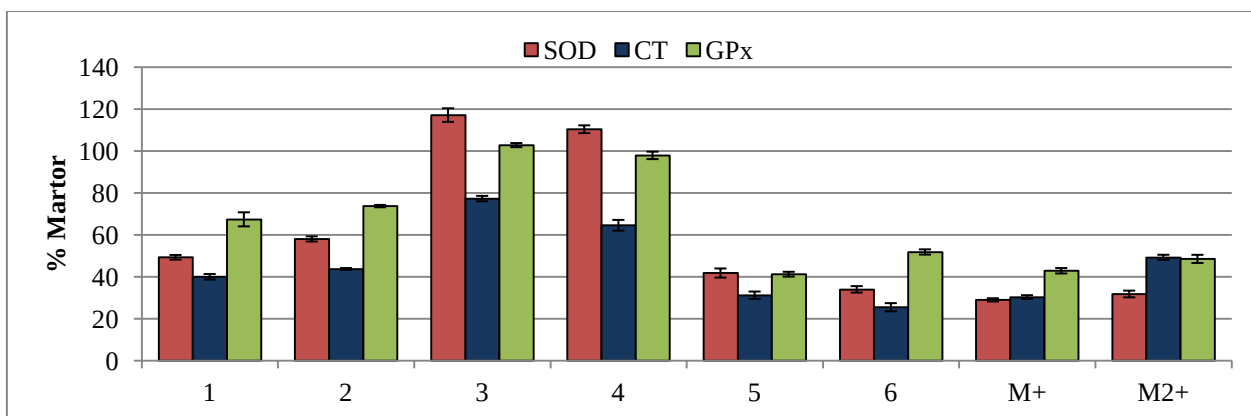


Fig. 4.25. Activitatea enzimelor antioxidante la *Microsporum gypseum* ATCC®24102™ sub influența substanțelor studiate. 1. Extract frunze *J. regia* (etil acetat); 2. Extract pericarp *J. regia* (etanol); 3. Extract hidro etanolic 20% *S. platensis*; 4. Extract hidro etanolic 20% *N. linckia*; 5. EE_{Co}; 6. EE_{Cr}; M₊ - Itraconazol; M₂₊ - Clorhidrat de naftifină

Activitatea GPx în biomasa de *Microsporum gypseum* ATCC®24102™ tratată cu remediile antifungice selectate, cu excepția extractelor hidro etanolice din biomasa de spirulină și nostoc, a fost mai mică față de matorul netratat (activitatea CT la mator a fost de 1656 ± 16 U/L). Extractele ce fac excepție nu au modificat semnificativ activitatea GPx, aceasta fiind de 102,73% și 97,85 % față de mator. Extractele din frunze și pericarp de nucă, precum și cele etanolice din biomasa de spirulină cu conținut de cobalt și crom au produs o reducere a activității acestei enzime până la valori de 41,15 – 73,64% din valoarea obținută pentru matorul netratat.

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% (figura 4.26).

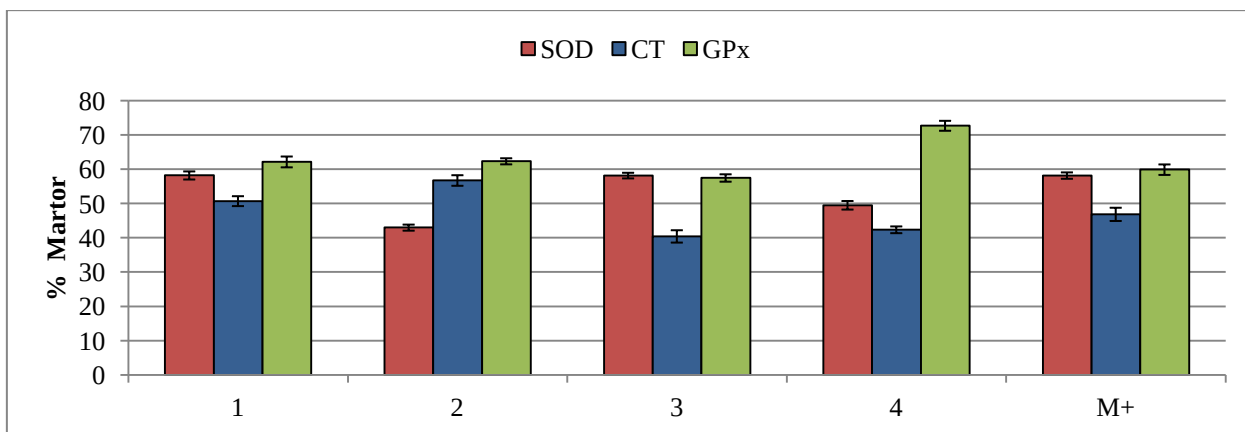


Fig. 4.26. Activitatea enzimelor antioxidante la *Aspergillus fumigatus* CNM-FA-02 sub influența substanțelor studiate. 1. EH_{Cd}; 2. EH_{Cr}; 3. EE_{Cd}; 4. EE_{Cr}; M₊ - Clorhidrat de naftifină

Extractele hidric și etanolic din biomasa de spirulină cu conținut de crom au produs o reducere a activității SOD la *Aspergillus fumigatus* CNM-FA-02 veridic mai puternică ($P < 0,005$) decât reducerea produsă de clorhidratul de naftifină. Astfel, în variantele experimentale activitatea SOD a constituit între 42,98 și 58,20% din valoarea obținută pentru martorul netratat. Activitatea catalazei s-a redus sub acțiunea extractelor din biomasa de spirulină cu conținut de metale până la valori ce constituie 42,35 – 56,77% din activitatea enzimei în biomasa standard de *Aspergillus fumigatus* CNM-FA-02. Mai puțin pronunțată a fost reducerea activității GPx – cu 27,31-42,54% față de martor.

Aceleași efecte au fost observate și la tulpina *Penicillium expansum* CNMN-FD-05 atunci când aceasta a fost tratată cu extracte etanolice și hidrice din biomasa de spirulină cu conținut de metale (figura 4.27). Valorile activității celor trei enzime antioxidante în biomasa martorului au fost: SOD – $122,96 \pm 2,33$ U/ml; CT – $8,01 \pm 0,20$ U/L; GPx – $2199 \pm 24,9$ U/L. Cel mai puternic s-a redus activitatea SOD, valorile ei în biomasa tratată cu remediile antifungice fiind de 30,48% – 54,56% din valoarea înregistrată în martor. Cea mai semnificativă reducere a activității SOD a fost înregistrată pentru martorul pozitiv – clorhidratul de naftifină. Activitatea CT și cea a GPx de asemenea a fost mai joasă în biomasa de penicilium tratată cu remediile antifungice selectate. Pentru aceste două enzime valorile au variat între 46,71 și 80,64% din activitatea înregistrată în biomasa martorului netratat. Rezultatele obținute la aplicarea extractului etanolic din biomasa de

spirulină cu conținut de cadmiu au fost foarte apropiate de cele obținute în cazul aplicării matorului pozitiv (diferențele dintre valori nu au fost susținute statistic). În toate celelalte cazuri rezultatele au fost mai modeste comparativ cu clorhidratul de naftifină.

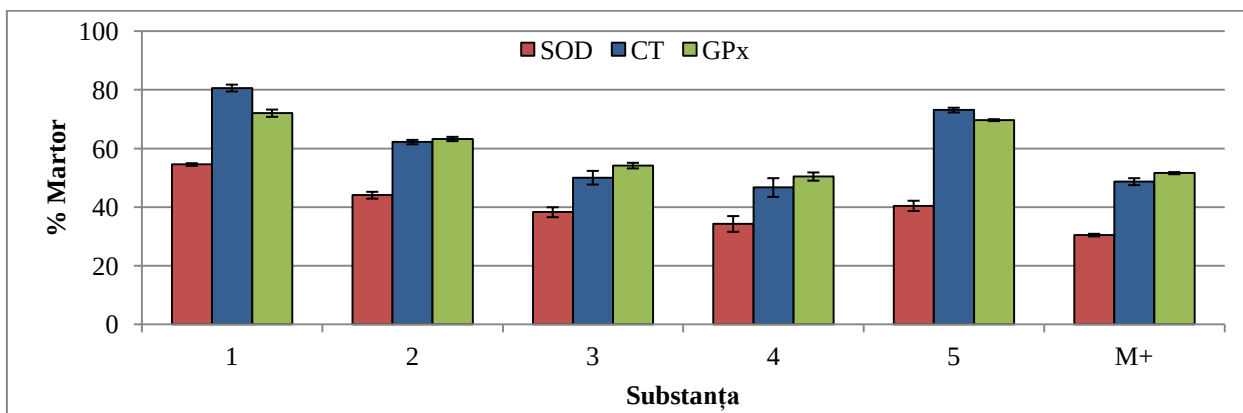


Fig. 4.27. Activitatea enzimelor antioxidante la *Penicillium expansum* CNMN-FD-05 sub influența substanțelor studiate. 1. EH_{Cd}; 2. EH_{Cr}; 3. EH_{Co}; 4. EE_{Cd}; 5. EE_{Cr}, M+ - Clorhidrat de naftifină

Tulpina *Mucor vulgaris* CNMN-FD-07 a manifestat sensibilitate față de extractele din biomasa de spirulină cu conținut de metale (figura 4.28). Toate extractele selectate au provocat inhibiția activității enzimelor antioxidante primare.

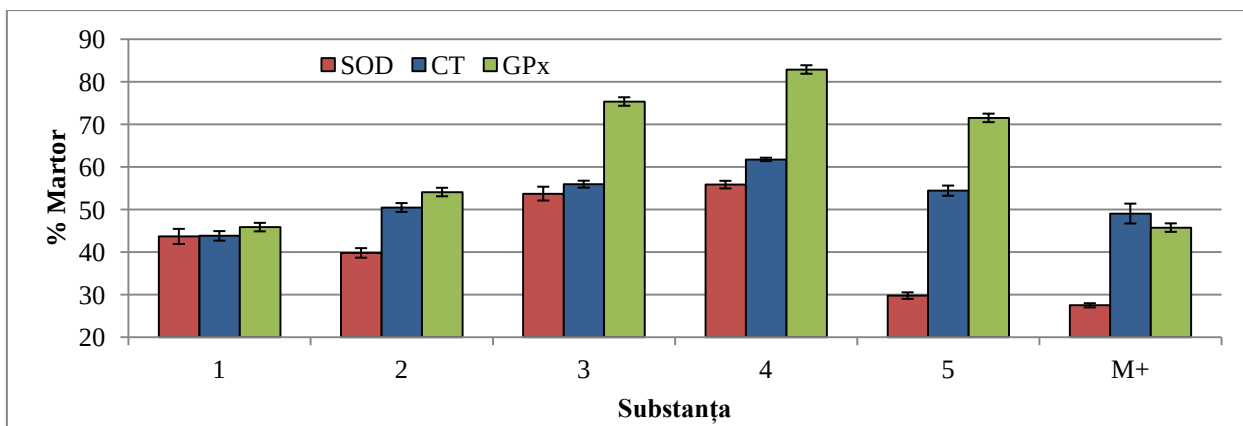


Fig. 4.28. Activitatea enzimelor antioxidante la *Mucor vulgaris* CNMN-FD-07 sub influența substanțelor studiate. 1. EH_{Co}; 2. EE_{Cd}; 3. EE_{Cr}; 4. EE_{Zn}; 5. EE_{Fe}, M+ - Clorhidrat de naftifină

Valorile activității enzimelor în biomasa matorului au fost următoarele: SOD – 110,58±1,08 U/ml; CT – 8,04±0,30 U/L; GPx - 1642±17,2 U/L. Ca și în cazul tulpinii analizate anterior, cea mai însemnată reducere a activității enzimatice a fost înregistrată în cazul SOD. Valoarea minimă de activitate (27,48% din valoarea matorului) a fost obținută ca rezultat al acțiunii clorhidratului de naftifină asupra fungilor. Extractele din spirulină cu conținut de metale au produs o reducere a activității SOD care a constituit 29,75 – 55,85% din activitatea enzimei în

biomasa netratată. În cazul CT unul dintre remediile aplicate – extractul hidric din biomasa de spirulină cu conținut de cobalt a produs un efect de inhibare mai pronunțat ca cel al clorhidratului de naftifină ($P < 0,01$). Același tip de extract a produs și o scădere a activității GPx în biomasa la nivelul matorului pozitiv. Valorile de activitate a CT în biomasa probelor tratate cu remedii antifungice a constituit între 43,80 și 55,95% din activitatea enzimei în matorul netratat, iar cele ale activității GPx au fost de 45,75 – 82,91% din valoarea înregistrată pentru mator.

Figurile 4.29 și 4.30 reflectă activitatea enzimelor antioxidante în biomasa izolatelor naturale *Fusarium oxysporum* FO1 și *Fusarium oxysporum* FO1. În cazul *Fusarium oxysporum* FO1 valorile de activitate a enzimelor antioxidante au constituit SOD – $223,50 \pm 1,94$ U/ml; CT – $8,26 \pm 0,40$ U/L; GPx – $3449 \pm 21,5$ U/L. La această tulpină (figura 4.29) doar una dintre substanțele testate a produs o diminuare a activității SOD veridic mai joasă decât cea înregistrată la acțiunea clorhidratului de naftifină. Acesta a fost extractul hidric din biomasa de spirulină cu conținut de cobalt. Astfel, activitatea SOD în biomasa izolatelor *Fusarium oxysporum* tratată cu remediile antifungice evidențiate a avut valori care constituie 33,44- 54,45% din activitatea enzimei în biomasa mator; CT – 39,78 – 57,72%, iar GPx – 49,48 – 62,64%.

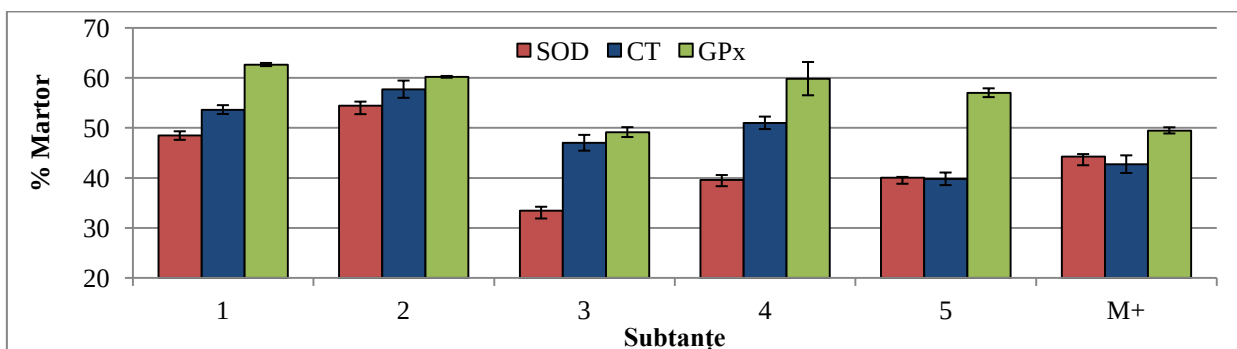


Fig. 4.29. Activitatea enzimelor antioxidante la *Fusarium oxysporum* FO1 sub influența substanțelor studiate. 1. EH_{Cd}; 2. EH_{Cr}; 3. EH_{Co}; 4. EE_{Cd}; 5. EE_{Cr}; M+ - Clorhidrat de naftifină

În cazul *Fusarium solani* FS01 valorile de activitate a enzimelor antioxidante au constituit: SOD – $51,17 \pm 1,12$ U/ml; CT – $8,24 \pm 0,09$ U/L; GPx – $2980 \pm 8,5$ U/L. Activitatea SOD la această tulpină a fost redusă simțitor practic de toate remediile aplicate, iar valorile obținute au constituit între 20,97 și 35,72% din activitatea enzimei în proba mator (figura 4.30).

Extractul hidric din biomasa de spirulină cu conținut de cadmiu și extractele etanolice din biomasa cu conținut de crom și cobalt au dus la o diminuare veridic mai pronunțată ($P < 0,01$) a activității SOD la *Fusarium solani* FS01 comparativ cu efectul observat la acțiunea clorhidratului de naftifină. Extractul hidric din biomasa cu conținut de crom a avut același efect de inhibare a activității SOD ca și matorul pozitiv. Diminuarea activității CT a fost mai

pronunțată la acțiunea matorului pozitiv, dar în linii generale, rezultatele obținute au fost destul de omogene, activitatea CT în biomasa de *Fusarium solani* FS01 tratată cu remediile antifungice, constituind între 42,31% și 55,12% din activitatea acesteia în biomasa netratată. Activitatea GPx sub acțiunea remediilor antifungice de asemenea s-a redus, dar într-o măsură mai mică. Valorile obținute au reprezentat 42,61% – 75,84% din activitate în matorul netratat. Cea mai joasă activitate a GPx a fost înregistrată în biomasa de *Fusarium solani* FS01 tratată cu clorhidrat de naftifină.

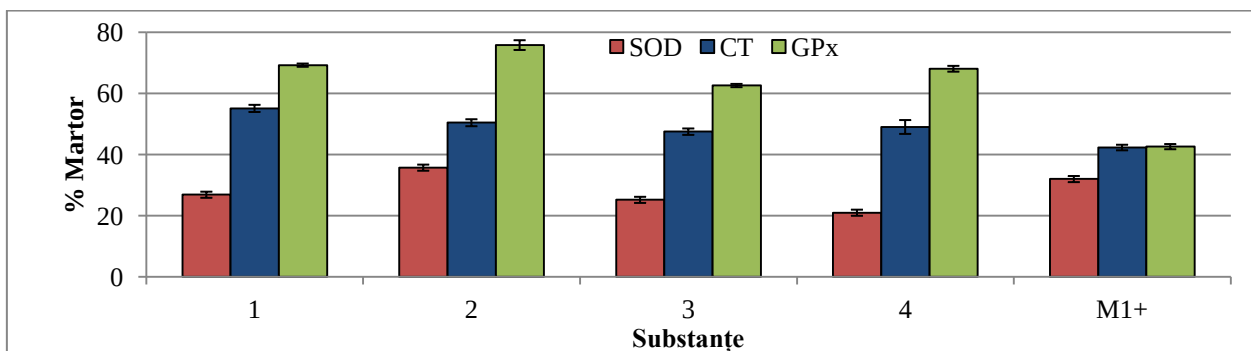


Fig. 4.30. Activitatea enzimelor antioxidante la *Fusarium solani* FS01 sub influența substanțelor studiate. 1. EH_{Cd}; 2. EH_{Cr}; 3. EH_{Co}; 4. EE_{Cd}; 5. EE_{Cr}; M+ - Clorhidrat de naftifină

Astfel, pentru extractele din frunze și pericarp de nucă, extractele din biomasa de spirulină cu conținut de metale și pentru compușii chimici noi a fost demonstrat efectul de diminuare semnificativă a activității enzimelor antioxidante. Extractele hidro etanolice din biomasa de spirulină și nostoc au constituit excepție din lista remediilor testate. În cele mai multe cazuri acestea nu modifică substanțial activitatea GPx, scad activitatea CT și o măresc pe cea a SOD. Lipsa ori intensitatea foarte joasă a efectelor extractelor hidro etanolice din biomasa de spirulină și nostoc asupra unor parametri biochimici ai tulpinilor de fîngi se explică în primul rând, prin aceea, că aceste două culturi nu au potențial toxic. În același timp extractele date, s-au manifestat în calitate de agenți antifungici față de candida și dermatofitii studiați. Cercetările efectuate în ultimii ani demonstrează, că extractele hidrice și etanolice concentrate din spirulină, afectează sinteza de glucozamină și ergosterol la fungi [18, 49, 134], ceea ce duce, la dezorganizarea funcțională a membranelor biologice, afectând astfel viabilitatea fungilor. 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 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.

4.5. Concluzii la capitolul 4

1. Compușii chimici noi, cât și extractele din frunzele și pericarpul de nucă și din biomasa de spirulină cu conținut de metale generează același tip de reacții de răspuns a culturilor de funghi testați: eliberarea extracelulară a lactat dehidrogenazei, scăderea activității enzimelor antioxidante din prima linie de protecție – SOD, CT și GPx, scăderea activității antioxidante totale a biomasei fungice și mărirea cantității produselor peroxidării lipidice.

2. Extractele hidro etanolice din biomasa de spirulină și nostoc în cele mai multe cazuri nu produc eliberarea lactat dehidrogenazei în mediul extracelular, nu modifică substanțial capacitatea antioxidantă totală, intensitatea peroxidării lipidice și activitatea GPx, scad activitatea CT și o măresc pe cea a SOD. Astfel, datorită siguranței pentru consumul uman, dar și datorită efectelor antifungice specifice față de unii agenți cauzali ai micozelor acest tip de extracte merită a fi obiectul unor studii separate.

3. 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. Aceasta ar putea fi una din explicațiile pentru dereglarea permeabilității peretelui și membranei celulare, care duce la eliberarea intensă în mediul extracelular a lactat dehidrogenazei.

4. Un alt mecanism care asigură acțiunea antifungică a substanțelor menționate constă în reducerea activității enzimelor antioxidante primare - catalazei, superoxiddismutazei și glutatation peroxidazei, ceea ce reduce substanțial capacitatea fungilor de a se proteja de acțiunea nocivă a radicalilor liberi formați în celulele fungilor ca răspuns la acțiunea remediilor antifungice de origine chimică și biologică.

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 $\mu\text{g/ml}$, iar CMF – 0,7-4,69 $\mu\text{g/ml}$ [3].
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* ATCC9533, *Trichophyton rubrum* ATCC 28188, *Microsporum canis* ATCC 36299 și *Microsporum gypseum* ATCC 24102 [6, 117, 118].
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 [119].
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 [119].
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 peretelui și membranei celulare ale fungilor [119].
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 etanolicе din biomasa de *Arthrospira platensis* și *Nostoc linckia* asupra agenților cauzali ai micozelor.

BIBLIOGRAFIA

In limba română

1. Bețiu M., Muset Gh., **Oltu Iu.** ș.a . Particularitățile epidemiologice ale polimicozelor în Republica Moldova. Curierul medical, 2016, vol.59, Nr.3, p. 10.
2. Brevet de invenție 4402, C1, MD. Metil-N ' -[(2-hidroxinaftalen-1-il)metiliden]-N-prop-2-en-1-ilhidrazonotioat, care manifestă activitate antimicotică față de *Candida albicans*. / Graur Vasilii; Zariciuc Elena; Usataia Irina; Țapcov Victor; Rudic Valeriu; Gulea Aurelian (MD). Cererea depusa 29.02.2016, BOPI nr. 2/2016.
3. 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:
4. 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. In: Curierul medical 2012, nr. 3 (327), p. 308-310.
5. **Oltu Iu.** Abordări contemporane în sensibilitatea și rezistența antifungică. În: Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științele vieții. 2015, nr.3 (327), p. 163-170.
6. **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, Chișinău, 2016, vol.II, p. 212-217.

In limba engleză

7. Aala F., Umi K., Nulit R. Electron Microscopy Studies of the Effects of Garlic Extract Against *Trichophyton rubrum*. In: Sains Malaysiana, 2013, vol. 42(11), p. 1585–1590.
8. Abed R., Dobretsov S., Sudesh K. Applications of cyanobacteria in biotechnology. In: Journal Applied Microbiology. 2009, nr.106, p.1–12.
9. Alcazar-Fuoli L. Mellado E. Ergosterol biosynthesis in *Aspergillus fumigatus*: its relevance as an antifungal target and role in antifungal drug resistance. In: Frontiers in microbiology, 2013, nr. 3, p.439.
10. Andrade M. et al. The Coordination Chemistry in the Antifungal Effect of Tin(IV)-Bis(Pyrimidin-2-Ylthio)Alkane Derivatives. In: American Journal of Applied Chemistry, 2015. vol.3(2), p.77–82.
11. Ansari M. et al. Natural Phenolic Compounds: A Potential Antifungal Agent. In: Microbial

- pathogens and strategies for combating them: science, technology and education, 2013, p. 1189–1195.
12. Apak R. et al. Methods of Measurement and Evaluation of Natural Antioxidant Capacity/activity (IUPAC Technical Report). In: Pure Applied Chemistry, 2013, vol. 85(5), p. 957–998.
 13. Arif T. et al. Natural products – antifungal agents derived from plants. In: Journal of Asian Natural Products Research, 2009, vol.11(7), p. 621–638.
 14. Arokiyaraj S. et al. Rapid green synthesis of silver nanoparticles from *Chrysanthemum indicum* L and its antibacterial and cytotoxic effects: an in vitro study. In: Journal of Nanomedicine. 2014, vol. 9(1), p. 379–388.
 15. Avijgan M., Mahboubi M. Echinophora platyloba DC. as a new natural antifungal agent. In: Asian Pacific Journal of Tropical Disease, 2015, vol. 5(3), p. 169–174.
 16. Ayala A., Munoz M., Arguelles S. Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. In: Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2014, ID 360438. 31p.
 17. Baghi N. et al. In Vitro Activity of New Azoles Luliconazole and Lanconazole Compared with Ten Other Antifungal Drugs against Clinical Dermatophyte Isolates. In: Medical Mycology, 2016, vol. 54(7), p. 757–763.
 18. Battah M. et al. Antifungal Agent from *Spirulina maxima*: Extraction and Characterization. In: Global Journal of Pharmacology, 2014, vol. 8(2), p. 228–236.
 19. Behr J. Chitin synthase, a fungal glycosyltransferase that is a valuable antifungal target. Chimia, 2011, vol. 65(1–2), p. 49–53.
 20. Ben-Ami R., Lewis R., Kontoyiannis D. Immunocompromised hosts: Immunopharmacology of modern antifungals. In: Clinical Infectious Diseases, 2008, nr.47, p. 226–235.
 21. Ben-Ami R. et al. Fitness and virulence costs of *Candida albicans* FKS1 hot spot mutations associated with echinocandin resistance. In: Journal of Infectious Diseases, 2011, nr. 204, p. 626–635.
 22. Blyth Ch. Antifungal Azoles: Old and New. In: The Pediatric Infectious Disease Journal, 2011, vol. 30(6), p. 506–507.
 23. Bonhomme J., d'Enfert C. *Candida albicans* biofilms: Building a heterogeneous, drug-tolerant environment. In: Current Opinion of Microbiology, 2013, nr.1, p. 398–403.
 24. Bowman S. Free S. The structure and synthesis of the fungal cell wall. In: BioEssays, 2006, vol. 28(8), p.799–808.

25. Brown G. et.al. Hidden killers: Human fungal infections. In: Science Translational Medicine, 2012, vol.4 (165), p.165rv113.
26. Burja A. et.al. Marine cyanobacteria—A prolific source of natural products. In: Tetrahedron, 2001, nr. 57, p. 9347–9377.
27. Butts A., Krysan D. Antifungal Drug Discovery: Something Old and Something New. In: PLoS Pathogens, 2012. vol. 8(9), p.e1002870.
28. Caggiano G. Fungal infection in patients of paediatric age. In: Contemporary pediatrics (ed. Oner Ozdemir), Tech, 2012, p. 385-402.
29. Calderone R. et al. Antifungal drug discovery: the process and outcomes. In: Future microbiology, 2014, vol. 9(6), p.791–805.
30. Carvalho M. et al. Human cancer cell antiproliferative and antioxidant activities of *Juglans regia* L. In: Food Chemistry Toxicology, 2010, nr.48, p. 441-447.
31. Castillo F. et al. Antifungal Properties of Bioactive Compounds from Plants. In: Fungicides for Plant and Animal Diseases, 2012, p. 81–106.
32. Chamilos G. et al. *Candida albicans* Cas5, a regulator of cell wall integrity, is required for virulence in murine and toll mutant fly models. In: The Journal of infectious diseases, 2009, vol. 200(1), p.152–157.
33. Chandrasekar P. Management of invasive fungal infections: a role for polyenes. In: Journal Antimicrobial Chemotherapy, 2011, nr. 66, p. 457–465.
34. Chen J. et al. New broad-spectrum antibacterial and antifungal alkaloids from *Kopsia hainanensis*. In: Phytochemistry Letters, 2014, vol. 7(1), p.156–160.
35. Chowdhary A, Agarwal K, Meis J. Filamentous Fungi in Respiratory Infections. What Lies Beyond Aspergillosis and Mucormycosis? In: PLoS Pathogens, 2016, vol.12(4). p.e1005491.
36. Conte A., Marin J. Selection of 5-fluorocytosine-resistant mutants from an *Aspergillus niger* citric acid-producing strain. In: Brazilian Journal of Microbiology, 2003, nr.34, p.1–4.
37. Coste A. et al. Genotypic evolution of azole resistance mechanisms in sequential *Candida albicans* isolates. In: Eukaryot Cell, 2007, nr.6, p.1889 – 1904.
38. Cowen L. The evolution of fungal drug resistance: Modulating the trajectory from genotype to phenotype. In: Nature Reviews Microbiology, 2008, nr.6, p. 187–198.
39. Cowen L. et al. Mechanisms of antifungal drug resistance. In: Cold Spring Harb Perspect Med, 2014, vol.5(7), p.a019752.
40. Cretton S. et al. Antifungal Quinoline Alkaloids from *Waltheria indica*. In: Journal of Natural Products, 2016, vol. 79(2), p. 300–307.

41. Dantas A. et al. Oxidative stress responses in the human fungal pathogen, *Candida albicans*. In: Biomolecules, 2015, vol. 5(1), p.142–165.
42. Davis S. An overview of the antifungal properties of allicin and its breakdown products - the possibility of a safe and effective antifungal prophylactic. In: Mycoses, 2005, vol. 48(2), p.95–100.
43. De Coninck B., Cammue B., Thevissen K. Modes of antifungal action and in planta functions of plant defensins and defensin-like peptides. In: Fungal Biology Reviews, 2013, vol. 26(4), p.109–120.
44. De Lucca A., Walsh T. Antifungal peptides: Novel therapeutic compounds against emerging pathogens. In: Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1999, vol. 43(1), p.1–11.
45. Debourgogne A., Dorin J., Machouart M. Emerging infections due to filamentous fungi in humans and animals: only the tip of the iceberg? In: Environmental Microbiology Reports, 2016, vol. 8(3), p. 332–342.
46. Degani G. et al. Genomic and functional analyses unveil the response to hyphal wall stress in *Candida albicans* cells lacking $\beta(1,3)$ -glucan remodeling. In: BMC Genomics, 2016, nr.17(1), p.482.
47. Dylağ M. et al. Antifungal Activity of Organotin Compounds with Functionalized Carboxylates Evaluated by the Microdilution Bioassay *in Vitro*. In: Medical Mycology, 2010, vol. 48(2), p. 373–83.
48. Edwards J., Kemski M., Rappleye C. Identification of an aminothiazole with antifungal activity against intracellular *Histoplasma capsulatum*. In: Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2013, nr. 57(9), p.4349–4359.
49. El-Baz FK E., El-Sayed A., Kamel M. In vitro antiviral and antimicrobial activities of *Spirulina platensis* extract. In: Journal Applied Pharmacuetical Sciense, 2013, vol. 3(12), p. 52–56.
50. Epp E. et al. Reverse Genetics in *Candida albicans* Predicts ARF Cycling Is Essential for Drug Resistance and Virulence A. P. Mitchell, ed. In: PLoS Pathogens, 2010, vol. 6(2), p.e1000753.
51. Espinel-Ingroff A. Mechanisms of resistance to antifungal agents: Yeasts and filamentous fungi. In: Revista Iberoamerica Micologia, 2008; nr.25, p. 101-106.
52. Ferreira G. et al. The Role of Oxidative and Nitrosative Bursts Caused by Azoles and Amphotericin B against the Fungal Pathogen *Cryptococcus gattii*. In: Journal Antimicrobial Chemotherapy, 2013, nr.68, p. 1801–1811.
53. Fiorini A. et al. *Candida albicans* protein profile changes in response to the butanolic

- extract of *Sapindus saponaria* L. In: Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, 2016, nr. 58, p. 25–32.
54. Gamarra S. et al. Mechanism of the synergistic effect of amiodarone and fluconazole in *Candida albicans*. In: Antimicrobial agents and chemotherapy, 2010, vol. 54(5), p.1753–1761.
 55. Gatto M. et al. Antifungal activity of total and fractionated phenolic extracts from two wild edible herbs. In: Natural Science, 2013, vol. 5(8), p. 895–902.
 56. Ge Z. et al. Synthesis and biological evaluation of novel 3-substituted amino-4-hydroxycoumarin derivatives as chitin synthase inhibitors and antifungal agents. In: Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 2016, vol. 31(2), p. 219–228.
 57. Ghannoum M., Rice L. Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. In: Clinical Microbiology Reviews, 1999, vol. 12(4), p. 501–517.
 58. Gray K. et al. Amphotericin primarily kills yeast by simply binding ergosterol. In: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012, nr.109(7), p. 2234–2239.
 59. Groll A., Piscitelli S., Walsh T. Clinical pharmacology of systemic antifungal agents: A comprehensive review of agents in clinical use, current investigational compounds, and putative targets for antifungal drug development. In: Advanced Pharma, 1998, nr. 44, p. 343–500.
 60. Grover N. Echinocandins: A Ray of Hope in Antifungal Drug Therapy. In: Indian journal of pharmacology, 2010, vol. 42(1), p. 9–11.
 61. Gulea A., **Oltu Iu.** et al. 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.
 62. Gulea A. et al. Synthesis and antileukaemia activity of N-(2,4-dimethylphenyl)hydrazine carbothioamide and its azomethine derivatives. In: Buletinul AŞM. Ştiinţele vieţii, 2012, nr.3(318), p. 59-66.
 63. 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, Karlovac, Croatia, 2015, p. 131-132.
 64. Gulea A.; **Oltu Iu.**; Graur V.; Zariciuc E.; Tapcov V.; Gudumac V. New antifungal inhibitors. International Warsaw Invention Show IWIS Warsaw, Poland, 2016, p. 25-26.
 65. Gulea A.P. et al. Coordination Compounds of Copper with 2-Formylpyridine 4-

- (Dimethylphenyl) thiosemicarbazones. In: Журнал Общей Химии , 2012, vol. 82 , p. 1880–1884.
66. 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.
 67. Gulshan K., Moye-Rowley W.S. Multidrug resistance in fungi. In: Eukaryot Cell, 2007, nr. 6, p. 1933 – 1942.
 68. Gulya A. et al. In vitro antileukemia, antibacterial and antifungal activities of some 3d metal complexes: Chemical synthesis and structure – activity relationships. In: Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 2008, vol. 23(6), p. 806-818.
 69. Gulya A . et al. Synthesis, Structure, and properties of coordination compounds of copper (II) acetate with substituted 2-{[2-(2-hydroxyethylamino) etylamino]methyl}phenol. In: Russian Journal of General Chemistry, 2011, vol. 81(9), p.1859-1866.
 70. Gulya A. et al. Coordination compounds of Copper with 2-Formylpyridine 4 - (Dimethylphenyl) thiosemicarbazones. In: Russian Journal of General Chemistry, 2012, vol. 82(11), p.1869-1872.
 71. Gulya A. et al. Synthesis, structure, and microbial activity of copper(II) chelates containing imidazole and condensation products of α - amino acids with salicylaldehyde and its derivatives. In: Russian Journal of General Chemistry, 2013, vol.83, nr.3, p.530-537.
 72. Harrison B. et al. A tetraploid intermediate precedes aneuploid formation in yeasts exposed to fluconazole. In: PLoS Biology , 2014, nr.12, p. e1001815.
 73. Havlickova B., Czaika V., Friedrich M. Epidemiological trends in skin mycoses worldwide. In: Mycoses, 2008, vol. 51 (Suppl. 4), p. 2–15.
 74. Healey K. et al. Sphingolipids Mediate Differential Echinocandin Susceptibility in *Candida albicans* and *Aspergillus nidulans*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2015, vol. 59(6), p.3377–3384.
 75. Hosseini S. et al. The Hypoglycemic Effect of *Juglans regia* Leaves Aqueous Extract in Diabetic Patients: A First Human Trial. In: Journal of Pharmaceutical Sciences, 2014, vol. 22(1),p. 19–23.
 76. Hosseinzadeh. H, Zarei H., Taghiabadi E. Antinociceptive, Anti-Inflammatory and Acute Toxicity Effects of *Juglans regia* L. Leaves in Mice. In: Iranian Red Crescent medical journal, 2011, vol. 13(1), p. 27–33.
 77. Husein A. et al. Isolation and antifungal evaluation of juglans regia l extracts. In: International Journal of Recent Research and Applied Studies, 2012, vol. 13(2), p. 665–670.

78. Iwaki T. et al. Multiple functions of ergosterol in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. In: Microbiology, 2008, nr.154, p. 830–841.
79. Ji Q. et al. Synthesis and biological evaluation of novel phosphoramidate derivatives of coumarin as chitin synthase inhibitors and antifungal agents. In: European Journal of Medicinal Chemistry, 2016, nr. 108, p.166–176.
80. Jill A., Gangneux J., Pappas P. Comparison between Liposomal Formulations of Amphotericin B. In: Medical Mycology, 2016, vol. 54(3), p. 223–31.
81. Jimenez-Ortigosa C. et al. Chitin synthases with a myosin motor-like domain control the resistance of *Aspergillus fumigatus* to echinocandins. In: Antimicrobial Agents Chemotherapy, 2012, nr. 56, p. 6121 – 6131.
82. Kanafani Z., Perfect J. Resistance to antifungal agents: mechanisms and clinical impact. In: Clinical Infect Diseases, 2008, nr. 46, p. 120-128.
83. Kathiravan M. et al. The biology and chemistry of antifungal agents: A review. In: Bioorganic & Medical Chemistry, 2012, nr. 20, p. 5678–5698.
84. Kauffman C., Pappas P., Sobel J. Essential of clinical mycology. Springer New York Dordrecht Heidelberg, London, 2011, 542 p.
85. Kinoshita H. et al. Cryptic antifungal compounds active by synergism with polyene antibiotics. In: Journal of Bioscience and Bioengineering, 2016, vol. 121(4), p. 394–398.
86. Kral K. et al. New monomeric and dimeric uridinyl derivatives as inhibitors of chitin synthase. In: Bioorganic Chemistry, 2015, nr. 61, p. 13–20.
87. Kshetrimayum M., Kant M. Antimicrobial activities of freshwater cyanobacterium, nostoc sp. From tamdil wetland of mizoram, india: an identification of bioactive compounds by gc-ms. In: International Journal Of Pharmaceutical Sciences And Research, 2016, vol.2(5), p.199–208.
88. Kumar Nigam P. Antifungal drugs and resistance: Current concepts. In: Current concepts. Our Dermatol Online, 2015, vol. 6(2), p. 212–221.
89. Kumar R., Anil M., Rangaswamy B. Synthesis, Characterization, Antimicrobial Activity, Antifungal Activity and DNA Cleavage Studies of Transition Metal Complexes with Schiff Base Ligand. In: International Journal of Innovative Research in Science, Engineering and Technology (An ISO Certified Organization), 2015, vol. 4(2), p. 60–66.
90. Kumar V. et al. Antifungal Activity of *Spirulina platensis* (Geitler) against Some Human Pathogenic Fungi. In: Vegetos - An International Journal of Plant Research, 2009, vol. 22(2), p. 83–89.
91. LaFayette S. et al. PKC signaling regulates drug resistance of the fungal pathogen *Candida*

- albicans* via circuitry comprised of Mkc1, calcineurin, and Hsp90. In: PLoS Pathogens, 2010, nr. 6, p.e1001069.
92. Latté K., Kolodziej H. Antifungal effects of hydrolysable tannins and related compounds on dermatophytes, mould fungi and yeasts. In: Zeitschrift fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences, 2000, vol. 55(5–6), p. 467–472.
 93. Lee K. et al. Elevated cell wall chitin in *Candida albicans* confers echinocandin resistance in vivo. In: Antimicrobial Agents Chemotherapy, 2012, nr. 56, p. 208 – 217.
 94. Lehrnbecher T. et al. Trends in the postmortem epidemiology of invasive infections at a university hospital. In: Journal of Infection, 2010, vol. 61(3), p. 259–265.
 95. Lewis R. Current concepts in antifungal pharmacology. In: Mayo Clinic proceedings. Mayo Clinic, 2011, vol. 86(8), p. 805–817.
 96. Li Y. et al. Synergistic activity of chloroquine with fluconazole against fluconazole-resistant isolates of *Candida species*. In: Antimicrobial agents and chemotherapy, 2015, vol. 59(2), p.1365–1369.
 97. Lila T. et al. Molecular basis for fungal selectivity of novel antimitotic compounds. In: Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2003, vol. 47(7), p. 2273–2282.
 98. Liu W. et al. Synergistic Antifungal Effect of Glabridin and Fluconazole , In: PLoS ONE, 2014, vol. 9(7), p.e103442.
 99. Loeffler J., Stevens D. Antifungal drug resistance. In: Clinical Infect Disease, 2003, vol.36(Suppl 1), p. 31–41.
 100. Mania D. et al. Screening for antifungal peptides and their modes of action in *Aspergillus nidulans*. In: Applied and environmental microbiology, 2010, vol. 76(21), p. 7102–7108.
 101. Marichal P. et al. Molecular biological characterization of an azole-resistant *Candida glabrata* isolate. In: Antimicrobial Agents Chemotherapy, 1997, nr. 41, p. 2229 – 2237.
 102. Markovich S. et al. Genomic approach to identification of mutations affecting caspofungin susceptibility in *Saccharomyces cerevisiae*. In: Antimicrobial Agents Chemotherapy, 2004, nr.48, p. 3871 – 3876.
 103. Mayer F., Wilson D., Hube B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. In: Virulence, 2013, vol. 4(2), p.119–128.
 104. MazuT. et al. The Mechanistic Targets of Antifungal Agents: An Overview. In: Mini-Reviews in Medical Chemistry, 2016, vol. 16(7), p.555–578.
 105. Miron D. et al. Antifungal activity and mechanism of action of monoterpenes against dermatophytes and yeasts. In: Revista Brasileira de Farmacognosia, 2014, vol. 24(6), p. 660–667.

106. Moraes De Souza M. et al. Assessment of the antifungal activity of spirulina platensis phenolic extract against *Aspergillus flavus*. In: Ciênc agrotec Lavras, 2011, vol. 35(6), p. 1050–1058.
107. Moselhy H. et al. A Specific, Accurate, and Sensitive Measure of Total Plasma Malondialdehyde by HPLC. In: Journal of lipid research, 2013, vol. 54(3), p. 852–858.
108. Muhsin T. et al. Effect of Garlic Bulb Extract on the Growth and Enzymatic Activities of Rhizosphere and Rhizoplane Fungi. In: Mycopathologia, 2001, vol. 152(3), p. 143–146.
109. Mukherjee P. et al. Mechanism of fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilms: Phase-specific role of efflux pumps and membrane sterols. In: Infections and Immunity, 2003, nr.71, p. 4333–4340.
110. Munro C. et al. The PKC, HOG and Ca²⁺ signalling pathways co-ordinately regulate chitin synthesis in *Candida albicans*. In: Molecular Microbiology, 2007, nr. 63, p. 1399 – 1413.
111. Negri M. et al. Early State Research on Antifungal Natural Products. In: Molecules, 2014, nr. 19, p. 2925–2956.
112. Nett J. et al. Role of Fks1p and matrix glucan in *Candida albicans* biofilm resistance to an echinocandin, pyrimidine, and polyene. In: Antimicrobial Agents Chemotherapy, 2010, nr.54, p. 3505–3508.
113. Noumi E. et al. Antifungal Properties of *Salvadora persica* and *Juglans regia* L. Extracts against Oral Candida Strains. In: European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 2010, vol. 29(1), p. 81–88.
114. Nour V., Trandafir I., Cosmulescu S. HPLC Determination of Phenolic Acids, Flavonoids and Juglone in Walnut Leaves. In: Journal of Chromatographic Science, 2013, vol. 51(9), p. 883–90.
115. Odds F., Brown F., Gow N. Antifungal agents: mechanisms of action. In: Trends Microbiology, 2003, vol. 11(6), p. 272–279.
116. Ogawa H. et al. Efficacy of itraconazole in the treatment of patients with chronic cough whose sputa yield basidiomycetous fungi-fungus-associated chronic cough (FACC). In: Journal of Asthma, 2009, vol. 46(4), p. 407–412.
117. **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, Chişinău, Moldova, march 25, 2016, p. 91.
118. **Oltu Iu.** Antifungal extracts from *Spirulina* biomass. În: International Scientific

- Conference on Microbial Biotechnology, 3-rd edition, Chişinău, Moldova, october 12-13, 2016, p.78.
119. **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. 9-14.
 120. Osborne C. et al. Amino acid substitution in *Trichophyton rubrum* squalene epoxidase associated with resistance to terbinafine. In: Antimicrobial Agents Chemotherapy, 2005, nr. 49, p. 2840-2844.
 121. Osborne C. et al. Biological, biochemical, and molecular characterization of a new clinical *Trichophyton rubrum* isolate resistant to terbinafine. In: Antimicrobial Agents Chemotherapy, 2006, nr. 50, p. 2234-2236.
 122. Pahontu E. et al. Antibacterial, Antifungal and *in vitro* Antileukaemia Activity of Metal Complexes with Thiosemicarbazones. In: Journal of Cellular and Molecular Medicine, 2015, vol. 19(4), p. 865 – 878.
 123. Palmieri B., Sblendorio V. Oxidative Stress Tests: Overview on Reliability and Use. In: European Review for Medical and Pharmacological Sciences, 2007, nr.11, p. 309–342.
 124. Pandian C., Palanivel R., Dhanasekaran S. Screening Antimicrobial Activity of Nickel Nanoparticles Synthesized Using Ocimum sanctum Leaf Extract. In: Journal of Nanoparticles, 2016, ID 4694367, 13p.
 125. Parks L., Casey W. Fungal sterols. In: R. Prasad and M. Ghannoum (ed.), Lipids of pathogenic fungi. CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla, 1996, p. 63–82.
 126. Pârvu M., Pârvu A. Antifungal Plant Extracts. In: Science Against Microbial Pathogens Communicating. In: Current Research And Technological Advances, 2011, p. 1055–1062.
 127. Pereira J. Et al. Bioactive properties and chemical composition of six walnut (*Juglans regia* L.) culti- vars. In: Food and Chemical Toxicology, 2008, nr. 46, p. 2103-2108.
 128. Pereira F., Moura Mendes F., Edeltrudes de Oliveira L. Investigation on Mechanism of Antifungal Activity of Eugenol against *Trichophyton rubrum*. In: Medical Mycology, 2013, nr. 51, p. 597–513.
 129. Pereira F. et al. Antifungal Activity of Geraniol and Citronellol, Two Monoterpenes Alcohols, against *Trichophyton rubrum* Involves Inhibition of Ergosterol Biosynthesis. In: Pharmaceutical Biology, 2015, vol. 53(2), p. 228–234.
 130. Perlin D. Echinocandin Resistance in *Candida*. In: Clinical Infectious Diseases, 2015, vol.61(suppl 6), p.S612–S617.
 131. Perlin D. Mechanisms of Echinocandin Antifungal Drug Resistance. In: Annals of the New York Academy of Sciences, 2015, vol. 1354(1), p. 1–11.

132. Persinoti G. et al. RNA-Sequencing Analysis of *Trichophyton rubrum* Transcriptome in Response to Sublethal Doses of Acriflavine. In: BMC Genomics, 2014, vol. 15(S7), p. 1–13.
133. Prasad R., Shah A., Rawal M. Antifungals: Mechanism of Action and Drug Resistance. In: Advances in experimental medicine and biology, 2016, p. 327–349.
134. Pugazhendhi A et al. Antifungal Activity of Cell Extract of *Spirulina platensis* against Aflatoxin Producing *Aspergillus species*. In: Journal of Current Microbiology and Applied Science, 2015, vol. 4(8), p. 1025–1029.
135. Qi J. et al. Metabolic engineering of an industrial polyoxin producer for the targeted overproduction of designer nucleoside antibiotics. In: Biotechnology and Bioengineering, 2015, vol. 112(9), p. 1865–1871.
136. Raja D., Bhuvanesh N., Natarajan K. Biological evaluation of a novel water soluble sulphur bridged binuclear copper(II) thiosemicarbazone complex. In: European Journal of Medicinal Chemistry, 2011, nr. 46, p. 4584–4594.
137. Ramage G. et al. Investigation of multidrug efflux pumps in relation to fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilms. In: Journal of Antimicrobials. Chemotherapy, 2002, nr. 49, p. 973–980.
138. Ramage G. et al. Our current understanding of fungal biofilms. In: Critical Reviews In Microbiology, 2009, nr. 35, p. 340–355.
139. Rath B., Pradhan D. Antidepressant Activity of *Juglans regia* L. fruit extract. In: Journal of Toxicology and Pharmacology, 2009, nr. 1, p. 24–26.
140. Rautemaa R., Ramage G. Oral candidosis—clinical challenges of a biofilm disease. In: Critical Reviews in Microbiology, 2011, nr. 37, p. 328–336.
141. Rawat D., Bhargava S. Bioactive Compounds from *Nostoc species*. In: Current Research in Pharmaceutical Sciences, 2011, nr. 02, p. 48–54.
142. Reinoso-Martin C. et al. The yeast protein kinase C cell integrity pathway mediates tolerance to the antifungal drug caspofungin through activation of Slt2p mitogen-activated protein kinase signaling. In: Eukaryotic cell, 2003, nr. 2, p. 1200 – 1210.
143. Rizzotto M. Metal Complexes as Antimicrobial Agents. In: A Search for Antibacterial Agents-InTech, 2012, p. 73–88.
144. Rocha E. et al. A phe389Leu substitution in ErgA confers terbinafine resistance in *Aspergillus fumigatus*. In: Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2006, nr. 50, p. 2533–2536.
145. Rodríguez-Leguizamón G. et al. New Echinocandin Susceptibility Patterns for Nosocomial *Candida albicans* in Bogotá, Colombia, in Ten Tertiary Care Centres: An Observational

- Study. In: BMC Infectious Diseases, 2015, vol. 15(108), p. 1–7.
146. Roemer T., Boone C. Systems-level antimicrobial drug and drug synergy discovery. In: Nature Chemical Biology, 2013, vol. 9(4), p. 222–231.
 147. Roemer T., Krysan D. Antifungal drug development: challenges, unmet clinical needs, and new approaches. In: Cold Spring Harbor perspectives in medicine, 2014, nr.5, p.a019703.
 148. Sanglard D., Coste A., Ferrari S. Antifungal drug resistance mechanisms in fungal pathogens from the perspective of transcriptional gene regulation. In: FEMS Yeast Research, 2009, nr. 9, p. 1029–1050.
 149. Selmecki A., Forche A., Berman J. Genomic plasticity of the human fungal pathogen *Candida albicans*. In: Eukaryot Cell, 2010, nr.9, p. 991 – 1008.
 150. Seneviratne C., Edvaldo A. Editorial: Antifungal Drug Discovery: New Theories and New Therapies. In: Frontiers in Microbiology, 2016. vol.7, p. 728.
 151. Seneviratne C et al. Cell density and cell aging as factors modulating antifungal resistance of *Candida albicans* biofilms. In: Antimicrobial Agents of Chemotherapy, 2008, nr. 52, p. 3259–3266.
 152. Shah T. et al. Anti-Proliferative, Cytotoxicity and Anti-Oxidant Activity of *Juglans regia* Extract. In: American Journal of Cancer Prevention, 2015, vol. 3(2), p. 45–50.
 153. Shaieb F., Issa A., Maragaa A. Antimicrobial activity of crude extracts of cyanobacteria *Nostoc commune* and *Spirulina platensis*. In: Archives of Biomedical Sciences, 2014, vol. 2 (2), p. 34-41.
 154. Shalaby E., Sanaa M. Comparison of DPPH and ABTS Assays for Determining Antioxidant Potential of Water and Methanol Extracts of *Spirulina platensis*. In: Indian Journal of Geo-Marine Sciences, 2013, vol. 42(5), p. 556–564.
 155. Shapiro R., Robbins N., Cowen L. Regulatory circuitry governing fungal development, drug resistance, and disease. In: Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2011, nr.75, p. 213 – 267.
 156. Shishido T. et al. Antifungal Compounds from Cyanobacteria. In: Marine Drugs, 2015, vol. 13(4), p. 2124–2140.
 157. Siikala E. et al. Persistent *Candida albicans* colonization and molecular mechanisms of azole resistance in autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy (APECED) patients. In: Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2010, nr. 65, p. 2505–2513.
 158. Silva P., Gonçalves S. Santos N. Defensins: Antifungal lessons from eukaryotes. In: Frontiers in Microbiology, 2014 , vol.5(MAR), p.97.

159. Singh P. et al. Clinical significance and molecular characterization of nonsporulating molds isolated from the respiratory tracts of bronchopulmonary mycosis patients with special reference to basidiomycetes. In: Journal of Clinical Microbiology, 2013, vol. 51(10), p. 3331–3337.
160. Singh Z. et al. Use of Malondialdehyde as a Biomarker for Assessing Oxidative Stress in Different Disease Pathologies: A Review. In: Iranian Journal of Public Health, 2014, vol. 43(3), p. 7–16.
161. Sionov E. et al. *Cryptococcus neoformans* overcomes stress of azole drugs by formation of disomy in specific multiple chromosomes. In: PLoS Pathogens, 2010, p.e1000848.
162. Siqueira Bento T. et al. Leaf Extracts of *Casearia sylvestris* and *Casearia decandra* Affect Growth and Production of Ligninolytic Enzymes in Wood Decay Basidiomycetes 1, In: Hoehnea, 2016, vol. 43(4), p. 575–581.
163. Spirlandeli A., Deminice R., Jordao A. Plasma Malondialdehyde as Biomarker of Lipid Peroxidation: Effects of Acute Exercise. In: International Journal of Sports Medicine 2014, vol.35(1), p. 14–18.
164. Steverding D. et al. In vitro antifungal activity of DNA topoisomerase inhibitors. In: Medical Mycology, 2012, vol. 50(3), p.333–336.
165. Sturtevant J. Translation elongation-3-like factors: are they rational antifungal targets? In: Expert opinion on therapeutic targets, 2002, vol.6(5), p. 545–553.
166. Subissi A. et al. Ciclopirox: recent nonclinical and clinical data relevant to its use as a topical antimycotic agent. In: Drugs, 2010, vol. 70(16), p.2133–2152.
167. Suganthi M. Antifungal agents and their action against dermatophytes: curious to know the facts. In: Journal of Innovations in Pharmaceutical and Biological Sciences, 2016. vol. 3(4), p. 73–77.
168. Sussman A. et al. Discovery of cercosporamide, a known antifungal natural product, as a selective Pkc1 kinase inhibitor through high-throughput screening. In: Eukaryot Cell, 2004, nr.3, p. 932 – 943.
169. Sytykiewicz H. et al. Antifungal Activity of *Juglans Regia* (L.) Leaf Extracts against *Candida albicans* Isolates. In: Polish Journal of Environmental Studies, 2015, vol. 24(3), p. 1339–1348.
170. Taha N., Al-Wadaan M. Utility and Importance of Walnut, *Juglans regia* Linn: A Review. In: African Journal of Microbiology Research, 2011, vol. 5(32), p. 5796–5805.
171. Thaipong K. et al. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC Assays for Estimating Antioxidant Activity from Guava Fruit Extracts. In: Journal of Food Composition and

- Analysis, 2006, nr. 19, p. 669–675.
172. Tirzitis G., Grzegorz B. Determination of Antiradical and Antioxidant Activity: Basic Principles and New Insights. In: Acta Biochimica Polonica, 2010, vol. 57(1), p. 139–142.
 173. Uniyal V. et al. Antifungal activity of essential oils and their volatile constituents against respiratory tract pathogens causing Aspergilloma and Aspergillosis by gaseous contact. In: Journal of Applied and Natural Science, 2012, vol. 4(1), p. 65–70.
 174. Uyisenga J et al. In Vitro Study of Antibacterial and Antifungal Activity of *Spirulina platensis*. In: International Journal of Ecology and Development. 2010, vol.16(2), p. 10S-15S.
 175. Rubalya V., Neelamegam P. Selective ABTS and DPPH- Radical Scavenging Activity of Peroxide from Vegetable Oils. In: International Food Research Journal, 2015, vol. 22(1), p. 289–294.
 176. Vandeputte P. et al. Antifungal resistance and new strategies to control fungal infections. In: Journal of Microbiology, 2012, ID 713687, 26 p. <http://dx.doi.org/10.1155/2012/713687>
 177. Vengurlekar, S., Sharma R., Trivedi P. Efficacy of some natural compounds as antifungal agents. In: Pharmacognosy reviews, 2012, vol. 6(12), p. 91–99.
 178. Vermes A., Guchelaar H., Dankert J. Flucytosine: a review of its pharmacology, clinical indications, pharmacokinetics, toxicity and drug interactions. In: Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2000, vol. 46(2), p.171–179.
 179. Vestola J. et al. Hassallidins, antifungal glycolipopeptides, are widespread among cyanobacteria and are the end-product of a nonribosomal pathway. In: Proceedings of the National of Academie of Science. USA, 2014, nr.111, p.1909–1917.
 180. Volk R., Franz H. Antialgal, Antibacterial and Antifungal Activity of Two Metabolites Produced and Excreted by Cyanobacteria during Growth. 2006, In: Microbiological Research, vol.161(2), p.180–186.
 181. Wächtler B. et al. From Attachment to Damage: Defined Genes of *Candida albicans* Mediate Adhesion, Invasion and Damage during Interaction with Oral Epithelial Cells C. Munro, In: PLoS ONE, 2011, vol. 6(2), p. e17046.
 182. Walker L. et al. Stimulation of chitin synthesis rescues *Candida albicans* from echinocandins. In: PLoS Pathogens, 2007, nr. 4, p. e1000040.
 183. Walker L., Gow N., Munro C. Elevated chitin content reduces the susceptibility of *Candida species* to caspofungin. In: Antimicrobial Agents of Chemotherapy, 2013, nr. 57, p. 146 – 154.
 184. Walker S. et al. Discovery of a novel class of orally active antifungal beta-1,3-D-glucan

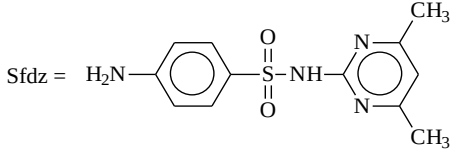
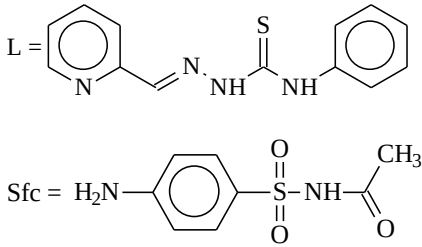
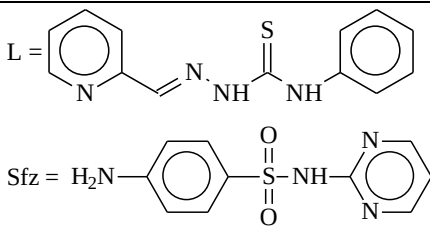
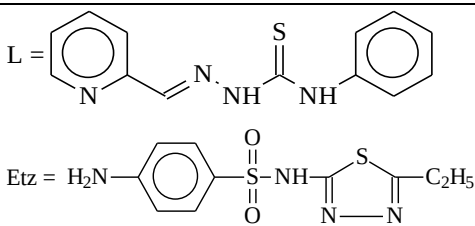
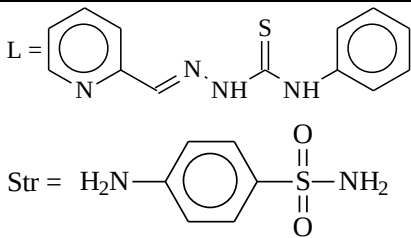
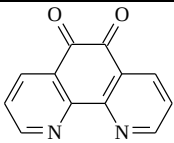
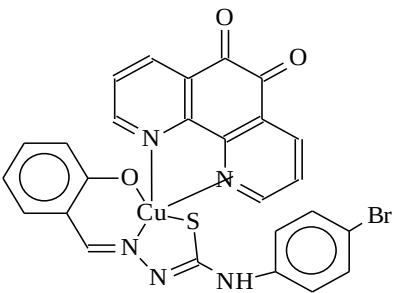
- synthase inhibitors. In: Antimicrobial Agents of Chemotherapy, 2011, vol. 55(11), p. 5099–5106.
185. Wang J. et al. Antifungal New Oxepine-Containing Alkaloids and Xanthones from the Deep-Sea-Derived Fungus *Aspergillus versicolor* SCSIO 05879. In: Journal Agriculture and Food Chemistry, 2016, vol. 64(14), p. 2910–2916.
 186. White T. Mechanisms of resistance to antifungal agents. In: Murray P.R. et al (Eds.). Manual of Clinical Microbiology, 9th Ed. ASM Press, Washington, DC, 2007, p. 1961–1971.
 187. Wiederhold N. Echinocandin Resistance in *Candida* Species: a Review of Recent Developments. In: Current Infectious Disease Reports, 2016, vol. 18(12), p. 42.
 188. Wong S., Samaranayake L., Seneviratne C. In pursuit of the ideal antifungal agent for *Candida* infections: high-throughput screening of small molecules. In: Drug Discovery. Today, 2014, nr.19, p. 1721–1730.
 189. Xu H. et al. Binding of pradimicin A derivative BMY-28864 to neoglycolipids bearing mannose residues at the non-reducing ends. In: BioScience Trends, 2008, vol. 2(3), p.101–104.
 190. Zatar N. Isolation and Antifungal Evaluation of *Juglans regia* L Extracts. In: International Journal of Recent Research and Applied Studies, 2012, vol. 13(2), p. 655–660.
 191. Zerbo P. et al. Antioxidant and antifungal profiles of phenol acid rich-fractions from *Sida urens* L. Against mycelia growth inhibition of some *Aspergillus* and *Fusarium* species. In: International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 2014, nr. 6, p. 174–178.
 192. Zhai B., Xiaorong L. Recent Progress on Antifungal Drug Development. In: Current pharmaceutical biotechnology, 2011, vol. 12(8), p. 1255–1262.
 193. Zida A. et al. Anti-*Candida albicans* natural products, sources of new antifungal drugs: A review. In: Journal de Mycologie Médicale, 2016, pii: S1156-5233(16), 30222-0. doi: 10.1016/j.mycmed.2016.10.002
 194. Zorofchian Moghadamtousi S. et al. A review on antibacterial, antiviral, and antifungal activity of curcumin. In: BioMed Research International, 2014, ID186864, 12 p. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/186864>

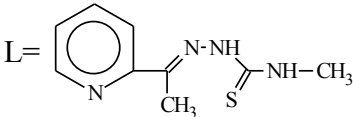
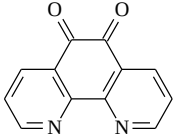
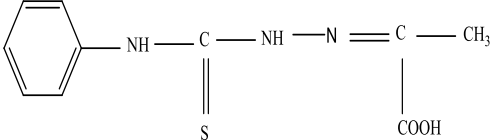
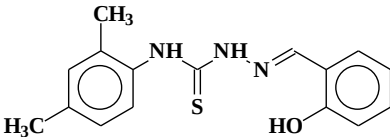
ANEXE

Anexa 1.
Structura compușilor chimici utilizați în cercetare

№	Cod	Compusul	Ligand	M, g/mol
Compușii coordinativi ai cuprului cu tiosemicarbazone substituite				
1	RGTM-25	Cu(L-H)Cl		306.5
2	RGTM-27	Cu(L-H)Cl		306.5
3	RGTM-28	Cu(L-H)NO ₃		347
4	RGTM-29	Cu(L-H)Cl		320.5
5	RGTM-37	Co(L-H) ₂ Cl		508.5
6	RGTM-44	Cu(L-H)Cl		365.5
16	RGTM-64	PhenO ₂		210
17	RGTM-76	4-BrFtsa + Cu(CH ₃ COO) ₂ + PhenO ₂		637

18	RGTM-81	$\text{Cu}(\text{L-H})\text{NO}_3$		409
19	RGTM-83	$\text{Cu}(\text{L-H})\text{Cl}$		382,5
21	RGMT-86	$[\text{Cu}(\text{Str})\text{L}_1] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$		430.5
Compuși coordinativi ai cuprului cu tiosemicarbazone substituie și sulfanilamide				
7	RGTM-51	$\text{Cu}(\text{Sfdz})(\text{L-H})\text{Cl}$		632,5
8	RGTM-52	$\text{Cu}(\text{Sfc})(\text{L-H})\text{Cl}$		568,5
9	RGTM-55	$\text{Cu}(\text{Str})(\text{L-H})\text{Cl}$		526,5
10	RGTM-56	$\text{Cu}(\text{Ns})(\text{L-H})\text{Cl}$		609,5
11	RGTM-57	$\text{Cu}(\text{Sfdz})(\text{L-H})\text{NO}_3$		659

				
12	RGTM-58	Cu(Sfc)(L-H) NO ₃		595
13	RGTM-59	Cu(Sfz)(L-H) NO ₃		631
14	RGTM-60	Cu(Etz)(L-H) NO ₃		665
15	RGTM-61	Cu(Str)(L-H) NO ₃		553
16	RGTM-64	PhenO ₂		210
17	RGTM-76	4-BrFtsa + Cu(CH ₃ COO) ₂ + PhenO ₂		637

Alți compuși				
5	RGTM-37	$\text{Co}(\text{L-H})_2\text{Cl}$	$\text{L} = $ 	508.5
16	RGTM-64	PhenO_2		210
20	RGMT-85	H_2L_2		237
22	BREV 1	[N-(2,4-dimetilfenil) tiosemicarbazonei 2-hidroxibenzaldehydei]		299



MD 4452 B1 2016.12.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **4452** (13) **B1**
(51) Int.Cl: *A61K 31/175* (2006.01)
A61P 31/10 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE

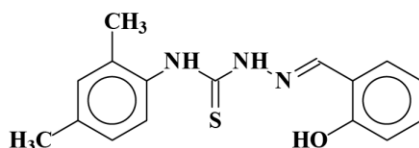
In termen de 6 luni de la data publicării mențiunii privind hotărârea de acordare a brevetului de invenție, orice persoană poate face opoziție la acordarea brevetului	
(21) Nr. depozit: a 2016 0020 (22) Data depozit: 2016.02.29	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2016.12.31, BOPI nr. 12/2016
(71) Solicitant: UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD (72) Inventatori: OLTU Iulian, MD; GUȚU Tatiana, MD; GULEA Aurelian, MD; ȚAPCOV Victor, MD (73) Titular: UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD	

(54) Utilizarea N-(2,4-dimetilfenil)-2-(2-hidroxibenziliden)-hidrazincarbotoamiei în calitate de inhibitor al proliferării fungilor din specia *Candida albicans*

(57) Rezumat:

Invenția se referă la chimie și medicină, și anume la utilizarea compusului organic biologic activ din clasa tiosemicarbazonelor, care manifestă o activitate bacteriostatică și bactericidă înaltă față de *Candida albicans* și poate găsi aplicare în medicină și veterinarie la profilaxia și tratarea micozelor.

Esența invenției constă în utilizarea în calitate de inhibitor al proliferării fungilor din specia *Candida albicans* a N-(2,4-dimetilfenil)-2-(2-hidroxibenziliden)-hidrazincarbotoamiei cu formula :



Totodată, tiosemicarbazona menționată manifestă în același timp o activitate antimicrobiană bacteriostatică de 2 ori mai înaltă față de *Staphylococcus aureus* și de 4...17 ori mai înaltă față de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* și *Pseudomonas aeruginosa* comparativ cu compusul de referință metil N'-[(2-hidroxinaftalen-1-il)metiliden]-N-(prop-2-en-1-il)-hidrazincarbimidotioat.

Revendicări: 1

MD 4452 B1 2016.12.31



ASSOCIATION OF POLISH INVENTORS AND RATIONALIZERS
WARSAW UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

PATENT OFFICE
OF THE REPUBLIC OF POLAND



INTERNATIONAL WARSAW
INVENTION SHOW
IWIS 2016



SILVER
MEDAL

FOR

A. GULEA, IU, OLTU, V. GRAUR, E. ZARICIUC, V. TAPCOV, V. GUDUMAC

FROM

ACADEMY OF SCIENCES OF R. MOLDOVA
MOLDOVA

FOR THE INVENTION
NEW ANTIFUNGAL INHIBITOR



THE PRESIDENT OF JURY

PROF. MICHAŁ SZOTA

WARSAW, 10-12TH OF OCTOBER 2016

DIPLÔME



SALON INTERNATIONAL DES INVENTIONS GENÈVE

Après examen, le Jury International a décidé

de remettre à: **Gulea A., Oltu Iu., Gutu Tatiana., Tapcov V.**

pour l'invention: **N-(2,4-diméthylphényl)-2-carbothiamide de la benziliden-Hydrazine (2-hydroxy) comme inhibiteur de champignon.**



MÉDAILLE D'ARGENT
SILVER MEDAL
SILBERMEDAILLE

Genève, le 15 avril 2016



Le Président du Jury: David Tajj



Le Président du Salon: Jean-Luc Vincent

BELGIUM
INNOVATION AWARDS

Labor Improdus Omnia Vincit



Innovation Award

After an analysis of the applicant's file, The High Commission
of the Invention Award hereby presents

Iulian Oltu

With the diploma of

Chevalier

Number of the cross : 15007

Brussels, 20th November 2015

A member of the Commission



President



40TH INTERNATIONAL INVENTION SHOW
11TH INVENTION AND PROTOTYPE SHOW AND STUDENT
BUSINESS PLAN COMPETITION

Silver

GULEA AURELIAN, LOZAN-TIRSHU
C., OLTU IU., ZARICIUC E., TAPCOV
VICTOR, GUDUMAC VALENTIN
REPUBLIC OF MOLDOVA

NEW ANTIFUNGAL INHIBITORS

KARLOVAC, CROATIA, 05.-07. November 2015.



Međunarodni ocjenjivački sud
International Jury
Predsjednik/President
MScBA Andrej Škrinjar, univ.dipl.ing.stroj.

Andrej Škrinjar

Hrvatski savez inovatora
Croatian Inventors Association
Predsjednica/President
Ljiljana Pedišić, mag.ing.cheming.

Ljiljana Pedišić

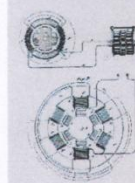
F. VRANCIC



E.S. PENKALA



I. VUCETIC



N. TESLA

DECLARAȚIA PRIVIND ASUMAREA RĂSPUNDERII

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

OLTU Iulian



Data: 07 aprilie 2017

CURRICULUM VITAE



OLTU IULIAN

Cetățenia
Studii

Republica Moldova

Superioare (1986-1995), USMF „N. Testemițanu”, Chișinău, medicină generală, diploma de studii superioare E003673

Domeniile de interes științific

Microbiologie medicală, biologia fungilor patogeni, preparate antifungice; Dermatologie; maladii comunicabile

Participări la proiecte

Programul Național HIV/SIDA și ITS (2016-2020), director de program

Participări la foruri 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;
 - Saloanele Internaționale de invenție:
INOVA-Budi Uzor, Karlovac, Croația, 2015;
INNOVA, Brussels, 2015;
PALEXPO, Geneva, 2016;
IWIS, Warșovia, 2016.
 - Conferința ”Zilele Gh.Năstase”, Iași, ediția XX, 2014; ediția XXII-a, 2016;
 - Conferința de Dermatologie convocată prin Dispoziția Ministerului Sănătății, RM, Chișinău 2015;
 - Conferința științifico-practică a medicilor dermatovenerologi ”Evaluarea situației epidemiologice prin sifilis, infecție gonococică și boli contagioase de piele și aprobarea activităților de redresare. Abordarea etiopatogenetică contemporană și principii de tratament în Rozacee”, Chișinău, 2015;
 - Conferința a 14-a europeană SIDA, Brussels, 2013;
- 12 publicații științifice: 4 articole științifice, 3 rezumate ale comunicărilor științifice, 4 materiale la saloane de invenții, 1 brevet de invenție
- Diploma de gradul întâi, semnată de Prim-ministru P.Filip, pentru activitate prodigioasă în domeniul dermatovenerologiei, contribuție personală la dezvoltarea procesului științifico-practic de investigare, tratament și eliminarea sifilisului congenital în RM.
- Română (maternă), franceză (fluent), rusa (fluent)
- Spitalul de Dermatologie și Maladii Comunicabile IMSP**
mun. Chișinău, or. Codru, str. Costiujeni 5/1, Tel.: 022794211
Mob.079443182

Lucrări științifice publicate
Mențiuni

Cunoașterea limbilor
Date de contact