

Școala doctorală în domeniul Științe medicale

Cu titlu de manuscris

CZU: 615.281:616-002.44(043.2)

BĂLAN Greta

**COMPUȘI NOI CU ACȚIUNE ASUPRA MICROORGANISMELOR
IZOLATE DIN ULCERE TROFICE**

313.02 – MICROBIOLOGIE, VIRUSOLOGIE MEDICALĂ

Rezumatul tezei de doctor habilitat în științe medicale

Chișinău, 2022

Teza a fost elaborată în cadrul Departamentului Medicină Preventivă, Disciplina de microbiologie și imunologie.

Consultanți științifici:

Rudic Valeriu, dr. hab. șt. biol., prof. univ., academician, Om Emerit

Gulea Aurelian, dr. hab. șt. chim., prof. univ., academician, Om Emerit

Referenți oficiali:

Bălășoiu Maria, dr. șt. med., profesor universitar (Craiova, România)

Gudumac Valentin, dr. hab. șt. med., prof. univ.

Roșcin Iurie, dr. hab. șt. med., prof. univ.

Componenta Comisiei de susținere publică:

Spînu Constantin președinte, dr. hab. șt. med., prof. univ., Om Emerit

Holban Tiberiu dr. hab. șt. med., prof. univ.

Azoicăi Doina dr. șt. med., prof. univ. (Iași, România)

Ghinda Serghei dr. hab. șt. med., prof. cercet.

Rojnoveanu Gheorghe dr. hab. șt. med., prof. univ.

Spinei Larisa dr. hab. șt. med., prof. univ.

Friptuleac Grigore dr. hab. șt. med., prof. univ.

Diug Eugen dr. hab. șt. farm., prof. univ.

Susținerea va avea loc la 05. 07. 2022, ora 14.00 în incinta USMF „Nicolae Testemițanu”, bd. Ștefan cel Mare și Sfânt, 165, biroul 205 în ședința Comisiei de susținere publică a tezei de doctorat, aprobată prin Decizia Senatului nr. 5/7 din 24. 05. 2022 al IP Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”.

Teza de doctor habilitat și rezumatul pot fi consultate la biblioteca IP Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu” și la pagina web a ANACEC (www.cnaa.md).

Rezumatul a fost expediat la 03. 06. 2022

Secretar științific al Comisiei de susținere publică:

Guțu Luminița, dr. șt. med., conf. univ.

Consultanți științifici:

Rudic Valeriu, dr. hab. șt. biol., prof. univ., academician, Om Emerit

Gulea Aurelian, dr. hab. șt. chim., prof. univ., academician, Om Emerit

Autor

Bălan Greta

© Bălan Greta, 2022

CUPRINS

LISTA ABREVIERILOR	4
REPERELE CONCEPTUALE ALE LUCRĂRII	5
1. STADIUL ACTUAL AL CERCETĂRII ÎN DEZVOLTAREA ANTIMICROBIENELOR ȘI STRATEGII NOI ÎN TERAPIA ULCERULUI TROFIC	12
2. MATERIALE ȘI METODE DE CERCETARE	13
3. DIVERSITATEA SPECIILOR, REZISTENȚA LA ANTIMICROBIENE ȘI FACTORI DE PATOGENITATE A TULPINILOR IZOLATE DIN ULCERE TROFICE	16
3.1. Evaluarea spectrului și ponderii microorganismelor asociate ulcerului trofic	16
3.2. Rezistență la antibiotice a tulpinilor izolate din ulcere trofice	17
3.3. Evaluarea factorilor de patogenitate a tulpinilor microbiene izolate din ulcere trofice	19
4. ACTIVITATEA ANTIMICROBIANĂ A COMPUȘILOR NOI DE ORIGINE CHIMICĂ ȘI BIOLOGICĂ	25
4.1. Rezultatele evaluării activității antimicrobiene a substanțelor chimice și biologice noi	25
4.2. Activitatea antimicrobiană a compușilor chimici și biologici asupra tulpinilor izolate din ulcere trofice	28
4.3. Acțiunea sinergică a compușilor chimici și biologici noi	29
4.4. Influența compușilor noi asupra factorilor de patogenitate a microorganismelor	33
5. MODIFICĂRI ALE UNOR PARAMETRI BIOCHIMICI AI MICROORGANISMELOR INDUSE DE COMPUȘII CHIMICI ȘI BIOLOGICI NOI	39
5.1. Modificarea indicatorilor stresului oxidativ în culturile de microorganisme sub influența compușilor chimici și biologici noi	39
5.2. Modificarea capacității antioxidante a culturilor de microorganisme sub influența compușilor chimici și biologici noi	42
6. INFLUENȚA COMPUȘILOR BIOLOGIC ACTIVI ASUPRA MARKERILOR STRESULUI OXIDATIV, SISTEMULUI ANTIOXIDANT ȘI PATTERN-ULUI INFLAMATOR	46
CONCLUZII GENERALE	48
RECOMANDĂRI PRACTICE	50
BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ	50
LISTA PUBLICAȚIILOR LA TEMA TEZEI	53
ADNOTARE	61
SUMMARY	62
АННОТАЦИЯ	63

LISTA ABREVIERILOR

AAL	Activitate antilizozim
AAT	Activitatea antioxidantă totală
ADN	Acidul dezoxiribonucleic
ATCC	American Type Culture Collection
BGN	Bacili gramnegativi
BLSE	Beta lactamaze cu spectrul extins
CECT	Spanish Type Culture Collection
CM	Clindamicină
CMB	Concentrația Minimă Bactericidă
CMI	Concentrația Minimă Inhibitorie
CMF	Concentrația Minimă Fungicidă
CT	Catalaza
CV	Curriculum vitae
DAM	Dialdehida malonică
DO	Densitate optică
E	Eritromicină
FIC	Fraction inhibitory concentration
IL	Interleukina
IMSP	Instituția Medico-Sanitară Publică
GPO	Glutation peroxidaza
GR	Glutation reductaza
GST	Glutation S transferaza
LDH	Lactat dehidrogenaza
MDR	Tulpini multirezistente
MLS_B	Macrolide-lincozamide-streptogramine B
MRS	<i>Staphylococcus</i> spp. meticilin-rezistent
MSB	Macrolide-streptogramine B
MSS	<i>Staphylococcus</i> spp. sensibil la meticilină
OMS	Organizația Mondială a Sănătății
PPOA	Produse proteice de oxidare avansată
RAM	Rezistența la antimicrobiene
SOD	Superoxid dismutaza
SCN	Stafilococi coagulazo-negativi
TNF	Factorul de necroză tumorală
XDR	Tulpini cu rezistență extinsă

REPERELE CONCEPTUALE ALE LUCRĂRII

Actualitatea temei și importanța problemei abordate. Una dintre cele mai mari realizări ale omenirii din istoria recentă este descoperirea și producerea penicilinei, care a contribuit la schimbarea calității vieții, la reducerea mortalității și la creșterea speranței de viață. Această descoperire epocală a stat la baza cercetărilor de dezvoltare a noi preparate antimicrobiene. Cu părere de rău, de la sfârșitul anilor 60 ai sec. al XX-lea nu au mai fost dezvoltate molecule antimicrobiene cu mecanisme de acțiune noi. Ultima clasă de antimicrobiene a fost descoperită în 1968, ceea ce a făcut ca majoritatea preparatelor antimicrobiene, folosite în această perioadă, să fie versiuni modificate ale celor descoperite anterior [26, 28].

Reducerea dramatică a numărului de agenți antimicrobieni noi de pe piața farmaceutică este determinată de creșterea costurilor pentru cercetarea și dezvoltarea acestor preparate precum și de rentabilitatea scăzută [4].

În pofida progreselor obținute în medicina modernă, microorganismele continuă să reprezinte una dintre cele mai mari provocări pentru sănătate. Una dintre cauze este dezvoltarea rezistenței microorganismelor la antimicrobiene, ceea ce nu le permite să-și exercite acțiunea. Rezistența la antimicrobiene (RAM) este un fenomen natural, cauzat de mutații în genele bacteriilor, iar utilizarea excesivă și nejustificată a antimicrobienelor accelerează apariția și răspândirea bacteriilor rezistente la aceste preparate. Devenind o problemă serioasă de sănătate publică pe întreg mapamondul, RAM impune o povară economică semnificativă asupra sectorului de sănătate [6,41].

Pentru soluționarea acestei probleme sunt necesare nu numai descoperirea de noi antimicrobiene, dar și dezvoltarea de noi abordări alternative. Dezvoltarea de metode alternative de tratament este considerată de Organizația Mondială a Sănătății (OMS) o provocare cu care se confruntă comunitatea medicală [3, 44].

Studiile sinergiei compușilor combinați denotă oportunități în lupta cu agenții patogeni rezistenți la antimicrobiene. În ultimii ani, cercetătorii experimentează combinarea antimicrobienelor sintetice cu compușii biologici. Cercetările au arătat că în cazul pacienților cu infecții grave, terapia combinată sau sinergică împotriva microorganismelor rezistente este o nouă modalitate de tratare a bolilor infecțioase și, probabil, de perspectivă pentru cercetările ulterioare [40].

Conform datelor din literatura de specialitate, interesul pentru cercetarea interacțiunii sinergice dintre extractele de plante și antimicrobienele cu potențial de dezvoltare a rezistenței a sporit semnificativ. Mai mulți cercetători au constatat că extractele brute de diferite plante, fiind folosite în combinație cu unele antimicrobiene, au scăzut semnificativ valorile concentrației minime inhibitorii (CMI) împotriva tulpinilor multirezistente [25].

Ulcerul trofic reprezintă o problemă majoră de sănătate ca urmare a incidenței înalte și a impactului socio-economic semnificativ, generat de afectarea abilității pacientului de a realiza activități (sociale, ocupaționale), de diminuarea calității vieții și de constrângerile financiare [2]. La nivel global, impactul dramatic al ulcerului trofic este determinat de creșterea cheltuielilor pentru îngrijiri medicale, ca urmare a spitalizărilor frecvente și de durată, a invalidității și a pensionării

premature. În Europa de Vest, pentru această patologie, din bugetul pentru sănătate, sunt alocate anual 1-2,6% [18, 34].

Datele din literatura de specialitate despre incidența ulcerului trofic al extremităților inferioare, denotă că cca 70% sunt cauzate de patologii ale circulației venoase, cum ar fi dilatarea varicoasă a venelor, de care suferă aproximativ 1% din populația generală, 3% din vârstnicii de peste 60 de ani și 5% dintre cei trecuți de 80 de ani [27, 33]. Studii realizate în China au adus dovezi că factorul etiologic primordial în dezvoltarea ulcerelor trofice sunt traumele sau plăgile traumatice infectate, înregistrate la cca 67% dintre bolnavi [1]. Un alt factor este ateroscleroza obliterantă, cea mai importantă cauză a bolii arteriale obstructive a extremităților după vârsta de 30 de ani, atestată în cca 8% din cazuri [17]. Diabetul zaharat este responsabil de cca 3% din defectele de la nivelul tegumentelor. Printre alte cauze pot fi tromboza, diverse traumatisme, tulburări de inervație etc. [12, 13].

În literatura de specialitate, prevalența ulcerului trofic în comunitate variază de la 1,9% până la 13,1% [21]. Sasanka S. Chatterjee indică drept cauze ale creșterii incidenței ulcerelor îmbătrânirea populației și multitudinea factorilor de risc precum fumatul, obezitatea, diabetul zaharat etc. [32]. Conform estimărilor, până la 25% dintre bolnavii cu diabet zaharat vor dezvolta ulcere trofice ale membrelor inferioare care, în marea majoritate, se vor infecta, iar fiecare al cincilea bolnav va necesita amputarea membrului [36]. Cercetările în domeniu au apreciat că aproximativ 10% din populație va dezvolta un ulcer trofic, dintre care 2,5% vor deceda de pe urma acestei afecțiuni [23].

Una dintre cele mai frecvente complicații ale ulcerului trofic este asocierea infecției microbiene, generată în 40-75% din cazuri de flora bacteriană mixtă. Spectrul etiologic al microorganismelor, implicate în infecția ulcerelor trofice, este divers, cu predominarea speciei *Staphylococcus aureus*, urmată de reprezentanți ai familiei *Enterobacteriaceae* și specia *Pseudomonas aeruginosa*. Mai rar sunt izolați streptococi α sau β -hemolitici și bacterii anaerobe, mai ales din genurile *Clostridium* și *Bacteroides* [16]. În pofida faptului că unele dintre aceste bacterii nu sunt patogene, asocierea lor multiplă determină o colonizare critică a ulcerelor trofice și încetinirea vindecării lor [43].

Ulcerele trofice cronice sunt predispuse la infecții bacteriene, în special cele venoase, ca urmare a hipoxiei tisulare, influențând astfel acțiunea leucocitelor asupra bacteriilor prin reducerea „stresului oxidativ” [36]. Comparativ cu plăgile obișnuite, vindecarea ulcerelor trofice se stopează în faza inflamatorie și nu progresează din cauza anumitor factori precum vârsta, asocierea infecției, ischemiei, diabetului zaharat, stărilor neoplazice, malnutriției etc.

Evoluția ulcerelor trofice este influențată de microorganisme în mod diferit. Una dintre cele mai nefavorabile evoluții este persistența răspunsului inflamator, cu secreția de toxine și de enzime, care distrug factorii de regenerare, împiedicând vindecarea prin dezvoltarea unui țesut cu aspect de pseudoescară [38].

Vindecarea ulcerului trofic infectat este influențată și de dezvoltarea biofilmului microbial, ceea ce determină rezistență la răspunsul imun al gazdei și la acțiunea preparatelor antimicrobiene, declanșând un răspuns inflamator. Drept

urmare, ulcerul trofic infectat este antrenat într-o inflamație prelungită care determină secreția de citokine și de proteaze, cu degradarea țesutului.

Microorganismele izolate din ulcere trofice dispun atât de mecanisme de rezistență la antimicrobiene, cât și de factori de patogenitate, responsabili de inițierea unor complicații, soldate cu eșecuri terapeutice. Astfel, majoritatea antimicrobienuelor existente nu inhibă unii factori de patogenitate, cum ar fi formarea biofilmelor, în special de tulpini rezistente. Pentru a depăși această problemă, multe studii recomandă studiarea efectului antibiofilm al unor compuși de origine naturală (ex. animalieră, vegetală, fungică, bacteriană etc) sau sintetică. Astfel, problema rezistenței la antimicrobiene și a factorilor de patogenitate ai microorganismelor, implicate în ulcere trofice, a condiționat dezvoltarea de noi strategii terapeutice [31, 35].

În ultimele decenii, un domeniu de actualitate al cercetărilor farmaceutice sunt terapiile alternative noi. Acestea utilizează medicamente ce conțin principii active de proveniență naturală, combinate cu cele de origine sintetică [37].

Realizarea unui studiu original și complex privind efectul antimicrobian al preparatelor combinate și valorificarea acestora în vederea dezvoltării unor noi forme farmaceutice, pune în evidență importanța, noutatea și actualitatea prezentei cercetări.

Scopul studiului: Evaluarea activității antimicrobiene a unor compuși noi în vederea formulării principiilor de elaborare a preparatelor policomponente, eficiente în tratamentul ulcerului trofic infectat.

Obiectivele cercetării:

1. Determinarea spectrului de microorganisme izolate din ulcere trofice infectate.
2. Elucidarea fenotipurilor de rezistență la antimicrobiene și a factorilor de patogenitate a tulpinilor de microorganisme, izolate din ulcere trofice.
3. Determinarea activității antimicrobiene a unor entități chimice și biologice noi față de tulpinile microbiene de referință și clinice.
4. Studiarea acțiunii sinergice a substanțelor chimice și biologice, și a posibilităților de obținere a compușilor policompenenți cu acțiune antimicrobiană.
5. Determinarea influenței compușilor noi monocompenenți și în combinație asupra expresiei unor factori de patogenitate ai microorganismelor.
6. Evaluarea modificărilor unor parametri biochimici ai culturilor bacteriene sub influența compușilor monocompenenți și în combinație.
7. Influența compușilor biologic activi asupra markerilor stresului oxidativ, sistemului antioxidant și pattern-ului inflamator pentru obținerea de potențiale preparate medicamentoase.

Ipoteza de cercetare. Rezultatele celor mai recente cercetări în domeniul microbiologiei indică tot mai frecvent la eșecuri terapeutice în utilizarea antimicrobienuelor de ultimă intenție. Pentru a contracara această amenințare la adresa pacienților, inclusiv a celor cu ulcer trofic infectat, sunt necesare noi opțiuni de tratament. Indispensabile în acest scop sunt studiile despre activitatea antimicrobiană a unor compuși noi de origine biologică și chimică, cu evaluarea

efectului sinergic al preparatelor policomponente, eficiente împotriva microorganismelor izolate din ulcerul trofic infectat. Preparatele antimicrobiene sunt esențiale în medicina modernă, iar apariția tulpinilor rezistente față de acestea este un fenomen inevitabil care va duce la scăderea eficacității lor și la retragerea din uz. Pentru prevenirea acestor efecte negative este necesară elaborarea de preparate antimicrobiene noi. În trecutul apropiat, preparatele antimicrobiene noi erau de origine naturală sau de sinteză, iar în ultimii ani accentul se pune pe combinarea preparatelor cu efect antimicrobian de origine diferită. Această asociere permite interacțiunea sinergică între compușii biologici și chimici, care s-a dovedit a fi cea mai eficientă metodă de combatere a rezistenței la antibacteriene. Prin urmare, capacitatea compușilor biologici de a „re-utiliza” antimicrobienele existente în tratamentul patologiei infecțioase poate avea un impact semnificativ asupra combaterii microorganismelor rezistente. Screening-ul și identificarea de noi compuși chimici și biologici cu proprietăți antimicrobiene poate sta la baza obținerii unor noi preparate, active asupra tulpinilor rezistente. În pofida datelor disponibile, pentru a demonstra efectul antimicrobian al preparatelor combinate, sunt necesare studii suplimentare cu stabilirea acțiunii sinergice și formularea principiilor de elaborare a preparatelor policomponente eficiente în tratamentul ulcerului trofic.

Sinteza metodologiei de cercetare științifică și justificarea metodelor de cercetare alese. Studiul a fost realizat în cadrul Departamentului Medicină Preventivă, Disciplina de microbiologie și imunologie, în Laboratorul de biochimie al Universității de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”, în Laboratorul Ficobiotehologic din cadrul Institutului de Microbiologie și Biotehologie al Academiei de Științe a Moldovei și în Laboratorul microbiologic al Agenției Naționale pentru Sănătate Publică.

Pentru demonstrarea ipotezei de cercetare au fost utilizate metode specifice pentru fiecare obiectiv, validate la nivel național și internațional.

Studiul a fost efectuat în câteva etape și a constatat în: determinarea spectrului de microorganisme cu evaluarea fenotipurilor de rezistență la antimicrobiene și a factorilor de patogenitate ai tulpinilor izolate din ulcere trofice infectate; determinarea acțiunii antimicrobiene (CMI și CMB) a compușilor chimici și biologici asupra tulpinilor de referință și a celor clinice izolate din ulcere trofice; determinarea acțiunii sinergice a substanțelor monocomponente de origine chimică și biologică, precum și a posibilităților de obținere a compușilor policompenți cu acțiune antimicrobiană; determinarea influenței compușilor noi asupra expresiei unor factori de patogenitate a microorganismelor; stabilirea modificărilor unor parametri biochimici ai microorganismelor sub acțiunea compușilor chimici și biologici; determinarea efectului imunomodulator al compușilor evidențiați.

În conformitate cu scopul și obiectivele trasate, au fost aplicate metode clasice și moderne de studiu, inclusiv: metode microbiologice de stabilire a spectrului etiologic al ulcerelor trofice infectate, a fenotipurilor de rezistență la antimicrobiene și a factorilor de patogenitate ai tulpinilor studiate; determinarea acțiunii compușilor noi asupra microorganismelor și a expresiei unor factori de patogenitate; metode biochimice și imunochimice pentru determinarea acțiunii compușilor noi asupra

producerii spontane a indicilor biochimici și imunochimici, precum și modificărilor unor parametri biochimici ai microorganismelor sub acțiunea compușilor chimici și biologici; metode statistice de analiză cantitativă și calitativă a rezultatelor.

Noutatea și originalitatea științifică a rezultatelor obținute. În premieră, în baza unui studiu, a fost evaluată acțiunea antimicrobiană, antioxidantă și imunomodulatoare a unor compuși noi, determinat spectrul microorganismelor implicate în ulcere trofice infectate și stabilită acțiunea compușilor noi asupra factorilor de patogenitate ai agenților microbieni.

Rezultatele obținute au permis elaborarea și implementarea ghidului privind managementul ulcerului trofic infectat ce va permite standardizarea metodologiei de diagnostic și stabilirea în timp util a agentului etiologic, cu indicarea tratamentului țintit și evitarea eșecului terapeutic și a dezvoltării rezistenței la antimicrobiene.

Valorile potențialului antimicrobian, antipatogenic, imunomodulator și antioxidant ale compușilor luați în studiu, sugerează necesitatea continuării cercetărilor în vederea elaborării unor strategii antiinfecțioase alternative și a dezvoltării unor noi compuși policomponenți, generând nu doar o utilizare empirică, ci și una bazată pe dovezi științifice privind proprietățile lor terapeutice.

Datele obținute în prezenta cercetare au fost utilizate la elaborarea a nouă brevete de invenție.

În lucrare au fost folosite unele rezultate acumulate la realizarea unor proiecte de cercetare naționale și internaționale:

20.80009.8007.09 Studierea rezistenței bacililor gramnegativi la antimicrobiene în vederea fortificării sistemului național de supraveghere și control al bolilor transmisibile (2020-2023).

AUF-MECR 2020-2021 Synthese et caracterisations de nouveaux complexes de coordination pour des applications biologiques (2020-2021).

18.51.07.01A/PS Diminuarea contaminării materiei prime și produselor alimentare cu microorganisme patogene (2018-2019).

09.816.09.05A Compuși cu proprietăți antimicrobiene și antifungice concomitente (2009-2010).

Problema științifică soluționată în teză constă în fundamentarea științifică a acțiunii unor compuși chimici și biologici noi asupra microorganismelor izolate din ulcere trofice infectate. Soluționarea acestei probleme contribuie la formularea principiilor de dezvoltare a preparatelor policomponente, eficiente în tratamentul ulcerului trofic infectat, și la elaborarea unor strategii alternative antiinfecțioase în scopul evitării eșecurilor terapeutice și a dezvoltării rezistenței microorganismelor la antimicrobiene.

Semnificația teoretică și valoarea aplicativă a studiului. Rezultatele cercetării completează studiile anterioare privind efectul compușilor chimici și biologici asupra tulpinilor de referință și a tulpinilor clinice izolate din ulcerele trofice, și acțiunea sinergică a acestor compuși, cu identificarea combinațiilor de compuși care potențează efectul antimicrobian.

În urma studiului au fost acumulate date despre influența compușilor noi asupra expresiei factorilor enzimatici de patogenitate și a factorilor de persistență ai microorganismelor.

Rezultatele obținute au permis evidențierea efectului imunomodulator al compușilor chimici și biologici, aparte și în combinație, prin determinarea acțiunii lor asupra producerii spontane a indicilor biochimici și imunochimici.

Pe baza datelor acumulate în prezentul studiu a fost elaborat un algoritm standardizat de diagnostic al agentului etiologic, a mecanismelor de rezistență la antimicrobiene și a factorilor de patogenitate a microorganismelor asociate cu ulcerul trofic.

Datele despre pattern-urile de rezistență la antibiotice ale microorganismelor, asociate cu ulcerul trofic infectat, vor servi ca argument pentru reactualizarea listei de antimicrobiene, procurarea argumentată a acestora și elaborarea măsurilor coerente de control.

Rezultatele cercetării acțiunii particulare a unor compuși de origine chimică și biologică și a acțiunii sinergice a compușilor combinați sunt dovezi științifice ce pot fi utilizate ca modele structurale pentru obținerea de agenți terapeutici antimicrobieni noi policomponenți, lipsiți de efecte adverse majore, și în alte cercetări inițiate în cadrul disciplinei.

Rezultatele științifice de esență prezentate spre susținere:

1. Diversitatea speciilor de microorganisme asociate ulcerelor trofice infectate.
2. Factorii de patogenitate relevanți în persistența tulpinilor microbiene izolate din ulcere trofice infectate.
3. Caracteristica sensibilității la antimicrobiene a izolatelor, cu elucidarea mecanismelor de rezistență la patogenii multirezistenți.
4. Estimarea activității antimicrobiene a unor entități chimice și biologice asupra tulpinilor de referință și clinice.
5. Evaluarea acțiunii sinergice a compușilor chimici și biologici, și a timpului de omorâre a microorganismelor.
6. Fundamentarea științifică a acțiunii compușilor monocomponenți și în combinație asupra expresiei factorilor de patogenitate a microorganismelor asociate ulcerului trofic.
7. Aprecierea valorii parametrilor biochimici ai microorganismelor sub influența compușilor monocomponenți și în combinație.
8. Furnizarea de dovezi relevante a acțiunii compușilor biologic activi asupra markerilor stresului oxidativ, sistemului antioxidant, pattern-ului inflamator în vederea formulării principiilor de elaborare a preparatelor antimicrobiene eficiente în terapia ulcerului trofic infectat.

Implementarea rezultatelor științifice. Rezultatele studiului au fost implementate în activitatea Laboratorului microbiologic al IMSP Spitalul Clinic Republican „Timofei Moșneaga”, a Laboratorului bacteriologic IMSP Spitalul Clinic Municipal de Copii „Valentin Ignatenco”, a Laboratorului microbiologic IMSP Spitalul Clinic de Boli Infecțioase „Toma Ciorbă”, în activitatea medicilor din cadrul IMSP Centrul de Sănătate Călărași, din secția Chirurgie IMSP Spitalul

Raional Călărași precum și în procesul didactic la Disciplina de microbiologie și imunologie, Departamentul Medicină Preventivă, Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu” din Republica Moldova.

Aprobarea rezultatelor științifice. Rezultatele studiului au fost prezentate și discutate în cadrul unor foruri științifice naționale și internaționale: a VII-a Conferință Națională de Microbiologie și Epidemiologie „Provocări actuale în diagnosticul și epidemiologia bolilor transmisibile și netransmisibile cu impact asupra sănătății publice” (București, România, 2014); International Conference titled “Socio-psycho-medical changes in the lifestyles of the contemporary family” (București, România, 2015); International Scientific Conference on Microbial Biotechnology (3^{ed} edition) (Chisinau, Republica Moldova, 2016); Conferința națională de otorinolaringologie și chirurgie cervico-facială (Sibiu, România, 2017); VII Ежегодная Международная Научно- Практическая Конференция „Актуальные вопросы медицины” (Baku, Azerbaijan, 2018); First Balkan Conference of Medical Mycology and Mycotoxicology „Balkan Fungus 2018” (Timișoara, România, 2018); a XXXV-a Conferință națională de chimie Călimănești – Căciulata (Vâlcea, România, 2018); International Scientific Conference on Microbial Biotechnology (4nd edition) (Chisinau, 2018); Zilele Universității de medicină și farmacie din Craiova a XLIX-a ediție (Craiova, România, 2019); International Conference Achievements and Perspectives of Modern Chemistry dedicated to the 60th anniversary from the foundation of the Institute of Chemistry (Chișinău, Republica Moldova, 2019); Congresului Național al specialiștilor din domeniul sănătății publice și managementului sanitar din Republica Moldova cu participare Internațională „O singură sănătate” (Chișinău, Republica Moldova, 2019); Congresul consacrat aniversării a 75-a de la formarea USMF „Nicolae Testemițanu” (Chișinău, Republica Moldova, 2020); Conferința științifică națională cu participare internațională „Materiale avansate în biofarmaceutică și tehnică” (Chișinău, Republica Moldova, 2021); National Conference with International participation „One Health Approach in a Changing World” (Chișinău, Republica Moldova, 2021).

De asemenea, rezultatele au fost prezentate la următoarele saloane de inventică, lucrările fiind menționate cu distincții: The World Exhibition on Inventions, Research and New Technologies (Valencia, Spania, 2018 – medalie de aur); 46E Salon International des Inventions de Genève (Geneva, 2018 – medalie de aur); Euroinvent 2018 (Iasi, Romania, 2018 – medalie de aur, medalie de bronz); Inventica 2018 (Iasi, Romania, 2018 – 2 medalii de aur); Salonul Internațional de Invenții Inovații „Traian Vuia” (Timișoara, România, 2018 – 2 medalii de aur); PRO INVENT Ediția XVII (Cluj-Napoca, Romania, 2019 – diplomă de excelență); 47E Salon International des Inventions de Genève (Geneva, Elveția, 2019 – medalie de argint); Euroinvent 2019 (Iasi, Romania, 2019 – medalie de aur); Salonul Internațional de Invenții Inovații „Traian Vuia” (Timișoara, România, 2019 – medalie de aur); Inventica 2019 (Iasi, Romania, 2019 – medalie de aur); Infoinvent Ediția a XVI-a (Chișinău, Republica Moldova, 2019 – medalie de argint); Euroinvent 2020 (Iasi, Romania, 2020 – medalie de aur); Inventica 2020 (Iasi,

Romania, 2020 – medalie de aur); Innovation and Creative Education Fair for Youth ICE-USV – IVth Edition (Suceava, Romania, 2020 – medalie de argint, medalie de aur); Salonul Internațional de Invenții și Inovații „Traian Vuia”, ediția a VI –a (Timișoara, România, 2020 – medalie de aur, medalie de argint); International Exhibition Inventcor (Deva, România, 2020 – 2 medalii de aur); Euroinvent 2021 (Iasi, Romania, 2021 – medalie de aur); Innovation and Creative Education Fair for Youth ICE-USV – Vth Edition (Suceava, Romania, 2021 – medalie de aur, medalie de argint); Inventica 2021 (Iasi, Romania, 2021 – 2 medalii de argint); PRO INVENT Ediția a XIX-a (Cluj-Napoca, România, 2021 – medalie de aur); Infoinvent Ediția a XVII-a (Chișinău, Republica Moldova, 2021 – medalie de aur); International Exhibition Inventcor IInd edition (Deva, România, 2021 - medalie de aur).

Publicații la temă

Rezultatele studiului au fost publicate în 77 de lucrări științifice, dintre care o monografie în monoautorat „Rezistența microorganismelor la antibiotice” (240 pag.), cinci articole în reviste din baze de date internaționale, șase articole în reviste științifice din străinătate recunoscute, 16 articole în revistele științifice din Registrul Național al revistelor de profil, în materialele congreselor, conferințelor științifice, dintre care opt publicații de monoautorat, 22 de rezumate în culegeri de lucrări în cadrul conferințelor internaționale (peste hotare), 18 rezumate la conferințe internaționale din republică, două ghiduri, trei lucrări metodico-didactice, nouă brevete de invenție, trei inovații. Rezultatele științifice ale tezei au fost prezentate la 30 de foruri științifice internaționale și la cinci foruri științifice naționale cu participare internațională.

Sumarul compartimentelor tezei

Manuscrisul tezei este expus în limba română, pe 191 pagini tehnoredactate la computer. Structurat în conformitate cu rigorile de întocmire a tezei de doctor habilitat, manuscrisul constă din foaie de titlu, foaie privind dreptul de autor, cuprins, adnotare în limbile română, engleză și rusă, introducere, șase capitole, concluzii generale, recomandări și bibliografia cu 350 de referințe, 8 anexe, declarația privind asumarea răspunderii și CV-ul autorului. Materialul ilustrativ include 40 de tabele, 47 de figuri și 12 formule.

Cuvinte cheie: ulcer trofic infectat, factori de patogenitate, compuși noi, activitate antimicrobiană.

CONȚINUTUL TEZEI

1. STADIUL ACTUAL AL CERCETĂRII ÎN DEZVOLTAREA ANTIMICROBIENELOR ȘI STRATEGII NOI ÎN TERAPIA ULCERULUI TROFIC

Studiul bibliografic al fenomenului de antibiorezistență, a posibilităților de diagnostic, precum și a strategiilor noi de tratament a permis evidențierea deficiențelor terapiei ulcerului trofic infectat cu microorganisme rezistente la antimicrobiene. Astfel, eșecurile terapeutice, ce duc la creșterea morbidității, invalidizării și mortalității, sunt, în mare parte, consecința rezistenței multiple la antimicrobiene a acestor microorganisme.

Acuratețea și rapiditatea raportării rezultatelor investigațiilor de laborator privind agentul etiologic, mecanismele de rezistență și preparatul antimicrobian adecvat pentru tratament în funcție de antibiogramă sunt elemente esențiale în terapia patologiei infecțioase.

În ultimile trei decenii, terapia patologiei infecțioase devine tot mai dificilă din lipsa preparatelor antimicrobiene noi din cauza: costurilor exacerbate pentru elaborare și implementare, durată relativ mică a patentului, includerea preparatelor elaborate în lista de rezervă, durată scurtă a tratamentului antimicrobian ce determină, în final, un profit mic pentru companiile farmaceutice.

Medicina contemporană se confruntă cu mai multe probleme legate de ulcerul trofic precum particularitățile evoluției clinice, complicațiile devastatoare, soldate cu deces, provocările științifice pentru argumentarea noilor strategii terapeutice și chirurgicale.

Ulcerele trofice sunt predispuse la invazia microbiană, iar una dintre cele mai frecvente complicații este asocierea infecției microbiene, predominant mixtă. Diagnosticul microbiologic cu determinarea agenților microbieni și a mecanismelor de rezistență previn dezvoltarea complicațiilor.

Adaptarea și supraviețuirea pe termen lung a microorganismelor la nivelul ulcerului trofic se explică prin prezența complexului de factori de patogenitate și de persistență care inactivează mecanismele de rezistență antibacteriană ale sistemului imun, cum ar fi activitatea antilizozim, anticomplementară, antiinterferon etc. Potențialul de persistență al microorganismelor, inclusiv amploarea fenomenului de rezistență, determină durata aflării lor în macroorganism. De aici necesitatea dezvoltării de preparate antimicrobiene ce vor permite atenuarea potențialului infecțios al microorganismului.

În ultimii ani, în căutarea unor noi alternative terapeutice în tratamentul maladiilor infecțioase, savanții și-au orientat cercetările spre dezvoltarea preparatelor antimicrobiene combinate. Sinergismul compușilor antimicrobieni de origine biologică și de sinteză este unul dintre domeniile actuale ale cercetărilor medicale, dezvoltând o perspectivă nouă în elaborarea unor molecule active împotriva microorganismelor multirezistente la antimicrobiene, ceea ce va permite reducerea timpului de vindecare, inclusiv a ulcerelor trofice infectate.

2. MATERIALE ȘI METODE DE CERCETARE

Prezența cercetare științifică a fost realizată în perioada 2013-2021 în cadrul Disciplinei de microbiologie și imunologie, în Laboratorul de biochimie al Universității de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”, în Laboratorul Ficobiotehnologie din cadrul Institutului de Microbiologie și Biotehnologie al Academiei de Științe a Moldovei și în Laboratorul microbiologic al Agenției Naționale pentru Sănătate Publică. Consultanți științifici: Rudic Valeriu, dr. hab. șt. biol., prof. univ., acad., Om Emerit al Republicii Moldova (specialitatea 313.02 Microbiologie, virusologie medicală) și Gulea Aurelian, dr. hab. șt. chim., prof. univ., acad., Om Emerit al Republicii Moldova (specialitatea 141.01. Chimie anorganică; 141.02; Chimie coordinativă).

Metodologia cercetării a fost aprobată de către Comitetul de Etică a Cercetării USMF „Nicolae Testemițanu”, avizul nr. 65 din 12 aprilie 2017.

Scopul principal al prezentului studiu constă în evaluarea activității antimicrobiene a unor compuși noi și elaborarea principiilor de formulare a preparatelor policomponente eficiente în tratamentul ulcerului trofic infectat.

Importanța și necesitatea realizării prezentului studiu reies din impactul semnificativ asupra sănătății publice la nivel global a fenomenului de rezistență la antimicrobiene. Infecțiile provocate de microorganisme rezistente la antimicrobiene, deoarece nu răspund la terapie, au o evoluție mai prelungită, necesită perioade mai lungi de spitalizare, duc la creșterea mortalității. [20, 39]. Screening-ul și identificarea de noi compuși chimici și biologici cu proprietăți antimicrobiene sunt o oportunitate în dezvoltarea de noi preparate active împotriva tulpinilor rezistente. Fără astfel de preparate, terapia intensivă, transplanturile de grefe, chimioterapia cancerului, îngrijirea copiilor prematuri și chiar intervențiile chirurgicale obișnuite nu ar fi posibile [42].

Obiecte de studiu în cercetare au servit tulpinile de referință, din colecțiile internaționale *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, ATCC 29213, *Streptococcus pyogenes* ATCC 12344, *Enterococcus faecalis* ATCC 19433, *Enterococcus faecium* ATCC 6569, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Candida albicans* ATCC 10231, *Cryptococcus neoformans* CECT 1043, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Acinetobacter baumannii* ATCC® BAA-747, *Proteus mirabilis* ATCC 25933, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Enterobacter cloacae* ATCC 13047 și tulpinile clinice izolate din ulcere trofice. Tulpinile clinice au fost oferite de Laboratorul microbiologic din cadrul Spitalului Clinic Republican „Timofei Moșneaga”.

În studiu au fost incluși compuși chimici noi sintetizați la Catedra de chimie anorganică, Departamentul de Chimie al Universității de Stat din Moldova, iar remediile biologice au fost oferite de Laboratorul de Ficobiotehnologie din cadrul Institutului de Microbiologie și Biotehnologie al Academiei de Științe a Moldovei și de Laboratorul de cercetări științifice „Ficobiotehnologie” al Universității de Stat din Moldova.

Pentru realizarea scopului și obiectivelor trasate au fost utilizate metode standardizate, ajustate cercetărilor realizate în cadrul studiului:

- ✓ *istorice, descriptive, bibliografico-analitice, logice* – la studierea teoretică a surselor bibliografice, a conceptelor și a abordărilor teoretice
- ✓ *epidemiologice* – la analiza indicatorilor epidemiologici
- ✓ *microbiologice* – la izolarea agenților microbieni asociați ulcerelor trofice; la determinarea paternurilor de rezistență; la cercetarea factorilor de patogenitate a tulpinilor izolate; la determinarea activității antimicrobiene a compușilor chimici și biologici asupra tulpinilor de referință și a izolatelor clinice, separat și în combinație
- ✓ *biochimice, imunochimice* – la determinarea acțiunii compușilor chimici și biologici asupra producerii spontane a indicilor biochimici și imunochimici
- ✓ *observația* – la analiza efectelor antimicrobiene și imunomodulatoare prin analiza citokinelor și chemokinelor pro- și anti-inflamatoare

- ✓ *analiza sistematică* – la identificarea obiectului de studiu, la caracterizarea cu acuratețe, cu exactitate, cu sensibilitate și cu precizie a subiectului studiului, cu minimalizarea devierii
- ✓ *analiza comparativă* – la compararea, la toate etapele de cercetare, a activității antimicrobiene a compușilor chimici și biologici, separat și în combinație, asupra tulpinilor de referință și a izolatelor clinice, cu evidențierea particularităților de sinergie
- ✓ *analiza experimentală* – la confirmarea ipotezei studiului și la fundamentarea modelului structural pentru obținerea unor agenți terapeutici noi, lipsiți de efecte adverse majore
- ✓ *sinteza* – la verificarea corectitudinii fiecărui pas, cu păstrarea numai a ceea ce se concepe cu maximă claritate și cu deplină certitudine
- ✓ *statistice* – la analiza cantitativă și calitativă a datelor obținute în studiu
- ✓ *matematice* – la prelucrarea numerică, de analiză și de simulare a datelor obținute
- ✓ *verificarea și aprecierea critică a rezultatelor* – la excluderea unei alte modalități care să ducă la același rezultat sau identificarea posibilităților de obținere a altor rezultate pe această cale.

Cercetările stipulate în obiectivele cercetării, au fost organizate și desfășurate pe etape:

Etapa 1. A fost elaborat planul general de cercetare, s-a definitivat problema, documentarea teoretico-practică cu fenomenele planificate pentru observare. A fost formulată ipoteza de cercetare, stabilite modalitățile și metodele de investigare, și de colectare a datelor.

Etapa 2. Au fost determinate și studiate microorganismele implicate în etiologia ulcerului trofic infectat. Au fost analizate datele privind sensibilitatea/rezistența la antimicrobiene a tulpinilor izolate. Au fost studiați factorii de patogenitate ai microorganismelor izolate din ulcere trofice, care favorizează persistența procesului infecțios. Au fost selectați pentru cercetare factorii de patogenitate, în funcție de implicarea lor în fenomenul de persistență a microorganismelor în organismul-gazdă și de cronicizare a procesului infecțios.

Etapa 3. A fost stabilită acțiunea unor compuși chimici și biologici noi asupra tulpinilor de referință prin metodele difuzimetrică și a diluțiilor succesive în medii lichide. A fost determinată concentrația minimă inhibitoare și minimă bactericidă a acestor compuși și, în baza rezultatelor obținute, au fost selectați cei care au prezentat activitate antimicrobiană confirmată prin studii ulterioare. A fost determinată toxicitatea acută a compușilor chimici noi față de dafnii.

Etapa 4. A fost studiată acțiunea sinergică a compușilor chimici și biologici pe tulpini de referință, identificând combinațiile de compuși care au amplificat efectul antimicrobian. A fost determinat timpul de omorâre a microorganismelor sub acțiunea compușilor separat și în combinație. S-a studiat acțiunea compușilor noi asupra expresiei factorilor enzimatici de patogenitate (gelatinazei, ADN-azei, lecitinazei, amilazei, lipazei, hemolizinei) și de persistență a microorganismelor (acțiunea anticomplementară, antilizozim). A fost determinată influența compușilor

noi asupra capacității de aderență a microorganismelor la substratul inert și acțiunea antibiofilm a acestora.

Etapa 5. A fost determinat efectul imunomodulator al compușilor chimici și biologici separat și în combinație. S-a stabilit acțiunea acestora asupra producerii spontane a indicilor biochimici și imunochimici, precum și modificările induse de acestea asupra unor parametri biochimici ai microorganismelor.

Etapa 6. Rezultatele obținute au fost analizate sistematic în funcție de obiectivele propuse și de ipotezele formulate. În baza rezultatelor obținute au fost formulate concluzii și recomandări practice.

Rezultatele studiului au fost folosite la elaborarea a două ghiduri: „Ghid privind detectarea mecanismelor de rezistență la antimicrobiene, interpretarea și aplicarea clinică a rezultatelor” și „Ghid privind managementul ulcerului trofic infectat”.

3. DIVERSITATEA SPECIILOR, REZISTENȚA LA ANTIMICROBIENE ȘI FACTORII DE PATOGENITATE A TULPINILOR IZOLATE DIN ULCERE TROFICE

3.1. Evaluarea spectrului și ponderii microorganismelor asociate ulcerului trofic

Spectrul etiologic al ulcerului trofic infectat este foarte divers, cu implicarea mai multor specii de microorganisme, dominat frecvent de specia *S. aureus*, reprezentanții familiei *Enterobacteriaceae* sau de specia *P. aeruginosa*.

Una dintre provocările majore ale medicinei – opțiunile limitate de tratament antimicrobian al ulcerelor trofice infectate – impune, în primul rând, elucidarea diversității speciilor implicate în acest proces patologic. Cu acest scop, în acest studiu a fost determinat spectrul și ponderea microorganismelor în probele prelevate din ulcerele trofice. Au fost analizate 387 de probe biologice. În 176 (41,5%; ÎI 5% 44,8-45,4) a fost izolată o specie microbiană, în 172 (40,6%; ÎI 95% 40,3-40,9) – două specii și în 37 (8,7%; ÎI 95% 8,5-8,9) – trei specii. În 39 (9,2%; ÎI 95% 38,7-39,3) de probe microorganismele nu au fost izolate în titru diagnostic. În total au fost izolate 631 de tulpini microbiene.

Microorganismele, frecvent asociate ulcerului trofic, au fost cele din genul *Staphylococcus* (preponderent *Staphylococcus aureus*), urmate în ordinea descreșterii incidenței de streptococi (*Enterococcus* spp., *Streptococcus pyogenes*), de enterobacterii (*Klebsiella* spp., *Proteus* spp., *Escherichia* spp. *Serratia* spp., *Citrobacter* spp.), de bacilii nefermentativi *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* și de micetele levuriforme din genul *Candida*.

În infecția provocată de o singură specie microbiană, de rând cu *Staphylococcus aureus*, specia cea mai des implicată în proces (19,3%; ÎI 95% 18,8-19,8), au fost izolate *Pseudomonas aeruginosa* (17,6%; ÎI 95% 17,1-18,1), *Enterococcus* spp. (13,6%; ÎI 95% 13,2-14,0), *Proteus* spp. (12,5%; ÎI 95% 12,1-12,9), *Klebsiella pneumoniae* (11,4%; ÎI 95% 11,0-11,8), *Acinetobacter baumannii* (10,2%; ÎI 95% 9,8-10,6), *Streptococcus pyogenes* (8,5%; ÎI 95% 8,2-8,8) și *Escherichia coli* (6,8%; ÎI 95% 6,5-7,1).

În infecția mixtă în 62,8% de cazuri au dominat tulpinile de *S. aureus*, asociate, în 47,7% de cazuri cu speciile *K. pneumoniae* și *P. aeruginosa*.

Bacilii gram-negativi au fost izolați mai frecvent din ulcerele trofice (56,3%; ÎI 95% 53,2-54,0), decât cocii gram-pozitivi (41,5%; ÎI 95% 41,2-41,8). Cel mai comun izolat a fost specia *S. aureus* (21,9%; ÎI 95% 21,7-22,1), urmată în ordinea descreșterii incidenței de *P. aeruginosa* (15,2%; ÎI 95% 15,0-15,4), *K. pneumoniae* (13,3%; ÎI 95% 13,1-13,5) și *Enterococcus* spp. (11,9%; ÎI 95% 11,7-12,1).

3.2. Rezistență la antibiotice a tulpinilor izolate din ulcere trofice

Din cele 158 de tulpini de *Staphylococcus* spp. izolate din ulcere trofice, 108 (68,4%; ÎI 95% 67,4-69,4) au fost multirezistente la antibiotice, 69 (43,7%; ÎI 95% 42,9-44,5) au prezentat MRS (*Staphylococcus* metilicilin-rezistent), 31 (19,6%; ÎI 95% 19,0-20,2) s-au dovedit a fi pozitive prin testul D și doar 20 (12,6%; ÎI 12,2-13,0) – sensibile la toate antimicrobienele testate.

Cel mai ridicat nivel de sensibilitate a tulpinilor de *Staphylococcus* spp. a fost înregistrat față de glicopeptide (100%; ÎI 95% 99,5-100,5), urmate de tetraciclina (91,8%; ÎI 95% 91,3-92,3), oxazolidone (89,9%; ÎI 95% 89,4-90,4) și amfenicoli (87,9%; ÎI 95% 87,4-88,4).

Din 158 de tulpini de *Staphylococcus* spp. testate, 31 (19,6%; ÎI 95% 19,0-20,2) au prezentat rezistență MLS_B inductibilă (macrolide-lincozamide-streptograminele B), 13 (8,2%; ÎI 95% 7,8-8,6) – rezistență MLS_B constitutivă și 44 (27,8%; ÎI 95% 27,1-28,5) – rezistență la macrolide-streptograminele B (MS_B). Rezistența inductibilă MLS_B a fost mai mare în rândul MRS în comparație cu MSS (p=0,037) (Tabelul 1).

Tabelul 1. Fenotipurile de rezistență la clindamicină a tulpinilor de *Staphylococcus* spp. izolate din ulcere trofice

Fenotipurile	E	CM	Testul D	MRS (n=69)	MSS (n=89)	<i>Staphylococcus</i> spp. total (n=158)
				n (%; ÎI ₉₅)	n (%; ÎI ₉₅)	n (%; ÎI ₉₅)
MLS _B inductibil	R	S	+	25 (36,2; 35,7-36,7)	6 (6,7; 6,4-7,0)	31 (19,6; 19,0-20,2)
MLS _B constitutiv	R	R	-	7 (10,1; 9,8-10,4)	6 (6,7; 6,4-7,0)	13 (8,2; 7,8-8,6)
MS _B	R	S	-	14 (20,3; 19,9-20,7)	30 (33,7; 33,1-34,3)	44 (27,8; 27,1-28,5)
Sensibile	S	S	-	23 (33,3; 32,8-33,8)	47 (52,8; 52,2-53,4)	70 (44,3; 43,4-45,2)

Notă: MLS_B – macrolide-lincozamide-streptogramine B; MS_B – macrolide-streptogramine B; E – eritromicină; CM – clindamicină.

Tulpinile de *Enterococcus* spp., izolate din ulcere trofice, au prezentat un grad înalt de rezistență la fluorochinolone (ciprofloxacina – (84,0%; ÎI 95% 83,5-84,5); levofloxacina – (78,7%; ÎI 95% 78,2-79,2), sulfonamide (54,7%; ÎI 95% 54,3-55,1), peniciline și tetraciclina (45,3%; ÎI 95% 45,0-45,6). O sensibilitate mai înaltă a fost înregistrată la carbapeneme și la glicopeptide (57,3%).

Din numărul total de tulpini de enterococi, 35 (46,7%; ÎI 95% 47,8-51,6) au prezentat multirezistență, iar 32 (54,7%; ÎI 95% 52,7-56,7) au fost vancomicin-rezistente (VRE). Din tulpinile multirezistente, 100% (ÎI 95% 97,3-102,7) au fost

non-susceptibile la ciprofloxacina, 57,1% (Î 95% 55,1-59,1) la trimetoprim/sulfametoxazol și 54,3% (Î 95% 52,3-56,3) la tigeciclină.

Tulpinile de *Enterobacteriaceae*, izolate din ulcere trofice au prezentat o rezistență marcată la aminopeniciline (ampicilină - 93,2%; Î 95% 90,4-96,0), peniciline cu inhibitori de beta-lactamaze (amoxiclav - 89,3%; Î 95% 86,5-92,1) și cefalosporine (ceftazidim - 85,9%; Î 95% 83,2-88,6, cefepim - 84,0%; Î 95% 81,3-86,7, cefotaxim - 78,2%; Î 95% 75,6-80,8). Cele mai eficiente preparate, la care enterobacteriile au prezentat un nivel de rezistență mai scăzut, s-au dovedit a fi monobactamele (aztreonam - 14,6%; Î 95% 13,5-15,7), sulfonamidele (trimetoprim/sulfametoxazol - 18,4%; Î 95% 17,1-19,7), carbapenemele (imipenem - 21,4%; Î 95% 20,0-22,8), meropenem - 24,8%; Î 95% 23,3-26,3, ertapenem - 10,2%; Î 95% 10,5-9,9) și aminoglicozidele (amicacină - 25,7%; Î 95% 24,2-27,2, gentamicină - 32,5%; Î 95% 30,8-34,2, tobramicină - 20,9%; Î 95% 19,6-22,2). La fluorchinolone, tulpinile de enterobacterii au prezentat o rezistență moderată (ciprofloxacina - 68,0%; Î 95% 65,6-70,4, levofloxacina - 38,3%; Î 95% 36,5-40,1).

Tulpinile de *P. aeruginosa* au înregistrat cel mai ridicat nivel de sensibilitate față de carbapeneme (ertapenem - 91,7% (Î 95% 88,9-94,5), imipenem - 59,4% (Î 95% 57,1-61,7), meropenem - 55,2% (Î 95% 53,0-57,4)) și aminoglicozide (amicacină - 59,4% (Î 95% 57,1-61,7), tobramicină - 57,3% (Î 95% 55,1-59,5)). La restul grupurilor de preparate a fost marcat un grad înalt de rezistență, după cum urmează: peniciline (ticarcilina - 96,9% (Î 95% 94,9-98,9), piperacilină-tazobactam - 90,6% (Î 95% 88,6-92,6)), cefalosporine (cefepim - 84,4 (Î 95% 82,5-86,3), ceftazidim - 80,2% (Î 95% 78,3-82,1)), monobactame (aztreonam 83,3% (Î 95% 81,4-85,2)) și fluorchinolone (ciprofloxacina - 75,0% (Î 95% 73,2-76,8), levofloxacina - 71,9% (Î 95% 70,1-73,7)).

Rezultatele testării sensibilității la antimicrobiene a tulpinilor de *Acinetobacter baumannii* a pus în evidență o rezistență înaltă la fluorochinolone - 84,0% (Î 95% 80,6-87,4), la sulfonamide - 81,1% (Î 95% 77,7-84,5) și la carbapeneme - 40,8% (Î 95% 38,4-43,2). Cel mai înalt grad de sensibilitate s-a înregistrat la preparatele din grupul aminoglicozidelor - 54,1% (Î 95% 51,3-56,9).

La analiza pattern-urilor multirezistente de bacili gram-negativi, cel mai înalt nivel a fost înregistrat la tulpinile de *P. aeruginosa* (88,5%; Î 95% 86,5-90,5), urmate de *K. pneumoniae* (81,0%; Î 95% 78,9-83,1), de *A. baumannii* (71,7%; Î 95% 68,5-74,9), și de *E. coli* (69,8%; Î 95% 66,7-72,9). Rata de rezistență per totală a bacililor gram-negativi la trei și mai multe antimicrobiene a constituit 71,3%, și doar o tulpină (0,28%) a fost sensibilă la toate preparatele antimicrobiene testate.

Bacili gram-negativi au fost supuși testelor de screening pentru detectarea beta-lactamazelor cu spectru extins și testelor fenotipice de confirmare a producerii de BLSE.

În prezentul studiu, prin teste fenotipice, au fost identificate 97 (27,3±0,29%; Î 95% 27,0-27,6) de tulpini de bacili gram-negativi producătoare de beta-lactamaze cu spectru extins. Speciile de bacili gram-negativi, la care s-a înregistrat o rată mai mare a producerii de BLSE, au fost *P. aeruginosa* (40,6±1,32%; Î 95% 39,3-41,9), urmate de *K. pneumoniae* (36,9±1,44%; Î 95% 35,7-38,1) și *E. coli* (33,9±2,19%;

Î 95% 32,7-35,1). Totodată, 15 ($28,3 \pm 2,00\%$; Î 95% 27,0-29,6) tulpini de *A. baumannii*, 7 ($8,3 \pm 0,68\%$; Î 95% 7,6-9,0) de *K. pneumoniae* și 4 ($4,2 \pm 0,42\%$; Î 95% 3,47-4,93) de *P. aeruginosa* au fost producătoare de β -lactamaze de tip AmpC.

Dintre tulpinile de bacili gram-negativi izolate din ulcere trofice, 50 ($16,6 \pm 0,27\%$; Î 95% 16,4-16,8) au fost pozitive la carbapenemaze prin testele fenotipice și doar 9 (3,0%; Î 95% 2,9-3,1) au fost confirmate prin teste genotipice.

La caracterizarea moleculară a tulpinilor producătoare de carbapenemaze, în scopul identificării determinantilor de rezistență, gene ce codifică producerea carbapenemazelor au fost detectate la $5,9 \pm 0,58\%$ (Î 95% 5,3-6,5) izolate de *K. pneumoniae*, $3,8 \pm 0,73\%$ (Î 95% 3,1-4,5) - *E. coli* și $2,1 \pm 0,30\%$ (Î 95% 1,8-2,4) tulpini de *P. aeruginosa*. Cel mai frecvent tip de carbapenemază detectat a fost OXA-48 ($2,6 \pm 0,10\%$; Î 95% 2,5-2,7), urmat de NDM ($0,3 \pm 0,26\%$; Î 95% 0,26-0,34). Carbapenemaze din clasa A (KPC) nu au fost detectate la tulpinile izolate din ulcere trofice.

Rezistența la carbapeneme a tulpinilor de *A. baumannii* este mediată, în principal, de genele *bla*_{OXA} (cum ar fi *bla*_{OXA-51}, *bla*_{OXA-58}, *bla*_{OXA-23} și *bla*_{OXA-40}), care codifică β -lactamazele de clasa D de hidrolizare a carbapenemelor. În urma testărilor s-a constatat că tulpinile de *A. baumannii* izolate din ulcere trofice în $9,5 \pm 1,15\%$ (Î 95% 8,4-10,7) de cazuri au prezentat gene de rezistență la carbapeneme, dintre care în $5,7 \pm 0,90\%$ (Î 95% 4,8-6,6) de cazuri gena *bla*_{OXA-23} și în $3,8 \pm 0,73\%$ (Î 95% 3,1-4,5) de cazuri gena *bla*_{OXA-58}.

3.3. Evaluarea factorilor de patogenitate a tulpinilor microbiene izolate din ulcere trofice

Patogenitatea microbiană cuprinde totalitatea mecanismelor biochimice, prin care microorganismele conditionează dezvoltarea bolii. Nu toate microorganismele patogene sau potential patogene își exprimă această capacitate la fel. Din aceste considerente este importantă determinarea și cunoașterea arsenalului de factori de patogenitate pe care-l posedă tulpinile microbiene implicate în procesul infecțios.

În prezentul studiu au fost studiați unii factori enzimatici de patogenitate a tulpinilor bacteriene izolate din ulcere trofice, care permit microorganismelor să persiste în focarul infecțios.

Unul dintre acești factori este hemolizina – proteină citolitică care are capacitatea de a liza eritrocitele umane și animale. De regulă, hemolizina este produsă de tulpinile bacteriene, care au demonstrat o virulență înaltă în cercetările experimentale, și asociată cu o manifestare mai severă a procesului infecțios.

Dintre tulpinile izolate din ulcere trofice, activitate hemolitică au prezentat 356 (57,7%; Î 95% 51,6-52,0), dintre care 184 (51,8%; Î 95% 51,4-52,2) tulpini de bacili gram-negativi și 172 (65,6%; Î 95% 65,2-66,1) de coci gram-pozitivi. Acest factor de patogenitate s-a dovedit a fi mai exprimat printre cocii gram-pozitivi (65,6%; Î 95% 64,7-66,5), urmați de bacilii gram-negativi nefermentativi (59,1%; Î 95% 58,2-60,0) și enterobacterii (46,6%; Î 95% 45,8-47,9).

Enzima lecitinaza a fost pusă în evidență la 154 (58,8%) tulpini de coci gram-pozitivi și la 177 (49,9%) tulpini de bacili gram-negativi. Dintre bacilii gram-negativi, cele mai multe tulpini producătoare de lecitinază au fost înregistrate printre *Proteus* spp. ($70,4 \pm 1,60\%$; Î 95% 68,8-72,3), *P. aeruginosa* ($65,6 \pm 0,49\%$; Î 95%

65,1-66,1) și *K. pneumoniae* (57,1±0,45%; Î 95% 56,7-57,6). Producerea de lecitinază a fost înregistrată la un număr mai mare de bacilli gram-negativi glucozo-nefermentativi (52,3±1,02%; Î 95% 51,3-53,3), în comparație cu tulpinile de bacilli gram-negativi glucozo-fermentativi (48,1±0,98%; Î 95% 47,1-49,1). Sinteza acestei enzime a fost înregistrată la 58,8 ±0,99% (Î 95% 57,8-59,8) dintre cocii gram-pozitivi, întâietatea revenind speciei *S. aureus* (100%).

Producători de lipază s-a dovedit a fi un număr mare de tulpini atât gram-negative (77,2±1,41%; Î 95% 71,1-73,8), cât și gram-pozitive (70,2±0,36%; Î 95% 69,8-70,6). Rata de exprimare a acestei enzime a fost înregistrată la peste 70% din speciile izolate din ulcere trofice, cu excepția *E.coli* (58,5%) și SCN (25,0%).

ADN-aza este o enzimă care scindează acizii nucleici cromozomiali și plasmidici. Ea asigură reducerea viscozității secrețiilor, în care se acumulează ADN-ul din celulele lezate, asigurându-le cu mononucleotide pentru propriile sinteze și permițând diseminarea lor în organismul-gazdă [7]. Această enzimă de patogenitate a fost mai des înregistrată la tulpinile de coci gram-pozitivi (43,9±0,50%; Î 95% 43,4-44,4), comparativ cu bacilii gram-negativi (42,2±0,49%; Î 95% 41,7-42,7). Dintre bacilii gram-negativi, acest factor de patogenitate a fost mai exprimat la tulpinile de enterobacterii (61,7±0,59%; Î 95% 61,1-62,3), în comparație cu bacilii gram-negativi nefermentativi (15,4±0,29%; Î 95% 15,1-15,7).

Hidrolazele, precum amilaza, au importanță majoră în metabolismul microbian, fiind responsabile de scindarea proteinelor, glucidelor și lipidelor. Acest factor de patogenitate a fost înregistrat la 43,9% de tulpini testate, mai exprimat fiind la enterobacterii (57,8%) și la bacilii gram-negativi nefermentativi (53,0%). Tulpinile de coci gram-pozitivi au exprimat această enzimă în 27,9% de cazuri, preponderent tulpinile de *S. aureus* (51,4%).

Secreția de enzime proteolitice (gelatinaza și cazeinaza) este extrem de importantă în supraviețuirea bacteriilor și invazia țesuturilor macroorganismului. Numeroase studii au arătat că proteazele sintetizate de microorganismele implicate în procesul infecțios pot contribui la dezvoltarea formelor severe de infecție. Conform rezultatelor studiilor noastre, producerea de proteaze a fost mai exprimată la tulpinile de coci gram-pozitivi (cazeinaza – 75,6±0,74% (Î 95% 74,9-76,3), gelatinaza – 65,6±0,37% (Î 95% 65,2-66,0), în special la tulpinile de *S. aureus* și *Enterococcus* spp – 77,3±0,41% (Î 95% 76,9-77,7).

La compararea gradelor de exprimare a factorilor enzimatici de patogenitate la tulpinile în monoculturi și în asociații s-a constatat că acesta este mai mic la cele izolate în monoculturi, în comparație cu cele din asociații microbiene ($p=0,026$) (Figura 1).

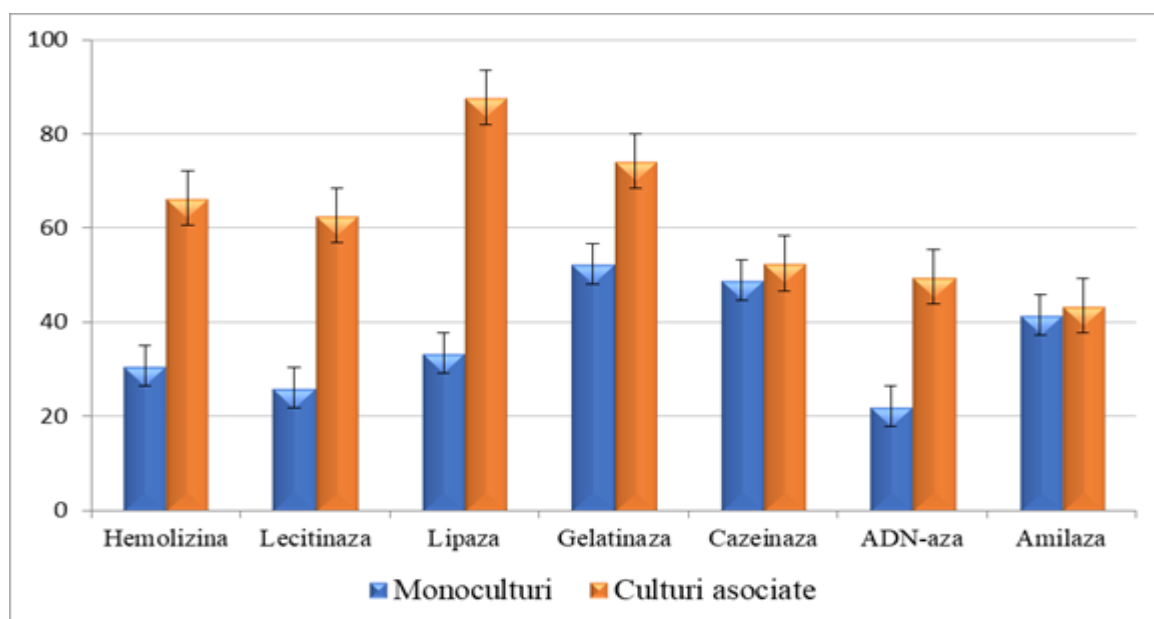


Figura 1. **Exprimarea factorilor enzimatici de patogenitate la tulpinile izolate în monoculturi și în asociații (%)**

Determinarea și compararea gradului de exprimare a factorilor de patogenitate enzimatici la tulpinile de bacili gram-negativi și coci gram-pozitivi multirezistenți la antimicrobiene și sensibile a arătat că acesta este mai înalt la tulpinile multirezistente, atât la bacilii gram-negativi (BGN), cât și la cocii gram-pozitivi, în comparație cu cele sensibile ($p=0,036$).

Tulpinile multirezistente de BGN au prezentat o rată de exprimare a lipazei, gelatinazei, hemolizinei și lecitinazei mai mare cu 58,8%, 57,9%, 49,3% și 41,1% respectiv, față de tulpinile sensibile. Diferențe mai mici au fost observate la producerea ADN-azei și amilazei, tulpinile multirezistente depășind cu 35,9% și cu 26,0% tulpinile sensibile.

Printre tulpinile de coci gram-pozitivi multirezistenți și sensibili, diferențe mai mari în producerea enzimelor de patogenitate s-au înregistrat în cazul lipazei (73,2%), lecitinazei (65,8%), hemolizinei (57,7%) și cazeinazei (56,3%).

Un alt factor de patogenitate analizat în prezentul studiu a fost activitatea antilizozim a microorganismelor izolate. Din cele 631 de tulpini izolate din ulcere trofice, activitate antilizozim au prezentat 589 ($93,3 \pm 0,29\%$; ÎÎ 95% 93,6-94,2) și doar 42 ($6,7 \pm 0,08\%$; ÎÎ 95% 6,6-6,8%) au fost inactive. Dintre tulpinile de coci gram-pozitivi, activitate antilizozim au prezentat $98,8 \pm 0,79\%$ (ÎÎ 95% 98,0-99,6), dintre tulpinile de bacilii gram-negativi nefermentativi – $97,3 \pm 1,35\%$ (ÎÎ 95% 95,9-98,7), dintre micetele levuriforme din genul *Candida* – $92,9 \pm 14,95\%$ (ÎÎ 95% 78,1-107,7) și dintre tulpinile de bacilii gram-negativi fermentativi – $83,1 \pm 1,25\%$ (ÎÎ 95% 81,8-84,4). Marea majoritate a tulpinilor clinice – 278 ($47,2 \pm 0,23\%$; ÎÎ 95% 47,0-47,4) – au prezentat un grad mediu ($K_{0,5-2,49}$) de exprimare a activității antilizozim, 174 ($29,5 \pm 0,18\%$; ÎÎ 95% 29,3-29,7) – grad înalt ($K > 2,5$) și 137 ($23,3 \pm 0,16\%$; ÎÎ 95% 23,1-23,5) – grad mic ($K < 0,49$) (Tabelul 2).

Tabelul 2. Capacitatea de inactivare a lizozimului a tulpinilor izolate din ulcere trofice

Gradul de exprimare al AAL	Coci gram pozitivi (n = 259)		Bacili gram negativi nefermentativi (n = 145)		Bacili gram negativi fermentativi (n = 172)		Micete din genul <i>Candida</i> (n = 13)		Total (n = 589)	
	abs	%	abs	%	abs	%	abs	%	abs	%
Înalt (K>2,5)	73	28,2	46	31,7	51	29,6	4	30,8	174	29,5
Mediu (K0,5-2,49)	118	45,6	69	47,6	84	48,8	7	53,8	278	47,2
Mic (K<0,49)	68	26,2	30	20,7	37	21,5	2	15,4	137	23,3

Am comparat și capacitatea de inactivare a lizozimului a tulpinilor de *Staphylococcus* spp. rezistente și sensibile la meticilină și tulpinilor de BGN multirezistente și sensibile la preparatele antimicrobiene. Toate tulpinile MRS, 100% (Î 95% 97,1-100,0), au inactivat lizozimul, 45,0% (Î 95% 43,1-46,9) prezentând un grad înalt de exprimare a activității antilizozim, 53,7% (Î 95% 51,6-55,8) – grad mediu și 1,3% (Î 95% 1,0-1,6) – grad mic. Tulpinile MSS au inactivat lizozimul în proporție de 97,1% (Î 95% 94,9-99,3), dintre care 1,0% (Î 95% 0,8-1,1) au prezentat un grad înalt de exprimare a activității antilizozim, 32,3% (Î 95% 31,0-33,06) – grad mediu și 66,8% (Î 95% 65,0-68,6) – grad mic.

În urma analizei capacității de inactivare a lizozimului a tulpinilor de BGN multirezistente și sensibile la antimicrobiene s-a constatat că $98,4 \pm 1,36\%$ (Î 95% 97,0-99,8) de tulpini multirezistente au prezentat această capacitate, dintre care la $37,4 \pm 0,84\%$ (Î 95% 36,6-38,2) s-a înregistrat un grad înalt de exprimare, la $59,4 \pm 1,06\%$ (Î 95% 58,3-60,5) – grad mediu și la $3,2 \pm 0,25\%$ (Î 95% 3,0-3,4) – grad mic. Tulpinile sensibile de BGN au inactivat lizozimul în $66,7 \pm 1,12\%$ (Î 95% 65,6-67,8) de cazuri, dintre care $5,9 \pm 0,33\%$ (Î 95% 5,6-6,2) au prezentat un grad înalt de exprimare a activității antilizozim, $7,3 \pm 0,37\%$ (Î 95% 6,9-7,7) – grad mediu și $86,8 \pm 1,28\%$ (Î 95% 85,5-88,1) – grad mic.

Un alt factor important, care asigură persistența microorganismelor în focar, este capacitatea celulelor bacteriene de a inactiva sistemul complement al macroorganismului [11]. Dintre cele 631 de tulpini studiate, 601 ($95,2 \pm 0,31\%$; Î 95% 94,9-95,5) au prezentat activitate anticomplementară, dintre care 480 ($79,9 \pm 0,28\%$; Î 95% 79,6-80,2) au inactivat complementul la o concentrație mai mare de 15CH50/ml, 68 ($11,3 \pm 0,11\%$; Î 95% 11,2-11,4) – la o concentrație de la 5CH50/ml până la 15CH50/ml și 53 ($8,8 \pm 0,09\%$; Î 95% 8,7-8,9%) – la o concentrație de 5CH50/ml. Nu au inactivat complementul doar 30 de tulpini ($4,8 \pm 0,07\%$; Î 95% 4,73-4,87%).

Rezultatele analizei capacității de inactivare a complementului a tulpinilor de *Staphylococcus* spp. rezistente și sensibile la meticilină și a tulpinilor de BGN multirezistente și sensibile la preparatele antimicrobiene sunt prezentate în figura 2.

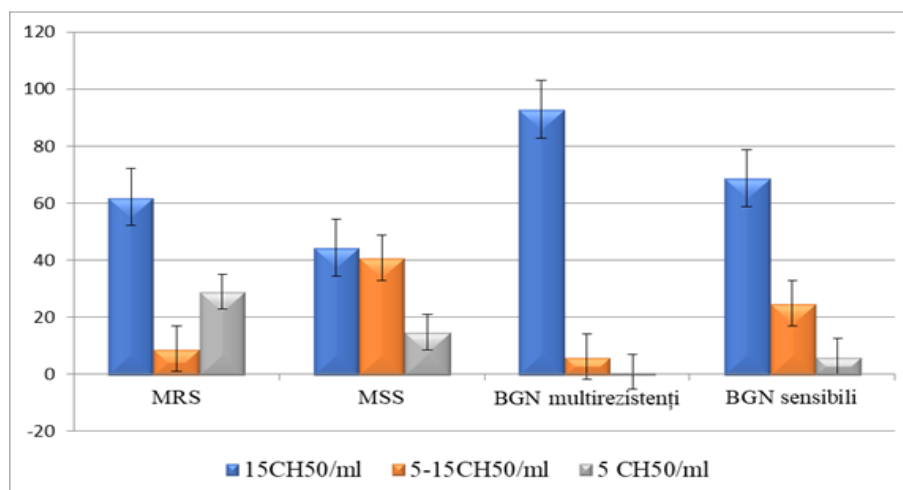


Figura 2. Capacitatea de inactivare a complementului a tulpinilor multirezistente și sensibile la antimicrobiene (%)

În urma analizei efectuate a fost constatat faptul că $77,5 \pm 0,27\%$ (ÎÎ 95% 77,2-77,8) dintre tulpinile MRS au inactivat complementul, dintre care $62,1 \pm 0,24\%$ (ÎÎ 95% 61,9-62,3) la o concentrația de 15CH50/ml, $8,9 \pm 0,09\%$ (ÎÎ 95% 8,8-9,0) – la concentrația de la 5CH50/ml până la 15CH50/ml și $29,0 \pm 0,16\%$ (ÎÎ 95% 28,8-29,2) – la o concentrație de 5CH50. Dintre tulpinile MSS au prezentat această capacitate doar $26,5 \pm 0,15\%$ (ÎÎ 95% 26,1-26,4), dintre care $44,4 \pm 0,20\%$ (ÎÎ 95% 44,2-44,6) au inactivat complementul la concentrația de 15CH50/ml, $40,7 \pm 0,19\%$ (ÎÎ 95% 40,5-40,9) – la concentrația de 5-15CH50/ml și $14,8 \pm 0,12\%$ (ÎÎ 95% 14,7-14,9) – la concentrația de 5CH50.

Tulpinile de BGN multirezistente la antimicrobiene au inactivat complementul în proporție de 100%, iar tulpinile sensibile în proporție de $78,4 \pm 1,22\%$ (ÎÎ 95% 77,2-79,6). Majoritatea tulpinilor multirezistente și sensibile au inactivat complementul la o concentrație de 15CH50/ml, $92,9 \pm 1,32\%$ (ÎÎ 95% 91,6-94,2) și $68,7 \pm 1,14\%$ (ÎÎ 95% 67,6-69,8) respectiv.

Compararea datelor activității antilizozim și anticomplementare a monoculturilor și a asociațiilor a arătat că în asociații tulpinile bacteriene prezintă mai des activitate antilizozim și anticomplementară medie și înaltă ($p=0,028$).

Am studiat și capacitatea de formare a biofilmelor de către tulpinile izolate din ulcere trofice. În prezentul studiu, din cele 631 de tulpini izolate din ulcere trofice, 462 ($73,2 \pm 0,27\%$; ÎÎ 95% 72,9-73,5) au produs biofilm detectabil ($DO > 0,056$), iar 169 ($26,8 \pm 0,16\%$; ÎÎ 95% 26,6-27,0) nu au produs biofilm ($DO \leq 0,056$). În ceea ce privește statutul de biofilm, 193 ($41,8 \pm 0,20\%$; ÎÎ 95% 41,6-42,0) de izolate au produs biofilm puternic ($DO > 0,220$), 202 ($43,7 \pm 0,21\%$; ÎÎ 95% 43,5-43,9) – biofilm moderat ($DO 0,112-0,220$) și 67 ($14,5 \pm 0,12\%$; ÎÎ 95% 14,4-14,6) – biofilm slab ($0,056 < DO \leq 0,112$).

Cel mai înalt grad de aderență și de formare a biofilmelor a fost înregistrat la tulpinile de bacili gram-negativi ($78,0 \pm 0,50\%$; ÎÎ 95% 77,5-78,5), în special la *Proteus* spp. ($87,0 \pm 3,34\%$; ÎÎ 95% 83,6-90,4), *Klebsiella* spp. ($86,9 \pm 2,21\%$; ÎÎ 95% 84,5-88,9), *Citrobacter* spp. ($80,0 \pm 35,6\%$; ÎÎ 95% 44,5-115,6), *P. aeruginosa* ($73,9 \pm 1,78\%$; ÎÎ 95% 72,1-75,7) și *A. baumannii* ($73,6 \pm 3,22\%$; ÎÎ 95% 70,4-76,8). Biofilm puternic aderent au format $44,8 \pm 0,42\%$ (ÎÎ 95% 44,4-45,2) dintre tulpini,

42,9±0,47% (Î 95% 42,4-43,4) - biofilm moderat aderent și 12,3±0,25% (Î 95% 12,1-12,5) - biofilm slab aderent.

La analiza relației dintre capacitatea de formare a biofilmelor și rezistența tulpinilor de bacili gram-negativi la antimicrobiene s-a constatat că din izolatele care formează biofilm, 52,3±0,52% (Î 95% 51,8-52,8) erau tulpini MDR, 31,4 ±0,40% (Î 95% 31,0-31,8) – XDR și doar 16,2±0,25% (Î 95% 15,9-16,5) – non-MDR. Tulpinile MDR și XDR au format în principal biofilm puternic aderent – 41,4±0,29% (Î 95% 40,4-42,4) și 70,1±1,20% (Î 95% 68,9-71,3) și moderat aderent – 57,2±1,20% (Î 95% 56,0-58,40) și 25,3±1,00% (Î 95% 24,3-26,3) respectiv. Tulpinile non-MDR au fost responsabile de formarea, în special a biofilmelor slab aderente 60,0±3,70% (Î 95% 56,3-63,7), iar 55,9±2,20% (Î 95% 53,7-58,1) nu au format biofilme.

Biofilm detectabil au format 67,6±0,62% (Î 95% 67,0-68,2) dintre tulpinile de coci gram-pozitivi. Cea mai înaltă capacitate de formare a biofilmelor a fost înregistrată la tulpinile de *Enterococcus* spp. (86,7±2,47% (Î 95% 84,2-89,2)), urmate în ordinea descreșterii incidenței de SCN (65,0±8,02% (Î 95% 57,0-73,0)), *S.pyogenes* (62,1±5,41% (Î 95% 56,7-67,5)) și *S.aureus* (58,7±1,10% (Î 95% 57,6-59,8)). Biofilm puternic aderent au format 65 (36,7±1,85% (Î 95% 34,85-38,55)) dintre tulpinile de coci gram-pozitivi, biofilm moderat aderent – 80 (45,2±1,67% (Î 95% 43,53-46,87)) și biofilm slab aderent – 32 (18,1±2,65% (Î 95% 15,45-20,75)).

La studierea relației dintre capacitatea de formare a biofilmelor și rezistența la meticilină a tulpinilor de stafilococi a ieșit în evidență capacitatea semnificativ mai mare de formare a biofilmului a tulpinilor MRS (94,2±2,80%; Î 95% 91,4-97,0), în comparație cu tulpinile MSS (32,6±1,28%; Î 95% 31,3-33,9) (p=0,036). Tulpinile de stafilococi meticilin-rezistente au format preponderent biofilme puternic aderente (50,8±2,06%; Î 95% 48,7-52,9) și moderat aderente (44,6±1,93%; Î 95% 42,7-46,5), pe când la tulpinile de stafilococi meticilin-sensibile au prevalat biofilmele slab aderente (62,1±1,76%; Î 95% 59,8-64,4). Dintre tulpinile MRS doar 5,8±0,69% (Î 95% 5,1-6,5) nu au format biofilm detectabil, iar dintre tulpinile MSS – 67,4±1,87% (Î 95% 65,6-69,2).

Conform rezultatelor analizei relațiilor dintre multidrogrezistența tulpinilor de *Enterococcus* spp. izolate din ulcere trofice și capacitatea de formare a biofilmelor, tulpinile MDR au format biofilme detectabile în 100% de cazuri, pe când tulpinile sensibile – în 75,0±1,94% (Î 95% 73,1-76,9) de cazuri (Figura 3). Tulpinile MDR de *Enterococcus* spp. au format în special biofilme moderat aderente (57,1±1,69% (Î 95% 55,4-58,8)) și puternic aderente (40,0±1,41% (Î 95% 38,6-41,4)), pe când tulpinile sensibile au format în 42,5±1,46% (Î 95% 41,0-44,0) de cazuri biofilme moderat aderente și în 17,5±0,94% (Î 95% 16,6-18,4) de cazuri biofilme slab aderente.

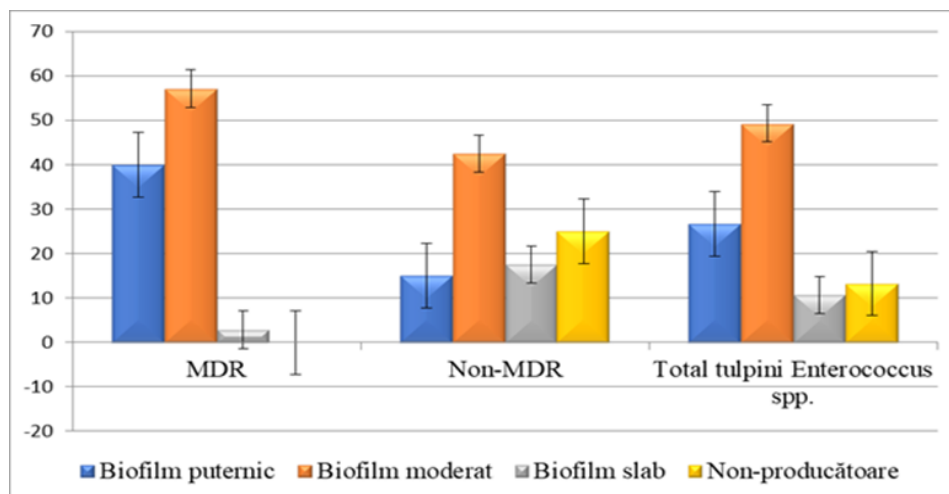


Figura 3. Capacitatea de formare a biofilmelor a tulpinilor de *Enterococcus* spp. izolate din ulcere trofice (%)

Toate tulpinile de microorganisme izolate din ulcere trofice au demonstrat o capacitate înaltă de formare a biofilmelor (>70%).

Studierea factorilor de virulență a microorganismelor izolate din ulcere trofice a arătat că nivelul de exprimare este mai mare la tulpinile izolate din infecții mixte și multirezistente la antimicrobiene (de 1,0-1,5 ori), în comparație cu tulpinile izolate din monoinfecție și sensibile la antimicrobiene ($p=0,348$).

4. ACTIVITATEA ANTIMICROBIANĂ A COMPUȘILOR NOI DE ORIGINE CHIMICĂ ȘI BIOLOGICĂ

4.1. Rezultatele evaluării activității antimicrobiene a substanțelor chimice și biologice noi

Compușii chimici luați în studiu au fost sintetizați în urma interacțiunii soluțiilor etanolice fierbinți (50-55°C) de imidazol sau de 3,4-dimetilpiridină (în cazul II) cu trihidratul nitrului de cupru(2+) și N-(prop-2-en-1-il)-2-[1-(piridin-2-il)etiliden]hidrazincarbotoamidă (4-aliltiosemicarbazona 2-acetilpiridinei), luate în raport molar 2:1:1. Mecanismul reacției constă în adăugarea a două molecule de amină la ionul de cupru (2+) cu formarea aductului, care interacționează cu 4-aliltiosemicarbazona 2-acetilpiridinei, având rolul de ligand-N,N,S tridentat monodeprotonat. Ulterior, o moleculă de amină este substituită cu azometina polidentată, rezultând nitrul de imidazoliu sau 3,4-dimetilpiridiniu prin deprotonarea tiosemicarbazonei. Locurile patru și cinci, din sfera coordinativă a acestui atom central, sunt ocupate de 10 nitril-ion și de molecula de amină rămasă.

Cea mai înaltă activitate bacteriostatică și bactericidă asupra bacteriilor *S. aureus* ATCC 25923 au manifestat-o compușii $C_{14}H_{20}ClCuN_3O_6S$ (CMI – 0,03 $\mu\text{g/ml}$; CMB – 0,98 $\mu\text{g/ml}$) și $C_{18}H_{22}CuN_6O_3S$ (CMI – 0,06 $\mu\text{g/ml}$; CMB – 0,24 $\mu\text{g/ml}$).

Asupra tulpinilor de *B. cereus* ATCC 11778, cea mai înaltă activitate a demonstrat-o compusul chimic $C_{10}H_{12}CuN_6O_6S$, manifestând o acțiune bacteriostatică la concentrația de 0,007 $\mu\text{g/ml}$ și bactericidă la concentrația de 0,03 $\mu\text{g/ml}$. Activitate înaltă asupra tulpinilor de *B. cereus* ATCC 11778 a demonstrat compusul $C_{11}H_{13}BrCuN_4S$ (CMI – 0,06 $\mu\text{g/ml}$; CMB – 0,12 $\mu\text{g/ml}$).

Tulpinile de *B. subtilis* ATCC 6633 s-au dovedit a fi mai sensibile la compușii testați, în comparație cu tulpinile de *B. cereus* ATCC 11778. Cea mai înaltă a fost activitatea compusului $C_{10}H_{12}CuN_6O_6S$ (CMI – 0,007 $\mu\text{g/ml}$; CMB – 0,03 $\mu\text{g/ml}$).

Dintre toate bacteriile gram-pozitive testate, specia *S. pyogenes* ATCC 12344 a fost cea mai sensibilă la acțiunea compușilor chimici luați în studiu. Cea mai înaltă activitate asupra acestor bacterii au demonstrat-o compușii $C_{24}H_{32}Cu_2N_8O_6S_2$ și $C_{11}H_{14}CuN_6O_6S$, CMI – 0,002 $\mu\text{g/ml}$ și CMB – 0,003 $\mu\text{g/ml}$ pentru ambii compuși.

Majoritatea compușilor chimici testați au avut efect bacteriostatic și bactericid asupra tulpinilor de enterococi în concentrații mai mari, în comparație cu alte specii gram-pozitive. Cea mai înaltă activitate asupra *E. faecalis* ATCC 19433 a demonstrat-o compusul $C_{11}H_{13}BrCuN_4S$ (CMI - 0,06 $\mu\text{g/ml}$ și CMB – 0,12 $\mu\text{g/ml}$), iar asupra *E. faecium* ATCC 6569 – compusul $C_{11}H_{14}CuN_6O_6S$ (CMI – 0,12 $\mu\text{g/ml}$ și CMB – 0,24 $\mu\text{g/ml}$).

Conform rezultatelor obținute, compușii $C_{11}H_{14}CuN_6O_6S$ și $C_{11}H_{13}BrCuN_4S$ manifestă acțiune bacteriostatică și bactericidă asupra bacteriilor gram-pozitive în concentrații mici.

CMI și CMB ale compușilor luați în studiu au fost determinate și pentru bacteriile gram-negative fermentative (*E. coli* ATCC 25922, *P. mirabilis* ATCC 25933, *K. pneumoniae* ATCC 13883, *E. cloacae* ATCC 13047) și nonfermentative (*P. aeruginosa* ATCC 27853, *A. baumannii* BAA-747).

Analiza rezultatelor obținute a arătat că asupra tulpinilor de *E. coli* ATCC 25922 au manifestat activitate mai înaltă compusul chimic $C_{11}H_{14}CuN_6O_6S$, CMI – 0,24 $\mu\text{g/ml}$ și CMB - 0,49 $\mu\text{g/ml}$. Activitate la concentrații de 1,95 $\mu\text{g/ml}$ (CMI) și de 3,91 $\mu\text{g/ml}$ (CMB) au manifestat și compușii $C_{10}H_{12}CuN_6O_6S$ și $C_{24}H_{32}Cu_2N_8O_6S_2$.

Alte specii de *Enterobacteriaceae* (*K. pneumoniae* ATCC 13883, *P. mirabilis* ATCC 25933 și *E. cloacae* ATCC 13047) s-au dovedit a fi mai rezistente la toți compușii chimici testați, în comparație cu specia *E. coli* ATCC 13047.

Tulpinile de *K. pneumoniae* ATCC 13883 au fost mai sensibile la compușii $C_{10}H_{12}CuN_6O_6S$, $C_{10}H_{11}BrCuN_4S$ și $C_{24}H_{32}Cu_2N_8O_6S_2$, CMI și CMB constituind 1,95 $\mu\text{g/ml}$ și 3,91 $\mu\text{g/ml}$ respectiv.

Compușii $C_{10}H_{12}CuN_6O_6S$ și $C_{11}H_{14}CuN_6O_6S$ au fost mai activi asupra bacteriilor *P. mirabilis* ATCC 25933, exercitând efect bactericid la concentrația de 3,91 $\mu\text{g/ml}$, iar bacteriostatic la concentrația de 1,95 $\mu\text{g/ml}$.

Tulpinile de *E. cloacae* ATCC 13047 au demonstrat o sensibilitate mai înaltă la compușii $C_{10}H_{11}BrCuN_4S$ și $C_{11}H_{14}CuN_6O_6S$, CMI constituind 0,98 $\mu\text{g/ml}$, iar CMB – 1,95 $\mu\text{g/ml}$.

Compușii chimici testați au manifestat activitate antimicrobiană asupra tulpinilor de bacili gram-negativi nonfermentativi în concentrații mai mari. Astfel, cel mai activ compus asupra tulpinilor de *A. baumannii* BAA-747 s-a dovedit a fi $C_{11}H_{14}CuN_6O_6S$; CMI – 0,98 $\mu\text{g/ml}$ și CMB – 1,95 $\mu\text{g/ml}$. Tulpinile de *P. aeruginosa* ATCC 27853 au demonstrat o sensibilitate mai înaltă la compușii $C_{10}H_{11}BrCuN_4S$, $C_{11}H_{14}CuN_6O_6S$ și $C_{11}H_{13}BrCuN_4S$; CMI și CMB constituind 3,91 $\mu\text{g/ml}$ și 7,81 $\mu\text{g/ml}$ respectiv.

Toate bacteriile gram-negative de referință au prezentat rezistență la patru compuși chimici testați în concentrații de 500 µg/ml: $C_{14}H_{20}ClCuN_3O_6S$, $C_{15}H_{20}N_4NiO_2S$, $C_{11}H_{11}Br_2CuN_3O_2S$ și $C_{16}H_{14}Br_2CuN_4OS$. Compusul $C_{18}H_{22}CuN_6O_3S$ a demonstrat activitate doar asupra tulpinilor de *A. baumannii* BAA-747 în concentrații mari: CMI – 333,3 µg/ml și CMB - 500 µg/ml.

La următoarea etapă a fost determinată acțiunea compușilor chimici luați în studiu asupra micetelor levuriforme (*C. albicans* ATCC 10231 și *C. neoformans* CECT 1043). În conformitate cu rezultatele obținute, cea mai înaltă activitate antifungică asupra micetelor *C. albicans* ATCC 10231 au demonstrat compușii $C_{24}H_{23}CuN_7O_7S$ și $C_{18}H_{22}CuN_6O_3S$; CMI 0,49 µg/ml și 0,98 µg/ml, iar CMF 15,6 µg/ml și 1,96 µg/ml respectiv. Asupra micetelor *C. neoformans* CECT 1043 o activitate antifungică marcantă au demonstrat compușii $C_{18}H_{20}CuN_4O_2S$ (CMI – 0,03 µg/ml, CMF – 0,06 µg/ml), $C_{14}H_{20}N_4S$ (CMI – 0,12 µg/ml, CMF – 0,24 µg/ml) și $C_{14}H_{19}CuN_7O_4S$ (CMI – 0,24 µg/ml, CMF – 0,24 µg/ml). Ceilalți compuși testați au manifestat activitate antifungică în concentrații mai mari, cu excepția compusului $C_{11}H_{11}Br_2CuN_3O_2S$, care nu a fost activ asupra micetelor *C. neoformans* CECT 1043 în concentrație de 500 µg/ml. Micetele levuriforme *C. neoformans* CECT 1043 au fost inhibitate și omorâte la concentrații mai mici ale compușilor chimici, comparativ cu micetele *C. albicans* ATCC 10231.

Compușii biologici utilizați în cercetare (*ES*, *ES1*, *ES2*, *MX1* și *MX2*) reprezintă extracte de cianobacteria *Spirulina platensis* CNMN CB-02. La testarea acțiunii antimicrobiene a acestor extracte pe tulpini de referință gram-pozitive, activitate mai înaltă au manifestat compușii *MX1*, *MX2* și *ES*. Cea mai înaltă activitate antimicrobiană asupra bacteriilor gram-pozitive a demonstrat-o compusul *MX1* (CMI – 0,004-0,02 mg/ml; CMB – 0,009-0,04 mg/ml), urmat în ordinea descreșterii activității de *MX2* (CMI – 0,01-0,03 mg/ml; CMB – 0,01-0,05 mg/ml) și de *ES* (CMI – 0,16-0,62 mg/ml; CMB – 0,16-1,25 mg/ml). Compușii *ES1* și *ES2* au manifestat activitate antimicrobiană la concentrații mai mari (CMI-1,25-2,5 mg/ml; CMB -1,25-5,0 mg/ml).

În prezentul studiu a fost testată și acțiunea antimicrobiană a compușilor biologici asupra bacteriilor gram-negative. Conform datelor obținute, mai sensibile la acțiunea compusului *MX1* s-au dovedit a fi *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853 și *A. baumannii* BAA-747, CMI – 0,009 mg/ml, iar CMB – 0,02 mg/ml. Activitate înaltă asupra bacteriilor gram-negative a manifestat și compusul *MX2* (CMI – 0,02-0,03 mg/ml; CMB – 0,03 mg/ml), urmat de *ES* (CMI – 0,625-1,25 mg/ml; CMB – 1,25-2,5 mg/ml). Extractele *ES1* și *ES2* au demonstrat efect antimicrobian asupra tuturor speciilor de bacili gram-negativi, însă în concentrații mai mari (CMI – 1,25-5,0 mg/ml; CMB – 2,5-5,0 mg/ml).

Acțiunea antimicotică a extractelor de spirulină a fost studiată pe două tulpini de micete levuriforme *C. albicans* ATCC 10231 și *C. neoformans* CECT 1043. O activitate antimicotică mai înaltă a demonstrat compusul *MX2* (CMI – 0,007 mg/ml; CMF – 0,01 mg/ml), urmat în ordinea descreșterii activității antimicotice de extractele *MX 1* (CMI – 0,05 mg/ml; CMF – 0,09 mg/ml) și *ES* (CMI – 0,31-0,62 mg/ml; CMF – 0,62-1,25 mg/ml). Ca și în cazul efectului antibacterian, extractele

ES1 și ES2 au exercitat activitate antimicrobică în concentrații mai mari (CMI – 0,62-1,25 mg/ml; CMF – 1,25-2,5 mg/ml).

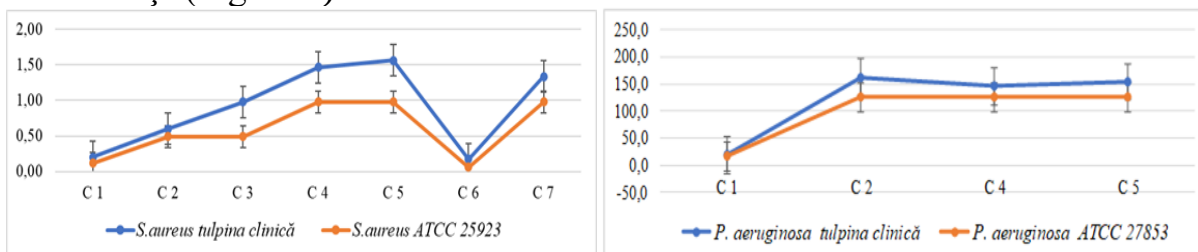
Pentru determinarea toxicității compușilor chimici, am efectuat testul de imobilizare a crustaceului *Daphnia magna*, conform unei proceduri europene standardizate. În conformitate cu procedura menționată a fost determinată toxicitatea acută (CL₅₀), a compușilor chimici selectați față dafnii. Pentru determinarea toxicității compușilor chimici noi s-a utilizat crustaceul *Daphnia magna*, efectuând testul de imobilizare. Analizând rezultatele obținute am constatat că, atât ligandul (CL₅₀ 5,53±0,90), cât și compușii coordinativi ai cuprului (Cu L Br – CL₅₀ 4,4±0,96; Cu L Cl – CL₅₀ 3,5±0,91) au demonstrat o toxicitate mai redusă în comparație cu preparatul medicamentos clorhidratul de doxorubicină (CL₅₀ 3,27±0,30).

4.2. Activitatea antimicrobiană a compușilor chimici și biologici noi asupra tulpinilor izolate din ulcere trofice

În prezentul studiu au fost testați șapte compuși chimici pe 120 de tulpini clinice ale speciilor *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii* și *P. aeruginosa*, izolate din ulcere trofice. Cea mai mică concentrație minimă inhibitoare asupra tulpinilor clinice de *S. aureus* a fost înregistrată pentru compușii chimici C₁₄H₂₀N₄S (CMI: 0,17±0,098) și C₁₀H₁₄CuN₄O₅S₂ (CMI: 0,20±0,113). Compușii C₁₀H₁₄CuN₄O₅S₂ (CMI: 3,19±2,018 – 18,8±6,36) și C₁₄H₁₉CuN₇O₄S au manifestat activitate inhibitorie asupra tulpinilor de *A. baumannii* în concentrații inhibitoare minime (CMI: 0,17±0,098).

CMI și CMB ale compușilor biologici ES, ES1, ES2, MX1 și MX2 a fost studiată pe 120 de tulpini de microorganisme gram-pozitive și gram-negative izolate din ulcere trofice.

Activitate inhibitoare și bactericidă în concentrații mici asupra tulpinilor clinice au demonstrat compușii biologici MX1 (CMI: 0,01±0,001 – 0,02±0,003) și MX2 (CMI: 0,015±0,003 – 0,03±0,007). Acești compuși biologici au exercitat activitate inhibitoare asupra bacililor gram-negativi în concentrații mai mici, comparativ cu tulpinile de *S. aureus*. Compararea concentrațiilor minime inhibitoare ale compușilor chimici asupra tulpinilor de referință și a celor clinice, atât de bacterii gram-pozitive, cât și gram-negative, a arătat că unii compuși au exercitat efect inhibitor asupra tulpinilor clinice în concentrații mai mari, decât în cazul tulpinilor de referință (Figura 4).



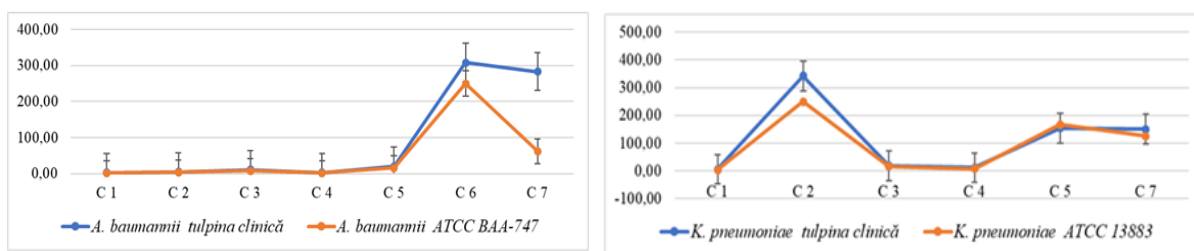


Figura 4. Acțiunea compușilor chimici asupra tulpinilor de referință și tulpinilor izolate din ulcere trofice

Concentrația minimă bactericidă pentru tulpinile clinice de *S. aureus* a fost mai mare decât pentru tulpinile de referință, în special pentru compușii chimici $C_{13}H_{17}ClCuN_4S$, $C_{18}H_{22}CuN_6O_3S$ și $C_{13}H_{16}Br_2CuN_4S$ (CMI tulpini referință – 0,49 $\mu\text{g/mL}$, 0,98 $\mu\text{g/mL}$, 0,98 $\mu\text{g/mL}$; CMI tulpini clinice – 0,98 $\mu\text{g/mL}$, 1,46 $\mu\text{g/mL}$ și 1,56 $\mu\text{g/mL}$, respectiv).

Pentru tulpinile clinice de *A. baumannii*, în raport cu cele de referință, CMI pentru compușii $C_{14}H_{19}ClCuN_4S$ și $C_{14}H_{20}N_4S$ s-au majorat considerabil de la 62,5 $\mu\text{g/mL}$ până la 283,3 $\mu\text{g/mL}$ și de la 250 $\mu\text{g/mL}$ până la 308,3 $\mu\text{g/mL}$ respectiv. Pentru restul compușilor testați, CMI pentru tulpinile clinice de *A. baumannii* nu s-a majorat considerabil, în comparație cu CMI pentru tulpinile de referință.

La compararea acțiunii compușilor chimici luați în studiu asupra tulpinilor clinice și de referință de *K. pneumoniae* și de *P. aeruginosa* s-a constatat că CMI pentru compusul $C_{18}H_{20}CuN_4O_2S$ s-a majorat considerabil. Pentru tulpinile de *K. pneumoniae*, CMI s-a majorat de două ori, de la 250 $\mu\text{g/mL}$ până la 500,0 $\mu\text{g/mL}$, iar pentru tulpinile de *P. aeruginosa* de la 125 $\mu\text{g/mL}$ până la 266,7 $\mu\text{g/mL}$.

În studiu a fost comparată și acțiunea compușilor biologici asupra tulpinilor de referință și a celor clinice (Figura 5).

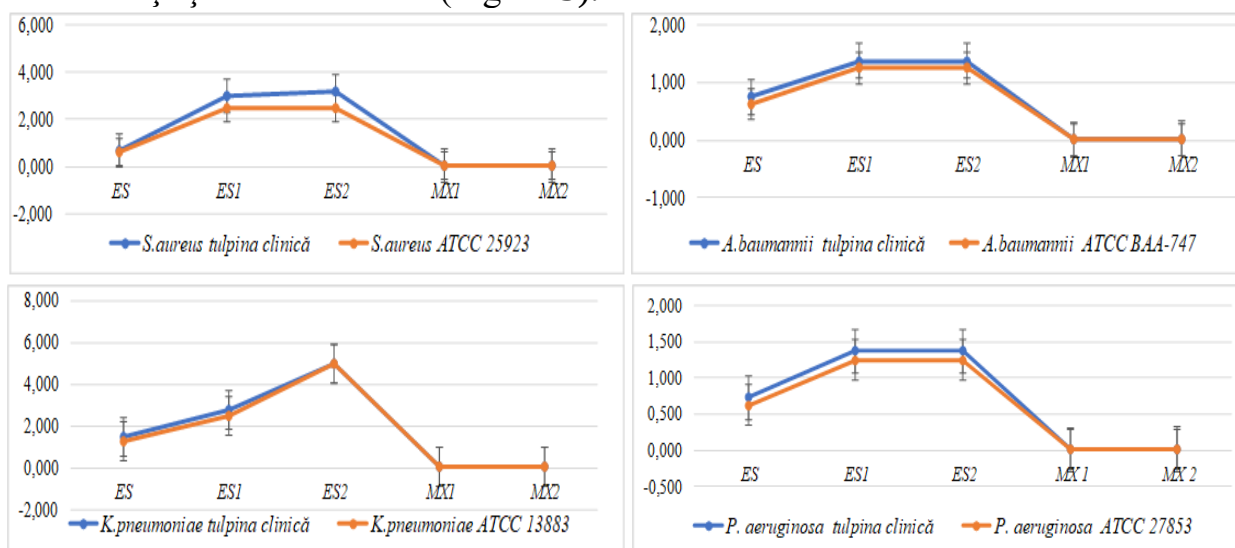


Figura 5. Acțiunea compușilor biologici asupra tulpinilor de referință și tulpinilor izolate din ulcere trofice

Analiza rezultatelor obținute a arătat că compușii biologici MX1 și MX2 au manifestat activitate antibacteriană asupra tulpinilor de referință și clinice în aceleași concentrații.

4.3. Acțiunea sinergică a compușilor chimici și biologici noi

Pentru a determina tipul de interacțiune între compușii chimici și biologici noi au fost testați șapte compuși chimici ($C_{18}H_{20}CuN_4O_2S$, $C_{14}H_{20}N_4S$, $C_{14}H_{19}ClCuN_4S$,

$C_{10}H_{14}CuN_4O_5S_2$, $C_{13}H_{17}ClCuN_4S$, $C_{14}H_{19}CuN_7O_4S$, $C_{13}H_{16}Br_2CuN_4S$) în combinație cu trei compuși biologici (*ES*, *ES1*, *MX1*) pe șase tulpini de referință.

Valorile indicelui FIC, care reprezintă concentrația inhibitoare a fracțiunilor, determinate în prezentul studiu, indică în 87,2% de cazuri acțiuni sinergice, în 6,8% – acțiuni aditive și în 6,0% – acțiuni indiferente. Acțiuni antagoniste între compușii testați nu au fost puse în evidență (FIC>4).

Testarea compusului chimic $C_{14}H_{19}CuN_7O_4S$ în asociere cu cei trei compuși biologici luați în studiu, în majoritatea cazurilor a arătat sinergism, cu excepția tulpinilor de *P. aeruginosa*, pentru care s-a înregistrat aditivitate și indiferență în combinație cu compușii biologici *ES* și *ES1*.

Compusul chimic $C_{13}H_{16}Br_2CuN_4S$ în toate combinațiile a manifestat sinergism asupra microorganismelor de referință, cu excepția combinației cu compusul biologic *ES1* asupra tulpinilor de *P. aeruginosa*, unde a manifestat indiferență (FIC=1,56).

$C_{10}H_{14}CuN_4O_5S_2$, în combinație cu compușii biologici selectați pentru testare, în 72,2 % de cazuri a manifestat sinergism, în 22,2 % – aditivitate și în 5,6% – indiferență asupra tulpinilor de referință.

Compusul $C_{13}H_{17}ClCuN_4S$ în combinație cu toți compușii biologici luați în studiu a manifestat în special acțiune sinergică (94,4 %) și doar în 5,6 % de cazuri acțiune aditivă.

Compusul $C_{18}H_{20}CuN_4O_2S$ în combinație cu *ES1* a prezentat acțiune indiferentă asupra tulpinilor de *E. coli* și de *P. aeruginosa*, iar în combinație cu *ES* a fost indiferent doar asupra tulpinilor de *P. aeruginosa*.

$C_{14}H_{20}N_4S$ a prezentat indiferență asupra tulpinilor de *A. baumannii* în combinație cu *ES1* și aditivitate în combinație cu *ES*.

Compusul $C_{14}H_{19}ClCuN_4S$, în combinație cu *ES1*, a prezentat efect aditiv asupra tulpinilor de *E. coli*.

Toți compușii chimici testați în combinație cu compusul biologic *MX* au prezentat acțiune sinergică asupra tuturor tulpinilor de referință. Combinațiile testate dintre compușii chimici și biologici au manifestat acțiune aditivă și indiferentă în special asupra bacililor gram-negativi și micetelor levuriforme din genul *Candida*.

În combinații, concentrațiile minime de inhibiție ale compușilor chimici și biologici au fost cu mult mai mici decât ale compușilor separați, obținând o reducere de 4-32 de ori.

Pentru fiecare tulpină de referință s-au înregistrat profiluri diferite ale timpului de omorâre a acestora pe o perioadă de 24 ore după inoculare. Conform rezultatelor obținute, în primele 30 de min după inoculare nu s-a atestat o creștere a tulpinilor de referință. Diferențe în activitatea antimicrobiană a compușilor testați asupra tulpinilor de referință au fost puse în evidență după 90 min de la incubare. În tuburile-martori nu s-a înregistrat o reducere a numărului de UFC. Utilizarea individuală a compușilor chimici și biologici, la o concentrație de 0,25CMI, nu a indus moartea microorganismelor timp de 24 ore. În schimb, la testarea compușilor chimici și biologici în combinație s-a observat o reducere semnificativă a numărului de microorganisme.

Compusul chimic $C_{14}H_{19}CuN_7O_4S$ în combinația 0,25CMI $C_{14}H_{19}CuN_7O_4S$ + 0,25CMI *MX* a manifestat acțiune bactericidă asupra tulpinilor de *S.aureus* după 8 ore de acțiune. Combinația 0,25CMI $C_{14}H_{19}CuN_7O_4S$ + 0,25CMI *ES* a distrus complet tulpinile de *S. aureus* după 20 de ore de acțiune, iar 0,25CMI $C_{14}H_{19}CuN_7O_4S$ + 0,25CMI *ES1* – după 24 de ore. Tulpinile de bacili gram-negativi *E. coli* și *A. baumannii* au fost ucise după 12 ore de acțiune a combinației 0,25CMI $C_{14}H_{19}CuN_7O_4S$ + 0,25CMI *MX* și după 20 și respectiv 24 de ore de acțiune a combinațiilor 0,25CMI $C_{14}H_{19}CuN_7O_4S$ + 0,25CMI *ES* și 0,25CMI $C_{14}H_{19}CuN_7O_4S$ + 0,25CMI *ES1* (Figura 6).

Combinația 0,25CMI $C_{14}H_{19}CuN_7O_4S$ + 0,25CMI *MX* a demonstrat efect fungicid asupra micetelor levuriforme *C. albicans* după 20 de ore de acțiune, iar combinațiile 0,25CMI $C_{14}H_{19}CuN_7O_4S$ + 0,25CMI *ES* și 0,25CMI $C_{14}H_{19}CuN_7O_4S$ + 0,25CMI *ES1* – după 24 de ore.

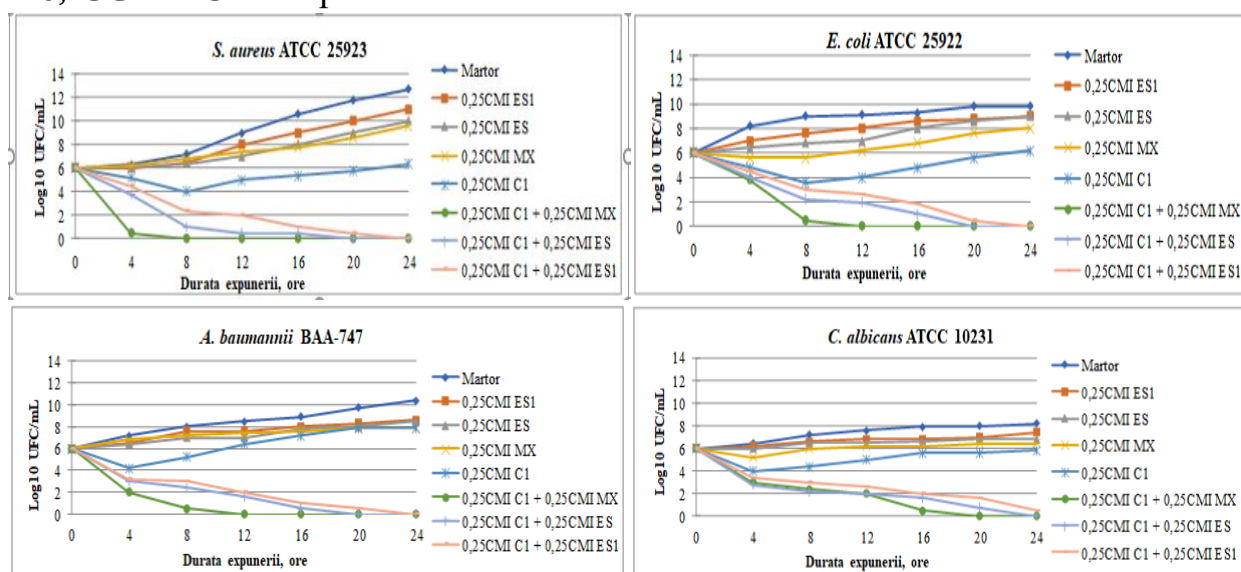
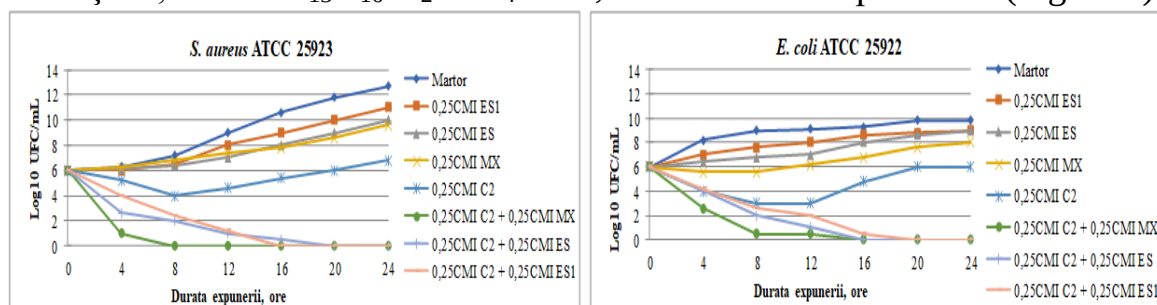


Figura 6. Cinetica activității antimicrobiene a compusului chimic $C_{14}H_{19}CuN_7O_4S$ și a compușilor biologici (*ES*, *ES1*, *MX*) asupra tulpinilor de referință

Notă. Valorile sunt exprimate ca media $\pm$ DS a trei valori independente, rezultatele fiind în intervalele de încredere 95%-99%

Compusul chimic $C_{13}H_{16}Br_2CuN_4S$, în combinație cu compusul biologic *MX* (0,25CMI $C_{13}H_{16}Br_2CuN_4S$ + 0,25CMI *MX*), a prezentat efect bactericid asupra tulpinilor de *S.aureus* după 8 ore de acțiune. Combinația 0,25CMI $C_{13}H_{16}Br_2CuN_4S$ + 0,25CMI *ES* a omorât tulpinile de *S. aureus* după o expunere de 20 de ore, iar combinația 0,25CMI $C_{13}H_{16}Br_2CuN_4S$ + 0,25CMI *ES1* – după 16 ore (Figura 7).



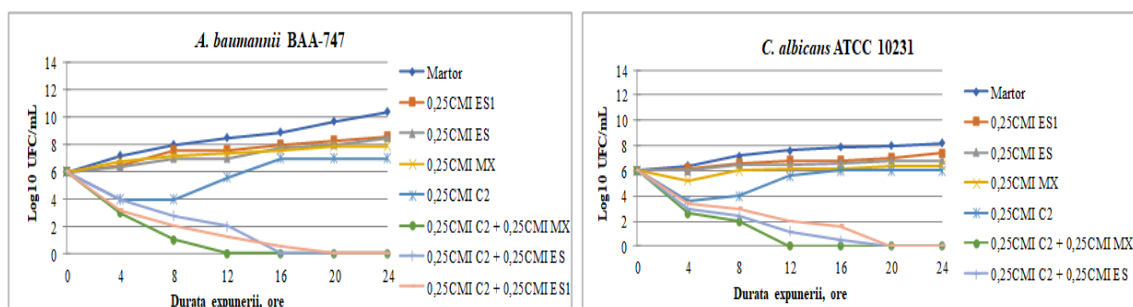


Figura 7. Cinetica activității antimicrobiene a compusului chimic $C_{13}H_{16}Br_2CuN_4S$ și a compușilor biologici (ES, ES1, MX) asupra tulpinilor de referință

Notă. Valorile sunt exprimate ca media $\pm$ DS a trei valori independente, rezultatele fiind în intervalele de încredere 95%-99%

E. coli a fost omorâtă după 16 ore de acțiune a combinațiilor 0,25CMI $C_{13}H_{16}Br_2CuN_4S$ + 0,25CMI MX și 0,25CMI $C_{13}H_{16}Br_2CuN_4S$ + 0,25CMI ES, și după 20 de ore de acțiune a combinației 0,25CMI $C_{13}H_{16}Br_2CuN_4S$ + 0,25CMI ES1.

Tulpinile de *A. baumannii* au fost omorâte după 12 ore de acțiune a combinației 0,25CMI $C_{13}H_{16}Br_2CuN_4S$ + 0,25CMI MX și după 16 ore și respectiv 20 de ore de acțiune a combinațiilor 0,25CMI $C_{13}H_{16}Br_2CuN_4S$ + 0,25CMI ES și 0,25CMI $C_{13}H_{16}Br_2CuN_4S$ + 0,25CMI ES1 (Figura 8).

Combinația 0,25CMI $C_{13}H_{16}Br_2CuN_4S$ + 0,25CMI MX a demonstrat efect fungicid asupra micetelor levuriforme *C. albicans* după o expunere de 12 ore, iar combinațiile 0,25CMI $C_{13}H_{16}Br_2CuN_4S$ + 0,25CMI ES și 0,25CMI $C_{13}H_{16}Br_2CuN_4S$ + 0,25CMI ES1 – după 20 de ore de acțiune.

Combinația compusului chimic $C_{10}H_{14}CuN_4O_5S_2$ cu compusul biologic MX (0,25CMI $C_{10}H_{14}CuN_4O_5S_2$ + 0,25CMI MX) a manifestat efect bactericid asupra tulpinilor de *S. aureus* după 12 ore de acțiune, iar combinațiile 0,25CMI $C_{10}H_{14}CuN_4O_5S_2$ + 0,25CMI ES și 0,25CMI $C_{10}H_{14}CuN_4O_5S_2$ + 0,25CMI ES1 după 16 și respectiv 24 de ore (Figura 8).

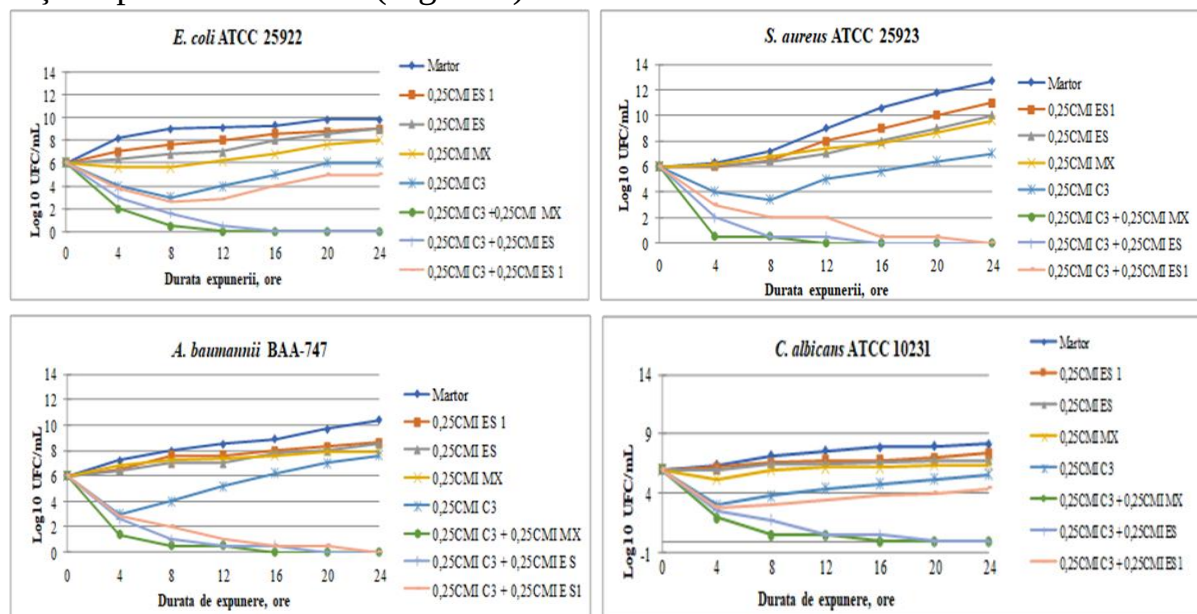


Figura 8. Cinetica activității antimicrobiene a compusului chimic $C_{10}H_{14}CuN_4O_5S_2$ și a compușilor biologici (ES, ES1, MX) asupra tulpinilor de referință

Notă. Valorile sunt exprimate ca media $\pm$ DS a trei valori independente, rezultatele fiind în intervalele de încredere 95%-99%

Comparațiile 0,25CMI $C_{10}H_{14}CuN_4O_5S_2$ + 0,25CMI MX și 0,25CMI $C_{10}H_{14}CuN_4O_5S_2$ + 0,25CMI ES au demonstrat acțiune bactericidă asupra tulpinilor de *E. coli* după 12 ore și respectiv 16 ore de acțiune. Combinația 0,25CMI $C_{10}H_{14}CuN_4O_5S_2$ + 0,25CMI ES1 nu a manifestat efect bactericid asupra tulpinilor de *E. coli*.

Tulpinile *A. baumannii* au fost omorâte după 16 ore de acțiune a combinației 0,25CMI $C_{10}H_{14}CuN_4O_5S_2$ + 0,25CMI MX1 și după 20 de ore și respectiv 24 de ore de acțiune a combinațiilor 0,25CMI $C_{10}H_{14}CuN_4O_5S_2$ + 0,25CMI ES și 0,25CMI $C_{10}H_{14}CuN_4O_5S_2$ + 0,25CMI ES1.

Comparațiile 0,25CMI $C_{10}H_{14}CuN_4O_5S_2$ + 0,25CMI MX și 0,25CMI $C_{10}H_{14}CuN_4O_5S_2$ + 0,25CMI ES au demonstrat efect fungicid asupra micetelor levuriforme *C. albicans* peste 16 ore și respectiv 20 de ore de acțiune, iar combinația 0,25CMI $C_{10}H_{14}CuN_4O_5S_2$ + 0,25CMI ES1 nu a manifestat efect fungicid (Figura 8).

La analiza acțiunii bactericide a combinațiilor compusului chimic $C_{13}H_{17}ClCuN_4S$ cu compușii biologici incluși în studiu s-a constatat că combinația 0,25CMI $C_{13}H_{17}ClCuN_4S$ + 0,25CMI MX exercită efect bactericid asupra tulpinilor de *S. aureus* după 12 ore de acțiune, iar combinațiile 0,25CMI $C_{13}H_{17}ClCuN_4S$ + 0,25CMI ES și 0,25CMI $C_{13}H_{17}ClCuN_4S$ + 0,25CMI ES1 după 16 ore și respectiv 20 de ore de expunere (Figura 9).

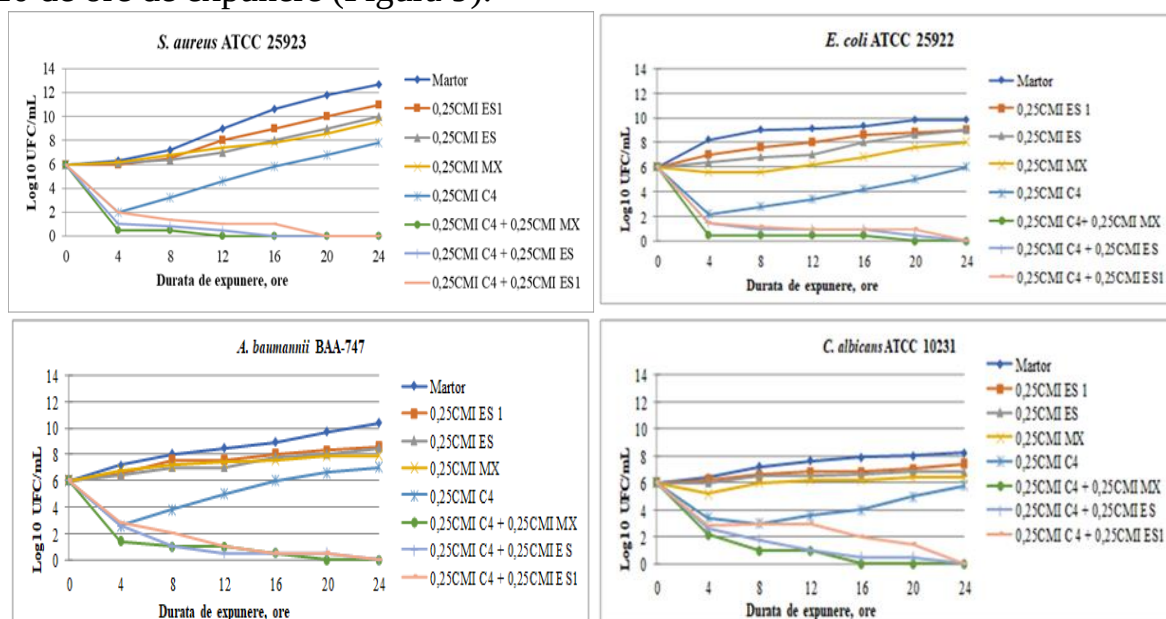


Figura 9. Cinetica activității antimicrobiene a compusului chimic $C_{13}H_{17}ClCuN_4S$ și a compușilor biologici (ES, ES1, MX) asupra tulpinilor de referință.

Notă. Valorile sunt exprimate ca media $\pm$ DS a trei valori independente, rezultatele fiind în intervalele de încredere 95%-99%

Combinația 0,25CMI $C_{13}H_{17}ClCuN_4S$ + 0,25CMI MX a demonstrat acțiune bactericidă asupra tulpinilor de *E. coli* și de *A. baumannii* după 20 ore de acțiune, iar combinațiile 0,25CMI $C_{13}H_{17}ClCuN_4S$ + 0,25CMI ES și 0,25CMI $C_{13}H_{17}ClCuN_4S$ + 0,25CMI ES1 au distrus bacilii gram-negativi după 24 ore de acțiune.

Combinația 0,25CMI $C_{13}H_{17}ClCuN_4S$ + 0,25CMI MX a manifestat efect fungicid asupra micetelor levuriforme *C. albicans* după 16 ore de expunere, iar combinațiile 0,25CMI $C_{13}H_{17}ClCuN_4S$ + 0,25CMI ES și 0,25CMI $C_{13}H_{17}ClCuN_4S$

+ 0,25CMI *ES1* după 24 de ore (Figura 9). Cele mai eficiente s-au dovedit a fi combinațiile dintre compușii chimici cu compusul biologic *MX*, tulpinile de referință fiind omorâte după 8, 12, 16 și 20 de ore de expunere la aceste combinații.

4.4. Influența compușilor noi asupra factorilor de patogenitate a microorganismelor

Pe lângă diversele mecanisme de rezistență la preparatele antimicrobiene, microorganismele mai sunt dotate și cu diverși factori de patogenitate, responsabili de inițierea unor efecte letale mai mari.

În prezentul studiu a fost testată influența compușilor chimici și biologici luați în studiu, în diferite concentrații, asupra activității anticomplementare a microorganismelor pe 80 de tulpini microbiene gram-pozitive și gram-negative, care inițial au inactivat complementul la concentrații de 15CH50/mL (Figura 10).

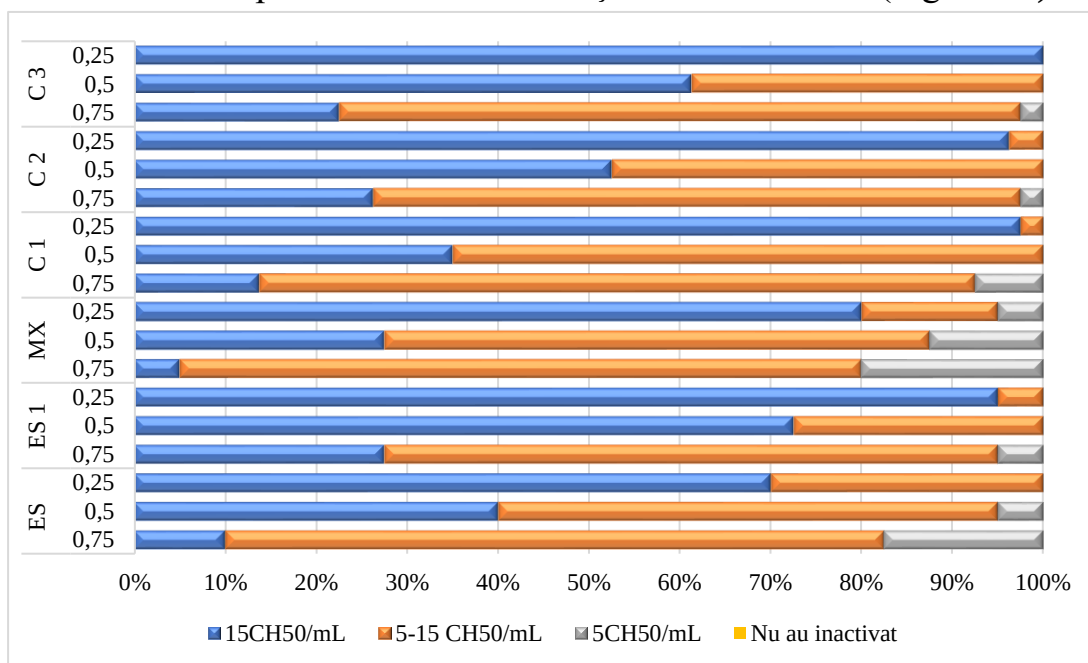


Figura 10. Activitatea anticomplementară a microorganismelor sub acțiunea compușilor chimici și biologici

Notă. C1 - $C_{14}H_{19}CuN_7O_4S$, C2 - $C_{13}H_{16}Br_2CuN_4S$, C3 - $C_{13}H_{17}ClCuN_4S$

Analiza rezultatelor obținute a arătat că compușii testați au diminuat cel mai mult activitatea anticomplementară a microorganismelor în concentrație de 75%. Compușii biologici, în special *MX1* și *ES*, au manifestat cel mai înalt nivel de acțiune asupra activității anticomplementare a tulpinilor testate. Sub acțiunea compusului biologic 75%*MX*, majoritatea tulpinilor (75,0 %) au inactivat complementul în concentrația de 5-15CH50/mL, iar 20,0% în concentrația de 5CH50/mL. Compusul biologic 75%*ES* la fel a diminuat activitatea anticomplementară a tulpinilor microbiene, în 72,5% de cazuri inactivând complementul în concentrația de 5-15CH50/mL, iar în 17,5% de cazuri în concentrația de 5CH50/mL.

Dintre compușii chimici, activitatea anticomplementară a fost mai exprimată la compusul $C_{14}H_{19}CuN_7O_4S$ (concentrația 75%). Sub acțiunea acestuia, 78,8% dintre tulpinile testate au inhibat complementul în concentrația de 5-15CH50/mL, 7,5% – în concentrația de 5-CH50/mL, iar 13,8% – în concentrația de 15CH50/mL.

La utilizarea compușilor, atât chimici cât și biologici, în concentrație de 25%, acțiunea anticomplementară a tulpinilor microbiene a fost diminuată puțin sau deloc. Trebuie menționat faptul că nici un compus nu a inhibat în totalitate proprietatea tulpinilor de a inactiva complementul.

La testarea activității anticomplementare a compușilor chimici și biologici în combinație, un efect mai pronunțat a manifestat combinația compușilor biologici *MX* și *ES* cu compușii chimici (Figura 11).

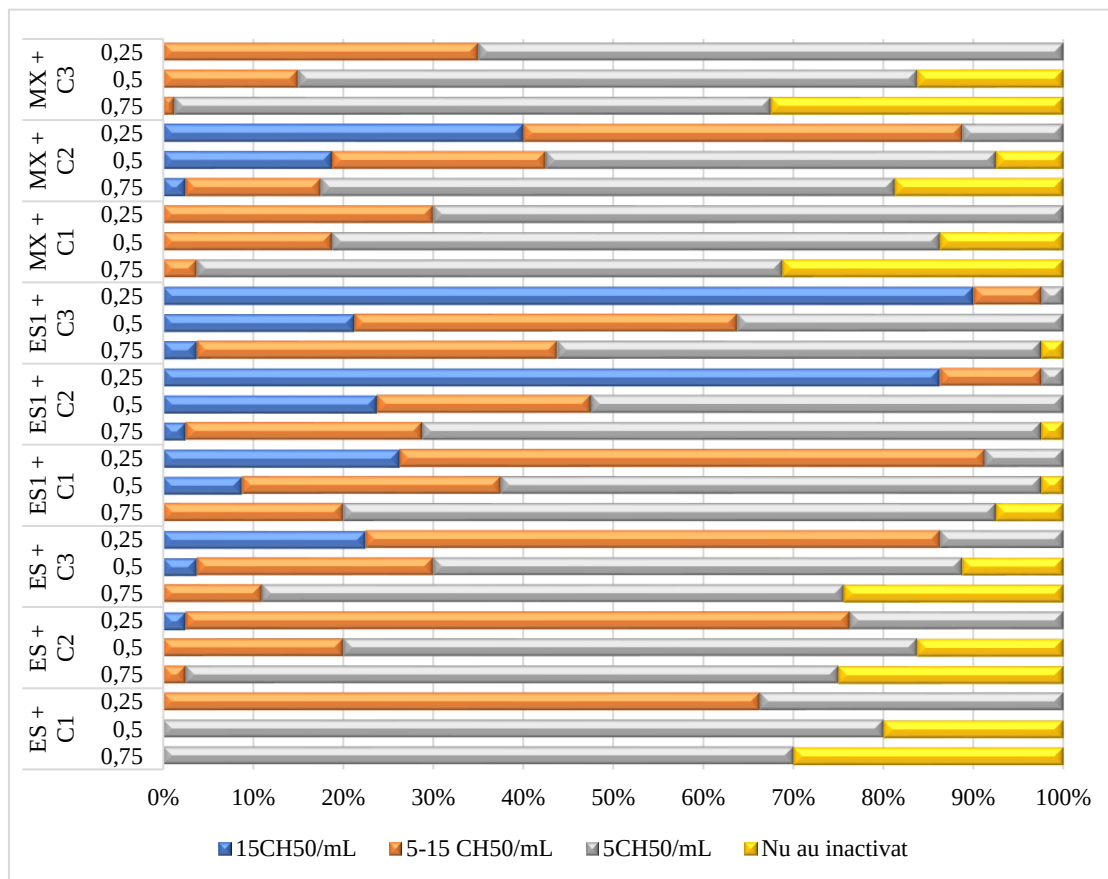


Figura 11. Activitatea anticomplementară a microorganismelor sub acțiunea compușilor chimici și biologici în combinație (%)

Notă. C1 - $C_{14}H_{19}CuN_7O_4S$, C2 - $C_{13}H_{16}Br_2CuN_4S$, C3 - $C_{13}H_{17}ClCuN_4S$

Combinațiile compusului biologic *MX* cu compușii chimici $C_{13}H_{17}ClCuN_4S$ și $C_{14}H_{19}CuN_7O_4S$ în concentrații de 75% au inactivat complet activitatea anticomplementară la 32,5% și respectiv 31,3% din tulpinile testate.

La testarea combinației compusului biologic *ES* cu compusul chimic $C_{14}H_{19}CuN_7O_4S$ monohidrat s-a constatat că la o concentrație de 75%, 70,0% de tulpini au inactivat complementul în concentrație de 5CH50/mL, iar 30,0% nu au manifestat acțiune anticomplementară. La testarea aceleiași combinații de compuși, dar la o concentrație de 50%, 80,0% de tulpini au inactivat complementul în concentrație de 5CH50/mL, iar 20,0% nu au inactivat complementul.

În studiu a fost determinată și manifestarea activității antilizozim de către tulpinile de *S. aureus* și de *E. coli* la acțiunea individuală a compușilor chimici și biologici luați în studiu (Figura 12).

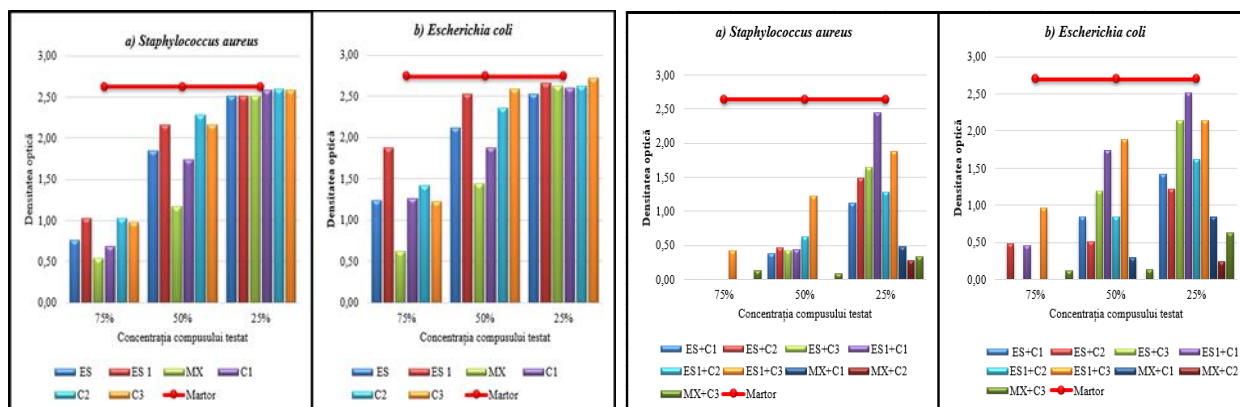


Figura 12. **Activitatea antilizozim a microorganismelor sub acțiunea compușilor chimici și biologici separat și în combinație**

Notă. C1 - $C_{14}H_{19}CuN_7O_4S$, C2 - $C_{13}H_{16}Br_2CuN_4S$, C3 - $C_{13}H_{17}ClCuN_4S$

În urma analizei rezultatelor obținute s-a constatat că atât compușii chimici, cât și cei biologici au inactivat activitatea antilizozim a tulpinilor testate, în comparație cu tulpinile-martori, care au manifestat un grad înalt de activitate antilizozim (K 2,62-2,74). La acțiunea compușilor biologici și chimici în concentrație de 25%, activitatea antilizozim a tulpinilor de *S. aureus* și de *E. coli* s-a menținut la un nivel înalt. Utilizarea compușilor testați în concentrații de 50% și de 70% a dus la micșorarea gradului de exprimare a activității antilizozim (grad mediu de exprimare) la ambele specii microbiene, cu excepția acțiunii compusului *ES1* (50%) asupra *E. coli*, care a manifestat un grad înalt de activitate antilizozim.

La utilizarea compușilor chimici și biologici în combinație (la concentrații de 50% și de 70%) s-a înregistrat un grad mic de exprimare a activității antilizozim la tulpinile de *S. aureus*, cu excepția combinației dintre 50% *ES1* și 50% $C_{13}H_{17}ClCuN_4S$, la care gradul de exprimare a activității antilizozim a fost mediu. Tulpinile de *E. coli*, la concentrația compușilor de 75%, au manifestat un grad mic de exprimare a activității antilizozim, cu excepția combinației dintre *ES1* și $C_{13}H_{17}ClCuN_4S$, la care s-a înregistrat un grad mediu de exprimare.

Combinațiile compușilor chimici cu compusul biologic *MX* au prezentat cel mai bun efect asupra exprimării activității antilizozim a tulpinilor microbiene testate. Combinațiile *MX* + $C_{14}H_{19}CuN_7O_4S$ și *MX* + $C_{14}H_{19}CuN_7O_4S$ la concentrațiile de 50% și 75% au redus la zero activitatea antilizozim a tulpinilor microbiene.

La utilizarea combinațiilor compușilor chimici cu compusul biologic *MX*, la concentrație de 25%, tulpinile microbiene au manifestat un grad mic de exprimare a activității antilizozim, cu excepția combinației *MX* + $C_{18}H_{22}CuN_6O_3S$, la care tulpinile de *E. coli* au înregistrat un grad mediu de exprimare a activității antilizozim (K= 0,63).

În studiu a fost determinată și influența compușilor chimici și biologici asupra formării biofilmelor microbiene (Figura 13). Conform rezultatelor obținute, la acțiunea compușilor chimici și biologici în concentrație de 25% și a compușilor *ES1* și $C_{13}H_{17}ClCuN_4S$ în concentrație de 50%, microorganismele au produs biofilm puternic ($DO > 0,220$). O acțiune antibiofilm mai bună au demonstrat acești compuși în concentrație de 75%, la care microorganismele au produs preponderent biofilm

moderat ($0,220 < DO < 0,112$), cu excepția compusului biologic *MX*, sub a cărei acțiune tulpinile au produs biofilm slab ($0,112 \leq DO < 0,056$). Tulpinile de *S. aureus* au produs biofilm slab și sub acțiunea compusului biologic *ES* și a compusului chimic $C_{13}H_{16}Br_2CuN_4S$.

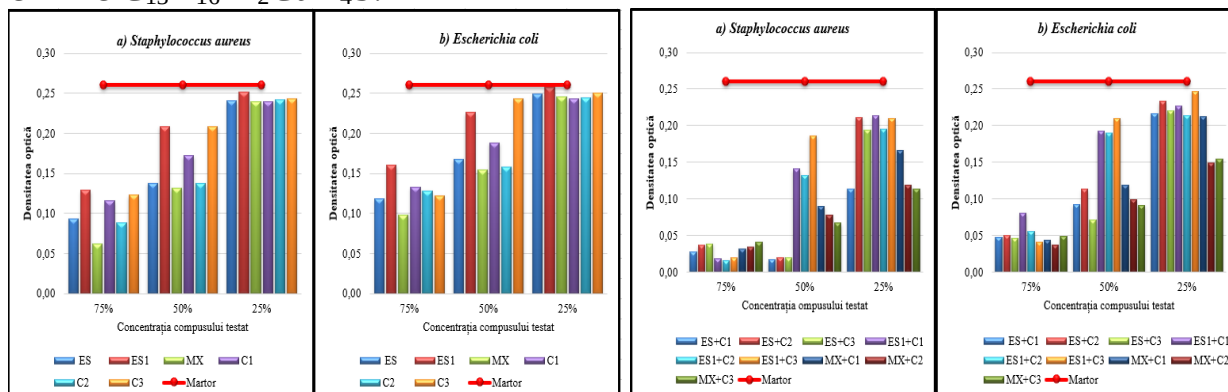


Figura 13. Gradul de formare a biofilmelor microbiene la acțiunea compușilor chimici și biologici separat și în combinație

Notă. C1 - $C_{14}H_{19}CuN_7O_4S$, C2 - $C_{13}H_{16}Br_2CuN_4S$, C3 - $C_{13}H_{17}ClCuN_4S$)

Un grad mai mare de inhibiție a biofilmelor microbiene au demonstrat combinațiile dintre compușii biologici *ES* și *MX*, și compușii chimici în concentrații de 50% și de 75%. Tulpinile microbiene, sub influența acestor combinații, și-au pierdut capacitatea de a forma biofilme sau au format biofilm slab, cu excepția combinațiilor 50% *ES* + $C_{13}H_{16}Br_2CuN_4S$; *MX* + $C_{14}H_{19}CuN_7O_4S$ și combinațiilor dintre compușii chimici cu compusul biologic *ES1*, sub a căror influență bacteriile au format biofilm moderat.

La acțiunea combinațiilor în concentrație de 25%, tulpinile au produs, în majoritatea cazurilor, biofilm puternic, cu excepția combinațiilor dintre compusul biologic *MX* și compușii chimici precum combinațiile *ES* + $C_{14}H_{19}CuN_7O_4S$, *ES* + $C_{13}H_{17}ClCuN_4S$ și *ES1* + $C_{13}H_{16}Br_2CuN_4S$, la care microorganismele au format biofilm moderat.

Rezultatele testării acțiunii compușilor chimici și biologici asupra gradului de exprimare a enzimei de patogenitate lecitinaza sunt prezentate pe figura 14. O activitate antilecitinazică mai înaltă, atât la microorganismele gram-pozitive, cât și gram-negative, au demonstrat compușii chimici în concentrație de 75%. Cel mai activ a fost compusul $C_{13}H_{16}Br_2CuN_4S$, urmat de compusul $C_{13}H_{17}ClCuN_4S$ și $C_{14}H_{19}CuN_7O_4S$.

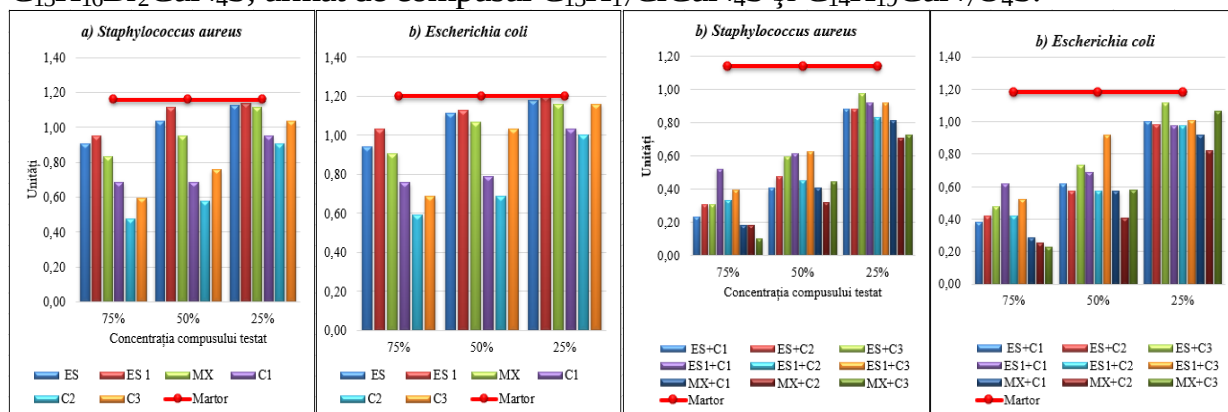


Figura 14. Gradul de exprimare a lecitinazei microbiene la acțiunea compușilor chimici și biologici separat și în combinație

Notă. C1 - $C_{14}H_{19}CuN_7O_4S$, C2 - $C_{13}H_{16}Br_2CuN_4S$, C3 - $C_{13}H_{17}ClCuN_4S$)

Capacitatea de inhibiție a enzimei lecitinaza de către compușii chimici s-a dovedit a fi mai înaltă decât a compușilor biologici. Cea mai înaltă activitate au demonstrat compușii în concentrație de 75%, în special compusul $C_{13}H_{16}Br_2CuN_4S$, diminuând activitatea lecitinazei de la $1,16 \pm 0,027$ unități până la $0,48 \pm 0,031$ unități, pentru tulpinile de *S. aureus*, și de la $1,2 \pm 0,0$ unități până la $0,48 \pm 0,013$ unități pentru tulpinile de *E. coli*.

Dintre compușii biologici mai activ a fost compusul MX, care a redus activitatea lecitinazei de la $1,6 \pm 0,027$ unități până la $0,83 \pm 0,036$ unități, la tulpinile de *S. aureus*, și de la $1,2 \pm 0,00$ până la $0,91 \pm 0,031$ unități, pentru tulpinile de *E. coli*. La utilizarea combinată a compușilor chimici cu cei biologici a rezultat o potențiere a efectului de reducere a activității lecitinazei. Cel mai înalt efect, atât la bacteriile gram-pozitive, cât și la cele gram-negative, a fost înregistrat la combinarea compusului biologic MX cu compușii chimici în concentrații de 75%.

Combinăția compusului MX cu compusul chimic $C_{13}H_{17}ClCuN_4S$ a redus cel mai mult activitatea lecitinazei: la tulpinile de *S. aureus* de la $1,14 \pm 0,00$ unități până la $0,10 \pm 0,024$ unități, iar la tulpinile de *E. coli* de la $1,18 \pm 0,027$ unități până la $0,23 \pm 0,033$ unități. La acțiunea combinației compusului biologic MX cu compusul chimic $C_{13}H_{16}Br_2CuN_4S$ la o concentrație de 50% s-a înregistrat o reducere a activității lecitinazei: la tulpinile de *S. aureus* de la $1,14 \pm 0,00$ unități până la $0,32 \pm 0,027$ unități, iar la tulpinile de *E. coli* de la $1,18 \pm 0,027$ unități la $0,41 \pm 0,013$ unități.

Rezultatele testării acțiunii compușilor chimici și biologici asupra gradului de exprimare a enzimei hemolizina de către tulpinile microbiene sunt prezentate pe figura 15.

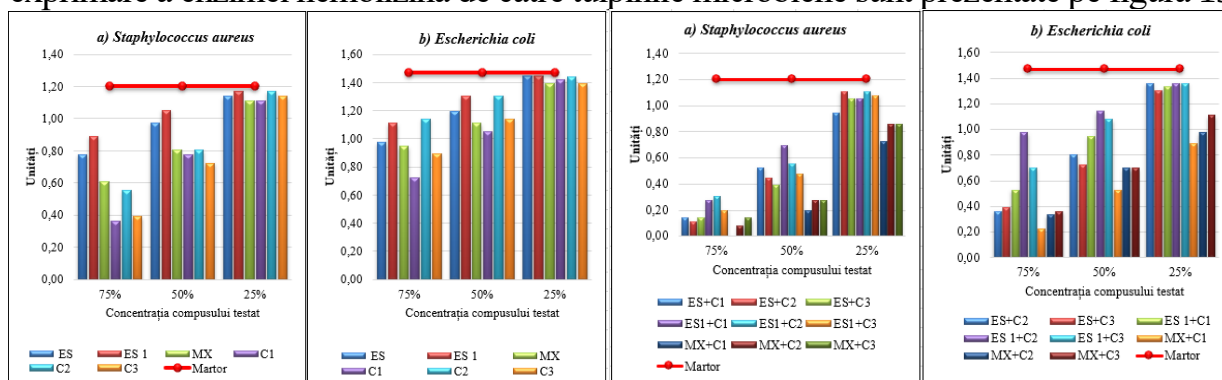


Figura 15. Gradul de exprimare a hemolizinei microbiene la acțiunea compușilor chimici și biologici separat și în combinație

Notă. C1 - $C_{14}H_{19}CuN_7O_4S$, C2 - $C_{13}H_{16}Br_2CuN_4S$, C3 - $C_{13}H_{17}ClCuN_4S$

Un efect mai mare de reducere a activității hemolizinei s-a înregistrat la acțiunea compusului chimic $C_{14}H_{19}CuN_7O_4S$ și a compusului $C_{13}H_{17}ClCuN_4S$ în concentrație de 75%. La tulpinile de *S. aureus*, activitatea hemolizinei s-a redus de la $1,20 \pm 0,036$ până la $0,36 \pm 0,04$ și de la $1,20 \pm 0,036$ până la $0,39 \pm 0,04$, iar la tulpinile de *E. coli* de la $1,47 \pm 0,036$ până la $0,72 \pm 0,036$, și de la $1,47 \pm 0,036$ până la $0,89 \pm 0,04$. Atât compușii chimici, cât și cei biologici în concentrație de 25% practic nu au influențat gradul de exprimare al hemolizinei.

La evaluarea acțiunii compușilor chimici în combinație cu compușii biologici, o reducere mai mare a exprimării hemolizinei s-a înregistrat la utilizarea combinației

dintre compusul biologic *MX* și compusul chimic $C_{14}H_{19}CuN_7O_4S$ în toate concentrațiile. Această combinație de compuși a redus exprimarea enzimei hemolizina pentru tulpinile de *S. aureus* de la $1,20 \pm 0,036$ până la $0,00 \pm 0,00$ – la concentrația de 75%, de la $1,20 \pm 0,036$ până la $0,20 \pm 0,036$ – la concentrația de 50% și de la $1,20 \pm 0,036$ până la $0,72 \pm 0,036$ – la concentrația de 25%.

În cazul tulpinilor de *E. coli*, această combinație a compușilor a inhibat mai puțin gradul de exprimare a hemolizinei: $1,47 \pm 0,036$ unități pentru martor și $0,22 \pm 0,071$ unități la acțiunea compușilor în concentrație de 75%, $0,53 \pm 0,036$ unități la concentrația de 50% și $0,89 \pm 0,04$ unități la concentrația de 25%.

5. MODIFICĂRI INDUSE DE COMPUȘII CHIMICI ȘI BIOLOGICI ASUPRA UNOR PARAMETRI BIOCHIMICI AI MICROORGANISMELOR

5.1. Modificarea indicatorilor stresului oxidativ în culturile de microorganisme sub influența compușilor chimici și biologici

Nivelul de toxicitate al compușilor chimici și biologici aparține și în combinații a fost apreciat după cantitatea de dialdehidă malonică în biomasa microorganismelor testate. Rezultatele obținute sunt prezentate în figura 16. La toate cele trei specii de microorganisme luate în studiu s-a observat același pattern al răspunsului la acțiunea agenților testați: compușii naturali nu au modificat conținutul de DAM, în timp ce compușii chimici, atât separat, cât și în combinație cu cei naturali, au produs o creștere semnificativă a cantității de DAM, în funcție de compus și de specia bacteriană.

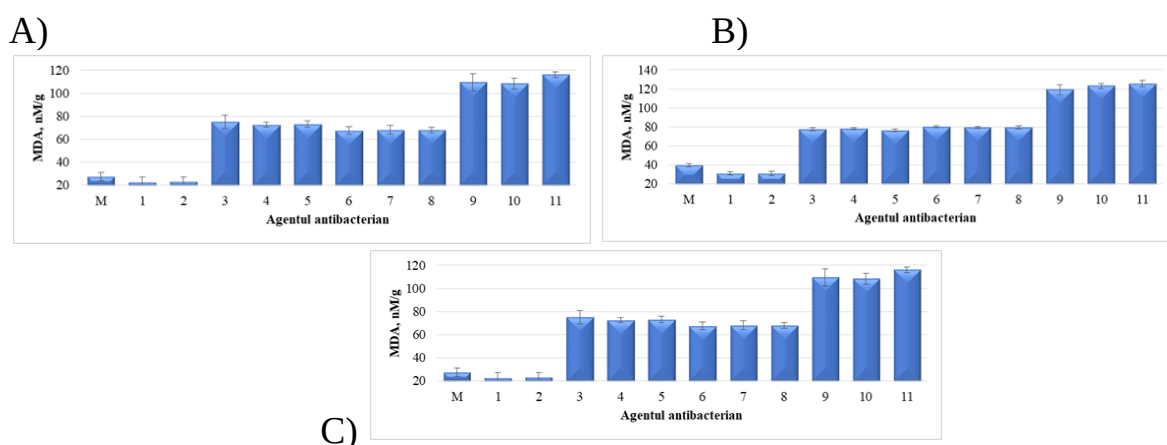


Figura 16. Influența compușilor testați asupra cantității de dialdehidă malonică în masa celulară de (A) *P. aeruginosa* ATCC 27853, (B) de *E. coli* ATCC 25922 și (C) de *S. aureus* ATCC 25923

Notă. M – martor, 1 – mixoxantofila (MX), 2 – extract de spirulină (ES), 3 – $C_{14}H_{19}CuN_7O_4S$; 4 – $C_{14}H_{19}CuN_7O_4S$ + ES; 5 – $C_{14}H_{19}CuN_7O_4S$ + MX; 6 – $C_{10}H_{14}CuN_4O_5S_2$; 7 – $C_{10}H_{14}CuN_4O_5S_2$ + ES; 8 – $C_{10}H_{14}CuN_4O_5S_2$ + MX; 9 – $C_{13}H_{16}Br_2CuN_4S$; 10 – $C_{13}H_{16}Br_2CuN_4S$ + ES; 11 – $C_{13}H_{16}Br_2CuN_4S$ + MX

Astfel, în cazul tulpinilor de *P. aeruginosa*, compușii naturali (mixoxantofila și extractul de spirulină ES, cărora le corespund variantele experimentale 1 și 2) nu au modificat nivelul de DAM în biomasă (Figura 16A). Cu toate că valorile medii obținute pentru aceste variante experimentale sunt cu 13,8 și respectiv cu 17,3% mai mici decât martorul, analiza statistică a arătat un nivel de semnificație insuficient

($p=0,054$ și $p=0,078$ respectiv). Cei trei compuși chimici, aplicați aparte (variantele experimentale 3, 6, 9), precum și în combinație cu mixoxantofila (variantele 5, 8, 11) sau cu extractul de spirulină *ES* (variantele 4,7,10), au produs o mărire semnificativă a DAM (pentru toate cazurile $p<0,001$). Valorile DAM în probele experimentale sunt destul de omogene și denotă o creștere de 2,2 -2,5 ori față de umartor.

În cazul tulpinilor de *E. coli*, compușii naturali au produs o scădere a cantității de DAM cu peste 20%, comparativ cu martorul. Pentru ambii compuși, diferența este statistic veridică ($p=0,003$ în cazul mixoxantofilei și $p=0,008$ în cazul extractului *ES*). Compușii chimici $C_{14}H_{19}CuN_7O_4S$ și $C_{10}H_{14}CuN_4O_5S_2$, atât aplicați separat, cât și în combinație cu *MX* și cu *ES*, au produs o dublare a cantității de DAM. Compusul $C_{13}H_{16}Br_2CuN_4S$ pare a fi mai toxic, producând o creștere de trei ori a cantității de DAM, atât de unul singur, cât și în combinație cu extractul de spirulină *ES*.

Tulpinile de *S. aureus* au reacționat la compușii naturali după același principiu ca și cele de *E. coli*, doar că efectul de diminuare a nivelului DAM în acest caz lipsește. Valorile DAM la acțiunea mixoxantofilei și a extractului de spirulină sunt la nivelul lotului-martor. Pentru această tulpină efectul toxic de asemenea a fost mai pronunțat în cazul compusului $C_{13}H_{16}Br_2CuN_4S$.

Conform rezultatelor obținute, creșterea cantității de DAM a fost mai mare în cazul tulpinilor de *S. aureus*. Astfel compușii $C_{14}H_{19}CuN_7O_4S$ și $C_{10}H_{14}CuN_4O_5S_2$ au produs o creștere a cantității de DAM de 2,5-2,7 ori față de martor (comparativ cu 1,9-2,0 ori la *E. coli*), iar compusul $C_{13}H_{16}Br_2CuN_4S$ de 3,9-4,2 ori (comparativ cu 3,0-3,2 în cazul *E. coli*).

Rezultatele obținute în cadrul testului efectuat cu referire la nivelul de activitate a lactat dehidrogenazei (LDH) eliberate de cele trei specii bacteriene sunt redate în figura 17.

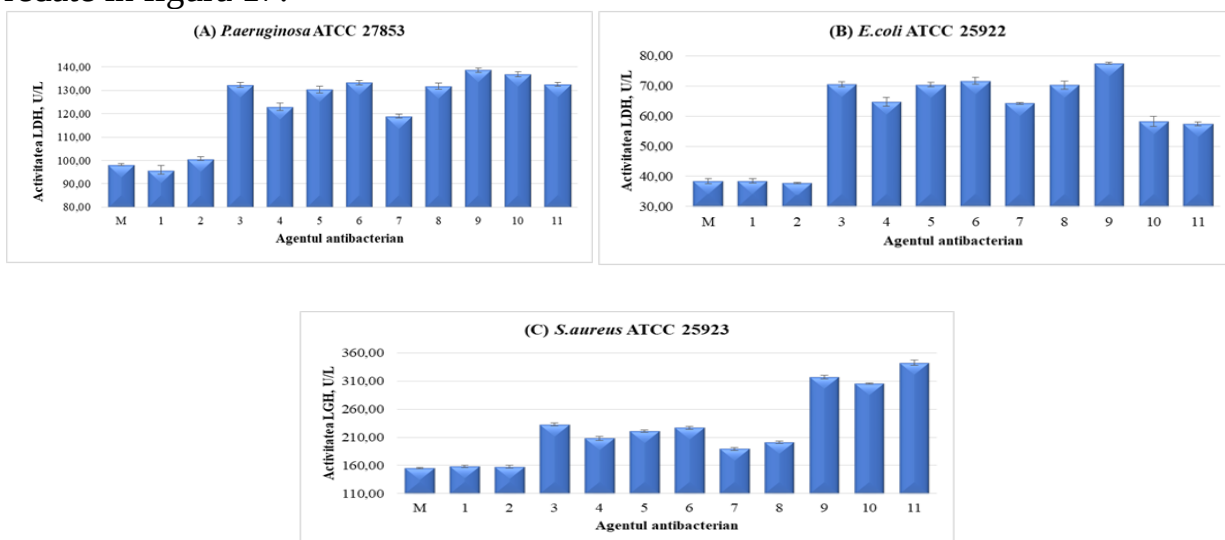


Figura 17. Influența compușilor testați asupra activității lactat dehidrogenazei eliberate de (A) *P. aeruginosa* ATCC 27853, (B) de *E. coli* ATCC 25922 și (C) de *S. aureus* ATCC 25923

Notă. M – martor, 1 – mixoxantofila (MX), 2 – extract de spirulină (ES), 3 – $C_{14}H_{19}CuN_7O_4S$; 4 – $C_{14}H_{19}CuN_7O_4S$ +ES; 5 – $C_{14}H_{19}CuN_7O_4S$ +MX; 6 –

$C_{10}H_{14}CuN_4O_5S_2$; 7 – $C_{10}H_{14}CuN_4O_5S_2+ES$; 8 – $C_{10}H_{14}CuN_4O_5S_2+MX$; 9 – $C_{13}H_{16}Br_2CuN_4S$; 10 – $C_{13}H_{16}Br_2CuN_4S+ES$; 11 – $C_{13}H_{16}Br_2CuN_4S +MX$

În cazul martorilor, activitatea acestei enzime variază de la 38 unități/litru pentru *E.coli* până la 155 unități/litru pentru *S. aureus*. Această diferență, observată și pentru dialdehida malonică, poate fi cauzată atât de deosebirile naturale între aceste două specii, cât și de sensibilitatea diferită față de DMSO, un agent de solubilizare folosit pentru dizolvarea compușilor chimici utilizați în studiu.

Toate cele trei specii bacteriene testate au răspuns diferit la acțiunea compușilor chimici, aplicați separat ori în combinație cu cei naturali, dar, ca și în cazul dialdehidei malonice, atât mixoxantofila, cât și extractul de spirulină *ES* nu au modificat activitatea LDH eliberată în lichidul cultural. Activitatea lactat dehidrogenazei, eliberată de către tulpinile de *P. aeruginosa* sub influența compușilor chimici și a combinațiilor acestora cu mixoxantofila și *ES*, a fost semnificativ mai mare comparativ cu martorul (de 1,21-1,39 ori, $p<0,001$).

Trebuie menționat faptul că în cazul celor trei compuși chimici aplicați în combinație cu *ES* se observă o diminuare a toxicității, comparativ cu acțiunea compușilor aparte. Cu toate că aceste diferențe sunt mici, semnificația lor statistică admite o atenuare a efectelor deteriorante, observate la nivel de variante experimentale. Astfel, compusul $C_{14}H_{19}CuN_7O_4S$ a provocat o creștere a activității LGH eliberată de tulpinile de *P. aeruginosa* cu 34,7%, în timp ce în varianta cu combinarea compusului chimic $C_{14}H_{19}CuN_7O_4S$ cu *ES* această creștere a fost de 25,2% ($p=0,0005$). Același fenomen s-a atestat și în cazul compusului $C_{10}H_{14}CuN_4O_5S_2$ care mărește cu 35,7% activitatea LDH eliberate, iar în combinație cu *ES* creșterea este de 21,0%. În cazul compusului $C_{13}H_{16}Br_2CuN_4S$, efectul de diminuare a acțiunii asupra LDH eliberate de tulpinile de *P. aeruginosa* îl are mixoxantofila (scăderea de la creșterea cu 41,0% la 35,0%). În ambele cazuri, diferențele sunt statistic veridice. Trebuie menționat faptul că cantitatea de compus chimic în variantele experimentale, unde acesta se folosește de unul singur, este de patru ori mai joasă comparativ cu variantele, în care se aplică în combinație cu compușii naturali. La nivelul actual de cercetare nu se pot trage concluzii despre rolul individual al fiecărui component în manifestarea efectului antibacterian, cert fiind faptul că aceste interacțiuni prezintă interes teoretic, dar și aplicativ.

Sub influența compușilor chimici și naturali (cu excepția extractelor utilizate aparte), la tulpinile de *E. coli* creșterea activității LDH în mediul extracelular a fost de 1,5-2,0 ori în raport cu varianta experimentală. Și la această specie bacteriană, extractele naturale ar părea să aibă un efect de atenuare a efectelor compușilor chimici aplicați aparte, în special în cazul compusului $C_{13}H_{16}Br_2CuN_4S$, unde un sfert al efectului toxic manifestat de compus este anihilat în variantele cu mixoxantofilă și cu *ES*.

Tulpinile de *S. aureus* au reacționat după modelul tulpinilor de *E. coli*, atât la acțiunea agenților antimicrobieni aplicați aparte, cât și în combinațiile corespunzătoare. Astfel, cel mai pronunțat efect toxic l-a avut compusul $C_{13}H_{16}Br_2CuN_4S$, atât aparte, cât și în combinație, cu excepția mixoxantofilei care a amplificat efectul generat de compusul chimic. Conform rezultatelor obținute, sub influența compusului chimic $C_{13}H_{16}Br_2CuN_4S$ de unul singur activitatea LDH

eliberate a crescut de 2,0 ori, iar la combinarea acestuia cu *MX* această creștere a fost de 2,2 ori, diferența fiind statistic veridică ($p=0,0007$).

5.2. Modificarea capacității antioxidante a culturilor de microorganisme sub influența compușilor chimici și biologici noi

În cazul unui stres pronunțat, activitatea enzimelor antioxidante scade, ceea ce duce la incapacitatea celulelor de a se proteja de acțiunea nocivă a radicalilor liberi, formați la interacțiunea cu xenobioticele toxice aplicate. În cazul culturilor bacteriene studiate, prima linie de protecție antioxidantă este formată de enzimele antioxidante primare. Acestea anihilează radicalul superoxid (superoxid dismutaza) și peroxidul de hidrogen, formate ca produs al reacției de dismutație (catalaza și glutatión peroxidaza).

Rezultatele testării acțiunii agenților antimicrobieni asupra tulpinilor de *P. aeruginosa* sunt reprezentate în figura 18. Mixoxantofila și extractul de spirulină *ES* nu modifică semnificativ nivelul de activitate a SOD, nici a celei intracelulare, nici a celei eliberate în mediul de creștere. În același timp, în toate variantele experimentale, activitatea SOD este diminuată – în biomasă practic de 2 ori (cu 46,7-54,9%), iar în lichidul cultural cu 59,2-78,8%.

Cel mai puternic reduce activitatea SOD intracelulare compușii sulfat de $C_{10}H_{14}CuN_4O_5S_2$ și $C_{13}H_{16}Br_2CuN_4S$. În lichidul cultural, activitatea SOD este redusă identic de compușii $C_{18}H_{22}CuN_6O_3S$ și $C_{10}H_{14}CuN_4O_5S_2$. Compusul chimic $C_{13}H_{16}Br_2CuN_4S$ se manifestă mai activ, comparativ cu primii doi. În activitatea superoxid dismutazei nu au fost evidențiate diferențe semnificative între variantele experimentale, în care compușii chimici au fost aplicați aparte, și cele unde au fost combinați cu extractele de spirulină.

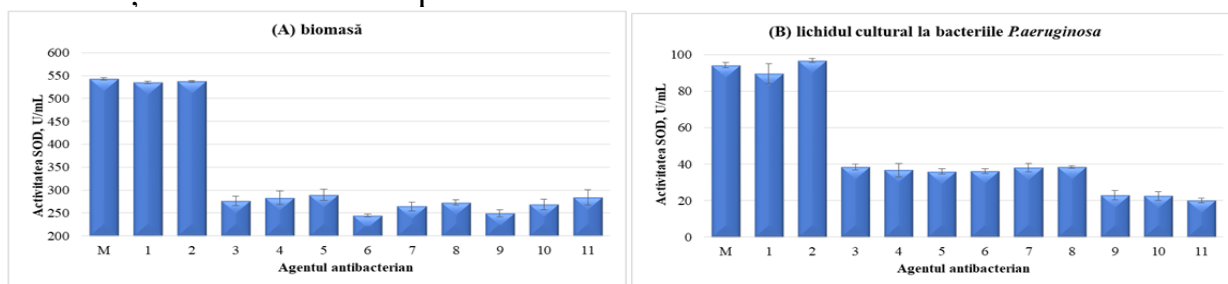


Figura 18. Influența compușilor testați asupra activității superoxid dismutazei în (A) biomasă și (B) în lichidul cultural la bacteriile *P. aeruginosa*

Notă. M – martor, 1 – mixoxantofila (MX), 2 – extract de spirulină (ES), 3 – $C_{14}H_{19}CuN_7O_4S$; 4 – $C_{14}H_{19}CuN_7O_4S+ES$; 5 – $C_{14}H_{19}CuN_7O_4S+MX$; 6 – $C_{10}H_{14}CuN_4O_5S_2$; 7 – $C_{10}H_{14}CuN_4O_5S_2+ES$; 8 – $C_{10}H_{14}CuN_4O_5S_2+MX$; 9 – $C_{13}H_{16}Br_2CuN_4S$; 10 – $C_{13}H_{16}Br_2CuN_4S+ES$; 11 – $C_{13}H_{16}Br_2CuN_4S +MX$

În cazul tulpinilor de *E. coli*, nivelul fiziologic de activitate a SOD este mai jos, comparativ cu *P. aeruginosa*, dar efectele compușilor testați asupra acestui parametru sunt foarte asemănătoare (Figura 19). În același timp, scăderea activității SOD din punct de vedere valoric este și mai pronunțată, în special în lichidul cultural, unde compusul $C_{13}H_{16}Br_2CuN_4S$ și combinațiile acestuia reduc practic la zero activitatea enzimei. În biomasă, activitatea SOD s-a redus sub influența agenților antibacterieni cu 53,8-79,9%, iar în lichidul cultural cu 56,8-97,7%. Combinațiile compușilor chimici cu cei naturali par a fi mai eficiente în blocarea activității SOD atât în interiorul celulelor, cât și a enzimei eliberate. Ținând cont de faptul că concentrațiile compușilor în combinații este de 2-4 ori mai mici comparativ

cu varianta utilizării aparte, se poate presupune un efect sinergic al compușilor combinați, care urmează a fi studiat în mod special.

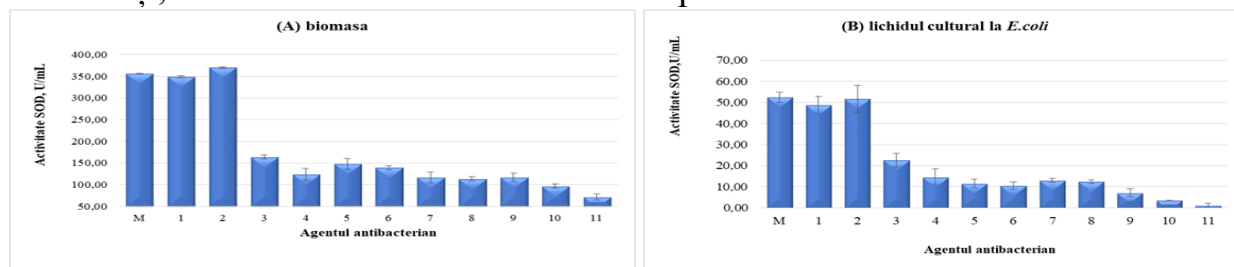


Figura 19. Influența compușilor testați asupra activității superoxid dismutazei în (A) biomasa și (B) în lichidul cultural la *E. coli*

Notă. M – martor, 1 – mixoxantofila (MX), 2 – extract de spirulină (ES), 3 – $C_{14}H_{19}CuN_7O_4S$; 4 – $C_{14}H_{19}CuN_7O_4S+ES$; 5 – $C_{14}H_{19}CuN_7O_4S+MX$; 6 – $C_{10}H_{14}CuN_4O_5S_2$; 7 – $C_{10}H_{14}CuN_4O_5S_2+ES$; 8 – $C_{10}H_{14}CuN_4O_5S_2+MX$; 9 – $C_{13}H_{16}Br_2CuN_4S$; 10 – $C_{13}H_{16}Br_2CuN_4S+ES$; 11 – $C_{13}H_{16}Br_2CuN_4S +MX$

După nivelul fiziologic de activitate a SOD intra- și extracelulară, *S. aureus* este mai aproape de *P. aeruginosa* (Figura 20). Reacția de răspuns la acțiunea agenților antibacterieni de asemenea este foarte asemănătoare la aceste două tulpini. Și în cazul *S. aureus*, activitatea SOD intracelulară se reduce în proporție mai mică, comparativ cu SOD extracelulară. Astfel, activitatea SOD în biomasă în toate variantele experimentale, cu excepția celor în care s-au aplicat compușii naturali aparte, a scăzut cu 45-47%, iar în lichidul cultural cu 69,8-77,9%. Valorile obținute sunt foarte apropiate, diferențele nefiind semnificative. În cazul aplicării mixoxantofilei și a extractului de spirulină ES, activitatea superoxid dismutazei atât în celule, cât și în spațiul extracelular, se păstrează la nivelul probei martor.

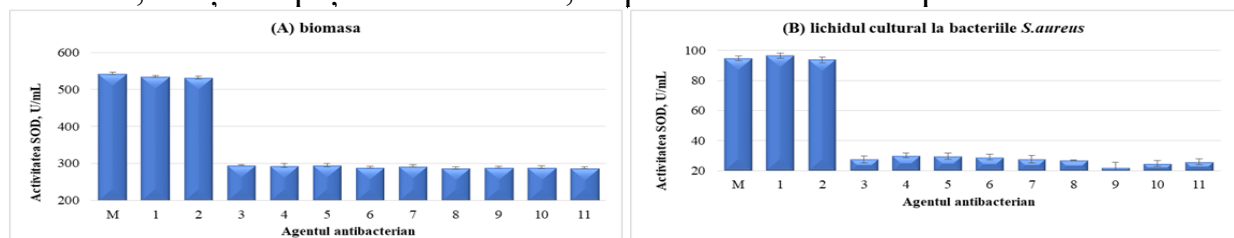


Figura 20. Influența compușilor testați asupra activității superoxid dismutazei în (A) biomasa și (B) în lichidul cultural la bacteriile *S. aureus*

Notă. M – martor, 1 – mixoxantofila (MX), 2 – extract de spirulină (ES), 3 – $C_{14}H_{19}CuN_7O_4S$; 4 – $C_{14}H_{19}CuN_7O_4S+ES$; 5 – $C_{14}H_{19}CuN_7O_4S+MX$; 6 – $C_{10}H_{14}CuN_4O_5S_2$; 7 – $C_{10}H_{14}CuN_4O_5S_2+ES$; 8 – $C_{10}H_{14}CuN_4O_5S_2+MX$; 9 – $C_{13}H_{16}Br_2CuN_4S$; 10 – $C_{13}H_{16}Br_2CuN_4S+ES$; 11 – $C_{13}H_{16}Br_2CuN_4S +MX$

Inactivarea SOD este un efect nociv pentru organismele aerobe, acestea devenind incapabile să facă față chiar și proceselor fiziologice normale, care soldează cu formarea superoxid radicalului, nemaivorbind de cele patologice, generate de prezența în mediu a substanțelor toxice.

Peroxidul de oxigen este o moleculă reactivă cu efect nociv pronunțat, grație duratei de viață relativ lungi, comparativ cu alți radicali liberi. În celulele vii, anihilarea acestei substanțe este în competența mai multor enzime, principalele dintre care sunt catalaza și peroxidaza.

Activitatea catalazei la culturile bacteriene tratate cu agenții antibacterieni luați în studiu sunt prezentate în figura 21. Ca și în cazul altor parametri evaluați mai sus, aplicarea separată a mixoxantofilei și a extractului de spirulină ES nu a modificat statistic veridic

activitatea catalazei (CT) la cele trei culturi bacteriene de referință. Compușii chimici aplicați separat au diminuat foarte semnificativ activitatea CT, iar combinarea lor cu mixoxantofila ori cu extractul de spirulină *ES* a anihilat parțial, iar în unele cazuri integral, acest efect. În cazul tulpinilor de *P. aeruginosa*, compusul chimic $C_{14}H_{19}CuN_7O_4S$ a redus cu 34% activitatea CT, în combinație cu *ES* cu 6,4% ($p=0,0021$), iar cu mixoxantofila cu 14,0% ($p=0,0006$). La tulpinile de *E. coli*, sub acțiunea $C_{14}H_{19}CuN_7O_4S$, activitatea CT a scăzut cu 49%, în combinație cu *ES* doar cu 9,8%, iar în combinație cu *MX* ceva mai mult – cu 34,2%. La tulpinile de *S. aureus* acest compus, de unul singur, a redus activitatea CT cu 52,9%, în combinație cu *ES* – cu 25,6 % și în combinație cu *MX* – cu 30,7%. Practic aceiași acțiuni asupra activității CT tulpinilor de referință au manifestat și ceilalți doi compuși chimici luați în studiu, fie aplicați aparte ori în combinație cu cei doi compuși biologici (*MX* și *ES*). Astfel, $C_{10}H_{14}CuN_4O_5S_2$ a redus activitatea CT la tulpinile de *P. aeruginosa* cu 55,23%, la tulpinile de *E. coli* – cu 58,3%, iar la tulpinile de *S. aureus* – cu 67,17%. La aplicarea acestui compus în combinație cu *ES*, reducerea activității CT a fost la un nivel mai jos, în intervalul 10,6 -26,4%. Rezultate foarte apropiate de cele înregistrate în combinație cu *ES* au fost obținute și în combinație cu *MX*.

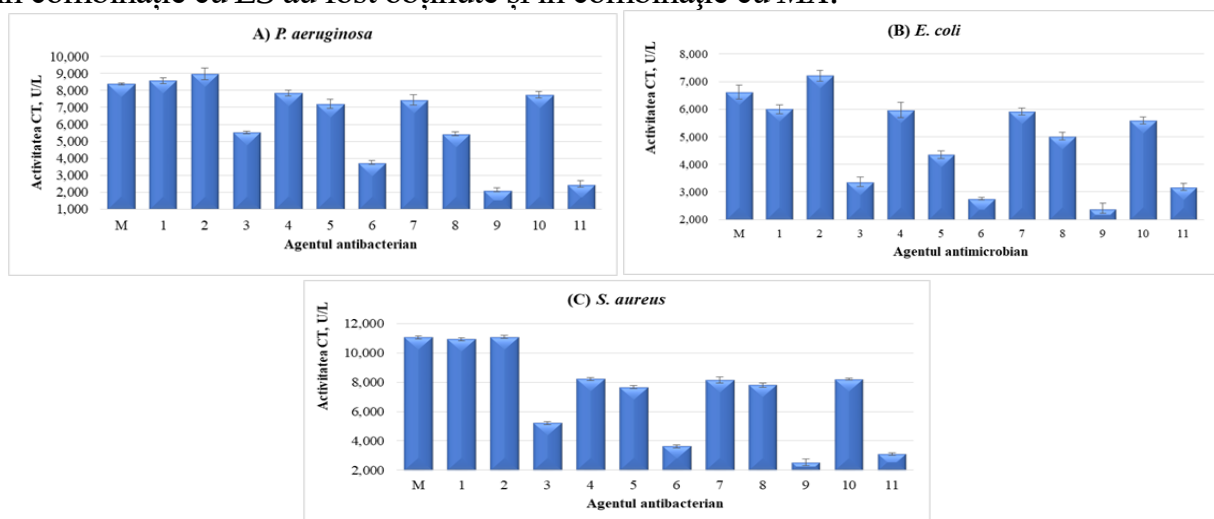


Figura 21. Influența compușilor testați asupra activității catalazei la (A) *P. aeruginosa*, (B) la *E. coli* și (C) la *S. aureus*

Notă. M – martor, 1 – mixoxantofila (MX), 2 – extract de spirulină (ES), 3 – $C_{14}H_{19}CuN_7O_4S$; 4 – $C_{14}H_{19}CuN_7O_4S+ES$; 5 – $C_{14}H_{19}CuN_7O_4S+MX$; 6 – $C_{10}H_{14}CuN_4O_5S_2$; 7 – $C_{10}H_{14}CuN_4O_5S_2+ES$; 8 – $C_{10}H_{14}CuN_4O_5S_2+MX$; 9 – $C_{13}H_{16}Br_2CuN_4S$; 10 – $C_{13}H_{16}Br_2CuN_4S+ES$; 11 – $C_{13}H_{16}Br_2CuN_4S+MX$

Doar în cazul tulpinilor de *P. aeruginosa*, diferența între acțiunea $C_{10}H_{14}CuN_4O_5S_2$ separat și în combinație cu *MX* asupra activității CT a rămas mare – 35%.

Cea mai semnificativă reducere a activității CT (63,6-77,4%) a fost indusă de compusul $C_{13}H_{16}Br_2CuN_4S$. În cazul tulpinilor de *P. aeruginosa*, combinația $C_{13}H_{16}Br_2CuN_4S + ES$ a readus practic la normal activitatea CT, aceasta fiind doar cu 7,72% mai joasă comparativ cu martorul. La combinarea acestui compus chimic cu *MX*, cu toate că concentrația acestuia era de 4 ori mai joasă decât la aplicarea de unul singur, activitatea CT a scăzut cu 70,2% față de martor. Rezultatele înregistrate pentru tulpinile de *E. coli* sunt foarte asemănătoare. Astfel, aplicat de unul singur, compusul chimic a produs o scădere cu 63,6% a activității CT, în combinație cu *MX* – cu 51,8%, iar cu *ES* – doar cu 15,5%. Pentru tulpinile de *S. aureus* s-au obținut

următoarele rezultate: reducere cu 77,1% a activității CT în cazul compusului aplicat de unul singur; cu 72,0% în combinație cu *MX* și cu 25,7% în combinație cu *ES*.

O altă enzimă implicată în degradarea peroxidului de hidrogen este glutatyon peroxidaza (GPX). Rezultatele testării acțiunii compușilor chimici și biologici luați în studiu asupra activității GPX sunt prezentate în figura 22. Compușii naturali, ca și în cazul CT, nu au modificat semnificativ activitatea GPX și doar în cazul *ES*, la tulpinile de *P. aeruginosa*, a fost înregistrată o creștere statistic veridică cu 10,3% ($p=0,004$) a activității acestei enzime. În rest, patternul de răspuns al bacteriilor cercetate a fost foarte apropiat de cel observat pentru CT.

La tulpinile de *P. aeruginosa*, compusul $C_{14}H_{19}CuN_7O_4S$ a produs o reducere a activității GPX cu 51,1%, iar în combinație cu *ES* și cu *MX*, diferența în nivelul de activitate a enzimei comparativ cu martorul, a fost respectiv de 6,9% și de 10,8%. Compusul $C_{10}H_{14}CuN_4O_5S_2$ a redus activitatea GPX la tulpinile de *P. aeruginosa* cu 47,9%, iar în combinații cu 25,5% (*ES*) și 37,7% (*MX*). Cel mai semnificativ, activitatea GPX la tulpinile de *P. aeruginosa* a fost redusă de compusul $C_{13}H_{16}Br_2CuN_4S$ – cu 64%. În cazul combinațiilor reducerea a fost mult mai modestă – 17,5-19,9%.

Activitatea GPX la tulpinile de *E. coli* a fost redusă de cei trei compuși chimici aplicați aparte cu 52,6-64,7%, combinațiile generând reduceri mai mici, dar semnificative – 14,1-28,1%.

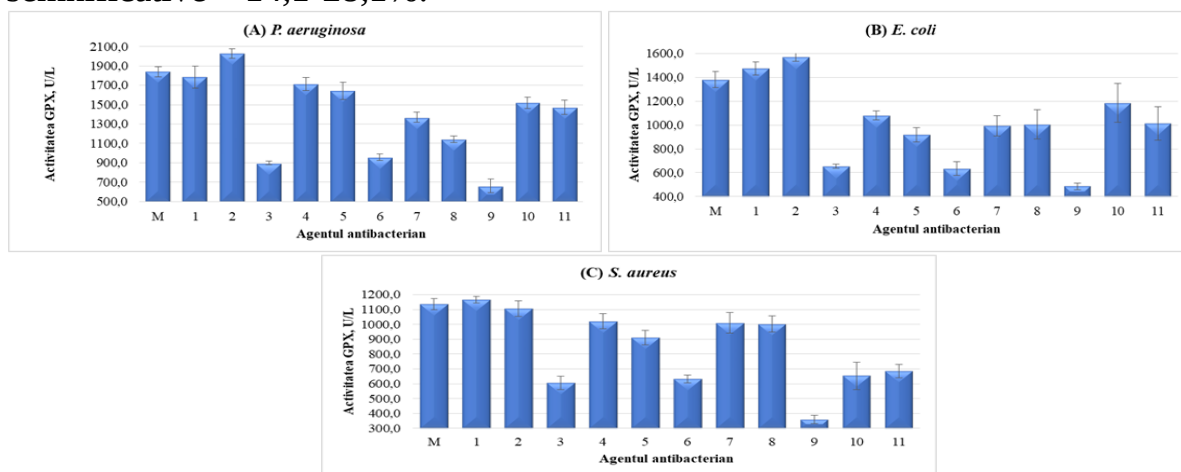


Figura 22. Influența compușilor testați asupra activității glutatyon peroxidazei la (A) *P. aeruginosa*, (B) la *E. coli* și (C) la *S. aureus*

Notă. M – martor, 1 – mixoxantofila (*MX*), 2 – extract de spirulină (*ES*), 3 – $C_{14}H_{19}CuN_7O_4S$; 4 – $C_{14}H_{19}CuN_7O_4S+ES$; 5 – $C_{14}H_{19}CuN_7O_4S+MX$; 6 – $C_{10}H_{14}CuN_4O_5S_2$; 7 – $C_{10}H_{14}CuN_4O_5S_2+ES$; 8 – $C_{10}H_{14}CuN_4O_5S_2+MX$; 9 – $C_{13}H_{16}Br_2CuN_4S$; 10 – $C_{13}H_{16}Br_2CuN_4S+ES$; 11 – $C_{13}H_{16}Br_2CuN_4S+MX$

Influența compușilor testați asupra activității GPX la tulpinile de *S. aureus* s-a dovedit a fi similară celei semnalată la celelalte două specii bacteriene. Astfel, compusul $C_{14}H_{19}CuN_7O_4S$, aplicat de unul singur, a produs o reducere a activității GPX cu 46,6%, în combinație cu *ES* – cu 10,2%, iar în combinație cu *MX* – cu 20%. $C_{10}H_{14}CuN_4O_5S_2$, aplicat aparte, a redus activitatea glutatyon peroxidazei cu 44,39%, iar în combinație cu *ES* și cu *MX* – cu 11,22 și cu 11,96% respectiv. Compusul $C_{13}H_{16}Br_2CuN_4S$ a produs cea mai pronunțată reducere a activității GPX – cu 68,43%. În cazul combinării acestuia cu

extractul de spirulină *ES* și cu mixoxantofila a fost observat un grad înalt de inhibare a activității GPX – cu 42,54 și cu 39,7% respectiv.

Conform rezultatelor obținute, activitatea acestor două enzime antioxidante, implicate în detoxifierea celulelor prin înlăturarea peroxidului de hidrogen, este puternic afectată atât de compușii chimici aplicați aparte, cât și de combinațiile acestora cu extractul de spirulină *ES* și cu mixoxantofila, obținută din aceeași specie de cianobacterii. La scăderea semnificativă a activității superoxid dismutazei intracelulare și a celei eliberate în lichidul cultural, efectele agenților antibacterieni studiați s-au soldat cu blocarea primei linii de protecție antioxidantă a celulelor microbiene, ceea ce le face vulnerabile acțiunii factorilor protectori ai macroorganismului. Această constatare poate fi utilă pentru un viitor agent terapeutic antimicrobian.

6. INFLUENȚA COMPUȘILOR BIOLOGIC ACTIVI ASUPRA MARKERILOR STRESULUI OXIDATIV, SISTEMULUI ANTIOXIDANT ȘI PATTERN-ULUI INFLAMATOR

Pentru a evalua influența compușilor biologic activi, aparte și în combinație, asupra markerilor stresului oxidativ, sistemului antioxidant și pattern-ului inflamator au fost efectuate testări *in vitro* conform procedurii descris de Râjcovă S. și coaut., cu unele modificări. Sinteza rezultatelor obținute prin evaluarea comparativă a loturilor precum și efectuarea testelor post-hoc permite de a concluziona că substanțele cercetate prezintă anumite efecte asupra parametrilor fiziologici *in vitro* (Tabelul 3).

Compusul biologic *ES* a înregistrat efecte pozitive asupra tuturor parametrilor studiați, micșorând, pe de o parte, valorile DAM, $\mu\text{M/L}$ ($p = 0,008$), PPOA, $\mu\text{M/L}$ ($p = 0,018$) și ale sistemului proinflamator (IL-1 β , pg/ml ($p = 0,02$), IL-6, pg/ml ($p = 0,005$)), și majorând, pe de altă parte, potențialul antioxidant (SOD, u/c ($p = 0,003$), CT, $\mu\text{M/L}$ ($p = 0,002$), AAT cu ABTS, $\mu\text{M/L}$ ($p = 0,005$), GST, nM/s.L ($p = 0,024$), GPO, nM/s.L ($p = 0,004$), GR, nM/s.L ($p = 0,006$)) și antiinflamator (IL-10, pg/ml ($p = 0,008$)).

Compusul biologic *MX* a demonstrat efecte asemănătoare cu compusul *ES*: pe de o parte, a redus valorile DAM, $\mu\text{M/L}$ ($p = 0,008$), PPOA, $\mu\text{M/L}$ ($p = 0,012$) și ale sistemului proinflamator (IL-1 β , pg/ml ($p = 0,015$), IL-6, pg/ml ($p = 0,008$)), iar, pe de altă parte, a crescut potențialul antioxidant (SOD, u/c ($p = 0,009$), CT, $\mu\text{M/L}$ ($p = 0,002$), AAT cu ABTS, $\mu\text{M/L}$ ($p = 0,005$), GST, nM/s.L ($p = 0,014$), GPO, nM/s.L ($p = 0,004$), GR, nM/s.L ($p = 0,006$)) și cel antiinflamator (IL-10, pg/ml ($p = 0,003$)).

$\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{CuN}_4\text{O}_5\text{S}_2$ a prezentat efecte negative, determinând valori crescute pentru DAM, $\mu\text{M/L}$ ($p = 0,008$), precum și pentru componentele sistemului proinflamator IL-1 β , pg/ml ($p = 0,010$), TNF- α , pg/ml ($p = 0,008$), IL-6, pg/ml ($p = 0,022$). Totodată, acest compus a favorizat sistemul antioxidant (SOD, u/c ($p = 0,003$), CT, $\mu\text{M/L}$ ($p = 0,024$), AAT cu ABTS, $\mu\text{M/L}$ ($p = 0,017$), GST, nM/s.L ($p = 0,023$), GPO, nM/s.L ($p = 0,036$), GR, nM/s.L ($p = 0,007$)) și cel antiinflamator (IL-10, pg/ml ($p = 0,020$)).

Tabelul 3. Heatmap pentru sinteza evaluării comparative a parametrilor cercetați cu lotul-martor pentru compuși aparte și în combinație

Loturile	B1	B2	C1	C1+B1	C1+B 2	C2	C2+B 1	C2+B 2
Martor, DAM, μM/L	0,0085	0,008 5	0,008 5	0,016 6	0,008 5	0,490 8	0,011 3	0,008 5
Martor, PPOA, μM/L	0,018	0,012	0,080	0,695	0,409	0,027	0,073	0,012
Martor, SOD, u/c	0,0035	0,009 6	0,003 5	0,003 5	0,003 5	0,003 5	0,003 5	0,003 5
Martor, CT, μM/L	0,0029	0,002 9	0,024 8	0,002 9	0,002 9	0,030 9	0,007 3	0,002 9
Martor, AAT cu ABTS, μM/L	0,0059	0,005 9	0,017 3	0,005 9	0,005 9	0,005 9	0,012 5	0,005 9
Martor, GST, nM/s.L	0,024	0,014	0,023	0,024	0,014	0,014	0,014	0,024
Martor, GPO, nM/s.L	0,0041	0,004 1	0,036 5	0,007 0	0,007 0	0,097 5	0,004 1	0,004 1
Martor, GR, nM/s.L	0,0064	0,006 4	0,007 6	0,006 4	0,006 4	0,006 4	0,006 4	0,006 4
Martor, IL-1β, pg/ml	0,020	0,015	0,010	0,822	0,196	0,020	0,207	0,033
Martor, TNF- α, pg/ml	0,7362	0,057 9	0,008 8	1,000 0	0,354 1	0,057 9	0,571 6	0,206 2
Martor, IL-6, pg/ml	0,0054	0,008 8	0,022 4	0,104 3	0,029 3	0,005 4	0,085 9	0,011 2
Martor, IL-10, pg/ml	0,0082	0,003 5	0,020 4	0,003 5	0,003 5	0,008 2	0,003 5	0,003 5
	diferență statistic semnificativă, valoarea din lotul-martor fiind mai mică							
	diferență statistic semnificativă, valoarea din lotul-martor fiind mai mare							
	diferență statistic nesemnificativă.							

Notă: B1 – extract de *S. platensis* (ES); B2 – pigment carotenoidic mixoxantofila (MX); C1 – compusul chimic $C_{10}H_{14}CuN_4O_5S_2$; C2 – compusul chimic $C_{14}H_{19}CuN_7O_4S$, DAM – dialdehida malonică, PPOA – produși proteici de oxidare avansată, SOD – superoxid dismutaza, AAT – activitatea antioxidantă totală, GST – glutadion S-transferaza, GPO – glutadion peroxidaza, GR – glutatión reductaza, IL – interleukina, TNF – factorul de necroză tumorală.

Compusul $C_{14}H_{19}CuN_7O_4S$ a exercitat efecte similare cu $C_{10}H_{14}CuN_4O_5S_2$, manifestate prin creșterea valorilor tuturor parametrilor cercetați, comparativ cu

lotul-martor: PPOA, $\mu\text{M/L}$ ($p = 0,027$), SOD, u/c ($p = 0,003$), CT, $\mu\text{M/L}$ ($p = 0,030$), AAT cu ABTS, $\mu\text{M/L}$ ($p = 0,005$), GST, nM/s.L ($p = 0,014$), GR, nM/s.L ($p = 0,006$), IL-1 β , pg/ml ($p = 0,020$), IL-6, pg/ml ($p = 0,005$) și IL-10, pg/ml ($p = 0,008$).

Efecte pozitive, mai ales asupra sistemului antiinflamator și sistemului DAM – PPOA, au fost exercitate de compușii biologici ES și MX, caracteristici optimele înregistrând combinația $C_{14}H_{19}CuN_7O_4S + MX$. Compușii biologici ES și MX, datorită caracteristicilor optimele privind efectele asupra sistemelor cercetate, prezintă potențial pentru a fi studiate ulterior.

CONCLUZII GENERALE

1. Soluționarea problemei științifice prin fundamentarea pe dovezi a acțiunii unor compuși chimici și biologici noi asupra microorganismelor izolate din ulcere trofice infectate a permis formularea principiilor de elaborare a preparatelor policomponente, eficiente în tratamentul ulcerului trofic infectat, și elaborarea unor strategii alternative antiinfecțioase în scopul evitării eșecurilor terapeutice și a dezvoltării rezistenței la antimicrobiene.
2. Rezultatele obținute în prezentul studiu au demonstrat asocierea în ulcerul trofic infectat a unei specii microbiene în 50,6% de cazuri, iar în 49,4% de cazuri a mai multor specii, ceea ce poate explica agravarea sau întârzierea vindecării ulcerului trofic. Diversitatea microorganismelor asociate în ulcerul trofic a fost reprezentată de *Staphylococcus aureus* (21,9%; ÎI 95% 21,7-22,1), urmată în ordinea descreșterii frecvenței de *Pseudomonas aeruginosa* (15,2%; ÎI 95% 15,0-15,4), de *Klebsiella pneumoniae* (13,3%; ÎI 95% 13,1-13,5) și de speciile din genul *Enterococcus* spp. (11,9%; ÎI 95% 11,7-12,1).
3. Profilurile de rezistență la antimicrobiene ale izolatelor din ulcerele trofice infectate denotă o rezistență marcată la aceste preparate. Tulpinile de *Staphylococcus* spp. au înregistrat rezistență multiplă la antimicrobiene în 68,4% de cazuri, inclusiv 43,7% de tulpini au dat dovadă de rezistență la meticilină, iar 19,6% de rezistență inductibilă la clindamicină. Enterobacteriile au manifestat rezistență vădită la aminopeniciline, peniciline cu inhibitori de beta-lactamaze și cefalosporine. Tulpinile de *P. aeruginosa* și de *A. baumannii* au prezentat rezistență înaltă la majoritatea preparatelor utilizate în tratament.
4. Un număr semnificativ de tulpini de bacili gram-negativi s-au prezentat ca producători de β -lactamaze cu spectru extins, în special tulpinile de *P. aeruginosa* - 40,6% (ÎI 95% 39,3-41,9), urmate de tulpinile de *K. pneumoniae* cu 36,9% (ÎI 95% 35,7-38,1) și de *E. coli* cu 33,9% (ÎI 95% 32,7-35,1). Producători de β -lactamazele de tip AmpC s-au dovedit a fi tulpinile de *A. baumannii* - 28,3% (ÎI 95% 27,0-29,6), de *K. pneumoniae* - 4,2% (ÎI 95% 3,47-4,93) și de *P. aeruginosa* - 4,2% (ÎI 95% 3,47-4,93). Tipurile de carbapenemaze frecvent înregistrate au fost OXA-48 (2,6%; ÎI 95% 2,5-2,7) și NDM (0,3%; ÎI 95% 0,26-0,34), iar la tulpinile de *A. baumannii* - OXA-23 (5,7%; ÎI 95% 4,8-6,6) și OXA-58 (3,8%; ÎI 95% 3,1-4,5).
5. Expresia fenotipică a factorilor de virulență la agenții microbieni testați a fost variabilă, în funcție de tulpinile de referință. Majoritatea tulpinilor au

- exprimat toxine formatoare de pori, în special lipaza (74,2%), lecitinaza (53,6%) și hemolizinele (57,7%), implicate atât în invazie, cât și în evitarea răspunsului imun al gazdei. Lizozimul a fost inactivat de 93,3% dintre tulpini, majoritatea (47,2%) prezentând grad mediu de exprimare a activității antilizozim. Activitate anticomplementară au demonstrat 95,2% dintre tulpinile testate. Capacitatea de formare a biofilmelor a fost observată la 73,2% dintre tulpinile izolate din ulcere trofice. Toți factorii de patogenitate determinați au fost înregistrați într-o rată mai mare la tulpinile izolate din infecții polimicrobiene și cu rezistență multiplă la preparatele antimicrobiene.
6. Studiul activității antimicrobiene a unor entități chimice, care au în calitate de precursor de sinteză azotatul de cupru (II), a evidențiat o acțiune antimicrobiană înaltă asupra microorganismelor gram-pozitive luate în studiu. Activitate mai exprimată au demonstrat compușii din clasa tiosemicarbazonaților metalelor de tranziție, iar asupra bacililor gram-negativi - compușii sintetizați pe baza clorurii de cupru. Compușii biologici au manifestat o activitate antimicrobiană mai înaltă asupra bacteriilor gram-pozitive, în special compusul *MX1*, urmat în ordinea descreșterii acțiunii de compușii *MX2* și *ES*. Determinarea toxicității acute a compușilor chimici noi față de dafnii au demonstrat că, atât ligandul ($CL_{50} 5,53 \pm 0,90$), cât și compușii coordinativi ai cuprului ($Cu L Br - CL_{50} 4,4 \pm 0,96$; $Cu L Cl - CL_{50} 3,5 \pm 0,91$) denotă o toxicitate mai redusă în comparație cu preparatul medicamentos clorhidratul de doxorubicină ($CL_{50} 3,27 \pm 0,30$).
 7. Compușii chimici și biologici luați în studiu au manifestat acțiune sinergică în 87,2% de cazuri, acțiuni aditive în 6,8% și indiferente în 6,0%. Efectele aditive și indiferente au fost observate mai ales împotriva bacililor gram-negativi și micetelor levuriforme. Acțiuni antagoniste nu au fost înregistrate la combinarea compușilor chimici și biologici luați în studiu. În combinații, CMI pentru compușii chimici și biologici s-a redus de la patru până la 32 de ori în comparație cu CMI a compușilor aparte.
 8. La utilizarea aparte a compușilor chimici și biologici în concentrație de 0,25CMI nu a fost înregistrată reducerea numărului de celule microbiene, iar la combinarea acestor compuși, microorganismele au fost omorâte timp de 8-24 de ore. Cel mai scurt timp de distrugere a celulelor microbiene (8-20 ore) a fost înregistrat la combinarea compușilor chimici cu compusul biologic *MX1*.
 9. Prezentul studiu a demonstrat că unii factori de patogenitate a microorganismelor precum activitatea anticomplementară, antilizozim, lecitinazică, hemolitică și capacitatea de formare a biofilmelor microbiene au fost diminuați mai puternic la utilizarea compușilor chimici și biologici în concentrații de 75% atât aparte, cât și în combinație. O inhibiție mai semnificativă a factorilor de patogenitate a fost evidențiată la combinarea compusului biologic *MX1* cu compușii chimici.
 10. Extractele de spirulină nu au exercitat efect toxic direct asupra tulpinilor de referință, spre deosebire de compușii chimici care, în concentrații minime inhibitoare, au produs efecte toxice pronunțate asupra tulpinilor de referință.

Acțiunea combinată a compușilor asupra parametrilor investigați este mai eficientă, deoarece în acest caz concentrația minim invazivă a compușilor este de 2-4 ori mai mică comparativ cu cea a compușilor folosiți aparte. Compușii chimici și cei naturali acționează sinergic, prin mecanisme neevidențiate în cadrul prezentului studiu, dar care le oferă perspective mari în calitate de agenți antimicrobieni, cu grad redus de toxicitate și potențial scăzut de formare a rezistenței.

11. În contextul influenței compușilor biologic activi asupra parametrilor fiziologici *in vitro*, efecte pozitive s-au înregistrat asupra tuturor parametrilor studiați, manifestate prin micșorarea valorii indicilor stresului oxidativ, sistemului proinflamator și majorarea potențialului antioxidant și antiinflamator. Compușii chimici au prezentat efecte negative, înregistrând valori crescute pentru indicii stresului oxidativ și componentele sistemului proinflamator, favorizând sistemele antioxidant și antiinflamator. La acțiunea combinată a compușilor luați în studiu s-au atestat efecte pozitive, în special asupra sistemului antiinflamator și a indicilor stresului oxidativ.

RECOMANDĂRI PRACTICE

1. Se propun procedee de evidențiere a expresiei factorilor de patogenitate a microorganismelor în timp util, ceea ce permite elaborarea unor recomandări practice în indicarea tratamentelor antimicrobiene țintite care vor contribui la reducerea rezistenței la antimicrobiene.
2. Se recomandă compuși biologic activi cu activitate antimicrobiană pronunțată în calitate de substanțe cu efecte antibacteriene față de tulpinile asociate ulcerului trofic infectat și se propune continuarea cercetărilor clinice privind elaborarea produselor antimicrobiene combinate de sinteză și naturiste.
3. Metodele aplicate și rezultatele obținute în prezentul studiu pot fi utilizate în procesul de instruire universitară și postuniversitară la disciplinele microbiologie clinică și laboratorul microbiologic.

Sugestii privind cercetări de perspectivă

1. Rezultatele obținute în prezentul studiu necesită confirmare în cercetările *in vivo* prin inițierea testărilor preclinice a acțiunii antimicrobiene a compușilor biologic activi.
2. Sunt necesare cercetări orientate spre evidențierea mecanismelor de acțiune a compușilor biologic activi cu activitate antimicrobiană pronunțată asupra microorganismelor asociate ulcerelor trofice.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. AGALE, S. Chronic Leg Ulcers: Epidemiology, Aetiopathogenesis and Management. In: *Hindawi Publ Corp Ulcers*. 2013, p. 9-23. ISSN 2314-6133.
2. ALRUB, A. HYASSAT, D., KHADER, Y., BANI-MUSTAFA, R., YOUNES, N., AJLOUNI, K. Factors Associated with Health-Related Quality of Life among Jordanian Patients with Diabetic Foot Ulcer. In: *Journal of Diabetes Research*. 2019, pp. 1-8. ISSN 23146745 (IF: 2.965).
3. ANDERSSON, D., BALABAN, N., BAQUERO, F., COURVALIN, P., GLASER, P., GOPHNA, U., et al. Antibiotic resistance: turning evolutionary

- principles into clinical reality. In: *FEMS Microbiol. Rev.* 2020, nr. 43, pp. 341-361. ISSN 0168-6445 (IF: 16.408).
4. ASTRID, L., UNNI, G., KARSTEN, G. et al. Antimicrobial Resistance in a One Health and One World Perspective – Mechanisms and Solutions. In: *INTERNATIONAL ENCYCLOPEDIA OF PUBLIC HEALTH*. Second Edition Academic Press, 2016, vol. 1, chapter 22, pp. 140-153. ISBN 9780128037089.
 5. AYED, M., ABABNEH, M., ROBERT, A., ALZAID, A., AHMED, R., SALMAN, A., et al. Common pathogens and antibiotic sensitivity profiles of infected diabetic foot ulcers in Saudi Arabia. In: *Int J Lower Extrem Wounds*. 2018, pp. 1-8. ISSN 1534-7346 (IF: 0.570).
 6. BONDAREVA, G., STADNYUK, G., GREBENNIKOVA, T., SHASHLOVA, M., DONINA, M. Antimicrobial Properties of Some Zinc Compounds. In: *Sys Rev Pharm.* 2020, 11(12), pp. 2065-2066. ISSN 0975-8453 (IF: 5.373).
 7. BUIUC, D. NEGUȚ, M. *Tratat de microbiologie clinică*. București: Ed. Medicală, 2017. 1250 p. ISBN 978-973-39-0593-6.
 8. CZAPLEWSKI, L., BAX, R., CLOKIE, M., DAWSON, M., FAIRHEAD, H., FISCHETTI, VA., et al. Alternatives to antibiotics-a pipeline portfolio review. In: *Lancet Infect Dis.* 2016, nr. 16, pp. 239-251. ISSN 14733099. (IF:19.864).
 9. DATTA, P, CHANDER, J, GUPTA, V, MOHI, G., ATTRI, A. Evaluarea diversilor factori de risc asociați cu organisme rezistente la medicamente, izolate de la pacienții cu ulcer diabetic. In : *J Medici de laborator*. 2019, 11 (1), pp. 58-62. ISSN 1841-6624. (IF:0.945).
 10. DEFOIRDT, T. Quorum-sensing systems as targets for antivirulence therapy. In: *Trends Microbiol.* 2017, nr. 26, pp. 313-328. ISSN 18784380.
 11. DINGUES, M., ORWIN, P., SCHLIEVERT, M. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. In: *Clin Microb Reviews*. 2000, 13(1), pp. 16-34. ISSN1098-6618. (IF:13.484).
 12. EIKMEYER, F., HADIATI, A., SZCZEPANOWSKI, R., et al. The complete genome sequences of four new IncN plasmids from wastewater treatment plant effluent provide new insights into IncN plasmid diversity and evolution. In: *Plasmid*. 2012, vol. 68, nr.1., pp. 13-24. ISSN 0147-619X.
 13. ELBARSHA, A., HAMEDH, M. AI., ELSAEITI, M. Prevalence and risk factors of diabetic peripheral neuropathy in patients with type 2 diabetes mellitus. In: *Ibnosina Journal of Medicine and Biomedical Sciences*. 2019, 11(1), pp. 25-28. ISSN: 1947489X.
 14. FONG , J., ZHANG, C., YANG, R., BOO, Z., TAN, S., NIELSEN, T., et al. Combination therapy strategy of quorum quenching enzyme and quorum sensing inhibitor in suppressing multiple quorum sensing pathways of *P. aeruginosa*. In: *Sci. Rep.* 2018, nr. 8, p. 1155-1166. ISSN 2045-2322.
 15. FOTHERGILL, A. Antifungal Susceptibility Testing: Clinical Laboratory and Standards Institute (CLSI) Methods. In: *Hall GS, editor. Interactions of Yeasts, Moulds, and Antifungal Agents*. Totowa, NJ: Humana Press. 2012, pp. 65-74.
 16. GARCIA, T., BORGES E., JUNHO T., SPIRA J. Microbiological profile of leg ulcer infections: review study. In: *Rev Bras Enferm.* 2021, nr. 74(3):e20190763, pp. 923-930. ISSN 347167.
 17. GLADUN, N. et al. Ateroscleroza obliterantă a membrelor inferioare. În: *Arta Medica*. 2007, 3 (24), p. 44-46. ISSN 1810-1852.

18. GREEN, J., JESTER, R., MCKINLEY, R. , POOLER, A. The impact of chronic venous leg ulcers: asystematic review. In: *J Wound Care*. 2014, nr. 23, pp. 601-612. ISSN: 0969-0700. (IF:1.069).
19. GUAN, H., DONG, W., LU, Y., et al. Distribution and Antibiotic Resistance Patterns of Pathogenic Bacteria in Patients With Chronic Cutaneous Wounds in China. In: *Frontiers in Medicine*. 2021, vol. 8, p. 274-287. ISSN 2296-858X. (IF: 5.091).
20. HAY, S., RAO, P., DOLECEK, C., DAY, N., STERGACHIS, A., LOPEZ, A., et al. Measuring and mapping the global burden of antimicrobial resistance. In: *BMC Med*. 2018, 16(1), pp. 78-81. ISSN 1741-7015. (IF: 8.285).
21. KULESZA, T, MITRUT T, JOJCZUK M, JAHOLKOWSKI L, NODALSKI A, PRYSTUPA A. Treatment of lower limb trophic ulcers using hyperbaric oxygenation. In: *J Pre Clin Clin Res*. 2014, 8(1), pp. 44-47. ISSN 1898-7516.
22. LINDSAY, S., OATES, A., BOURDILLON, K. The detrimental impact of extracellular bacterial proteases on wound healing. In: *International Wound Journal*. 2017, nr. 14, pp. 1237-1247. ISSN 1742-4801.
23. MARKEVICH, P., MARKEVICH, L., PLEKHANOV, A. The pharmacotherapeutic efficiency of cytoflavin in patients with diabetic foot syndrome: immediate and long-term results. *Klin Med*. 2015, vol.33, nr. 6, pp. 67-72. ISSN 2077-0383. (IF: 5.583).
24. NAYLOR, NR, ATUN R, ZHU N, KULASABANATHAN K, SILVA S, CHATTERJEE A, et al. Estimating the burden of antimicrobial resistance: a systematic literature review. In: *Antimicrob Resist Infect Control*. 2018, nr. 7, pp. 58.
25. PIROG, T., KLIUCHKA, I., KLIUCHKA, L. Synergistic action on microorganisms of complex of essential oils with the biocides. In: *Biotechnologia Acta*. 2019, vol. 12, pp. 5-17.
26. PODOLSKY, S. The evolving response to antibiotic resistance (1945–2018). *Palgrave Commun*. 2018, nr. 4, pp. 214-132.
27. PUGLIESE, D. Infection in Venous Leg Ulcers: Considerations for Optimal Management in the Elderly. In: *Drugs Aging*. 2016, nr. 33, pp. 87-96. ISSN 1170-229X.
28. RAHMAN, M., SARKER S. D. Antimicrobial natural products. In: *Annual reports in Medicinal Chemistry*. 2020, vol. 55, pp. 77-113. ISSN 0065-7743, ISBN 9780128210192.
29. RAJPUT A., THAKUR, A., SHARMA, S., AND KUMAR, M. aBiofilm: a resource of anti-biofilm agents and their potential implications in targeting antibiotic drug resistance. In: *Nucleic Acids Res*. 2017, nr. 46, pp. 894–900.
30. RIBEIRO, S., FELICIO, M., BOAS, E. V., GONÇALVES, S., COSTA, F. F., SAMY, R. P., et al. New frontiers for anti-biofilm drug developmen. In: *Pharmacol. Ther*. 2016, nr. 160, pp. 133-144.
31. SAHA, R, SARKAR S, MAJUMDER M, BANERJEE G. Bacteriological Profile of Aerobic and Anaerobic Isolates of Trophic Ulcer in Leprosy: A Study from Eastern India. In: *Indian J Dermatol*. 2019, 64(5), pp. 372-376.
32. SASANKA, S. Venous ulcers of the lower limb: where do we stand? In: *Indian Journal of Plastic Surgery*. 2012, vol. 45, nr. 2, pp. 266-274. ISSN 0970-0358.
33. SELIVESTROV, E.I., AVAKYANTS, I.P., NIKISHKOV, A.S., & ZOLOTUKHIN, I. A. Epidemiology of Chronic Venous Disease. In: *Journal of Venous Disorders (Flebologiya)*. 2016, nr. 1, pp. 35-40.

34. SERMSATHANASAWADI, N., PRUEKPRASERT, K., PITAKSANTAYOTHIN, W., CHINSAKCHAI, K., WONGWANIT, C., RUANGSETAKIT, C., MUTIRANGURA, P. Prevalence, risk factors, and evaluation of ilio caval obstruction in advanced chronic venous insufficiency. In: *J Vasc Surg Venous Lymphat Disord*. 2019, nr. 7, pp. 441-447.
35. SHAHI, S., KUMAR, A. Isolation and Genetic Analysis of Multidrug Resistant Bacteria from Diabetic Foot Ulcers. In: *Frontiers in Microbiology*. 2016. Vol. 6, pp. 59-64. ISSN1664-302X. (IF:4.076).
36. SHIMANKO, A., DIBIROV, M., ZUBRITSKY, V., et.al. The Combined Treatment of Trophic Ulcers of Venous Etiology. In: *Journal of Venous Disorders (Flebologiya)*. 2017, nr. 2, pp. 91-95.
37. SILLANKORV, S., PEREIRA, M., HENRIQUES, M. *Antibiotic Alternatives and Combinational Therapies for Bacterial Infections*. In: *Front Microbiol*. 2019, vol. 9, pp. 3359-3361.
38. SORG, H., TILKORN, D. J., HAGER, S., HAUSER, J., MIRASIJSKI, U. Skin Wound Healing: An Update on the Current Knowledge and Concepts. In: *Eur Surg Res*. 2016, nr. 58, pp. 81-94.
39. TROTTER, A. J., AYDIN, A., STRINDEN, M. J. & O'GRADY, J. Recent and emerging technologies for the rapid diagnosis of infection and antimicrobial resistance. In: *Curr. Opin. Microbiol*. 2019, nr. 51, pp. 39-45. ISSN 1369-5274 (IF: 8.134).
40. WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) [online]. Lack of new antibiotics threatens global efforts to contain drug-resistant infections. 2020 [citat 09.06.21]. Disponibil: <https://www.who.int>.
41. WHO. Antibiotic Resistance [online]. 2020. [citat 09.06.21].Disponibil: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance>.
42. WHO. Ten threats to global health in 2019 [online], 2019 [citat 13.02.2020]. Disponibil: <https://www.who.int/emergencies/ten-threats-to-global-health-in-2019>.
43. ZAVARUEV, A.V., BREGADZE A.A., & KOZKA A.A. The Experience with the Surgical Treatment of Venous Trophic Ulcers. In: *Flebologiya*. 2016, nr. 2, pp. 103–105. ISSN: 2309-5601.
44. ZHARKOVA, M. S., ORLOV, D. S., GOLUBEVA, O. Y., CHAKCHIR, O. B., ELISEEV, I. E., GRINCHUK, T. M., et al. Application of antimicrobial peptides of the innate immune system in combination with conventional antibiotics-a novel way to combat antibiotic resistance? In: *Front. Cell. Infect. Microbiol*. 2019, nr. 9, pp. 128. ISSN: 2235-2988 (IF: 4.123).
45. МИКИТИН, И.Л., КАРАПЕТЯН, Г.Э., КОЧЕТОВА, Л.В., ЯКИМОВ, С.В., ПАХОМОВА, Р.А. Современный взгляд на лечение трофических язв. В: *Креативная хирургия и онкология*. 2013, №4, с. 108-112. ISSN: 2307-0501.

LISTA PUBLICAȚIILOR LA TEMA TEZEI

1. Monografii

1.1. Monografii monoautor

1.1.1 BĂLAN, G. *Rzistența microorganismelor la antibiotice*. Chișinău: Tipografia „Print-Caro”, 2018. 240 p. ISBN 978-9975-56-597-4.

2. Articole în reviste științifice

2.1. în reviste din bazele de date Web of Science și SCOPUS

2.1.1. GULEA, A., GRAUR, V., CHUMAKOV, YU., PETRENKO, P., BĂLAN, G. et al. Synthesis, Structure, and Biological Activity of Copper and Cobalt Coordination

Compounds with Substituted 2-(2-Hydroxybenzylidene)-N-(prop-2-en-1-yl)hydrazinecarbothioamides. In: *Russian Journal of General Chemistry*. 2019, 89(5), 953-964. Doi: 10.1134/S1070363219050153 (IF: 0,761).

2.1.2. GULEA, A., MITKEVICH, N., CHUMAKOV, YU., PETRENKO, P., **BALAN, G.** et al. Synthesis, Structure, and Biological Activity of Coordination Compounds of Cobalt(II), Nickel(II), and Copper(II) with N-(Methoxyphenyl)-2-[(5-nitrofuryl)methylene]hydrazine Carbothioamides. In: *Russian Journal of General Chemistry*. 2019, 89(7), 1415-1423. Doi: 10.1134/S1070363219070119 (IF: 0,761).

2.1.3. **BALAN, G.**, BURDUNIUC, O., USATAIA, I. et al. Novel 2-formylpyridine 4-allyl-Smethylisothiosemicarbazone and Zn(II), Cu(II), Ni(II) and Co(III) complexes: Synthesis, characterization, crystal structure, antioxidant, antimicrobial and antiproliferative activity. In: *Applied Organometallic Chemistry*. 2020, 34: e5423. Doi: org/10.1002/aoc.5423 (IF: 4,105).

2.1.4. GULEA, A., USATAIA, I., GRAUR, V., CHUMAKOV, YU., PETRENKO, P., **BALAN, G.** et al. Synthesis, Structure and Biological Activity of Coordination Compounds of Copper, Nickel, Cobalt, and Iron with Ethyl N'-(2-Hydroxybenzylidene)-N-prop-2-en-1-ylcarbamohydrazonothioate. In: *Russian Journal of General Chemistry*. 2020, 90(4), pp. 630–639. ISSN 1070-3632. Doi: 10.1134/S107036322004012X. (IF: 0,767).

2.1.5. GULEA, A., GRAUR, V., DIURICI, E., ULCHINA, IA., BOUROSH, P., **BALAN, G.** et al. Synthesis, Structure, and Biological Activity of Copper(II), Nickel(II), Cobalt(III), and Iron(III) Coordination Compounds with 2-{2-[(Prop-2-en-1-yl)carbamothioyl]hydrazinylidene}propanoic Acid. In: *Russ J Gen Chem*. 2020, 90(11), 2120-2127. Doi: 10.1134/S107036322011016X (IF: 0,767).

2.2. în reviste din străinătate recunoscute

2.2.1. **BALAN, G.** et al. Frequency of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains in healthcare associated infections in Republic of Moldova. In: *Romanian Archives of Microbiology and Immunology*. 2017, vol. 76 (2), pp.79-84. ISSN 1222-3891.

2.2.2. **БЭЛАН, Г.**, БЕХТА, Е. Биопленкообразующая способность штаммов *Pseudomonas aeruginosa* выделенных из трофических язв и их ассоциация с антимикробной резистентностью. В: *Международный научный журнал „Научные горизонты”*. 2020, 9(37), с. 100-109. ISSN 2587-618X.

2.2.3. **BALAN, G.**, BURDUNIUC, O. Antibiotic resistance and biofilm formation of *S. aureus* and *C. albicans* strains isolated from trophic ulcers. В: *Международный научный журнал „Научные горизонты”*. 2020, 9(37), с. 110-118. ISSN 2587-618X.

2.2.4. BURDUNIUC, O., DJUR, S., CHIRIAC, T., RUDIC, V., **BALAN, G.** In vitro evaluation of antimicrobial and biofilm inhibitory activity of *Spirulina platensis* extracts. В: *Здоров'я суспільства*. 2020, том 9, № 3; 118-123. ISSN 2306-2436.

2.2.5. **BALAN, G.** et al. Antibiotic susceptibility of clinical *Acinetobacter baumannii* strains. В: *Международный научный журнал „Научные горизонты”*. 2020, 11(39), с. 161-167. ISSN 2587-618X.

2.2.6. **БЭЛАН, Г.** Чувствительность к антибиотикам и некоторые факторы патогенности штаммов *Klebsiella spp.*, выделенных из трофических язв. В: *Здоров'я суспільства*. 2020, том 9, № 4; 150-154. ISSN 2306-2436.

2.3. în reviste din Registrul Național al revistelor de profil, cu indicarea categoriei - categoria B

2.3.1. GHENDOV-MOȘANU, A., COJOCARI, D., **BALAN, G.**, STURZA, R. Antimicrobial activity of rose hip and hawthorn powders on pathogenic bacteria. In:

Journal of Engineering Science. Chișinău, 2018, Vol. XXV (3), p. 100-107. ISSN 2587-3474.

2.3.2. **BALAN, G.** Antibiotic susceptibility and some persistence factors of Gram-negative bacilli isolated from trophic ulcers. In: *The Moldovan Medical Journal*. 2019, 62(3): 13-17. ISSN 2537-6373.

2.3.3. **BALAN, G.** The bacterial strains isolated from trophic ulcers their persistence factors. In: *The Moldovan Medical Journal*. 2019, 62(4): 36-18. ISSN 2537-6373.

2.3.4. **BALAN, G., BURDUNIUC O.** Antimicrobial susceptibility and biofilm production among *Staphylococcus* and *Candida* species. In: *The Moldovan Medical Journal*. 2020, 63(1): 3-7. ISSN 2537-6373.

2.3.5. **BALAN, G.** Antibiotic susceptibility and factors involved in virulence and persistence of *Acinetobacter baumannii* strains. In: *The Moldovan Medical Journal*. 2021, 64(1):4. ISSN 2537-6373.

2.3.6. **BĂLAN, G., RUDIC V.** Spectrul etiologic și dificultățile terapeutice în infecțiile de plagă. În: *Sănătate Publică, Economie și Management în Medicină*. 2014, 3(54): 147-149. ISSN 1729-8687.

2.3.7. **BURDUNIUC, O., BĂLAN, G.** Conștientizarea populației privind consumul de antimicrobiene în Republica Moldova. În: *Sănătate Publică, Economie și Management în Medicină*. 2015, 3(60): 160-163. ISSN 1729-8687.

2.3.8. **BĂLAN, G.** Formarea biofilmelor *in vitro* de către tulpinile de *Pseudomonas aeruginosa* și asocierea acestora cu rezistența antimicrobiană. În: *Sănătate Publică, Economie și Management în Medicină*. 2019, 4(82): 276-280. ISSN 1729-8687.

2.3.9. **BĂLAN, G.** Rezistența la antibiotice și formarea biofilmelor de către tulpinile de *Staphylococcus aureus* izolate din ulcere trofice. În: *Sănătate Publică, Economie și Management în Medicină*. 2020, 1(83): 48-52. ISSN 1729-8687.

2.3.10. **RUSNAC, R., BÎRCĂ, M., ȘOVA, S., COTOVAIA, A., BALAN, G.** et al. Sinteza și proprietățile antibacteriene și antifungice ale compușilor coordinați ai Fe(III) Cu 4-ciclohexiltiosemicarbazona 4-benzoil-3-metil-1-fenil-2-pirazolin-5-onă. În: *Studia Universitatis Moldaviae. Chișinău*. 2020, nr.1(131) Seria “Științe Reale și ale Naturii”, pp. 32-37. ISSN 1814-3237.

2.3.11. **BEHTA, E., BURDUNIUC, O., BUCOVA, V., CRACIUN, O., BIVOL, M., BURDUNIUC, A., BRÎNZĂ, O. GRUMEZA, M., BALAN, G.** Antimicrobial discovery – impact of the natural sources. În: *Studia Universitatis Moldaviae. Chișinău*. 2020, nr.6(136) Seria “Științe Reale și ale Naturii”, p. 39-48. ISSN 1814-3237.

2.3.12. **BUCOV, V., BURDUNIUC, O., BALAN, G.** ș. a. Rezistența la antimicrobiene. Caracteristica rezistenței la preparate antimicrobiene a bacteriilor Gram-negative. În: *Sănătate Publică, Economie și Management în Medicină*. 2021, 1(88): 50-56. ISSN 1729-8687.

- categoria C

2.3.13. **BURDUNIUC, O., COJOCARU, R., BĂLAN, G.** ș. a. Determinarea unor markeri ai rezistenței enterobacteriilor la preparatele antimicrobiene. În: *Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științele Vieții*. 2012, 3(318): 151-158. ISSN 1857-064X.

3. Articole în culegeri științifice

3.1. în lucrările conferințelor științifice internaționale (Republica Moldova)

3.1.1. **BĂLAN, G.** Incidence and antibiotic susceptibility of bacterial strains isolates from wound infections. In: *Scientific Conference on Microbial Biotechnology (3rd edition)*. Chișinău; 2016, pp. 24-27. ISBN 978-9975-3129-3-6.

3.2. în lucrările conferințelor științifice internaționale (Republica Moldova)

3.2.1. **BALAN, G.** et al. Synergistic Action of Some Chemical and Biological

Compounds. În: *Materialele Conferinței științifice naționale cu participare internațională „Materiale avansate în biofarmaceutică și tehnică”*. Chișinău, 2021, pp. 314-325. ISBN 978-9975-89-216-2.

3.2.2. LOZAN-TIRSU, C., RUDIC, V., **BĂLAN, G.**, GULEA, A. Activitatea enzimelor antioxidante în culturile de referință la acțiunea compușilor chimici noi. În: *Materialele Conferinței științifice naționale cu participare internațională „Materiale avansate în biofarmaceutică și tehnică”*. Chișinău, 2021, pp. 154-162. ISBN 978-9975-89-216-2.

4. Teze în culegeri științifice

4.1. în lucrările conferințelor științifice internaționale (peste hotare)

4.1.1. **BĂLAN, G.** et al. Antifungal activity of 2-acetylpyridine{n-(4-aminophenyl)-acetamid}thiosemicarbazone and salicylaldehyde { n-(4-amino-phenyl)-acetamid} thiosemicarbazone. În: *Supliment la Revista Română de Medicină de Laborator*. Timișoara, România, 2018, nr.3, vol. 26, p. 50. ISSN 18416624.

4.1.2. **BĂLAN, G.** et al. Antifungal activity of new copper (II) complexes with 4-benzoyl-5-methyl-2-phenyl-2,4-dihydro-3h-pirazol-3-one n(4)-ciclohexylthiosemicarbazone. În: *Supliment la Revista Română de Medicină de Laborator*. Timișoara, România, 2018, nr.3, vol. 26, p. 50. ISSN 18416624.

4.1.3. BURDUNIUC, O., **BĂLAN, G.** et al. Antifungal activity of some 3d metal coordination compounds with 2-[2-(prop-2-en-1-ylcarbamoithioy)-hydrazinylidene]-propanoic acid. În: *Supliment la Revista Română de Medicină de Laborator*. Timișoara, România, 2018, nr.3, vol. 26, p. 50. ISSN 18416624.

4.1.4. BURDUNIUC, O., **BĂLAN, G.** et al. Antifungal activity of iron, cobalt, nickel and zinc coordination with 2-[1-(2,4-dihydroxyphenyl)ethylidene]-n-(prop-2-en-1-yl)-hydrazinencarbothioamide. În: *Supliment la Revista Română de Medicină de Laborator*. Timișoara, România, 2018, nr.3, vol. 26, p. 50. ISSN 18416624.

4.1.5. **БАЛАН, Г.** и др. Видовая структура и резистентность к антибиотикам микроорганизмов, выделенных из инфицированных ран. В: *Материалы XII Межгосударственной научно-практической конференции „Вклад государств-участников содружества независимых государств в обеспечение санитарно-эпидемиологического благополучия населения в современных условиях”*. Саратов, Россия, 2014, с. 22-23. ISBN 978-5-4253-0773-6.

4.1.6. **BĂLAN, G.** et al. Staph wound infections and methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. În: *Materialele celei de-a VII-a Conferință Națională de Microbiologie și Epidemiologie*. București, România, 2014, vol. 59, p. 41. ISSN: 1220 – 3696.

4.1.7. **БАЛАН, Г.** и др. Антибиотикорезистентность *Staphylococcus aureus*, выделенных из гнойных ран. В: *Епідеміологічні дослідження в клінічній та профілактичній медицині: досягнення та перспективи: матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю, присвяченої 210-й річниці Харківського національного медичного університету та 85-річчю кафедри епідеміології*. Харків, Україна, 2015, с. 35-37. ISBN 978-617-7225-50-7.

4.1.8. **BĂLAN, G.** et al. Prevalence and antibiotic sensitivity of bacteria isolated from nosocomial infections. In: *International Conference titled “Socio-psycho-medical changes in the lifestyles of the contemporary family”*. Antropological Research and Studies. Bucharest, Romania, 2015, nr. 5, p. 12. ISSN-1 0039 – 3886.

4.1.9. **BĂLAN, G.** et al. Multidrug – resistant bacteria isolates in infected wounds. In: *International Conference titled “Socio-psycho-medical changes in the lifestyles of the contemporary family”*. Antropological Research and Studies. Bucharest, Romania, 2015, nr. 5, p. 11. ISSN-1 0039 – 3886.

- 4.1.10. GULEA, A., CEBOTARI, D., BĂLAN, G. et al. Synthesis, structure and antimicrobial activity of some 3d-metal coordination compounds with 2-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde 4-(dimethylphenyl)thiosemicarbazones. In: *Abstract book 4th Colloque Franco-Roumain de Chimie Medicinale*. Iași, România, 2017, p. 72.
- 4.1.11. DIACOVA, S., BALAN, G. et al. Antimicrobial susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa*. In: *Abstract book National ENT, Head and Neck Surgery Conference*. Sibiu, România, 2017, p. 122.
- 4.1.12. ЯСЫБАШ, О., БАЛАН, Г. и др. Внебольничные инфекции, обусловленные метициллинрезистентным стафилококком. В: VI Ежегодная Международная Научно-Практическая Конференция „Актуальные вопросы медицины”. Баку, Азербайджан, 2017, с. 13-14. ISSN 978-81-942709-5-9.
- 4.1.13. БАЛАН, Г. Спектр антибиотикоустойчивости и персистентные свойства штаммов *Staphylococcus aureus* выделенных из содержимого трофических язв. В: VII Ежегодная Международная Научно-Практическая Конференция „Актуальные вопросы медицины”. Баку, Азербайджан, 2018, с. 15-17. ISBN 978-9952-8276-0-6.
- 4.1.14. БАЛАН, Г. и др. Влияние препарата BioR на персистентные свойства микроорганизмов. В: VII Ежегодная Международная Научно-Практическая Конференция „Актуальные вопросы медицины”. Баку, Азербайджан, 2018, с. 12-13. ISBN 978-9952-8276-0-6.
- 4.1.15. GULEA, A., BĂLAN, G. et al. Synthesis, structure and biological activity of some 3d-metal coordination compounds with N'-[3-(methyl-5-oxo-1-phenyl-4,5-dihydro-1H-pyrazol-4-yl)(phenyl)methylidene] benzohydrazide. In: *A XXXV-a Conferință Națională de Chimie. Călimănești-Căciulata, Vâlcea, România*, 2018, p. 24.
- 4.1.16. BALAN, G. Bacterial etiology and antibiotic susceptibility pattern of bacteria isolated from diabetic foot ulcers. In: *Materials of the Conference "Contemporary Issues In Preventive Medicine"*. Yerevan, Republic of Armenia, 2018, p. 48-49. ISBN 978-9939-65-204-7.
- 4.1.16. БЭЛАН, Г. и др. Исследование антибактериальных свойств координационных соединений меди(II) на основе этилового эфира 4-([2-(2-гидроксibenзилиден) гидразинил]карбонотиоил}-амино)бензоата. В: VIII Ежегодная Международная Научно-Практическая Конференция „Актуальные вопросы медицины”. Баку, Азербайджан, 2019, с. 4. ISSN 978-9952-8279-6-4.
- 4.1.17. BALAN, G. et al. A study on biofilm production among *Candida* species. In: *VIII Annual International Scientific-Practical Conference „Medicine pressing questions"*. Baku, Azerbaijan, 2019, с. 60. ISSN 978-9952-8279-6-4.
- 4.1.18. BALAN, G. Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* isolated from trophic ulcers and their association with antimicrobial resistance. În: *Zilele U.M.F. din Craiova a XLIX-a. Volum de rezumate*. Craiova, România, 2019, p. 65. ISSN: 1843-2441.
- 4.1.19. BALAN, G. ș. a. Rezistența la antibiotice a tulpnilor de *Staphylococcus* spp. izolate din ulcere trofice a membrilor inferioare. În: *Zilele U.M.F. din Craiova a XLIX-a. Volum de rezumate*. Craiova, România, 2019, p. 67. ISSN: 1843-2441.
- 4.1.20. BALAN, G., BURDUNIUC, O. Synergistic antimicrobial activity of some chemical compounds combined with spirulina extracts. In: *Scientific Collection «InterConf», (44): with the Proceedings of the 8 th International Scientific and Practical Conference «Scientific Research in XXI Century»*. Ottawa, Canada, 2021, pp. 437-439. ISBN 978-0-458-20903-3.
- 4.1.21. BALAN, G. Association between antibiotic resistance and virulence factors of *Klebsiella pneumoniae* strains. *Scientific Collection «InterConf», (45): with the Proceedings of the 3 th International Scientific and Practical Conference «Scientific*

Community: Interdisciplinary Research». Hamburg, Germany, 2021, pp. 324-329. ISBN 978-3-512-31217-5.

4.2. în lucrările conferințelor științifice internaționale (Republica Moldova)

4.2.1. **BĂLAN, G.**, RUDIC, V. Optimizing antimicrobial prescribing: meticillin resistant *Staphylococcus aureus* in staph wound infections. In: *Scientific international conference on microbial biotechnology (2nd edition)*. Chișinău, 2014, p. 99. ISBN 978-9975-4432-8-9.

4.2.2. ORLIOGLO, A., **BĂLAN, G.** Antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* strains. In: *The international conference - Life sciences in the dialogue of generations: „Connections between Universities, Academia and Business Community”*. Chișinău, 2016, p.92.

4.2.2. RUDIC, V., **BĂLAN, G.** et al. Antibacterial and antifungal properties of algae product BioR. In: *International Scientific Conference on Microbial Biotechnology (3rd edition)*. Chișinău, 2016, p. 81. ISBN 978-9975-3129-3-6.

4.2.3. **BĂLAN, G.** et al. Bacterial profile and antibiotic resistance in patients with trophic ulcers. In: *International Scientific Conference on Microbial Biotechnology (4nd edition)*. Chișinău, 2018, p. 27. ISBN 978-9975-3178-8-7.

4.2.4. BURDUNIUC, O., **BĂLAN, G.** et al. Antimicrobial activity of some copper (II) coordination compounds with N-(4-(2-((3-methyl-5-oxo-1-phenyl)-4,5-dihydro-1H-pyrazol)methylene) hidrazincarbotoamido)phenyl)acetamide. In: *International Scientific Conference on Microbial Biotechnology (4nd edition)*. Chișinău, 2018, p. 36. ISBN 978-9975-3178-8-7.

4.2.5. BURDUNIUC, O., **BĂLAN, G.** et al. Antifungal activity of some heterocyclic compounds. In: *International Scientific Conference on Microbial Biotechnology (4nd edition)*. Chișinău, 2018, p. 37. ISBN 978-9975-3178-8-7.

4.2.6. RUSNAC, R., BOTNARU, M., ȚAPCOV, V., BURDUNIUC, O., **BĂLAN, G.**, GULEA, A. Azachalcone derivatives and their antifungal activity. In: *International Scientific Conference on Microbial Biotechnology (4nd edition)*. Chișinău, 2018, p. 39. ISBN 978-9975-3178-8-7.

4.2.7. GRAUR, V., ȚAPCOV, V., MOLDOVAN, E., **BĂLAN, G.** et al. Antimicrobial and antifungal activities of iron (III), cobalt (III), nickel (II) and zinc (II) coordination compounds with 2,4-dihydroxyacetophenone 4-allylthiosemicarbazone. In: *International Scientific Conference on Microbial Biotechnology (4nd edition)*. Chișinău, 2018, pp. 51-52. ISBN 978-9975-3178-8-7.

4.2.8. ȚAPCOV, V., COTOVAIA, A., MILENTIEV, A., BURDUNIUC, O., **BĂLAN, G.**, et al. Antimicrobial and antifungal effect of some biometal coordination compounds with 2-[(3-methyl-5-oxo-1-phenyl-4,5-dihydro-1H-pyrazol-4-yl)-(phenyl)methylidene]hydrazin-ecarboximidamide. In: *International Scientific Conference on Microbial Biotechnology (4nd edition)*. Chișinău, 2018, pp. 55-56. ISBN 978-9975-3178-8-7.

4.2.9. USATAIA, I., GRAUR, V., ȚAPCOV, V., VASÎLCA, M., **BĂLAN, G.** et al. Antibacterial and antifungal activities of iron (III), cobalt (III), nickel (II) and copper (II) coordination compounds with 3,5-dibromosalicylaldehyde 4-allyl-S-methylisothiosemicarbazone. In: *International Scientific Conference on Microbial Biotechnology (4nd edition)*. Chișinău, 2018, p. 57-58. ISBN 978-9975-3178-8-7.

4.2.10. GRAUR, V., ȚAPCOV, V., DIURICI, E., **BĂLAN, G.** et al. Bacteriostatic and bactericide activities of some 3D metal complexes with 2-[2-(prop-2-en-1-ylcarbamothioyl)-hydrazinyldiene]propanoic acid. In: *International Scientific Conference*

on *Microbial Biotechnology* (4th edition). Chişinău, 2018, pp. 65-66. ISBN 978-9975-3178-8-7.

4.2.11. BIRCA, M., RUSNAC, R., BIRSANU, I., **BALAN, G.** et al. Synthesis, characterization, crystal structure and antimicrobial activity of copper(II) complexes. In: *International Conference Achievements and Perspectives of Modern Chemistry dedicated to the 60th anniversary from the foundation of the Institute of Chemistry*. Chişinău, 2019, p.78. ISBN 978-9975-62-428-2.

4.2.12. JOVMIR, T., POPA, T., **BALAN, G.** et al. Water-soluble dicopper complex having antimicrobial activity. In: *International Conference Achievements and Perspectives of Modern Chemistry dedicated to the 60th anniversary from the foundation of the Institute of Chemistry*. Chişinău, 2019, p. 117. ISBN 978-9975-62-428-2.

4.2.13. RUSNAC, A., **BALAN, G.** et al. Synthesis and antimicrobial properties of new copper(II) complexes with benzoate of ethyl 4-({2-[(pyridin-2yl)methylidene]hydrazinecarbothiolyl} amino). In: *International Conference Achievements and Perspectives of Modern Chemistry dedicated to the 60th anniversary from the foundation of the Institute of Chemistry*. Chişinău, 2019, p.140. ISBN 978-9975-62-428-2.

4.2.14. GULEA, A., ULCHINA, I., GRAUR, V., TSAPCOV, V., GHUMAKOV, YU., PETRENKO, P., **BALAN, G.**, BURDUNIUC, O. Synthesis, antimicrobial and antifungal properties of copper(II) coordination compounds with 2,4-dihydroxybenzaldehyde 4-allylthiosemicarbazone containing amines. In: *International Conference Achievements and Perspectives of Modern Chemistry dedicated to the 60th anniversary from the foundation of the Institute of Chemistry*. Chişinău, 2019, p. 149. ISBN 978-9975-62-428-2.

4.2.15. RUSNAC, A., **BALAN, G.** et al. Cercetarea relaţiei structură-activitate a compuşilor coordinativi ai Cu(II) cu benzoat de etil-4-tiosemicarbazone-2-formil(acetil şi benzoil)piridinei asupra microorganismelor *Acinetobacter baumannii* şi *Escherichia coli*. În: *Conferinţa ştiinţifică naţională cu participare internaţională „Integrare prin cercetare şi inovare”*. Chişinău, 2019, pp. 223-225. ISBN 978-9975-149-47-1.

4.2.16. IUNAC, D., **BALAN, G.** Rezistenţa la antibiotice şi factorii de persistenţă a tulpinilor de *Staphylococcus aureus* izolat din ulcere trofice. În: *Materialele Congresului consacrat aniversării a 75-a de la formarea USMF „Nicolae Testemiţanu”*. Chişinău, 2020, p. 174.

4.2.17. **BALAN, G.** Antimicrobial susceptibility and biofilm formation of *Klebsiella pneumoniae* strains. În: *Materialele Congresului consacrat aniversării a 75-a de la formarea USMF „Nicolae Testemiţanu”*. Chişinău, 2020, p. 165.

4.3. în lucrările conferinţelor ştiinţifice naţionale cu participare internaţională

4.3.1. **BALAN, G.** et al. Antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from patients. In: *Materials of the National Scientific Conference with international participation "One Health" approach in a changing world*. One Health&Risk Management, Supplement, 2021, vol. 2, nr. 4, p. 28.

4.3.2. **BALAN, G.** The influence of biological active compounds on markers of oxidative stress and antioxidant system. In: *Materials of the National Scientific Conference with international participation "One Health" approach in a changing world*. One Health&Risk Management, Supplement, 2021, vol. 2, nr. 4, p. 92.

4.3.3. BURDUNIUC, O., BIVOL, M., BRINZA, M., CRACIUN, O., **BALAN, G.** Emergence of carbapenem-resistant enterobacteriaceae: overview of a major public health challenge. In: *Materials of the National Scientific Conference with international participation "One Health" approach in a changing world*. One Health&Risk Management, Supplement, 2021, vol. 2, nr. 4, p. 29.

4.3.4. CRECIUN, L., **BĂLAN G.** Antibiotic resistance and biofilm formation of strains isolated from trophic ulcers. In: *Materials of the National Scientific Conference with international participation "One Health" approach in a changing world. One Health&Risk Management, Supplement, 2021, vol. 2, nr. 4, p. 17.*

6. Brevete de invenție și alte obiecte de proprietate intelectuală (OPI)

- Brevete de invenție

6.1. BURDUNIUC, O., **BĂLAN, G.** ș. a. *Compuși ai cuprului (II) cu 4-aliltiosemicarbazona 2-acetilpiridinei în calitate de inhibitori ai proliferării fungilor din specia Cryptococcus neoformans.* //Brevet de invenție MD 4621 C1 2019.09.30. BOPI nr. 2/2019 din 28.02.2019.

6.2. GULEA, A., BURDUNIUC, O., **BĂLAN, G.** ș. a. *Utilizare a N-ciclohexil-2-[1-(piridin-2-il)]-hidrazincarbonatamidei în calitate de inhibitor al proliferării microorganismelor gram-pozitive și fungilor Candida albicans.* // Brevet de invenție MD 4648 C1 2020.04.30. BOPI nr. 9/2019 din 30.09.2019.

6.3. **BĂLAN, G.** ș. a. *Complecșii sulfatului de cupru(II) cu 2-(2-hidroxibenziliden)-N-(metoxifenil)hidrazincarbonatamide, care manifestă activitate antimicrobiană față de microorganismele gram-pozitive.* // Brevet de invenție MD 4652. C1 2020.04.30. BOPI nr. 9/2019 din 30.09.2019.

4.4. GULEA, A., ȚAPCOV, V., **BĂLAN, G.** ș. a. *Tetrachis{[m3-2-(1-oxibutan-2-il)iminometil]-fenolato(2-)-O,N,O-Oalc}-tetracupru(II), care manifestă activitate antimicrobiană și antimicrobică.* // Brevet de invenție MD 4667 C1 2020.07.31. BOPI nr. 12/2019 din 31.12.2019.

4.5. GULEA, A., ȚAPCOV, V., CEBOTARI, D., **BĂLAN, G.** ș. a. *Inhibitor al proliferării fungilor din specia Cryptococcus neoformans în baza hidratului de cloro-{[4-(2,4-dimetilfenil)-2-(oxo-3-metoxibenziliden)hidrazincarbonatamido(1-)]-O,N,S}-{[4-(2,4-dimetilfenil)-5-(2-hidroxi-3-metoxifenil)-2,4-dihidro-3H-1,2,4-triazol-3-tion]-S}cupru.* // Brevet de invenție MD 4675 C1 2020.11.30. BOPI nr. 2/2020 din 29.02.2020.

4.6. GULEA, A., **BĂLAN, G.** ș. a. *[N'-(3,5-dibromo-2-oxidobenziliden)-N-prop-2-en-1-ilcarbamo-hidrazontioato] piridincupru, care manifestă activitate bacteriostatică față de bacteriile din speciile Bacillus cereus și Bacillus subtilis.* // Brevet de invenție MD 4707 B1 2020.08.31. BOPI nr. 8/2020 din 31.08.2020.

4.7. GORINCIOI, V., LOZAN, V., BURDUNIUC, O., **BĂLAN G.**, ș. a. *Utilizarea tetrasalicilatului de bariu-cupru în calitate de inhibitor al proliferării fungilor Cryptococcus neoformans.* // Brevet de invenție MD 4712 B1 2020.09.30. BOPI nr. 9/2020 din 30.09.2020.

4.8. JOVMIR, T., **BĂLAN, G.** ș. a. *Compus hidrosolubil 2,6-bis(S-metiloziosemicarbazidometiliden)-4-metilfenolato-tricloro-dicupru-hidrat pentru utilizare în calitate de remediu farmaceutic selectiv contra bacteriilor Gram-pozitive.* // Brevet de invenție MD 4687 C1 2021.01.31. BOPI nr. 4/2020 din 30.04.2020.

4.9. GORINCIOI, V., LOZAN, V., BURDUNIUC, O., **BĂLAN, G.** ș. a. *Utilizarea clusterului de oxohepta(salicilat)trifler(III)-polisolvat în calitate de inhibitor al proliferării fungilor din specia Cryptococcus neoformans.* // Brevet de invenție MD 4742 B1 2021.02.28. BOPI nr. 2/2021 din 28.02.2021.

Lucrări științifico-metodice și didactice

10. Indicații/îndrumări metodice

10.1. BURDUNIUC, O., COJOCARU, R., **BĂLAN, G.** ș. a. *Detectarea de laborator a producerii de betalactamaze la microorganismele familiei Enterobacteriaceae.* Chișinău: Tipografia „Print-Caro”. 2013, 49 p. ISBN 978-9975-113-84-7.

- 10.2. BURDUNIUC, O., BĂLAN, G. *Antimicrobial susceptibility testing*. Chișinău: Tipografia „Print-Caro”. 2014, 37 p. ISBN 978-9975-56-169-3.
- 10.3. BĂLAN, G. ș. a. *Factorii de patogenitate a microorganismelor – semnificația lor în patologia infecțioasă*. Indicație metodică. Chișinău: „Print-Caro”, 2018, 72 p. ISBN 978-9975-56-615-5.
- 10,3. BĂLAN, G., RUDIC, V. *Ghid privind managementul ulcerului trofic infectat*. Chișinău: „Print-Caro SRL”, 2021, 12 p. ISBN 978-9975-56-905-7.
- 10.4. BURDUNIUC, O., BALAN, G ș. a. *Ghid: Detectarea mecanismelor de rezistență la antimicrobiene, interpretarea și aplicarea clinică a rezultatelor*. Spre publicare.

ADNOTARE

BĂLAN Greta

COMPUȘI NOI CU ACȚIUNE ASUPRA MICROORGANISMELOR IZOLATE DIN ULCERE TROFICE

Teza de doctor habilitat în științe medicale, Chișinău, 2022

Structura: Introducere, reviu literaturii, materiale și metode de cercetare, patru capitole explorative, concluzii generale și recomandări, bibliografia din 350 de titluri, 15 anexe, 191 pagini de text de bază, 47 de figuri și 40 de tabele. Rezultatele obținute sunt publicate în 77 de lucrări științifice.

Cuvinte cheie: ulcer trofic, factori de patogenitate, compuși noi, activitate antimicrobiană.

Domeniul de studiu: Microbiologie, Virusologie medicală

Scopul: Evaluarea activității antimicrobiene a unor compuși noi în vederea formulării principiilor de elaborare a preparatelor policomponente eficiente în tratamentul ulcerului trofic infectat.

Obiectivele lucrării: Determinarea spectrului etiologic al microorganismelor izolate din ulcere trofice infectate; elucidarea fenotipurilor de rezistență la antimicrobiene și a factorilor de patogenitate ai tulpinilor de microorganisme izolate din ulcere trofice; studiul calitativ și cantitativ al activității antimicrobiene a unor entități chimice și biologice noi față de tulpinile microbiene de referință și clinice; studierea acțiunii sinergice a compușilor monocomponenti și a posibilităților de obținere a compușilor policomponenti cu acțiune antimicrobiană; determinarea influenței compușilor noi monocomponenti și în combinație asupra expresiei unor factori de patogenitate a microorganismelor; evaluarea modificărilor unor parametri biochimici ai culturilor bacteriene sub influența substanțelor monocomponente și în combinație; influența compușilor biologic activi asupra markerilor stresului oxidativ, sistemului antioxidant și pattern-ului inflamator pentru obținerea potențialelor preparate medicamentoase, eficiente în tratamentul ulcerului trofic infectat.

Noutatea și originalitatea științifică: În premieră, pe baza unui studiu complex, a fost evaluată acțiunea antimicrobiană, antioxidantă și imunomodulatoare a unor compuși noi, determinat spectrul microorganismelor implicate în ulcere trofice infectate și stabilită acțiunea compușilor noi asupra factorilor de patogenitate ai agenților microbieni.

Problema științifică soluționată: fundamentarea științifică a acțiunii unor compuși chimici și biologici noi asupra microorganismelor izolate din ulcere trofice infectate. Aceasta contribuie la formularea principiilor de dezvoltare a preparatelor policomponente eficiente în tratamentul ulcerului trofic infectat și la elaborarea unor strategii antiinfecțioase alternative, în scopul evitării eșecurilor terapeutice și dezvoltării rezistenței la antimicrobiene.

Semnificația teoretică și valoarea aplicativă a studiului: Rezultatele prezentei cercetări completează studiile anterioare despre efectul compușilor chimici și biologici asupra tulpinilor de referință și a tulpinilor clinice, izolate din ulcerele trofice, despre acțiunea sinergică a acestor compuși și despre combinațiile de compuși care potențiază efectul antimicrobian. Totodată au fost acumulate date despre influența compușilor noi asupra expresiei factorilor enzimatici de patogenitate și a factorilor de persistență ai microorganismelor. Datele obținute pot fi utilizate ca dovezi la elaborarea unor strategii antiinfecțioase alternative și la obținerea altor compuși policomponenti, generând astfel nu

doar o utilizare empirică ci și una bazată pe dovezi științifice privind proprietățile lor terapeutice. Rezultatele obținute au permis evidențierea efectului imunomodulator al compușilor chimici și biologici noi aparte și în combinație, prin determinarea acțiunii lor asupra producerii spontane a indicilor biochimici și imunochimici. Rezultatele privind patternurile de rezistență la antibiotice vor servi drept argument pentru reactualizarea listei de antimicrobiene și procurarea argumentată a acestora, pentru elaborarea măsurilor coerente de control.

Implementarea rezultatelor științifice: Rezultatele studiului au fost implementate în activitatea laboratoarelor microbiologice, a medicilor din cadrul Centrelor de Sănătate, a secțiilor de chirurgie, în procesul didactic la Disciplina de microbiologie și imunologie, Departamentul Medicină Preventivă, USMF „Nicolae Testemițanu”.

SUMMARY

BALAN Greta

THE NEW COMPOUNDS ACTING ON MICROORGANISMS ISOLATED FROM TROPHIC ULCERS

The Habilitation Thesis in Medical Sciences, Chisinau, 2022

Structure: This research paper includes introduction, literature review, research materials and methods, 4 investigative chapters, general conclusions and recommendations, a bibliography list of 350 references, 15 annexes, 191 pages of basic text, 47 figures, and 40 tables. The obtained results have been published in 77 scientific papers.

Keywords: trophic ulcer, pathogenic factors, new compounds, antimicrobial activity.

Field of study: Microbiology and Medical Virology.

The purpose of the research: To assess the antimicrobial activity of new compounds in order to develop the principles for obtaining multicomponent drug products effective in the treatment of infected trophic ulcers.

The research objectives: To determine the etiological spectrum of microorganisms isolated from infected trophic ulcers; to highlight the antimicrobial resistance phenotypes and the pathogenicity factors of microbial strains isolated from trophic ulcers; to perform a qualitative and quantitative study of the new chemical and biological antimicrobial entities compared to the reference and clinical microbial strains; to study the synergistic action of single-component substances and the possibility to obtain multicomponent antimicrobial compounds; to determine the effects of new single-component compounds and their combination on the manifestations of microbial pathogenicity factors; to assess the biochemical changes of bacterial cultures under the action of single-component and combined substances; to study the impact of biologically active compounds on oxidative stress markers, antioxidant system and inflammatory patterns for the development of potential drugs.

Scientific novelty and originality of the research: We report for the first time a comprehensive study assessing the antimicrobial, antioxidant and immunomodulatory activity of new compounds, as well as determining the microbial spectrum associated with the infected trophic ulcers and activity of new compounds on microbial pathogenicity factors.

The scientific problem solved: The present research scientifically validated the activity of new chemical and biological compounds on microorganisms isolated from infected trophic ulcers. It contributes to developing the principles for the improvement of effective multicomponent drug products in the treatment of infected trophic ulcers and for development of alternative anti-infective strategies to prevent therapeutic failures and the emergence of antimicrobial resistance.

Theoretical significance and applicative value of the study: The research findings complement the previous studies on the effect of chemical and biological compounds on the reference and clinical strains isolated from trophic ulcers, as well as on the synergistic action of these compounds by identifying combinations of compounds that might enhance the antimicrobial effect. At the same time, new data were collected regarding the influence of new compounds on the manifestations of enzymatic pathogenicity and microbial persistence factors. The obtained evidence-based data can be used to develop alternative, anti-infective strategies and other multicomponent drug compounds, thus providing both an empirical approach and scientific evidence of their therapeutic properties. The obtained results allowed

highlighting the immunomodulatory effects of single and combined chemical and biological compounds by determining their action on the spontaneous production of biochemical and immunochemical indices. The study results regarding the antibiotic resistance patterns will enable updating of the list of antimicrobials and organizing their justified procurement, as well as developing rational control measures.

Implementation of scientific results. The results of the study were introduced within the microbiological laboratories, the medical practice of the Health Centers, at surgery departments, in teaching the Discipline of Microbiology and Immunology at the Department of Preventive Medicine of "Nicolae Testemitanu" SUMPh.

АННОТАЦИЯ

БЭЛАН Грета

НОВЫЕ СОЕДИНЕНИЯ С ВОЗДЕЙСТВИЕМ НА МИКРООРГАНИЗМЫ ИЗОЛИРОВАННЫЕ ИЗ ТРОФИЧЕСКИХ ЯЗВ

Диссертация доктора хабилитат медицинских наук, Кишинев, 2022 г.

Структура: Введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, 4 ознакомительных глав, общие выводы и рекомендации, библиография из 350 наименований, 15 приложений, 191 страниц основного текста, 47 рисунков, 40 таблиц. Полученные результаты опубликованы в 77 научных статьях.

Ключевые слова: трофическая язва, патогенные факторы, новые соединения, антимикробное действие.

Специализация: Микробиология, медицинская вирусология.

Цель: оценка антимикробной активности новых соединений с целью формулировки принципов разработки поликомпонентных препаратов, эффективных при лечении инфицированных трофических язв.

Задачи работы: Определение этиологического спектра микроорганизмов, выделенных из инфицированных трофических язв; выявление фенотипов устойчивости к противомикробным препаратам и факторов патогенности штаммов микроорганизмов, выделенных из трофических язв; качественное и количественное изучение антимикробной активности новых химических и биологических соединений по отношению к эталонным и клиническим штаммам микробов; изучение синергетического действия однокомпонентных веществ и возможности получения поликомпонентных соединений с антимикробным действием; определение влияния новых однокомпонентных соединений и их комбинации на проявление факторов патогенности микроорганизмов; оценка изменения биохимических показателей бактериальных культур под влиянием однокомпонентных веществ и их комбинаций; изучение влияния биологически активных соединений на маркеры окислительного стресса, антиоксидантную систему.

Научная новизна и оригинальность: Впервые, на основе комплексного исследования, было оценено антимикробное, антиоксидантное и иммуномодулирующее действие новых соединений, определен спектр микроорганизмов, вовлеченных в этиопатогенез инфицированных трофических язв, и действие новых соединений на факторы микробной патогенности.

Решенная научная задача: Научное обоснование действия новых химических и биологических соединений на микроорганизмы, выделенных из инфицированных трофических язв. Это способствует формулированию принципов разработки эффективных поликомпонентных препаратов для лечения инфицированных трофических язв и выработке альтернативных противoinфекционных стратегий, позволяющих избежать терапевтических неудач и развития устойчивости к противомикробным препаратам.

Теоретическая значимость и прикладная ценность исследования: результаты исследования дополняют предыдущие исследования влияния химических и биологических соединений на эталонные штаммы, клинические штаммы, выделенные из трофических язв, и синергетическое действие этих соединений путем выявления комбинаций соединений, которые усиливали противомикробный эффект.

Одновременно накапливались новые данные о влиянии новых соединений на экспрессию ферментативных факторов патогенности и факторов персистенции микроорганизмов. Полученные данные могут быть использованы в качестве доказательства для получения альтернативных противоифекционных стратегий и других поликомпонентных соединений, таким образом обеспечивая их не только эмпирическое использование, но и основанное на научных данных об их терапевтических свойствах. Полученные результаты позволили выделить иммуномодулирующее действие химических и биологических соединений по отдельности и в комбинации, определив действие этих соединений на спонтанную выработку биохимических и иммунохимических показателей. Результаты, касающиеся паттернов устойчивости к антибиотикам, послужат доказательством для обновления списка противомикробных препаратов и организации их обоснованной закупки, разработки последовательных мер контроля.

Внедрение научных результатов. Результаты исследования были внедрены в деятельность микробиологических лабораторий, врачей медицинских центров, хирургических отделений, в учебный процесс по Дисциплине микробиология и иммунология Департамента профилактической медицины, КГУМиФ «Николае Тестемицану».

BĂLAN GRETA

**COMPUȚI NOI CU ACȚIUNE ASUPRA MICROORGANISMELOR
IZOLATE DIN ULCERE**

313.02 – Microbiologie, virusologie medicală

Rezumatul tezei de doctor habilitat în științe medicale

Aprobat spre tipar:2022
1/16

Formatul hârtiei 60x84

Hârtie ofset. Tipar digital

Tiraj 100 ex.

Coli de tipar: 4,0

Comanda nr.

Tipografia PRINT-CARO,
mun. Chișinău, str. Columna 170
tel.: 022-85-33-86