

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

Teza 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., Om Emerit, academician

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

Susținerea va avea loc la data de 05. 07. 2022, ora 14.30 în incinta USMF "Nicolae Testemițanu", bd. Ștefan cel Mare și Sfânt, 165, biroul 205 în ședința Comisiei de susținere publică a tezei, aprobată prin decizia Senatului nr. 5/7 din 24. 05. 2022 al IP Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu” din Republica Moldova.

Componența Comisiei de susținere publică a tezei de doctor habilitat:

Președinte:

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

Membri:

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

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

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

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

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

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

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

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

Referenți:

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.

Autor

Bălan Greta

CUPRINS

ADNOTARE	6
SUMMARY	7
АННОТАЦИЯ.....	8
LISTA TABELELOR.....	9
LISTA FIGURILOR.....	11
LISTA ABREVIERILOR.....	13
INTRODUCERE.....	17
1. STADIUL ACTUAL AL CERCETĂRII ÎN DEZVOLTAREA ANTIMICROBIENELOR ȘI STRATEGII NOI ÎN TERAPIA ULCERULUI TROFIC.....	32
1.1. Antibioticele și antibioterapia – istoric, caracteristici și constrângeri	32
1.2. Rezistența antimicrobiană – definiție, cauze, mecanisme de formare, metode de detectare	36
1.3. Rezistența la antimicrobiene la nivel național	45
1.4. Perspective și noi alternative terapeutice în tratamentul infecțiilor cauzate de microorganisme multirezistente	47
1.5. Ulcerul trofic: clasificare și considerații etiopatogenetice.....	57
1.6. Particularitățile ulcerului trofic infectat.....	60
1.7. Concluzii la capitolul 1	64
2. MATERIALE ȘI METODE	66
2.1. Caracteristica generală și etapele cercetării	66
2.2. Metode de cercetare	72
2.3. Prelucrarea matematico-statistică a rezultatelor obținute	96
2.4. Concluzii la capitolul 2	96
3. DIVERSITATEA SPECILOR, REZISTENȚA LA ANTIMICROBIENE ȘI FACTORII DE PATOGENITATE A TULPINILOR IZOLATE DIN ULCERE TROFICE.....	97
3.1. Evaluarea spectrului și ponderii microorganismelor asociate ulcerului trofic.....	97
3.2. Rezistența la antimicrobiene a tulpinilor izolate din ulcere trofice	98

3.3.	Evaluarea factorilor de patogenitate a tulpinilor microbiene izolate din ulcere trofice	106
3.4.	Concluzii la capitolul 3	117
4.	ACTIVITATEA ANTIMICROBIANĂ A COMPUȘILOR NOI DE ORIGINE CHIMICĂ ȘI BIOLOGICĂ	119
4.1.	Rezultatele evaluării activității antimicrobiene a substanțelor chimice și biologice noi	119
4.2.	Activitatea antimicrobiană a compușilor chimici și biologici noi asupra tulpinilor izolate din ulcere trofice	125
4.3.	Acțiunea sinergică a compușilor chimici și biologici noi	129
4.4.	Influența compușilor noi asupra factorilor de patogenitate a microorganismelor	138
4.5.	Concluzii la capitolul 4	148
5.	MODIFICĂRI ALE UNOR PARAMETRI BIOCHIMICI AI MICROORGANISMELOR INDUSE DE COMPUȘII CHIMICI ȘI BIOLOGICI NOI	151
5.1.	Modificarea indicatorilor stresului oxidativ în culturile de microorganisme sub influența compușilor chimici și biologici noi	151
5.2.	Modificarea capacității antioxidante a culturilor de microorganisme sub influența compușilor chimici și biologici noi	157
5.3.	Concluzii la capitolul 5	165
6.	INFLUENȚA COMPUȘILOR BIOLOGIC ACTIVI ASUPRA MARKERILOR STRESULUI OXIDATIV, SISTEMULUI ANTIOXIDANT ȘI PATTERN-ULUI INFLAMATOR	167
6.1.	Evaluarea activității compușilor biologic activi asupra markerilor stresului oxidativ și ai sistemului antioxidant	167
6.2.	Estimarea profilului citokinic. Determinarea unor citokine proinflamatoare și antiinflamatoare	174
6.3.	Evaluarea comparativă a parametrilor din loturile studiate	177
6.4.	Concluzii la capitolul 6	186
	CONCLUZII GENERALE.....	188

RECOMANDĂRI PRACTICE	191
BIBLIOGRAFIA	192
ANEXE	214
Anexa 1. Profilurile de sensibilitate/rezistență la antimicrobiene a tulpinilor de Enterobacteriaceae izolate din ulcere trofice.....	215
Anexa 2. Patternurile multidrog-rezistente de bacili gram-negativi izolate din ulcere trofice.....	216
Anexa 3. Exprimarea factorilor enzimatici de patogenitate a tulpinilor izolate din ulcere trofice	217
<u>Anexa 4.</u> Activitatea antimicrobiană a compușilor coordinativi asupra microorganismelor gram-pozitive ($\mu\text{g/ml}$)	218
Anexa 5. Activitatea antimicrobiană a compușilor coordinativi asupra microorganismelor gram-negative ($\mu\text{g/ml}$)	219
Anexa 6. Tabelul A6.1. Activitatea antimicrobiană a compușilor biologici asupra microorganismelor gram-pozitive (mg/ml)	220
Anexa 6. Tabelul A6.2. Activitatea antimicrobiană a compușilor biologici asupra microorganismelor gram-negative (mg/ml)	220
<u>Anexa 7.</u> Efectul antimicrobian sinergic dintre compușii chimici și biologici pe tulpini de referință.....	221
Anexa 8. Statistica descriptivă a markerilor stresului oxidativ, sistemului antioxidant și patternului inflamator din loturile formate (Rstudio output).....	222
Anexa 9. Brevete de invenție.....	224
Anexa 10. Certificate de inovator	233
Anexa 11. Diplome de excelență la expoziții	236
Anexa 12. Medalii de aur.....	240
Anexa 13. Medalii de argint	255
Anexa 14. Medalii de bronz.....	261
Anexa 15. Acte de implementare.....	262
CURRICULUM VITAE	277

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 infectat, 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 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 monocompenți și a posibilităților de obținere a compușilor policompenți cu acțiune antimicrobiană; determinarea influenței compușilor noi monocompenți 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 policompenți, 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 pattern-urile 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 медицинских наук. Кишинев, 2022.

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 противоинфекционных 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 противоинфекционных стратегий и других поликомпонентных соединений, таким образом обеспечивая их не только эмпирическое использование, но и основанное на научных данных их терапевтические свойства. 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».

LISTA TABELELOR

Tabelul	Denumirea	Pagina
Tabelul 1	Tipuri de rezistență intrinsecă la antimicrobiene și mecanisme de dezvoltare	39
Tabelul 2	Exemple de rezistență la antimicrobiene dobândită prin mutații și transfer orizontal de gene	40
Tabelul 3	Clasificarea ulcerelor trofice	58
Tabelul 4	Compușii chimici luați în studiu	68
Tabelul 5	Clasificarea abilității de formare a biofilmului prin metoda microtitrării	83
Tabelul 6	Tehnica de preparare a diluțiilor serului hemolitic	86
Tabelul 7	Pregătirea diluțiilor complementului	88
Tabelul 8	Concentrațiile compușilor luați în studiu	91
Tabelul 9	Sensibilitatea/rezistența la antimicrobiene a tulpinilor de <i>Staphylococcus</i> spp. izolate din ulcere trofice	99
Tabelul 10	Fenotipurile de rezistență a tulpinilor de <i>Staphylococcus</i> spp. izolate din ulcere trofice	99
Tabelul 11	Sensibilitatea/rezistența la antimicrobiene a tulpinilor de <i>Enterococcus</i> spp. izolate din ulcere trofice	100
Tabelul 12	Sensibilitatea/rezistența la antimicrobiene a tulpinilor de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> izolate din ulcere trofice	102
Tabelul 13	Sensibilitatea/rezistența la antimicrobiene a tulpinilor de <i>Acinetobacter baumannii</i> izolate din ulcere trofice	103
Tabelul 14	Tulpinile de bacili gram-negativi producătoare de BLSE și de β -lactamaze AmpC	104
Tabelul 15	Pattern-urile de rezistență a tulpinilor de <i>Enterobacteriaceae</i> și <i>P. aeruginosa</i> izolate din ulcere trofice	105
Tabelul 16	Pattern-urile de rezistență a tulpinilor de <i>A. baumannii</i> izolate din ulcere trofice	105
Tabelul 17	Capacitatea de inactivare a lizozimului a tulpinilor izolate din ulcere trofice	110
Tabelul 18	Capacitatea de a inactiva complementul a tulpinilor izolate din ulcere trofice	111
Tabelul 19	Capacitatea de formare a biofilmelor a tulpinilor de bacili gram-negativi izolate din ulcere trofice	114
Tabelul 20	Relația dintre capacitatea de formare a biofilmelor și rezistența la antimicrobiene a tulpinilor de bacili gram-negativi izolate din ulcere trofice	114
Tabelul 21	Capacitatea de formare a biofilmelor a tulpinilor de coci gram-pozitivi izolate din ulcere trofice	115
Tabelul 22	Relația dintre capacitatea de formare a biofilmelor și rezistența la meticilină a tulpinilor de stafilococi izolate din ulcere trofice	116
Tabelul 23	Activitatea antimicrobică a compușilor chimici ($\mu\text{g/ml}$)	123
Tabelul 24	Activitatea antimicrobică a compușilor biologici (mg/ml)	124
Tabelul 25	Activitatea antimicrobiană a compușilor chimici asupra tulpinilor izolate din ulcere trofice ($\mu\text{g/ml}$)	125
Tabelul 26	Activitatea antimicrobiană a compușilor biologici asupra tulpinilor izolate din ulcere trofice ($\mu\text{g/ml}$)	126
Tabelul 27	Evaluarea interacțiunii dintre compușii chimici și biologici pe baza indicelui FIC	130
Tabelul 28	Analiza post hoc. Valorile p ajustate prin metoda Benjamini Hochberg	178

	pentru evaluarea comparativă a valorilor DAM, $\mu\text{M/L}$ între loturile de cercetare	
Tabelul 29	Analiza post hoc. Valorile p ajustate prin metoda Benjamini Hochberg pentru evaluarea comparativă a valorilor PPOA, $\mu\text{M/L}$ între loturile de cercetare	178
Tabelul 30	Analiza post-hoc. Valorile p ajustate prin metoda Benjamini Hochberg pentru evaluarea comparativă a valorilor SOD, u/c între loturile de cercetare	179
Tabelul 31	Analiza post hoc. Valorile p ajustate prin metoda Benjamini Hochberg pentru evaluarea comparativă a valorilor Catalaza, $\mu\text{M/L}$ între loturile de cercetare	179
Tabelul 32	Analiza post hoc. Valorile p ajustate prin metoda Benjamini Hochberg pentru evaluarea comparativă a valorilor AAT cu ABTS, $\mu\text{M/L}$ între loturile de cercetare	180
Tabelul 33	Analiza post hoc. Valorile p ajustate prin metoda Benjamini Hochberg pentru evaluarea comparativă a valorilor GST, nM/s.L între loturile de cercetare	181
Tabelul 34	Analiza post hoc. Valorile p ajustate prin metoda Benjamini Hochberg pentru evaluarea comparativă a valorilor GPO, nM/s.L între loturile de cercetare	181
Tabelul 35	Analiza post-hoc. Valorile p ajustate prin metoda Benjamini Hochberg pentru evaluarea comparativă a valorilor GR, nM/s.L între loturile de cercetare	182
Tabelul 36	Analiza post-hoc. Valorile p ajustate prin metoda Benjamini Hochberg pentru evaluarea comparativă a valorilor IL-1 β , pg/ml între loturile de cercetare	182
Tabelul 37	Analiza post-hoc. Valorile p ajustate prin metoda Benjamini Hochberg pentru evaluarea comparativă a valorilor TNF- α , pg/ml între loturile de cercetare	183
Tabelul 38	Analiza post hoc. Valorile p ajustate prin metoda Benjamini Hochberg pentru evaluarea comparativă a valorilor IL-6, pg/ml între loturile de cercetare	184
Tabelul 39	Analiza post-hoc. Valorile p ajustate prin metoda Benjamini Hochberg pentru evaluarea comparativă a valorilor IL-10, pg/ml între loturile de cercetare	184
Tabelul 40	Heatmap pentru sinteza evaluării comparative a parametrilor cercetați cu lotul-martor pentru compuși aparte și în combinație	185

LISTA FIGURILOR

Figura	Denumirea	Pagina
Figura 1	Mecanisme de acțiune a antibioticelor și de rezistență la antibiotice	41
Figura 2	Lista de „prioritate a agenților patogeni” rezistenți la antimicrobiene	48
Figura 3	Numărul claselor de antimicrobiene descoperite sau brevetate	49
Figura 4	Designul studiului	71
Figura 5	Spectrul și ponderea microorganismelor izolate din ulcere trofice	97
Figura 6	Exprimarea factorilor enzimatici de patogenitate la tulpinile izolate în monoculturi și în asociații (%)	108
Figura 7	Exprimarea factorilor enzimatici de patogenitate la tulpinile de BGN multirezistente și sensibile la antimicrobiene (%)	108
Figura 8	Exprimarea factorilor enzimatici de patogenitate la tulpinile de coci gram-pozitive multirezistente și sensibile la antimicrobiene (%)	109
Figura 9	Capacitatea de inactivare a lizozimului a tulpinilor multirezistente și sensibile la antimicrobiene (%)	110
Figura 10	Capacitatea de inactivare a complementului a tulpinilor multirezistente și sensibile la antimicrobiene (%)	112
Figura 11	Capacitatea de formare a biofilmelor a tulpinilor de <i>Enterococcus</i> spp. izolate din ulcere trofice	116
Figura 12	Toxicitatea compușilor chimici	124
Figura 13	Acțiunea compușilor chimici asupra tulpinilor de referință și a tulpinilor izolate din ulcere trofice	128
Figura 14	Acțiunea compușilor biologici asupra tulpinilor de referință și a tulpinilor izolate din ulcere trofice	129
Figura 15	Cinetica activității antimicrobiene a compusului chimic $C_{14}H_{19}CuN_7O_4S$ și a compușilor biologici (<i>ES</i> , <i>ESI</i> , <i>MX</i>) asupra tulpinilor de referință	133
Figura 16	Cinetica activității antimicrobiene a compusului chimic $C_{13}H_{16}Br_2CuN_4S$ și a compușilor biologici (<i>ES</i> , <i>ESI</i> , <i>MX</i>) asupra tulpinilor de referință	134
Figura 17	Cinetica activității antimicrobiene a compusului chimic $C_{10}H_{14}CuN_4O_5S_2$ și a compușilor biologici (<i>ES</i> , <i>ESI</i> , <i>MX</i>) asupra tulpinilor de referință	136
Figura 18	Cinetica activității antimicrobiene a compusului chimic $C_{13}H_{17}ClCuN_4S$ și a compușilor biologici (<i>ES</i> , <i>ESI</i> , <i>MX</i>) asupra tulpinilor de referință	137
Figura 19	Activitatea anticomplementară a microorganismelor sub acțiunea compușilor chimici și biologici	139
Figura 20	Activitatea anticomplementară a microorganismelor sub acțiunea compușilor chimici și biologici în combinație	140
Figura 21	Activitatea antilizozim a microorganismelor sub acțiunea compușilor chimici și biologici	141
Figura 22	Activitatea antilizozim a microorganismelor sub acțiunea compușilor chimici și biologici în combinație	142
Figura 23	Gradul de formare a biofilmelor microbiene la acțiunea compușilor chimici și biologici	143
Figura 24	Gradul de formare a biofilmelor microbiene la acțiunea compușilor chimici și biologici în combinație	144
Figura 25	Gradul de exprimare a lecitinazei microbiene la acțiunea compușilor chimici și biologici	145

Figura 26	Gradul de exprimare a lecitinazei microbiene la acțiunea compușilor chimici și biologici în combinație	146
Figura 27	Gradul de exprimare a hemolizinei microbiene la acțiunea compușilor chimici și biologici	147
Figura 28	Gradul de exprimare a hemolizinei microbiene la acțiunea compușilor chimici și biologici în combinație	148
Figura 29	Influența compușilor testați asupra cantității de dialdehidă malonică în masa celulară de (A) <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853, (B) de <i>E. coli</i> ATCC 25922 și (C) de <i>S. aureus</i> ATCC 25923	153
Figura 30	Influența compușilor testați asupra activității lactatdehidrogenazei eliberate de (A) <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853, (B) de <i>E. coli</i> ATCC 25922 și (C) de <i>S. aureus</i> ATCC 25923	155
Figura 31	Influența compușilor testați asupra activității superoxid-dismutazei în (A) biomasa și (B) în lichidul cultural la bacteriile <i>P. aeruginosa</i>	158
Figura 32	Influența compușilor testați asupra activității superoxid-dismutazei în (A) biomasa și în (B) lichidul cultural la <i>E. coli</i>	159
Figura 33	Influența compușilor testați asupra activității superoxid-dismutazei în (A) biomasa și (B) în lichidul cultural la bacteriile <i>S. aureus</i>	160
Figura 34	Influența compușilor testați asupra activității catalazei la (A) <i>P. aeruginosa</i> , (B) la <i>E. coli</i> și (C) la <i>S. aureus</i>	162
Figura 35	Influența compușilor testați asupra activității glutat-ion peroxidazei la (A) <i>P. aeruginosa</i> , (B) la <i>E. coli</i> și (C) la <i>S. aureus</i>	164
Figura 36	Distribuția valorilor DAM, nM/s.L după loturile de cercetare	167
Figura 37	Distribuția valorilor PPOA, μM/L după loturile de cercetare	168
Figura 38	Distribuția valorilor SOD, u/c după loturile de cercetare	169
Figura 39	Distribuția valorilor catalazei, μM/s.L după loturile de cercetare	170
Figura 40	Distribuția valorilor AAT cu ABTS, μM/L după loturile de cercetare	171
Figura 41	Distribuția valorilor GST, nM/s.L după loturile de cercetare	172
Figura 42	Distribuția valorilor GPO, nM/s.L după loturile de cercetare	173
Figura 43	Distribuția valorilor GR, nM/s.L după loturile de cercetare	174
Figura 44	Distribuția valorilor IL-1β, pg/ml după loturile de cercetare	175
Figura 45	Distribuția valorilor TNF-α, pg/ml după loturile de cercetare	176
Figura 46	Distribuția valorilor IL-6, pg/ml după loturile de cercetare	176
Figura 47	Distribuția valorilor IL-10, pg/ml după loturile de cercetare	177

LISTA ABREVIERILOR

AAL	Activitate antilizozim
AAT	Activitatea antioxidantă totală
AB	Antibiotic
ABTS	2,2-azinobis-3-etilbenzotiazolin-6-acid sulfonic
ADN	Acidul dezoxiribonucleic
AM	Ampicilina
AN	Amicacina
ANSP	Agenția Națională pentru Sănătate Publică
ARN	Acidul ribonucleic
ATCC	eng. <i>American Type Culture Collection</i> /Colecția americană de culturi-tip
ATM	Aztreonam
AUG	Amoxicilină-acid clavulanic
BGN	Bacili gramnegativi
BLSE	Beta lactamaze cu spectrul extins
CAESAR	eng. <i>Central Asian and European Surveillance of Antimicrobial Resistance</i> / Rețeaua de Supraveghere a rezistenței la antimicrobiene din Asia Centrală și Europa de Est
CAZ	Ceftazidim
CAZ/CA	Ceftazidim/Acid Clavulanic
CDC	Centru pentru Controlul și Prevenirea Bolilor
CECT	eng. <i>Spanish Type Culture Collection</i> / Colecția spaniolă de culturi-tip
CIP	Ciprofloxacina
CL	Cloxacilina
CLSI	eng. <i>Clinical&Laboratory Standards Institute</i> /Institutul pentru Standarde Clinice și de Laborator
CM	Clindamicina
CMB	Concentrația minimă bactericidă
CMI	Concentrația minimă inhibitoare
CMF	Concentrația minimă fungicidă
CPE	Carbapenemaze
CTX	Cefotaxim
CTX/CA	Cefotaxim/Clavulanat
CRO	Ceftriaxon

CS	Colistin
CT	Catalaza
CZ	Cefazolin
CV	Curriculum vitae
DAM	Dialdehida malonică
DL	Doza letală
DO	Densitate optică
DMSO	Sulfoxid de dimetil
E	Eritromicină
ECDC	Centrul European pentru Prevenirea și Controlul Bolilor
ELISA	eng. <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> /analiza imunoenzimatică
ETP	Ertapenem
EUCAST	eng. <i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i> / Comitetul European pentru Testarea Sensibilitatii la Antimicrobiene
FA	Acid fusidic
FEP	Cefepim
FEP/CA	Cefepim /Clavulanat
FIC	eng. <i>Fractional Inhibitory Concentration</i> /Concentrația inhibitorie a fracțiunilor
FOS	Fosfomicină
FOX	Cefoxitin
FT	Nitrofurantoin
IAE	Indicele de activitate enzimatică
IL	Interleukina
IMSP	Instituția Medico-Sanitară Publică
IPM	Imipenem
INT	Clorura de 2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-feniltetrazolium
GLASS	eng. <i>Global Antimicrobial Resistance Surveillance System</i> /Sistemul global de supraveghere a rezistenței la antimicrobiene
GM	Gentamicin
GPO	Glutation peroxidaza
GR	Glutation reductaza
GST	Glutation S transferaza
LDH	Lactat dehidrogenaza
LEV	Lefloxacin

LNZ	Linezolid
MBL	Metalo- β -lactamaze
MDR	Tulpini multirezistente
MEM	Meropenem
MS_B	Macrolide-streptogramine B
MLS_B	Macrolide-lincozamide-streptogramine B
MNO	Monociclină
MRAB	<i>A. baumannii</i> multirezistent
MRS	<i>Staphylococcus</i> spp. meticilin-rezistent
MSB	Macrolide-streptogramine B
MSMPS	Ministerul Sănătății, Muncii și Protecției Sociale
MSS	<i>Staphylococcus</i> spp. sensibil la meticilină
MXF	Moxifloxacină
NAD	Nicotinamid adenin dinucleotid
NADP	Nicotinamid dinucleotid fosfat
NADPH	Nicotinamid dinucleotid fosfat redus
NAG	Acidul N-acetilglucozamină
NAM	Acidul N-acetilmuramic
NP	Nortmann-Poirel
OMS	Organizația Mondială a Sănătății
OXA	Oxacilină
P	Penicilină
PCR	eng. <i>Polymerase chain reaction</i> /Reacția de polimerizare în lanț
PDR	Tulpini pan-rezistente
PEF	Pefloxacină
PIP	Piperacilină
PLP	Proteine care leagă penicilina
PPOA	Produse proteice de oxidare avansată
RA	Rifampicină
RAM	Rezistența la antimicrobiene
SAM	Ampicilină/Sulbactam
SCN	Stafilococi coagulazo-negativi
SOD	Superoxid dismutaza
SXT	Trimetoprim/Sulfametoxazol

TCC	Ticarcilină-Acid clavulanic
TE	Tetracilină
TEC	Teicoplanină
TGC	Tigecilină
TIC	Ticarcilină
THM	Testul Hodje modificat
TM	Tobramicină
TNF	Factorul de necroză tumorală
TZP	Piperacilină-Tazobactam
UFC	Unități Formatoare de Colonii
UH	Unitate hemolitică
UHM	Unitate hemolitică minimă
USMF	Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie
VA	Vancomicină
VRE	<i>Enterococcus</i> vancomicin rezistent
XDR	Tulpini cu rezistență extinsă
XOD	Xantinoxidaza

INTRODUCERE

Actualitatea 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 [233, 247].

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 [24].

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 antimicrobielenor 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 [49, 101, 204, 316, 326].

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 [325].

Studiile sinergiei compușilor combinați denotă oportunități în lupta cu agenții patogeni rezistenți la antimicrobiene. În ultimii ani, cercetătorii experimentează combinarea antimicrobielenor sintetice cu compuși 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 [16, 341].

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 [232].

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 [12]. 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% [120, 275].

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 [242, 274]. 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 [6]. 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 [116]. 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. [90, 92].

În literatura de specialitate, prevalența ulcerului trofic în comunitate variază de la 1,9% până la 13,1% [164]. Sasanka S. Chatterjee indică drept cauze ale creșterii incidenței ulcerelor îmbătrânirea populației și multitudinea factorilor de risc precum fumatul, obezitatea, diabetul zaharat etc. [270]. 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 [283]. 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 [185].

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* [107]. 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 [339].

Ulcerule trofice cronice sunt predispușe la infecții bacteriene, în special cele venoase, ca urmare a hipoxiei tisulare, influențând astfel acțiunea leucocitelor asupra bacteriilor prin reducerea „stresului oxidativ” [122, 283]. 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 [288].

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 studierea 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 [142, 258, 265, 267, 276].

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 [221, 248, 284].

Realizarea unui studiu original și complex privind efectul antimicrobial 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 policompenți cu acțiune antimicrobiană.
5. Determinarea influenței compușilor noi monocompenți și în combinație asupra expresiei unor factori de patogenitate ai microorganismelor.
6. Evaluarea modificărilor unor parametri biochimici ai culturilor bacteriene sub influența compușilor monocompenți 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 antimicrobienele 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 aplicate

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 Moldove 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 Synthèse et caractérisations 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 la foruri științifice naționale și internaționale:

- **în formă orală:**

1. 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: „*Staph wound infections and methicillin resistant Staphylococcus aureus*”.
2. International Conference titled “Socio-psycho-medical changes in the lifestyles of the contemporary family”. Bucharest, Romania, 2015: „*Multidrug-resistant bacteria isolates in infected wounds*”; „*Prevalence and antibiotic sensitivity of bacteria isolated from nosocomial infections*”.
3. International Scientific Conference on Microbial Biotechnology (3^{ed} edition). Academy of Sciences of Moldova, Institute of Microbiology and Biotechnology. Chisinau, 2016: „*Antibacterial and antifungal properties of algae product BioR*”; „*Incidence and antibiotic susceptibility of bacterial strains isolates from wound infections*”.
4. VII Ежегодная Международная Научно-Практическая Конференция „Актуальные вопросы медицины”. Баку, Азербайджан, 2018: „*Спектр антибиотикоустойчивости и персистентные свойства штаммов Staphylococcus aureus выделенных из содержимого трофических язв*”.
5. International Scientific Conference on Microbial Biotechnology (4nd edition). Academy of Sciences of Moldova, Institute of Microbiology and Biotechnology. Chisinau, 2018: „*Bacterial profile and antibiotic resistance in patients with trophic ulcers*”; „*Antimicrobial activity of some copper (II) coordination compounds with N-(4-(2-((3-methyl-5-oxo-1-phenyl)-4,5-dihydro-1H-pyrazol)methylene) hidrazincarbotioamido) phenyl)acetamide*”; „*Antimicrobial and antifungal activities of iron (III), cobalt (III), nickel (II) and zinc (II) coordination compounds with 2,4-dihydroxyacetophenone 4-allylthiosemicarbazone*”; „*Azachalcone derivatives and their antifungal activity*”.
6. Zilele UMF din Craiova a XLIX-a ediție. Craiova, România, 2019: „*Biofilm formation by Pseudomonas aeruginosa isolated from trophic ulcers and their association with*

antimicrobial resistance”; „Rezistența la antibiotice a tulpinilor de *Staphylococcus spp.* izolate din ulcere trofice a membrilor inferioare”.

7. International Conference Achievements and Perspectives of Modern Chemistry dedicated to the 60th anniversary from the foundation of the Institute of Chemistry. Chișinău, 2019: „*Antimicrobial activity of sea buckthorn powder against four pathogenic bacteria strains.*”
8. Congresului Național al specialiștilor din domeniul sănătății publice și managementului sanitar din Republica Moldova cu participare Internațională „O singură sănătate”. Chișinău, 2019: „*Rezistența la antibiotice și factorii de persistență a tulpinilor izolate din ulcere trofice*”.
9. Congresul consacrat aniversării a 75-a de la formarea USMF „Nicolae Testemițanu”. Chișinău, 2020: „*Rezistența la antibiotice și factorii de persistență a tulpinilor de *Staphylococcus aureus* izolate din ulcere trofice*”.
10. Conferință științifică națională cu participare internațională „Materiale avansate în biofarmaceutică și tehnică”. Chișinău, 2021: „*Synergistic Action of Some Chemical and Biological Compounds*”.
11. National Conference with International participation „One Health Approach in a Changing World”. Chișinău, 2021: „*The influence of certain bioactive compounds on oxidative stress markers, the antioxidant system and inflammatory pattern*”; „*Antibiotic resistance of gram negative bacteria isolated from patients*”; „*Antimicrobial and antifungal activity of Cu(II) and Bi(III) complexes based on aminopolycarboxylate ions and 2-formyl and 2-acetylpyridine thiosemicarbazones*”.

• **în expoziții:**

1. The World Exhibition on Inventions, Research and New Technologies. Eureka - Valencia, Spain 8th of March 2018: „*Inhibitor of increase and multiplication of fungi*”, Medalie de aur.
2. 46E Salon International des Inventions de Genève. Genève, 13 Avril, 2018: „*Agents contenant de cuivre d'activité antibactérienne*”, Medalie de aur; Diploma for high scientific and technological level of the invention on behalf of the Scientific Community of Romania „*Copper containing agents with antibacterial activity against gram positive microorganisms*”.
3. Euroinvent 2018, Iasi, Romania 19 mai 2018: „*Copper containing agents with antibacterial activity against gram positive microorganisms*”, Medalie de aur; „*Inhibitor of increase and multiplication of the fungi*”, Medalie de bronz.
4. Inventica 2018, Iasi, Romania 27-29 iunie 2018: „*Copper containing agents with antibacterial activity against gram positive microorganisms*”, Medalie de aur.

5. Salonul Internațional de Invenții Inovații „Traian Vuia”. Timișoara, România 15 iunie 2018: „*Copper containing agents with antibacterial activity against gram positive microorganisms*”, Medalie de aur; „*Inhibitor of increase and multiplication of the fungi*”, Medalie de aur.
6. Inventica 2018, Iasi, Romania 27-29 iunie 2018: „*Inhibitor of increase and multiplication of the fungi*”, Medalie de aur.
7. PRO INVENT Ediția XVII. Cluj-Napoca, Romania 20-22 martie, 2019: „*Agenții care conțin cupru cu activitate antibacteriană împotriva microorganismelor Gram-pozitive*”. Diplomă de excelență.
8. 47^E Salon International des Inventions de Genève. Genève, 12 Avril, 2019: „*Composés qui exercent une activité antimicrobienne sélective contre les bactéries gram-pozitiv et Candida albicans*”, Medalie de argint; *Diploma on behalf of the Scientific Community of Romania* „*Molecular inhibitors against Candida albicans and gram-positive bacteria*”.
9. Euroinvent 2019, Iasi, Romania 18 mai 2019: „*Copper containing agents with antibacterial activity against gram positive microorganisms*”, Medalie de aur.
10. Salonul Internațional de Invenții Inovații „Traian Vuia”. Timișoara, România 14 iunie 2019: „*Molecular inhibitors against Candida albicans and Gram-positive bacteria*”, Medalie de aur.
11. Inventica 2019, Iasi, Romania 26-28 iunie 2019: „*Molecular inhibitors against Candida albicans and Gram-positive bacteria*”, Medalie de aur.
12. Infoinvent Ediția a XVI-a, Chișinău, Republica Moldova 20-23 noiembrie 2019: „*Utilizarea N-ciclohexil-2-[1-(piridin-2-IL)etiliden]hidrazincarbotoamidei în calitate de inhibitor al proliferării microorganismelor gram-pozitive și fungilor din specia Candida albicans*”, Medalie de argint.
13. Euroinvent 2020, Iasi, Romania 23 mai 2020: „*Water-sopluble dicopper complex having selective antimicrobial activity against medical and agricultural*”, Medalie de aur.
14. Inventica 2020, Iasi, Romania 29-31 iunie 2020: „*New antibacterial agent against Bacillus cereus and Bacillus subtilis*”, Diplomă de Performanță, Medalie de aur; „*Water-soluble dicopper complex having antimicrobial activity*”, Diplomă de Performanță, Medalie de aur.
15. Innovation and Creative Education Fair for Youth ICE-USV – Ivth Edition. Suceava, Romania, 3-5 septembrie 2020: „*Syntesis and characterization of new transition metal coordination compounds for applications in biology*”, Medalie de argint; „*New antibacterial agent against Bacillus cereus and Bacillus subtilis*”, Medalie de aur.
16. Salonul Internațional de Invenții și Inovații „Traian Vuia”, ediția a VI –a. Timișoara, România 13-15 octombrie 2020: „*Sinteza și caracterizarea noilor compuși de coordonare a*

- metalelor de tranziție pentru aplicații în biologie*”, Medalie de argint; „*Nou agent antibacterial împotriva Bacillus cereus și Bacillus subtilis*”, Medalie de aur.
17. International Exhibition Inventcor, Deva, România 17-19 decembrie 2020: „*Synthesis and characterization of new transition metal coordination compounds for applications in biology*”, Medalie de aur; „*New antibacterial agent against Bacillus subtilis*”, Medalie de aur.
18. Euroinvent 2021, Iasi, Romania 22 mai 2021: „*New antibacterial agent against Bacillus cereus and Bacillus subtilis*”, Diplomă de excelență; „*Inhibitor of the proliferation of fungi of the species Cryptococcus neoformans*”, Medalie de aur.
19. Innovation and Creative Education Fair for Youth ICE-USV – Vth Edition. Suceava, Romania, mai 2021: „*Inhibitor of the proliferation of fungi of the species Cryptococcus neoformans*”, Medalie de argint; „*Nitratul de bis{[(ciclohexilamino)fenil(piridin-2-il)-metilidenhidrazono]metansulfinato-N,N',S}fier(III), care manifestă activitate antimicrobiană față de bacteriile din specia Bacillus cereus*”, Medalie de aur.
20. Inventica 2021, Iasi, Romania 23-25 iunie 2021: „*Nitrate bis{[(cyclohexylamine)phenyl(pyridin-2-yl)metilidenhidrazono]metansulfinato-n,n',s} iron (III), with antimicrobial activity against Bacillus cereus.*”, Diplomă de Excelență, Medalie de argint; „*Inhibitor of the proliferation of fungi of the species Cryptococcus neoformans*”, Diplomă de Excelență, Medalie de argint.
21. PRO INVENT Ediția a XIX-a. Cluj-Napoca, România 20-22 octombrie, 2021: „*Nou agent antifungic sintetic*”, Diplomă de Excelență, Medalie de aur; „*Utilizarea nitrato-[n-ciclohexil-n'-(piridin-2-ilmetiliden)carbamoahidrazontioato]cupru în calitate de inhibitor al proliferării bacteriilor din specia Acinetobacter baumannii*”, Diplomă de Excelență, Medalie de aur.
22. Infoinvent Ediția a XVII-a, Chișinău, Republica Moldova 17-20 noiembrie 2021: „*Nou agent antibacterial împotriva Bacillus cereus și bacillus subtilis*”, Medalie de argint; „*Utilizarea nitrato-[n-ciclohexil-n'-(piridin-2-ilmetiliden)carbamoahidrazontioato]cupru în calitate de inhibitor al proliferării bacteriilor din specia Acinetobacter baumannii*”, Medalie de aur.
23. International Exhibition INVENTCOR IInd edition, Deva, România 16-18 decembrie 2021: „*Use of nitrato-[n-cyclohexyl-n'-(pyridin-2-ylmethylidene)carbamoahidrazonethioato] copper as an inhibitor of the reproduction of bacteria of the species Acinetobacter baumannii*”, Medalie de aur.

- **în formă de poster:**

1. Conferința națională de otorinolaringologie și chirurgie cervico-facială, Sibiu, România, 2017: *Antimicrobial susceptibility of Pseudomonas aeruginosa*.
2. First Balkan Conference of Medical Mycology and Mycotoxicology „Balkan Fungus 2018”, Timișoara, România, 2018: „*Antifungal activity of 2-acetylpyridine{n-(4-aminophenyl)-acetamid}thiosemicarbazone and salicylaldehyde{n-(4-amino-phenyl)-acetamid}thiosemicarbazone*”; „*Antifungal activity of new copper (II) complexes with 4-benzoyl-5-methyl-2-phenyl-2,4-dihydro-3h-pirazol-3-onen(4)-ciclohexylthiosemicarbazone*”; „*Antifungal activity of some 3d metal coordination compounds with 2-[2-(prop-2-en-1-ylcarbamothioy)-hydrazinylidene]-propanoic acid*”; „*Antifungal activity of iron, cobalt, nickel and zinc coordination with 2-[1-(2,4-dihydroxyphenyl)ethylidene]-n-(prop-2-en-1-yl)-hydrazinocarbothioamide*”.
3. A XXXV-a Conferință națională de chimie Călimănești – Căciulata, Vâlcea, România, 2018. *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*.
4. International Conference Achievements and Perspectives of Modern Chemistry dedicated to the 60th anniversary from the foundation of the Institute of Chemistry. Chișinău, 2019: „*Synthesis, characterization, crystal structure and antimicrobial activity of copper(II) complexes*”; „*Water-soluble dicopper complex having antimicrobial activity*”; „*Synthesis and antimicrobial properties of new copper(II) complexes with benzoate of ethyl 4-({2-[(pyridin-2yl)methylidene]hydrazin-ecarbothiolyl}amino)*”; „*Synthesis, antimicrobial and antifungal properties of copper(II) coordination compounds with 2,4-dihydroxybenzaldehyde 4-allylthiosemicarbazone containing amines*”.
5. Congresul consacrat aniversării a 75-a de la formarea USMF „Nicolae Testemițanu”. Chișinău, 2020: „*Antimicrobial susceptibility and biofilm formation of Klebsiella pneumoniae strains*”.
6. National Conference with International Participation „One Health Approach in a Changing World”. Chișinău, 2021: „*The action of some chemical and biological compounds on the biochemical parameters of microorganisms*”; „*Antibiotic resistance and biofilm formation of strains isolated from trophic ulcers*”.

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.

Rezultatele tezei au fost discutate și aprobate la ședința Disciplinei de microbiologie și imunologie, Departamentul Medicină Preventivă, USMF „Nicolae Testemițanu” (proces verbal nr. 07 din 16. 02. 2022) și la ședința Seminarului Științific de profil (313. Imunologie, microbiologie, virusologie, 321. Medicină generală, specialitățile 313.02. Microbiologie, virusologie medicală, 321.09. Boli infecțioase, tropicale și parazitologie medicală (proces verbal nr. din 18. 04. 2022).

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.

În „*Introducere*” este expusă actualitatea și importanța științifico-practică a subiectului abordat, scopul și obiectivele cercetării, noutatea și originalitatea, semnificația teoretică, valoarea aplicativă, problema științifică soluționată, aprobarea și implementarea rezultatelor științifice obținute.

Capitolul 1 „*Stadiul actual al cercetării în dezvoltarea antimicrobienei și strategii noi în terapia ulcerului trofic*” include informații actuale, selectate din literatura de specialitate, cu referire la antimicrobiene și anume: aspecte generale, principiul de clasificare și semnificația acestora în terapia patologiei infecțioase. Sunt aduse dovezi concludente ale problemei globale a sistemului de sănătate - rezistența microorganismelor la antimicrobiene. Se enumeră tipurile de rezistență antimicrobiană, cauzele apariției, mecanismele de dezvoltare și metodele de detectare. Se analizează situația actuală, la nivel național, a rezistenței la antimicrobiene a microorganismelor implicate în patologia umană, folosind ca reper rapoartele Agenției Naționale de Sănătate Publică. Sunt prezentate noile perspective și alternative terapeutice în tratamentul infecțiilor cauzate de microorganisme multirezistente, selectate în urma analizei și sintezei detaliate a publicațiilor științifice din țară și de peste hotare (articole științifice, ghiduri și recomandări). O documentare laborioasă a permis definirea conceptului de ulcer trofic și stabilirea principiilor de clasificare, cu descrierea detaliată a tipurilor de microorganisme izolate

din ulcerele trofice și a considerațiilor etiopatogenetice. Un compartiment important al acestui capitol este rezervat elucidării particularităților ulcerului trofic infectat și rolului diagnosticului microbiologic în managementul eficient a acelei patologii. Capitolul se finalizează cu 10 concluzii la problemele ce persistă în domeniul de interes al cercetării preconizate.

În capitolul 2 „*Material și metode*” sunt prezente designul studiului, metodologia cercetării, metodele de investigație (bibliografico-analitice, epidemiologice, microbiologice, biochimice, imunochimice, de observație, experimentale și comparative, analiza cantitativă și calitativă a datelor obținute), metodele statistice de prelucrare a datelor obținute, criteriile de includere în studiu, volumul eșantionului utilizat. În urma analizei materialului și metodelor de cercetare au fost formulate cinci concluzii.

Capitolul 3 „*Diversitatea speciilor, rezistența la antimicrobiene și factorii de patogenitate a tulpinilor izolate din ulcere trofice*”, cuprinde câteva compartimente în care sunt prezentate rezultatele evaluării spectrului de microorganisme implicate în etiologia ulcerului trofic infectat; rezistența la antimicrobiene și factorii de patogenitate ai tulpinilor izolate din ulcere trofice infectate; rezultatele corelării rezistenței tulpinilor la antimicrobiene cu factorii de patogenitate. Cele zece concluzii de la finele capitolului reflectă în totalitate rezultatele obținute.

În capitolul 4 „*Activitatea antimicrobiană a compușilor noi de origine chimică și biologică*” se descriu rezultatele testărilor de determinare a acțiunii antimicrobiene a compușilor noi de origine chimică și biologică. La prima etapă a fost estimată acțiunea bacteriostatică și bactericidă asupra bacteriilor gram-pozitive, gram-negative și a micetelor levuriforme a compușilor aparte, cu determinarea concentrației minime inhibitorii, minime bactericide și fungicide. Acțiunea antimicrobiană a fost evaluată atât pe tulpini de referință, cât și pe tulpini clinice, izolate din ulcere trofice infectate. De asemenea a fost apreciată acțiunea compușilor monocomponenți și în combinație asupra exprimării factorilor de patogenitate ai tulpinilor clinice. Compușii, care au manifestat activitate antimicrobiană mai pronunțată, au fost testați în combinație, pentru determinarea synergismului și timpului de omorâre a microorganismelor. Sunt relatate rezultatele toxicității unor substanțe chimice noi asupra crustaceului *Daphnia magna*. Rezultatele obținute au fost utilizate la elaborarea a nouă brevete de invenție și două certificate de inovație.

În capitolul 5 „*Modificări ale unor parametri biochimici ai microorganismelor induse de compuși chimici și biologici noi*” sunt prezentate rezultatele studierii efectelor compușilor luați în studiu, atât separat, cât și în combinație, asupra tulpinilor microbiene. Astfel au fost determinați și evaluați indicii stresului oxidativ, a fost explorată modificarea capacității antioxidante a culturilor de microorganisme sub influența compușilor chimici și biologici, incluși în studiu. În baza datelor obținute au fost formulate patru concluzii.

Capitolul 6 „*Influența compușilor biologic activi asupra markerilor stresului oxidativ, sistemului antioxidant și pattern-ului inflamator*” include rezultatele cercetării axate pe influența compușilor biologic activi, separat și în combinație, asupra indicilor stresului oxidativ și ai sistemului antioxidant, precum și asupra profilului citokinic, prin determinarea unor citokine proinflamatoare și antiinflamatoare. Capitolul se încheie cu sinteza rezultatelor și formularea a opt concluzii.

Concluziile generale și recomandările practice sunt bazate pe dovezile obținute în cercetare și corespund cu scopul și obiectivele trasate.

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

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

1.1. Antibioticele și antibioterapia – istoric, caracteristici și constrângeri

Antimicrobienele sunt substanțe de origine naturală, semisintetică sau sintetică care, la concentrații *in vivo*, distrug sau inhibă proliferarea microorganismelor prin interacțiunea cu situsuri-țintă din celula bacteriană. La antimicrobiene se referă următoarele clase de preparate: antibacteriene, antivirale, antifungice și antiparazitare.

Antimicrobienele au un impact semnificativ asupra sănătății umane prin capacitatea lor de a preveni și de a elimina maladiile infecțioase [257]. Majoritatea sunt molecule complexe, cu regiuni hidrofobe, ceea ce ușurează difuziunea lor în celule. În prezent sunt stabilite diferite criterii de clasificare a antimicrobienulelor, printre care și modul de acțiune asupra celulei microbiene în funcție de care deosebim [156]:

- *antimicrobiene care acționează asupra sintezei componentelor chimice ale peretelui celular*, vitale pentru microorganisme. Prin urmare, antimicrobianul, care țintește peretele bacterian, poate să distrugă sau să inhibe microorganismul dat;
- *antimicrobiene active asupra sintezei proteinelor bacteriene*. Enzimele sunt constituite din proteine, iar sinteza acestora este un proces esențial pentru supraviețuirea microorganismelor. Grupul dat de agenți antimicrobieni, prin legarea de ribozomii intracelulari, inhibă sinteza proteinelor microbiene, ceea ce duce la dereglarea metabolismului, la moartea sau la inhibiția multiplicării microorganismelor;
- *antimicrobiene active asupra sintezei acizilor nucleici*. Acționând prin legarea de componentele implicate în sinteza ADN-ului și ARN-ului, antimicrobienele din acest grup compromit multiplicarea și supraviețuirea bacteriilor;
- *antimicrobiene active asupra membranei celulare*. În cazul deteriorării membranei celulare, care divizează și stabilește fluxul intra- și extracelular al substanțelor, se pot produce modificări ireversibile pentru supraviețuirea celulei microbiene;
- *antimicrobiene inhibitori ai altor procese metabolice*. Acest grup de preparate antimicrobiene este focusat pe anumite procese celulare, importante pentru supraviețuirea microorganismelor.

Istoricul descoperirii antimicrobienulelor. Una dintre marile realizări ale medicinei este descoperirea antibioticelor. Până la descoperirea lor, maladiile infecțioase bacteriene se soldau, în majoritatea cazurilor, cu deces. În era preantibiotică, pentru combaterea maladiilor infecțioase

erau folosite diferite substanțe cu acțiune antibacteriană. Grecii și indienii foloseau în acest scop diverse specii de ciuperci și de plante [110].

În sec. al XVII-lea, maladiile infecțioase erau tratate cu mucegaiuri. În sec. al XIX-lea, în 1871, renumitul chirurg englez Joseph Lister descrie acțiunea antibacteriană a unor specii de micete, printre care *Penicillium glaucium*, iar în 1875, fizicianul irlandez John Tyndall, a speciei *Penicillium fungus*. În 1877, chimistul și microbiologul francez Louis Pasteur demonstrează că unele specii de bacterii pot distruge altele [148].

Spre sfârșitul sec. al XIX-lea, după ce Louis Pasteur a sugerat ideea că bolile pot fi provocate de microorganisme, cercetările pentru obținerea unor substanțe cu proprietăți bactericide au căpătat amploare.

La descoperirea antimicrobienei și-a adus contribuția și savantul român Victor Babeș care, în 1885, a observat acțiunea inhibitoare asupra creșterii bacteriilor a unor substanțe produse de microorganisme și a intuit posibilitatea folosirii lor în terapia unor infecții [149].

Termenul „antibioză” a fost introdus, în 1889, de către discipolul lui Louis Pasteur, Paul Vuillemin, și definea procesul prin care un agent cu activitate biologică, poate fi folosit pentru a distruge un microorganism viu [149].

Prima substanță antibacteriană, care poate fi considerată un antibiotic cu spectru restrâns, a fost *salvarsanul*, descoperit în 1910 de chimistul și medicul german Paul Ehrlich [111].

În 1921, Alexander Fleming descoperă enzima antiseptică numită *lizozim*, iar în 1928, urmărind distrugerea coloniilor de bacterii de către secreția mucegaiului verde *Penicillium notatum* (*Penicillium chrysogenum*), penicilina. Această descoperire epocală a fost publicată, în 1929, în „British Journal of Experimental Pathology”, iar în 1942, Howard Florey și Ernst Boris Chain, purifică și inițiază producerea penicilinei [3].

În 1935, Gerhard Domagk descoperă un nou preparat bacteriostatic - *sulfonamida*.

În 1940 și în 1950 sunt descoperite *streptomicina*, *cloramfenicolul* și *tetraciclina*, iar în 1942 Selman Waksman utilizează pentru prima dată termenul de „antibiotic” [321].

Mai bine de jumătate de secol, antibioticele au fost eficiente, salvând miliarde de vieți și sporind semnificativ speranța de viață. Însă în timp, din cauza folosirii abuzive și nejustificate a acestor preparate, atât în medicina umană, cât și veterinară, s-a dezvoltat fenomenul de *rezistență la antimicrobiene* [148].

Încă în 1945, Alexander Fleming avertiza lumea medicală că o utilizare abuzivă a penicilinei ar putea duce la apariția unor tulpini bacteriene rezistente la acest preparat [148].

Fenomenul de rezistență a fost observat și descris pentru prima dată la tulpinile de *Staphylococcus aureus* - primul microorganism care a început lupta cu penicilina [102]. În 1950 au fost descrise tulpini de *Escherichia coli* care prezentau rezistență la sulfonamide [333].

În 1953, Watanabe și colab. au observat că *Shigella dysenteriae* a devenit rezistentă nu doar la sulfonamide și streptomycină, dar și la cloramfenicol, tetracilină. Rezistența a fost generată nu numai de mutațiile unor gene cromozomiale, ci și de prezența ADN-ului extracromozomial, transmisibil, adică o rezistență mediată plasmidic [323].

Până în prezent, bacteriile au dezvoltat rezistență aproape la toate antimicrobienele existente [115, 289] De ex., vancomicina a fost introdusă în practica medicală, în 1972, pentru tratamentul infecțiilor cauzate de *Staphylococcus aureus* rezistent la meticilină. Deși se considera dificilă inducerea rezistenței la vancomicină, în 1979 și în 1983 au fost raportate cazuri de rezistență la vancomicină a stafilococilor coagulazo-negativi [148]

Începând cu anii 60 și până la începutul anilor 80 ai sec. al XX-lea, industria farmaceutică a propus un șir de antimicrobiene noi, pentru a soluționa problema rezistenței. Ulterior, tot mai puține antibiotice noi au fost lansate pe piață. Ca rezultat, la cca 70 de ani de utilizare a antimicrobienele, infecțiile bacteriene au devenit din nou o amenințare majoră pentru omenire [66, 172].

În ultimele decenii, eficacitatea antimicrobienele a început să scadă progresiv, iar evoluția fenomenului de multirezistență a determinat țările să întreprindă măsuri și să dezvolte strategii de combatere a acestui fenomen [22].

Clasificarea antimicrobienele și semnificația lor în patologia umană. Până în prezent au fost dezvoltate zeci de mii de preparate antimicrobiene pentru tratamentul patologiei infecțioase, dar numai o parte sunt utilizate în practica medicală. Antimicrobienele existente se clasifică în funcție de origine, de mecanismul de acțiune și de structura chimică.

În funcție de origine, preparatele antimicrobiene pot fi naturale, sintetice și semisintetice. Exemple bine cunoscute de antimicrobiene naturale sunt cefalosporinele, cefamicinele, benzilpenicilina, gentamicina etc. Aceste preparate prezintă, de obicei, o toxicitate mai înaltă decât antimicrobienele semisintetice sau sintetice. Antimicrobienele semisintetice (ex. ampicilina, amicacina) au fost dezvoltate pentru a crește eficacitatea preparatelor de origine naturală și de a micșora toxicitatea lor. Printr-o eficiență mai înaltă și o toxicitate mai scăzută decât antimicrobienele naturale se disting antimicrobienele sintetice (ex. moxifloxacina, norfloxacina) [121].

Din punct de vedere al structurii chimice, antibioticele sunt substanțe foarte heterogene și se clasifică în mai multe grupuri, prezentate în continuare [38].

Antimicrobienele beta-lactamice, unul dintre cele mai importante și mari grupuri de antimicrobiene, cuprind în structura lor inelul beta-lactamic. Din acest grup fac parte penicilinele, cefalosporinele și cefamicinele. Până în 2003, mai mult de jumătate din toate antimicrobienele disponibile erau compuși beta-lactamici [59].

Antimicrobienele polipeptidice, peptide non-ribozomale, derivate de la aminoacizi, sunt produse de bacteriile din genul *Bacillus* și acționează prin inhibiția sintezei membranei citoplasmatică. Reprezentanți ai acestui grup sunt bacitracina (produsă de *B. subtilis*), gramicidina (produsă de *B. brevis*), actinomicina, polimixinele (produse de *B. polymyxa*). Bacitracina reprezintă un peptid ciclic care derivă dintr-o proteină a celulei vegetative, degradată parțial în timpul sporulării. Polimixinele au o configurație ciclică cu o „coadă” hidrofobă de acid octanoic [65].

Antimicrobienele aminoglicozide au un inel format din șase unități cu grupări amino, de unde și provine denumirea lor. Sunt antimicrobiene semisintetice, bactericide cu spectru larg de acțiune, dar relativ toxice. De regulă, nu sunt active împotriva bacteriilor cu parazitare intracelulară. Aceste preparate sunt produse de sinteză ale unor specii din genul *Streptomyces* (a căror denumire se termină cu sufixul „mycin”) sau *Micromonospora* (denumirea cărora se termină cu sufixul „micin”) [163].

Antimicrobienele polichetide sunt de origine naturală, derivate din acizi poli- β -cetonici. Datorită spectrului antimicrobian larg, prezintă un grup important de preparate antimicrobiene ce acționează prin inhibiția sintezei proteinelor. Din acest grup fac parte griseofulvina (produsă de *Penicillium patulum*), tetraciclina (produsă de *Streptomyces* spp.) [170].

Antimicrobienele macrolide au în componența lor un ciclu lactonic la care se atașează componenta glucidică. Diversitatea preparatelor din acest grup se datorează variației inelului macrolidic și a complexului glucidic. Se disting prin efect bacteriostatic și un spectru larg de activitate. Cele mai cunoscute și utilizate macrolide sunt eritromicina, claritromicina și azitromicina [46].

Antimicrobienele chinolone și fluorochinolone. Chinolonele sunt preparate antimicrobiene sintetice, derivate din chinină. Cele mai importante chinolone sunt fluorochinolonele obținute prin introducerea unui atom de fluor în poziția 6 a nucleului chinolonic. Reprezentanții acestui grup sunt acidul nalidixic (prima generație), ciprofloxacina (a doua generație), levofloxacina (a treia generație) și trovafloxacina (a patra generație) [224].

Antimicrobienele streptogramine sunt formate din două grupe de molecule, A (macrolactone polinesaturate) și B (hexadepsipeptide ciclice), care acționează în sinergie. Reprezentanții acestui grup de antimicrobiene, dalfopristina (streptogramină A) și chinupristina (streptogramină B), sunt folosite în tratamentul infecțiilor provocate de *S. aureus* și enterococi rezistenți la vancomicină [187].

Antimicrobienele sulfonamide sunt una dintre cele mai importante clase de antimicrobiene. Sulfonamidele sunt antibiotice sintetice, bacteriostatice cu spectru larg de acțiune, având în componența lor grupa funcțională sulfonamidă ($R_1-SO_2-NR_2R_3$) [311].

Antimicrobienele steroide reprezintă o structură chimică similară colesterolului. Reprezentantul acestui grup este acidul fusidic (fusidina), produs de fungi din genul *Fusarium*, cu efect bacteriostatic sau bactericid (în raport cu doza) [291].

Antimicrobienele poliene se caracterizează prin prezența în molecula lor a unui anumit număr de legături duble carbon-carbon. Din această grup fac parte: nistatina, amfotericina B, candicidina (produse de *Streptomyces* spp.), fumigalina (produsă de *Aspergillus fumigatus*) [62].

Antimicrobienele glicopeptide sunt reprezentate de două preparate: vancomicina și teicoplanina. Vancomicina reprezintă un heptapeptid provenit din aminoacizi aromatici, condensați într-o structură triciclică, la care se atașează un dizaharid. Teicoplanina constă dintr-un glicopeptid asociat cu două glucide (manoza și N-acetilglucozamina) [184].

Antimicrobienele lincosamide reprezintă un grup de preparate a căror structură se bazează pe un nucleu de piroolidină care se leagă, prin intermediul unei legături amidice, de o piranoză. Reprezentanții acestui grup sunt lincomicina și clindamicina. Lincomicina este un preparat natural, sintetizat de specia *Streptomyces lincolnensis*, iar clindamicina un derivat clorurat al lincomicinei, care se obține în urma reacției cu clorura de tionil [291].

1.2. Rezistența antimicrobiană – definiție, cauze, mecanisme de formare, metode de detectare

Maladiile infecțioase cauzate de microorganisme rezistente la antimicrobiene, sunt listate printre cele mai grave amenințări pentru sănătatea publică și siguranța pacienților la nivel global, regional și național [81].

Infecțiile cu bacterii rezistente la antimicrobiene determină un nivel înalt de morbiditate și de mortalitate, ca urmare a eșecurilor terapeutice, și costuri tot mai ridicate pentru îngrijirile medicale, fiind o povară socială și economică gravă ce necesită intervenții în timp util [146, 147, 317].

De pe urma infecțiilor cauzate de bacterii multirezistente anual decedează 700 mii de persoane la nivel mondial (~ 25 mii în UE), cu perspectiva creșterii alarmante până la 10 milioane în următorii 35 de ani [297]. În 2019, Organizația Mondială a Sănătății a nominalizat RAM ca fiind una dintre cele zece amenințări globale la adresa sănătății [105].

RAM amenință, de asemenea, realizarea unor obiective de dezvoltare durabilă ale Națiunilor Unite (obiectivul 3). Pentru combaterea RAM au fost adoptate, la nivel global, un șir de măsuri precum Declarația Politică a Organizației Națiunilor Unite din 2016 și Planul de acțiune globală al OMS din 2015 privind RAM. Problema RAM a fost abordată și în cadrul forumurilor G7 și G20 [106].

Tipurile de rezistență la antimicrobiene

La baza fenomenului de rezistență la antimicrobiene stă capacitatea microorganismelor de a rezista acțiunii acestor preparate (cresc și se multiplică în prezența unui nivel ridicat de antimicrobiene), prin mutații sau prin achiziționarea genelor exogene de rezistență [112, 123, 176].

Clasificarea rezistenței la antimicrobiene se face în baza mai multor criterii prezentate în continuare:

A. În funcție de origine:

- *rezistență naturală*: capacitatea intrinsecă a unor microorganisme de a rezista la anumite preparate antimicrobiene [257];
- *rezistență dobândită*: rezistența unui microorganism la un agent antimicrobian, inițial eficient în tratarea infecțiilor cauzate de microorganismul dat [16].

B. În funcție de momentul în care se instalează infecția:

- *rezistență primară*: rezistența microorganismelor în momentul contractării infecției;
- *rezistență secundară*: starea dobândită de tulpina contractată în timpul tratamentelor inadecvate.

C. În funcție de numărul de antimicrobiene față de care se instalează:

- *monorezistență*: rezistență față de un singur preparat antimicrobian;
- *multirezistență*: rezistență față de mai multe preparate antimicrobiene [257].

D. În raport cu viteza de instalare a rezistenței față de antimicrobiene [155]:

- *rezistență rapidă* (monostadială), constituită dintr-o singură treaptă (mutantă unică, implicând o singură genă);
- *rezistență progresivă* (pluristadială), cuprinzând mai multe trepte (mutații succesive, implicând mai multe procese genetice).

E. În raport cu prezența factorului antimicrobian [271]:

- *rezistență inductibilă*: rezistență exprimată doar în prezența preparatului antimicrobian;
- *rezistență constitutivă*: capacitate a unei gene de a-și exprima continuu rezistența, independent de prezența sau de absența preparatului antimicrobian.

Sunt descrise și alte tipuri de rezistență precum:

- *rezistență încrucișată*: capacitatea unor tulpini de a manifesta rezistență față de unele antimicrobiene înrudite prin structura chimică [93];
- *rezistență adaptativă*: apare la utilizarea unor doze subinhibitoare de antimicrobian, microorganismele revenind la starea inițială după câteva generații de la înlăturarea factorului inductor.

Tulpinile bacteriene, în raport cu numărul de antimicrobiene față de care au dezvoltat rezistență (gradul de rezistență la antimicrobiene), se grupează în:

- *tulpini multirezistente* (MDR): rezistență dobândită de către tulpina bacteriană la cel puțin un antimicrobian din trei sau din mai multe grupuri de antimicrobiene [179];
- *tulpini cu rezistență extinsă* (XDR): rezistență dobândită de către tulpina bacteriană la cel puțin un antimicrobian din toate grupurile, cu excepția a două sau mai puține grupuri antimicrobiene (adică izolatele rămân sensibile doar la una sau două grupuri de antimicrobiene) [304];
- *tulpini pan-rezistente* (PDR): tulpina bacteriană prezintă rezistența dobândită la toți agenții din toate grupurile de antimicrobiene. PDR provine de la prefixul grecesc *pan* - toate, însă, conform unor studii, acest termen variază și descrie un izolat rezistent la toate antimicrobienele aprobate și utile. Alți autori definesc PDR ca „rezistent aproape la toate antimicrobienele disponibile în comerț”, „rezistent la toate antimicrobienele testate de rutină” [296].

Pentru aplicarea corectă a acestei clasificări este necesară testarea tulpinilor bacteriene la toate sau aproape la toate preparatele antimicrobiene și evitarea raportării selective.

Cauzele principale ale dezvoltării rezistenței la antimicrobiene

RAM este un fenomen natural cauzat de mutații ale genelor bacteriilor, iar utilizarea excesivă și nejustificată a antimicrobienelelor accelerează apariția și răspândirea bacteriilor rezistente la aceste preparate. Astfel, antibacterienele pot fi administrate eronat în tratamentul infecțiilor de origine virală, împotriva cărora acestea nu sunt eficiente [22].

În multe țări, inclusiv în Republica Moldova, antibioticele pot fi procurate fără rețetă, cu toate că legislația în vigoare interzice acest lucru. Presiuni asupra medicilor și farmaciștilor exercită și industria farmaceutică. Pentru a combate rezistența la antimicrobiene este necesară o abordare intersectorială și decizii ferme atât pe plan național, cât și internațional [330].

La dezvoltarea RAM contribuie și utilizarea inadecvată a acestora, când este redusă durata tratamentului, doza și nu este respectată frecvența administrării [45].

Utilizarea antimicrobienelelor în lanțurile alimentare, mai ales ca acceleratori de creștere a animalelor agricole, de asemenea a favorizat dezvoltarea RAM. Unele țări, inclusiv Republica Moldova, permit utilizarea antimicrobienelelor în sectorul zootehnic, spre deosebire de țările Uniunii Europene. În unele studii este descris fenomenul folosirii exagerate a antimicrobienelelor la animalele agricole, în comparație cu oamenii [313, 327].

În mai multe studii internaționale recente, se atrage atenția la o utilizare exagerată a antimicrobienelelor în tratamentul pacienților cu COVID-19. Astfel, aproximativ 75% dintre pacienții diagnosticați cu această infecție au recurs la antimicrobiene împotriva infecțiilor bacteriene asociate sau secundare, chiar dacă dezvoltarea lor a fost estimată la mai puțin de 10% și, respectiv, 15% [2].

Conform datelor unui studiu cu referire la viziunile comportamentale privind COVID-19 în Republica Moldova, realizat în august 2020, 13,5% dintre respondenți au utilizat antibiotice pentru a preveni sau trata COVID-19 [194].

Mecanismele de dobândire a rezistenței la antimicrobiene și metode de detectare

Ațiunea preparatelor antimicrobiene poate fi contracarată prin mecanisme atât intrinseci bacteriei, cât și prin mutațiile genelor sau prin dobândirea acestora [199].

Rezistența intrinsecă a unei specii sau a unui gen este o caracteristică proprie, aparținând speciei sau genului respectiv. Fiind cromozomială se transmite la descendenți, determinând fenotipurile sălbatice rezistente la antimicrobiene (Tabelul 1). Cunoașterea particularităților rezistenței intrinseci a unui agent patogen este importantă în practica medicală pentru a evita tratamentele inadecvate și ineficiente [150].

Tabelul 1. Tipuri de rezistență intrinsecă la antimicrobiene și mecanisme de dezvoltare

[150]

Microorganism	Rezistență intrinsecă	Mecanismul de dezvoltare
Bacterii anaerobe	Aminoglicozide	Lipsa metabolismului oxidativ pentru a determina absorbția aminoglicozidelor
Bacterii aerobe	Metronidazol	Incapacitatea de a reduce anaerob preparatul la forma sa activă
Bacterii gram-pozitive	Aztreonam (beta-lactam)	Lipsa proteinelor care leagă penicilina (PLP)
Bacterii gram-negative	Vancomicina	Lipsa absorbției rezultată din incapacitatea vancomicinei de a pătrunde prin membrana externă
<i>Klebsiella</i> spp.	Ampicilina (beta-lactam)	Secreția de enzime (beta-lactamaze) care distrug ampicilina înainte ca acesta să poată atinge ținta (PLP)
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Imipenem (beta-lactam)	Secreția de enzime (beta-lactamaze) care distrug imipenemul înainte ca acesta să poată atinge ținta (PLP)
Lactobacili și Leuconostoc	Vancomicina	Lipsa țintei adecvate (precursorul peretelui celular) care permite vancomicinei să se lege și să inhibe sinteza peretelui celular
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Sulfonamide, trimetoprim, tetraciclina, sau cloramfenicolul	Lipsa absorbției rezultată din incapacitatea antimicrobienelelor de a atinge concentrații intracelulare eficiente
Enterococi	Aminoglicozide	Lipsa unui metabolism oxidativ suficient pentru a determina absorbția aminoglicozidelor
	Toate cefalosporinele	Lipsa proteinelor care leagă penicilina (PLP)

Rezistența dobândită a microorganismelor la antimicrobiene este o particularitate fenotipică, corelată cu alterarea materialului genetic indusă prin mecanisme de variație genetică,

atât de natură endogenă, cum ar fi mutațiile, translocările, și exogenă precum recombinările cromozomiale, transferul de plasmide rezistente etc. (Tabelul 2).

Ca urmare a unor mutații în secvențele nucleotidelor cromozomului bacterian, care determină sinteza de proteine sau de alte macromolecule, se dezvoltă rezistența cromozomială.

Pentru microorganismele dotate cu sisteme de transfer genetic eficiente, capabile de a interacționa și de a acumula genele de rezistență, este caracteristică rezistența transferabilă. Transferul interspecii presupune că, odată ce au apărut gene ale rezistenței, microorganismele care le dețin rămân donori potențiali de astfel de gene pentru alți agenți microbieni. Acest transfer al genelor de rezistență între microorganisme are loc prin plasmide, transpozoni și integroni [168, 199].

Tabelul 2. **Exemple de rezistență la antimicrobiene dobândită prin mutații și transfer orizontal de gene [89]**

Microorganism	Mecanismul de dezvoltare	
<i>M. tuberculosis</i> rezistent la rifamicină	Mutații	Mutații punctiforme în regiunea de legare a rifampicinei (<i>rpoB</i>)
Izolate clinice rezistente la fluorochinolone		Mutație, în special, a regiunii care determină rezistența la chinolone precum <i>GyrA</i> și <i>ParC/GrlA</i>
<i>E.coli</i> , <i>H. influenzae</i> rezistente la trimetoprim		Mutații ale genei care specifică dihidrofolat reductaza
<i>Staphylococcus aureus</i> rezistent la meticilină (SARM)	Transfer orizontal de gene	Achiziționarea genelor <i>mecA</i> dislocate pe un element genetic mobil responsabil de codificarea proteinelor ce leagă penicilina (PLP)
Bacterii patogene rezistente la sulfonamide		Transferul orizontal de gene străine <i>folP</i> sau părți ale acestora
<i>E. faecium</i> și <i>E. faecalis</i> rezistente la vancomicină		Achiziționarea uneia din cele două gene conexe <i>VanA</i> și <i>VanB</i> , responsabile de codificarea enzimelor ce modifică precursorul peptidoglicanului

Plasmidele sunt molecule de ADN extracromozomal, capabile de replicare autonomă, specifică bacteriilor. Transmiterea plasmidelor de la o celulă microbială la alta se face prin: conjugare (prin pili sexuali), transducție fagică (prin intermediul unui bacteriofag) și transformare (materialul plasmidic fiind preluat direct de un alt microorganism în urma distrugerii celulei bacteriene). Unele plasmide conțin gene ce codifică rezistența împotriva antimicrobienele și au fost desemnate ca plasmide de rezistență (plasmide R). Acest tip de plasmide, răspândite pe larg în natură, practic la toate grupele de bacterii, răspund de transmiterea rezistenței multiple la antimicrobiene, atât pe orizontală, cât și pe verticală [169, 294].

Mecanismele biochimice de exprimare a genelor de rezistență sunt: reducerea sau inhibarea pătrunderii antibioticului în celula-țintă (bacterie) prin sistemele de eflux excesiv – eliminarea activă a antibioticului; modificarea țintei antibioticului sau locului de legare a antibioticului, astfel încât molecula nu mai poate interacționa cu organele celulare (la al căror nivel este țintit mecanismul de acțiune, de ex., ribozomi sau enzime implicate în sinteza peretelui bacterian); inactivarea sau distrugerea antibioticului sub acțiunea unor enzime bacteriene (ex. inactivarea penicilinei prin sinteza de beta-lactamaze care rup o legătură beta-lactamică din molecula de antibiotic); reducerea acumulării preparatului antimicrobian în bacterie prin diminuarea permeabilității membranei celulare – apare, mai ales, la nivelul membranei externe a bacteriilor gramnegative, la care porii se obturează parțial sau total, iar uneori pot să dispară (Figura 1) [223, 250].

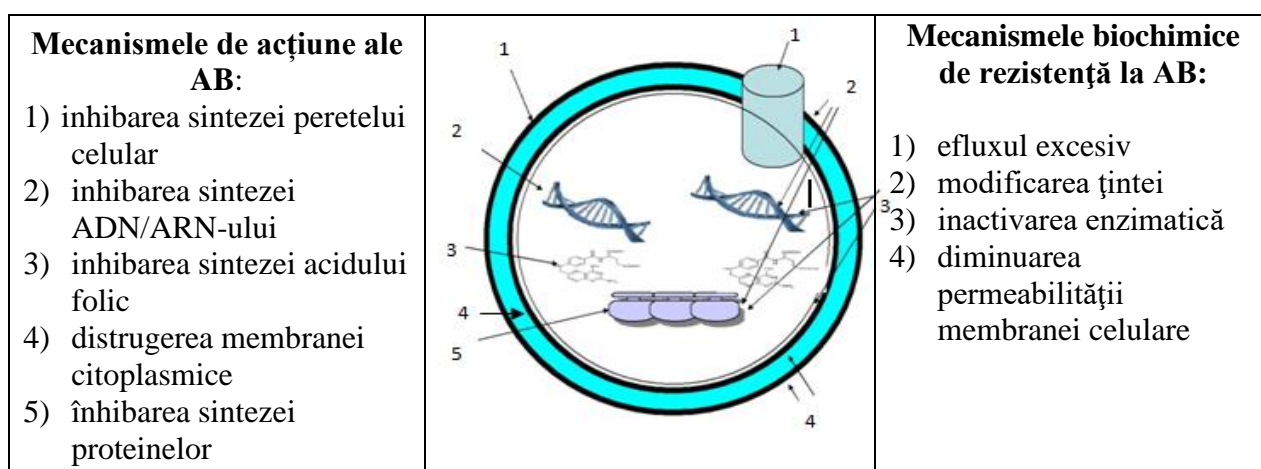


Figura 1. Mecanisme de acțiune a antibioticelor și de rezistență la antibiotice [223].

Conform informațiilor din literatura de specialitate, inactivarea sau distrugerea antibioticului sub acțiunea unor enzime bacteriene este cel mai frecvent mecanism de antibioretistență, raportat la microorganismele asociate ulcerului trofic [77, 141].

Dezvoltarea la microorganisme a antibioretistenței are loc prin următoarele mecanisme biochimice: a) mutațiile proteinelor de legare a penicilinelor PBP (eng. *penicillin-binding proteins*), al căror efect este reducerea afinității de legare cu antibioticele beta-lactamice; b) efluxul activ al beta-lactamilor, prin recunoașterea lor de către proteinele de transport bacterian, cu pomparea eficientă a acestora din celulă; c) dereglarea accesului antibioticului la locul de acțiune, determinând schimbări în structura peretelui – modificarea porinelor din membrana externă; d) sinteza beta-lactamazelor, care rup inelul beta-lactamic și inactivează antibioticul – cel mai important mecanism pentru bacilii gram-negativi.

Beta-lactamazele sunt enzimele responsabile de rezistența la antibioticele beta-lactamice. Sub acțiunea acestor enzime are loc hidroliza inelului beta-lactamic al antibioticelor din acest

grup (penicilinele, cefalosporinele, cefamicinele și carbapenemele), ceea ce duce la inactivarea lor completă. Întrucât majoritatea speciilor bacteriene dispun de astfel de enzime, devine clară dezvoltarea de către acestea a rezistenței la antibioticele beta-lactamice [64].

Clasificarea beta-lactamazelor este foarte complexă și controversată, având la bază mai multe criterii [4, 272]:

- *în funcție de caracterul de expresie a genelor codificatoare* (modul de producere de către bacterie): constitutivă (capacitatea bacteriei de a secreta continuu enzima, independent de prezența sau de absența antibioticului) sau inductibilă (rezistență exprimată numai în prezența antibioticului);
- *în funcție de spectrul și de specificitatea substratului* pe care-l hidrolizează: penicilinaze (acționează asupra penicilinelor), cefalosporinaze (hidrolizează cefalosporinele), carbapenemaze (acționează asupra carbapenemelor), cefamicinaze (hidrolizează cefamicinele), betalactamaze cu spectru extins de acțiune (hidrolizează penicilinele și cefalosporinele) etc;
- *în funcție de localizarea plasmidică a genelor ce codifică rezistența* se clasifică în patru categorii:
 - a) beta-lactamaze cu spectru restrâns (îngust) – inactivează numai penicilinele și sunt responsabile de rezistența dobândită la penicilina G și A a tulpinilor de *S. aureus*;
 - b) beta-lactamaze cu spectru larg – inactivează penicilinele și cefalosporinele, cu excepția cefamicinei și cefalosporinelor de a III-a generație. Întrucât sunt responsabile de rezistența dobândită la penicilină și la enterobacterii, au fost numite penicilinaze. Un exemplu tipic este TEM-1, identificată la o tulpină de *E. coli*. Enzima SHV-1 este produsă de majoritatea tulpinilor de *K. pneumoniae*;
 - c) beta-lactamaze cu spectru extins (BLSE) – derivate prin mutații punctiforme din beta-lactamazele TEM-1 și SHV-1, inactivează, de asemenea, cefalosporinele de a III-a generație și aztreonamul;
 - d) beta-lactamaze rezistente la inhibitori (descoperite în 1990), precum acidul clavulanic. Secvențele de nucleotide ale acestor enzime sunt variante ale enzimelor TEM-1 și TEM-2. Au fost identificate la tulpinile de *E. coli* și sunt rezistente la asocierea amoxicilină/acid clavulanic.

Clasificarea structurală a beta-lactamazelor, propusă în 1980 de către Ambler, ulterior a fost considerată ca incompletă deoarece erau cunoscute doar patru secvențe de aminoacizi din molecula de beta-lactamaze. Clasificarea includea două grupe de enzime: clasa A, reprezentată de penicilinaza produsă de *S. aureus*, și metalo-beta-lactamaza de clasa B, produsă de *B. cereus* [227].

În prezent, clasificarea structurală a beta-lactamazelor bazată pe secvențele de nucleotide (după Ambler) ale genelor codificatoare cuprinde patru clase: A, B, C, D. Această clasificare este stabilă și reflectă raporturi fundamentale, ce nu pot fi modificate de mutații. Enzimele din clasele A, C și D au centru activ serinic, iar cele din clasa B cuprind beta-lactamazele cu molecule de Zn în centrul activ. β -lactamazele din clasele A și B sunt foarte active față de benzilpenicilină și, respectiv, față de peniciline și cefalosporine. Clasa C include, în general, enzime inductibile, dar mutațiile genelor codificatoare pot duce la supraexpresie. Enzimele clasei D sunt de tip OXA, deoarece hidrolizează oxacilina [15].

Cefalosporinazele (clasa C) au fost descrise de Jaurin și Grünstrom în 1981, iar oxacilinazele (D) au fost identificate la sfârșitul anilor 80 ai sec. al XX-lea [152].

Clasificarea funcțională (Bush-Jacoby-Medeiros), bazată pe fenotipurile de rezistență ale bacteriilor producătoare de beta-lactamaze, începe cu diferențierea cefalosporinazelor și penicilinazelor [60].

Acest principiu de clasificare a fost folosit de către Sawai și coaut. în 1968 [273]. Richmond și Sykes (1973), reieșind din profilul substratului, au clasificat beta-lactamazele bacteriilor gram-negative în cinci grupe [259].

Numărul mare de beta-lactamaze descrise a scos în vileag neajunsurile acestor clasificări. În 1989 a fost introdusă clasificarea funcțională propusă de Bush, care ține cont de substratul diferitor beta-lactamaze și sensibilitatea lor față de inhibitori. În baza acestor criterii, Jacoby și Bush (1989) au identificat patru grupe principale de beta-lactamaze:

- grupa 1: beta-lactamaze ce hidrolizează cefalosporinele, dar nu sunt inhibate de acidul clavulanic;
- grupa 2: beta-lactamaze ce hidrolizează cefalosporinele și sunt inhibate de acidul clavulanic;
- grupa 3: metaloenzime;
- grupa 4: penicilinazele ce nu sunt inhibate de acidul clavulanic.

Grupa 2 cuprinde câteva subgrupe:

- grupa 2a: penicilinaze;
- grupa 2b: beta-lactamaze ce hidrolizează cefalosporinele cu spectru larg (TEM-1);
- grupa 2c: beta-lactamaze ce hidrolizează carbenicilinele;
- grupa 2d: beta-lactamaze ce hidrolizează oxacilina.

În caz de mutații punctiforme, ce duc la schimbarea afinității față de substrat, utilizarea acestei clasificări este dificilă.

Clasificarea funcțională a beta-lactamazelor propusă de Bush și Jacoby a fost revăzută de mai multe ori. În 2010 a fost publicată ultima versiune, mult mai complexă decât cele anterioare, completată cu noi subgrupe de beta-lactamaze [60].

Metodele de detectare a mecanismelor de rezistență la antimicrobiene

În prezent, majoritatea studiilor și diagnosticul practic de laborator sunt axate pe bacilii gram-negativi producători de carbapenemaze, ca urmare a emergenței acestor patogeni la nivel global. Acuratețea și rapiditatea obținerii rezultatelor investigațiilor de laborator privind detectarea mecanismelor de antibioretistență și stabilirea antimicrobianului adecvat și eficient pentru tratament, în funcție de antibiogramă, asigură managementul eficient al maladiilor infecțioase [42,87, 91].

Teste de detectare a beta-lactamazelor și a carbapenemazelor

Detectarea spectrului divers de beta-lactamaze presupune utilizarea metodelor nonmoleculare (bazate pe identificarea manifestărilor fenotipice) și moleculare (axate pe tehnici de biologie moleculară) [196].

Pentru evaluarea eficacității metodelor fenotipice în detectarea beta-lactamazelor cu spectru extins (BLSE) și carbapenemazelor au fost efectuate numeroase studii [234, 343].

Producerea de carbapenemaze de către enterobacterii este testată, cel mai frecvent, pe tulpini de *K. pneumoniae* și *E. coli*, deoarece mecanismele respective sunt des înregistrate la aceste specii, care au și cea mai ridicată incidență în patologia infecțioasă nespecifică [80].

Majoritatea cercetătorilor susțin că metodele fenotipice nu pot fi utilizate pentru stabilirea tipului de BLSE, necesitând confirmare prin metode de biologie moleculară și anume detectarea genelor ce codifică enzima responsabilă de rezistența la antimicrobiene. Metodele de biologie moleculară asigură clasificarea tipurilor de beta-lactamaze și în prezent le suplinesc pe cele fenotipice [50].

Metodele fenotipice sunt utilizate în majoritatea laboratoarelor medicale, deoarece sunt ușor de reprodus, convenabile și ieftine. Aceste metode includ o diversitate mare de teste, cum ar fi: testele cromogene, antibiograma difuzimetrică calitativă, metoda diluțiilor în medii lichide, testele de sinergie antimicrobiană, antibiograma difuzimetrică cantitativă (E-test) și testarea prin sisteme automatizate [231, 342].

Progresele înregistrate în ultimii ani în domeniul biologiei moleculare au permis dezvoltarea unei game variate de teste de identificare a ADN-ului, utilizate în laboratoarele microbiologice, atât pentru confirmare, cât și pentru detectarea directă a microorganismelor patogene din probele biologice. Tehnicile de biologie moleculară permit a pune în evidență genele ce codifică prezența BLSE la bacterii, fiind utilizate pentru screeningul, și pentru confirmarea mecanismelor de rezistență la antimicrobiene.

În prezent sunt disponibile comercial numeroase teste PCR în format simplu sau multiplex care permit detectarea și distingerea genelor de rezistență la microorganismele cercetate [322].

Tehnica de secvențiere a nucleotidelor este considerată standardul de aur în determinarea prezenței genelor ce codifică rezistența la antimicrobiene într-o tulpină bacteriană. Secvențierea ADN-ului permite identificarea tipului și succesiunii nucleotidelor dintr-un fragment de ADN al tulpinilor cercetate pentru un anumit mecanism de rezistență. Secvențele obținute în urma amplificării sunt comparate cu secvențele din bazele de date, în scopul identificării unor noi markeri genetici ai rezistenței, utili în diagnosticul epidemiologic, și clasificării filogenetice a microorganismelor, care prezintă rezistență la antibiotice [7, 14].

1.3. Rezistența la antimicrobiene la nivel național

Problema maladiilor infecțioase cauzate de agenți microbieni multirezistenți la antimicrobiene și a complicațiilor acestora devine tot mai actuală în Republica Moldova, fiind o problemă specială de sănătate publică [35, 240, 241]. Practica a demonstrat că supravegherea rezistenței la antimicrobiene a microorganismelor implicate în etiologia maladiilor infecțioase este esențială pentru o terapie eficientă. Reeșind din această constatare, în republică, în 2018, a fost instituit sistemul național de supraveghere epidemiologică a rezistenței la antimicrobiene prin ordinul MSMPS nr.711 din 07.07.2018, care este în continuă fortificare. Acest sistem este constituit din Laboratorul Național de Referință din cadrul Agenției Naționale pentru Sănătate Publică (ANSP) (nivelul I), 10 laboratoare microbiologice din cadrul Centrelor de Sănătate Publică regionale ale ANSP și cinci laboratoare microbiologice din spitalele republicane și municipale (nivel II).

Din 2018, Republica Moldova este parte componentă a rețelei CAESAR (*eng. Central Asian and European Surveillance of Antimicrobial Resistance*), iar din 2021 raportează date privind RAM și în GLASS (*eng. Global Antimicrobial Resistance Surveillance System*). În cadrul acestor rețele internaționale se monitorizează rezistența agenților microbieni, izolați din biosubstraturi umane.

Rapoartele naționale recente privind testarea sensibilității la antimicrobiene a tulpinilor izolate din diverse biosubstraturi relevă indici majorați de rezistență. Astfel, reprezentanții familiei *Enterobacteriaceae* în 33,9% din cazuri manifestă rezistență crescută față de beta-lactamine (peniciline, cefalosporine și carbapeneme), utilizate pe larg în practica medicală. Circa 48,7% din enterobacterii au prezentat rezistență la toate preparatele testate din grupul penicinelor: *K. pneumoniae* – 66,4%, *E. coli* – 45,0%, *Proteus spp.* – 43,7%, *Shigella flexneri* – 35,8%, *Salmonella spp.* – 15,1%. *K. pneumoniae* a manifestat cea mai mare rată de rezistență

antimicrobiană la: peniciline – 66,4%, cefalosporine – 45,5%, fluorchinolone – 40,9%, aminoglicozide și alte preparate antimicrobiene – 28,0%.

În 36,3% din cazuri, enterobacteriile au prezentat rezistență la preparatele antimicrobiene din grupul cefalosporinelor. Majoritatea tulpinilor testate s-au dovedit a fi rezistente la cefalosporinele de a IV-a (42%) generație, urmată de cefalosporinele de a II-a (38,8%) generație și a III-a (30,4%).

Rezistență mai accentuată la acest grup de antimicrobiene au prezentat tulpinile de *K. pneumoniae* – 45,4%. Peste 50% din tulpinile de *K. pneumoniae* s-au dovedit a fi multirezistente, exercitând rezistență sporită la peniciline, cefalosporine și la cel puțin un preparat din restul grupurilor de antimicrobiene testate.

La cefalosporinele de a IV-a generație, cea mai mare rezistență a fost înregistrată pentru *E. coli* (53%), urmată de *K. pneumoniae* (50,9%) și *Proteus spp.* (50,5%). Tulpinile de *K. pneumoniae* au înregistrat niveluri înalte de rezistență și la cefalosporinele de a II-a generație (47,9%) și de I-a (46,7%).

Enterobacteriile au prezentat niveluri relativ majorate de rezistență la carbapeneme (14,8%), aminoglicozide (20,7%) și fluorchinolone (24,6%).

Indici îngrijorători de rezistență la antimicrobiene s-au înregistrat la tulpinile de *Pseudomonas aeruginosa* și *Acinetobacter baumannii*, majoritatea dovedind rezistență la cel puțin un preparat din trei sau la mai multe grupuri de antimicrobiene [250].

Specia *P. aeruginosa* a manifestat rezistență sporită la preparatele din grupul cefalosporinelor – 62,1%, penicilinelor – 53,9% și fluorchinolonelor – 54,1%, iar *A. baumannii* la fluorchinolone – 76,5%.

Rezultatele testării sensibilității la antimicrobiene a cocilor gram-pozitivi indică la prezența tulpinilor multirezistente. Dintre tulpinile de *S. aureus* circulante pe teritoriul republicii, 32,9% au înregistrat rezistență la meticilină, 57,7% la macrolide, 25,8% la betalactamine și câte 25,0% la tetraciline și la glicopeptide.

Conform datelor testării sensibilității la antimicrobiene, *Enterococcus faecium* manifestă rezistență marcată în special la aminoglicozide (90,0%) și beta-lactamine (47,1%), iar *Enterococcus faecalis* la aminoglicozide (49,3%) și glicopeptide (35,9%).

Determinarea tipului și mecanismelor de antibioretistență la tulpinile clinice contribuie la stabilirea arealului de răspândire a acestora pe teritoriul țării noastre, la optimizarea schemelor terapeutice și la completarea bazei de date la nivel național, iar în perspectivă și european.

Datele colectate în cadrul sistemului național asigură autoritățile centrale responsabile cu informații fiabile pentru elaborarea strategiilor, planurilor naționale în domeniul prevenirii și

controlul infecțiilor cauzate de microorganisme rezistente la antimicrobiene, argumentarea deciziilor și intervențiilor în domeniul utilizării și consumului de antimicrobiene.

1.4. Perspective și noi alternative terapeutice în tratamentul infecțiilor cauzate de microorganisme multirezistente

Terapia antimicrobiană a maladiilor infecțioase este o problemă de sănătate publică stringentă, ca urmare a evoluției alarmante a rezistenței microorganismelor la antimicrobienele disponibile și a descreșterii numărului de noi preparate antimicrobiene. Evoluția RAM a devenit o provocare stringentă de sănătate publică. Conform unui sondaj realizat de OMS, mai mult de 80% din populația globală utilizează antimicrobiene în terapia diferitor maladii. Folosirea abuzivă și nejustificată a antimicrobienei a dus la apariția și la evoluția microorganismelor rezistente la multiple antimicrobiene și a accentuat importanța dezvoltării de noi alternative terapeutice [76, 329].

Cercetarea și dezvoltarea noilor compuși antimicrobieni sunt indispensabili în soluționarea provocărilor cu referire la patogenii rezistenți de comun cu măsurile eficiente de prevenire și control a infecțiilor cauzate [22].

Un șir de centre științifice și de companii farmaceutice sunt implicate în elaborarea și în implementarea de noi medicamente cu efect antimicrobian. La dispoziția lor sunt numeroși compuși cu potențial efect antimicrobian, inclusiv de origine microbiană [286].

În 2017, OMS a publicat lista de „prioritate a agenților patogeni” rezistenți la antimicrobiene ce prezintă un pericol major pentru sănătatea publică. Scopul elaborării acestui document a fost de a ghida și de a promova cercetarea în direcția dezvoltării de noi preparate antimicrobiene. Această listă este categorisită în trei grupuri, în funcție de urgența necesității de antimicrobiene de prioritate: critică, mare și medie [328].

Grupul critic include microorganisme rezistente la mai multe antimicrobiene și care prezintă o amenințare majoră, în special, în instituțiile medicale (*Acinetobacter* spp., *Pseudomonas* spp. și specii din familia *Enterobacteriaceae*). Acest grup poate cauza infecții severe, soldate frecvent cu deces, precum infecțiile fluxului sangvin și pneumoniile. Microorganismele menționate prezintă rezistență la un număr mare de antimicrobiene, inclusiv carbapeneme și cefalosporine de a III-a generație, utilizate în tratamentul infecțiilor provocate de microorganisme multirezistente.

Al doilea și al treilea grup, de prioritate mare și medie, microorganisme responsabile pentru dezvoltarea mai multor maladii infecțioase (Figura 2).

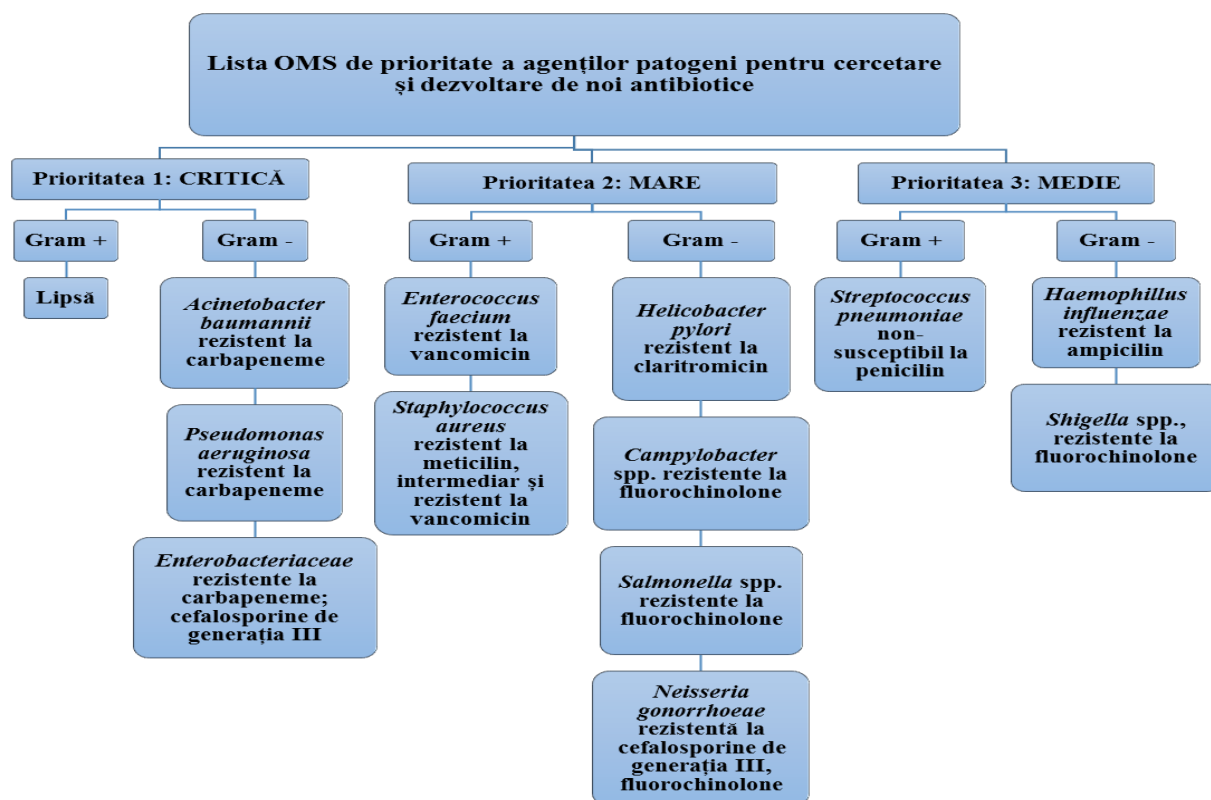


Figura 2. Lista de „prioritate a agenților patogeni” rezistenți la antimicrobiene [328].

Microorganismele incluse în această listă au fost selectate în baza mai multor criterii: gravitatea infecțiilor pe care le cauzează, necesitatea spitalizării de lungă durată, frecvența eșecurilor terapiei antimicrobiene în infecțiile comunitare, gradul de răspândire în mediu, disponibilitatea măsurilor specifice și nespecifice de prevenire și existența opțiunilor de tratament.

Lista OMS de prioritate a agenților patogeni rezistenți la antimicrobiene a fost întocmită pentru a impulsiona guvernele să pună în aplicare politici, ce vor stimula cercetarea fundamentală și dezvoltarea de preparate antimicrobiene noi, să ghideze realizarea acestor politici.

Conform datelor din literatura de specialitate, în ultimii 30 de ani nu s-a descoperit niciun preparat antimicrobian. Cauzele sunt mai multe: costuri majorate pentru elaborare și punerea pe piață; durata relativ mică a patentului; durata scurtă a tratamentului antimicrobian comparativ cu preparatele folosite în terapia bolilor cronice, ceea ce determină un profit mic pentru companiile farmaceutice; includerea preparatelor elaborate în lista de rezervă din cauza costului majorat și pentru prevenirea dezvoltării rezistenței (Figura 3) [68, 72, 198].

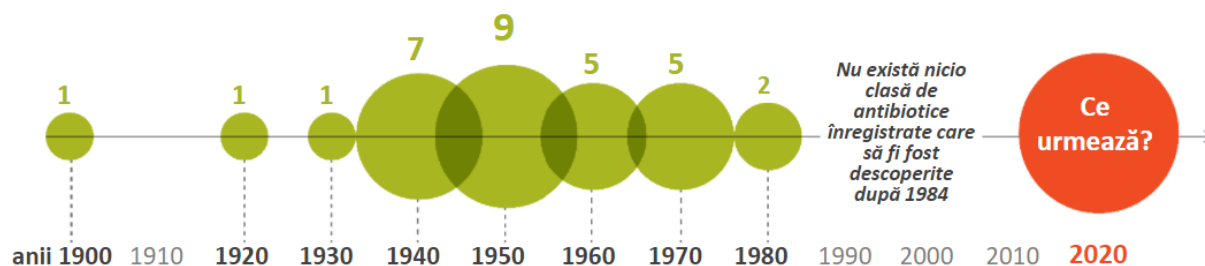


Figura 3. **Numărul claselor de antimicrobiene descoperite sau brevetate** [73].

În literatura de specialitate sunt prezentate două direcții în elaborarea antimicrobienele noi: cercetarea și elaborarea unor grupuri noi de antimicrobiene și dezvoltarea de preparate cu proprietăți noi din grupurile de antimicrobiene existente. Prima direcție presupune realizarea unui screening general sau țintit al compușilor noi sintetizați sau naturali, iar a doua ține de obținerea unor antimicrobiene noi din grupurile existente. Astfel, comunitatea științifică internațională depune un efort imens pentru a dezvolta noi antimicrobiene sau de a le perfecționa pe cele existente [68, 315].

Compuși biologici cu acțiune antimicrobiană

Utilizarea compușilor biologici cu potențial antimicrobian în terapia bolilor infecțioase a devenit o necesitate și o alternativă eficientă, cu efecte toxice minime [25, 97].

Potențialul antimicrobian al produselor biologice din plante împotriva bacteriilor multirezistente, implicate în patologia infecțioasă, inclusiv în ulcerele trofice infectate, a atras atenția mai multor cercetători [197, 278].

Cercetările recente au arătat că cea mai eficientă metodă în dezvoltarea antimicrobienele cu efecte toxice sau secundare minime este utilizarea produselor naturale [195].

Întrucât structura chimică a compușilor naturali cu potențial antimicrobian este foarte diversă, activitatea antimicrobiană a acestora se bazează pe multiple mecanisme cum ar fi: implicarea în căile metabolice ale microorganismelor prin inhibarea unor enzime, ceea ce duce la diminuarea virulenței; mărirea permeabilității membranei bacteriene, cu pierderea conținutului celular și a electroliților; inhibarea sintezei de metaboliți esențiali; stimularea activității fagocitare și a celulelor imunocompetente etc. [40, 263].

Mai mulți cercetători, studiind în special biofilmul, au demonstrat existența compușilor naturali capabili să prevină formarea acestora prin blocarea procesului de semnalizare intercelulară (*quorum sensing*) și, ca rezultat, reducerea riscului de dezvoltare a rezistenței [190, 208].

Plantele sunt o sursă valoroasă de compuși naturali cu acțiune antimicrobiană. Până în prezent au fost descriși peste 50.000 de astfel de compuși și numărul lor crește cu câteva mii pe an. În funcție de structura chimică, poziția sistematică, căile de biosinteză sau proprietățile biologice, acești compuși au fost grupați în câteva clase majore. Una dintre cele mai utilizate scheme de clasificare este bazată pe structura chimică a compușilor naturali, iar principalele grupuri sunt reprezentate de alcaloizi, flavonoizi, fenoli, chinone, terpenoide, saponine, poliacetilene, etc. Pentru stabilirea efectului antimicrobian, produsele bioactive din plante trebuie supuse unor testări *in vitro* și *in vivo* [256, 292].

Cercetările comprehensive din ultimii ani au demonstrat posibilitatea obținerii de preparate noi cu efect antimicrobian din biomasa vegetală, cu efecte adverse minime asupra macroorganismului și eficiență terapeutică înaltă [118, 158].

Reieșind din faptul că preparatele de origine vegetală, inclusiv cele cu efect antimicrobian, sunt utilizate tot mai frecvent, o prioritate de cercetare a devenit elucidarea mecanismelor de interacțiune între ele și cu alte preparate medicamentoase [253].

Cianobacteriile, procariote fotosintetizatoare, polimorfologice ce se adaptează ușor la diferite condiții de mediu și dispun de mecanisme eficiente de protecție, au fost identificate de mai mulți cercetători ca surse importante de compuși biologici activi cu valoare chimică și farmacologică [181]. Acțiune antimicrobiană posedă nu numai substanțele pure, izolate din biomasa de cianobacterii, ci și extractele. Acțiunea antimicrobiană a extractelor se manifestă atât asupra microorganismelor gram-pozitive (*S. aureus*) și gram-negative (*E. coli*, *K. pneumoniae*), cât și a micetelor levuriforme (*C. albicans*). Unele extracte lipidice de cianobacterii s-au dovedit a fi active față de microorganismele, implicate în infecțiile asociate asistenței medicale. O activitate antimicrobiană mai accentuată au manifestat extractele în metanol și în acetonă [1, 58, 153, 183, 186, 265].

Arthospira platensis (numită și *Spirulina platensis*), una dintre cianobacteriile cele mai cunoscute și produsă la scară industrială, a atras atenția cercetătorilor ca compus natural cu particularități terapeutice și potențial efect antimicrobian (antibacterian, antifungic și antiviral) [13, 332].

În timpul investigării *Arthospira platensis* ca sursă de proteine, de vitamine (vitamina B12 și provitamina A) și de acizi grași esențiali, cum ar fi acidul γ -linolenic, au fost obținuți compuși biologici activi, cu activitate antimicrobiană asupra unor specii de microorganisme [157].

În prezent sunt studiate efectele terapeutice ale *A. platensis*, precum, reducerea colesterolului și nefrotoxicității, induse de metalele grele, efectele antitumoral, antidiabetic, antiinflamator și imunomodulator [99, 212, 261, 334, 335].

Experimental a fost demonstrată eficiența extractelor de spirulină asupra microorganismelor cu rezistență multiplă la antimicrobiene. Activitatea antimicrobiană a acestora se datorează prezenței în compoziția lor a carbohidraților, a compușilor fenolici, a flavonoizilor și a taninelor [1, 264].

Fiind lipsită de toxicitate, spirulina este întrebuințată pe larg în consumul uman și animal, iar în viitor va fi utilizată și în calitate de materie primă pentru dezvoltarea preparatelor antimicrobiene noi, fără efecte adverse [186]. Cu acest scop sunt studiate pe larg efectele biologice ale spirulinei și ale derivaților săi. Siguranța utilizării preparatelor pe bază de spirulină în medicină a fost confirmată într-un șir de publicații [9, 61, 114, 172, 178].

Cercetătorii moldoveni au obținut biomasă de spirulină cu un conținut sporit de substanțe bioactive: proteine, peptide, aminoacizi, glucide, lipide și microelemente legate cu compuși organici [43, 55, 56, 84]. Peptidele sunt compuși bazici cu efect antimicrobian împotriva microorganismelor implicate în dezvoltarea infecțiilor persistente. Astfel, sinergismul peptidelor antimicrobiene cu antibioticele convenționale, cât și activitatea antibiofilm sunt studiate pe larg [177].

Activitatea antioxidantă a spirulinei, asociată cu efectele antiinflamatoare, a fost demonstrată de mai mulți cercetători [44, 203].

Dintre antioxidanți, în componența spirulinei au fost identificați carotenoizii, ficobiliproteinele, acizii grași nesaturați, tocoferolul, enzimele, polifenolii, mixoxantofilele, etc. [47, 191].

La utilizarea spirulinei, în țesuturile hepatic, renal și cerebral a scăzut factorul de necroză tumorală (TNF- α) și s-au îmbunătățit markerii de stres oxidativ: dialdehida malonică, oxidul nitric, superoxid dismutaza, catalaza, glutatiónul redus și glutatión peroxidaza [18, 67, 192].

Pe modelul artritei induse la șobolani au fost demonstrate efectele antioxidante, imunomodulatoare și anti-angiogenice ale extractelor din spirulina: creșterea nivelului seric al glutadionului redus, scăderea concentrațiilor plasmatică ale ciclooxigenazei², TNF- α , IL-6 și dialdehidei malonice [226].

Extractele de spirulină reprimă expresia și secreția citokinelor proinflamatoare (TNF- α , IL-1 β și IL-6) prin inhibarea căii NF-kB [160, 192].

Spirulina conține și o componentă volatilă, numită heptadecan, care are proprietatea de a suprima expresia genelor proinflamatoare prin reducerea activității NF-kB [225].

Unele specii de spirulină conțin și polizaharide care pot induce calea NF-kB, în special cele cu greutatea moleculară mare, demonstrând activitate imunostimulatoare și accentuarea expresiei IL-1 β și TNF- α prin inducerea NF-kB [99].

Polizaharidele sulfatate din spirulină inhibă activ producerea de IL-6 și de TNF- α , majorând semnificativ producția de IL-10 și de citokină anti-inflamatoare [52, 192]. Experimental s-a demonstrat că consumul de spirulină sporește activitatea macrofagelor și poate influența reacția sistemului imun, reducând inflamația, fără a inhiba imunitatea înăscută [63].

La utilizarea în calitate de supliment alimentar, spirulina are efecte benefice și asupra profilului lipidic, glucidic, sistemului imunitar și capacității antioxidante [316].

Polizaharidele din *Spirullina* spp. reprezintă compuși naturali cu acțiuni anticoagulante, antilipidice, antimicrobiene, imunomodulatoare, antitumorale, antiinflamatoare și antioxidante, ceea ce le face relevante și aplicabile în calitate de produse biologice active și biomateriale. Aplicabilitatea acestora în diferite domenii, inclusiv pentru terapia plăgilor și în medicina regenerativă, nu prezintă îndoeli [29, 177, 193].

Conform datelor din literatura de specialitate, compușii naturali cu potențial antimicrobian sunt studiați pe larg de cercetătorii din diferite țări, datorită activității farmacologice accentuate, toxicității și costurilor reduse, comparativ cu antimicrobienele sintetice. Cercetările au arătat că plantele au un conținut bogat și variat de metaboliți secundari bioactivi precum taninuri, alcaloizi, saponine, flavonoide și compuși fenolici cu un potențial efect fiziologic asupra organismului uman [21, 113, 213, 252, 277].

Compuși de sinteză cu potențial antimicrobian

În ultimii ani, numărul lucrărilor consacrate cercetării compușilor coordinativi a creșterii semnificativ, ceea ce denotă interesul sporit al cercetătorilor pentru acești compuși chimici. Principalele avantaje ale acestor compuși sunt omogenitatea, stabilitatea, posibilitatea dozării exacte, facilitatea în aprecierea proceselor de metabolizare, precum și respectarea strictă a operațiunilor tehnologice. În majoritatea studiilor este menționată posibilitatea de a dirija cu proprietățile și cu efectele biologice ale acestor compuși.

Gulea A. și coaut. au sintetizat și studiat un șir de compuși chimici cu proprietăți antimicrobiene [57, 127-129, 132].

Compuși coordinativi ai unor metale tranziționale cu liganzi

Chimia coordinativă rămâne una dintre cele mai importante și de actualitate compartimente ale chimiei anorganice. Un interes deosebit prezintă sinteza și studierea proprietăților fizico-chimice ale compușilor coordinativi ai metalelor de tranziție cu liganzi organici. Liganzii, posedând o tendință sporită de coordinare, formează compuși cu compoziție, cu structură și cu proprietăți diferite. Datorită activității biologice valoroase, acești compuși sunt utilizați în practica medicală. Printre acestea se numără și tiosemicarbazonile heterociclice cu proprietăți antibacteriene, antifungice, antimalarice și antivirale [17, 131, 134].

În prezent, datorită numeroaselor cercetări și transferului tehnologic, compușii coordinativi și-au găsit aplicabilitatea în diverse domenii, inclusiv în industria biofarmaceutică și în medicină. Aceasta a permis evidențierea potențialului antimicrobian, antifungic și antiviral a acestor compuși și utilizarea lor în calitate de preparate medicamentoase. Studii recente au arătat că compușii coordinativi ai Cu(II) manifestă activitate antibacteriană față de *S. aureus*, *S. saprophyticus*, *Streptococcus* spp., *E. faecalis*, *E. coli*, *Salmonella* spp., *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *Proteus* spp. și *B. cereus*. Compușii menționați exercită acțiune antibacteriană și antifungică la concentrații semnificativ mai mici, comparativ cu preparatele antiseptice existente. Față de tulpinile de *Staphylococcus* spp. și *Streptococcus* spp. acești compuși s-au dovedit a fi de 2-260 ori mai activi decât furacilina [131, 133, 266].

În unele studii recente este menționată activitatea antifungică mai pronunțată a compușilor coordinativi, comparativ cu preparatul antifungic de referință nistatina. Autorii acestor studii au mai demonstrat că acești compuși manifestă o toxicitate redusă, estimată la 1,42-4,25 mg/kg (DL50), de 8,6–25,5 ori mai mică comparativ cu cea a furacilinei (DL50=166,7 mg/kg) [218].

Cercetările au arătat că unii compuși coordinativi ai Ni(II) și Zn(II) pot manifesta și acțiune antiparazitară, după o expunere de 48 ore [222].

În ultimii ani, cercetătorii și inovatorii autohtoni au sintetizat un șir de compuși coordinativi ai cuprului, cobaltului, nichelului și fierului cu diferite amine și sulfanilamide, activi împotriva microorganismelor gram-pozitive și micetelor [57, 129]. Conform datelor obținute activitatea antimicrobiană a compușilor sintetizați este influențată de natura atomului central, aminei, tiosemicarbazonei, sulfanilamidei și a restului acid. S-a constatat că acești compuși manifestă și activitate antioxidantă, de 1,6-9 ori mai înaltă decât a troloxului, preparat utilizat în calitate de etalon la testarea compușilor de origine biologică și sintetică [34, 135, 136].

Cercetările din domeniul chimiei bioanorganice au demonstrat că unele metale sunt parte componentă a enzimelor și a cofactorilor, necesari pentru realizarea funcțiilor biologice. Astfel, hemoglobina din eritrocite conține în structura complexului porfirinic atomul de fier, utilizat pentru transportul și depozitarea oxigenului în organism [235]. Metalele cupru, zinc, fier și mangan, parte componentă a metaloenzimelor, facilitează diverse reacții chimice, indispensabile pentru viață. O altă grupă importantă de metale este reprezentată de complecșii metalelor de tranziție care, în ultimul timp, și-au găsit aplicabilitate în domeniul științelor biologice [174].

Studii autohtone și internaționale, axate pe studierea și pe sinteza compușilor coordinativi cu potențial efect antimicrobian, au arătat că activitatea farmacologică a compușilor metalici este influențată de ionul de metal, de liganzi și de structura integrală a acestora. Factorii menționați sunt responsabili ca complecșii metalici să atingă ținta din organism. Conform unor studii,

anumiți ioni metalici penetrează celulele microbiene și inactivează arsenalul enzimatic al acestora. Alte studii relatează că ionii metalici pot activa formarea peroxizilor, cauzând moartea celulelor microbiene. Datele obținute de mai mulți cercetători indică la faptul că complexii metalici cu potențial antimicrobian trebuie sintetizați în baza anumitor cerințe cu referire la designul lor. Prin urmare, complexul metalic, ce posedă activitate antimicrobiană, necesită stabilitate termodinamică înaltă pentru a atinge site-ul activ. Așadar, legătura dintre metal și ligand trebuie să fie hidrolitic stabilă.

Nu mai puțin importante sunt cinetica reacțiilor de formare și de rupere a legăturii dintre metal și ligand, precum și greutatea moleculară a complexului metalic. S-a constatat că compușii cu greutate moleculară mică, sarcină neutră și hidrosolubili pot pătrunde mai ușor în diverse medii prin difuzie pasivă [104, 130, 287].

În ultimile decenii, elaborarea preparatelor antimicrobiene noi s-a bazat pe combinarea antimicrobienele tradiționale cu diverși compuși coordinativi. Rezultatele remarcabile ale acestor studii au fost confirmate prin: intensificarea activității și lărgirea spectrului de acțiune la folosirea atât a compușilor cu activitate sinergică, cât și cumulativă; prevenirea rezistenței la antimicrobiene; micșorarea dozei de tratament; reducerea costurilor și efectelor secundare toxice [69].

Unii cercetători susțin că eficacitatea diverselor preparate medicamentoase poate fi majorată prin combinarea lor cu ioni metalici [251]. Astfel, conform rezultatelor studiilor din țară, activitatea farmacologică a complexilor metalici s-a dovedit a fi dependentă de natura ionilor metalici și a liganzilor, deoarece proprietățile biologice ale acestora diferă. Prin studii similare a fost stabilit că acțiunea antimicrobiană a complexilor metalici depinde predominant de centrul metalic [216, 219, 312].

Studiile privind elaborarea de noi compuși antimicrobieni, cu mecanisme de acțiune eficiente împotriva germenilor multirezistenți la antimicrobiene, sunt foarte actuale și indispensabile în contextul evoluției alarmante a fenomenului de RAM. În această ordine de idei, compușii coordinativi tot mai mult sunt cercetați ca potențiali agenți antimicrobieni. Multiple studii *in vivo* au demonstrat că acțiunea bacteriostatică și bactericidă a compușilor biologic activi poate fi accentuată vădit la chelatizarea lor.

În cazul compușilor coordinativi ai Mn(II), Co(II), Ni(II) și Cu(II) cu glicina și cu fenilalanina a fost observată o potențiere a efectului antimicrobian la mărirea numărului inelelor de chelare urmare a amplificării proprietăților lipofilice ale compușilor [175, 211, 220, 318, 338].

În calitate de agenți antimicrobieni pot fi folosite și unele metale, precum cuprul, zincul, nichelul și cobaltul, în complex cu aminoacizii, grație activității antimicrobiene pronunțate a acestora [49].

Rezultatele cercetărilor au arătat că nivelul de activitate al compușilor coordinativi este mult mai pronunțat decât al liganzilor, utilizați actualmente în calitate de agenți antimicrobieni [217].

Complecșii metalici de tranziție cu baze Schiff sunt în centrul atenției cercetătorilor, în special în ultimele două decenii, datorită proprietăților antibacteriene, antifungice, antitumorale și antivirale [138, 219].

Ionul de cupru este biologic activ și participă în multe procese din organism, grație capacității înalte de chelare și potențialului redox Cu^{2+} pozitiv. Conform datelor din literatura de specialitate, complecșii cuprului prezintă activitate antibacteriană, antivirală, antitumorală și antiinflamatoare evidentă. În contextul dat, dovezile științifice argumentează activitatea biologică înaltă a noilor compuși complecși, sintetizați cu utilizarea cuprului și a diferitor tipuri de baze Schiff. Astfel, la studierea *in vitro*, majoritatea acestor compuși au demonstrat o activitate antimicrobiană mai vădită, decât ligandul separat [51, 174].

Compușii cuprului cu tiosemicarbazone s-au dovedit a fi activi față de mai multe specii microbiene, inclusiv *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *K. pneumoniae*, *S. saprophyticus*, *S. faecalis*. Printre compușii coordinativi ai cuprului cu tiosemicarbazonele au fost identificați reprezentanți foarte activi împotriva microorganismelor implicate în patologia umană [134, 217].

Evaluarea modificărilor ciclului glutationic și ale indicilor metabolismului tiol-disulfidic în patologia hepatică experimentală, determinată de acțiunea unor compuși biologic activi autohtoni, a argumentat eficiența utilizării acestora în terapia maladiilor hepatice. Unele combinații ale bazelor Schiff noi cu metale 3d determină modificări ale conținutului de glutation total, redus și oxidat, dar nu influențează asupra activității enzimelor glutationice, pe când altele modulează preponderent activitatea enzimatică [18].

Compuși combinați cu efect antimicrobian

Elaborarea preparatelor combinate este un proces complex (necesită diverse cercetări chimice, tehnologice, farmacocinetice, analitice, etc), iar implementarea terapiei cu aceste preparate presupune substituirea mai multor preparate monocomponente cu unul, care le conține pe toate. Astfel, un preparat combinat este un amestec din mai multe substanțe active într-o singură formă, fabricat și distribuit în doze fixe [305].

În tratamentul maladiilor infecțioase, savanții s-au axat pe dezvoltarea unor noi alternative terapeutice. Una dintre aceste alternative este dezvoltarea preparatelor antimicrobiene combinate. Unii cercetători sunt de părere că pentru obținerea de rezultate reproductibile este

important de a defini așa parametri ca: materia primă, identificarea compusului biologic, tehnicile pentru obținere și concentrația substanței active. Într-un șir a fost înregistrată o activitate sinergică semnificativă a compușilor combinați împotriva tulpinilor de microorganisme multirezistente [340].

Cercetările din ultimii ani nu numai că au pus în evidență o nouă alternativă în combaterea microorganismelor multirezistente, dar au argumentat și posibilitatea restabilirii efectului antimicrobian al unor antimicrobiene, categorisite ca ineficiente. Rezultate promițătoare au fost înregistrate și la asocierea compușilor naturali cu acțiune antimicrobiană cu antimicrobiene sintetice. Utilizarea în combinație a compușilor cu acțiune antimicrobiană naturali și sintetici în tratamentul maladiilor infecțioase potențează spectrul antimicrobian, reduce toxicitatea unor antimicrobiene și previne dezvoltarea rezistenței la antimicrobiene [162, 165, 269].

Terapia combinată este utilizată mai frecvent în tratamentul empiric al pacienților cu infecții cauzate de microorganisme multirezistente de la terapie intensivă. Această strategie de tratament este recomandată în special când nu sunt disponibile rezultatele antibiogrammei și există riscul ca agenții cauzali să fie rezistenți la preparatul antimicrobian indicat în monoterapie. Totodată, alte studii au relatat că în cazul combinării compușilor cu potențial antimicrobian diferit, unele antimicrobiene intensifică efectul bactericid al altora [39, 173, 185, 309].

Utilizarea terapiei combinate în patologia infecțioasă permite nu numai inhibiția sau distrugerea directă a agenților microbieni, dar și potențează activitatea sistemului imun al organismului și mecanismele de regenerare [100, 137].

Terapia combinată este mai eficientă în infecțiile polimicrobiene, comparativ cu monoterapia. Remediile antimicrobiene de origine naturală, utilizate în combinație cu preparatele sintetice, au manifestat un șir de interacțiuni eficiente: amplificarea sinergică a potențialului antimicrobian și reducerea efectelor adverse ale preparatelor sintetice. Aceste efecte sinergice ale preparatelor combinate reduc eșecurile terapeutice, sporesc eficacitatea și micșorează perioada de spitalizare [33, 280, 285].

Avantajul utilizării preparatelor combinate rezidă și în cost-eficiența și inofensivitatea acestora [337].

Datele din literatura de specialitate demonstrează eficacitatea aplicării combinațiilor de antibiotice în tratamentul infecțiilor cauzate de microorganisme multirezistente. Totodată, un preparat din combinație poate neutraliza sau diminua mecanismele de rezistență, restabilind eficacitatea celuilalt preparat. Un exemplu elocvent este combinația acidului clavulanic cu antibiotice β -lactamice [19, 228, 260].

Sinergismul preparatelor de origine naturală combinate cu antimicrobiene, împotriva cărora microorganismele frecvent dezvoltă rezistență, a fost abordat de mai mulți cercetători. Unii au observat că extractele din frunzele de *Berberis aetnensis* scad semnificativ concentrația minimă inhibitoare a ciprofloxacinei, restabilind eficacitatea acesteia în terapia infecțiilor cu *S. aureus*, cu *E. coli* și cu *P. aeruginosa*. Într-un alt studiu a fost dovedită sporirea semnificativă a activității antimicrobiene, împotriva tulpinilor de *P. aeruginosa* multirezistente la combinarea antibioticelor cu extracte de cuișoare, de jambolan, de rodie și de cimbru. La utilizarea combinațiilor cuișoare-ampicilină și cuișoare-tetraciclină a fost observată sporirea activității antimicrobiene împotriva tulpinilor de *K. pneumoniae* și de *Proteus* spp. [180, 202, 285].

Rezultatele studiilor sinergismului antimicrobian au demonstrat necesitatea elaborării de noi preparate combinate și perspectiva utilizării acestui principiu în restabilirea eficacității antibioticelor ineficiente.

1.5. Ulcerul trofic: clasificare și considerații etiopatogenetice

Termenul „trofic” derivă din cuvântul grecesc *trophe* - nutriție. Ulcerul trofic este definit ca „ulcer generat de tulburările de nutriție ale unei părți a corpului” [207]. O altă definiție acceptată ar fi „ulcer de decubit dezvoltat în urma unei traume externe a unei părți a corpului, a insuficienței vasculare sau a pierderii de fibre nervoase aferente” [243].

Ulcerul trofic de la nivelul membrelor inferioare este o problemă pentru sistemul de sănătate, deoarece resursele financiare și umane ale managementului pacienților cu această patologie sunt semnificative. Mai mult de atât, consecințele psiho-sociale ale patologiei date afectează calitatea vieții pacienților [41, 210].

Datele distribuției pe vârste a ulcerelor trofice din ultimii ani denotă creșterea incidenței acestei patologii cu înaintarea în vârstă [145, 201].

La analiza repartizării după gen a ulcerului trofic s-a constatat că această patologie afectează în aceeași proporție bărbații și femeile [246].

Dezvoltarea ulcerului trofic implică o multitudine de factori, iar managementul clinic al cazului necesită o abordare interdisciplinară a evaluării sistematice a individului, cu antrenarea specialiștilor din domeniul sănătății în scopul determinării patogenezei, stabilirii cu acuratețe a diagnosticului și a tratamentului adecvat [36, 96].

Elucidarea aspectelor etiopatogenetice, cu categorisirea și determinarea tipului de ulcer trofic, precum și stabilirea unui diagnostic corect sunt elemente esențiale pentru indicarea unui tratament adecvat, ce va facilita vindecarea și va evita eșecul terapeutic [268].

Experții internaționali au sugerat utilizarea unui sistem complex de clasificare a ulcerului trofic, pentru a permite uniformizarea și standardizarea diagnosticului, compararea grupurilor de

pacienți și monitorizarea eficienței tratamentului. Una dintre clasificările ulcerelor trofice, utilizate în prezent în practica medicală, este prezentată în tabelul 3 [243].

Tabelul 3. **Clasificarea ulcerelor trofice** [243]

Tipul ulcerului trofic	Maladii în care se dezvoltă
Neurogen	Lepră, siringomielielie, ulcer de decubit în paraplegii, neuropatie diabetică, polineuropatie alcoolică, spina bifida etc.
Vascular (arterial)	Boli vasculare periferice, ateroscleroză, microangiopatie diabetică
Vascular (venos)	Ulcere de stază venoasă
Sistemic cauzat de malnutriție	Deficiențe de vitamina B12, avitaminoze severe, ulcere în gută

Ulcerul trofic neurogen

Acest tip include toate ulcerile membrelor, atât superioare, cât și inferioare, întâlnite la pacienții cu neuropatii precum lepra (sau boala Hansen), siringomielia, spina bifida, neuropatia diabetică, polinevrite de diferită etiologie etc. [139, 144].

Conform datelor din literatura de specialitate, aproximativ 15% din persoanele cu diabet zaharat vor dezvolta în timp ulcere trofice neurogene. La elucidarea patogenezei acestor ulcere au fost evidențiați mai mulți factori ce țin de bolile vasculare periferice, de neuropatia periferică, de traume repetate etc. Ulcerele trofice neurogene, frecvent înregistrate la persoanele cu diabet, pot fi observate și în cazul unor afecțiuni care duc la polineuropatie (ex. intoxicații cu arsen) sau neuropatie locală (ex. herpes zoster, lepra) [215, 324].

Printre particularitățile ulcerelor neurogene se numără deficiențe în tratament, frecvența recidivelor cu morbiditate înaltă și consecințe severe precum pierderea funcției membrului și, deseori, amputarea lui [108, 151, 319].

Ulcerul trofic vascular (arterial)

Ulcerele ischemice (sau arteriale) se dezvoltă, în special, la reducerea debitului sangvin din arterele membrelor, cauzat de ateroscleroză progresivă (boală vasculară periferică) sau de embolizare arterială [126].

În conformitate cu studiile analizate, în cazul bolii arteriale severe, ulcerile de gambă se dezvoltă în 5% din cazuri [320].

Printre particularitățile ulcerelor ischemice, elucidate în majoritatea studiilor, se numără cronicizarea și prezența durerii accentuate. Incidența ulcerelor ischemice crește odată cu înaintarea în vârstă, persoanele în etate prezentând un risc crescut pentru dezvoltarea ulcerelor de etiologie mixtă. Printre factorii de risc, mai frecvent implicați în dezvoltarea acestui tip de ulcere, sunt evidențiați obezitatea, diabetul zaharat, poliartrita reumatoidă, fumatul, hiperlipidemia, bolile coronariene și hipertensiunea arterială [86].

O altă cauză a dezvoltării ulcerului trofic vascular este boala arterială periferică. În această patologie, plăcile aterosclerotice pot apărea în arterele femurale, poplitee și tibiale posterioare, generând ocluzia acestor vase sau reducerea lumenului. În contextul dat, acești pacienți sunt predispuși la ulcere [85].

Savanții au demonstrat că ischemia afectează vindecarea ulcerelor prin scăderea debitului de oxigen la țesuturi precum și prin diminuarea tuturor componentelor necesare pentru vindecare [306].

Ulcerul trofic vascular (venos)

Ulcerale venoase sau de stază sunt definite ca ulcere generate de insuficiența venoasă. Acest tip de ulcere se distinge prin dimensiuni mari, formă neregulată, adâncime mică și prezența la suprafață a unui exsudat gălbui. Ulcerul venos, fiind o boală cronică, caracterizată prin acutizări și remisiuni, necesită o perioadă de recuperare completă mai îndelungată, cauzând disconfort sporit atât la nivel fizic, cât și psihic, afectând negativ calitatea vieții acestor pacienți [229, 236].

Unele studii au raportat o prevalență de aproximativ 0,05% -1,52% a ulcerelor venoase. Această patologie afectează în mod egal bărbații și femeile. Mai frecvent sunt vizate persoanele de vârstă înaintată. Alți factori de risc importanți sunt antecedentele de tromboză, de flebită, de leziuni la nivelul membrelor inferioare, sarcina, obezitatea, etc. [153, 302].

La elucidarea fiziopatologiei ulcerelor venoase a fost demonstrată semnificația deficienței funcționării valvelor venoase. Aceasta cauzează revenirea insuficientă a sângelui venos la inimă și hipertensiune venoasă cronică a membrului inferior. Hipertensiunea venoasă presupune scăderea transportului de oxigen și de substanțe nutritive, dereglarea evacuării subproduselor metabolice, soldată cu ischemie tisulară [79, 200].

Referindu-se la patogeneza ulcerelor venoase cronice, care se dezvoltă în hipertensiune venoasă evidentă, cu anomalii microcirculatorii, Raffetto J. și coaut. menționează că acestea sunt consecința persistenței presiunii venoase cronice la nivelul microcirculației pielii. În cazul ulcerului venos cronic, exsudatul perpetuează inhibarea celulară, sporind expresia citokinelor, care afectează celulele și vindecarea ulcerului [200, 244]. Acest tip de ulcere a fost descris ca fiind cea mai severă complicație a insuficienței venoase, dureros, dificil de tratat, cu tendință la recurență în aproximativ 68% de cazuri, frecvent asociate cu infectare secundară .

Ulcerul sistemic cauzat de malnutriție

Ulcerul sistemic cauzat de malnutriție este mai frecvent întâlnit în deficiența vitaminei B12, avitaminoze severe, gută etc.

În cazul gutei acest tip de ulcer este rar înregistrat, deseori contaminat cu microorganisme, dezvoltând infecție locală, iar uneori septicemie. O altă particularitate a

ulcerului trofic în gută este vindecarea întârziată, înregistrată în circa 50% de cazuri, astfel infecția constituind o provocare pentru majoritatea pacienților cu gută [206, 262].

Managementul eficient al diferitor tipuri de ulcere trofice este similar, cu mici modificări în funcție de etiologia și de fiziopatologia leziunii. Elucidarea particularităților etiopatogenice ale fiecărui tip de ulcer trofic ar permite o mai bună gestionare a tratamentului acestora [295].

Astfel, în diabetul zaharat ulcerele trofice au o patogenie multifactorială (neurogenă, ischemică și nutrițională), care contribuie la dezvoltarea și cronicizarea lor [11, 161].

Neuropatia diabetică se caracterizează prin afectarea unei rețele de nervi ce implică căile motorii, senzoriale și autonome (ex. pierderea senzațiilor dintr-un membru). Au fost evidențiate cinci tipuri de neuropatii diabetice: cu fibre mari, cu fibre mici, motorie proximală, mononeuropatia acută și de compresiune [98]. Toate aceste tipuri, fie individual sau în comun, contribuie la formarea ulcerului. Din cauza afectării nervului motor, pacientul prezintă deficiențe de mers, exercitând presiune asupra membrelor, soldată cu traumatism și, în timp, cu dezvoltarea ulcerului. În neuropatia senzorială se înregistrează și pierderea sensibilității, percepției durerii și temperaturii, iar leziunile repetate duc la ulcerării [48].

Mai mulți cercetători au elucidat și rolul neuropatiei vegetative în dezvoltarea ulcerului trofic. În acest tip de neuropatie se produce dilatarea vaselor sangvine cu pierderea sau cu scăderea transpirației, ceea ce duce la încălzirea și la uscarea membrului, cu predispunerea acestuia la fisuri. Ulterior fisurile se infectează, cu formarea ulcerelor [188].

1.6. Particularitățile ulcerului trofic infectat

Ulcerul trofic reprezintă o problemă majoră de sănătate, determinate de prevalența acestei patologii, de impactul socio-economic și de morbiditatea înaltă. Impactul socio-economic al ulcerului trofic este dramatic, fiind afectate abilitatea pacientului de a participa la activitățile sociale și ocupaționale, calitatea vieții și resursele financiare [12].

Mai bine de două decenii, cercetătorii sunt preocupați de stabilirea factorilor de risc, asociați eșecului sau deficienței vindecării ulcerului trofic. Cei mai studiați și mai incriminați parametri ai ulcerului sunt suprafața, cronicizarea și asocierea microbiană. Identificarea factorilor de risc, care împiedică vindecarea ulcerului și îmbunătățesc rezultatele, ar permite de a dezvolta strategii noi de tratament [8, 249].

Una dintre deficiențele vindecării ulcerului trofic este colonizarea microbiană cu formarea biofilmelor. Biofilmele reprezintă comunități microbiene care, aderând la suprafața ulcerului, sunt protejate de fagocitoză și de alți factori ai sistemului imun. Deși este constituit din mai multe specii microbiene, biofilmul coexistă sub forma unei singure comunități. Numeroasele procese fiziologice ale microorganismelor dintr-un biofilm, inclusiv producerea de metaboliți și de substanțe biologice active, decurg diferit, față de culturile planctonice pure. Reacția

microorganismelor producătoare de biofilme la schimbările condițiilor de mediu diferă semnificativ de reacția anumitei specii în monocultură. Acest mod de organizare a bacteriilor asigură stabilitatea fiziologică și funcțională, precum supraviețuirea competitivă în nișa ecologică [119, 182, 336].

Studierea biofilmelor asociate ulcerului trofic prezintă un interes major pentru cercetători, întrucât acest mod de existență a bacteriilor creează mari probleme pentru practica medicală. Comunitățile bacteriene de pe suprafața ulcerelor complică îndepărtarea microflorei implicate în această patologie [5, 88].

În mai multe studii a fost demonstrat că ulcerele trofice sunt rapid colonizate de bacterii cu rezistență multiplă la antimicrobiene, capabile să producă biofilme [27, 159, 214, 237].

Infectarea ulcerului trofic are loc în mai mult de 90% de cazuri și este generată, în special, de deficiențele sistemului imunitar, care nu poate controla comunitatea microbiană ce colonizează suprafața plăgii [205].

Conform datelor din literatura de specialitate, succesul vindecării ulcerelor trofice depinde de spectrul microorganismelor care le colonizează [331].

Printre agenții microbieni, cel mai des implicați în infecția ulcerelor trofice, se numără *S. aureus*. Alte specii microbiene, cum ar fi *Streptococcus* spp., *Enterococcus* spp. și *P. aeruginosa*, sunt frecvent izolate de comun cu *S. aureus* în infecțiile mixte [26, 32, 107]. Rezultatele unui studiu recent, indică că specia *S. aureus* este mai frecvent izolată în ulcerele infectate fără ischemie, iar *P. aeruginosa* în ulcerele infectate și cu ischemie, indiferent de adâncimea ulcerului [10].

Microflora ulcerelor cronice, în special a celor diabetice, este asociată cu factorii clinici. Ulcerele superficiale sunt, de obicei, infectate cu specii de *Staphylococcus*, în principal *S. aureus*, într-un titru înalt, cele profunde cu specii din genurile *Anaerococcus*, *Peptoniphilus*, *Bacteroides* și *Clostridium* [290].

Conform unui studiu efectuat prin metoda de secvențiere a pirosecvenței 16S rDNA asupra florei microbiene din ~ 3 000 de ulcere, în 7% din ulcerele infectate a fost izolată o singură specie microbiană, în rest două și mai multe [331].

Din ulcerele trofice au fost izolate, în principal, speciile *S. aureus* și *P. aeruginosa*, mai frecvente în formele cronice. Eliminarea acestora din focar a dus, în majoritatea cazurilor, la vindecarea mai rapidă a ulcerului trofic [331].

Terapia antibacteriană a ulcerelor trofice infectate cu diverse specii microbiene este dificilă din cauza formării biofilmelor microbiene și a nivelului sporit de rezistență la antimicrobiene a tulpinilor implicate [75, 82, 245].

În ultimii ani se atestă prezența mutațiilor la speciile de microorganisme implicate în patologia infecțioasă și tendința de creștere a ponderii infecțiilor mixte, ca urmare a expunerii simultane la câțiva agenți etiologici.

La adaptarea și la supraviețuirea pe termen lung a microorganismelor la nivelul ulcerului trofic contribuie complexul de factori de patogenitate și de persistență, care inactivează mecanismele de rezistență antibacteriană ale sistemului imun, cum ar fi activitatea antilizozim, anticomplementară, antiinterferon etc. [30, 31].

Potențialul de persistență al microorganismelor determină durata de aflare a lor în macroorganism, iar suprimarea acestuia prin intermediul preparatelor medicamentoase atenuază potențialul infecțios al microorganismului [154, 254].

Majoritatea microorganismelor patogene și potențial patogene prezintă un arsenal semnificativ de exoenzime și toxine formatoare de pori (ex. hemolizina, lipaza), evidențiate la nivel fenotipic. Toxinele formatoare de pori acționează prin inserția toxinei în membrana celulei-gază, ulterior se produce oligomerizarea monomerilor și formarea porilor care induc liza celulei (ex., toxinele RTX produse de *E. coli*, *Proteus* spp., toxinele α , β , γ , δ produse de *Staphylococcus* spp., toxinele tiol-activate produse de *Streptococcus* spp., *Bacillus* spp. etc). Astfel, formarea porilor generează multiple reacții secundare în celulele nucleate, precum eliberarea citokinelor, disfuncția citoscheletului, sinteza mediatorilor lipidici. Mai multe cercetări au demonstrat și implicarea hemolizinei în cronicizarea procesului infecțios [83, 189, 279].

Studiile din ultimii ani au arătat că, indiferent de sursa de izolare, *S. aureus* a exprimat lecitinază, cazeinază și ADN-ază. Cercetarea factorilor de patogenitate la agenții microbieni a evidențiat că ponderea acestora diferă în funcție de patologia infecțioasă și de biosubstratul investigat. Astfel, la tulpinile izolate din secreția de plagă au fost înregistrate, în special, lipaze, iar la cele izolate din hemoculturi, hemolizinele și lipazele au fost mai puțin exprimate, în timp ce gelatinaza a fost absentă. Majoritatea tulpinilor de *P. aeruginosa* și de *S. aureus* au o capacitate înaltă de aderare la substrat, dovedită prin valorile înalte ale indicilor de aderență [112, 238].

Microorganismele patogene intracelulare dispun de multiple enzime care au proprietatea de a liza membrana celulei eucariote, unele esențiale pentru manifestarea patogenității [78, 303].

Bacteriile acționează asupra plăgilor în mod diferit. Una din modalități este menținerea răspunsului inflamator cu secreția de toxine și de proteaze, care distrug factorii de creștere și împiedică vindecarea prin apariția unui țesut proteiform cu aspect de pseudoescară [171]. Astfel, în urma unei cercetări axată pe studierea factorilor de patogenitate ai tulpinilor de *S. Aureus*, s-a constatat că acestea secretă o serie de proteine extracelulare (proteaze, lipaze, nucleaze,

colagenaze, coagulază, hialuronidază, hemolizine, leucocidină), cu efect toxic și implicate în degradarea componentelor țesuturilor gazdei [282].

Un șir de bacterii implicate în patologia infecțioasă (ex. *C. perfringens*, *S. aureus*, *Streptococcus* spp. etc.) secretă enzime care degradează țesuturile gazdei sau manifestă acțiune protectoare a celulei bacteriene. Specia *P. aeruginosa*, dotată cu numeroase enzime extracelulare (ex. elastază, protează alcalină), frecvent este implicat în patologia infecțioasă, inclusiv în ulcerul trofic infectat, în special la persoanele imunocompromise. Elastaza degradează diverse proteine, precum elastina, fibrina, colagenul, și unele componente ale complementului și Ig [171, 314]. Alte enzime degradante produse de *S. aureus*, precum lecitinaza care scindează lecitina, coagulaza - produce coagularea plasmei și formarea fibrinei pe suprafața celulei bacteriene, cu efect protector față de fagocite, au un rol semnificativ în persistența acestor microorganisme [301].

Unele microorganisme (stafilococii, streptococii, anaerobii) produc hialuronidază - enzimă care are proprietatea de a hidroliza acidul hialuronic din componența țesutului conjunctiv. Streptococii hemolitici produc fibrinolizina, care activează o enzimă proteolitică și scindează coagulul plasmatic, favorizând diseminarea streptococilor din ulcere în țesuturile adiacente [117, 167].

Fosfolipazele, un alt grup de enzime bacteriene, produc o varietate de efecte, atât *in vivo*, cât și *in vitro*, de la alterări minore, în structura și în funcția membranei citoplasmice, până la distrugerii totale [37].

În prezent există dovezi că capacitatea celulelor bacteriene de a inactiva sistemul complement al macroorganismului asigură persistența microorganismelor în focar [166].

Necesitatea diagnosticului microbiologic în managementul cazului de ulcer trofic infectat

Reușita diagnosticului ulcerului trofic infectat implică o echipă multidisciplinară, constituită din medic chirurg vascular, chirurg plastic, endocrinolog, imagist, microbiolog, podolog, kinetoterapeut și dietetician. Conduita terapeutică antimicrobiană corectă necesită o bună colaborare între specialiștii menționați și medicul microbiolog. Stabilirea diagnosticului prezumtiv de ulcer trofic infectat și indicarea tratamentului empiric sunt importante în cazul acestor pacienți, fiind una dintre etapele inițiale și presupune suspiciunea existenței acestei patologii. Diagnosticul de ulcer trofic infectat se stabilește în baza tabloului clinic, simptomelor subiective, examenului obiectiv, istoricului bolii, anamnezei epidemiologice confirmat prin investigații de laborator, inclusiv microbiologice [349].

Medicul microbiolog trebuie să colaboreze cu medicul clinician și să-l informeze asupra probelor biologice, recoltate în diverse situații, precum și la modul de recoltare și de transportare

a materialului biologic. Rezultatul investigației microbiologice va oferi informații despre microorganismele implicate în proces și despre sensibilitatea acestora la preparatele antimicrobiene.

Practica a demonstrat că este foarte dificil de a diferenția colonizarea ulcerului trofic de infecție. Unele surse științifice informează că colonizarea precoce a ulcerelor trofice nu este nefavorabilă pentru vindecare. În acest context, stabilirea agentului etiologic implicat în proces și terapia antimicrobiană precoce sunt justificate [243].

1.7. Concluzii la capitolul 1

1. Managementul eficient al cazului de ulcer trofic infectat implică o echipă multidisciplinară care include chirurg vascular, chirurg plastic, endocrinolog, imagist, microbiolog, podolog, kinetoterapeut și dietetician.
2. Studiul bibliografic al fenomenului de antibioretistență, 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.
3. 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.
4. În ultimile trei decenii, terapia patologiei infecțioase devine tot mai dificilă din lipsa preparatelor antimicrobiene noi din cauza: costurilor exacerbate pentru elaborare și implementare, durata relativ mică a patentului, includerea preparatelor elaborate în lista de rezervă, durata scurtă a tratamentului antimicrobian ce determină, în final, un profit mic pentru companiile farmaceutice.
5. 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.
6. 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.
7. 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.

8. 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.
9. În ultimii ani, în căutarea unor noi alternative terapeutice în tratamentul maladiilor infecțioase, savanții și-au orientat cercetările spre dezvoltarea preparatelor antimicrobiene combinate.
10. 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

2.1. Caracteristica generală și etapele cercetării

Prezenta 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. Consultați 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 microorganismele rezistente la antimicrobiene, deoarece nu răspund la terapie, au o evoluție mai prelungită, necesită perioade mai lungi de spitalizare, duc la creșterea mortalității. [143, 307]. 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 [330].

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”.

Calcularea eșantionului a fost efectuat după formula 1:

Formula (1)

Numărul de tulpini de fiecare specie pentru valori medii

$$Z_{\alpha} = 5\%$$

$$Z_{\beta} = 90\%$$

$$D = (M_1 - M_2) : DS$$

D	Numărul pentru fiecare grup
0.2	527
0.3	235
0.4	133
0.5	86
0.6	60
0.7	44
0.8	34
0.9	27
1.0	23
1.2	16
1.4	12
1.6	10
1.8	8
2.0	7
2.5	5

La înlocuirea datelor în formulă a fost obținut numărul total de tulpini clinice pentru testare – 430.

Volumul eșantionului a fost constituit din tulpini de: *Staphylococcus* spp., *Enterobacteriaceae*, *Streptococcus* spp., *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp., *Candida* spp. izolate de la pacienții cu ulcere trofice.

Compușii chimici: în studiu au fost incluși compuși chimici noi sintetizați la Catedra de chimie anorganică, Departamentul de Chimie al Universității de Stat din Moldova. În calitate de precursori de sinteză ai compușilor chimici au fost utilizați reactivi de puritate înaltă „Sigma-Aldrich”, „Acros Organics” sau „Alfa Aesar”.

În total au fost testați peste 1000 de compuși chimici din diverse grupe. Într-un final au fost selectați 19 compuși din 7 grupe, care au prezentat o activitate antimicrobiană mai înaltă asupra tulpinilor de referință (Tabelul 4).

Compușii de origine biologică: au fost oferiți 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. Din cei 50 de compuși biologici testați s-au selectat cinci, care au prezentat o acțiune antimicrobiană mai înaltă asupra tulpinilor de referință.

Tabelul 4. Compușii chimici luați în studiu

Compusul	Denumirea chimică	Formula chimică
C 1	Sulfatul de {N-(prop-2-en-1-il)-2-[(piridin-2-il)-metiliden]hidrazin-1-carbotioamid} aquacupru(II)	C ₁₀ H ₁₄ CuN ₄ O ₅ S ₂
C 2	Nitrato-{N-(prop-2-en-1-il)-N'-[1-(piridin-2-il)-etiliden]carbamohidrazontioato}imidazolcupru monohidrat	C ₁₄ H ₁₉ CuN ₇ O ₄ S
C 3	Nitrat de catenă-(μ-nitrato-O,O')-{N-(prop-2-en-1-il)-2-[(piridin-2-il)-metiliden]hidrazin-1-carbotioamid}-cupru(II)	C ₁₀ H ₁₂ CuN ₆ O ₆ S
C 4	Bromo-{N-(prop-2-en-1-il)-N'-[1-(piridin-2-il)-metiliden]carbamohidrazontioato}imidazolcupru	C ₁₀ H ₁₁ BrCuN ₄ S
C 5	Bis(μ2-acetato-O)-bis{[N-prop-2-en-1-il-N'-(piridin-2-il)metiliden]carbamohidrazono-tioato}cupru} dihidrat	C ₂₄ H ₃₂ Cu ₂ N ₈ O ₆ S ₂
C 6	Nitrat de catenă-(μ-nitrato-O,O')-{N-(prop-2-en-1-il)-2-[(piridin-2-il)etiliden]hidrazin-1-carbotioamid}-cupru(II)	C ₁₁ H ₁₄ CuN ₆ O ₆ S
C 7	Bromo-{N-(prop-2-en-1-il)-N'-[1-(piridin-2-il)-etiliden]carbamohidrazontioato}-imidazolcupru	C ₁₁ H ₁₃ BrCuN ₄ S
C 8	Cloro-{N-ciclohexil-N'-[(piridin-2-il)metiliden]-carbamohidrazontioato} cupru(II)	C ₁₃ H ₁₇ ClCuN ₄ S
C 9	Nitrato-{N-ciclohexil-N'-[(piridin-2-il)metiliden]-carbamohidrazontioato} cupru(II)	C ₁₃ H ₁₇ CuN ₅ O ₃ S
C 10	Perclorat de N-ciclohexil-N'-[(2-hidroxifenil)-metiliden]carbamohidrazontioatoaqua cupru(II)	C ₁₄ H ₂₀ ClCuN ₃ O ₆ S
C 11	Acetato-{N-ciclohexil-N'-[(piridin-2-il)metiliden]-carbamohidrazontioato} cupru(II)	C ₁₅ H ₂₀ N ₄ NiO ₂ S
C 12	{N'-[(4-hidroxi-2-oxidofenil)metiliden]-N-prop-2-en-1-ilcarbamohidrazontioato}(3,4-dimetilpiridin)cupru	C ₁₈ H ₂₀ CuN ₄ O ₂ S
C 13	Nitratul de {2-[1-(2-hidroxifenil)etiliden]-N-(prop-2-en-1-il)hidrazin-1-carbotioamid}(1,10-fenantrolin)-cupru(II)	C ₂₄ H ₂₃ CuN ₇ O ₇ S
C 14	[N'-(3,5-dibromo-2-oxidobenziliden)-N-(prop-2-en-1-il)carbamohidrazontioato]aquacupru	C ₁₁ H ₁₁ Br ₂ CuN ₃ O ₂ S
C 15	[N'-(3,5-dibromo-2-oxidobenziliden)-N-(prop-2-en-1-il)carbamohidrazontioato]piridincupru	C ₁₆ H ₁₄ Br ₂ CuN ₄ OS
C 16	{Prop-2-en-1-il-N-prop-2-en-1-il-N'-[(piridin-2-il)-metiliden]carbamohidrazontioat}dibromo-cupru	C ₁₃ H ₁₆ Br ₂ CuN ₄ S
C 17	N-ciclohexil-2-[1-(piridin-2-il)etiliden]hidrazin-1-carbotioamid	C ₁₄ H ₂₀ N ₄ S
C 18	Bis-(μ-cloro)-bis-N-ciclohexil-N'-[(1-(piridin-2-il)-etiliden]carbamohidrazontioatcupru(II)	C ₁₄ H ₁₉ ClCuN ₄ S
C 19	Nitrato-{N-(prop-2-en-1-il)-N'-[1-(piridin-2-il)-etiliden]carbamohidrazontioato}-(3,4-dimetilpiridin)-cupru	C ₁₈ H ₂₂ CuN ₆ O ₃ S

Extractele, complexe biologice active – *ES*, *ES1*, *ES2*, *MX1* și *MX2* au fost obținute pe cale biotehnologică din tulpina cianobacteriei *Spirulina platensis* CNMN CB-02 (*Spirulina*), din Colecția Națională de Microorganisme Neapatogene a Institutului de Microbiologie și Biotehnologie al AȘM.

Biomasa de spirulină s-a obținut prin cultivarea cianobacteriei în condiții de creștere și de sinteză controlată a compușilor biologic activi. Din biomasa de spirulină, au fost extrase fracționat și purificate, cu utilizarea unor solvenți și tehnici inofensive, complexe biologice active (aminoacizii liberi și din componența oligopeptidelor și proteinelor, polizaharide sulfatate, fosfolipidele). Pe baza complexelor biologice active, derivate din biomasa de spirulină au fost elaborate și standardizate formulele compozițiilor complexe ale extractelor. Toate extractele sunt naturale (nu conțin erbicide, toxine sau conservanți).

Extractul de spirulină ES – complex aminoacid/oligopeptidic care conține aminoacizi neesențiali (glicina, alanina, serina, cisteina, tirozina, acidul aspartic, acidul glutamic, prolina) și esențiali (arginina, fenilalanina, histidina, izoleucina, leucina, lizina, metionina, treonina, triptofanul, valina), în stare liberă și combinați în oligopeptide (până la 10 kDa), macro- și microelemente funcționalizate biologic.

Pentru testele *in vitro* s-a utilizat extractul *ES* soluție alcoolică, cu concentrația extractului de 10 mg/ml și concentrația alcoolului de 50%.

Extractul de spirulină ES1 – combinație sinergică dintre complexul aminoacid/oligopeptidic, polizaharide sulfatate, proteine, macro- și microelemente funcționalizate biologic, derivate din spirulină.

Pentru testele *in vitro* a fost utilizată forma *ES1* soluție alcoolică, cu concentrația extractului de 20 mg/mL și concentrația alcoolului de 45%.

Extractul de spirulină ES2 – combinație sinergică dintre complexul aminoacid/oligopeptidic, fosfolipide, polizaharide sulfatate, proteine, macro- și microelemente funcționalizate biologic, derivate din spirulină.

Pentru testele *in vitro* s-a folosit forma *ES2* soluție alcoolică, cu concentrația extractului de 20 mg/mL și concentrația alcoolului de 45%.

Extractul MX1 – pigmentul carotenoid mixoxantofila din biomasă de *Spirulina platensis* în concentrație de 0,149 mg/ml în soluție apoasă de alcool etilic de 80%, iar extractul *MX2* în concentrație de 0,214 mg/ml în soluție apoasă de alcool etilic de 80%.

Cercetările stipulate în obiectivele cercetării au fost organizate și desfășurate pe etape, după design-ul prezentat în figura 4:

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, antilizoim). 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 aceștea 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”.

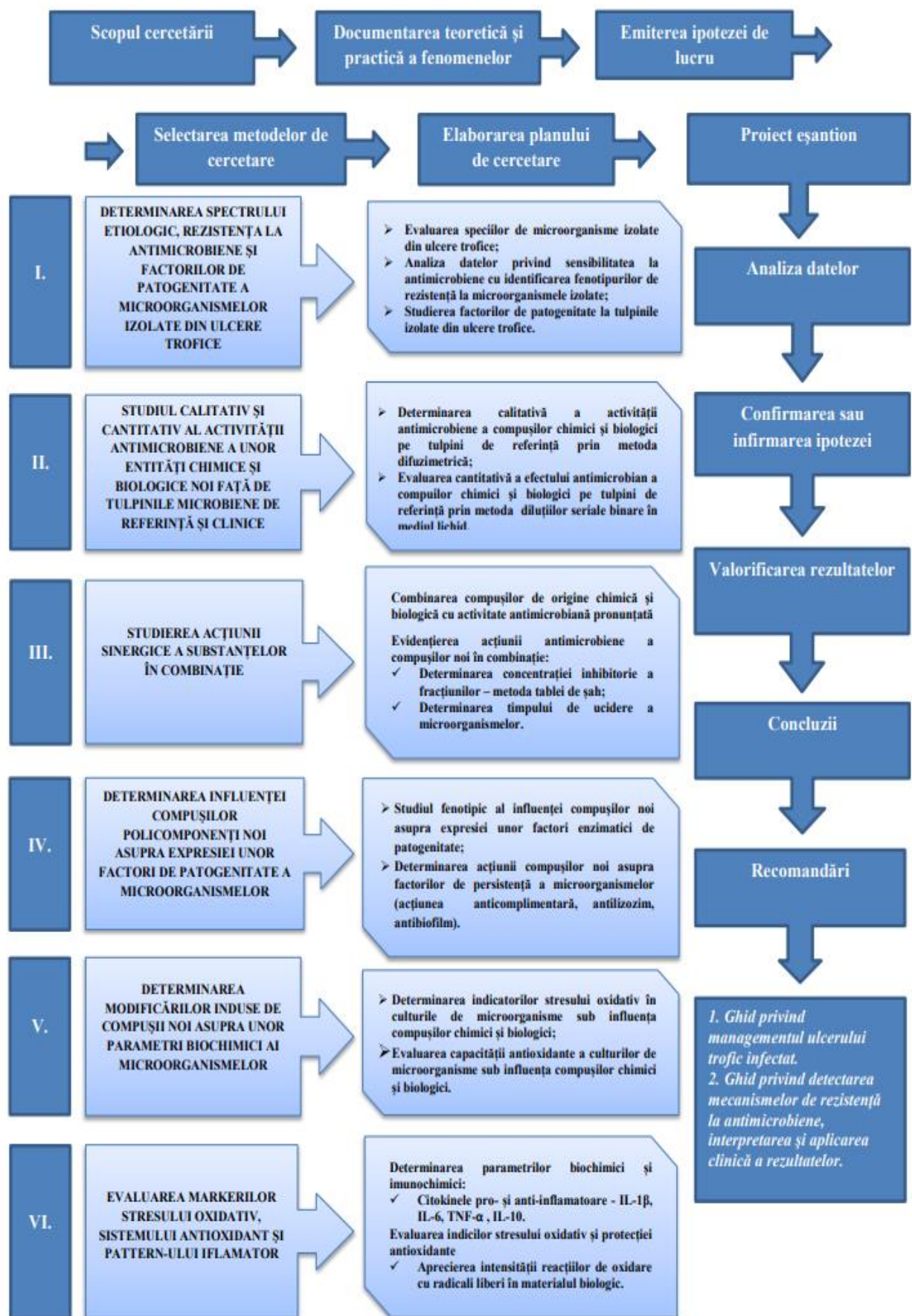


Figura 4. Designul studiului

2.2. Metode de cercetare

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 patenurilor 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 studio.
- ✓ *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.

Metode microbiologice

Tehnica de prelevare a probelor clinice

Probele din ulcere trofice au fost prelevate pe tampon sau prin tehnica Levine, cu presarea tamponului în patul ulcerului, pentru deplasarea microorganismelor aflate mai adânc, prin biopsie sau cu produsul de chiuretaj, după spălarea exsudatului stagnant de pe suprafața leziunii.

Prelevatul a fost recoltat în recipiente sterile, transportate la laborator cât mai curând posibil și procesate conform metodologiei aprobate [323].

Metoda microscopică a fost utilizată pentru studierea proprietăților morfologice, structurii și numărului de microorganisme implicate în proces. Aceste informații sunt necesare pentru ghidarea în stabilirea diagnosticului microbiologic corect. Examenului microscopic a fost supus materialul nativ colorat prin tehnica Gram.

Metoda bacteriologică, folosită la investigarea probelor prelevate din ulcerele trofice, a constat în aplicarea prelevatului pe placa cu mediu de cultură, izolarea culturii pure, identificarea și testarea sensibilității la antimicrobiene. Rezultatele obținute permit detectarea tulpinilor rezistente în vederea inițierii și monitorizării terapiei antimicrobiene și a măsurilor de prevenire a infecțiilor. Mediile de cultură utilizate, condițiile și durata de incubare au fost selectate în funcție de conjunctura clinico-epidemiologică, rezultatele microscopiei, localizarea și caracterul ulcerului trofic.

Pentru determinarea cantitativă a microorganismelor din probele prelevate prin biopsii, au fost efectuate diluții decimale, de la 10^{-1} până la 10^{-3} în ser fiziologic. După diluții s-au etalat câte 0,1 ml din fiecare diluție, inclusiv din suspensia inițială, pe medii în plăci. Plăcile au fost incubate la temperatura de 37°C , iar citirile au fost făcute la 24 și la 48 de ore [53].

Concentrația bacteriilor din prelevat a fost calculată după formula 2:

$$\text{Numărul UFC/tampon} = N \times D \times F \times 10 \quad \text{Formula (2)}$$

unde:

N – numărul coloniilor pe placă;

D – inversul diluției inoculate;

F – factorul de diluție ($\frac{W+V}{W}$),

W – greutatea țesutului omogenizat în g,

V – volumul de diluant utilizat pentru diluția inițială;

10 – diluția (s-au însămânțat 0,1 ml din diluție).

Pentru determinarea cantitativă a microorganismelor din prelevatul de pe tampon, acesta, după primire, a fost introdus într-un tub cu mediu de transport. Tamponul a fost agitat minuțios, pentru a descărca conținutul, apoi stors prin presare de pereții tubului. Suspensia astfel obținută a fost diluată decimal, după care s-a procedat ca mai sus. Concentrația bacteriilor din tampon a fost calculată după formula 3:

$$\text{Numărul UFC/tampon} = N \times D \times 10 \quad \text{Formula (3)}$$

unde:

N – numărul coloniilor pe placă;

D – inversul diluției însămânțate.

Izolatele în cantitatea $\geq 10^5$ UFC/g de țesut sau $\geq 10^6$ UFC/tampon au avut semnificație clinică și au fost considerate factori etiologici.

Streptococii β -hemolitici sunt relevanți din punct de vedere clinic, indiferent de cantitatea în care au fost izolați.

La prezența unei asocieri de microorganisme, izolatele în cantități de 10^3 - 10^4 UFC/g de țesut au fost catalogate ca agenți etiologici ai infecției de ulcer trofic.

Prelevatele au fost însămânțate pe mediile de cultură: agar sânge (5% sânge de berbec), agar hipersalin cu manitol și ou, Endo, Sabouraud agar, Enterococcus agar. Plăcile inoculate au fost incubate la temperatura de 37°C timp de 24-48 de ore, după care s-a determinat numărul de colonii. Cultura pură a fost identificată după proprietățile morfologice, tinctoriale, culturale, biochimice, apoi s-a testat sensibilitatea acestora la preparatele antimicrobiene.

Pentru identificarea tulpinilor izolate au fost utilizate teste manuale și automatizate (Vitek2 Compact -BioMerieux).

Antibiograma difuzimetrică (metoda Kirby Bauer). Această metodă a fost folosită pentru determinarea sensibilității microorganismelor la preparatele antimicrobiene pe medii solide. Cu acest scop, cultura microbiană a fost inoculată pe placa de mediu, după care s-au aplicat discuri cu antibiotic, în jurul cărora, prin difuziunea locală a antibioticului s-a realizat un gradient de concentrație (în imediata vecinătate a discului, concentrația de antibiotic este mai mare, iar pe măsura îndepărtării descrește).

Determinarea sensibilității microorganismelor la antimicrobiene prin metoda difuzimetrică poate fi influențată de compoziția și de pH-ul mediului de cultură, de densitatea inoculului, de stabilitatea și de difuziunea antimicrobianului, precum și de durata și de temperatura de incubare.

În calitate de mediu de cultură a fost folosit agarul Müller-Hinton recomandat de standardul EUCAST (eng. *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*), a cărui valoare nutritivă permite dezvoltarea optimă a unei varietăți mari de microorganisme și nu conține inhibitori ai acțiunii substanțelor antimicrobiene. Concentrația gelozei din mediul de cultură a fost de 1,5-1,7%, pH-ul – 7,2-7,4, iar grosimea plăcii – 4 mm.

Inoculul a fost reprezentat de tulpina microbiană testată, cultivată pe geloză în pantă timp de 18-24 de ore. Inoculul a fost standardizat corespunzător etalonului 0,5 Mac Farland. Plăcile de agar Müller-Hinton, după inocularea cu tulpina testată și aplicarea discurilor cu antibiotice, au fost incubate în termostat la temperatura de 36°C pentru 18-48 de ore. După expirarea perioadei de incubare s-au conturat două zone distincte: în una creșterea bacteriană era inhibată de substanța antimicrobiană, iar în cealaltă concentrația de substanță testată era nulă sau prea mică pentru a inhiba creșterea microorganismelor.

Mărimea zonei de inhibiție este condiționată și de rata de difuziune a substanței studiate în placa de geloză, care variază de la o substanță la alta. De aceea, zonele de inhibiție a diferitor antimicrobiene se deosebesc între ele. Diametrul zonelor de inhibiție totală a creșterii tulpinii testate au fost comparate cu diametrele descrise în standardul EUCAST [96].

Pentru testarea sensibilității la antimicrobiene a tulpinilor izolate din ulcere trofice au fost utilizate discuri cu preparate antimicrobiene din 15 clase (Mast Group): cefoxitin (30μg), ampicilină (10μg), amoxicilină-acid clavulanic (20-10μg), ticarcilină (75μg), piperacilină-tazobactam (30-6μg), ciprofloxacina (5μg), levofloxacina (5μg), gentamicina (10μg), ampicacina (30μg), tobramicina (10μg), cefepim (30μg), ceftazidim (10μg), cefotaxim (5μg), aztreonam (30μg), imipenem (10μg), meropenem (10μg), ertapenem (10μg), trimetoprim-sulfametoxazol (1,25-23,75μg), cloramfenicol (30μg), eritromicina (15μg), clindamicina (2μg), tetraciclina (30μg), rifampicina (5μg), linezolid (10μg), vancomicina (5μg), tigecilin (15μg).

Tulpinile, care au prezentat rezistență la cel puțin un preparat din trei sau mai multe grupuri de antimicrobiene, au fost identificate ca polirezistente, reieșind din recomandările Centrului European pentru Prevenirea și Controlul Bolilor (ECDC) și Centrului pentru Controlul și Prevenirea Bolilor (CDC) [179].

Caracterul meticilinorezistent sau meticilinosensibil al tulpinilor de *Staphylococcus* spp. a fost determinat în funcție de diametrul zonei de inhibiție, creată de discul cu cefoxitin (30μg), conform EUCAST: *Staphylococcus* spp. sensibil la meticilină (MSS) dacă diametrul este de cel puțin 22 mm; *Staphylococcus* spp. rezistent la meticilină (MRS) dacă diametrul este mai mic de 22 mm.

Rezistența inductibilă la clindamicină a fost detectată prin testul dublu disc (testul D). Discurile cu eritromicina (15μg) și cu clindamicină (2μg) au fost plasate la distanța de 12-20 mm, măsurată de la marginile discurilor. În cazul aplatizării zonei de inhibiție din jurul discului cu clindamicină (test D pozitiv), tulpina se raportează rezistentă la clindamicină [95].

CMI a antimicrobienele pentru microorganismele izolate din ulcere trofice a fost determinată cu sistemul automat Vitek2 Compact (BioMerieux).

Pentru bacili gram-negativi glucozofermentativi au fost utilizate galeriile automatizate Vitek 2 AST-GN 75 cu următoarele antimicrobiene: ampicacina (AN), ampicilină (AM), ampicilină/sulbactam (SAM), cefazolină (CZ), cefepim (FEP), cefoxitin (FOX), ceftazidim (CAZ), ceftriaxon (CRO), ciprofloxacina (CIP), ertapenem (ETP).

Pentru confirmarea BLSE (ESBL:FEP1): cefotaxim (CTX), ceftazidim (CAZ), cefepim /clavulanat BLSE (FEP/CA), cefotaxim/clavulanat BLSE (CTX/CA), ceftazidim/clavulanat

BLSE (CAZ/CA), gentamicină (GM), lefloxacină (LEV), meropenem (MEM), nitrofurantoin (FT), piperacilină (PIP), tobramicină (TM) și trimetoprim/sulfametoxazol (SXT).

Pentru bacilii gram-negativi glucozonefermentativi au fost utilizate galeriile automatizate Vitek 2 AST-N 222 cu următoarele antimicrobiene: amicacină (AN), aztreonam (ATM), cefepim (FEP), ceftazidim (CAZ), ciprofloxacina (CIP), colistin (CS), gentamicină (GM), imipenem (IPM), meropenem (MEM), minociclină (MNO), pefloxacină (PEF), piperacilină (PIP), piperacilină/tazobactam (TZP), rifampicină (RA), ticarcilină (TIC), ticarcilină/acid clavulanic (TCC), tobramicină (TM), trimetoprim/sulfametoxazol (SXT).

Pentru cocii gram-pozitivi au fost utilizate galeriile automatizate Vitek 2 AST-P592 (GP) cu antimicrobienele: ampicilină (AM), penicilină (P), cefoxitin (doar screening) (FOX), ciprofloxacina (CIP), clindamicină (CM), eritromicină (E), fosfomicină (FOS), acid fusidic (FA), gentamicină (GM), clindamicină/eritromicină (CM/E), linezolid (LNZ), moxifloxacină (MXF), oxacilină (OXA), rifampicină (RA), teicoplanină (TEC), tetracilină (TE), tigeciclin (TGC), trimetoprim/sulfametoxazol (SXT), vancomicină (VA).

Controlul intern de calitate a fost efectuat cu tulpina de referință *Escherichia coli* ATCCTM 25922. Controlul de calitate pozitiv – BLSE *Escherichia coli* ATCC 35218, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Pseudomonas aeruginosa* 27853.

Metode de determinare a beta-lactamazelor

Beta-lactamazele cu spectru extins (BLSE) sunt enzime ce hidrolizează penicilinele și cefalosporinele, inclusiv cefalosporinele de a III-a și a IV-a generație, monobactamele (aztreonam), dar nu hidrolizează cefamicinele și carbapenemele [272].

Pentru determinarea producerii de beta-lactamaze de către tulpinile studiate au fost utilizate metodele fenotipice.

Teste screening pentru determinarea producerii de BLSE

Toate tulpinile de bacili gram-negativi izolate din ulcere trofice au fost testate la producerea de BLSE. Izolatele care au prezentat sensibilitate intermediară sau rezistență la cefalosporinele de a III-a generație (ceftazidim, cefotaxim, ceftriaxon, cefexim, cefoperazon) sau de a IV-a generație (cefepim), au fost suspecte la producerea de BLSE.

Metode de screening pentru determinarea producerii de BLSE de tip AmpC

S-au realizat pe baza antibiogramii difuzimetrice și/sau determinarea CMI (interpretate conform EUCAST). Tulpinile rezistente la cefoxitim și sensibile la cefepim au fost suspecte la producerea de β-lactamaze de tip AmpC.

Teste screening pentru determinarea producerii de carbapenemaze (CPE)

Pentru screening-ul enterobacteriilor producătoare de carbapenemaze a fost efectuată antibiograma difuzimetrică și/sau determinată CMI (interpretate conform EUCAST).

Ertapenemul este antibioticul cel mai rapid afectat în cazul producerii de carbapenemaze. Întrucât sensibilitatea față de ertapenem poate fi diminuată și prin alte mecanisme de rezistență (producerea de beta-lactamaze tip AmpC asociat cu deficiență de porină), pentru detectarea producerii de carbapenemaze au fost utilizate două antimicrobiene: ertapenemul, caracterizat prin sensibilitate înaltă și specificitate redusă, și meropenemul care are o specificitate înaltă [94].

Metoda colorimetrică de determinare a carbapenemazelor

Rapidec Carba NP (Nordmann-Poirel) este un test enzimatic cu modificarea pH-ului mediului în care se găsesc tulpinile producătoare de carbapenemaze. Trusa conține imipenem (substrat pentru carbapenemază), roșu fenol (indicator de pH) și zinc (pentru favorizarea detecției MBL).

Pentru testare a fost folosită tulpina bacteriană de 18-24 de ore, însămânțată pe placa de geloză sânge sau geloză Müeller-Hinton. Rezultatele testului au fost lecturate și interpretate după 30 de min sau după 1,5 ore de incubare la 37°C.

Citirea și interpretarea rezultatelor:

- *test pozitiv*: virajul indicatorului de la roșu la galben, la oranj-galben sau la oranj-roșcat semnifică prezența carbapenemazelor de orice tip.
- *test negativ*: culoarea roșie nemodificată.

Test rapid imunocromatografic pentru confirmarea producerii de carbapenemaze (tip KPC, OXA, VIM, IMP și NDM). Testul a fost efectuat prin distribuirea a câte 150 μL soluție tampon în tuburi Eppendorf, în funcție de numărul de probe. Cu ansa bacteriologică s-a selectat o colonie izolată din cultura microbiană de 18-24 de ore crescută pe mediul agarizat, suspendat în tubul Eppendorf. Ulterior tubul a fost supus vortexării pentru omogenizarea amestecului, distribuit apoi în casete a câte 100 μL. Rezultatele au fost lecturate peste 15 minute și interpretate conform instrucțiunii producătorului.

Citirea și interpretarea rezultatelor:

- *test pozitiv*: vizualizarea unei linii roșii în regiunea de control și a uneia sau mai multor linii în regiunile de testare K, O, V, I, N indică prezența unuia sau mai multor tipuri de carbapenemaze.
- *test negativ*: vizualizarea unei linii roșii în regiunea de control indică lipsa carbapenemazelor în proba testată sau un nivel nedetectabil, interpretat ca rezultat negativ.

Metode de confirmare fenotipică a producerii de BLSE și de carbapenemaze

Testul dublu-disc sinergie pentru confirmarea fenotipică a producerii de BLSE. Pentru efectuarea testului au fost utilizate discuri cu ceftriaxon (CRO 30), cu amoxicilină 20/acid clavulanic 10 (AUG 30) și cu ceftazidim (CAZ 30). Din tulpina izolată de la pacient s-a pregătit

o suspensie în soluție fiziologică corespunzătoare standardului 0,5 McFarland, etalată pe două plăci de geloză Mueller-Hinton. În centrul primei plăci a fost plasat discul cu amoxicilină/acid clavulanic, iar în jur, la distanțe egale (15 mm), cele două discuri cu beta-lactamine. Pe a doua placă s-au aplicat aceleași discuri la o distanță de 20 mm. Plăcile au fost termostatate timp de 18-20 de ore la temperatura de 35°C [94].

Citirea și interpretarea rezultatelor:

- *test pozitiv*: zone de inhibiție a creșterii tulpinii mărite în jurul oricărui disc cu cefalosporine (CRO sau CAZ) în direcția discului amoxicilină/acid clavulanic (AUG).
- *test negativ*: lipsa zonelor de inhibiție mărite în jurul discurilor cu cefalosporine (CRO/CAZ).

Testul discurilor combinate. La montarea testului au fost utilizate trei plăci de geloză Mueller-Hinton. Pe fiecare placă, după inocularea tulpinii testate, s-au aplicat discurile cu antimicrobiene, la o distanță de 15 mm, după cum urmează: placa 1 – ceftazidim (CAZ 30) și ceftazidim/acid clavulanic (CAZ 30/CV); placa 2 – cefotaxim (CTX 30) și cefotaxim/ acid clavulanic (CTX 30/CV) și placa 3 – cefepim (FEP 30) și cefotaxim/ acid clavulanic (FEP 30/CV) [94].

Plăcile au fost termostatate timp de 18-20 de ore la temperatura de 35°C, după care s-a determinat diametrul de inhibiție totală a creșterii tulpinii testate.

Citirea și interpretarea rezultatelor:

- *test pozitiv*: diametrul zonei de inhibiție a creșterii tulpinii din jurul discului cu cefalosporine combinate cu acid clavulanic ≥ 5 mm decât diametrul zonei de inhibiție din jurul discului fără acid clavulanic;
- *test negativ*: diametrul zonei de inhibiție a creșterii tulpinii din jurul discului cu cefalosporine combinate cu acid clavulanic < 5 mm decât diametrul zonei de inhibiție din jurul discului fără acid clavulanic.

Testul Hodge modificat. Pentru efectuarea testului, pe agar Mueller-Hinton a fost însămânțată tulpina izolată de la pacient din suspensia efectuată în soluție fiziologică, corespunzătoare standardului 0,5 McFarland. Apoi s-a adăugat un disc de ertapenem de 10 μ g în centrul plăcii și tulpinile bacteriene de cercetat s-au însămânțat sub formă de linie dreaptă – de la antibiotic până la marginea plăcii. Citirea s-a realizat după incubare la 35°C timp de 18-20 de ore și distorsionarea zonei de inhibiție a creșterii bacteriene în jurul discului cu ertapenem la oricare dintre tulpini și la tulpina-martor, s-a citit ca test pozitiv pentru producerea de carbapenemază.

Controlul intern de calitate a testelor fenotipice a fost efectuat cu tulpinile de referință *E. coli* ATCC 25922 și *K. pneumoniae* ATCC 700603.

Testul pentru confirmarea fenotipică a producerii de BLSE de tip AmpC.

Pe placa de geloză Müeller-Hinton, după inocularea tulpinii testate, au fost aplicate discurile cu antimicrobiene la o distanță de 5-10 mm, după cum urmează: ceftazidim/acid clavulanic (FOX 30), cloxacilină (CL500), ceftazidimă (CAZ30), și la o distanță de 15 cm - discul cu imipenem (IPM 10).

Plăcile au fost termostatate timp de 18-20 de ore la temperatura de 35°C, după care s-a determinat sinergismul (zona fantomă) între discurile CL500 și FOX30 și / sau CL500 și CAZ30. Cel mai mic indiciu de sinergism denotă un test pozitiv: tulpină producătoare de β-lactamază de tip AmpC. Dacă între discurile CAZ30 și IPM10 a fost determinată o zonă de inhibiție (zona D) - prezența β-lactamazei de tip AmpC indusă.

Metode de biologie moleculară pentru determinarea genelor de rezistență

Tulpinile producătoare de BLSE, detectate prin testele fenotipice, au fost supuse tehnicii Real Time PCR (*eng. Polymerase Chain Reaction*) pentru identificarea genotipică a determinantilor de rezistență: *blaOXA-48*, *blaKPC*, *blaVIM*, *blaIMP*, *blaNDM*, *blaOXA-23*, *blaOXA-54*, *blaOXA-40*. Pentru detectarea de gene BLSE a fost utilizat un amestec compus din 25μl soluție tampon 10X (15 mM MgCl₂), 0,5 U ADN Taq polimerază (Roche), 200 μm de fiecare deoxinucleotid trifosfat, 5 pmol de fiecare primer și 50-100 ng de extract de ADN.

Reacțiile de amplificare au fost efectuate cu ajutorul amplificatorului (Applied Biosystems QuantStudio™ 5 Real-Time) în câteva etape: denaturare primară la 94°C timp de 4 minute, amplificare 30 cicluri (30 s la 94°C, 30 s la 55°C și 60 s la 72°C) și sinteza finală la 72°C timp de 5 min. Produsul amplificat a fost plasat într-un gel de agaroză de 1,5% și migrat la 100 V, timp de 30 min. Gelul a fost vizualizat în raze ultraviolete.

Determinarea sensibilității microorganismelor la acțiunea compușilor antimicrobieni prin metoda difuziunii în geloză

Pentru screening-ul calitativ al activității antimicrobiene a compușilor chimici și biologici luați în studiu a fost utilizată metoda godeurilor, standardizată pentru controlul activității antimicrobiene și propusă de standardul CLSI (*eng. Clinical&Laboratory Standards Institute*). Pe plăcile de geloză Müeller-Hinton au fost efectuate godeuri cu diametrul de $6 \pm 0,1$ mm, astfel ca distanțele dintre godeurile învecinate și până la marginea plăcii să fie egale. Plăcile au fost inoculate cu un tampon steril, umectat în suspensie microbiană care corespunde etalonului de turbiditate 0,5 Mac Farland. În godeurile formate s-au introdus volume egale de soluții ale marilor pozitivi respectivi și ale compușilor testați. Pentru a diminua diferențele, cauzate de intervalele de timp la care se aplică compușii testați, plăcile s-au lăsat la temperatura camerei pentru 1-2 ore, apoi s-au termostatat la temperatura de 37°C timp de 24-48 ore. Diametrul

zonelor de inhibiție totală a creșterii culturilor microbiene s-au măsurat cu ajutorul șublerului electronic cu exactitate de 0,1 mm [70, 103].

Determinarea sensibilității microorganismelor la acțiunea compușilor antimicrobieni prin metoda diluțiilor succesive

Metoda diluțiilor succesive este o metodă cantitativă pentru determinarea concentrației minime inhibitoare, adică a valorii cantitative minime capabilă să suprimă creșterea microorganismelor. Pentru a determina concentrația minimă inhibitoare, pentru fiecare derivat, s-a creat un gradient discontinuu de concentrații (500, 250, 125, 62, 31, 15, 7, 4, respectiv 3 μg/mL) în tuburi cu bulion Müeller-Hinton. Apoi, în fiecare tub, s-au adăugat câte 100 μL de suspensie bacteriană care corespunde etalonului de turbiditate 0,5 McFarland. Tuburile au fost incubate la temperatura optimă de dezvoltare a speciilor testate. A urmat determinarea valorii CMI prin analiza macroscopică a tuburilor în vederea testării prezenței sau lipsei creșterii microorganismelor. Concentrația cea mai mică, aferentă tubului în care a fost inhibată dezvoltarea vizibilă a culturii, reprezintă valoarea CMI (μg/mL) pentru compusul testat. În celelalte tuburi și în tubul-martor se atestă opacifierea mediului ca urmare a multiplicării microorganismelor.

Această metodă a permis și determinarea valorii CMB (concentrația minimă bactericidă) pentru compusul testat. Pentru aceasta, din fiecare diluție s-au efectuat repicări pe plăci de geloză Müeller-Hinton, cu incubarea ulterioară a plăcilor și interpretarea rezultatelor. Valoarea CMB este dată de cea mai mică concentrație de compus testat care reduce numărul coloniilor cu până la 99,9% [71].

Determinarea timpului de omorâre a microorganismelor

Testul „Time-kill”

Testul „Time-kill” (testul eficacității antimicrobiene), efectuat *in vitro*, a permis măsurarea schimbărilor în populația de microorganisme aerobe într-un timp prealabil stabilit, în prezența unor substanțe antimicrobiene [23].

Din cultura microbiană de 18-24 ore s-a preparat o suspensie în ser fiziologic steril, obținând în final inoculum de 1×10^6 UFC/mL. Suspensia obținută a fost adăugată în cantități egale (100 μL) în patru tuburi:

- tubul I (martor cultivare) – bulion Müeller-Hinton;
- tubul II – bulion Müeller-Hinton + CMI₂₅ substanța biologică;
- tubul III – bulion Müeller-Hinton + CMI₂₅ substanța chimică;
- tubul IV – bulion Müeller-Hinton + CMI₂₅ substanța biologică + CMI₂₅ substanța chimică.

Tuburile au fost incubate la temperatura de 35°C timp de 24 de ore. La intervale de timp stabilite (0, 4, 8, 12, 16, 20 și 24 ore), s-au repicat câte 100μL din fiecare tub pe plăcile cu mediul de cultură. Plăcile au fost incubate la temperatura de 37°C timp de 24 de ore, după care s-a determinat, prin numărare, UFC/placă, apoi UFC/mL (numărul mediu de colonii înmulțit cu diluția). Toate testările au fost efectuate în triplicat (trei experimente independente).

Determinarea concentrației inhibitorii a fracțiunilor

Metoda tablei de șah

Efectele antibacteriene ale celor două preparate combinate (compusul chimic și biologic) au fost evaluate prin metoda tablei de șah, urmată de calcularea indicelui FIC (eng. *Fractional Inhibitory Concentration*) [230]. Soluțiile stoc și diluțiile duble ale fiecărui compus au fost preparate înainte de testare, conform recomandărilor EUCAST. Testările s-au efectuat în plăci cu godeuri, în fiecare godeu adăugându-se câte 50μL de bulion Müeller-Hinton. Primul compus din combinație a fost diluat serial de-a lungul axei ordonatelor (y), iar cel de-al doilea de-a lungul axei absciselor (x). Din tulpina testată s-a preparat o suspensie, care corespunde standardului de turbiditate McFarland 0,5, după care, în fiecare godeu s-au adăugat câte 100 μL de suspensie microbiană (5x10⁵ UFC/ml). Plăcile au fost incubate la temperatura de 35°C timp de 24 de ore în condiții de aerobioză.

Concentrația inhibitoare a fracțiunilor a fost calculată în baza CMI a compușilor combinați și CMI a fiecărui compus în parte, obținute în paralel în același test, conform formulei 4:

$$\Sigma FIC = FIC (A) + FIC (B) \quad \text{Formula (4)}$$

unde,

$$FIC (A) = \frac{CMI (A) \text{ în combinație}}{CMI (A) \text{ individual}}$$

și

$$FIC (B) = \frac{CMI (B) \text{ în combinație}}{CMI (B) \text{ individual}}$$

Interpretarea rezultatelor

Valoarea indicelui FIC este utilizată pentru a clasifica interacțiunea celor doi compuși testați.

- $\Sigma FIC < 0,5$ – sinergie;
- $0,5 < \Sigma FIC \leq 1$ – aditivitate;
- $1 < \Sigma FIC \leq 4$ – indiferență;
- $\Sigma FIC > 4,0$ – antagonism.

Sinergie: combinarea compușilor crește activitatea inhibitoare (scăderea CMI) a unuia sau a ambilor compuși, în comparație cu compușii aparte.

Aditivitate: efectul acțiunii combinate a compușilor este echivalent cu suma activităților fiecărui compus atunci când este utilizat individual.

Indiferență: efectul compușilor combinați este egal cu efectul oricăruia dintre compușii individuali.

Antagonism: efectul comun al compușilor este mai slab decât suma efectelor compușilor individuali sau mai slab decât efectul oricărui compus individual.

Testul producerii de biofilm prin metodele calitativă și cantitativă

Metoda calitativă

Pentru testarea prin metoda calitativă a capacității tulpinilor bacteriene izolate din ulcere trofice de a forma biofilm a fost modelată formarea biofilmelor în tuburi de sticlă. Pentru aceasta, în tuburi de sticlă cu 10 ml de bulion tripticază din soia s-au transferat câte 0,1 ml de suspensie bacteriană, care corespunde standardului de turbiditate 0,5 McFarland. Tuburile au fost incubate la 37 °C timp de 48-72 de ore. După expirarea timpului de incubare, mediul s-a îndepărtat, iar tuburile au fost spălate cu soluție fiziologică sterilă și lăsate la uscare la temperatura camerei. Formarea biofilmelor a fost pusă în evidență cu cristal violet. Toate testările au fost efectuate în trei repetiții.

Metoda cantitativă

Pentru testarea cantitativă a producerii de biofilm de către tulpinile izolate din ulcere trofice s-a recurs la metoda microtitrării [293]. Culturile testate au fost cultivate în bulion tripticază din soia și ajustate la etalonul de turbiditate 0,5 McFarland. În fiecare trei godeuri, din placa cu 96 de godeuri, s-au adăugat câte 200μl de suspensie bacteriană. În godeurile pentru martor negativ s-a adăugat doar 200 μl de bulion tripticază din soia. Plăcile au fost acoperite și incubate aerobic timp de 24 de ore la temperatura de 37°C. După expirarea timpului, fiecare godeu a fost golit și clătit de cinci ori cu 250 μl de soluție fiziologică sterilă, după care a fost lăsat să se usuce la temperatura camerei. Apoi, placa a fost colorată timp de 30 de min cu 200μl soluție de cristal violet de 0,1%. Pentru înlăturarea excesului de pete, plăcile au fost clătite sub jet de apă de la robinet și uscate la temperatura camerei; colorantul legat la celulele aderente a fost resolubilizat cu 160μl soluție de acid acetic glacial de 33%. Rezultatele au fost lecturate cu un cititor ELISA, iar densitatea optică (DO) a fiecărui godeu s-a măsurat la lungimea de undă de 570 nm (A570).

Densitatea optică a cut-off-ului (DOc) este definită ca media DO a controlului negativ + 3x deviația standard (DS) a controlului negativ. Formarea biofilmului la tulpinile testate a fost analizată și clasificată pe baza adsorbției de către celule a colorantului cristal violet (Tabelul 5).

Tabelul 5. Clasificarea abilității de formare a biofilmului prin metoda microtitrării

Calcularea valorii limită	Media rezultatelor valorilor DO	Abilitatea de formare a biofilmului
$DO > 4DO_c$	$DO > 0,220$	Biofilm puternic
$2DO_c < DO \leq 4DO_c$	$0,112 < DO \leq 0,220$	Biofilm moderat
$DO_c < DO \leq 2DO_c$	$0,056 < DO \leq 0,112$	Biofilm slab
$DO \leq DO_c$	$DO \leq 0,056$	Lipsa biofilmului

În calitate de tulpini-martori ale producerii de biofilm au fost utilizate tulpinile de referință *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 și *Escherichia coli* ATCC 25922.

Evidențierea factorilor solubili de patogenitate ai microorganismelor

În prezentul studiu au fost efectuate teste pentru evidențierea lecitinazei, hemolizinei, coagulazei, lipazei, gelatinazei, cazeinazei, amilazei și ADN-azei.

Evidențierea lecitinazei

Unele specii de microorganisme produc lecitinază, sub acțiunea căreia mediile cu lecitovitelină (gălbenuș de ou) se opacifiază [53].

Pentru a depista prezența lecitinazei, placa cu agar lecitovitelină a fost însămânțată cu cultura pură testată și incubată la temperatura de 37°C timp de 48 de ore.

Citirea și interpretarea rezultatelor:

- *test pozitiv*: creștere cu opacifierea mediului din jur;
- *test negativ*: creștere fără opacifierea mediului.

Evidențierea hemolizinei

Pentru a pune în evidență hemolizina, cultura pură testată a fost însămânțată pe placa cu geloză-sânge și incubată în termostatat la temperatura de 37°C timp de 18-24 ore.

Interpretarea hemolizei s-a efectuat la examinarea sub lupă:

- *α-hemoliză*: zonă incomplet delimitată de distrugere parțială a eritrocitelor în jurul coloniei, acompaniată de decolorarea mediului înspre verde-brun;
- *β-hemoliză*: zonă clară, necolorată în jurul coloniei, în care eritrocitele sunt complet lizate;
- *nehemoliză-γ*: nu se observă nici o activitate hemolitică sau o decolorare a sângelui în jurul coloniei.

Evidențierea coagulazei

Coagulaza, enzimă extracelulară sintetizată de unele microorganisme, constituie un marker de patogenitate pentru tulpinile producătoare. Pentru detectarea acestei enzime, în tuburi cu 0,5 ml de plasmă citrată de iepure, diluată 1:4, s-a adăugat o ansă de cultură de 18-20 de ore din mediu solid sau 0,1 ml din mediul de cultură lichid (sau eventual o singură colonie de pe suprafața plăcii de geloză-sânge). Tuburile au fost incubate la temperatura de 37°C, examinarea

s-a făcut la intervale de 30 min în primele 4 ore. Dacă după expirarea timpului rezervat testul era negativ, incubarea se continua încă 6-20 de ore.

Tulpinile intens producătoare de coagulază dau reacție pozitivă în 1-4 ore, alte tulpini dau coagulare tardivă, după 18-24 ore [53].

Citirea și interpretarea rezultatelor:

- *test pozitiv*: formarea unui coagul, indiferent de mărimea lui, adică de la un coagul ce înoată în supernatantul plasmei și până la un coagul complet;
- *test negativ*: absența coagurilor.

Evidențierea ADN-azei

ADN-aza este o enzimă extracelulară, care depolimerizează ADN-ul. Pentru detectarea prezenței acestei enzime a fost utilizat mediul de cultură ADN agar cu albastru de toluidină (HiMedia). Albastru de toluidină formează cu ADN-ul un complex albastru, în timp ce produsele de degradare, rezultate la acțiunea ADN-azei, se colorează metacromatic în roz până la roșu [53].

Tulpina examinată a fost însămânțată în striu pe mediul de testare, incubat la temperatura de 37°C timp de 18-24 ore.

Citirea și interpretarea rezultatelor:

- *test pozitiv*: un halou roz în jurul coloniei sau striului de creștere bacteriană;
- *test negativ*: absența oricărei zone clare în jurul creșterii bacteriene.

Evidențierea lipazei

Pentru testarea capacității unei tulpini microbiene de a sintetiza lipază, a fost utilizat mediul agar tributirină (HiMedia), reeșind din capacitatea acesteia de a hidroliza uleiul de tributirină. Dacă microorganismul testat produce lipază, aceasta declanșează descompunerea tributirinei din mediul de cultură și în jurul coloniei apare un halou clar [53].

Citirea și interpretarea rezultatelor:

- *test pozitiv*: creșterea microorganismelor cu apariția unui halou clar în jur;
- *test negativ*: creșterea microorganismelor fără modificarea mediului.

Evidențierea gelatinazei

Producerea de gelatinază a fost determinată prin inocularea tulpinii testate, prin înțepătură, în coloana de agar nutritiv, suplimentat cu gelatină de 3% (HiMedia), termostatare timp 24 de ore la 37°C, urmată de refrigerare la 4°C timp de o jumătate de oră [53].

Citirea și interpretarea rezultatelor:

- *test pozitiv*: lichifierea gelatinei;
- *test negativ*: mediul nemodificat.

Evidențierea cazeinazei

Hidroliza cazeinei a fost testată pe agar Müller-Hinton cu adaos de soluție de lapte degresat de 3%. Tulpinile testate au fost aplicate în striuri pe placa cu mediu de testare, incubată apoi la 37°C timp de 24 de ore.

Citirea și interpretarea rezultatelor:

- *test pozitiv*: creștere microorganismelor cu dezvoltarea unui halou clar, transparent în jur;
- *test negativ*: creștere microorganismelor fără dezvoltarea haloului transparent în jur.

Evidențierea amilazei

Pentru testarea producerii de amilază microbiană a fost utilizat mediul de cultură cu amidon (HiMedia) și revelator – soluție Lugol. Tulpina testată a fost aplicată în striu pe placa cu mediul de testare, termostată apoi la 35°C timp de 24-48 de ore într-o atmosferă aerobă. După incubare, suprafața plăcii a fost inundată cu soluție Lugol, astfel încât să acopere complet inoculul și mediul [53].

Test pozitiv: apariția unei zone clare în jurul inoculului pe fonul albastru al mediului.

Test negativ: mediul nemodificat în jurul creșterii microorganismelor.

Determinarea activității antilizozim a microorganismelor

Lizozimul (muramidază) este o enzimă bacteriolitică care distruge peretele celular al bacteriilor prin hidrolizarea legăturii glicozidice β -1,4 dintre acidul N-acetilmuramic (NAM) și N-acetilglucozamină (NAG) (carbohidrați prezenți în peretele microbian). Activitatea antilizozim (capacitatea microorganismelor de a inactiva muramidaza, o verigă foarte importantă în rezistența nespecifică) este un caracter larg răspândit printre diferite izolate [209, 281].

Tulpina testată a fost cultivată pe geloză în pantă timp de 18-24 de ore la temperatura de 37°C. Apoi tulpina a fost repicată în bulion peptonat și incubată timp de 6 ore la temperatura de 37°C. Densitatea optică a culturii în bulionul peptonat a fost ajustată până la 0,15, ceea ce corespunde cu 1×10^8 UFC/ml.

Paralel a fost pregătită suspensia de lizozim în bulion peptonat cu concentrația de 12,5 μ g/ml. Utilizarea unei concentrații mai mari de lizozim inhibă creșterea microorganismelor, iar concentrațiile mai mici nu permit testarea fenomenului.

În godeurile plăcii pentru analiza imunoenzimatică s-au adăugat câte 100 μ l de bulion cu lizozim în concentrație de 12,5 μ g/ml și 25 μ l de suspensie microbiană. În godeurile-martori (în număr de două) s-au adăugat câte 100 μ l de bulion peptonat și 25 μ l de suspensie microbiană. Plăcile au fost termostatate timp de 4 ore. După 2 ore și 4 ore de incubare s-a măsurat densitatea optică. Rezultatele au fost lecturate cu cititorul ELISA, iar densitatea optică (DO) s-a măsurat la lungimea de undă de 600 nm (A600) [54].

Rezultatele obținute au fost calculate după formula 5:

$$K = \frac{V_k \cdot V_l \cdot Cl(M_{O4} - M_{O2})}{M_{K4} \cdot M_{K2}} * 100$$

Formula (5)

unde:

K – coeficientul activității antilizozim (AAL) a tulpinii testate;

V_k – volumul suspensiei de microorganisme;

V_l – volumul suspensiei de lizozim;

Cl – concentrația de lizozim;

M_{O4} – valoarea medie a densității optice a godeurilor cu cultură și cu lizozim după 4 ore de incubare, unități ale densității optice;

M_{O2} – valoarea medie a densității optice a godeurilor cu cultură și cu lizozim după 2 ore de incubare, unități ale densității optice;

M_{K4} – valoarea medie a densității optice a godeurilor martori (cultură fără lizozim) după 4 ore de incubare, unități ale densității optice;

M_{K2} – valoarea medie a densității optice a godeurilor martori (cultură fără lizozim) după 4 ore de incubare, unități ale densității optice;

100 – coeficient.

Ațiunea antilizozim a tulpinilor studiate a fost apreciată după următoarele criterii:

- grad de exprimare mic al AAL: $K < 0,49$;
- grad de exprimare mediu al AAL: K în limitele 0,5-2,49;
- grad de exprimare înalt al AAL: $K > 2,5$.

Determinarea activității anticomplementare a microorganismelor

Pentru determinarea activității anticomplementare a microorganismelor a fost titrat, în prealabil, serul hemolitic și complementul [348].

S-au utilizat ser hemolitic și complement liofilizat comerciale (producător „Biomed”, Rusia).

Titarea seului hemolitic

Inițial a fost pregătită o serie de diluții ale serului hemolitic, în conformitate cu datele din tabelul 6.

Tabelul 6. Tehnica de preparare a diluțiilor serului hemolitic

Diluție a serului hemolitic	Soluțiile utilizate		
	Volumul soluției tampon, ml	Ser hemolitic	
		Diluția	Volumul, ml
1:50	4,9	ne-diluat	0,1
1:100	1,0	1:50	1,0
1:250	4,0	1:50	1,0
1:500	2,0	1:250	2,0
1:1000	2,0	1:500	2,0
1:2000	1,5	1:1000	1,5
1:3000	2,0	1:1000	1,0
1:4000	1,0	1:2000	1,0

Din fiecare tub cu soluțiile obținute de ser hemolitic s-au transferat câte 1,0 ml în tuburi noi. În fiecare tub s-au adăugat câte 1,0 ml suspensie de eritrocite de 5% și s-a agitat ușor conținutul. Probele astfel pregătite au fost incubate la $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ timp de 30 de min.

După incubare, din fiecare probă s-au transferat câte 0,2 ml în alte tuburi, adăugând câte 1,1 ml soluție tampon fosfat și 0,2 ml soluție de complement. Toate testările au fost efectuate în duplicat.

Martor negativ (lipsa hemolizei): în trei tuburi s-au adăugat câte 4 ml soluție tampon fosfat și 0,1 ml suspensie de eritrocite de 5%.

Martor pozitiv (hemoliză completă): în trei tuburi s-au adăugat câte 1,4 ml apă purificată sterilă și 0,1 ml suspensie de eritrocite de 5%.

Probele au fost incubate în termostat la temperatura de $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ timp de 60 min, apoi 10 min răcite la temperatura de $5 \pm 3^\circ\text{C}$ și 5 min centrifugate la 3000 rpm. Determinarea densității optice a supernatantului s-a efectuat la lungimea de undă de 541 nm. Gradul de hemoliză a fost calculat în procente (Y%), în fiecare tub conform formulei 6:

$$Y = \frac{A_p - A_o}{A_k - A_o} \times 100\% \quad \text{Formula (6)}$$

unde:

A_p – valoarea medie a densității optice a probei cercetate;

A_o – valoarea medie a densității optice a probelor de control fără hemoliză;

A_k – valoarea medie a densității optice a probei de control cu hemoliză completă.

Rezultatele titrării serului hemolitic s-au considerat fiabile dacă gradul maxim de hemoliză a fost în intervalul 50-70%. Dacă gradul maxim de hemoliză nu s-a încadrat în aceste limite, titrarea s-a repetat cu o soluție de complement mai puțin sau mai mult diluată. Apoi a fost determinată diluția minimă la care o creștere suplimentară a cantității de ser hemolitic nu a provocat o creștere semnificativă a gradului de hemoliză. Această diluție este definită ca o unitate hemolitică minimă (1UHM) în 1 ml.

Pentru a prepara o suspensie de eritrocite de berbec sensibilizate a fost utilizată o diluție de ser hemolitic conținând 2 UHM/ml (de ex. dacă o diluție de 1:500 este luată ca 1 UHM/ml, atunci 2 UHM/ml este 1:250).

Titrrarea complementului

Inițial s-a pregătit o diluție de complement, folosind o soluție tampon, apoi au fost pregătite o serie de diluții duble în conformitate cu datele din tabelul 7.

Tabelul 7. Pregătirea diluțiilor complementului

Numărul tubului	Volumul de diluție al complementului, ml	Volumul soluției tampon, ml
1	0,1	1,2
2	0,2	1,1
3	0,3	1,0
4	0,4	0,9
5	0,5	0,8
6	0,6	0,7
7	0,7	0,6
8	0,8	0,5
9	0,9	0,4
10	1,0	0,3
11	1,1	0,2
12	1,2	0,1

Pentru a prepara probe-martor fără hemoliză, în trei tuburi s-a adăugat câte 1,3 ml de soluție tampon.

La prepararea de probe-martor cu hemoliză completă, în trei tuburi s-au adăugat câte 1,3 ml de apă purificată sterilă.

Apoi, în fiecare tub (cu diluții ale complementului 1-12 și probele martor), s-au adăugat câte 0,2 ml din sistemul hemolitic (format dintr-o suspensie de eritrocite de berbec și ser hemolitic) și conținutul tuburilor s-a amestecat bine. Tuburile au fost incubate la $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ timp de 60 de min, apoi 10 min răcite la o temperatură de $5 \pm 3^\circ\text{C}$ și 5 min centrifugate la 3000 rpm.

După centrifugare s-a măsurat densitatea optică a supernatantului la o lungime de undă de 541 nm. În calitate de soluție de referință s-a folosit soluția tampon fosfat.

Gradul de hemoliză (Y) a fost calculat după formula 7:

$$Y = \frac{A_p - A_o}{A_k - A_o} \quad \text{Formula (7)}$$

unde:

A_p – valoarea medie a densității optice a probei cercetate;

A_o – valoarea medie a densității optice a probelor de control fără hemoliză;

A_k – valoarea medie a densității optice a probei de control cu hemoliză completă.

Activitatea complementului în soluția inițială exprimată în unități hemolitice (50UH/ml), a fost calculată conform formulei 8:

$$50\text{UH/ml} = \frac{B}{C \times 5} \quad \text{Formula (8)}$$

unde:

B – mărimea, invers proporțională gradului de diluție a complementului;

C – cantitatea de complement dizolvat (ml), care produce hemoliza a 50% de eritrocite ($Y/(1-Y)=1$);

5 – multiplicatorul pentru evidența numărului de eritrocite.

După prepararea componentelor necesare testării, pe suprafața plăcii de geloză de 1,5%, cu pipeta Pasteur s-a inoculat suspensia de microorganisme studiate (densitatea optică a suspensiei microbiene conform standardului de turbiditate 1,0 Mac Farland). Plăcile inoculate au fost incubate în termostat la temperatura de 37°C timp de 18-24 de ore, pentru manifestarea proprietăților biologice ale microorganismelor. După expirarea timpului, culturile studiate au fost inactivate în vapori de cloroform timp de 10 min, după care plăcile s-au acoperit, pe o suprafață orizontală, cu al doilea strat care conținea 1,5 ml de geloză și 1 μl de complement (titrat în sistemul hemolitic până la activitatea de 50UH/ml, 25UH/ml și 12,5UH/ml), astfel ca concentrația finală a complementului să fie de 20; 10 și 5 UH/ml. Plăcile s-au incubat în poziție inversată la temperatura de 37°C timp de 1 oră pentru a realiza acțiunea anticomplementară a bacteriilor și a produselor vitale. După incubare, plăcile au fost acoperite cu al treilea strat de geloză de 0,7%. Acesta conținea 0,1 ml de suspensie bacteriană din cultura indicator (conform standardului 0,5 Mac Farland), cu o sensibilitate crescută la acțiunea bactericidă a sistemului complement. Plăcile au fost incubate la temperatura de 37°C timp de 18-24 de ore, pentru inactivarea complementului de către bacterii. Activitatea anticomplementară a fost evaluată după prezența zonelor de creștere a culturii indicator în jurul culturilor bacteriene testate, unde s-a produs inactivarea complementului [344].

Studierea efectului substanțelor chimice și biologice asupra exprimării factorilor de patogenitate ai microorganismelor

Pentru a studia efectul substanțelor chimice și biologice asupra exprimării factorilor de patogenitate, culturile microbiene de 24 de ore au fost co-incubate cu compusul testat la concentrațiile de 75,0%, de 50,0% și de 25,0% CMI, stabilite prin microtitrare în bulion, într-un raport de 1:9 la temperatura de 37°C timp de 1-18 ore. Pentru a exclude probabilitatea acțiunii substanțelor testate asupra componentelor tehnicilor utilizate, culturile au fost supuse centrifugării timp de 15 min la 3000 tur/min, iar supernatantul a fost separat de celule. În calitate de martor au fost utilizate aceleași culturi de microorganisme, incubate în aceleași condiții în bulion Müeller-Hinton. Factorii de patogenitate au fost determinați în conformitate cu metodele descrise mai sus. Indicele de activitate enzimatică (IAE) a fost calculat după cum urmează [348]:

$$\text{IAE} = \frac{\text{diametrul zonei de activitate enzimatică a tulpinei testate}}{\text{diametrul zonei coloniei tulpinii testate}}$$

Determinarea toxicității

Testul imobilizării acute

Pentru determinarea toxicității compușilor chimici, am efectuat testul de imobilizare a crustaceului *Daphnia magna*, conform unei proceduri descrise în legislația europeană [255]. Procedura stabilește metodologia de determinare a toxicității acute (CL_{50}) a unui compus față de dafnii.

Principiul metodei de testare. Dafniile de 24 de ore au fost expuse acțiunii compusului testat, într-o serie de concentrații, pe o perioadă de 24 de ore. Diferite concentrații ale compusului testat în condiții identice, exercită efecte diferite asupra capacității de înot a dafniilor, care duc la procente diferite de imobilizare.

Imobilizarea dafniilor s-a înregistrat la 48 de ore. Din datele obținute s-a determinat valoarea CL_{50} . Au fost considerate imobile dafniile care nu erau capabile să înoate în 15 sec după o agitare ușoară a vasului. Concentrația letală medie (CL_{50}) - reprezintă concentrația compusului testat care induce imobilizarea a 50% din dafnii.

Metode biochimice și imunochimice

În scopul elucidării efectelor compușilor chimici, biologici și a combinațiilor acestora asupra culturilor microbiene s-a acționat cu concentrații subinhibitoare pentru fiecare dintre compuși și pentru fiecare cultură bacteriană în parte (Tabelul 8). Pentru toate cele trei culturi bacteriene s-a preparat bulionul Müeller-Hinton și s-au repartizat câte 200 ml în flacoane cu volumul de 500 ml. În fiecare flacon s-au adăugat substanțele testate conform schemei din tabelul 2.5. Culturile bacteriene cu vârsta de 24 ore au fost adăugate astfel ca turbiditatea, conform standardului de turbiditate Mac Farland, să fie de 0,5, după care au fost incubate timp de 24 de ore la temperatura de 37°C [70].

Toate testările au fost realizate în trei repetiții. În calitate de martor a fost luată cultura bacteriană respectivă la care s-a adăugat solventul de probă în cantitate echivalentă cu cea care a fost adăugată cu compusul chimic. Proba-martor la fel a fost în trei repetiții.

Durata contactului culturii bacteriene cu compusul a fost de 24 de ore, după care masa celulară a fost separată prin centrifugare, fiind păstrată pentru testări ambele fracții. Probele au fost standardizate după conținutul uscat, astfel că masa celulară a avut concentrația de 200 mg/ml, iar lichidul cultural – de 10 mg/ml. Masa celulară a fost supusă procesului de înghețare-dezghetare pentru disponibilizarea compușilor intracelulari.

Tabelul 8. Concentrațiile compușilor luați în studiu

Compușul	Cultura bacteriană		
	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>
<i>MX</i> , μl/ml	10	10	10
<i>ES</i> , μl/ml	10	10	10
C ₁₄ H ₁₉ CuN ₇ O ₄ S, μg/ml	10	10	1
C ₁₀ H ₁₄ CuN ₄ O ₅ S ₂ , μg/ml	10	10	1
C ₁₃ H ₁₆ Br ₂ CuN ₄ S, μg/ml	10	10	1
C ₁₄ H ₁₉ CuN ₇ O ₄ S, μg/ml + <i>MX</i> , μl/ml	2,5+5,0	2,5+5,0	0,5+5,0
C ₁₄ H ₁₉ CuN ₇ O ₄ S, μg/ml + <i>ES</i> , μl/ml	2,5+5,0	2,5+5,0	0,5+5,0
C ₁₀ H ₁₄ CuN ₄ O ₅ S ₂ , μg/ml + <i>MX</i> , μl/ml	2,5+5,0	2,5+5,0	0,5+5,0
C ₁₀ H ₁₄ CuN ₄ O ₅ S ₂ , μg/ml + <i>MX</i> , μl/ml	2,5+5,0	2,5+5,0	0,5+5,0
C ₁₃ H ₁₆ Br ₂ CuN ₄ S, μg/ml + <i>MX</i> , μl/ml	2,5+5,0	2,5+5,0	0,5+5,0
C ₁₃ H ₁₆ Br ₂ CuN ₄ S, μg/ml + <i>MX</i> , μl/ml	2,5+5,0	2,5+5,0	0,5+5,0

Notă: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Determinarea acțiunii compușilor chimici și biologici, aparte și în combinație, asupra producerii spontane a indicilor biochimici și imunologici, a fost efectuată *in vitro*, conform procedurii descris de Râjcova S. și coaut., cu unele modificări [350].

Pregătirea materialului biologic. Sângele a fost recoltat de la 10 persoane sănătoase, cu vârsta cuprinsă între 25-30 de ani, dimineața pe nemâncate („a jeun”), în cantitate de 5 ml într-o seringă cu anticoagulant. În condiții aseptice, sângele a fost transferat într-un flacon cu 20 ml de mediu nutritiv Eagle modificat după Dulbecco (DMEM), heparină (2,5 un/ml), gentamicină (100 μg/ml) și L-glutamină (0,6 mg/ml).

Pentru studiul acțiunii compușilor noi asupra indicilor biochimici și imunologici, în godeurile unei plăci sterile cu 24 de godeuri s-au pipetat câte 0,9 ml din amestecul pregătit, apoi câte 0,1 ml de compus testat (compușii chimici au fost diluați cu sulfoxid de dimetil (DMSO) de 10% în doză de 1μM/L). În calitate de martor, pentru stabilirea nivelului inițial al indicilor studiați, în 2 godeuri paralele s-au pipetat câte 0,1ml de ser fiziologic sau diluant. Plăcile cu godeuri astfel pregătite au fost incubate la temperatura de 37°C timp de 48 de ore în incubatorul termostat cu CO₂.

După incubare, conținutul godeurilor a fost transferat în tuburi Eppendorf de 2,0 ml, centrifugate apoi timp de 5 min la 3000 rot/min. Supernatantul obținut a fost transferat în tuburi Eppendorf de 1,5 ml, depozitate la temperatura de 40°C până la determinarea indicilor biochimici și imunologici.

Testul de determinare a dialdehidei malonice. Testul permite monitorizarea unuia dintre produsele finale ale peroxidării lipidelor – dialdehida malonică (DAM). Acest compus este un marker recunoscut al stresului oxidativ și indică direct nivelul de degradare a lipidelor în celule

[124, 125, 308]. Testul bazat pe reacția DAM cu acidul tiobarbituric și quantificarea produsului acestei reacții, a fost realizat în modul următor: la 100 mg biomasă bacteriană s-a adăugat 1 ml de acid tricloracetic de 20%, amestecul fiind mojarat la rece. Masa omogenă obținută a fost centrifugată 5 min la 12 000 rot/min. În două tuburi identice cu dop rodat s-au transferat câte 0,4 ml de supernatant. În unul dintre tuburi, folosit ca martor, s-au adăugat 0,4 ml de acid tricloracetic de 20%. În cealălalt tub s-au adăugat 0,4 ml de acid tiobarbituric de 0,5%. Ambele tuburi s-au introdus în baia de apă preîncălzită la 98°C pentru 30 de min, după care s-au răcit până la temperatura camerei. După răcire s-a citit absorbanta la două lungimi de undă – la 532 nm și la 600 nm. Calculul s-a efectuat conform formulei 9:

$$C=(\Delta E/155)\cdot X\cdot V/m \quad \text{Formula (9)}$$

unde:

C – concentrația de DAM în mM/g substanță uscată;
ΔE – diferența de densitate optică la 532 și la 600 nm;
 155 – valoarea coeficientului de extincție ($\epsilon=155 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$);
X – diluția probei;
V – volumul probei.

Determinarea activității lactat dehidrogenazei. Cuantificarea activității lactat dehidrogenazei a fost realizată în lichidul cultural, aplicând metoda descrisă de Arokiyaraj și coaut [20, 111].

Această enzimă-cheie, care transformă piruvatul în lactat și asigură echilibrul redox în celule este eliberată în mediul extracelular doar la deteriorarea funcției de barieră semipermeabilă a membranei și a peretelui celular. De aceea, prezența acestei enzime în afara celulelor bacteriene, la interacțiunea cu agenții chimici ori biologici, este o dovadă a acțiunii nocive a acestora [109].

Mersul determinării: s-a preparat amestecul reactant ce conține 0,5 ml de piruvat de 100 mM, 5 mg NADH în 20 ml soluție tampon fosfat de potasiu de 500 mM cu pH 7. La acest amestec s-a adăugat 100 μL de lichid cultural. Absorbanta (A) s-a citit imediat și peste 5 min la lungimea de undă de 340 nm. Activitatea LDH s-a exprimat în unități internaționale per litru (U/L). O unitate exprimă cantitatea de lactat dehidrogenază, care reduce 1 μM de NAD per minut. Formula de calcul folosită 10:

$$C(U/L)=(((A_2-A_1)/\text{min} * V *1000)/d) * d * \epsilon Vp \quad \text{Formula (10)}$$

unde: *A*₁ – absorbanta citită imediat la 340 nm;
*A*₂ – absorbanta citită peste 5 min la 340 nm;
V – volumul total de reacție;

1000 – coeficientul de trecere de la U/ml la U/L ;
 d – calea fluxului luminos, în cm ;
 ε – coeficientul molar de extincție;
 V_{pr} – volumul probei, în ml .

Determinarea produselor proteice de oxidare avansată (PPOA) s-a efectuat conform procedurii descris de Capeillere-Blandin C., și coaut., modificat de Gudumac V. și coaut. [125]. Principiul metodei se bazează pe măsurarea absorbantei probei analizate la 340 nm , după prelucrarea prealabilă a acesteia cu o soluție de acid acetic. Calculul s-a efectuat după curba de calibrare întocmită folosind diluțiile succesive ale soluției standard de cloramină-T ($0-100\ \mu\text{mol/L}$), exprimată în $\mu\text{mol/L}$ echivalente de cloramină-T.

Determinarea activității superoxid dismutazei. Activitatea superoxid dismutazei (SOD) a fost determinată prin metoda al cărei principiu constă în utilizarea xantinei și xantinoxidazei (XOD) pentru generarea radicalului superoxid. Acesta din urmă reacționează cu clorura de 2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-feniltetrazolium (INT), formând formazanul de culoare roșie. Superoxid dismutaza inhibă această reacție, iar activitatea enzimei se măsoară după gradul de inhibare. O unitate de activitate SOD prezintă cantitatea de enzimă suficientă pentru a inhiba cu 50% rata de reducere a INT [299, 346].

Mersul determinării. Mai întâi, probele de lucru s-au diluat cu soluție tampon fosfat pH $7,0$ de $0,01\text{ mol/L}$, pentru a obține un nivel adecvat de inhibiție – $30\%-60\%$. Factorul de diluție pentru culturile studiate este de $200-300$. Apoi s-a preparat substratul reacției cu următoarea componență: $0,05\text{ mmol/L}$ xantină; $0,025\text{ mmol/L}$ INT în tampon (CAPS – 40 mmol/L , pH $10,2$ + EDTA $0,94\text{ mmol/L}$). La $60\ \mu\text{l}$ de probă diluată s-au adăugat 2 ml de substrat. După agitare s-au adăugat $300\ \mu\text{l}$ XOD (concentrația XOD - 80 U/L). Măsurarea absorbantei s-a făcut peste 30 min de la adăugarea substratului (A1), apoi peste 3 min de la prima măsurare (A2), contra aerului la temperatura de 37°C , în cuvă cu calea optică de 1 cm , la lungimea de undă de 505 nm . Calculul s-a efectuat pe baza curbei de calibrare cu utilizarea standardului (SOD).

Determinarea activității glutatation peroxidazei. Activitatea glutatation peroxidazei a fost determinată prin metoda în care glutadion peroxidaza (GPO) joacă rol de catalizator al reacției de oxidare a glutatationului de către hidropoxidul de cumen. În prezența glutatation reductazei și NADPH glutatationul oxidat este convertit în forma redusă, iar NADPH este oxidat în NADP^+ . Scăderea absorbantei la lungimea de undă de 340 nm este proporțională cu activitatea glutatation reductazei [298].

Mersul determinării. Proba s-a pregătit în modul următor: la $0,05\text{ ml}$ de probă s-a adăugat 1 ml de apă distilată. După incubare timp de 5 min s-a adăugat 1 ml de reactivul Drabkin dublu concentrat. Reactivul Drabkin include 3 componente: fosfat de potasiu de 104 mmol/L ,

ferocianura de potasiu de 60,8 mmol/L și cianură de potasiu de 78,8 mmol/L. Peste 20 min s-au adăugat 2,5 ml de reactiv cu următoarea componență: glutation 4 mmol/l, glutation reductaza $\geq 0,5$ U/l, NADH 0,34 mmol/l; apoi 0,1 ml de hidroperoxid de cumen de 0,18 mmol/l. Proba martor s-a preparat la fel, numai că în loc de 0,05 ml de probă s-au luat 0,05 ml de apă distilată. La finele reacției s-a citit absorbanta la 340 nm în cuvă cu calea optică de 1cm la temperatura de 37°C, apoi absorbanta s-a citit peste 2 min.

Calculul activității GPO s-a făcut pe baza formulei 11:

$$\text{U/L GPO} = 8412 \times \Delta A \text{ 340 nm/ min} \quad \text{Formula (11)}$$

Determinarea activității catalazei (CT). Testul colorimetric de determinare a activității CT aplicat în studiu se bazează pe cuantificarea H_2O_2 care rămâne în amestecul reactant după finalizarea acțiunii enzimei. În amestecul reactant, CT transformă H_2O_2 în apă și oxigen, după care reacția enzimatică este oprită cu azidă de sodiu. În amestecul de reacție se cuantifică cantitatea de H_2O_2 restantă. La baza determinării se află reacția de oxidoreducere dintre acidul 3,5-diclor-2-hidroxibenzensulfonic (care este un compus fenolic) și 4-aminoantipirină, în prezența H_2O_2 și peroxidazei. În urma acestei reacții se obține un colorant roșu quinonic (N-(4-antipiril) -3-clor-5-sulfonatep-benzochinonă-monoimină), absorbanta căruia se măsoară la 520 nm [28, 125].

Mersul determinării. Pentru realizarea testului s-a luat 25 μl probă la care s-au adăugat 50 μl soluție tampon fosfat, 500 mmol, pH 7,0. Pentru inițierea reacției s-au adăugat 25 μl soluție substrat (H_2O_2 de 50mM) și 900 μl soluție de stopare a reacției (azidă de sodiu). Proba s-a mixat și s-a lăsat la incubare timp de 5 min. Într-un tub Ependorf s-au luat 10 μl din amestec la care s-au adăugat 1 ml soluție de reactiv de culoare, apoi conținutul tubului s-a mixat prin inversie. Tuburile au fost ținute la temperatura camerei până la apariția culorii, după care s-a măsurat absorbanta la lungimea de undă de 520 nm.

Calculul s-a făcut cu utilizarea curbei de calibrare. Unitatea de activitate a catalazei exprimă cantitatea de catalază care descompune 1 μmol de H_2O_2 în oxigen și apă într-un minut la pH 7,0 la temperatura camerei și la o concentrație a substratului de 50 mM de H_2O_2 .

Determinarea activității antioxidante totale (AAT) prin metoda cu ABTS s-a efectuat conform metodei descrise de Re R. și coaut., modificată de Gudumac V. și coaut. Principiul metodei constă în degradarea radicalului 2,2-azinobis-3-etilbenzotiazolin-6-acid sulfonic (ABTS) la interacțiunea acestuia cu compușii testați cu proprietăți antioxidante [125, 347].

Mersul determinării. La soluția stoc a reactivului ABTS de 7 mM în apă deionizată, la care s-au adăugat 2,45 mM de persulfat de potasiu în raport de 1:1. Pentru formarea radicalului ABTS amestecul a fost plasat la întuneric, la temperatura camerei timp de 16 ore. Soluția de lucru

s-a obținut din soluția stoc, prin dizolvarea în etanol până la stabilizarea valorii absorbanței la $0,700 \pm 0,020$ unități la lungimea de undă de 734 nm. Reacția de reducere a decurs la temperatura camerei timp de 6 min., iar procentul de inhibiție s-a calculat conform formulei 12:

$$\% \text{ inhibiție} = (\text{Abst}=0 - \text{Abst}=6 \text{ min}) / \text{Abst}=0 * 100, \quad \text{Formula (12)}$$

Unde: *Abst=0 min* - valoarea absorbăței de $0,700 \pm 0,020$ la 734 nm a soluției ABTS⁺;
Abst=6 min - valoarea absorbăței după incubare.

Gradarea radicalului ABTS se stabilește prin măsurarea descreșterii absorbăței la 734 nm și se exprimă în $\mu\text{mol/L}$ supernatant.

Determinarea activității glutathion reductazei (GR) s-a efectuat conform metodei descrise de Vlasova S. și coaut., modificată de Gudumac V. și coaut. [125, 345]. Principiul metodei se rezumă la capacitatea enzimei de a reduce glutathionul oxidat în glutathion redus. Oxidarea coenzimei nicotinamid dinucleotid fosfat redus (NADPH) în nicotinamid dinucleotid fosfat (NADP) duce la micșorarea absorbăței mediului de reacție la 340 nm și această micșorare este proporțională cu activitatea enzimei. Activitatea GR se exprimă în $\mu\text{mol/s/L}$ supernatant.

Determinarea activității glutathion S transferazei (GST) s-a efectuat conform metodei propuse de Habig W. și coaut., modificată de Tagadiuc O. și coaut. [140, 300].

Metoda se bazează pe capacitatea enzimei GST de a cataliza reacția în care este utilizat GSH și un substrat electrophil, fapt ce duce la creșterea absorbăței mediului de reacție la 346 nm, proporțională cu activitatea enzimei. Activitatea GST se exprimă în $\mu\text{mol/s/L}$ supernatant.

Determinarea citokinelor pro- și antiinflamatoare, interleukina-1 β (IL-1 β), factorul de necroză tumorală alfa (TNF α), interleukina-6 (IL-6) și interleukina-10 (IL-10). Au fost aplicate kiturile ELISA sandwich, produse de firma Vector Best (Rusia), respectând instrucțiunile producătorului. Metoda se bazează pe utilizarea anticorpilor anticitokinici, denumiți anticorpi de captare (eng. „*capture antibodies*”), adsorbiți în godeurile microplăcii, care leagă specific antigenul (în cazul dat citokinele din proba biologică). După înlăturarea materialului neatașat, prin spălarea repetată cu soluția tampon de spălare, citokinele fixate reacționează cantitativ cu anticorpii anticitokinici marcați cu enzimă (eng. „*detection antibodies*”). Pentru înlăturarea anticorpilor nefixați, microplăcile au fost spălate repetat. După adăugarea substratului cromogen cantitatea produsului colorat a fost determinată prin spectrofotometriere la lungimea de undă de 540 nm. Intensitatea produsului colorat este direct proporțională cu concentrația citokinei în proba investigată.

2.3. Prelucrarea matematico-statistică a rezultatelor obținute

Rezultatele experimentale obținute au fost supuse analizei statistice cu aplicarea instrumentelor statisticii descriptive: media, mediana, abaterea standard, abaterea intercuartilă, valoarea minimă și cea maximă, vizualizate prin graficul violin în combinație cu boxplot. Unele date nu au distribuție normală (testate prin testul Shapiro Wilk), numărul unităților statistice fiind relativ mic. Aceste circumstanțe au servit ca indicatori pentru folosirea testului Friedman de evaluare comparativă dintre loturile studiate și lotul-martor. Luând în considerare designul cercetării, analiza post-hoc necesită o anumită libertate pentru identificarea efectelor studiate. Aceasta permite de a folosi corecția Benjamini Hochberg pentru comparațiile din loturile de cercetare. Baza de date și protocolul analizei statistice pot fi consultate în repozitoriului GitHub (<https://github.com/arnautoleg/Medication>).

2.4. Concluzii la capitolul 2

1. Design-ul cercetării, proiectat conform cerințelor metodologiei științifice aplicate în cercetările din domeniul sănătății, se compune din mai multe substudii pentru asigurarea realizării cu succes a scopului și a obiectivelor propuse.
2. Cercetările au fost efectuate în mai multe etape cu utilizarea metodelor istorico-bibliografice, matematico-statistice, analitico-epidemiologice, microbiologice, biochimice, imunochimice și de comparare.
3. Activitatea antimicrobiană a compușilor testați a fost cercetată pe tulpini de referință din colecțiile internaționale și pe tulpinile clinice izolate din ulcere trofice.
4. Metodele, descrise în acest capitol, au permis determinarea și evaluarea la un nivel științific aprofundat a acțiunii compușilor biologic activi asupra expresiei unor factori de patogenitate la izolatele testate, stabilirea acțiunii lor sinergice și efectului imunomodulator.
5. Rezultatele cercetării au fost supuse analizei statistice detaliate cu utilizarea diverselor metode matematice, ceea ce a permis aprecierea veridicității. Strategia analizei datelor a fost selectată în raport cu obiectivele propuse și tipul de date analizate, ceea ce a făcut posibilă formularea de concluzii și de recomandări practice.

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 95% 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* (Figura 5).

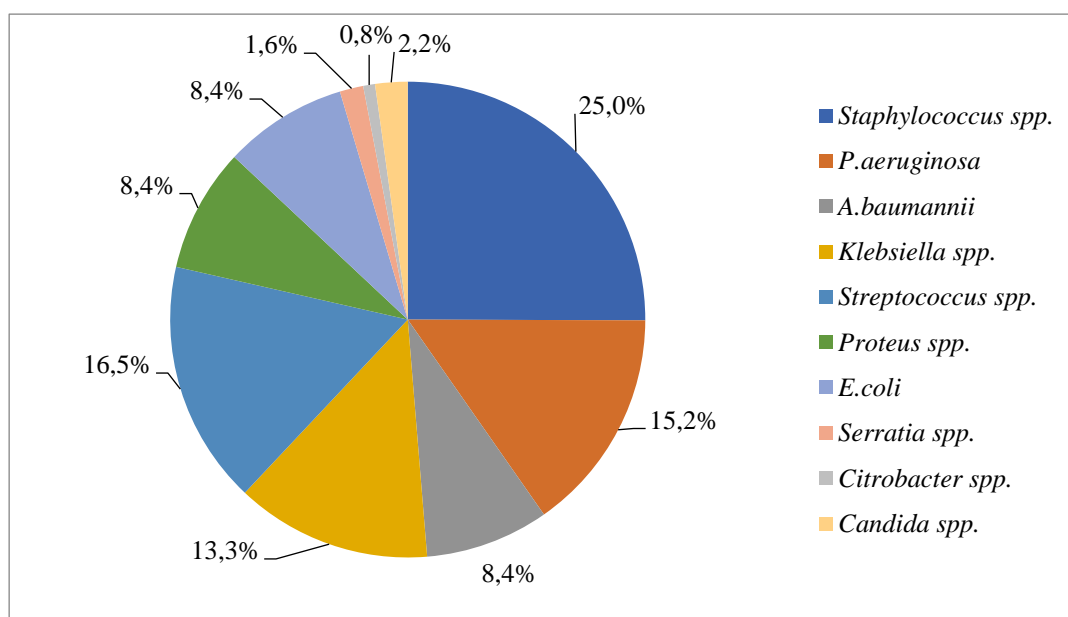


Figura 5. Spectrul și ponderea microorganismelor izolate din ulcere trofice

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. Rezistența la antimicrobiene a tulpinilor izolate din ulcere trofice

Rezistența la antimicrobiene a tulpinilor izolate din ulcere trofice a fost determinată prin metoda difuzimetrică și metoda diluțiilor succesive. Seturile de antimicrobiene utilizate, metodologia testării și interpretarea rezultatelor au fost efectuate în conformitate cu recomandările EUCAST.

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* meticilin-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 95% 12,2-13,0) – sensibile la toate antimicrobienele testate.

Tulpinile de stafilococi au prezentat o rezistență vădită la fluorchinolone: ciprofloxacină - 114 (72,2%; ÎI 95% 71,2-73,3) și levofloxacină - 96 (60,8%; ÎI 95% 59,8-61,8).

Cel mai ridicat nivel de sensibilitate a tulpinilor de *Staphylococcus* spp. a fost înregistrat față de glicopeptide (100%; ÎI 95% 99,9-101,0), urmate de tetraciline (91,8%; ÎI 95% 91,2-92,6), oxazolidone (89,9%; ÎI 95% 89,8-90,0) și amfenicoli (87,9%; ÎI 95% 87,8-88,0) (Tabelul 9).

Din cele 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 10).

Tabelul 9. Sensibilitatea/rezistența la antimicrobiene a tulpinilor de *Staphylococcus* spp. izolate din ulcere trofice

Preparatul antimicrobian	MRS (n = 69)		MSS (n = 89)		Total (n = 158)	
	n (%; Î 95%)		n (%; Î 95%)		n (%; Î 95%)	
	Sensibil	Rezistent	Sensibil	Rezistent	Sensibil	Rezistent
Cefalosporine						
Cefoxitină	0	100 (100; 102,8-97,2)	89 (100; 99,7-100,3)	0	89 (56,3; 56,2-56,4)	69 (43,7; 42,9-44,5)
Fluorchinolone						
Ciprofloxacină	17 (24,6; 23,1-26,1)	52 (75,4; 72,1-78,7)	27 (30,3; 30,0-30,6)	62 (69,7; 67,9-71,5)	44 (27,8; 27,0-28,6)	114 (72,2; 71,2-73,3)
Levofloxacină	26 (37,7; 35,9-39,5)	43 (62,3; 60,0-64,6)	36 (40,5; 39,1-41,9)	53 (59,5; 57,8-61,2)	62 (39,2; 38,4-40,0)	96 (60,8; 59,8-61,8)
Aminoglicozide						
Gentamicină	36 (52,2; 49,9-54,5)	33 (47,8; 43,7-51,9)	64 (71,9; 71,6-72,2)	25 (28,1; 26,9-29,3)	100 (63,3; 62,0-63,1)	58 (36,7; 36,0-37,5)
Amfenicoli						
Cloramfenicol	59 (85,5; 82,8-88,2)	10 (14,5; 13,4-15,6)	80 (89,9; 89,5-90,3)	9 (10,1; 9,4-11,8)	139 (87,9; 87,8-88,0)	19 (12,0; 11,6-12,4)
Ansamicine						
Rifampicină	51 (73,9; 71,4-76,4)	18 (26,1; 24,7-27,5)	71 (79,8; 79,4-80,2)	18 (20,2; 19,2-21,2)	122 (77,2; 77,1-77,3)	36 (22,8; 22,3-23,3)
MLS						
Eritromicină	23 (33,3; 31,4-35,2)	46 (66,7; 63,4-69,0)	47 (52,8; 52,5-53,1)	42 (47,2; 45,7-48,7)	70 (44,3; 44,2-44,4)	88 (55,7; 54,8-56,6)
Clindamicină	37 (53,6; 51,1-56,0)	32 (46,4; 44,5-48,3)	77 (86,5; 86,2-86,9)	12 (13,5; 12,7-14,3)	114 (72,1; 72,0-72,2)	44 (27,9; 27,3-28,5)
Tetracicline						
Tetraciclina	62 (89,8; 87,0-92,6)	7 (10,2; 9,3-11,1)	83 (93,2; 92,9-93,5)	6 (6,8; 6,2-7,4)	145 (91,8; 91,2-92,6)	13 (8,2; 7,9-8,5)
Oxazolidone						
Linezolid	56 (81,1; 78,4-83,4)	13 (18,9; 17,7-20,1)	64 (72,1; 71,8-72,5)	5 (5,6; 5,1-6,1)	142 (89,9; 89,8-90,0)	16 (10,1; 9,8-10,5)
Glicopeptide						
Vancomicină	69 (100; 97,1-102,9)	0	89 (100; 99,6-100,4)	0	158 (100; 99,9-100,1)	0

Notă: MRS – *Staphylococcus* meticilin-rezistent; MSS – *Staphylococcus* meticilin-sensibil; MLS – macrolide-lincozamide-streptogramine.

Tabelul 10. Fenotipurile de rezistență a tulpinilor de *Staphylococcus* spp. izolate din ulcere trofice

Fenotipurile	E	CM	Testul D	MRS	MSS	<i>Staphylococcus</i> spp. total
				n (%; Î 95%)	n (%; Î 95%)	n (%; Î 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 stafilococi coagulazo-negativi s-au dovedit a fi mai sensibile la toate grupele de preparate, în comparație cu tulpinile de *S. aureus*. Totodată indici de rezistență majorați s-au înregistrat la ciprofloxacina (69,7%; ÎI 95% 67,9-71,5) și eritromicina (47,2%; ÎI 95% 45,7-48,7).

Importanța clinică a speciilor de *Enterococcus* este corelată cu contribuția la colonizarea și la dezvoltarea infecției ca urmare a rezistenței lor la antimicrobiene. Tulpinile de *Enterococcus* spp. prezintă o varietate mare de mecanisme de rezistență intrinsecă și dobândită la clasele majore de antimicrobiene de uz clinic. Aceste specii sunt înzestrate și cu mecanisme genetice care facilitează diseminarea genelor de rezistență la antimicrobiene. În ultimele decenii au fost înregistrate tulpini de enterococi multirezistente la antimicrobiene, inclusiv la vancomicina, beta-lactame și aminoglicozide. Aceste tulpini sunt un agent patogen important al infecțiilor asociate asistenței medicale. Prin urmare, colonizarea cu enterococi servește drept rezervor pentru genele de rezistență la antimicrobiene care pot fi transmise de către aceștia altor specii de bacterii.

Tulpinile de *Enterococcus* spp., izolate din ulcere trofice, au prezentat un grad înalt de rezistență la fluorchinolone (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 tetracicline (45,3%; ÎI 95% 45,0-45,6). O sensibilitate mai înaltă a fost înregistrată la carbapeneme și la glicopeptide (57,3%) (Tabelul 11).

Tabelul 11. Sensibilitatea/rezistența la antimicrobiene a tulpinilor de *Enterococcus* spp. izolate din ulcere trofice

Preparatul antimicrobian	Nr. de tulpini	Sensibil	Rezistent
		n (%; ÎI 95%)	n (%; ÎI 95%)
Peniciline Ampicilină	75	41 (54,7; 54,1-55,3)	34 (45,3; 45,0-45,6)
Fluorchinolone Ciprofloxacina Levofloxacina	75 75	12 (16,0; 15,8-16,2) 16 (21,3; 20,9-21,7)	63 (84,0; 83,5-84,5) 59 (78,7; 78,2-79,2)
Tetracicline Tigeciclina	75	41 (54,7; 54,1-55,3)	34 (45,3; 45,0-45,6)
Carbapeneme Imipenem	75	43 (57,3; 57,1-57,5)	32 (42,7; 42,0-43,4)
Oxazolidone Linezolid	75	52 (69,3; 68,7-69,9)	23 (30,7; 30,3-31,1)
Glicopeptide Vancomicina	75	43 (57,3; 57,1-57,5)	32 (42,7; 42,0-43,4)
Sulfonamide Trimetoprim/sulfametoxazol	75	34 (45,3; 43,5-47,5)	41 (54,7; 54,3-55,1)

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% (ÎI 95% 55,1-59,1) la trimetoprim/sulfametoxazol și 54,3% (ÎI 95% 52,3-56,3) la tigeciclina.

Patologiile infecțioase, cauzate de bacili gram-negativi glucozofermentativi multirezistenți, sunt provocări majore în medicină, cauzând atât infecții asociate asistenței medicale, cât și comunitare, cu o rată sporită a complicațiilor și a letalității. Reprezentanții familiei *Enterobacteriaceae*, cum ar fi *E. coli*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp. etc., sunt foarte des implicați în procesele infecțioase nespecifice, în special în infecțiile asociate asistenței medicale. Rezistența la antimicrobiene a acestor specii este legată, în principal, de producerea de BLSE, dar sunt posibile și alte mecanisme de rezistență, ceea ce duce la dezvoltarea multirezistenței.

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

P. aeruginosa este un microorganism potențial patogen cu rezistență naturală la multe clase de antimicrobiene, inclusiv peniciline antipseudomonas, carbapeneme, aminoglicozide și fluorochinolone.

Cel mai ridicat nivel de sensibilitate a tulpinilor de *P. aeruginosa* a fost înregistrat față de carbapeneme (ertapenem - 91,7% (ÎI 95% 88,9-94,5), imipenem - 59,4% (ÎI 95% 57,1-61,7), meropenem - 55,2% (ÎI 95% 53,0-57,4)) și aminoglicozide (amicacină - 59,4% (ÎI 95% 57,1-61,7), tobramicină - 57,3% (ÎI 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% (ÎI 95% 94,9-98,9), piperacilină-tazobactam - 90,6% (ÎI 95% 88,6-92,6)), cefalosporine (cefepim - 84,4 (ÎI 95% 82,5-86,3), ceftazidim - 80,2% (ÎI 95% 78,3-82,1)), monobactame (aztreonam 83,3% (ÎI

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)) (Tabelul 12).

Tabelul 12. Sensibilitatea/rezistența la antimicrobiene a tulpinilor de *Pseudomonas aeruginosa* izolate din ulcere trofice

Preparatul antimicrobian	Nr. de tulpini	Sensibil	Rezistent
		n (%; Î 95%)	n (%; Î 95%)
Peniciline			
Ticarcilină	96	3 (3,1; 2,7-3,5)	93 (96,9; 94,9-98,9)
Piperacilină-tazobactam		9 (9,4; 8,8-10,0)	87 (90,6; 88,6-92,6)
Cefalosporine			
Cefepim	96	15 (15,6; 14,8-16,4)	81 (84,4; 82,5-86,3)
Ceftazidim		19 (19,8; 18,9-±20,7)	77 (80,2; 78,3-82,1)
Fluorchinolone			
Ciprofloxacina	96	24 (25,0; 24,0-26,0)	72 (75,0; 73,2-76,8)
Levofloxacina		27 (28,1; 27,0-29,2)	69 (71,9; 70,1-73,7)
Aminoglicozide			
Amicacina	96	57 (59,4; 57,1-61,7)	39 (40,6; 39,3-41,9)
Tobramicina		55 (57,3; 55,1-59,5)	41 (42,7; 41,4-44,1)
Monobactame			
Aztreonam	96	16 (16,7; 15,9-17,6)	80 (83,3; 81,4-85,2)
Carbapeneme			
Imipenem	96	57 (59,4; 57,1-61,7)	39 (40,6; 39,3-41,9)
Meropenem		53 (55,2; 53,0-57,4)	43 (44,8; 43,4-46,2)
Ertapenem		88 (91,7; 88,9-94,5)	8 (8,3; 7,7-8,9)

În ultimii ani, odată cu creșterea numărului de proceduri invazive, de utilizări nemotivate ale antibioticelor și de pacienți imunocompromiși, *Acinetobacter baumannii* a devenit endemic în spitale. Această bacterie a putut coloniza instituțiile medicale datorită aparatului genetic versatil, ce asigură perfecționarea rapidă a factorilor de rezistență, și capacității remarcabile de a tolera condiții dure de existență. Întrucât tulpinile de *A. baumannii* sunt multirezistente (MRAB), clinicienii se confruntă cu provocări grave atunci când tratează pacienții cu MRAB. Înțelegerea profundă a mecanismelor de rezistență ale MRAB poate face lumină asupra a două strategii posibile de combatere a diseminării rezistenței antimicrobiene: controlul strict al infecțiilor și folosirea antimicrobienei, terapia combinată pe bază de colistină fiind strategia principală. Creșterea ratei rezultatelor terapeutice nesatisfăcătoare impune dezvoltarea și evaluarea eficacității noilor antimicrobiene, elucidarea rolului altor alternative potențiale în tratamentul infecțiilor provocate de microorganisme polirezistente la preparatele antimicrobiene [74, 76, 330].

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) (Tabelul 13).

Tabelul 13. Sensibilitatea/rezistența la antimicrobiene a tulpinilor de *Acinetobacter baumannii* izolate din ulcere trofice

Preparatul antimicrobian	Nr. de tulpini	Sensibil	Rezistent
		n (%; Î 95%)	n (%; Î 95%)
Carbapeneme			
Imipenem	53	24 (45,3; 42,8-43,9)	29 (54,7; 53,6-55,8)
Meropenem	53	22 (41,5; 39,1-43,9)	31 (58,5; 55,3-61,4)
Ertapenem	53	48 (90,6; 87,0-94,2)	5 (9,4; 8,3-10,6)
Fluorchinolone			
Ciprofloxacină	53	5 (9,4; 8,3-10,6)	48 (90,6; 87,0-94,2)
Levofloxacină	53	12 (22,6; 20,8-24,4)	41 (77,4; 74,1-80,7)
Aminoglicozide			
Gentamicină	53	10 (18,9; 17,3-20,5)	43 (81,1; 77,7-84,5)
Amikacină	53	36 (67,9; 64,8-71,0)	17 (32,1; 30,0-34,2)
Tobramicină	53	40 (75,5; 72,2-78,9)	13 (24,5; 22,6-26,4)
Sulfonamide			
Trimetoprim/sulfametoxazol	53	10 (18,9; 17,3-20,5)	43 (81,1; 77,7-84,5)

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 (Anexa 2).

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.

Beta-lactamazele cu spectru extins sunt enzime care mediază rezistența la cefalosporinele cu spectru extins (a treia generație) (ex. ceftazidim, cefotaxim și ceftriaxon) și monobactame (ex. aztreonam), dar nu și la cefamicine (ex. cefoxitin și cefotetan) sau carbapeneme (ex. meropenem sau imipenem). Prezența unui microorganism producător de BLSE într-o infecție clinică poate duce la eșecul tratamentului, dacă se folosește unul din preparatele indicate mai sus.

BLSE pot fi dificil de detectat, deoarece au niveluri variate de activitate împotriva diferitor cefalosporine. Dacă se detectează o tulpină producătoare de BLSE, clasele de antimicrobiene precum penicilinele, cefalosporinele și aztreonamul trebuie raportate ca rezistente, chiar dacă rezultatele testelor *in vitro* demonstrează sensibilitate.

În prezentul studiu, prin teste fenotipice, au fost identificate 97 (27,3; 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; Î 95% 39,3-41,9), urmate de *K. pneumoniae* (36,9; Î 95% 35,7-38,1) și *E. coli* (33,9; Î 95% 32,7-35,1).

Totodată, 15 (28,3; Î 95% 27,0-29,6) tulpini de *A. baumannii*, 7 (8,3; Î 95% 7,6-9,0) de *K. pneumoniae* și 4 (4,2; Î 95% 3,47-4,93) de *P. aeruginosa* au fost producătoare de β -lactamaze de tip AmpC (Tabelul 14).

Tabelul 14. Tulpinile de bacili gram-negativi producătoare de BLSE și de β -lactamaze AmpC

Izolatul	Nr. de tulpini	BLSE		AmpC pozitive	
		test screening	test de confirmare	test screening	test de confirmare
<i>E. coli</i>	53	23 (43,4; 40,9-45,9)	18 (33,9; 32,7-35,1)	11 (20,7; 19,0-22,4)	2 (3,8; 3,1-4,5)
<i>K. pneumoniae</i>	84	33 (39,3; 37,8-40,8)	31 (36,9; 35,7-38,1)	29 (34,5; 33,1-35,9)	7 (8,3; 7,6-9,0)
<i>Proteus spp.</i>	54	3 (5,6; 4,7-6,5)	2 (3,7; 3,0-4,4)	3 (5,5; 4,6-6,4)	1 (1,8; 1,3-2,3)
<i>Serratia spp.</i>	10	1 (10,0; 9,3-10,7)	1 (10,0; 9,3-10,7)	0	0
<i>Citrobacter spp.</i>	5	0	0	0	0
<i>P. aeruginosa</i>	96	45 (46,9; 45,5-48,3)	39 (40,6; 39,3-41,9)	13 (13,5; 12,7-14,3)	4 (4,2; 3,47-4,93)
<i>A. baumannii</i>	53	8 (15,1; 13,6-16,6)	6 (11,3; 10,0-12,6)	21 (39,6; 37,2-42,0)	15 (28,3; 27,0-29,6)
Total	355	113 (31,8; 31,5-32,1)	97 (27,3; 27,0-27,6)	77 (21,7; 21,5-22,0)	29 (8,2; 8,0-8,4)

Notă: Valorile sunt prezentate n (%; Î 95%).

Introducerea carbapenemelor în practica medicală a sporit eficiența tratamentului infecțiilor bacteriene severe, cauzate de bacteriile rezistente la preparatele beta-lactamice. Datorită spectrului larg de activitate și stabilității la hidroliză de către majoritatea beta-lactamazelor, carbapenemele au fost utilizate în tratamentul infecțiilor cauzate de bacilii gram-negativi rezistenți la penicilină sau la cefalosporine, în special de tulpinile producătoare de BLSE. Însă bacilii gram-negativi nefermentativi *P. aeruginosa* și *Acinetobacter spp.* s-au dovedit a fi rezistenți la carbapeneme.

Dintre tulpinile de bacili gram-negativi izolate din ulcere trofice, 50 (16,6; 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 (Tabelul 15).

Tabelul 15. **Pattern-urile de rezistență a tulpinilor de *Enterobacteriaceae* și de *P. aeruginosa* izolate din ulcere trofice**

Izolatul	Carbapenemaze		<i>bla</i> _{NDM}	<i>bla</i> _{OXA-48}
	THM	genotipic		
<i>E. coli</i>	13 (24,5%; 22,6-25,4)	2 (3,8%; 3,1-4,5)	0	2 (3,8%; 3,1-4,5)
<i>K. pneumoniae</i>	19 (22,6; 21,5-23,7)	5 (5,9; 5,3-6,5)	1 (1,2; 0,9-1,5)	4 (4,8; 4,3-5,3)
<i>Proteus spp.</i>	1 (1,8; 1,3-2,3)	0	0	0
<i>Serratia spp.</i>	1 (10,0; 8,8-11,2)	0	0	0
<i>Citrobacter spp.</i>	0	0	0	0
<i>P. aeruginosa</i>	16 (16,7; 15,9-17,6)	2 (2,1; 1,8-2,4)	0	2 (2,1; 1,8-2,4)
Total	50 (16,6; 16,4-16,8)	9 (3,0; 2,9-3,1)	1 (0,3; 0,26-0,34)	8 (2,6; 2,5-2,7)

Notă: THM – testul Hodje modificat. Valorile sunt prezentate n (%±; ÎÎ 95%).

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±0,58% (ÎÎ 95% 5,3-6,5) izolate de *K. pneumoniae*, 3,8±0,73% (ÎÎ 95% 3,1-4,5) - *E. coli* și 2,1±0,30% (ÎÎ 95% 1,8-2,4) tulpini de *P. aeruginosa*. Cel mai frecvent tip de carbapenemază detectat a fost OXA-48 (2,6±0,10%; ÎÎ 95% 2,5-2,7), urmat de NDM (0,3±0,26%; ÎÎ 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±1,15% (ÎÎ 95% 8,4-10,7) de cazuri au prezentat gene de rezistență la carbapeneme, dintre care în 5,7±0,90% (ÎÎ 95% 4,8-6,6) de cazuri gena *bla*_{OXA-23} și în 3,8±0,73% (ÎÎ 95% 3,1-4,5) de cazuri gena *bla*_{OXA-58} (Tabelul 16).

Tabelul 16. **Pattern-urile de rezistență a tulpinilor de *A. baumannii* izolate din ulcere trofice**

Izolatul	Nr. de tulpini	Carbapenemaze		<i>bla</i> _{OXA-23}	<i>bla</i> _{OXA-58}
		THM	genotipic		
<i>A. baumannii</i>	53	11 (20,7; 19,0-22,4)	5 (9,5; 8,4-10,7)	3 (5,7; 4,8-6,6)	2 (3,8; 3,1-4,5)

Notă: Valorile sunt prezentate n (%±; ÎÎ 95%).

Conform multiplelor studii, gena *bla*_{OXA-23} este una dintre cele mai răspândite gene la tulpinile de *A. baumannii* rezistente la carbapeneme. Identificarea specifică și rapidă a genelor de rezistență la tulpinile de *A. baumannii* va oferi informații despre precauțiile terapeutice și de control a infecțiilor asociate asistenței medicale.

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

Patogenitatea microbială cuprinde totalitatea mecanismelor biochimice, prin care microorganismele conditionează dezvoltarea bolii. Nu toate microorganismele patogene sau potențial 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%; ÎI 95% 51,6-52,0), dintre care 184 (51,8%; ÎI 95% 51,4-52,2) tulpini de bacili gram-negativi și 172 (65,6%; ÎI 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%; ÎI 95% 64,7-66,5), urmați de bacilii gram-negativi nefermentativi (59,1%; ÎI 95% 58,2-60,0) și enterobacterii (46,6%; ÎI 95% 45,8-47,9) (Anexa 3).

Enzimele lecitinaza și lipaza sunt cunoscute ca toxine formatoare de pori. Ele acționează prin formarea de pori la nivelul membranei celulei bacteriene, asigurând diseminarea infecției în macroorganism.

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. ($70,4 \pm 1,60\%$; ÎI 95% 68,8-72,3), *P. aeruginosa* ($65,6 \pm 0,49\%$; ÎI 95% 65,1-66,1) și *K. pneumoniae* ($57,1 \pm 0,45\%$; ÎI 95% 56,7-57,6). Producerea de lecitinază a fost înregistrată la un număr mai mare de bacilli gram-negativi glucozo-nefermentativi ($52,3 \pm 1,02\%$; ÎI 95% 51,3-53,3), în comparație cu tulpinile de bacilli gram-negativi glucozo-fermentativi ($48,1 \pm 0,98\%$; ÎI 95% 47,1-49,1). Sinteza acestei enzime a fost înregistrată la $58,8 \pm 0,99\%$ (ÎI 95% 57,8-59,8) dintre cocii gram-pozitivi, întâietatea revenind speciei *S. aureus* (100%) (Anexa 3).

Producători de lipază s-a dovedit a fi un număr mare de tulpini atât gram-negative ($77,2 \pm 1,41\%$; ÎI 95% 71,1-73,8), cât și gram-pozitive ($70,2 \pm 0,36\%$; ÎI 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%) (Anexa 3).

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. Această enzimă de patogenitate a fost mai des înregistrată la tulpinile de coci gram-pozitivi ($43,9 \pm 0,50\%$; ÎI 95% 43,4-44,4), comparativ cu bacili gram-negativi ($42,2 \pm 0,49\%$; ÎI 95% 41,7-42,7). Dintre bacili gram-negativi, acest factor de patogenitate a fost mai exprimat la tulpinile de enterobacterii ($61,7 \pm 0,59\%$; ÎI 95% 61,1-62,3), în comparație cu bacili gram-negativi nefermentativi ($15,4 \pm 0,29\%$; ÎI 95% 15,1-15,7) (Anexa 3).

Hidrolazele, precum amilaza, au importanță majoră în metabolismul microbial, 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 bacili 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 caseinaza) 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 (caseinaza – $75,6 \pm 0,74\%$ (ÎI 95% 74,9-76,3), gelatinaza – $65,6 \pm 0,37\%$ (ÎI 95% 65,2-66,0), în special la tulpinile de *S. aureus* și *Enterococcus* spp – $77,3 \pm 0,41\%$ (ÎI 95% 76,9-77,7) (Anexa 3).

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 6).

Determinarea și compararea gradului de exprimare a factorilor de patogenitate enzimatici la tulpinile de bacili gram-negativi (Figura 7) și coci gram-pozitivi (Figura 8) multirezistenți la antimicrobiene și sensibile a arătat că acesta este mai înalt la tulpinile multirezistente, atât la bacili 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.

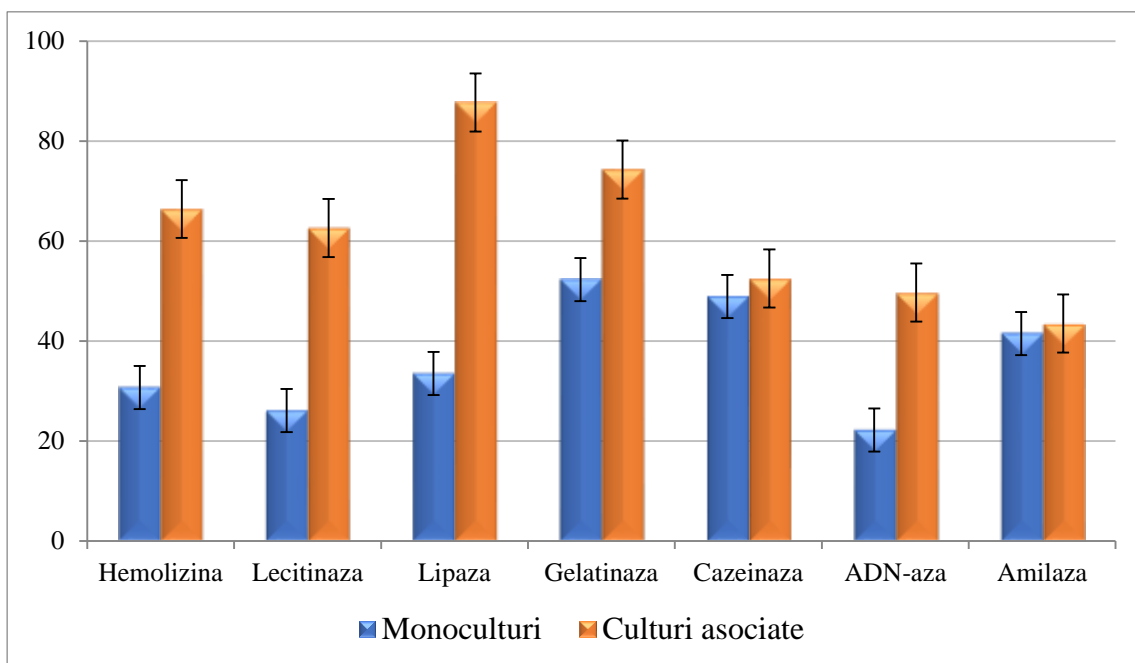


Figura 6. Expriarea factorilor enzimatici de patogenitate la tulpinile izolate în monoculturi și în asociații (%)

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%) (Figura 8).

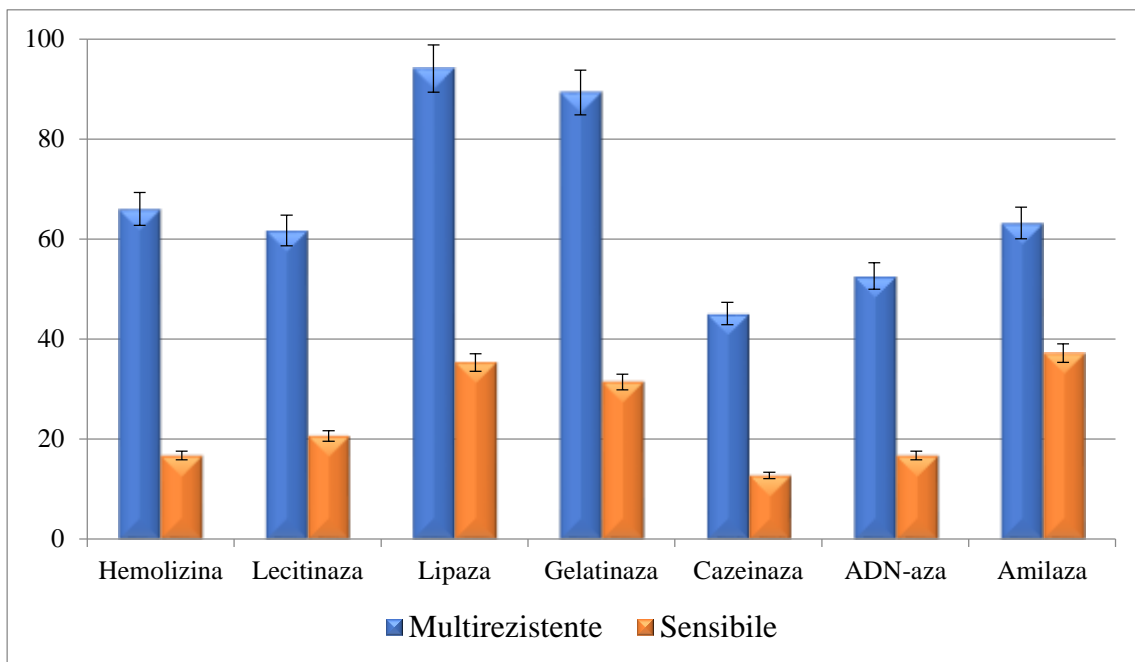


Figura 7. Expriarea factorilor enzimatici de patogenitate la tulpinile de BGN multirezistente și sensibile la antimicrobiene (%)

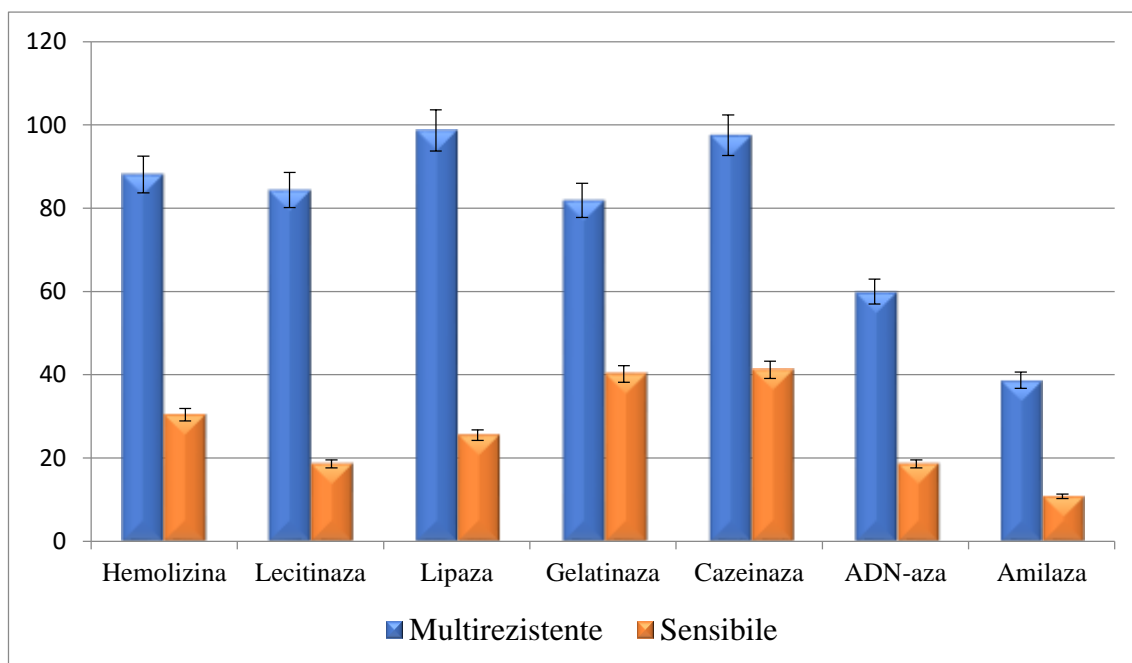


Figura 8. **Exprimarea factorilor enzimatici de patogenitate la tulpinile de coci gram-pozitivi multirezistente și sensibile la antimicrobiene (%)**

Un alt factor de patogenitate analizat în prezentul studiu a fost activitatea antilizozim a microorganismelor izolate. Lizozimul, un factor de rezistență universal al macroorganismului, distruge peptidoglicanul, preponderent la bacteriile gram-pozitive, dar exercită acțiune și asupra bacteriilor gram-negative prin mărirea permeabilității membranei externe și lipopolizaharidelor. De aceea, protejarea împotriva acestei enzime este una dintre tacticile importante adoptate de microorganisme pentru ași asigura supraviețuirea pe termen lung în organismul-gazdă. 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) (Tabelul 17).

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 17).

Tabelul 17. Capacitatea de inactivare a lizozimului a tulpinilor izolate din ulcere trofice

Gradul de exprimare a 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

Rezultatele comparării capacității de inactivare a lizozimului 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 9.

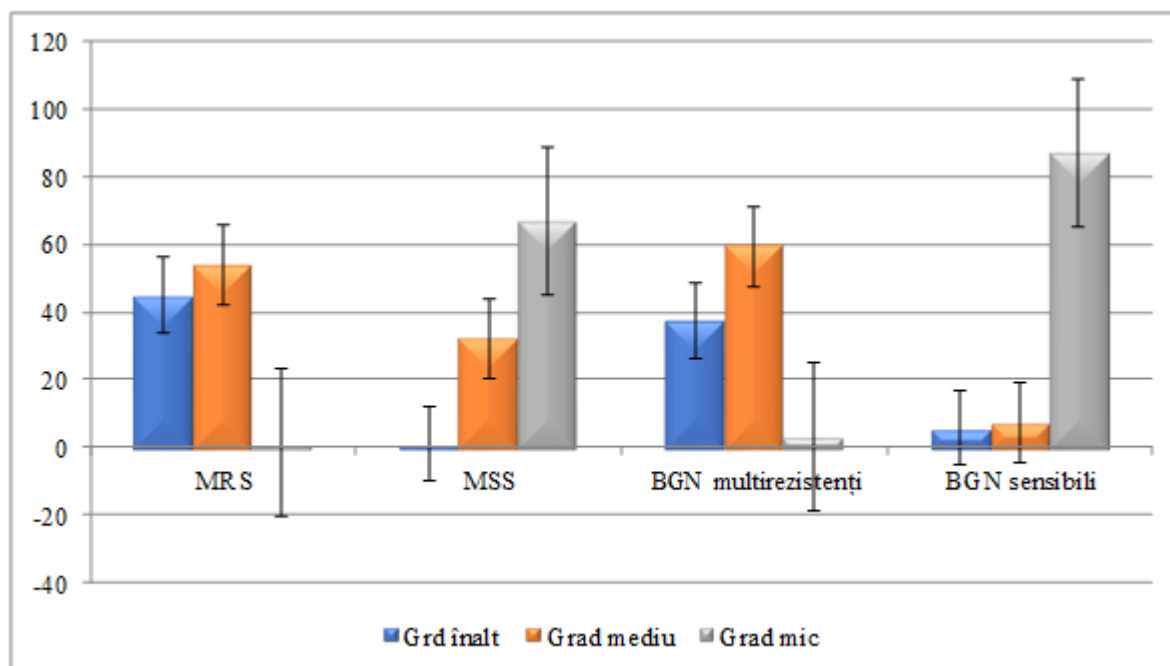


Figura 9. Capacitatea de inactivare a lizozimului a tulpinilor multirezistente și sensibile la antimicrobiene (%)

Toate tulpinile MRS, 100% (ÎI 95% 97,1-100,0), au inactivat lizozimul, 45,0% (ÎI 95% 43,1-46,9) prezentând un grad înalt de exprimare a activității antilizozim, 53,7% (ÎI 95% 51,6-55,8) – grad mediu și 1,3% (ÎI 95% 1,0-1,6) – grad mic. Tulpinile MSS au inactivat lizozimul în proporție de 97,1% (ÎI 95% 94,9-99,3), dintre care 1,0% (ÎI 95% 0,8-1,1) au prezentat un grad înalt de exprimare a activității antilizozim, 32,3% (ÎI 95% 31,0-33,06) – grad mediu și 66,8% (ÎI 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±1,36% (ÎÎ 95% 97,0-99,8) de tulpini multirezistente au prezentat această capacitate, dintre care la 37,4±0,84% (ÎÎ 95% 36,6-38,2) s-a înregistrat un grad înalt de exprimare, la 59,4±1,06% (ÎÎ 95% 58,3-60,5) – grad mediu și la 3,2±0,25% (ÎÎ 95% 3,0-3,4) – grad mic.

Tabelul 18. Capacitatea de a inactiva complementul a tulpinilor izolate din ulcere trofice

Microorganismul	Tulpinile care au inactivat complementul, n (%; ÎÎ 95%)	Concentrația complementului		
		15 CH50/ml, n (%; ÎÎ 95%)	5-15 CH50/ml, n (%; ÎÎ 95%)	5 CH50/ml, n (%; ÎÎ 95%)
<i>S.aureus</i>	136 (98,6; 97,2-100,0)	80 (58,8; 57,7-59,9)	17 (12,5; 12,0-13,0)	39 (28,7; 27,9-29,5)
SCN	15 (75,0; 66,4-83,6)	9 (60,0; 52,3-67,7)	5 (33,3; 27,3-39,0)	1 (6,7; 4,1-9,3)
<i>S. pyogenes</i>	29 (100; 90,3-109,7)	22 (75,9; 69,9-81,9)	4 (13,8; 11,3-16,4)	3 (10,3; 8,1-12,5)
<i>Enterococcus</i> spp.	75 (100; 97,4-102,6)	69 (92,0; 89,5-94,5)	3 (4,0; 3,5-4,5)	3 (4,0; 3,5-4,5)
<i>P. aeruginosa</i>	89 (92,7; 90,7-94,7)	71 (79,8; 78,0-81,7)	17 (19,1; 18,2-20,0)	1 (1,1; 0,6-1,7)
<i>A.baumannii</i>	50 (94,3; 90,9-98,0)	46 (92,0; 88,4-95,6)	3 (6,0; 5,1-6,9)	1 (2,0; 1,5-2,5)
<i>E.coli</i>	49 (92,5; 90,9-94,1)	41 (83,7; 80,3-87,1)	6 (12,2; 10,9-13,5)	2 (4,1; 3,3-4,9)
<i>Proteus</i> spp.	50 (92,6; 89,9-96,2)	43 (86,0; 82,6-89,4)	5 (10,0; 8,8-11,2)	2 (4,0; 3,4-4,6)
<i>Klebsiella</i> spp.	82 (97,6; 95,3-99,9)	80 (97,6; 95,4-99,9)	2 (2,4; 2,1-2,8)	0
<i>Serratia</i> spp.	9 (90,0; 71,1-98,9)	5 (55,6; 40,8-70,4)	3 (33,3; 21,8-44,8)	1 (11,1; 4,5-17,1)
<i>Citrobacter</i> spp.	4 (80,0; 44,4-115,6)	4 (100; 60,2-139,8)	0	0
<i>Candida</i> spp.	13 (92,9; 79,2-106,6)	11 (84,6; 71,5-97,7)	2 (15,4; 9,8-21,0)	0
Total	601 (95,2; 94,9-95,5)	480 (79,9; 79,6-80,2)	68 (11,3; 11,2-11,4)	53 (8,8; 8,7-8,9)

Tulpinile sensibile de BGN au inactivat lizozimul în 66,7±1,12% (ÎÎ 95% 65,6-67,8) de cazuri, dintre care 5,9±0,33% (ÎÎ 95% 5,6-6,2) au prezentat un grad înalt de exprimare a activității antilizozim, 7,3±0,37% (ÎÎ 95% 6,9-7,7) – grad mediu și 86,8±1,28% (ÎÎ 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. Dintre cele 631 de tulpini studiate, 601 (95,2±0,31%; ÎÎ 95% 94,9-95,5) au prezentat activitate

anticomplementară, dintre care 480 ($79,9 \pm 0,28\%$; ÎÎ 95% 79,6-80,2) au inactivat complementul la o concentrație mai mare de 15 CH50/ml, 68 ($11,3 \pm 0,11\%$; ÎÎ 95% 11,2-11,4) – la o concentrație de la 5 CH50/ml până la 15 CH50/ml și 53 ($8,8 \pm 0,09\%$; ÎÎ 95% 8,7-8,9%) – la o concentrație de 5 CH50/ml. Nu au inactivat complementul doar 30 de tulpini ($4,8 \pm 0,07\%$; ÎÎ 95% 4,73-4,87%) (Tabelul 18).

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 10.

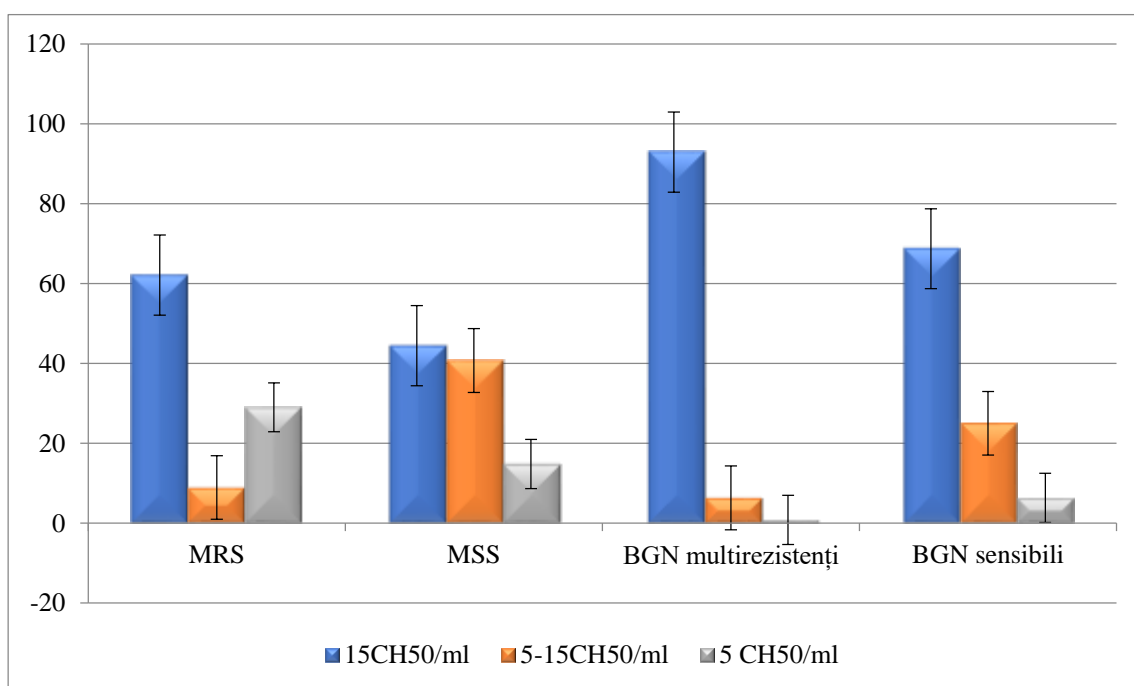


Figura 10. **Capacitatea de inactivare a complementului a tulpinilor multirezistente și sensibile la antimicrobiene (%)**

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 concentrație de 15 CH50/ml, $8,9 \pm 0,09\%$ (ÎÎ 95% 8,8-9,0) – la concentrația de la 5 CH50/ml până la 15 CH50/ml și $29,0 \pm 0,16\%$ (ÎÎ 95% 28,8-29,2) – la o concentrație de 5 CH50.

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 15 CH50/ml, $40,7 \pm 0,19\%$ (ÎÎ 95% 40,5-40,9) – la concentrația de 5-15 CH50/ml și $14,8 \pm 0,12\%$ (ÎÎ 95% 14,7-14,9) – la concentrația de 5 CH50.

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 15 CH50/ml, $92,9 \pm 1,32\%$ (Î 95% 91,6-94,2) și $68,7 \pm 1,14\%$ (Î 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 ($p=0,028$).

Marea majoritate a infecțiilor implică și formarea de biofilme microbiene. Biofilmul este definit ca agregat de microorganisme în care celulele bacteriene aderă împreună la o suprafață, fiind încorporate într-o matrice sintetizată din substanța polimerică extracelulară. Biofilmele se pot forma pe suprafețe vii sau nevii și pot fi răspândite pretutindeni în natură. Principalele caracteristici ale biofilmelor sunt rezistența crescută la preparate dezinfectante, antimicrobiene, deoarece matricea extracelulară densă și stratul exterior de celule protejează interiorul comunității.

În prezentul studiu, din cele 631 de tulpini izolate din ulcere trofice, 462 ($73,2 \pm 0,27\%$; Î 95% 72,9-73,5) au produs biofilm detectabil ($DO > 0,056$), iar 169 ($26,8 \pm 0,16\%$; Î 95% 26,6-27,0) nu au produs biofilm ($DO \leq 0,056$). În ceea ce privește statutul de biofilm, 193 ($41,8 \pm 0,20\%$; Î 95% 41,6-42,0) de izolate au produs biofilm puternic ($DO > 0,220$), 202 ($43,7 \pm 0,21\%$; Î 95% 43,5-43,9) – biofilm moderat ($DO 0,112-0,220$) și 67 ($14,5 \pm 0,12\%$; Î 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 ($78,0 \pm 0,50\%$; Î 95% 77,5-78,5), în special la *Proteus* spp. ($87,0 \pm 3,34\%$; Î 95% 83,6-90,4), *Klebsiella* spp. ($86,9 \pm 2,21\%$; Î 95% 84,5-88,9), *Citrobacter* spp. ($80,0 \pm 35,6\%$; Î 95% 44,5-115,6), *P. aeruginosa* ($73,9 \pm 1,78\%$; Î 95% 72,1-75,7) și *A. baumannii* ($73,6 \pm 3,22\%$; Î 95% 70,4-76,8).

Biofilm puternic aderent au format $44,8 \pm 0,42\%$ (Î 95% 44,4-45,2) dintre tulpini, $42,9 \pm 0,47\%$ (Î 95% 42,5-43,3) - biofilm moderat aderent și $12,3 \pm 0,25\%$ (Î 95% 12,1-12,5) - biofilm slab aderent (Tabelul 19).

La analiza relației dintre capacitatea de formare a biofilmelor și rezistența tulpinilor de bacili gram-negativi la antimicrobiene (Tabelul 20) s-a constatat că din izolatele care formează biofilm, $52,3 \pm 0,52\%$ (Î 95% 51,8-52,8) erau tulpini MDR, $31,4 \pm 0,40\%$ (Î 95% 31,0-31,8) – XDR și doar $16,2 \pm 0,25\%$ (Î 95% 15,9-16,5) – non-MDR.

Tabelul 19. Capacitatea de formare a biofilmelor a tulpinilor de bacili gram-negativi izolate din ulcere trofice

Microorganismul	Non-producătoare de biofilm (n=78)	Producătoare de biofilm (n=277)		
		Puternic aderente	Moderat aderente	Slab aderente
	n (%; Î 95%)	n (%; Î 95%)	n (%; Î 95%)	n (%; Î 95%)
<i>P.aeruginosa</i>	25 (26,0; 24,9-57,1)	30 (42,3; 38,0-46,5)	37 (52,1; 48,2-56,0)	4 (5,6; 4,4-6,8)
<i>A.baumannii</i>	14 (26,4; 24,5-28,3)	15 (38,5; 30,3-46,7)	6 (15,4; 14,1-16,7)	18 (46,1; 38,6-53,6)
<i>E.coli</i>	17 (32,1; 30,0-34,2)	12 (33,3; 23,7-42,9)	19 (52,8; 45,2-60,4)	5 (13,9; 12,4-15,4)
<i>Proteus</i> spp.	7 (12,9; 11,6-14,2)	11 (23,4; 15,2-32,2)	33 (70,2; 65,2-75,6)	3 (6,4; 4,7-8,1)
<i>Klebsiella</i> spp.	11 (13,1; 12,4-14,0)	51 (69,9; 66,6-73,4)	19 (26,0; 20,7-31,3)	3 (4,1; 2,8-5,4)
<i>Serratia</i> spp.	3 (30,0; 19,1-40,9)	3 (42,9; 38,6-47,2)	3 (42,9; 38,6-47,2)	1 (14,2; 6,7-21,8)
<i>Citrobacter</i> spp.	1 (20,0; 2,2-37,8)	2 (50,0; 43,0-57,0)	2 (50,0; 43,0-57,0)	0 (0; 0-0)
Total	78 (22,0; 21,7-22,3)	124 (44,8; 44,4-45,2)	119 (42,9; 42,5-43,3)	34 (12,3; 12,1-12,5)

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% 56,0-58,4) 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.

Tabelul 20. Relația dintre capacitatea de formare a biofilmelor și rezistența la antimicrobiene a tulpinilor de bacili gram-negativi izolate din ulcere trofice

Capacitatea de formare a biofilmelor	Profilurile de sensibilitate la antimicrobiene a izolatelor			
	Tulpini izolate (n=355)	Inclusiv		
		Non-MDR 28,7% (102/355)	MDR 45,6% (162/355)	XDR 25,6% (91/355)
n (%; Î 95%)	n (%; Î 95%)	n (%; Î 95%)	n (%; Î 95%)	
Lipsa formării de biofilme	78 (22,0; 21,8-23,8)	57 (55,9; 53,7-58,1)	17 (10,5; 9,3-11,7)	4 (4,4; 4,3-4,9)
Formare de biofilme	277 (78,0; 77,5-78,5)	45 (44,1; 43,8-44,4)	145 (89,5; 89,0-90,0)	87 (95,6; 95,2-96,0)
-biofilm puternic aderent	124 (44,8; 43,8-45,9)	4 (8,9; 7,8-10,0)	60 (41,4; 40,4-42,4)	61 (70,1; 68,9-71,3)
-biofilm moderat aderent	119 (43,0; 41,9-44,1)	14 (31,1; 30,7-31,7)	83 (57,2; 56,0-58,4)	22 (25,3; 24,3-26,3)
-biofilm slab aderent	34 (12,2; 10,2-14,2)	18 (60,0; 56,3-63,7)	2 (1,4; 0,1-2,5)	4 (4,6; 2,9-6,3)

Notă: MDR – rezistență multiplă la antimicrobiene; XDR – rezistență extinsă la antimicrobiene.

Biofilm detectabil au format $67,6 \pm 0,62\%$ (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. ($86,7 \pm 2,47\%$ (Î 95% 84,2-89,2)), urmate în ordinea descreșterii incidenței de SCN ($65,0 \pm 8,02\%$ (Î 95% 57,0-73,0)), *S.pyogenes* ($62,1 \pm 5,41\%$ (Î 95% 56,7-67,5)) și *S.aureus* ($58,7 \pm 1,10\%$ (Î 95% 57,6-59,8)). Biofilm puternic aderent au format 65 ($36,7 \pm 1,85\%$ (Î 95% 34,85-38,55)) dintre tulpinile de coci gram-pozitivi, biofilm moderat aderent – 80 ($45,2 \pm 1,67\%$ (Î 95% 43,53-46,87)) și biofilm slab aderent – 32 ($18,1 \pm 2,65\%$ (Î 95% 15,45-20,75)) (Tabelul 21).

Tabelul 21. Capacitatea de formare a biofilmelor a tulpinilor de coci gram-pozitivi izolate din ulcere trofice

Microorga-nismul	Tulpini non-producătoare de biofilm (n=85) $32,4 \pm 0,43$	Tulpini producătoare de biofilm n=177; $67,6 \pm 0,62$		
		Puternic aderente (n=65) $36,7 \pm 1,85$	Moderat aderente (n=80) $45,2 \pm 1,67$	Slab aderente (n=32) $18,1 \pm 2,65$
		n (%; Î 95%)	n (%; Î 95%)	n (%; Î 95%)
<i>S. aureus</i>	57 (41,3; 40,4-42,2)	29 (35,8; 34,9-36,7)	34 (42,0; 41,0-43,0)	18 (22,2; 21,5-22,9)
SCN	7 (35,0; 29,1-40,9)	6 (46,2; 39,4-53,0)	4 (30,8; 25,3-36,3)	3 (23,0; 18,2-27,8)
<i>S. pyogenes</i>	11 (37,9; 33,5-42,1)	10 (55,5; 50,4-40,6)	5 (27,8; 24,2-31,4)	3 (16,7; 13,9-19,5)
<i>Enterococcus</i> spp.	10 (13,3; 12,3-14,3)	20 (30,8; 29,3-32,3)	37 (56,9; 64,9-58,9)	8 (12,3; 11,4-13,2)

La studierea relației dintre capacitatea de formare a biofilmelor și rezistența la meticilină a tulpinilor de stafilococi (Tabelul 22) a ieșit în evidență capacitatea semnificativ mai mare de formare a biofilmului a tulpinilor MRS ($94,2 \pm 2,80\%$; Î 95% 91,4-97,0), în comparație cu tulpinile MSS ($32,6 \pm 1,28\%$; Î 95% 31,3-33,9) ($p=0,036$).

Tulpinile de stafilococi meticilin-rezistente au format preponderent biofilme puternic aderente ($50,8 \pm 2,06\%$; Î 95% 48,7-52,9) și moderat aderente ($44,6 \pm 1,93\%$; Î 95% 42,7-46,5), pe când la tulpinile de stafilococi meticilin-sensibile au prevalat biofilmele slab aderente ($62,1 \pm 1,76\%$; Î 95% 61,3-63,9). Dintre tulpinile MRS doar $5,8 \pm 0,69\%$ (Î 95% 5,1-6,5) nu au format biofilm detectabil, iar dintre tulpinile MSS – $67,4 \pm 1,87\%$ (Î 95% 65,5-69,3).

Tabelul 22. Relația dintre capacitatea de formare a biofilmelor și rezistența la meticilină a tulpinilor de stafilococi izolate din ulcere trofice

Capacitatea de formare a biofilmelor	Tulpini izolate (n=158)	MRS (n=69)	MSS (n=89)
	n (%; ÎÎ 95%)	n (%; ÎÎ 95%)	n (%; ÎÎ 95%)
Lipsa formării de biofilme	64 (40,5; 39,7-41,3)	4 (5,8; 5,1-6,5)	60 (67,4; 65,5-69,3)
Formare de biofilme	94 (59,5; 58,5-60,4)	65 (94,2; 91,4-97,0)	29 (32,6; 31,3-33,9)
-biofilm puternic aderent	35 (37,2; 36,4-38,0)	33 (50,8; 48,7-52,9)	2 (6,9; 6,3-7,5)
-biofilm moderat aderent	38 (40,4; 39,6-41,2)	29 (44,6; 42,7-46,5)	9 (31,0; 29,8-32,2)
-biofilm slab aderent	21 (22,3; 21,7-22,9)	3 (4,6; 4,0-5,2)	18 (62,1; 61,3-63,9)

Notă: MRS – *Staphylococcus meticilin-rezistent*; MSS – *Staphylococcus meticilin-sensibil*.

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 $75,0 \pm 1,94\%$ (ÎÎ 95% 73,1-76,9) de cazuri (Figura 11).

Tulpinile MDR de *Enterococcus* spp. au format în special biofilme moderat aderente ($57,1 \pm 1,69\%$ (ÎÎ 95% 55,4-58,8)) și puternic aderente ($40,0 \pm 1,41\%$ (ÎÎ 95% 38,6-41,4)), pe când tulpinile sensibile au format în $42,5 \pm 1,46\%$ (ÎÎ 95% 41,0-44,0) de cazuri biofilme moderat aderente și în $17,5 \pm 0,94\%$ (ÎÎ 95% 16,6-18,4) % de cazuri biofilme slab aderente.

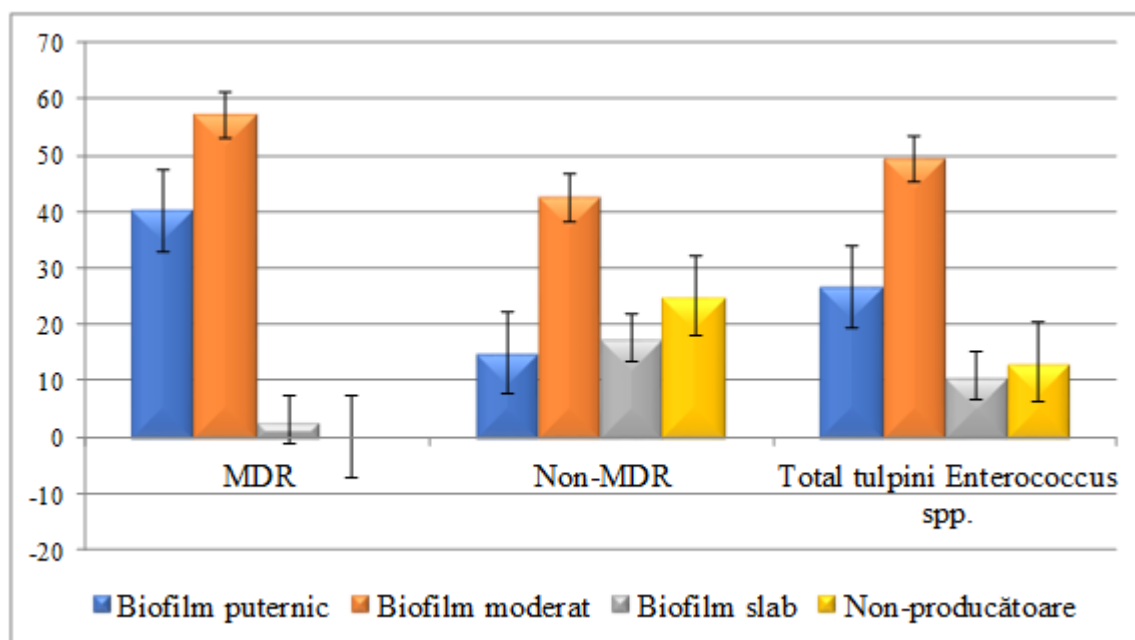


Figura 11. Capacitatea de formare a biofilmelor a tulpinilor de *Enterococcus* spp. izolate din ulcere trofice

Tulpinile de *Candida* spp. izolate din ulcere trofice au format, *in vitro*, biofilm detectabil în proporție de 57,1%, dintre care 50,0±7,04% (Î 95% 43,0-57,0) – biofilme puternic aderente, 37,5±6,09% (Î 95% 31,4-43,6) – biofilme moderat aderente și 14,5±3,79% (Î 95% 10,7-18,3) – biofilme slab aderente.

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).

3.4. Concluzii la capitolul 3

1. Rezultatele studierii spectrului etiologic al ulcerului trofic infectat indică implicarea în proces a unei singure specii microbiene în 50,6% de cazuri și prezența asociației de microorganisme în 49,4% de cazuri, ceea ce poate explica agravarea sau întârzierea vindecării în această patologie.
2. Principalul agent etiologic al ulcerului trofic infectat cu implicarea unei singure specii a fost *S. aureus* (19,3%; Î 95% 18,8-19,8), urmat în ordinea descreșterii incidenței de *P. aeruginosa* (17,6%; Î 95% 17,1-18,1), *Enterococcus* spp. (13,6%; Î 95% 13,2-14,0), specii de *Proteus* (12,5%; Î 95% 12,1-12,9), *K. pneumoniae* (11,4%; Î 95% 11,0-11,8), *A. baumannii* (10,2%; Î 95% 9,8-10,6), *S. pyogenes* (8,5%; Î 95% 8,2-8,8) și *E. coli* (6,8%; Î 95% 6,5-7,1). În 62,8% de cazuri de infecție mixtă au dominat tulpinile de *S. aureus*, asociate în 47,7% de cazuri cu speciile *K. pneumoniae* și *P. aeruginosa*.
3. Tulpinile izolate din ulcere trofice au demonstrat o rezistență marcată și multiplă la preparatele antimicrobiene. Astfel, 68,4% (Î 95% 67,4-69,4) din tulpinile de *Staphylococcus* au manifestat rezistență multiplă la antimicrobiene, 43,7% (Î 95% 42,9-44,5) de tulpini – rezistență la meticilină și 19,6% (Î 95% 19,0-20,2) – rezistență inductibilă la clindamicină.
4. Tulpinile de *Enterobacteriaceae* izolate din ulcere trofice au prezentat o rezistență vădită 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)).
5. Bacilii gram-negativi nonfermentativi, *P. aeruginosa* și *A. baumannii*, au prezentat rezistență înaltă la majoritatea preparatelor utilizate în tratament. Peste 90% dintre tulpinile de *P. aeruginosa* au fost rezistente la peniciline și peste 70% la fluorchinolone, iar tulpinile de *A. baumannii* la fluoroquinolone – 84,0% (Î 95% 80,6-87,4) și la sulfonamide – 81,1% (Î 95% 77,7-84,5). Un grad mai înalt de sensibilitate, atât bacteriile *P. aeruginosa*, cât și *A. baumannii*, l-au demonstrat la unele carbapeneme (ertapenem – 91,7% și 90,6% respectiv).

6. Analiza pattern-urilor multirezistente de bacili gram-negativi a arătat că cele mai rezistente la antimicrobiene sunt tulpinile de *P. aeruginosa* (88,5%; ÎI 95% 86,5-90,5), *K. pneumoniae* (81,0%; ÎI 95% 78,9-83,1), *A. baumannii* (71,7%; ÎI 95% 68,5-74,9), și *E. coli* (69,8%; ÎI 95% 66,7-72,9). Rata de rezistență per totală a bacililor gram-negativi la trei și mai multe preparate antimicrobiene a constituit 71,3%.
7. Rezultatele studiului au pus în evidență un număr impunător de tulpini de bacili gram-negativi producători de β -lactamaze cu spectru extins, în special *P. aeruginosa* – 40,6% (ÎI 95% 39,3-41,9), *K. pneumoniae* cu 36,9% (ÎI 95% 35,7-38,1) și *E. coli* cu 33,9% (ÎI 95% 32,7-35,1). β -lactamazele de tip AmpC au prevalat la tulpinile de *A. baumannii* – 28,3% (ÎI 95% 27,0-29,6), *K. pneumoniae* – 4,2% (ÎI 95% 3,47-4,93) și *P. aeruginosa* – 4,2% (ÎI 95% 3,47-4,93). Tipurile de carbapenemaze 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).
8. Tulpinile izolate din ulcere trofice au exprimat un șir de factori de patogenitate care explică supraviețuirea și implicarea lor în prognosticul nefavorabil al ulcerelor trofice. Expresia fenotipică a acestor factori la tulpinile microbiene analizate a fost diversă, în funcție de specia izolată. Majoritatea tulpinilor au prezentat toxine formatoare de pori, în special lipază (74,2%; ÎI 95% 72,9-75,5), lecitinază (53,6%; ÎI 95% 53,3-53,9) și hemolizine (57,7%; ÎI 95% 51,6-52,0), enzime implicate atât în invazie, cât și în evitarea răspunsului imun al gazdei. Un grad înalt de exprimare a fost înregistrat și pentru gelatinază (69,7%; ÎI 95% 69,3-70,1) și cazeinază (52,7%; ÎI 95% 52,5-52,9), enzime extrem de importante în supraviețuirea bacteriilor și în invazia țesuturilor macroorganismului.
9. Tulpinile izolate din ulcere trofice au prezentat și o capacitatea înaltă de a inactiva lizozimul și complementul, ceea ce le garantează supraviețuirea pe termen lung în macroorganism. Lizozimul a fost inactivat de 93,3% (ÎI 95% 93,6-94,2) din tulpinile studiate, majoritatea (47,2%; ÎI 95% 47,0-47,4) manifestând un grad mediu de exprimare a activității antilizozim. Activitate anticomplementară au demonstrat 95,2% (ÎI 95% 94,9-95,5) din tulpini, 79,9% (ÎI 95% 79,6-80,2) inactivând complementul la o concentrație mai mare de 15 CH50/ml.
10. Capacitatea de formare a biofilmelor a fost înregistrată la 73,2% (ÎI 95% 72,9-73,5) din tulpinile clinice, dintre care 41,8% (ÎI 95% 41,6-42,0) au produs biofilm puternic, 43,7% (ÎI 95% 43,5-43,9) – biofilm moderat și 14,5% (ÎI 95% 14,4-14,6) – biofilm slab. Toți factorii de patogenitate determinați, inclusiv capacitatea de formare a biofilmelor, au fost înregistrați într-o rată mai mare la tulpinile izolate din infecții polimicrobiene și cu rezistență multiplă la preparatele antimicrobiene.

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

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

Terapia antimicrobiană reprezintă una dintre cele mai importante și folosite terapii medicamentoase. Pe lângă avantajele, aceasta înregistrează și dezavantaje semnificative, cum ar fi diversitatea limitată, interacțiunea antagonistă și efectele tratamentelor abandonate care duc la dobândirea rezistenței microorganismelor la aceste preparate. Dezvoltarea rezistenței la antimicrobiene este considerată de Organizația Mondială a Sănătății cea mai urgentă problemă cu care se confruntă în prezent medicina.

Bacteriile multirezistente constituie una dintre cele mai grave probleme de sănătate publică la nivel mondial, iar noile tulpini rezistente apar tot mai frecvent, scăzând eficacitatea tratamentelor curente. Întrucât evoluția bacteriilor multirezistente a depășit rata de dezvoltare a noilor antimicrobiene, generarea de noi tratamente antimicrobiene eficiente este critică.

Dezvoltarea metodelor alternative de tratament al infecțiilor este crucială și considerată de OMS cea mai mare provocare pentru știința medicală în prezent.

În prezentul studiu, acțiunea compușilor chimici și biologici noi a fost testată pe mai multe microorganisme, inclusiv gram-pozitive: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Streptococcus pyogenes* ATCC 12344, *Enterococcus faecalis* ATCC 19433 și *Enterococcus faecium* ATCC 6569; și gram-negative: *Escherichia coli* ATCC25922, *Proteus mirabilis* ATCC 25933, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Enterobacter cloacae* ATCC 13047, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 și *Acinetobacter baumannii* ATCC BAA-747, precum și asupra unor micete levuriforme: *Candida albicans* ATCC 10231 și *Cryptococcus neoformans* CECT 1043.

Activitatea antimicrobiană a compușilor chimici noi asupra tulpinilor de referință

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 nitratului de cupru(2+) și N-(prop-2-en-1-il)-2-[1-(piridin-2-il)etiliden]hidrazincarbotoamidă (4-alitiosemicarbazona 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-alitiosemicarbazona 2-acetilpiridinei, având rolul de ligand-N,N,S tridentat monodeprotonat. Ulterior, o moleculă de amină este substituită cu azometina polidentată, rezultând nitratul de imidazoliu sau 3,4-dimetilpiridiniu prin deprotonarea tiosemicarbazonei.

Locurile patru și cinci, din sfera coordinativă a acestui atom central, sunt ocupate de 10 nitrat-ion și de molecula de amină rămasă.

Concentrațiile minimă inhibitoare și minimă bactericidă ale compușilor noi au fost determinate cu ajutorul metodei diluțiilor succesive în medii lichide, cu repicarea ulterioară pe mediul în plăci. Activitatea compușilor a fost testată atât asupra bacteriilor gram-pozitive, gram-negative, cât și asupra micetelor levurifome. Rezultatele obținute în urma testării celor 19 compuși chimici asupra a 6 tulpini de referință de bacterii gram-pozitive sunt redate în Anexa 4.

Cea mai înaltă activitate bacteriostatică și bactericidă asupra bacteriilor *S. aureus* ATCC 25923 au manifestat-o compușii perclorat de N-ciclohexil-N'-[(2-hidroxifenil)-metiliden]carbamo-hidrazonotioatoaqua cupru(II) (CMI – 0,03 μg/ml; CMB – 0,98 μg/ml) și nitrat- $\{N\text{-}(\text{prop-2-en-1-il})\text{-}N'\text{-}[1\text{-}(\text{piridin-2-il})\text{-etiliden}] \text{ carbamo-hidrazontioato}\}$ -(3,4-dimetilpiridin)-cupru (CMI – 0,06 μg/ml; CMB – 0,24 μg/ml).

Asupra tulpinilor de *B. cereus* ATCC 11778, cea mai înaltă activitate a demonstrat-o compusul chimic nitrat de catenă-(μ-nitrato- O,O')- $\{N\text{-}(\text{prop-2-en-1-il})\text{-}2\text{-}[(\text{piridin-2-il})\text{-etiliden}]\text{hidrazin-1-carbotioamid}\}$ -cupru(II), manifestând o acțiune bacteriostatică la concentrația de 0,007 μg/ml și bactericidă la concentrația de 0,03 μg/ml.

Activitate înaltă asupra tulpinilor de *B. cereus* ATCC 11778 a demonstrat compusul bromo- $\{N\text{-}(\text{prop-2-en-1-il})\text{-}N'\text{-}[1\text{-}(\text{piridin-2-il})\text{-etiliden}]\text{carbamo-hidrazontioato}\}$ -imidazolcupru (CMI – 0,06 μg/ml; CMB – 0,12 μg/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 nitrat de catenă-(μ-nitrato- O,O')- $\{N\text{-}(\text{prop-2-en-1-il})\text{-}2\text{-}[(\text{piridin-2-il})\text{-etiliden}]\text{hidrazin-1-carbotioamid}\}$ -cupru(II) (CMI – 0,007 μg/ml; CMB – 0,03 μg/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 bis(μ₂-acetato- O)-bis $\{[N\text{-}(\text{prop-2-en-1-il})\text{-}N'\text{-}(\text{piridin-2-il})\text{-etiliden}]\text{carbamo-hidrazono-tioato}\}$ cupru} dihidrat și nitrat de catenă-(μ-nitrato- O,O')- $\{N\text{-}(\text{prop-2-en-1-il})\text{-}2\text{-}[(\text{piridin-2-il})\text{-etiliden}]\text{hidrazin-1-carbotioamid}\}$ -cupru(II), CMI – 0,002 μg/ml și CMB – 0,003 μg/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 bromo- $\{N\text{-}(\text{prop-2-en-1-il})\text{-}N'\text{-}[1\text{-}(\text{piridin-2-il})\text{-etiliden}]\text{carbamo-hidrazontioato}\}$ -imidazolcupru (CMI - 0,06 μg/ml și CMB – 0,12 μg/ml), iar asupra *E. faecium* ATCC 6569 – compusul nitrat de catenă-(μ-nitrato-

O,O')-{*N*-(prop-2-en-1-il)-2-[(piridin-2-il)etiliden]hidrazin-1-carbotioamid}-cupru(II) (CMI – 0,12 µg/ml și CMB – 0,24 µg/ml).

Conform rezultatelor obținute, compușii nitrat de catenă-(µ-nitrato-*O,O'*)-{*N*-(prop-2-en-1-il)-2-[(piridin-2-il)etiliden]hidrazin-1-carbotioamid}-cupru(II) și bromo-{*N*-(prop-2-en-1-il)-*N'*-[1-(piridin-2-il)-etiliden]carbamo hidrazontioato}-imidazolcupru manifestă acțiune bacteriostatică și bactericidă asupra bacteriilor gram-pozitive în concentrații mici (Anexa 4).

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) (Anexa 5).

Analiza rezultatelor obținute a arătat că asupra tulpinilor de *E. coli* ATCC 25922 au manifestat activitate mai înaltă compusul chimic nitrat de catenă-(µ-nitrato-*O,O'*)-{*N*-(prop-2-en-1-il)-2-[(piridin-2-il)etiliden]hidrazin-1-carbotioamid}-cupru(II), CMI – 0,24 µg/ml și CMB - 0,49 µg/ml. Activitate la concentrații de 1,95 µg/ml (CMI) și de 3,91 µg/ml (CMB) au manifestat și compușii nitrat de catenă-(µ-nitrato-*O,O'*)-{*N*-(prop-2-en-1-il)-2-[(piridin-2-il)-metiliden]hidrazin-1-carbotioamid}-cupru(II) și bis(µ₂-acetato-*O*)-bis{[*N*-prop-2-en-1-il-*N'*-(piridin-2-il)metiliden]carbamo hidrazono-tioato]cupru} dihidrat.

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 25922.

Tulpinile de *K. pneumoniae* ATCC 13883 au fost mai sensibile la compușii nitrat de catenă-(µ-nitrato-*O,O'*)-{*N*-(prop-2-en-1-il)-2-[(piridin-2-il)-metiliden]hidrazin-1-carbotioamid}-cupru(II), bromo-{*N*-(prop-2-en-1-il)-*N'*-[1-(piridin-2-il)-metiliden]carbamo hidrazontioato}imidazolcupru și bis(µ₂-acetato-*O*)-bis{[*N*-prop-2-en-1-il-*N'*-(piridin-2-il)metiliden]carbamo hidrazonotioato]cupru} dihidrat, CMI și CMB constituind 1,95 µg/ml și 3,91 µg/ml respectiv.

Compușii nitrat de catenă-(µ-nitrato-*O,O'*)-{*N*-(prop-2-en-1-il)-2-[(piridin-2-il)-metiliden]hidrazin-1-carbotioamid}-cupru(II) și nitrat de catenă-(µ-nitrato-*O,O'*)-{*N*-(prop-2-en-1-il)-2-[(piridin-2-il)etiliden]hidrazin-1-carbotioamid}-cupru(II) au fost mai activi asupra bacteriilor *P. mirabilis* ATCC 25933, exercitând efect bactericid la concentrația de 3,91 µg/ml, iar bacteriostatic la concentrația de 1,95 µg/ml.

Tulpinile de *E. cloacae* ATCC 13047 au demonstrat o sensibilitate mai înaltă la compușii bromo-{*N*-(prop-2-en-1-il)-*N'*-[1-(piridin-2-il)-metiliden]carbamo hidrazontioato}imidazolcupru și nitrat de catenă-(µ-nitrato-*O,O'*)-{*N*-(prop-2-en-1-il)-2-[(piridin-2-il)etiliden]hidrazin-1-carbotioamid}-cupru(II), CMI constituind 0,98 µg/ml, iar CMB – 1,95 µg/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 nitratul de catenă-(μ-nitrato-*O,O'*)-{*N*-(prop-2-en-1-il)-2-[(piridin-2-il)etiliden]hidrazin-1-carbotioamid}-cupru(II); CMI – 0,98 μg/ml și CMB – 1,95 μg/ml.

Tulpinile de *P. aeruginosa* ATCC 27853 au demonstrat o sensibilitate mai înaltă la compușii bromo-{*N*-(prop-2-en-1-il)-*N'*-[1-(piridin-2-il)-metiliden]carbamohidrazontioato} imidazolcupru, nitrato de catenă-(μ-nitrato-*O,O'*)-{*N*-(prop-2-en-1-il)-2-[(piridin-2-il)etiliden] hidrazin-1-carbotioamid}-cupru(II) și bromo-{*N*-(prop-2-en-1-il)-*N'*-[1-(piridin-2-il)-etiliden] carbamohidrazontioato}-imidazolcupru; CMI și CMB constituind 3,91 μg/ml și 7,81 μg/ml respectiv.

Toate bacteriile gram-negative de referință au prezentat rezistență la patru compuși chimici testați în concentrații de 500 μg/ml: perclorat de *N*-ciclohexil-*N'*-[(2-hidroxifenil)-metiliden]carbamohidrazonotioatoaqua cupru(II), acetato-{*N*-ciclohexil-*N'*-[(piridin-2-il)metiliden]-carbamohidrazonotioato}cupru(II), [*N'*-(3,5-dibromo-2-oxidobenziliden)-*N*-(prop-2-en-1-il)carbamohidrazonotioato]aquacupru și [*N'*-(3,5-dibromo-2-oxidobenziliden)-*N*-(prop-2-en-1-il)carbamohidrazonotioato]piridincupru. Compusul nitrato-{*N*-(prop-2-en-1-il)-*N'*-[1-(piridin-2-il)-etiliden]carbamohidrazontioato}-(3,4-dimetilpiridin)-cupru 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) (Tabelul 23). În conformitate cu rezultatele obținute, cea mai înaltă activitate antifungică asupra micetelor *C. albicans* ATCC 10231 au demonstrat compușii nitrato de {2-[1-(2-hidroxifenil)etiliden]-*N*-(prop-2-en-1-il)hidrazin-1-carbotioamid}(1,10-fenantrolin)-cupru(II) și nitrato-{*N*-(prop-2-en-1-il)-*N'*-[1-(piridin-2-il)-etiliden]carbamohidrazontioato}-(3,4-dimetil-piridin)-cupru; 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 {*N'*-[(4-hidroxi-2-oxidofenil)metiliden]-*N*-prop-2-en-1-ilcarbamohidrazonotioato}(3,4-dimetilpiridin)cupru (CMI – 0,03 μg/ml, CMF – 0,06 μg/ml), *N*-ciclohexil-2-[1-(piridin-2-il)etiliden]hidrazin-1-carbotioamid (CMI – 0,12 μg/ml, CMF – 0,24 μg/ml) și nitrato-{*N*-(prop-2-en-1-il)-*N'*-[1-(piridin-2-il)-etiliden]carbamohidrazontioato}-(3,4-dimetilpiridin)-cupru (CMI – 0,24 μg/ml, CMF – 0,24 μg/ml).

Ceilalți compuși testați au manifestat activitate antifungică în concentrații mai mari, cu excepția compusului [*N'*-(3,5-dibromo-2-oxidobenziliden)-*N*-(prop-2-en-1-il)carbamohidrazonotioato]aquacupru, 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 inhibate și omorâte la concentrații mai mici ale compușilor chimici, comparativ cu micetele *C. albicans* ATCC 10231.

Tabelul 23. Activitatea antimicrobică a compușilor chimici (mg/mL)

Compușul chimic	<i>C. albicans</i>		<i>C. neoformans</i>	
	CMI	CMF	CMI	CMF
C ₁₀ H ₁₂ CuN ₆ O ₆ S	7,81	15,6	3,91	7,81
C ₁₀ H ₁₁ BrCuN ₄ S	7,81	15,6	3,91	7,81
C ₂₄ H ₃₂ Cu ₂ N ₈ O ₆ S ₂	31,25	62,5	3,91	15,6
C ₁₀ H ₁₄ CuN ₄ O ₅ S ₂	31,25	62,5	7,81	15,6
C ₁₁ H ₁₄ CuN ₆ O ₆ S	3,91	7,81	1,95	3,91
C ₁₁ H ₁₃ BrCuN ₄ S	7,81	31,25	0,98	1,95
C ₁₃ H ₁₇ ClCuN ₄ S	1,95	31,25	0,03	0,06
C ₁₃ H ₁₇ CuN ₅ O ₃ S	0,49	15,6	0,24	0,98
C ₁₄ H ₂₀ ClCuN ₃ O ₆ S	31,25	125	n/a	n/a
C ₁₅ H ₂₀ N ₄ NiO ₂ S	250	500	1,95	3,91
C ₁₈ H ₂₀ CuN ₄ O ₂ S	7,81	15,6	7,81	15,6
C ₂₄ H ₂₃ CuN ₇ O ₇ S	15,6	31,25	7,81	7,81
C ₁₁ H ₁₁ Br ₂ CuN ₃ O ₂ S	125	250	62,5	62,5
C ₁₆ H ₁₄ Br ₂ CuN ₄ OS	62,5	125	62,5	62,5
C ₁₃ H ₁₆ Br ₂ CuN ₄ S	3,91	7,81	0,98	0,98
C ₁₄ H ₂₀ N ₄ S	0,98	1,96	0,24	0,24
C ₁₄ H ₁₉ ClCuN ₄ S	7,81	15,6	3,91	3,91
C ₁₈ H ₂₂ CuN ₆ O ₃ S	31,25	31,25	0,49	1,95
C ₁₄ H ₁₉ CuN ₇ O ₄ S	15,6	31,25	0,12	0,24

Notă: *C. albicans* ATCC 10231, *C. neoformans* CECT 1043, n/a – compusul nu a demonstrat activitate la concentrația de 500 μg/ml, CMI – concentrația minimă inhibitoare, CMF – concentrația minimă fungicidă.

Activitatea antimicrobiană a compușilor biologici asupra tulpnilor de referință

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* (Tabelul A6.1).

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 descrescării 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 (Tabelul A6.2).

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).

Ațiunea antimicotică a extractelor de spirulină a fost studiată pe două tulpini de micete levuriforme *C. albicans* ATCC 10231 și *C. neoformans* CECT 1043 (Tabelul 24).

Tabelul 24. Activitatea antimicotică a compușilor biologici (mg/mL)

Compusul biologic	<i>C. albicans</i>		<i>C. neoformans</i>	
	CMI	CMF	CMI	CMF
<i>ES</i>	0,62	1,25	0,31	0,62
<i>ES 1</i>	1,25	2,5	0,62	1,25
<i>ES 2</i>	1,25	2,5	1,25	2,5
<i>MX 1</i>	0,05	0,09	0,05	0,09
<i>MX 2</i>	0,007	0,01	0,007	0,01
Fluconazol (martor)	12,8	25,6	16,0	32,0

Notă: *C. albicans* ATCC 10231, *C. neoformans* CECT 1043, CMI – concentrația minimă inhibitoare, CMF – concentrația minimă fungicidă.

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 *MX1* (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 antimicotică în concentrații mai mari (CMI – 0,62-1,25 mg/ml; CMF – 1,25-2,5 mg/ml).

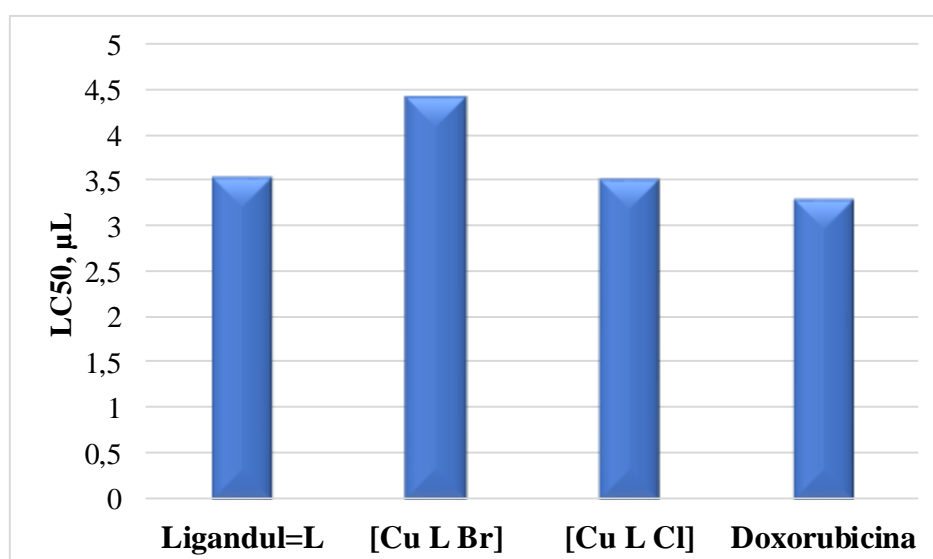


Figura 12. Toxicitatea compușilor chimici

Determinarea toxicității compușilor chimici noi

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 de dafnii, efectuând testul de imobilizare (Figura 12).

Astfel, analizând rezultatele obținute am constatat că, atât ligandul (CL₅₀ 5,53±0,90), cât și compușii coordinați 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 (Tabelul 25).

Tabelul 25. Activitatea antimicrobiană a compușilor chimici asupra tulpinilor izolate din ulcere trofice (μg/ml)

Compusul chimic	<i>S. aureus</i> n=30		<i>A. baumannii</i> n=30		<i>K. pneumoniae</i> n=30		<i>P. aeruginosa</i> n=30	
	M	±ES	M	±ES	M	±ES	M	±ES
C₁₀H₁₄CuN₄O₅S₂								
CMI	0,20	0,113	3,19	2,018	5,86	1,987	18,8	6,36
CMB	0,32	0,11	4,43	1,351	8,33	1,982	31,3	0,00
C₁₈H₂₀CuN₄O₂S								
CMI	0,60	0,210	4,82	1,680	341,67	122,533	162,5	81,41
CMB	1,07	0,30	8,07	1,426	500,00	0,000	266,7	63,43
C₁₃H₁₇ClCuN₄S								
CMI	0,98	0,702	10,68	3,829	18,75	6,357	145,8	47,38
CMB	2,02	0,36	17,71	5,402	32,28	5,660	258,3	45,64
C₁₄H₁₉CuN₇O₄S								
CMI	1,46	0,666	2,73	0,973	11,46	5,324	n/a	n/a
CMB	2,15	0,60	4,17	0,991	18,23	5,923	n/a	n/a
C₁₃H₁₆Br₂CuN₄S								
CMI	1,56	0,487	19,79	7,028	154,17	53,773	154,2	53,77
CMB	2,15	0,60	32,29	5,705	266,67	63,427	275,0	76,28
C₁₄H₂₀N₄S								
CMI	0,17	0,098	70,83	21,609	n/a	n/a	n/a	n/a
CMB	0,28	0,08	129,17	22,822	n/a	n/a	n/a	n/a
C₁₄H₁₉ClCuN₄S								
CMI	1,33	0,479	283,33	86,436	150,00	50,855	n/a	n/a
CMB	2,21	0,68	500,00	0,000	250,00	0,000	n/a	n/a

Notă: CMI – concentrația minimă inhibitoare; CMB – concentrația minimă bactericidă; n/a – neaplicabil.

Cea mai mică concentrație minimă inhibitoare asupra tulpinilor clinice de *S. aureus* a fost înregistrată pentru compușii chimici *N*-ciclohexil-2-[1-(piridin-2-il)etiliden]hidrazin-1-carbotioamid (CMI: 0,17±0,098) și sulfatul de {*N*-(prop-2-en-1-il)-2-[(piridin-2-il)-metiliden]hidrazin-1-carbo-tioamid}aquacupru(II) (CMI: 0,20±0,113).

Compușii sulfat de {*N*-(prop-2-en-1-il)-2-[(piridin-2-il)-metiliden]hidrazin-1-carbo-tioamid}aquacupru(II) (CMI: 3,19±2,018 – 18,8±6,36) și nitrato-{*N*-(prop-2-en-1-il)-*N'*-[1-(piridin-2-il)-etiliden]carbamo-hidrazontioato}imi-dazolcupru monohidrat au manifestat activitate inhibitoare 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 (Tabelul 26).

Tabelul 26. Activitatea antimicrobiană a compușilor biologici asupra tulpinilor izolate din ulcere trofice (μg/ml)

Compușul chimic	<i>S. aureus</i> n=30		<i>A. baumannii</i> n=30		<i>K. pneumoniae</i> n=30		<i>P. aeruginosa</i> n=30	
	M	±ES	M	±ES	M	±ES	M	±ES
<i>ES</i>								
CMI	0,708	0,1444	0,750	0,2000	1,500	0,4000	0,729	0,1736
CMB	1,292	0,0806	1,292	0,0806	2,667	0,3111	1,292	0,0806
<i>ES 1</i>								
CMI	3,000	0,8000	1,375	0,2250	2,750	0,4500	1,375	0,2250
CMB	5,000	0,0000	2,500	0,0000	5,000	0,0000	2,500	0,0000
<i>ES 2</i>								
CMI	3,167	0,9778	1,375	0,2250	5,000	0,0000	1,375	0,2250
CMB	5,000	0,0000	2,500	0,0000	5,333	0,6222	2,500	0,0000
<i>MX 1</i>								
CMI	0,020	0,0034	0,010	0,0012	0,020	0,0023	0,011	0,0022
CMB	0,037	0,0000	0,019	0,0000	0,024	0,0073	0,019	0,0000
<i>MX 2</i>								
CMI	0,031	0,0074	0,022	0,0164	0,016	0,0037	0,015	0,0031
CMB	0,054	0,0000	0,268	0,0000	0,027	0,0000	0,027	0,0000

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 13).

Concentrația minimă bactericidă pentru tulpinile clinice de *S. aureus* a fost mai mare decât pentru tulpinile de referință, în special pentru compușii chimici cloro-{N-ciclohexil-N'-[(piridin-2-il)metiliden]carbamohidrazonotioato}cupru(II), nitrato-{N-(prop-2-en-1-il)-N'-[1-(piridin-2-il)etiliden]carbamohidrazonotioato}-(3,4-dimetilpiridin)-cupru și {Prop-2-en-1-il-N-prop-2-en-1-il-N'-[(piridin-2-il)-metiliden]carbamohidrazonotioat}dibromo-cupru (CMI tulpini referință – 0,49 μg/mL, 0,98 μg/mL, 0,98 μg/mL; CMI tulpini clinice – 0,98 μg/mL, 1,46 μg/mL și 1,56 μg/mL, respectiv) (Figura 13).

Pentru tulpinile clinice de *A. baumannii*, în raport cu cele de referință, CMI pentru compușii bis-(μ-cloro)-bis-N-ciclohexil-N'-[(1-(piridin-2-il)-etiliden]carbamohidrazonotioat-cupru(II) și N-ciclohexil-2-[1-(piridin-2-il)etiliden]hidrazin-1-carbotioamid s-au majorat considerabil de la 62,5 μg/mL până la 283,3 μg/mL și de la 250 μg/mL până la 308,3 μg/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 (Figura 13).

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 {N'-[(4-hidroxi-2-oxidofenil)metiliden]-N-prop-2-en-1-ilcarbamohidrazonotioato}(3,4-dimetilpiridin)cupru s-a majorat considerabil. Pentru tulpinile de *K. pneumoniae*, CMI s-a majorat de două ori, de la 250 μg/mL până la 500,0 μg/mL, iar pentru tulpinile de *P. aeruginosa* de la 125 μg/mL până la 266,7 μg/mL (Figura 13).

În studiu a fost comparată și acțiunea compușilor biologici asupra tulpinilor de referință și a celor clinice (Figura 14). Analiza rezultatelor obținute a arătat că compușii biologici MX1 și MX2 au manifestat activitate antibacteriană asupra tulpinilor de referință și clinice în aceleași concentrații.

Concentrații mai mari, necesare pentru inhibarea tulpinilor clinice, au fost înregistrate la compușii biologici ES1 și ES2, comparativ cu CMI pentru tulpinile de referință.

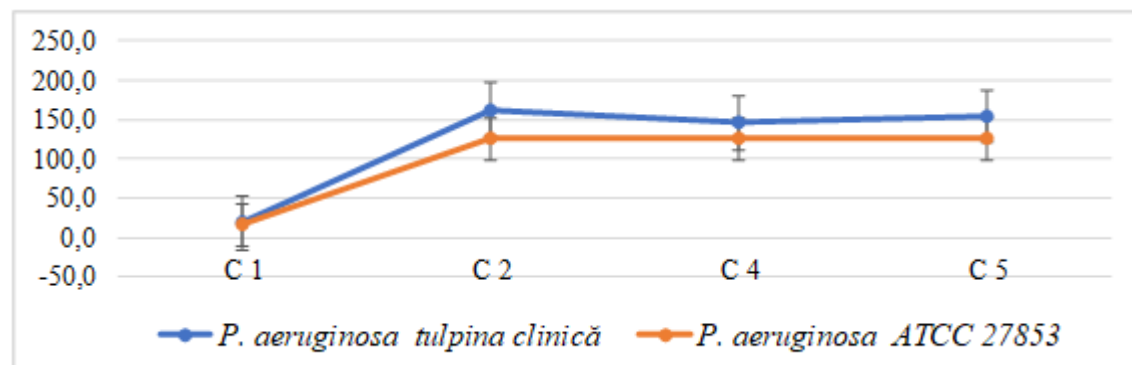
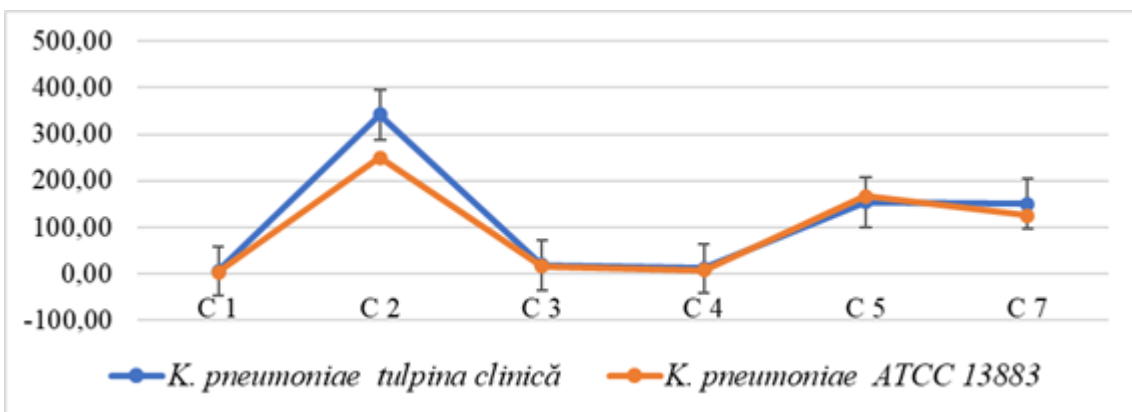
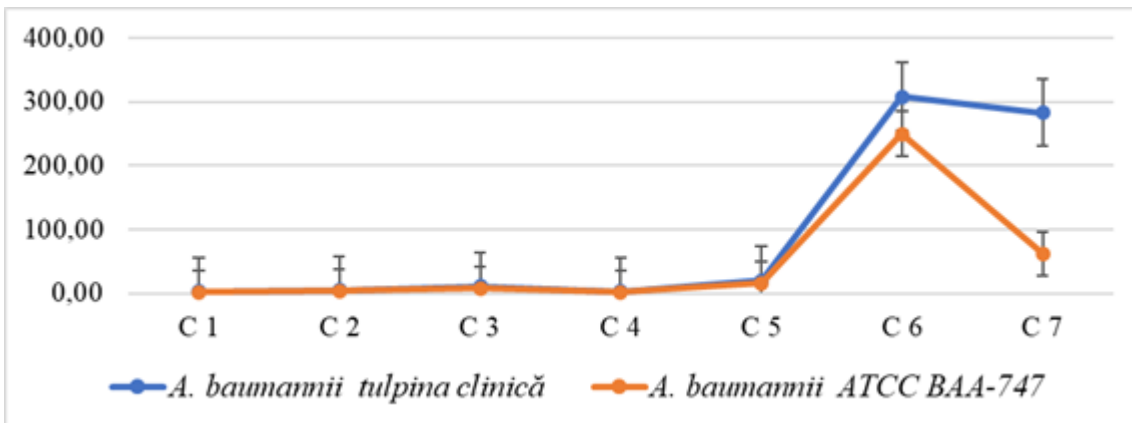
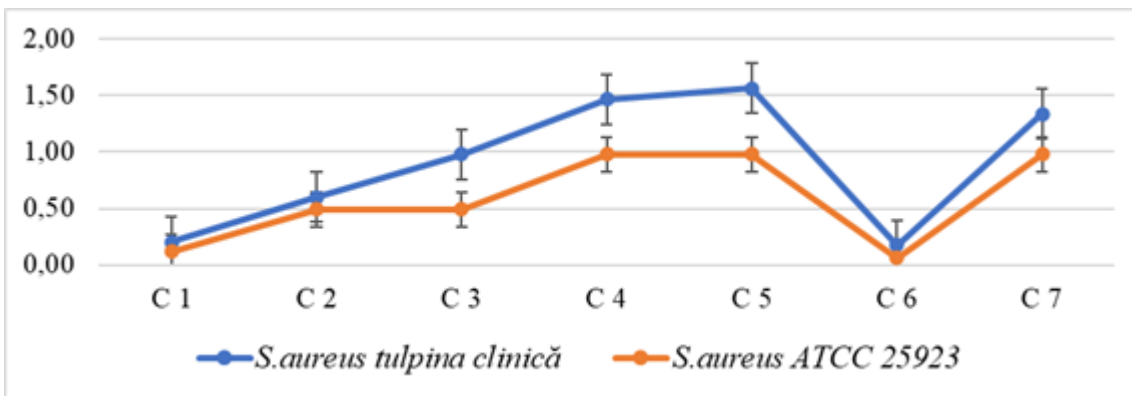


Figura 13. Acțiunea compușilor chimici asupra tulpinilor de referință și a tulpinilor izolate din ulcere trofice

Notă. C1 - $C_{10}H_{14}CuN_4O_5S_2$, C 2 - $C_{18}H_{20}CuN_4O_2S$, C 3 - $C_{13}H_{17}ClCuN_4S$, C 4 - $C_{14}H_{19}CuN_7O_4S$, C 5 - $C_{13}H_{16}Br_2CuN_4S$, C 6 - $C_{14}H_{20}N_4S$, C 7 - $C_{14}H_{19}ClCuN_4S$



Figura 14. Acțiunea compușilor biologici asupra tulpinilor de referință și a tulpinilor izolate din ulcere trofice

4.3. Acțiunea sinergică a compușilor chimici și biologici noi

Rezistența microorganismelor la antimicrobienele convenționale a devenit o problemă serioasă care impune nu numai dezvoltarea de noi preparate antimicrobiene, dar și elaborarea de noi abordări alternative.

O astfel de alternativă, care atrage tot mai mulți susținători, este combinarea antibioticelor cu extractele de plante. Această abordare, adică terapia combinată sau terapia sinergică împotriva microorganismelor rezistente la antimicrobiene, poate genera noi modalități de tratare a bolilor infecțioase și reprezintă, probabil, o zonă potențială pentru viitoarele investigații. Sinergismul constă în intensificarea unor efecte farmacodinamice ca urmare a asocierii a doi sau mai mulți compuși.

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*, *ESI*, *MXI*) 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 indifferente. Acțiuni antagoniste între compușii testați nu au fost puse în evidență ($FIC > 4$) (Tabelul 27).

Tabelul 27. **Evaluarea interacțiunii dintre compușii chimici și biologici pe baza indicelui FIC**

		<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>A. baumannii</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>
$C_{14}H_{19}CuN_7O_4S$	<i>ES</i>	0,35 (S)	0,12 (S)	0,5 (S)	0,32 (S)	0,61 (Ad)	0,32 (S)
	<i>ESI</i>	0,32 (S)	0,35 (S)	0,5 (S)	0,37 (S)	1,37 (I)	0,35 (S)
	<i>MXI</i>	0,35 (S)	0,12 (S)	0,40 (S)	0,32 (S)	0,5 (S)	0,32 (S)
$C_{13}H_{16}Br_2CuN_4S$	<i>ES</i>	0,32 (S)	0,35 (S)	0,30 (S)	0,35 (S)	0,5 (S)	0,44 (S)
	<i>ESI</i>	0,35 (S)	0,35 (S)	0,30 (S)	0,35 (S)	1,56 (I)	0,5 (S)
	<i>MXI</i>	0,12 (S)	0,12 (S)	0,32 (S)	0,35 (S)	0,44 (S)	0,37 (S)
$C_{10}H_{14}CuN_4O_5S_2$	<i>ES</i>	0,37 (S)	0,35 (S)	0,32 (S)	0,32 (S)	0,75 (Ad)	0,5 (S)
	<i>ESI</i>	0,44 (S)	0,32 (S)	0,44 (S)	0,56 (Ad)	1,23 (I)	0,61 (Ad)
	<i>MXI</i>	0,32 (S)	0,12 (S)	0,25 (S)	0,32 (S)	0,56 (Ad)	0,44 (S)
$C_{13}H_{17}ClCuN_4S$	<i>ES</i>	0,32 (S)	0,35 (S)	0,5 (S)	0,44 (S)	0,5 (S)	0,37 (S)
	<i>ESI</i>	0,37 (S)	0,32 (S)	0,5 (S)	0,5 (S)	0,84 (Ad)	0,44 (S)
	<i>MXI</i>	0,32 (S)	0,32 (S)	0,44 (S)	0,44 (S)	0,44 (S)	0,32 (S)
$C_{18}H_{20}CuN_4O_2S$	<i>ES</i>	0,32 (S)	0,25 (S)	0,32 (S)	0,5 (S)	1,23 (I)	0,44 (S)
	<i>ESI</i>	0,32 (S)	0,32 (S)	0,37 (S)	1,24 (I)	1,42 (I)	0,5 (S)
	<i>MXI</i>	0,30 (S)	0,35 (S)	0,25 (S)	0,44 (S)	0,5 (S)	0,37 (S)
$C_{14}H_{20}N_4S$	<i>ES</i>	0,35 (S)	0,37 (S)	0,56 (Ad)	NT	NT	0,32 (S)
	<i>ESI</i>	0,32 (S)	0,44 (S)	1,07 (I)	NT	NT	0,37 (S)
	<i>MXI</i>	0,12 (S)	0,32 (S)	0,5 (S)	NT	NT	0,35 (S)
$C_{14}H_{19}ClCuN_4S$	<i>ES</i>	0,35 (S)	0,25 (S)	0,44 (S)	0,5 (S)	NT	0,39 (S)
	<i>ESI</i>	0,32 (S)	0,32 (S)	0,5 (S)	0,5 (S)	NT	0,44 (S)
	<i>MXI</i>	0,32 (S)	0,25 (S)	0,37 (S)	0,44 (S)	NT	0,35 (S)

Notă: Sinergism (S) – $FIC \leq 0,5$; Aditivitate (Ad) – $0,5 < FIC \leq 1$; Indiferență (I) – $1 < FIC \leq 4$; Antagonism (An) – $FIC > 4$; NT – netestat, *S. aureus* ATCC 25923, *B. subtilis* ATCC6633, *A. baumannii* BAA-747, *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC27853, *C. albicans* ATCC 10231.

Testarea compusului chimic nitrato-{N-(prop-2-en-1-il)-N'-[1-(piridin-2-il)-etiliden]carbamoimidazolonioato}imidazolcupru monohidrat în asociere cu cei trei compuși biologici luați în studiu, în majoritatea cazurilor a arătat synergism, cu excepția tulpinilor de *P. aeruginosa*, pentru care s-a înregistrat aditivitate și indiferență în combinație cu compuși biologici *ES* și *ESI* (Tabelul 27).

Compusul chimic {Prop-2-en-1-il-N-prop-2-en-1-il-N'-[(piridin-2-il)-metiliden]carbamoimidazonioat}dibromo-cupru în toate combinațiile a manifestat synergism asupra microorganismelor de referință, cu excepția combinației cu compusul biologic *ESI* asupra tulpinilor de *P. aeruginosa*, unde a manifestat indiferență (FIC=1,56).

Sulfatul de {N-(prop-2-en-1-il)-2-[(piridin-2-il)-metiliden]hidrazin-1-carbotioamid}aqua-cupru(II), în combinație cu compușii biologici selectați pentru testare, în 72,2% de cazuri a manifestat synergism, în 22,2 % – aditivitate și în 5,6% – indiferență asupra tulpinilor de referință.

Compusul cloro-{N-ciclohexil-N'-[(piridin-2-il)metiliden]-carbamoimidazonioato}cupru(II) 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 {N'-[(4-hidroxi-2-oxidofenil)metiliden]-N-prop-2-en-1-ilcarbamoimidazonioato} (3,4-dimetilpiridin)cupru în combinație cu *ESI* 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*.

N-ciclohexil-2-[1-(piridin-2-il)etiliden]hidrazin-1-carbotioamid a prezentat indiferență asupra tulpinilor de *A. baumannii* în combinație cu *ESI* și aditivitate în combinație cu *ES*.

Compusul bis-(μ-cloro)-bis-N-ciclohexil-N'-[(1-(piridin-2-il)-etiliden]carbamoimidazonioat-cupru(II), în combinație cu *ESI*, a prezentat efect aditiv asupra tulpinilor de *E. coli*.

Toți compușii chimici testați în combinație cu compusul biologic *MXI* 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* (Tabelul 27).

În combinații, concentrațiile minime de inhibiție ale compușilor chimici și biologici au fost cu mult mai mici decât ale compușilor separați. Compușii din combinații au obținut o reducere a CMI-ului compusului inițial de la patru până la 32 de ori (Anexa 7).

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 (Figurile 15, 16, 17, 18).

Compusul chimic nitrato-{N-(prop-2-en-1-il)-N'-[1-(piridin-2-il)-etiliden]carbamo-hidrazontioato}imidazolcupru monohidrat 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 *ESI* – după 24 de ore.

Tulpinile de bacili gram-negativi *E. coli* ATCC 25922 și *A. baumannii* BAA-747 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 *ESI* (Figura 15).

Combinația 0,25CMI $C_{14}H_{19}CuN_7O_4S$ + 0,25CMI *MX* a demonstrat efect fungicid asupra micetelor levuriforme *C. albicans* ATCC 10231 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 *ESI* – după 24 de ore (Figura 15).

Compusul chimic {Prop-2-en-1-il-N-prop-2-en-1-il-N'-[(piridin-2-il)-metiliden]carbamo-hidrazonotioat}dibromo-cupru, 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* ATCC 25923 după 8 ore de acțiune. Combinația 0,25CMI $C_{13}H_{16}Br_2CuN_4S$ + 0,25CMI *ES* a omorât tulpinile de *S. aureus* ATCC 25923 după o expunere de 20 de ore, iar combinația 0,25CMI $C_{13}H_{16}Br_2CuN_4S$ + 0,25CMI *ESI* – după 16 ore (Figura 16).

E. coli ATCC 25922 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 *ESI* (Figura 16)

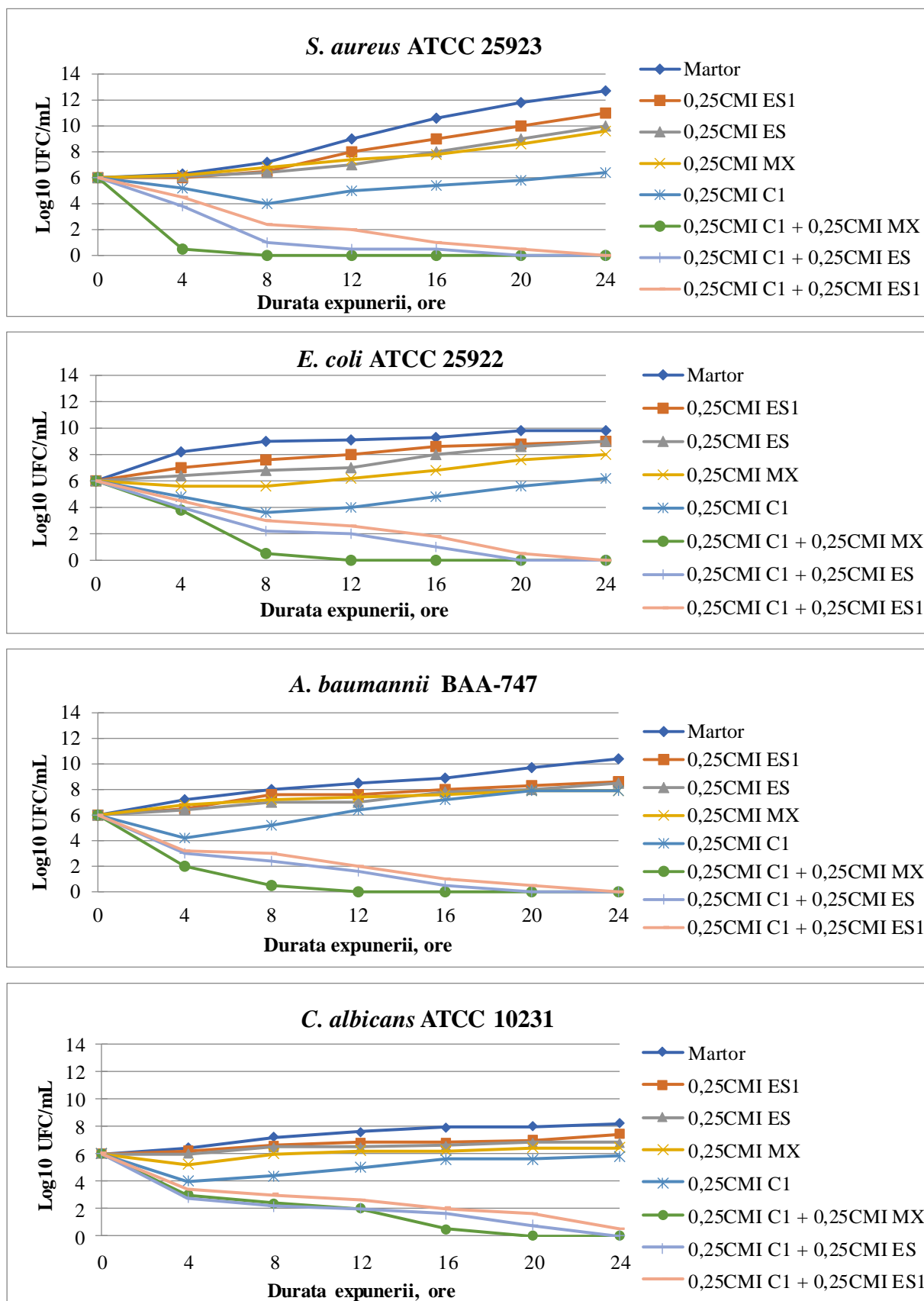


Figura 15 Cinetica activității antimicrobiene a compusului chimic $C_{14}H_{19}CuN_7O_4S$ și a compuşilor biologici (*ES*, *ES1*, *MX*) asupra tulpinilor de referință

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

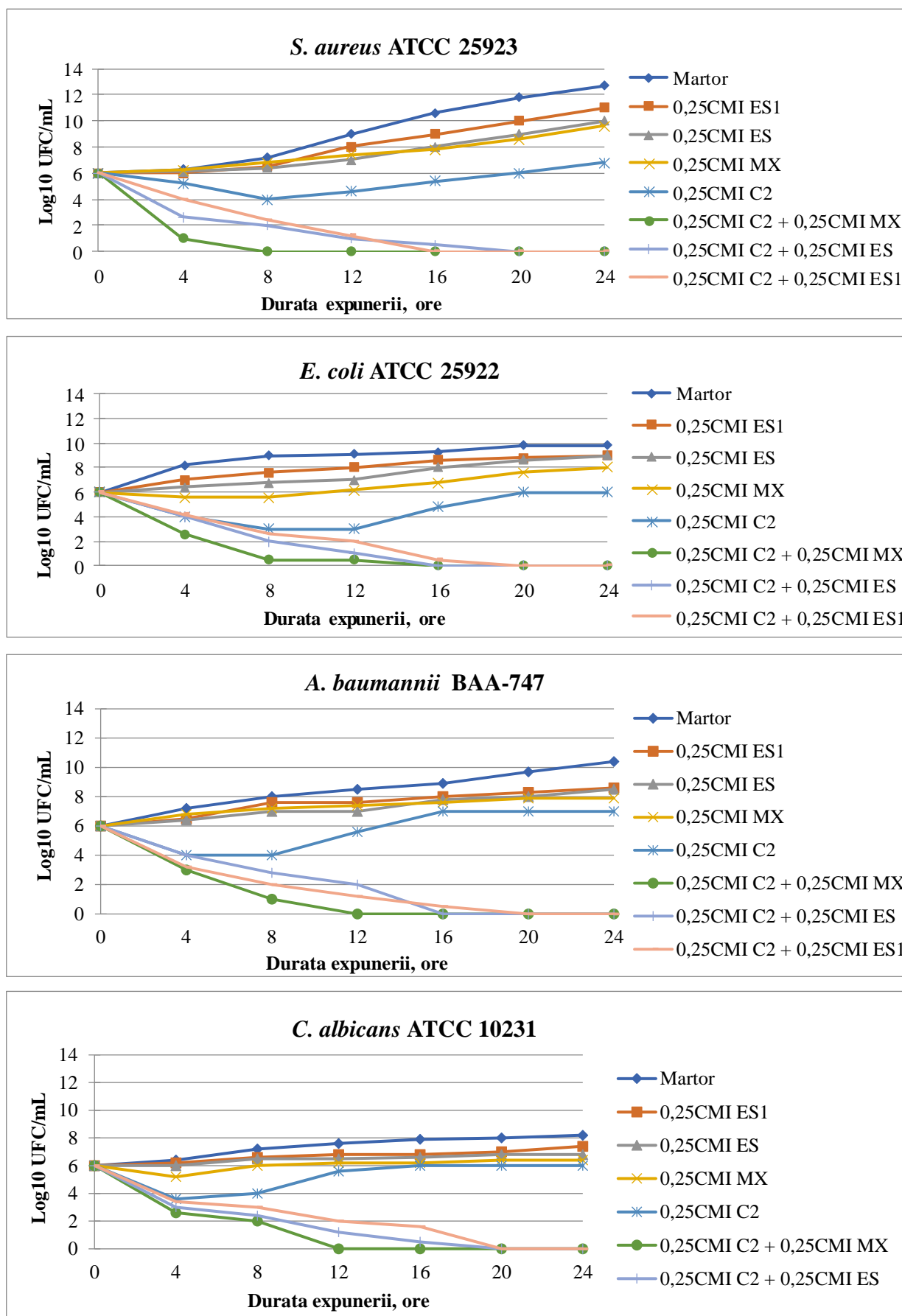


Figura 16. Cinetica activității antimicrobiene a compusului chimic $C_{13}H_{16}Br_2CuN_4S$ și a compuşilor biologici (*ES*, *ES1*, *MX*) asupra tulpinilor de referință

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

Specia *A. baumannii* BAA-747 a fost omorâtă după 12 ore de acțiune a combinației 0,25CMI C₁₃H₁₆Br₂CuN₄S + 0,25CMI *MX* și după 16 ore și respectiv 20 de ore de acțiune a combinațiilor 0,25CMI C₁₃H₁₆Br₂CuN₄S + 0,25CMI *ES* și 0,25CMI C₁₃H₁₆Br₂CuN₄S + 0,25CMI *ESI* (Figura 16).

Combinația 0,25CMI C₁₃H₁₆Br₂CuN₄S + 0,25CMI *MX* a demonstrat efect fungicid asupra micetelor levuriforme *C. albicans* ATCC 10231 după o expunere de 12 ore, iar combinațiile 0,25CMI C₁₃H₁₆Br₂CuN₄S + 0,25CMI *ES* și 0,25CMI C₁₃H₁₆Br₂CuN₄S + 0,25CMI *ESI* – după 20 de ore de acțiune (Figura 16).

Combinația compusului chimic sulfat de {N-(prop-2-en-1-il)-2-[(piridin-2-il)-metiliden]hidrazin-1-carbotioamid}aquacupru(II) cu compusul biologic *MX* (0,25CMI C₁₀H₁₄CuN₄O₅S₂ + 0,25CMI *MX*) a manifestat efect bactericid asupra tulpinilor de *S. aureus* ATCC 25923 după 12 ore de acțiune, iar combinațiile 0,25CMI C₁₀H₁₄CuN₄O₅S₂ + 0,25CMI *ES* și 0,25CMI C₁₀H₁₄CuN₄O₅S₂ + 0,25CMI *ESI* după 16 și respectiv 24 de ore (Figura 17).

Combinațiile 0,25CMI C₁₀H₁₄CuN₄O₅S₂ + 0,25CMI *MX* și 0,25CMI C₁₀H₁₄CuN₄O₅S₂ + 0,25CMI *ES* au demonstrat acțiune bactericidă asupra tulpinilor de *E. coli* după 12 ore și respectiv 16 ore de acțiune. Combinația 0,25CMI C₁₀H₁₄CuN₄O₅S₂ + 0,25CMI *ESI* nu a manifestat efect bactericid asupra tulpinilor de *E. coli* ATCC 25922 (Figura 17).

Specia *A. baumannii* BAA-747 a fost omorâtă după 16 ore de acțiune a combinației 0,25CMI C₁₀H₁₄CuN₄O₅S₂ + 0,25CMI *MXI* și după 20 de ore și respectiv 24 de ore de acțiune a combinațiilor 0,25CMI C₁₀H₁₄CuN₄O₅S₂ + 0,25CMI *ES* și 0,25CMI C₁₀H₁₄CuN₄O₅S₂ + 0,25CMI *ESI* (Figura 17).

Combinațiile 0,25CMI C₁₀H₁₄CuN₄O₅S₂ + 0,25CMI *MX* și 0,25CMI C₁₀H₁₄CuN₄O₅S₂ + 0,25CMI *ES* au demonstrat efect fungicid asupra micetelor levuriforme *C. albicans* ATCC 10231 peste 16 ore și respectiv 20 de ore de acțiune, iar combinația 0,25CMI C₁₀H₁₄CuN₄O₅S₂ + 0,25CMI *ESI* nu a manifestat efect fungicid (Figura 17).

La analiza acțiunii bactericide a combinațiilor compusului chimic cloro-{N-ciclohexil-N'-[(piridin-2-il)metiliden]-carbamo hidrazonotioato}cupru(II) cu compușii biologici incluși în studiu s-a constatat că combinația 0,25CMI C₁₃H₁₇ClCuN₄S + 0,25CMI *MX* exercită efect bactericid asupra tulpinilor de *S. aureus* ATCC 25923 după 12 ore de acțiune, iar combinațiile 0,25CMI C₁₃H₁₇ClCuN₄S + 0,25CMI *ES* și 0,25CMI C₁₃H₁₇ClCuN₄S + 0,25CMI *ESI* după 16 ore și respectiv 20 de ore de expunere (Figura 18).

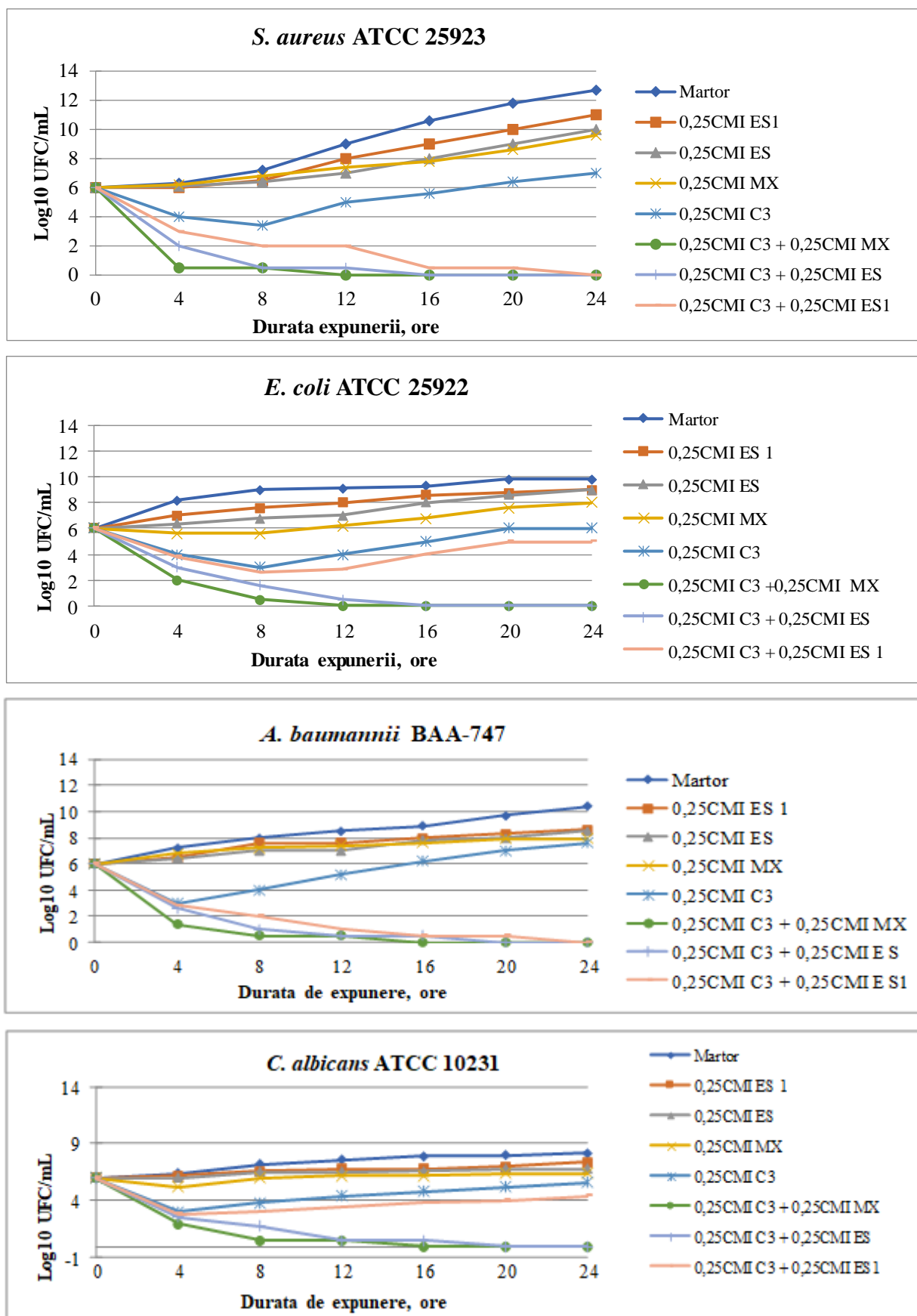


Figura 17. Cinetica activității antimicrobiene a compusului chimic $C_{10}H_{14}CuN_4O_5S_2$ și a compușilor biologici (*ES*, *ESI*, *MX*) asupra tulpinilor de referință

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

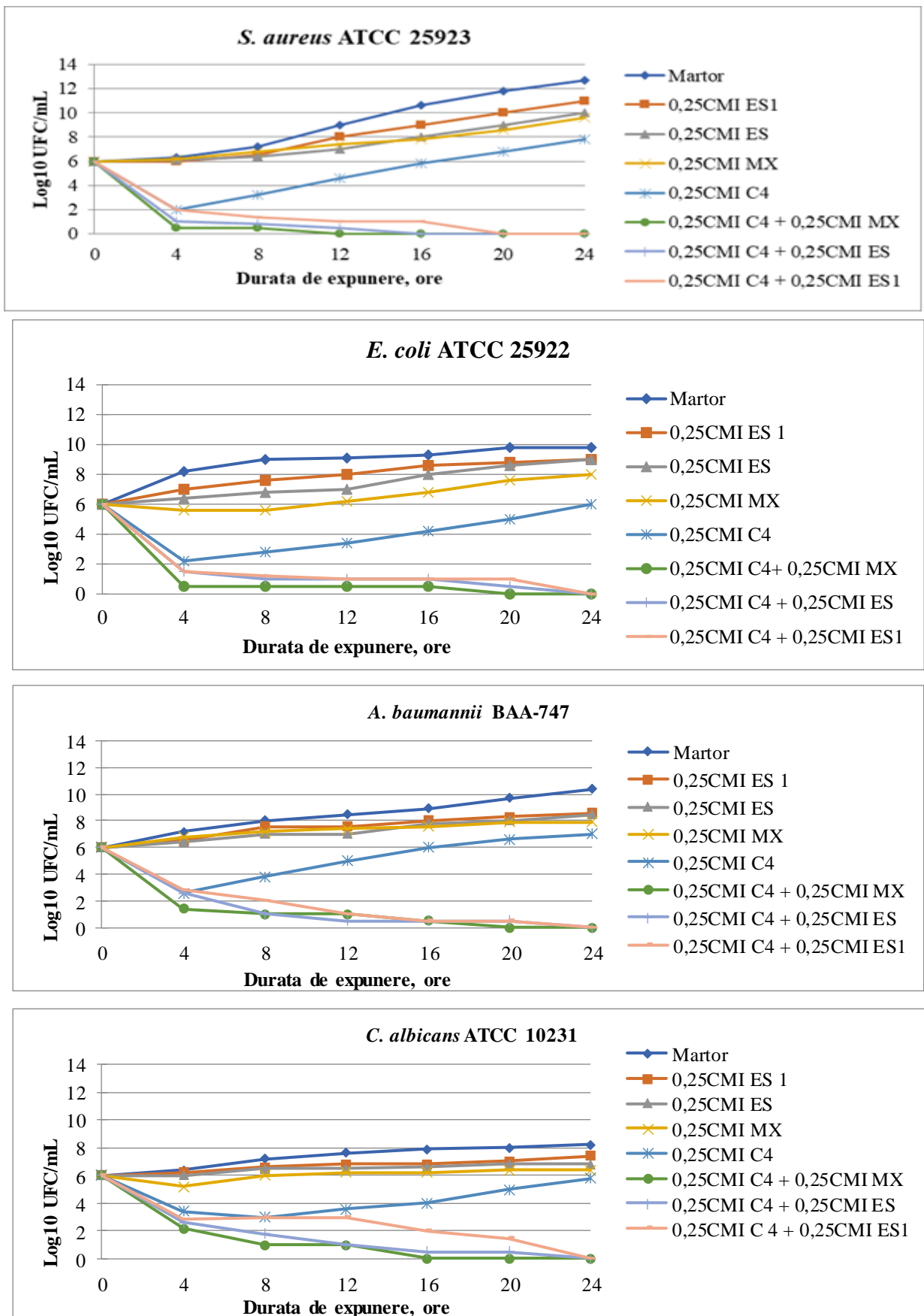


Figura 18. Cinetica activității antibacteriene a compusului chimic $C_{13}H_{17}ClCuN_4S$ și a compușilor biologici (*ES*, *ES1*, *MX*) asupra tulpinilor de referință

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

Combi-nația 0,25CMI C₁₃H₁₇ClCuN₄S + 0,25CMI *MX* a demon-strat acțiune bactericidă asupra tulpinilor de *E. coli* ATCC 25922 și de *A. baumannii* BAA-747 după 20 ore de acțiune, iar combinațiile 0,25CMI C₁₃H₁₇ClCuN₄S + 0,25CMI *ES* și 0,25CMI C₁₃H₁₇ClCuN₄S + 0,25CMI *ESI* au distrus bacilii gram-negativi după 24 ore de acțiune (Figura 18).

Combi-nația 0,25CMI C₁₃H₁₇ClCuN₄S + 0,25CMI *MX* a manifestat efect fungicid asupra micetelor levuriforme *C. albicans* ATCC 10231 după 16 ore de expunere, iar combinațiile 0,25CMI C₁₃H₁₇ClCuN₄S + 0,25CMI *ES* și 0,25CMI C₁₃H₁₇ClCuN₄S + 0,25CMI *ESI* după 24 de ore (Figura 18).

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.

Un factor important de patogenitate al bacteriilor este formarea de biofilme care, odată stabilit la nivelul ulcerului trofic, creează premise de persistență a microorganismelor și de cronicizare a procesului, ceea ce duce la limitarea terapiei antibacteriene. Combaterea biofilmelor necesită utilizarea unor doze mari de antimicrobiene și diversificarea strategiei. Cu regret, multe dintre antimicrobienele existente nu inhibă formarea biofilmelor, în special dacă sunt formate de microorganisme rezistente la antimicrobiene. Pentru a depăși această problemă se propune de a studia efectul antibiofilm al unor compuși de origine naturală (ex. animalieră, vegetală, fungică, bacteriană etc.) sau sintetică.

Producerea factorilor de patogenitate este controlată de mecanisme reglatoare (QS, eng. *quorum sensing*), iar interferența cu aceste mecanisme ar putea influența producerea unor factori de virulență. Una dintre provocările în perturbarea acestui sistem este faptul că un microorganism poate fi dotat cu mai multe sisteme QS din aceeași clasă. Prin urmare, inhibarea completă a sistemelor QS cu tratamente bazate pe monoterapie este dificil de realizat.

Ca răspuns la provocare, au fost testate capacitatea unei terapii combinatoare de a suprima sistemele QS la tulpinile de *P. aeruginosa*. În urma studiilor efectuate, s-a constatat că terapia combinată inhibă vădit expresia factorilor de patogenitate, spre deosebire de tratamentele bazate pe utilizarea unui singur preparat. Această constatare a sugerat ideea inovatoare de utilizare a terapiei combinatoare, folosind compuși cu diverse mecanisme de acțiune, pentru a exercita influență asupra diverselor sisteme QS ale agenților microbieni.

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 19).

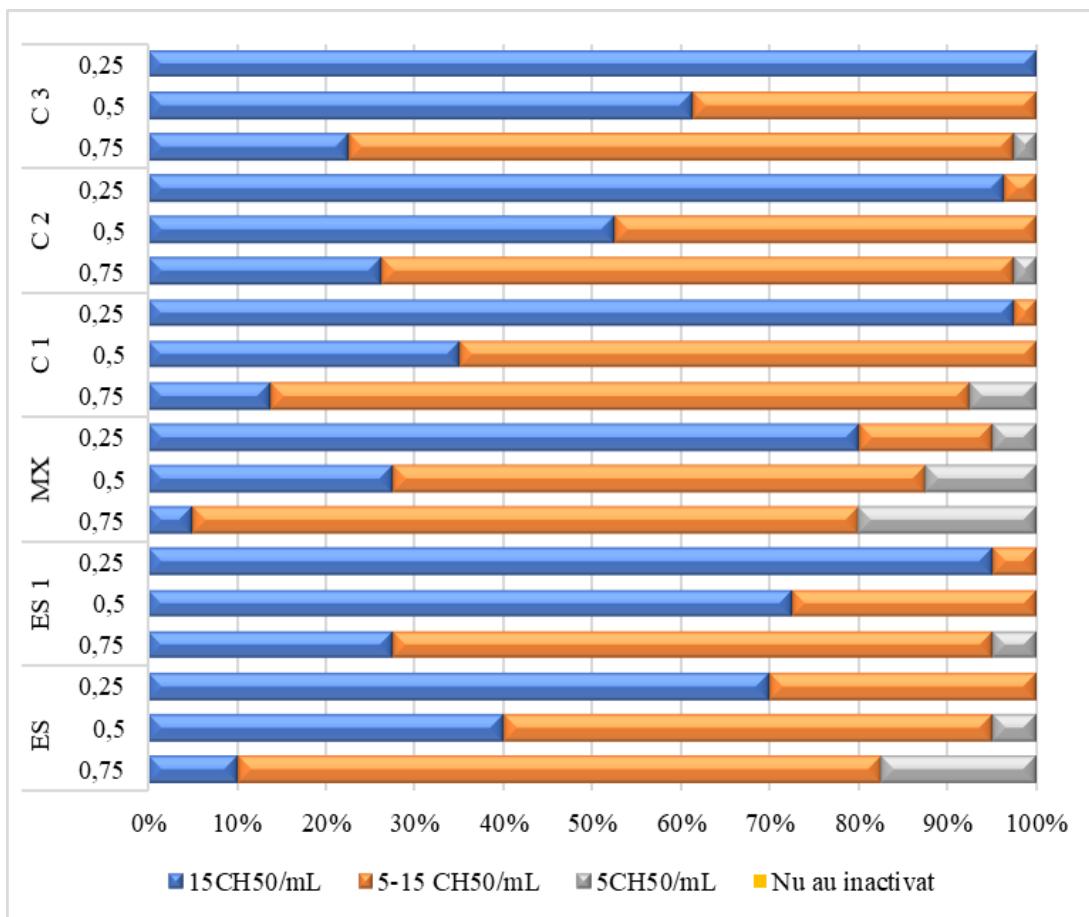


Figura 19. Activitatea anticomplementară a microorganismelor sub acțiunea compușilor chimici și biologici

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 *MXI* 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 5 CH50/mL.

Dintre compușii chimici, activitatea anticomplementară a fost mai exprimată la compusul nitrato- $\{N\text{-}(\text{prop-2-en-1-il})\text{-}N'\text{-}[1\text{-}(\text{piridin-2-il})\text{-etiliden}]\text{carbamohidrazontioato}\}$ imidazolcupru monohidrat (concentrația 75%). Sub acțiunea acestuia, 78,8% dintre tulpinile de referință 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 20).

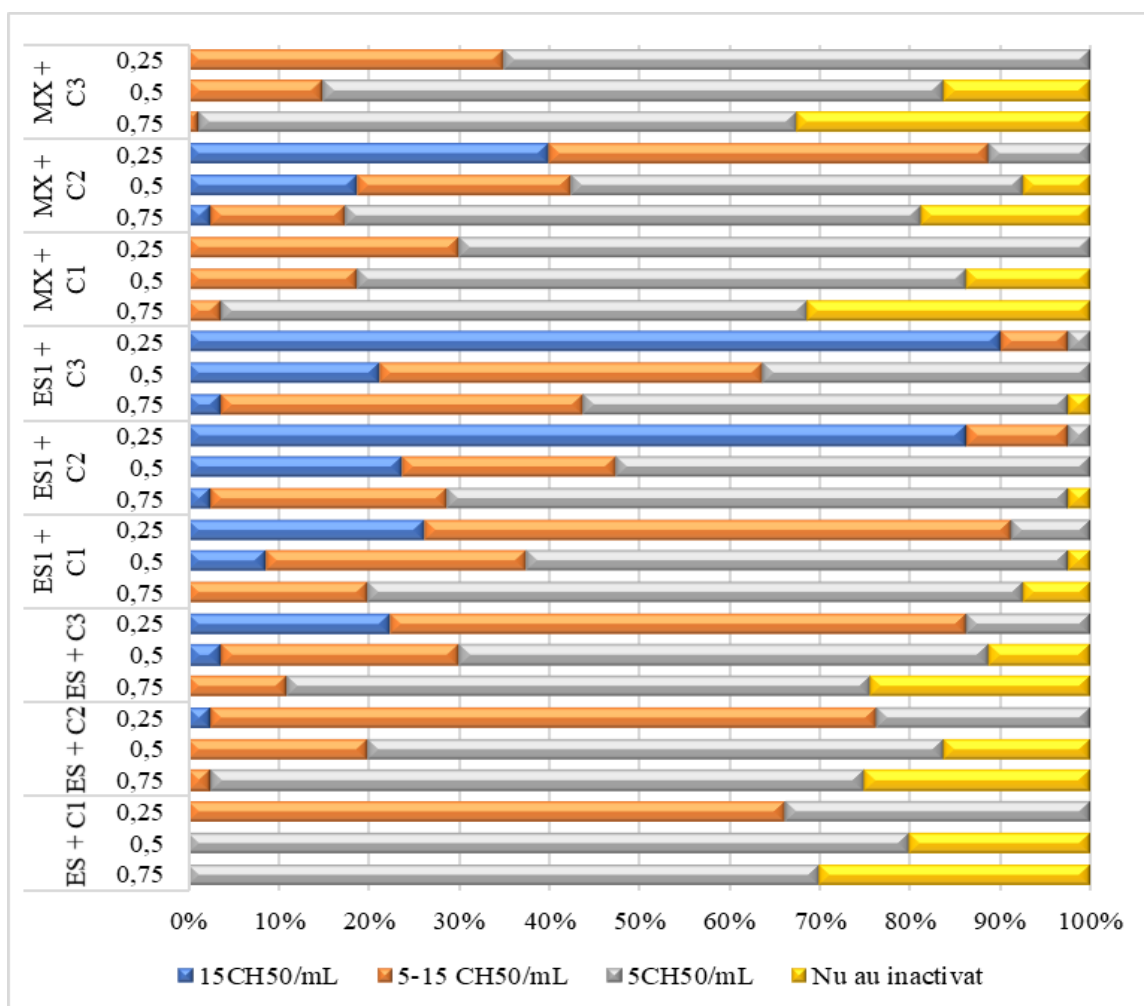


Figura 20. Activitatea anticomplementară a microorganismelor sub acțiunea compușilor chimici și biologici în combinație.

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

Combi-națiile compusului biologic *MX* cu compușii chimici cloro-{*N*-ciclohexil-*N'*-[(piridin-2-il)metiliden]-carbamohidrazonotioato}cupru(II) și nitrato-{*N*-(prop-2-en-1-il)-*N'*-[1-(piridin-2-il)-etiliden]carbamohidrazontioato}imidazolcupru monohidrat 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 nitrato-{*N*-(prop-2-en-1-il)-*N'*-[1-(piridin-2-il)-etiliden]carbamohidrazontioato}imidazolcupru 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 antilizo-zim de către tulpinile de *S. aureus* și de *E. coli* la acțiunea individuală a compușilor chimici și biologici luați în studiu (Figura 21).

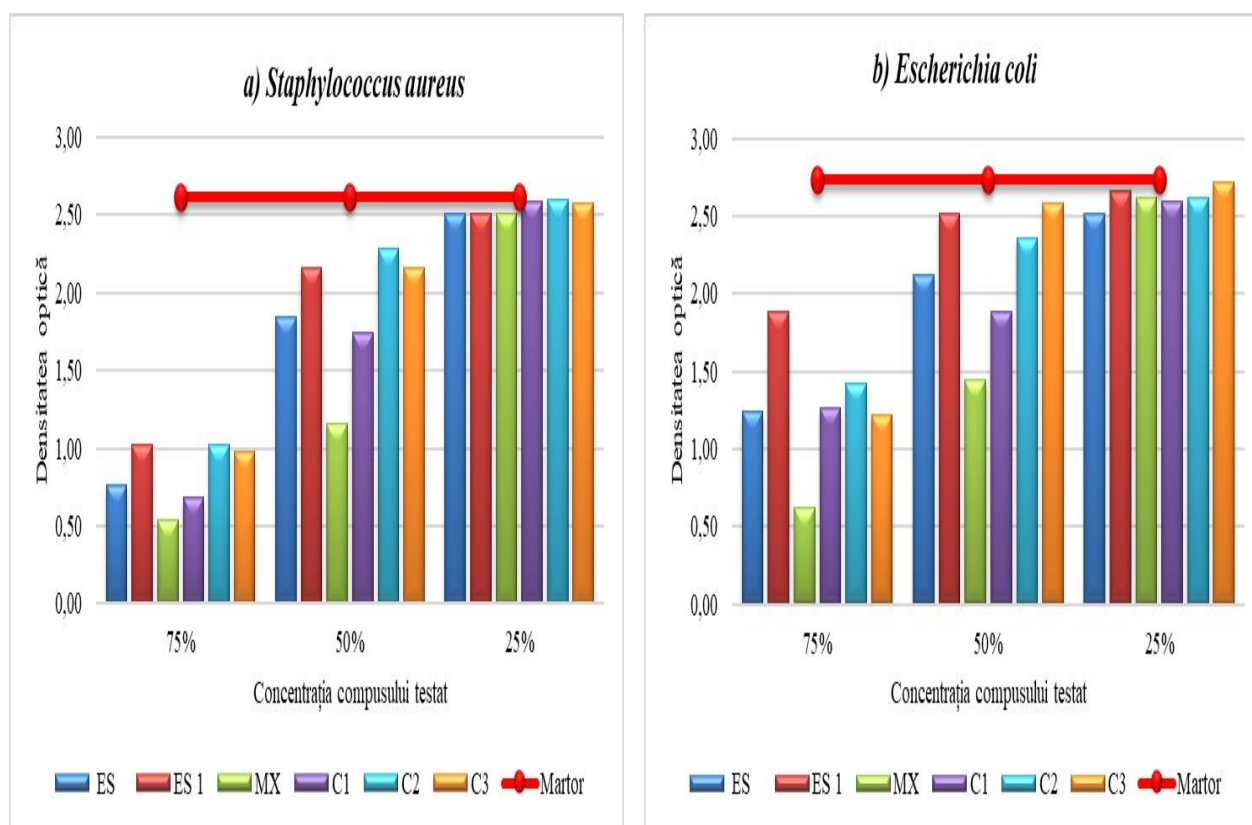


Figura 21. Activitatea antilizo-zim a microorganismelor sub acțiunea compușilor chimici și biologici

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

În urma analizei rezultatelor obținute s-a constatat că atât compușii chimici, cât și cei biologici au inactivat activitatea antilizo-zim a tulpinilor testate, în comparație cu tulpinile-martori, care au manifestat un grad înalt de activitate antilizo-zim (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 (Figura 21).

În studiu a fost determinată și acțiunea combinată a compușilor biologici și chimici asupra gradului de exprimare a activității antilizozim (Figura 22).

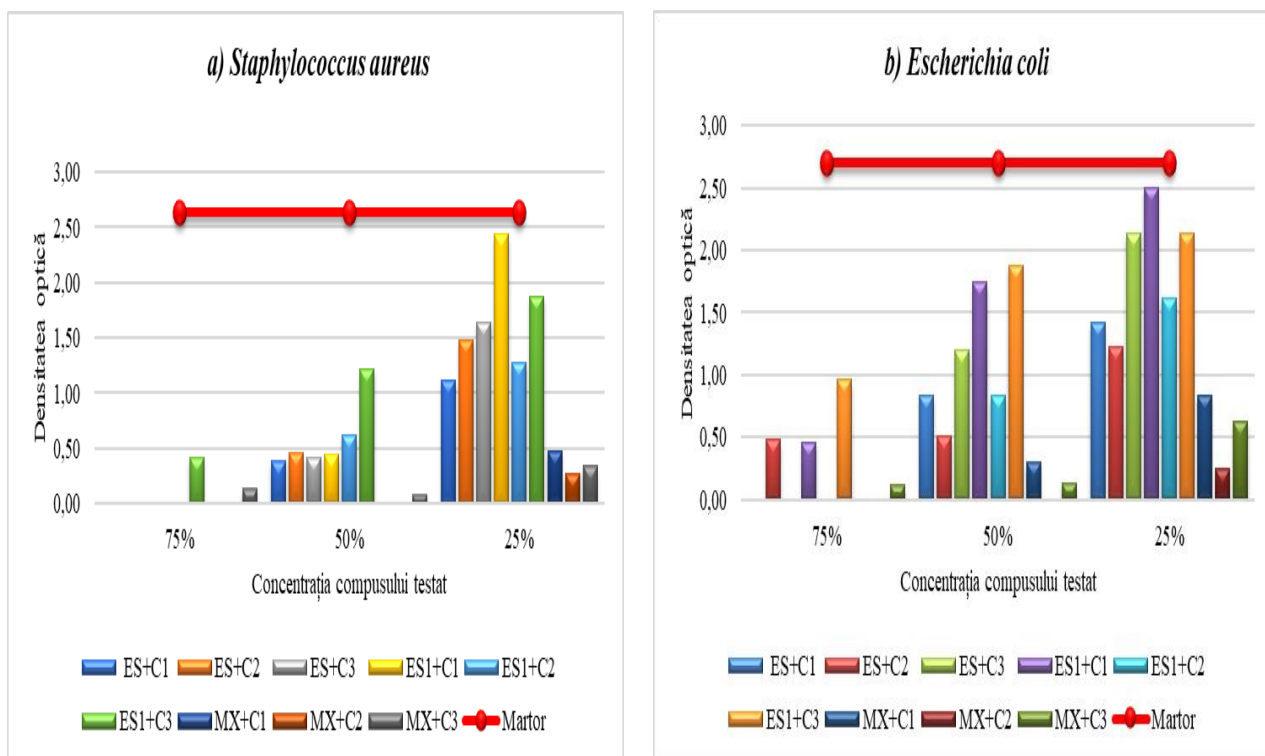


Figura 22. Activitatea antilizozim a microorganismelor sub acțiunea compușilor chimici și biologici în combinație

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

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% cloro-{N-ciclohexil-N'-[(piridin-2-il)metiliden]-carbamohidrazonotioato}cupru(II), 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 cloro-{N-ciclohexil-N'-[(piridin-2-il)metiliden]-carbamohidrazonotioato} cupru(II), la care s-a înregistrat un grad mediu de exprimare.

Combi-na-țiile compușilor chimici cu compusul biologic *MX* au prezentat cel mai bun efect asupra exprimării activității antilizo-zim a tulpinilor microbiene testate. Combi-na-țiile *MX* + nitrato- $\{N\text{-}(\text{prop-2-en-1-il})\text{-}N'\text{-}[1\text{-}(\text{piridin-2-il})\text{-etiliden}]\text{carbamohidrazontioato}\}$ imidazolcupru monohidrat și *MX* + $\{\text{Prop-2-en-1-il-}N\text{-prop-2-en-1-il-}N'\text{-}[(\text{piridin-2-il})\text{-metiliden}]\text{carbamohidrazonotioat}\}$ dibromo-cupru la concentrațiile de 50% și 75% au redus la zero activitatea antilizo-zim 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 antilizo-zim, cu excepția combinației *MX* + nitrato- $\{N\text{-}(\text{prop-2-en-1-il})\text{-}N'\text{-}[1\text{-}(\text{piridin-2-il})\text{-etiliden}]\text{carbamohidrazontioato}\}$ -(3,4-dimetilpiridin)-cupru, la care tulpinile de *E. coli* au înregistrat un grad mediu de exprimare a activității antilizo-zim ($K=0,63$).

În studiu a fost determinată și influența compușilor chimici și biologici asupra formării biofilmelor microbiene (Figura 23).

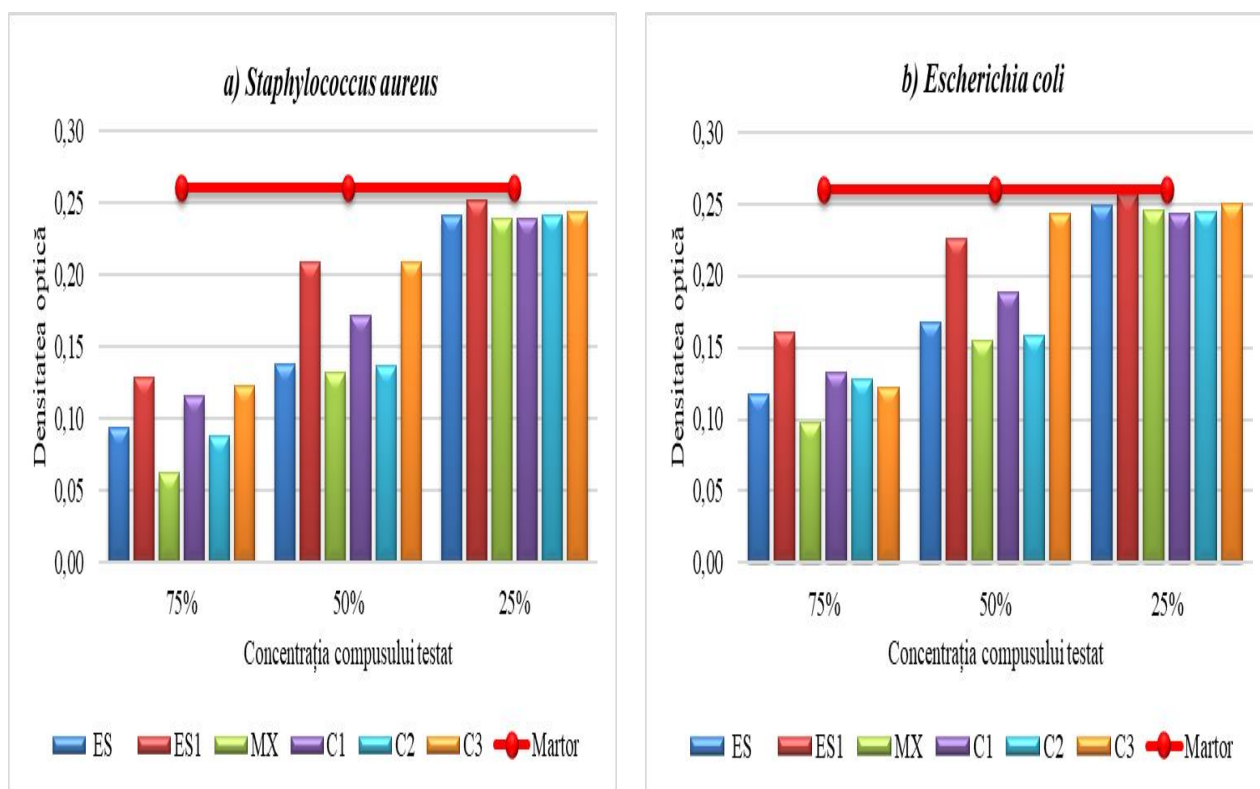


Figura 23. Gradul de formare a biofilmelor microbiene la acțiunea compușilor chimici și biologici

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

Conform rezultatelor obținute, la acțiunea compușilor chimici și biologici în concentrație de 25% și a compușilor *ES1* și cloro- $\{N\text{-ciclohexil-}N'\text{-}[(\text{piridin-2-il})\text{metiliden}]\text{carbamohidrazonotioato}\}$ cupru(II) 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 cărui 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 {Prop-2-en-1-il-N-prop-2-en-1-il-N'-[(piridin-2-il)-metiliden]carbomhidrazonotioat}dibromo-cupru.

Acțiunea compușilor chimici și biologici asupra capacității de formare a biofilmelor de către tulpinile de *S. aureus* și de *E. coli* a fost studiată și în combinație (Figura 24).

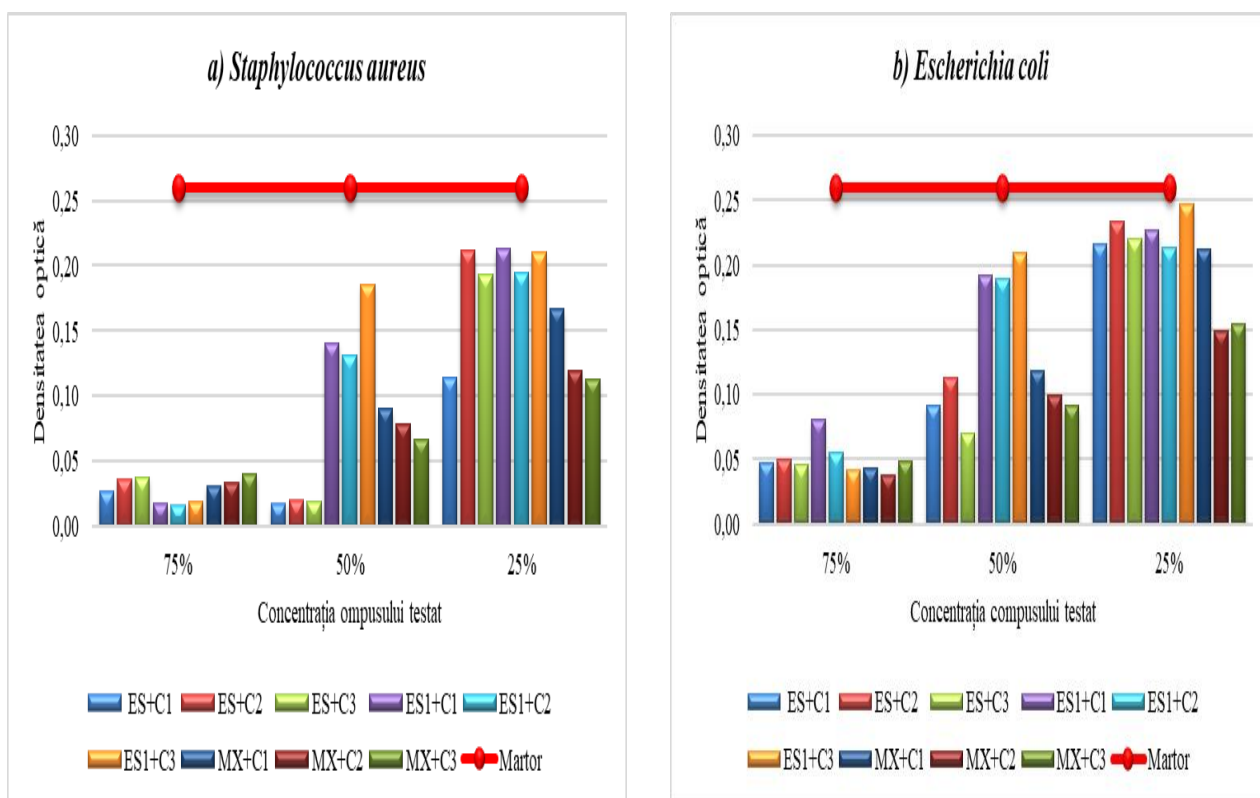


Figura 24. Gradul de formare a biofilmelor microbiene la acțiunea compușilor chimici și biologici în combinație

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

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* + {Prop-2-en-1-il-N-prop-2-en-1-il-N'-[(piridin-2-il)-metiliden]carbomhidrazonotioat}- dibromo-cupru; *MX* + nitrato-{N-(prop-2-en-1-il)-N'-[1-(piridin-2-il)etiliden]carbomhidrazon-tioato}imidazolcupru monohidrat și combinațiilor dintre compușii chimici cu compusul biologic *ESI*, 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* + nitrato-*N*-(prop-2-en-1-il)-*N'*-[1-(piridin-2-il)-etiliden]carbamo-hidrazontioato}imidazolcupru monohidrat, *ES* + cloro-*N*-ciclohexil-*N'*-[(piridin-2-il)metiliden]-carbamo-hidrazonotioato}cupru(II) și *ES1* + {Prop-2-en-1-il-*N*-prop-2-en-1-il-*N'*-[(piridin-2-il)-metiliden]carbamo-hidrazonotioat}dibromo-cupru, 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 în figura 25.

O activitate antilecitinazică mai înaltă, atât la microorganismele gram-pozitive, cât și gram-negative, au demonstrat compușii chimici în concentrație de 75% (Figura 25). Cel mai activ a fost compusul {Prop-2-en-1-il-*N*-prop-2-en-1-il-*N'*-[(piridin-2-il)metiliden]carbamo-hidrazonotioat}dibromo-cupru, urmat de compusul cloro-*N*-ciclohexil-*N'*-[(piridin-2-il)metiliden]-carbamo-hidrazonotioato}cupru(II) și nitrato-*N*-(prop-2-en-1-il)-*N'*-[1-(piridin-2-il)-etiliden]carbamo-hidrazontioato}imidazolcupru monohidrat.

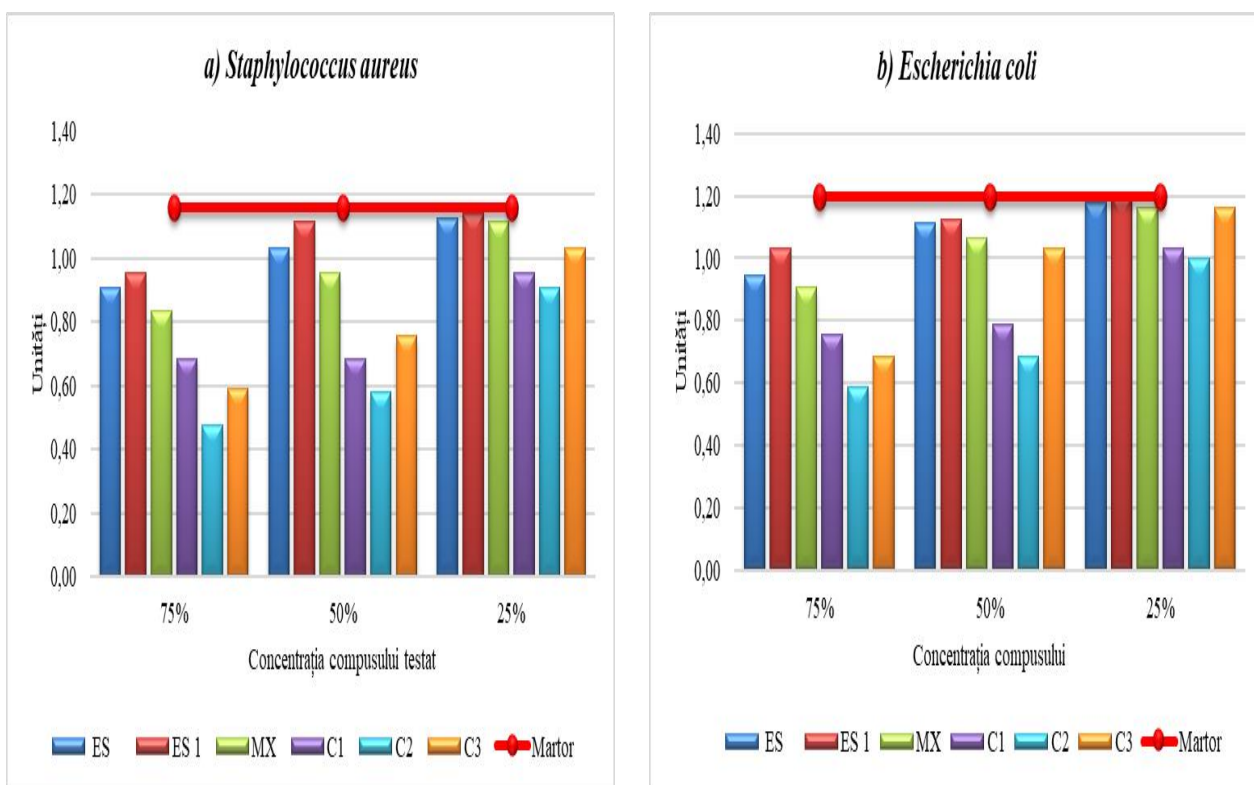


Figura 25. Gradul de exprimare a lecitinazei microbiene la acțiunea compușilor chimici și biologici

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

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 {Prop-2-en-1-il-*N*-prop-2-en-1-il-*N'*-[(piridin-2-il)-metiliden]carbamo-hidrazonotioat}dibromo-cupru, diminuând activitatea lecitinazei de la

1,16±0,027 unități până la 0,48±0,031 unități, pentru tulpinile de *S. aureus*, și de la 1,2±0,0 unități până la 0,48 ±0,013 unități pentru tulpinile de *E. coli* (Figura 25).

Dintre compușii biologici mai activ a fost compusul *MX*, care a redus activitatea lecitinazei de la 1,6±0,027 unități până la 0,83±0,036 unități, la tulpinile de *S. aureus*, și de la 1,2±0,00 până la 0,91±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 (Figura 26). 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%.

Combinarea compusului *MX* cu compusul chimic cloro-{N-ciclohexil-N'-[(piridin-2-il)metiliden]-carbamohidrazonotioato}cupru(II) a redus cel mai mult activitatea lecitinazei: la tulpinile de *S.aureus* de la 1,14±0,00 unități până la 0,10±0,024 unități, iar la tulpinile de *E. coli* de la 1,18±0,027 unități până la 0,23±0,033 unități.

La acțiunea combinației compusului biologic *MX* cu compusul chimic {Prop-2-en-1-il-N-prop-2-en-1-il-N'-[(piridin-2-il)-metiliden]carbamohidrazonotioat}dibromo-cupru la o concentrație de 50% s-a înregistrat o reducere a activității lecitinazei: la tulpinile de *S.aureus* de la 1,14±0,00 unități până la 0,32±0,027 unități, iar la tulpinile de *E. coli* de la 1,18±0,027 unități la 0,41±0,013 unități.

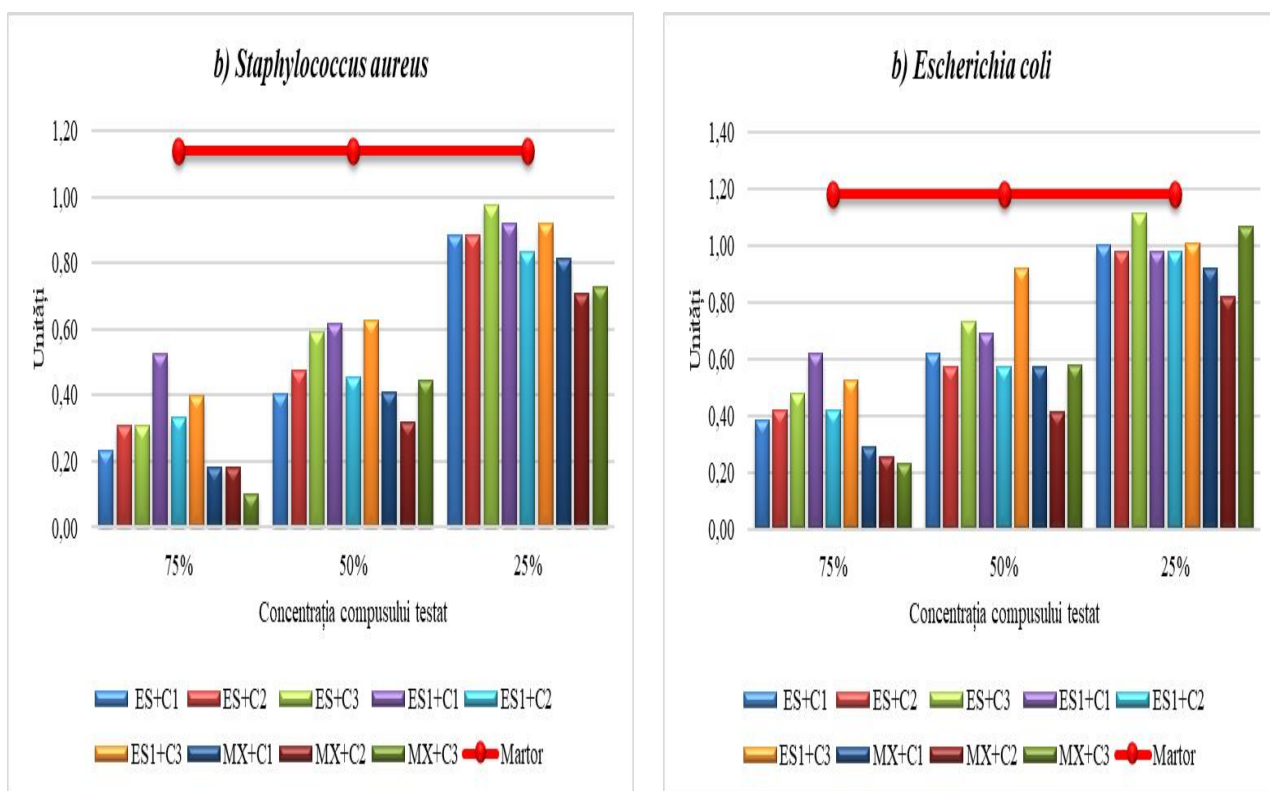


Figura 26. Gradul de exprimare a lecitinazei microbiene la acțiunea compușilor chimici și biologici în combinație

Notă. C1 - C₁₄H₁₉CuN₇O₄S, C2 - C₁₃H₁₆Br₂CuN₄S, C3 - C₁₃H₁₇ClCuN₄S

Rezultatele testării acțiunii compușilor chimici și biologici asupra gradului de exprimare a enzimei hemolizina de către tulpinile microbiene sunt prezentate pe figura 27. Un efect mai mare de reducere a activității hemolizinei s-a înregistrat la acțiunea compusului chimic nitrato- $\{N\text{-}(\text{prop-2-en-1-il})\text{-}N'\text{-}[1\text{-}(\text{piridin-2-il})\text{-etiliden}]\text{carbamohidrazontioato}\}$ imidazol-cupru monohidrat și a compusului cloro- $\{N\text{-ciclohexil-}N'\text{-}[(\text{piridin-2-il})\text{metiliden}]\text{-carbamohidrazono-tioato}\}$ cupru(II) 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.

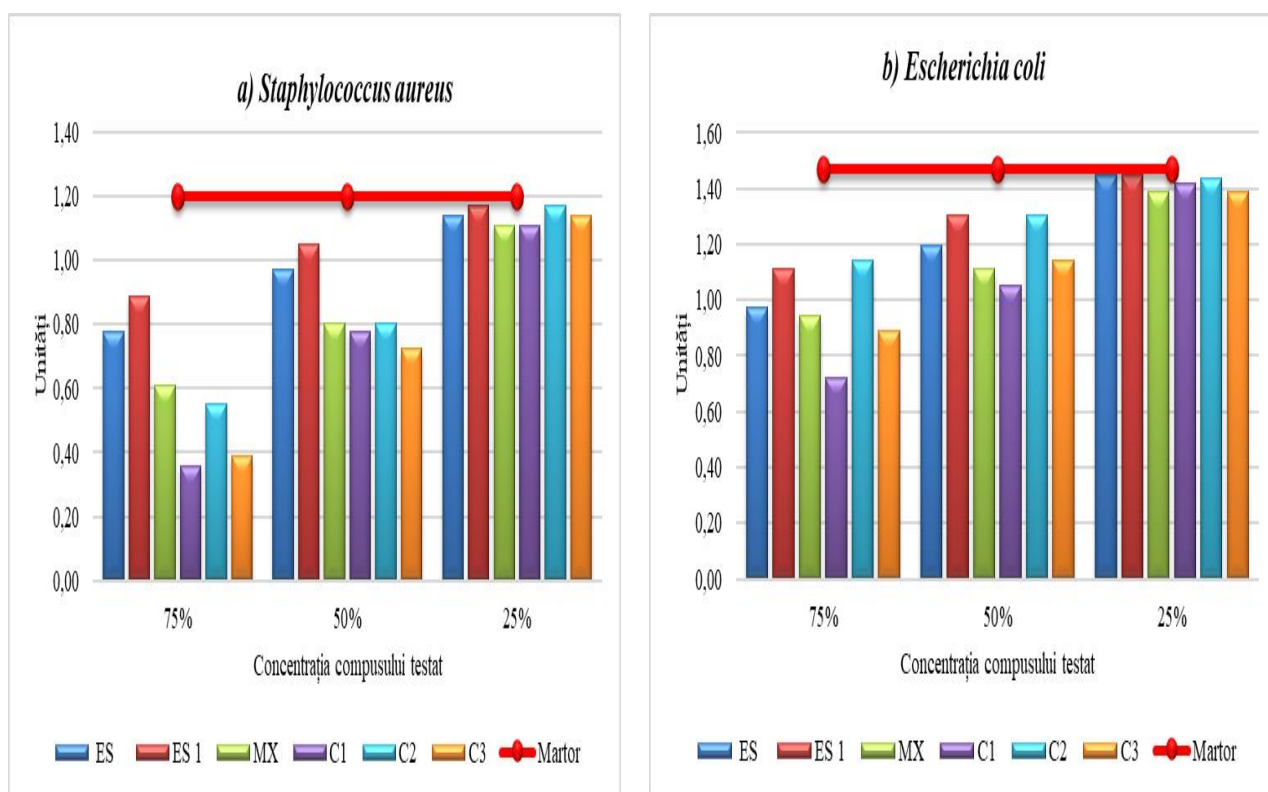


Figura 27. Gradul de exprimare a hemolizinei microbiene la acțiunea compușilor chimici și biologici

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

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 nitrato- $\{N\text{-}(\text{prop-2-en-1-il})\text{-}N'\text{-}[1\text{-}(\text{piridin-2-il})\text{-etiliden}]\text{carbamohidrazontioato}\}$ imidazolcupru monohidrat în toate concentrațiile (Figura 28). 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%.

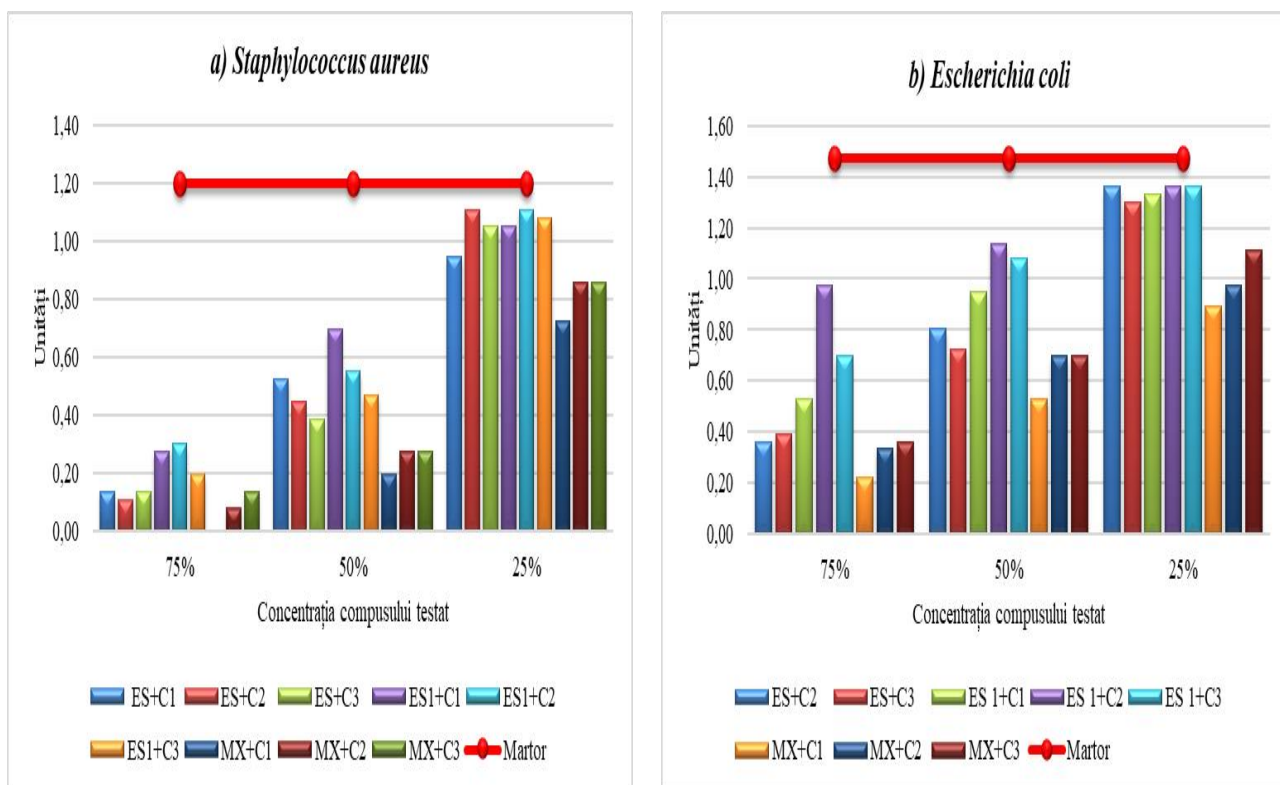


Figura 28. Gradul de exprimare a hemolizinei microbiene la acțiunea compușilor chimici și biologici în combinație

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

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%.

4.5. Concluzii la capitolul 4

1. Compușii nitrat de catenă-(μ -nitrato-O,O`)-{N-(prop-2-en-1-il)-2-[(piridin-2-il)etiliden]hidrazin-1-carbotioamid}-cupru(II) și acetato-{N-ciclohexil-N'-[(piridin-2-il)metiliden]-carbomohidrazonotioato}cupru(II), care au în calitate de precursor de sinteză azotatul de cupru (II), au manifestat o activitate bactericidă și bacteriostatică înaltă asupra tuturor speciilor de microorganisme gram-pozitive luate în studiu. Acești compuși au manifestat activitate antimicrobiană în doze mici, în special asupra tulpinilor de *B. cereus* ATCC 11778, de *B. subtilis* ATCC 6633 și de *S. pyogenes* ATCC 12344.
2. Activitate mai înaltă asupra bacteriilor gram-negative, atât glucozo-fermentative, cât și nonfermentative, au demonstrat nitratul de catenă-(μ -nitrato-O,O`)-{N-(prop-2-en-1-il)-

- 2-[(piridin-2-il)etiliden]hidrazin-1-carbotioamid}-cupru(II) și compusul bis(μ 2-acetato-O)-bis{[N-prop-2-en-1-il-N'-(piridin-2-ilmetiliden)carbamohidrazono-tioato]cupru} dihidrat.
3. Compușii {N'-[(4-hidroxi-2-oxidofenil)metiliden]-N-prop-2-en-1-ilcarbamohidrazono-tioato}(3,4-dimetilpiridin)cupru și nitratul de {2-[1-(2-hidroxifenil)etiliden]-N-(prop-2-en-1-il)hidrazin-1-carbotioamid}(1,10-fenantrolin)-cupru(II), la a căror sinteză a fost utilizată clorura de cupru, au fost mai activi împotriva micetelor levuriforme *Candida albicans* ATCC 10231 și *Cryptococcus neoformans* CECT 1043.
 4. Compușii biologici au exercitat acțiune antimicrobiană împotriva tuturor speciilor luate în studiu. Cea mai înaltă activitate antimicrobiană față de bacteriile gram-pozitive și gram-negative a manifestat compusul *MX1*, urmat de compușii *MX2* și *ES*. Mai activi contra micetelor levuriforme a fost compusul *MX2*, urmat de compușii *MX1* și *ES*. Compușii *ES1* și *ES2* au manifestat acțiune antimicrobiană în concentrații mai mari.
 5. Testul de determinare a toxicității acute a compușilor chimici noi față de dafnii au demonstrat 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) denotă o toxicitate mai redusă în comparație cu preparatul medicamentos clorhidratul de doxorubicină (CL50 3,27±0,30).
 6. Atât compușii chimici, cât și cei biologici au demonstrat acțiune antimicrobiană asupra tulpinilor izolate din ulcere trofice în concentrații mai mari, comparativ cu tulpinile de referință.
 7. 87,2 % din combinațiile compușilor chimici cu cei biologici au manifestat acțiuni sinergice și doar 6,8 % acțiuni aditive, iar 6,0% acțiuni indiferente. Efectele aditive și indiferente au fost observate îndeosebi asupra bacililor gram-negativi și a micetelor levuriforme. La combinarea compușilor chimici cu cei biologici nu au fost înregistrate acțiuni antagoniste. 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 compușilor chimici și biologici în concentrație de 0,25CMI, în majoritatea cazurilor nu a fost înregistrată reducerea numărului de celule microbiene, iar la combinarea lor microorganismele au fost omorâte peste 8-24 de ore. Cel mai scurt timp de distrugere a microorganismelor (8-20 ore) a fost înregistrat la combinarea compușilor chimici cu compusul biologic *MX1*.
 9. Activitatea anticomplementară, antilizozim, lecitinazică și hemolizinică au fost diminuate mai puternic la utilizarea compușilor chimici și biologici în concentrații de 75%, atât individual, cât și în combinație. Cea mai înaltă activitate au manifestat combinațiile

compușilor biologici și chimici, în special combinațiile dintre compusul biologic *MXI* și compușii chimici.

10. Capacitatea de formare a biofilmelor microbiene s-a redus esențial după tratarea tulpinilor bacteriene cu compuși biologici combinați cu compușii chimici nitrato- $\{N\text{-}(\text{prop-2-en-1-il})\text{-}N'\text{-}[1\text{-}(\text{piridin-2-il})\text{-etiliden}]\text{carbamohidrazon- tioato}\}$ imidazolcupru monohidrat și $\{\text{Prop-2-en-1-il-}N\text{-prop-2-en-1-il-}N'\text{-}[(\text{piridin-2-il})\text{-metiliden}]\text{carbamohidrazonotioat}\}$ dibro-mocupru în concentrații de 75%.

5. MODIFICĂRI ALE UNOR PARAMETRI BIOCHIMICI AI MICROORGANISMELOR INDUSE DE COMPUȘI CHIMICI ȘI BIOLOGICI NOI

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

Efectele compușilor chimici și ale extractelor de cianobacteria *Spirulina platensis* asupra culturilor de microorganisme patogene sunt asociate cu diferite modificări importante atât în componența biochimică, cât și în derularea ciclurilor biochimice vitale.

Acțiunea xenobioticelor, exprimată la nivel de cultură bacteriană prin inhibarea creșterii sau chiar moartea celulelor, este asociată cu stresul oxidativ. Nivelul stresului oxidativ, provocat de diferite acțiuni exogene asupra celulelor vii, poate fi măsurat prin cuantificarea directă a radicalilor liberi și a moleculelor reactive sau prin metode indirecte, cu utilizarea markerilor biologici ai degradării structurilor celulare. Markerii biologici ai stresului oxidativ pot fi cuantificați mai simplu din punct de vedere tehnic, aceștia fiind mult mai stabili, comparativ cu speciile reactive, iar datele obținute reflectă nu atât situația de moment, cât modificările induse, de cele mai multe ori ireversibile.

În calitate de markeri ai stresului oxidativ se utilizează cel mai des produsele biodegradării a trei clase de compuși biologici macromoleculari – acizilor nucleici, proteinelor și lipidelor. 8-hidroxi-deoxiguanozina (8-OHdG) este cel mai frecvent utilizat marker de deteriorare oxidativă a ADN-ului, iar denaturarea oxidativă a proteinelor poate fi apreciată prin măsurarea produselor carbonilării și a nitrării proteinelor (3-nitrotipozinelor). Speciile reactive de oxigen pot provoca de asemenea formarea de produse finale de glicare avansată a proteinelor (AGE - *advanced glycation end products*) și de produse de oxidare avansată a proteinelor (AOPP - *advanced oxidation protein products*). Totuși, cei mai utilizați și mai preciși markeri ai stresului oxidativ sunt considerate produsele finale ale degradării oxidative a lipidelor.

Peroxidarea lipidelor are loc cu producerea mai multor produse secundare, dintre care două majore – dialdehida malonică (DAM) și 4-hidroxi-2-nonenal (4-HNE). DAM se formează la descompunerea acizilor grași polinesaturați de dimensiuni mari și la metabolizarea acidului arahidonic în timpul sintezei tromboxanului A₂. În urma reacției DAM cu acidul tiobarbituric la pH 3,5 se formează un aduct DAM-TBA, detectat spectrofotometric la 532 nm. Această reacție este cunoscută ca testul substanțelor reactive ale acidului barbituric.

Determinarea modificării conținutului de dialdehidă malonică în masa celulară se aplică cu succes pentru identificarea condițiilor de stres ori a efectelor toxice ale diferitor substanțe. Molecula de dialdehidă malonică poate fi considerată un marker universal, cuantificabil în

diferite tipuri de celule, inclusiv procariote. La testarea produselor farmaceutice aceasta poate fi un indicator al perspicacității utilizării acestora în calitate de remedii terapeutice.

O altă moleculă semnificativă pentru evidențierea unor efecte toxice ale xenobioticelor asupra celulelor vii este enzima lactat dehidrogenaza (LDH). Aceasta transformă piruvatul în lactat și regenerează NAD^+ pentru continuarea glicolizei. Pe lângă metabolismul fermentativ, LDH este implicată și în virulența microbiană. Menținerea unui nivel adecvat al activității LDH în celulele microbiene este condiția rezistenței acestora la stres, deoarece determină capacitatea lor de a menține echilibrul redox. În absența LDH, bacteriile sunt susceptibile la diferiți factori de stres, inclusiv substanțe cu acțiune antimicrobiană. Deficitul de LDH atenuează capacitatea microorganismelor de a coloniza organisme-gazdă. Astfel, enzima LDH este importantă pentru metabolismul și virulența microorganismelor patogene. Activitatea LDH se manifestă strict în interiorul celulelor vii, iar în caz de efecte toxice, soldate cu modificarea permeabilității membranei și peretelui celular ori deteriorarea lor, aceasta poate fi eliberată în mediul extracelular. Așadar, prezența LDH în afara celulelor poate fi considerată o demonstrație a efectelor toxice asupra celulelor.

Protecția antioxidantă este realizată de sistemele de antioxidanți, printre care rolul cheie este jucat de enzimele antioxidante. Supeoxid dismutaza, catalaza și peroxidaza sunt trei enzime antioxidante primare, a căror activitate asigură eliminarea eficientă a radicalilor liberi și protejează celulele vii de efectele nocive ale stresului oxidativ. În cazul patogenilor, aceste enzime sunt adesea sintetizate și eliminate în mediul extracelular pentru protecția microorganismului de sistemul imun al macroorganismului, care se manifestă inclusiv prin eliminarea radicalilor liberi local, la nivelul de interacțiune a gazdei cu microorganismul patogen.

Nivelul de toxicitate al compușilor chimici și biologici apare și în combinații a fost apreciat după cantitatea de dialdehidă malonică în biomasa microorganismelor testate. Rezultatele obținute sunt prezentate în figurile 29-31. 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.

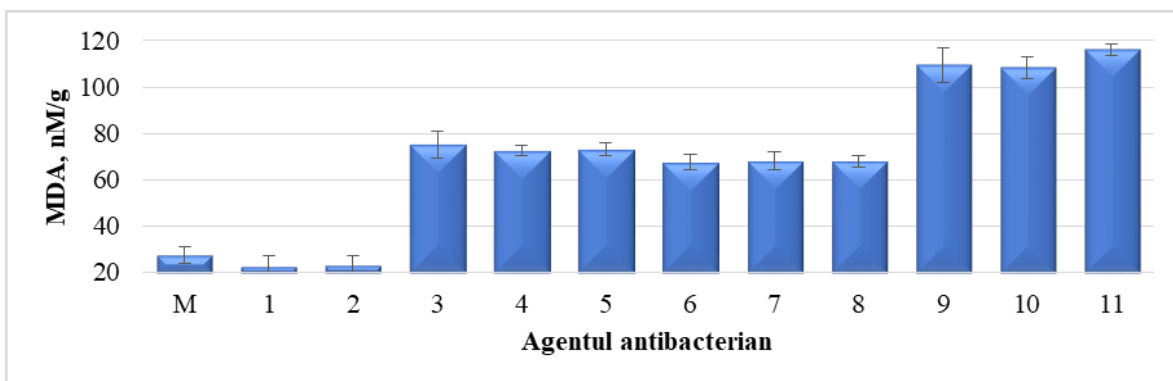
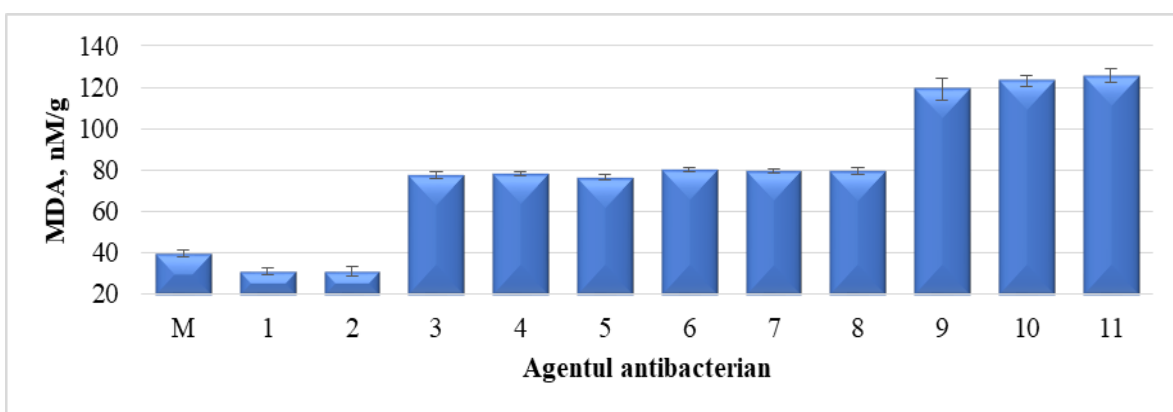
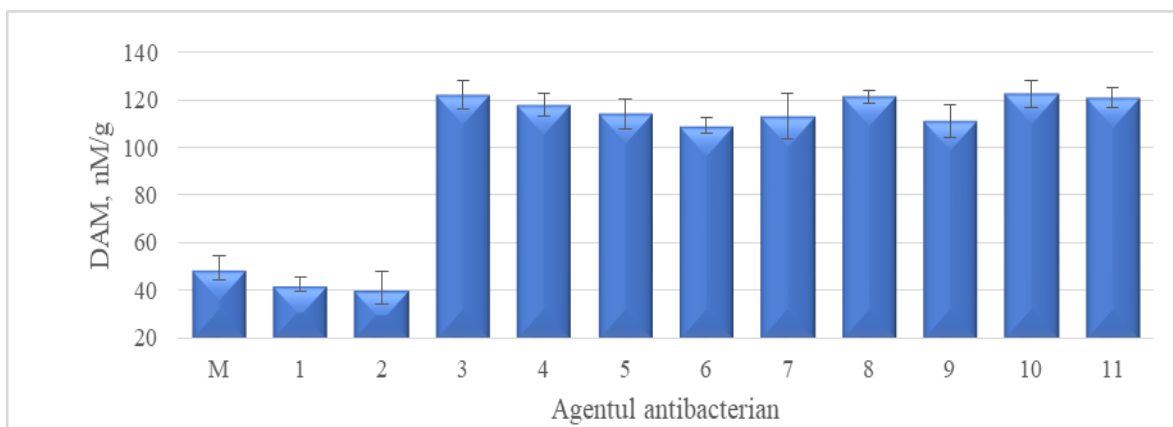


Figura 29. **Influența compușilor testați asupra cantității de dialdehidă malonică în masa celulară de (A) *P. aeruginosa* ATCC 27853, (B) de *E. coli* ATCC 25922 și (C) de *S. aureus* ATCC 25923**

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 29). 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 (Figura 29).

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 nitrato- $\{N-(prop-2-en-1-il)-N'-[1-(piridin-2-il)-etiliden]carbamo hidrazon-tioato\}$ imidazolcupru monohidrat și sulfatul de $\{N-(prop-2-en-1-il)-2-[(piridin-2-il)-metiliden]hidrazin-1-carbotioamid\}$ aquacupru(II), atât aplicați separat, cât și în combinație cu *MX* și cu *ES*, au produs o dublare a cantității de DAM. Compusul $\{Prop-2-en-1-il-N-prop-2-en-1-il-N'-[(piridin-2-il)-metiliden]carbamo hidrazonotioat\}$ dibromo -cupru 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 $\{Prop-2-en-1-il-N-prop-2-en-1-il-N'-[(piridin-2-il)-metiliden]carbamo hidrazonotioat\}$ dibromo-cupru.

Conform rezultatelor obținute, creșterea cantității de DAM a fost mai mare în cazul tulpinilor de *S. aureus*. Astfel compușii nitrato- $\{N-(prop-2-en-1-il)-N'-[1-(piridin-2-il)-etiliden]carbamo hidrazontioato\}$ imidazolcupru monohidrat și sulfatul de $\{N-(prop-2-en-1-il)-2-[(piridin-2-il)-metiliden]hidrazin-1-carbotioamid\}$ aquacupru(II) 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 $\{Prop-2-en-1-il-N-prop-2-en-1-il-N'-[(piridin-2-il)-metiliden]carbamo hidrazonotioat\}$ dibromo-cupru de 3,9-4,2 ori (comparativ cu 3,0-3,2 în cazul *E. coli*).

Nivelul de modificare a permeabilității selective a membranei celulare și a integrității învelișurilor celulare la tulpinile microbiene studiate a fost apreciat după activitatea lactat dehidrogenazei eliberate în mediul extracelular. Această enzimă, tipică pentru spațiul intracelular, lipsește în spațiul extracelular al celulelor vii, fiziologic active, și apare doar în caz de liză a acestora, din motive fiziologice (de ex., moarte programată) sau din exogene, induse de prezența substanțelor toxice.

Rezultatele testării nivelului de activitate a LDH eliberată de cele trei specii bacteriene testate sunt prezentate în figura 30.

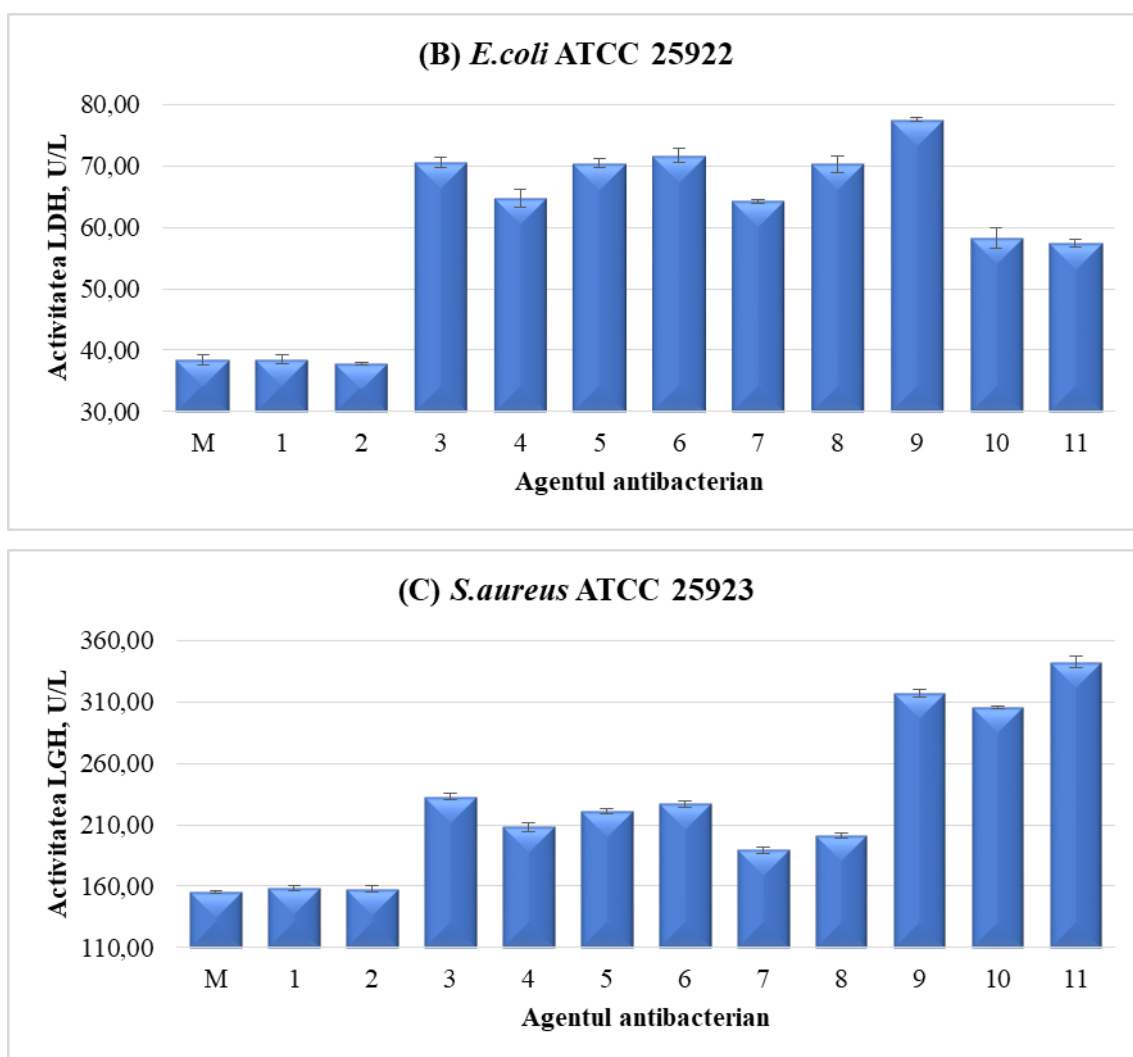


Figura 30. Influența compușilor testați asupra activității lactatdehidrogenazei eliberate de (A) *P. aeruginosa* ATCC 27853, (B) de *E. coli* ATCC 25922 și (C) de *S. aureus* ATCC 25923

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 (Figura 30).

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 nitrato-{N-(prop-2-en-1-il)-N'-[1-(piridin-2-il)-etiliden]carbamohidrazontioato}imidazolcupru monohidrat 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 nitrato-{N-(prop-2-en-1-il)-N'-[1-(piridin-2-il)-etiliden]carbamohidrazontioato}-imidazolcupru monohidrat cu *ES* această creștere a fost de 25,2% ($p = 0,0005$). Același fenomen s-a atestat și în cazul compusului sulfat de {N-(prop-2-en-1-il)-2-[(piridin-2-il)-metiliden]hidrazin-1-carbotioamid}aquacupru(II) care mărește cu 35,7% activitatea LDH eliberate, iar în combinație cu *ES* creșterea este de 21,0%. În cazul compusului {Prop-2-en-1-il-N-prop-2-en-1-il-N'-[(piridin-2-il)-metiliden]carbamohidrazonotioat}dibromocupru, 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 de remarcat 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 {Prop-2-en-1-il-N-prop-2-en-1-il-N'-[(piridin-2-il)-metiliden]carbamohidrazonotioat}dibromocupru, 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 {Prop-2-en-1-il-N-prop-2-en-1-il-N'-[(piridin-2-il)-metiliden]carbamohidrazonotioat}dibromocupru, atât aparte, cât și în combinație, cu excepția mixoxantofilei care a amplificat efectul generat de compusul chimic. Conform rezultatelor

obținute, sub influența compusului chimic {Prop-2-en-1-il-N-prop-2-en-1-il-N'-[(piridin-2-il)-metiliden]carbamohidrazonotioat}dibromo-cupru 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 glutatation peroxidaza). Activitatea superoxid dismutazei (SOD) a fost măsurată atât în celule, cât și în lichidul cultural, iar activitatea catalazei (CT) și glutatation peroxidazei (GPX) doar în masa celulară, nivelul lor în lichidul cultural fiind sub limita de detecție a metodelor aplicate și ne semnificativă din punct de vedere fiziologic.

Rezultatele testării acțiunii agenților antimicrobieni asupra tulpinilor de *P. aeruginosa* sunt reprezentate în figura 31. 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 compusul sulfat de {N-(prop-2-en-1-il)-2-[(piridin-2-il)-metiliden]hidrazin-1-carbotioamid}aquacupru(II) și {Prop-2-en-1-il-N-prop-2-en-1-il-N'-[(piridin-2-il)-metiliden]carbamohidrazonotioat}dibromo-cupru. În lichidul cultural, activitatea SOD este redusă identic de compusul nitrato-{N-(prop-2-en-1-il)-N'-[1-(piridin-2-il)-etiliden]carbamohidrazonotioat}imidazolcupru monohidrat și sulfat de {N-(prop-2-en-1-il)-2-[(piridin-2-il)-metiliden]hidrazin-1-carbotioamid}aquacupru(II). Compusul chimic {Prop-2-en-1-il-N-prop-2-en-1-il-N'-[(piridin-2-il)-metiliden]carbamohidrazonotioat}dibromo-cupru se manifestă mai activ, comparativ cu primii doi. În activitatea superoxid dismutazei nu au fost evidențiate diferențe semnificative între variantele experimentale, în care compuşii chimici au fost aplicați aparte, și cele unde au fost combinați cu extractele de spirulină.

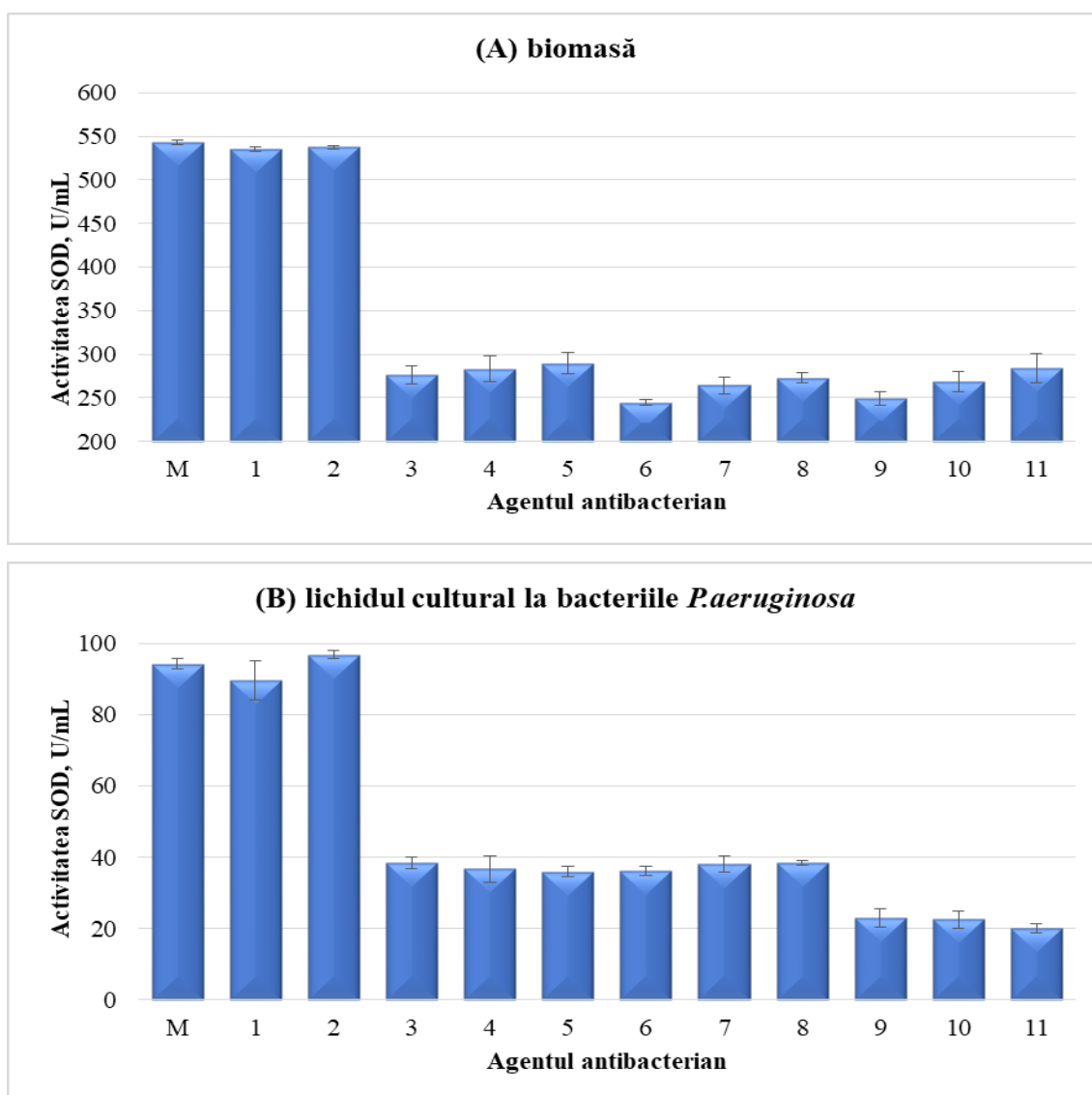


Figura 31. Influența compușilor testați asupra activității superoxid dismutazei în (A) biomasă și (B) în lichidul cultural la *P. aeruginosa*

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 32). În același timp, scăderea activității SOD din punct de vedere valoric este și mai pronunțată, în special în lichidul cultural, unde compusul {Prop-2-en-1-il-N-prop-2-en-1-il-N'-(piridin-2-il)-metiliden]carbamohidrazonotioat}dibromo-cupru 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%.

Combi-națiile 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.

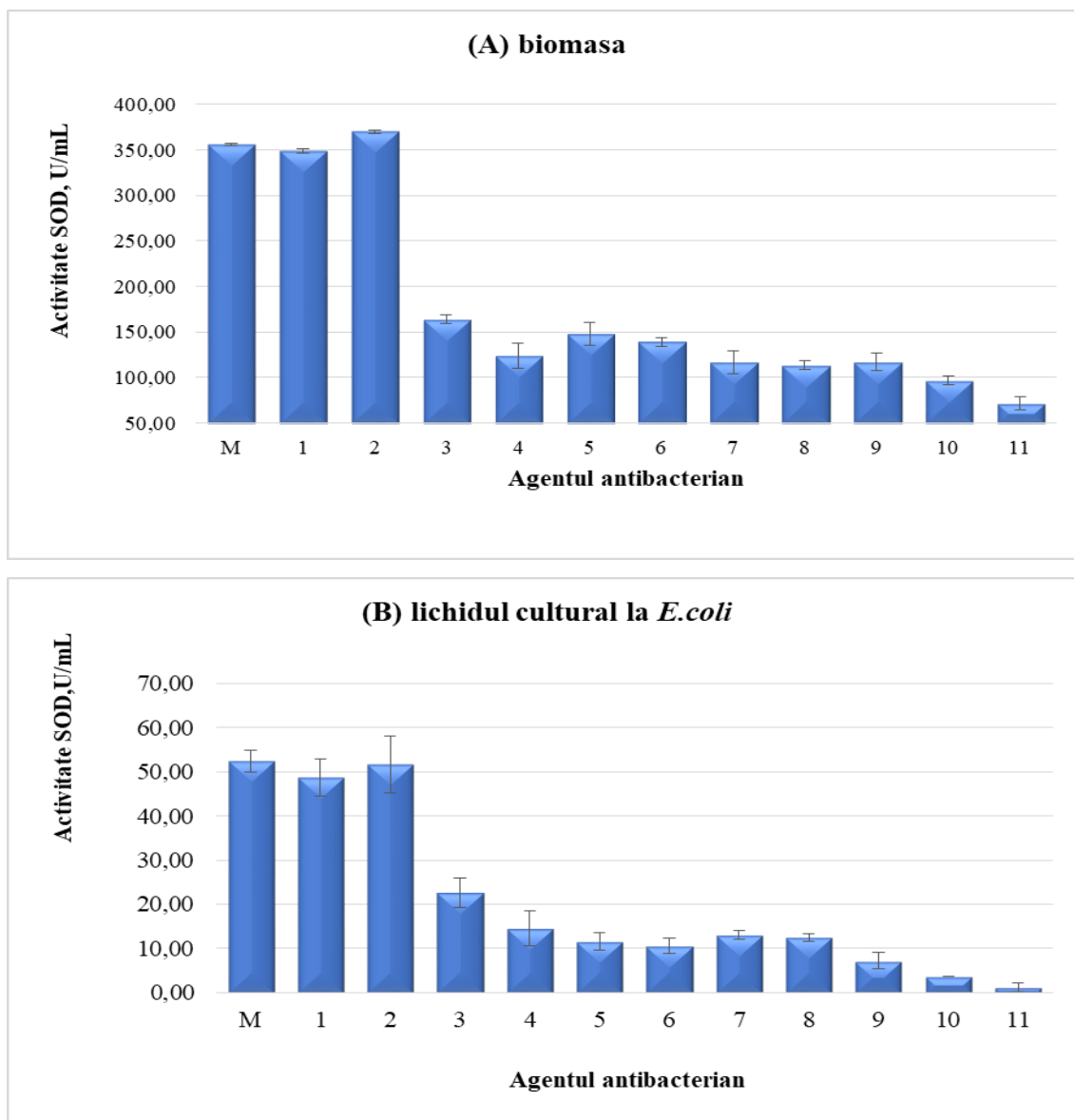


Figura 32. Influența compușilor testați asupra activității superoxid dismutazei în (A) biomasa și (B) în lichidul cultural la *E.coli*

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 33). Reacția de răspuns la acțiunea agenților antibacterieni de asemenea este foarte asemănătoare la aceste două tulpini. Și în cazul *S. aureus*, activitatea SOD intracelulare 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 mixoxantofiei și a extractului de spirulină *ES*, activitatea superoxid dismutazei atât în celule, cât și în spațiul extracelular, se păstrează la nivelul probei martor.

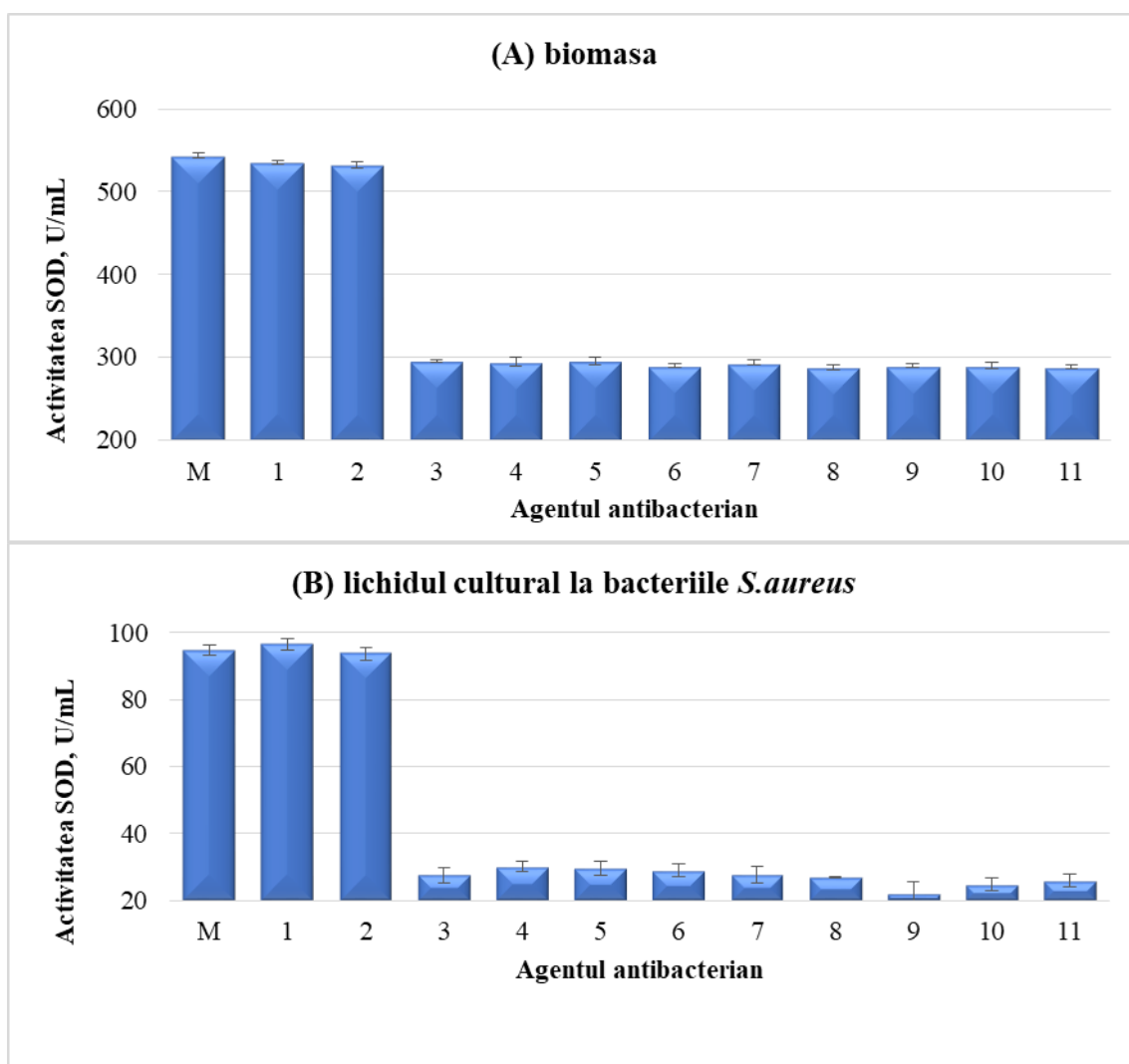


Figura 33. Influența compușilor testați asupra activității superoxid dismutazei în (A) biomasă și (B) în lichidul cultural la *S.aureus*

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 – $C_{13}H_{16}Br_2CuN_4S + MX$

Inactivarea SOD este un efect nociv pentru organismele aerobe, acestea devenind incapabile să facă față chiar și proceselor fiziologice normale, care soldează cu formarea superoxidradicalului, nemaivorbind de cele patologice, generate de prezența în mediu a substanțelor toxice. Pentru microorganismele patogene, scăderea activității SOD extracelulare este un indiciu al scăderii patogenității acestora. Astfel, activitatea scăzută a enzimelor antioxidante extracelulare face imposibilă anihilarea speciilor reactive ale oxigenului, eliberate de celulele imunocompetente ale macroorganismului infectat. În cazul agenților antimicrobieni, o asemenea acțiune este foarte benefică, fiind orientată spre inactivarea organismelor patogene, diminuarea gradului de patogenitate prin mecanisme diferite de cele manifestate de antimicrobienele clasice, astfel fiind posibilă depășirea rezistenței microorganismelor la agenții terapeutici cunoscuți.

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 34. 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 nitrato- $\{N-(prop-2-en-1-il)-N'-[1-(piridin-2-il)-etiliden]carbamoimidazoliu\}$ imidazolcupru monohidrat a redus cu 34% activitatea CT, în combinație cu *ES* cu 6,4% ($p=0,002$), iar cu mixoxantofila cu 14,0% ($p=0,0006$).

La tulpinile de *E. coli*, sub acțiunea nitrato- $\{N-(prop-2-en-1-il)-N'-[1-(piridin-2-il)-etiliden]carbamoimidazoliu\}$ imidazolcupru monohidrat, 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*).

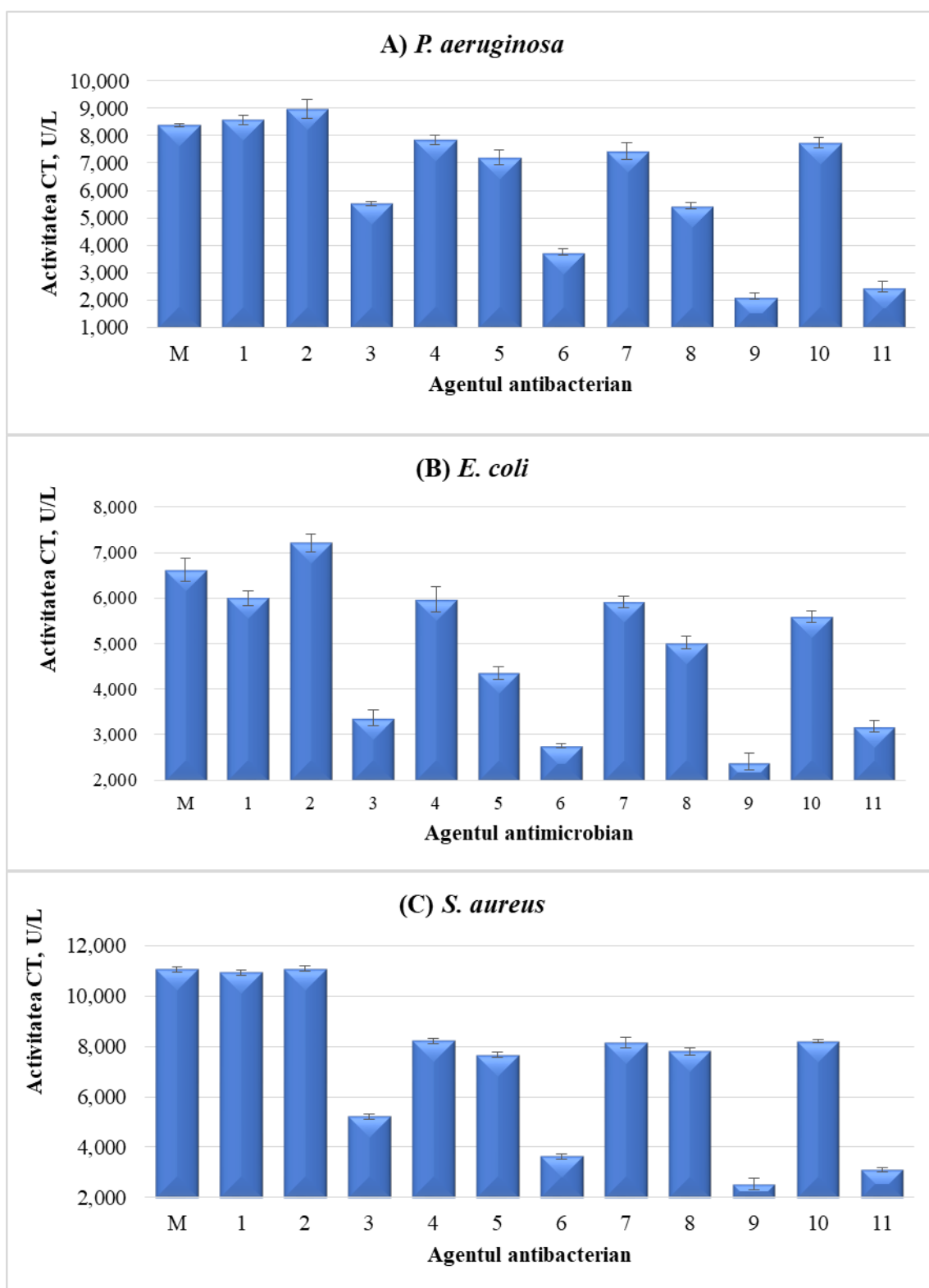


Figura 34. Influența compușilor testați asupra activității catalazei la (A) *P. aeruginosa*, (B) la *E. coli* și (C) la *S. aureus*

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 – $C_{13}H_{16}Br_2CuN_4S + MX$

Astfel, sulfatul de {N-(prop-2-en-1-il)-2-[(piridin-2-il)-metiliden]hidrazin-1-carbotioamid} aquacupru(II) 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*.

Doar în cazul tulpinilor de *P. aeruginosa*, diferența între acțiunea sulfatului de {N-(prop-2-en-1-il)-2-[(piridin-2-il)-metiliden]hidrazin-1-carbotioamid} aquacupru(II) 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 {Prop-2-en-1-il-N-prop-2-en-1-il-N'-[(piridin-2-il)-metiliden]carbomohidrazonotioat}dibromo-cupru.

În cazul tulpinilor de *P. aeruginosa*, combinația {Prop-2-en-1-il-N-prop-2-en-1-il-N'-[(piridin-2-il)-metiliden]carbomohidrazonotioat}dibromo-cupru + *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 glutatión peroxidaza (GPX). Rezultatele testării acțiunii compușilor chimici și biologici luați în studiu asupra activității GPX sunt prezentate în figura 35.

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 nitrato-{N-(prop-2-en-1-il)-N'-[1-(piridin-2-il)-etiliden]carbomohidrazonotioat}imidazolcupru monohidrat 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%.

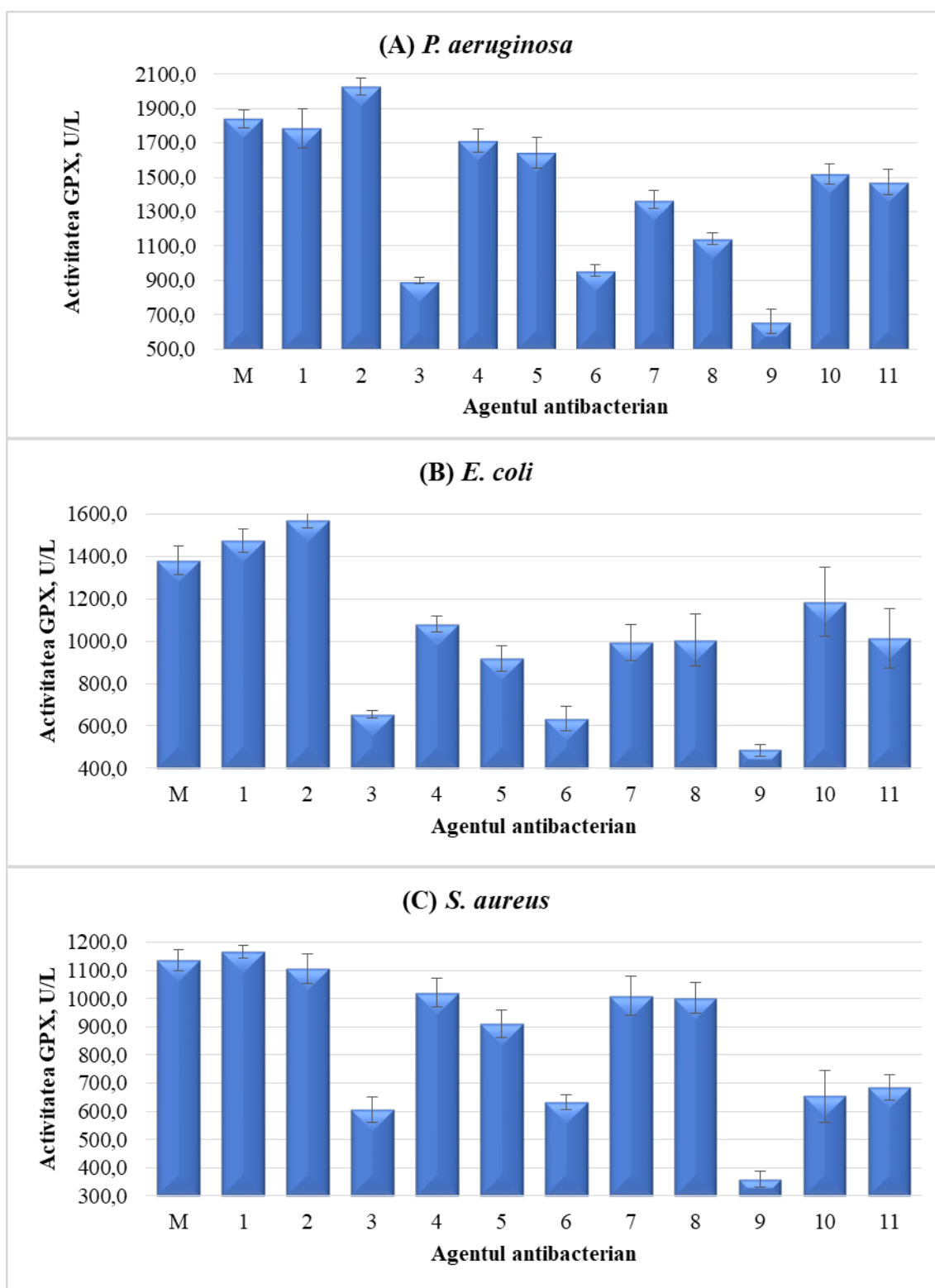


Figura 35. Influența compuşilor testați asupra activității glutation peroxidazei (A) la *P. aeruginosa*, (B) la *E. coli* și (C) la *S. aureus*

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 – $C_{13}H_{16}Br_2CuN_4S + MX$

Compusul sulfat de {N-(prop-2-en-1-il)-2-[(piridin-2-il)-metiliden]hidrazin-1-carbotioamid}aquacupru(II) 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 {Prop-2-en-1-il-N-prop-2-en-1-il-N'-[(piridin-2-il)-metiliden]carbamo-hidrazonotioat} dibromo-cupru – 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%.

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 nitratu-{N-(prop-2-en-1-il)-N'-[1-(piridin-2-il)etiliden]carbamo-hidrazontioato}imidazolcupru monohidrat, 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%.

Sulfatul de {N-(prop-2-en-1-il)-2-[(piridin-2-il)-metiliden]hidrazin-1-carbotioamid} aquacupru(II), aplicat aparte, a redus activitatea glutatone peroxidazei cu 44,39%, iar în combinație cu *ES* și cu *MX* – cu 11,22 și cu 11,96% respectiv.

Compusul {Prop-2-en-1-il-N-prop-2-en-1-il-N'-[(piridin-2-il)-metiliden]carbamo-hidrazonotioat}-dibromo-cupru 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.

5.3. Concluzii la capitolul 5

1. Extractul de spirulină *ES* și mixoxantofila nu au efect toxic direct asupra tulpinilor de *P. aeruginosa*, de *E. coli* și de *S. aureus*, fapt confirmat prin păstrarea nivelului de dialdehidă malonică și de lactat dehidrogenază, eliberată la nivelul matorului. Acești doi compuși naturali nu perturbază de asemenea activitatea enzimelor antioxidante primare.

2. Compușii chimici nitrato- $\{N\text{-(prop-2-en-1-il)-}N'\text{-[1-(piridin-2-il)-etiliden]carbamohidrazon-}$ tioato}imidazolcupru monohidrat, sulfat de $\{N\text{-(prop-2-en-1-il)-2-[(piridin-2-il)-metiliden]hidrazin-1-carbotioamid}\}$ aquacupru(II) și $\{Prop\text{-2-en-1-il-}N\text{-prop-2-en-1-il-}N'\text{-[(piridin-2-il)-metiliden]carbamohidrazonotioat}\}$ dibromo-cupru, aplicați în concentrații minime inhibitoare, produc efecte toxice pronunțate asupra culturilor bacteriene manifestate prin: creșterea cantității de dialdehidă malonică – produs final al peroxidării lipidice; creșterea activității lactat dehidrogenazei eliberate – manifestare a deteriorării membranelor celulare; scăderea activității enzimelor antioxidante primare – dovadă a incapacității de a păstra echilibrul redox în celulă.
3. Efectele combinațiilor compușilor chimici cu extractul de spirulină *ES* și cu mixoxantofila asupra parametrilor investigați demonstrează eficacitatea lor în calitate de potențiali agenți antibacterieni, în condițiile în care concentrațiile compușilor chimici în combinații este de 2-4 ori mai mici decât la folosirea separată.
4. Compușii chimici nitrato- $\{N\text{-(prop-2-en-1-il)-}N'\text{-[1-(piridin-2-il)-etiliden]carbamohidrazon-}$ tioato}imidazolcupru monohidrat, sulfatul de $\{N\text{-(prop-2-en-1-il)-2-[(piridin-2-il)-metiliden]hidrazin-1-carbotioamid}\}$ aquacupru(II) și $\{Prop\text{-2-en-1-il-}N\text{-prop-2-en-1-il-}N'\text{-[(piridin-2-il)-metiliden] carbamohidrazonotioat}\}$ dibromo-cupru și cei naturali (*ES* și *MX*) acționează sinergic, prin mecanisme neevidențiate în prezentul studiu, dar care le oferă perspective mari în calitate de agenți antimicrobieni cu grad redus de toxicitate și potențial scăzut de formare a rezistenței.

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

6.1. Evaluarea activității compușilor biologic activi asupra markerilor stresului oxidativ și ai sistemului antioxidant

Dezvoltarea unor procese degenerative este corelată cu existența unui surplus nociv de radicali liberi, promotori ai unor procese oxidative dezastruoase pentru organism.

În prezentul studiu a fost evaluat statutul oxidant al concentrației dialdehidei malonice și al concentrației produselor proteice de oxidare avansată.

Dialdehida malonică, produs secundar al peroxidării lipidelor, este utilizată ca biomarker al stresului oxidativ, al leziunilor membranei celulare și un indicator incontestabil al leziunii oxidative a celulelor și a țesuturilor.

Dialdehida malonică (DAM, $\mu\text{M/L}$) a înregistrat valoare maximă în lotul C1 (Mediana = 4,85; IQR = 0,55) și valoare minimă în lotul B2 (Mediana = 2,8; IQR = 0,4). Valorile absolute ale DAM, nM/s.L din martor (Mediana = 4,2; IQR = 0,725) au fost reduse, comparativ cu valorile din loturile C1 (Mediana = 4,85; IQR = 0,55) și C2 (Mediana = 4,2; IQR = 0,9), și majorate comparativ cu valorile din loturile B1 (Mediana = 3,35; IQR = 0,65), B2 (Mediana = 2,8; IQR = 0,4), C1+B1 (Mediana = 3,85; IQR = 0,4), C1+B2 (Mediana = 3,3, IQR = 0,775), C2+B1 (Mediana = 3,55, IQR = 0,5), C2+B2 (Mediana = 3,05; IQR = 0,775) (Anexa 8, figura 36).

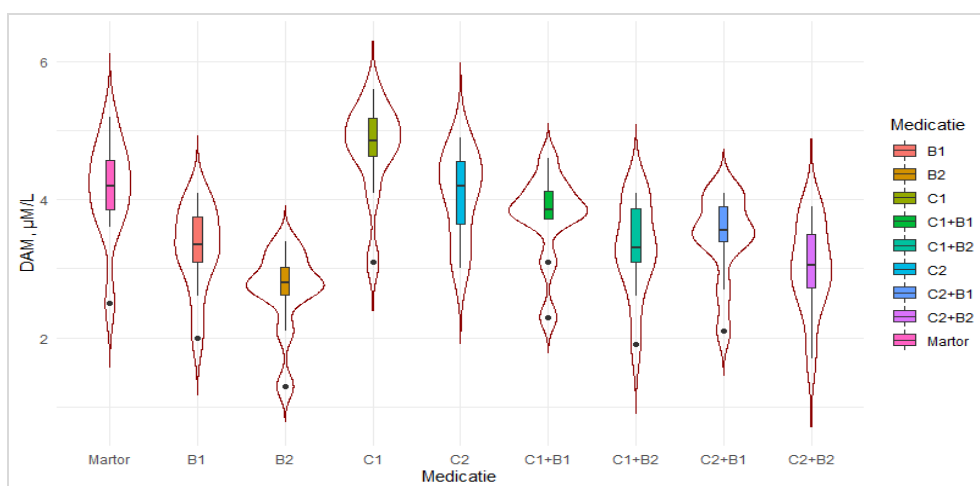


Figura 36. Distribuția valorilor DAM, nM/s.L după loturile de cercetare

Notă. DAM – dialdehida malonică, B1 – extract de *S. platensis* (ES); B2 – pigment carotenoidic mixoxantofila (MX); C1 – compusul chimic $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{CuN}_4\text{O}_5\text{S}_2$; C2 – compusul chimic $\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{CuN}_7\text{O}_4\text{S}$

Intensitatea stresului oxidativ este determinată de concentrația produselor proteice de oxidare avansată (PPOA), considerate biomarkeri importanți ai gradului modificărilor oxidative ireversibile ale proteinelor. Acestea se formează în timpul stresului oxidativ, în urma reacției proteinelor plasmatiche cu oxidanții clorinați.

Astfel, în prezentul studiu, o valoare maximă a PPOA a fost înregistrată în lotul C1 (Mediana = 19,1; IQR = 11,9), iar minimă în lotul B2 (Mediana = 15,0; IQR = 16,2). Valorile absolute ale PPOA din lotul-martor (Mediana = 16,1; IQR = 15,5) au fost reduse, comparativ cu valorile din lotul C1 (Mediana = 19,1; IQR = 11,9), din lotul C2 (Mediana = 18,0; IQR = 18,7) și din lotul C1+B1 (Mediana = 16,6; IQR = 14,2), comparativ cu lotul B1 (Mediana = 15,9; IQR = 14,7), cu lotul C1+B2 (Mediana = 15,9; IQR = 16,1), cu lotul C2+B1 (Mediana = 16,0; IQR = 15,3) și crescute comparativ cu valorile din lotul B2 (Mediana = 15,0; IQR = 16,2) și din lotul C2+B2 (Mediana = 15,3; IQR = 15,1) (Anexa 8, figura 37).

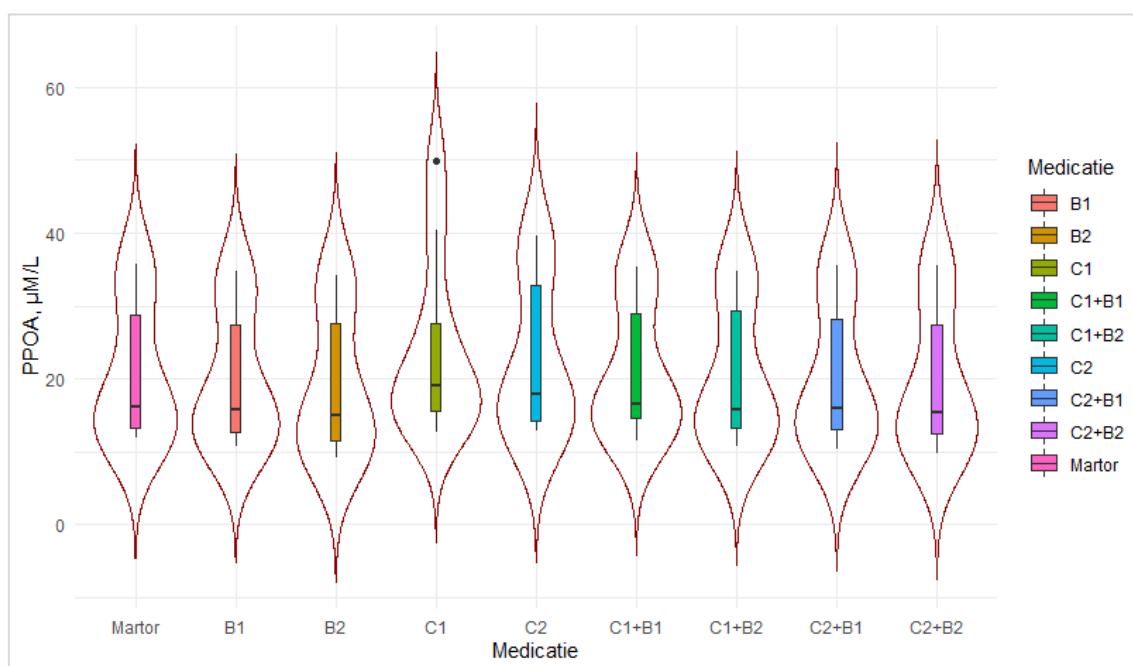


Figura 37. Distribuția valorilor PPOA, µM/L după loturile de cercetare

Notă. POA – produse proteice de oxidare avansată, 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 $C_{14}H_{19}CuN_7O_4S$

Din mecanismele de protecție a celulelor de potențialul distrugător al radicalilor liberi fac parte enzimele antioxidante: superoxid dismutaza, catalaza, glutatión S transferaza, glutatión peroxidaza și glutatión reductaza. Aceste enzime joacă un rol semnificativ în reducerea stresului oxidativ, acționând prin stoparea avansării efectelor nocive ale radicalilor liberi.

În cadrul studiului au fost evaluați unii reprezentanți ai sistemului antioxidant enzimatic endogen și determinată activitatea antioxidantă totală (AAT).

Enzima superoxid dismutaza (SOD) convertește radicalii superoxid în apă și în peroxid de hidrogen. Acesta din urmă produce leziuni la nivelul ADN-ului și al membranelor celulare, reducând astfel rata distrugerii celulelor de către radicalii liberi. Conform rezultatelor obținute, o valoare maximă a superoxid dismutazei (SOD, u/c) s-a înregistrat în lotul B2 (Mediana = 894; IQR = 64,3), iar valoare minimă în lotul-martor (Mediana = 693; IQR = 62). Valorile absolute ale SOD din lotul-martor au fost reduse, comparativ cu valorile din toate loturile de cercetare, și anume: lotul B1 (Mediana = 848; IQR = 45,8), lotul C1 (Mediana = 801; IQR = 61,7), lotul C2 (Mediana = 819; IQR = 68,2), lotul C1+B1 (Mediana = 865; IQR = 57,3), lotul C1+B2 (Mediana = 853; IQR = 77,4), lotul C2+B1 (Mediana = 820; IQR = 75,2) și lotul C2+B2 (Mediana = 839; IQR = 89,3) (Anexa 8, figura 38).

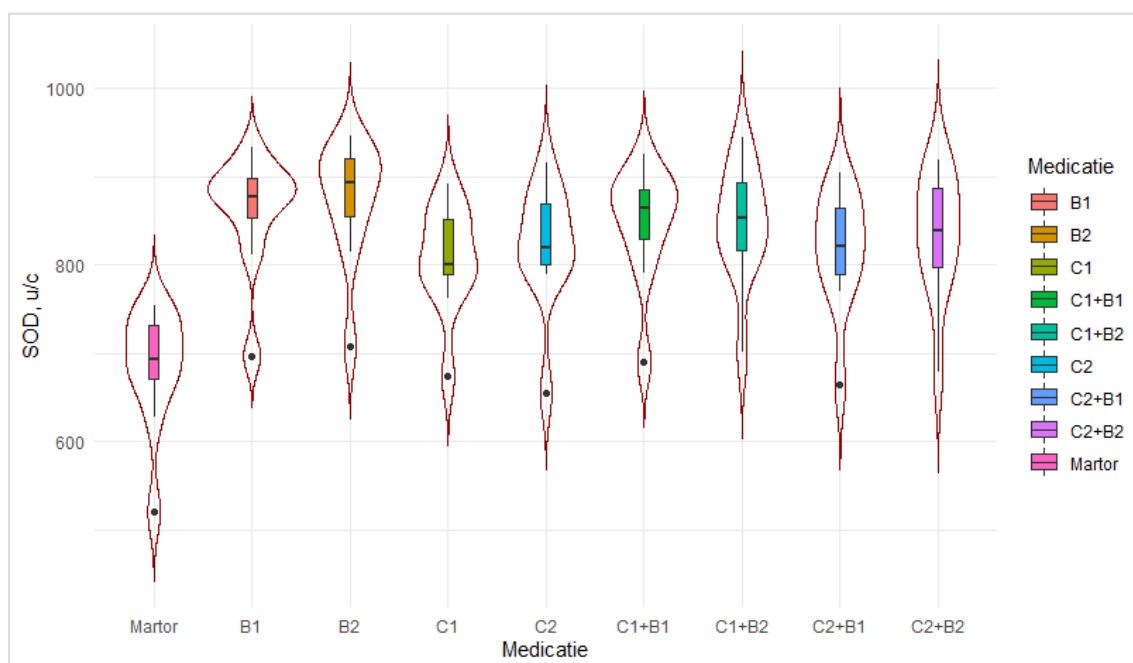


Figura 38. Distribuția valorilor SOD, u/c după loturile de cercetare

Notă. SOD – superoxid dismutaza, 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 $C_{14}H_{19}CuN_7O_4S$

O altă enzimă antioxidantă evaluată a fost catalaza, responsabilă de descompunerea peroxidului de hidrogen în apă și oxigen. La analiza datelor obținute pentru catalază, $\mu M/L$, o valoare maximă a fost atestată în lotul B2 (Mediana = 51; IQR = 7,68), iar valoarea minimă în lotul-martor (Mediana = 2,8, IQR = 0,4). Valorile absolute ale catalazei, $\mu M/s.L$ din lotul-martor (Mediana = 14,2; IQR = 1,2) au fost reduse, comparativ cu valorile din lotul B1 (Mediana = 50,3; IQR = 6,08), din lotul B2 (Mediana = 51,0; IQR = 7,68), din lotul C1+B1 (Mediana = 38,3;

IQR = 2,08), din lotul C1+B2 (Mediana = 39,1; IQR = 3,25), din lotul C2+B1 (Mediana = 37,7; IQR = 1,93), din lotul C2+B2 (Mediana = 42,2; IQR = 2,08), comparabil cu valorile din loturile C1 (Mediana = 15,4; IQR = 1,25) și C2 (Mediana = 15,7; IQR = 1,65).

Creșterea valorilor CT în loturile unde au fost cercetate efectele „combinate” ale compușilor luați în studiu, incontestabil, au fost determinate prin efectele preparatelor B1 și B2 (Anexa 8, Figura 39).

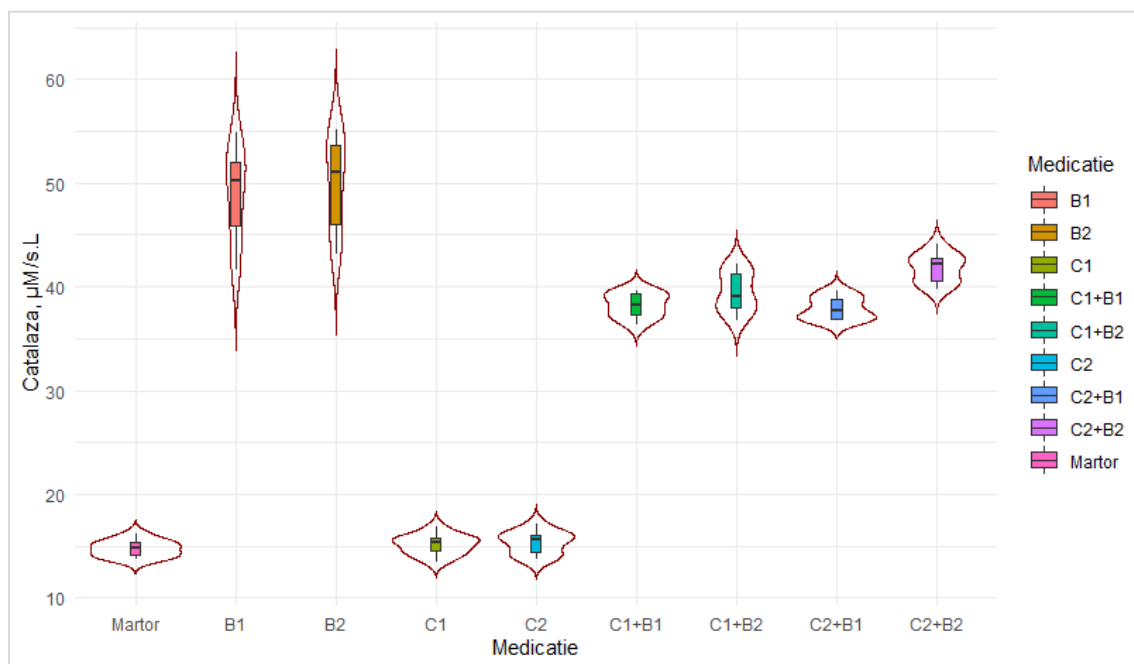


Figura 39. Distribuția valorilor catalazei, $\mu\text{M/s.L}$ după loturile de cercetare

Notă. B1 – extractul de *S. platensis* (ES); B2 – pigment carotenoidic mixoxantofila (MX); C1 – compusul chimic $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{CuN}_4\text{O}_5\text{S}_2$; C2 – $\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{CuN}_7\text{O}_4\text{S}$

Activitatea antioxidantă totală este definită ca un marker veridic privind estimarea repercusiunilor excesului de radicali liberi de oxigen, ce include activitatea componentelor enzimatică și celulare ale sistemului antioxidant.

Analiza rezultatelor obținute la determinarea activității antioxidante totale (AAT, $\mu\text{M/L}$) a arătat o valoare maximă în lotul B2 (Mediana = 152; IQR = 16,7) și în lotul C2+B2 (Mediana = 152; IQR = 16,1), iar o valoare minimă în lotul-martor (Mediana = 134; IQR = 15,1). Valorile absolute ale activității antioxidante totale din lotul-martor au fost reduse, comparativ cu valorile din lotul B1 (Mediana = 142; IQR = 14,1), din lotul C1 (Mediana = 139; IQR = 15,5), din lotul C2 (Mediana = 138; IQR = 14,1), din lotul C1+B1 (Mediana = 138; IQR = 16,4), din lotul C1+B2 (Mediana = 147; IQR = 19,3) și din lotul C2+B1 (Mediana = 147; IQR = 16,3) (Anexa 8, Figura 40).

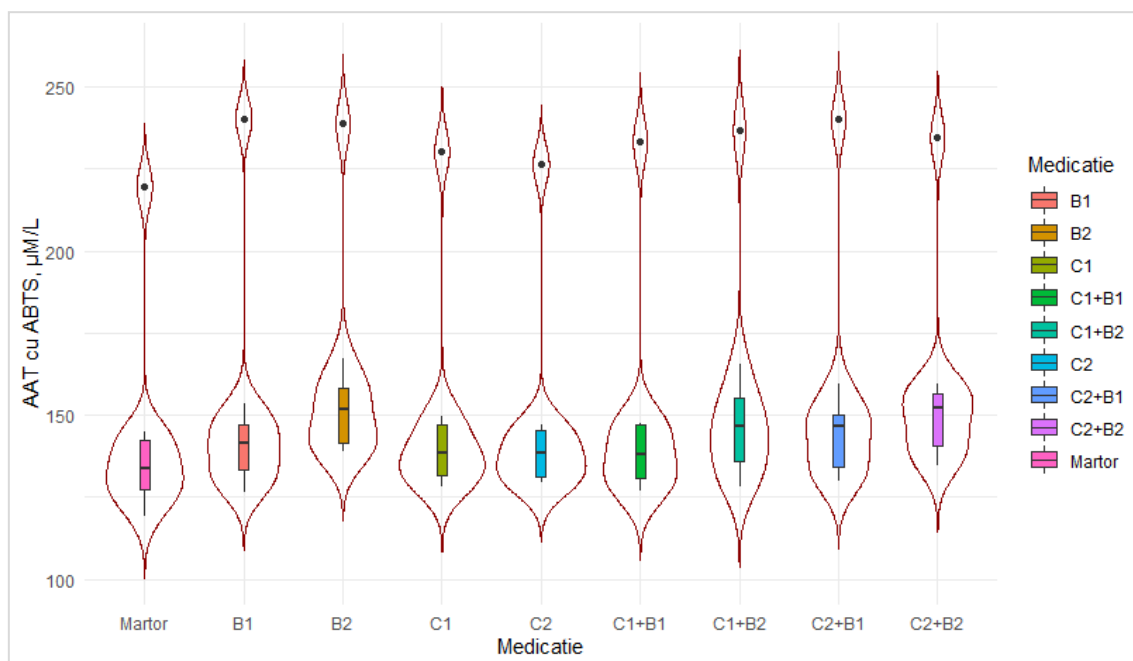


Figura 40. Distribuția valorilor AAT cu ABTS, $\mu\text{M/L}$ după loturile de cercetare

Notă. AAT – activitatea antioxidantă totală, B1 – extract de *S. platensis* (ES); B2 – pigment carotenoidic mixoxantofila (MX); C1 – compusul chimic $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{CuN}_4\text{O}_5\text{S}_2$; C2 – compusul chimic $\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{CuN}_7\text{O}_4\text{S}$

Într-un șir de studii a fost evidențiat rolul semnificativ al glutatationului și al enzimelor glutatationice în protecția antioxidantă. Caracterizate ca antioxidanți puternici, ce inhibă formarea radicalilor liberi, aceste enzime joacă un rol important în apărarea celulelor.

Glutacion S-transferazele, familie de enzime implicate în metabolismul xenobioticelor și capabile să catalizeze reacții multiple pentru a detoxifica peroxizii lipidici, au fost cercetate în mai multe studii, inclusiv în cercetarea dată. Astfel, valoarea maximă pentru glutadion S-transferază (GST, nM/s.L) s-a înregistrat în lotul C2 (Mediana = 51; IQR = 5,05), iar valoare minimă, precum și în cazul AAT cu ABTS, $\mu\text{M/L}$, în lotul-martor (Mediana = 38,6; IQR = 5).

AAT, cu excepția valorilor maxime înregistrate în lotul C2, a prezentat valori reduse, comparativ cu valorile absolute ale GST din lotul B1 (Mediana = 40,4; IQR = 4,65), din lotul B2 (Mediana = 41,5; IQR = 5,9), din lotul C1 (Mediana = 46,1; IQR = 3), din lotul C1+B1 (Mediana = 42,9; IQR = 6,28), din lotul C1+B2 (Mediana = 43, IQR = 6,4), din lotul C2+B1 (Mediana = 43,1; IQR = 5,95) și din lotul C2+B2 B1 (Mediana = 43,5; IQR = 7,15) (Anexa 8, Figura 41).

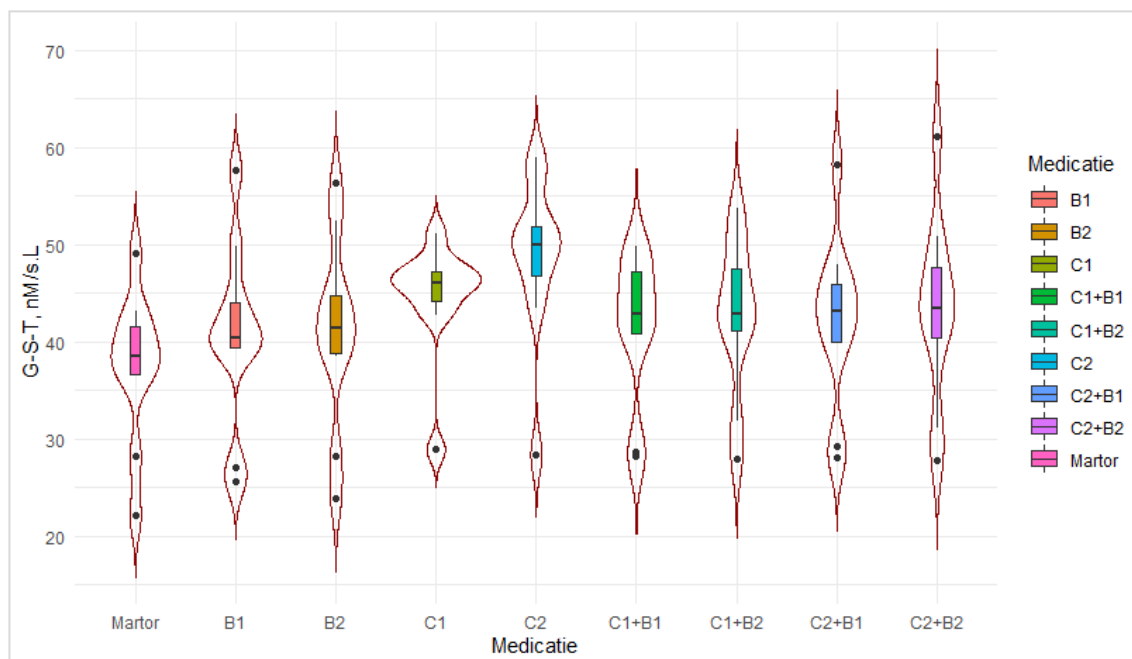


Figura 41. Distribuția valorilor GST, nM/s.L după loturile de cercetare

Notă. GST – glutadion S-transferaza, 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 $C_{14}H_{19}CuN_7O_4S$

O altă enzimă folosită la evaluarea stresului oxidativ este glutadion peroxidaza (GPO) care protejează celulele de peroxidarea lipidelor membranare. Pentru glutadion peroxidază (GPO, nM/s.L), valoare maximă s-a înregistrat în lotul C2+B2 (Mediana = 493; IQR = 126), iar valoare minimă, ca și în cazul AAT cu ABTS, $\mu M/L$, precum și GST, nM/s.L, în lotul-martor (Mediana = 287; IQR = 32,3). Cu excepția valorilor maxime din lotul C2+B2, GPO a prezentat indici reduși, comparativ cu valorile absolute din lotul B1 (Mediana = 377; IQR = 48,5), din lotul B2 (Mediana = 391; IQR = 39,3), din lotul C1 (Mediana = 319; IQR = 39,9), din lotul C2 (Mediana = 313; IQR = 24,2), din lotul C1+B1 (Mediana = 339; IQR = 61,7), din lotul C1+B2 (Mediana = 410; IQR = 79,6) și din lotul C2+B1 (Mediana = 387; IQR = 42,6) (Anexa 8, Figura 42).

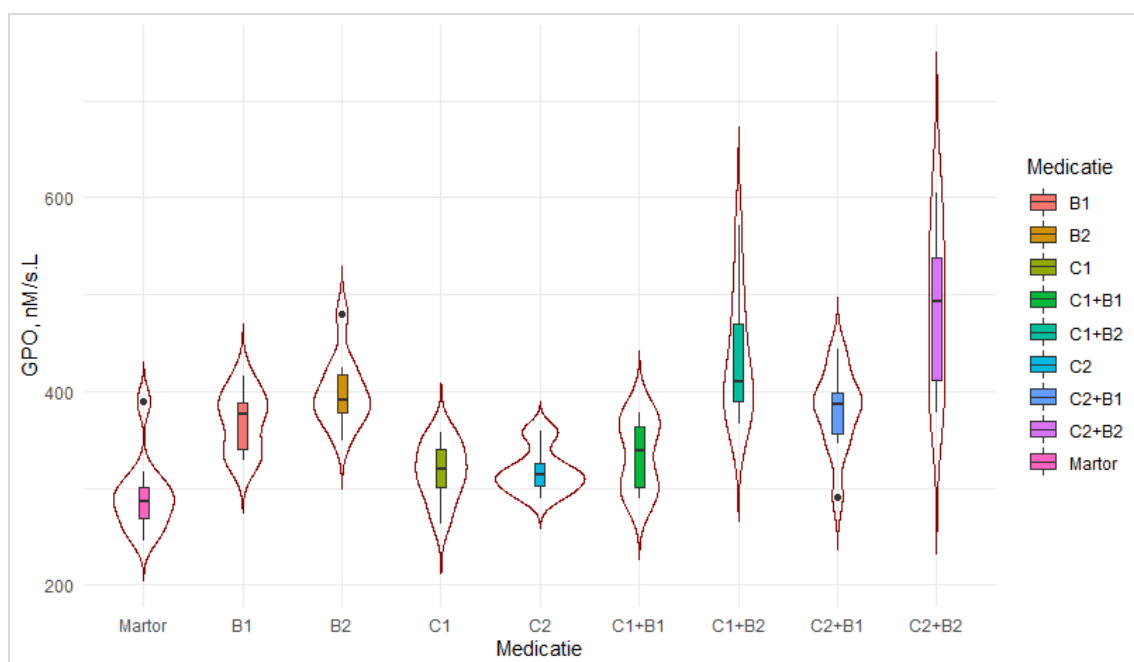


Figura 42. Distribuția valorilor GPO, nM/s.L după loturile de cercetare

Notă. GPO – glutadion peroxidaza, 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 $C_{14}H_{19}CuN_7O_4S$

Glutation–reductaza, descrisă ca parte a ciclului redox glutationic, menține la un nivel adecvat glutatiionul redus celular.

În urma evaluării activității glutatiion reductazei (GR, nM/s.L) s-a constatat o valoare maximă în lotul B2 (Mediana = 171; IQR = 88,7) și valoare minimă în lotul-martor (Mediana = 62; IQR = 14,5), ca și în cazul AAT, $\mu M/L$, GST, nM/s.L, precum și GPO, nM/s.L.

AAT, în afară de valorile maxime din lotul B2, a prezentat indicatori reduși, comparativ cu valorile absolute ale GR, nM/s.L din lotul B1 (Mediana = 110; IQR = 13,4), din lotul C1 (Mediana = 71,2; IQR = 8,53), din lotul C2 (Mediana = 81,2; IQR = 2,85), din lotul C1+B1 (Mediana = 93,5; IQR = 21,9), din lotul C1+B2 (Mediana = 104; IQR = 13), din lotul C2+B1 (Mediana = 112; IQR = 19,1) și din lotul C2+B2 (Mediana = 135; IQR = 52,8) (Anexa 8, Figura 43).

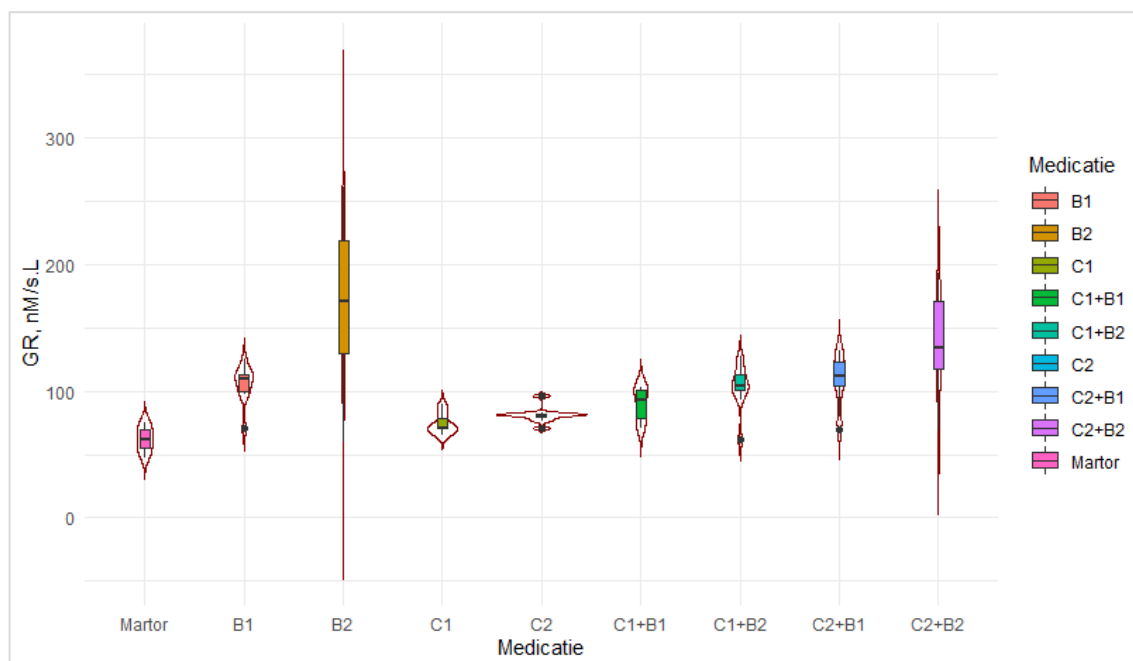


Figura 43. Distribuția valorilor GR, nM/s.L după loturile de cercetare

Notă. GR – glutadion reductaza, 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 $C_{14}H_{19}CuN_7O_4$

6.2. Estimarea profilului citokinic. Determinarea unor citokine proinflamatoare și antiinflamatoare

Întrucât citokinele sunt mediatorii-cheie ai inflamației și ai răspunsului imun, în prezentul studiu a fost evaluată expresia unor citokine pro- (IL-6, IL-1 β și TNF- α) și antiinflamatoare (IL-10) la acțiunea compușilor chimici și biologici luați în studiu, aparte și în combinație.

Conform rezultatelor măsurărilor, valoare maximă pentru IL-1 β , pg/ml, s-a înregistrat în lotul C1 (Mediana = 42,1; IQR = 4,43), iar valoare minimă în lotul B2 (Mediana = 36; IQR = 5,78). Valorile absolute ale IL-1 β (pg/ml, nM/s.L) din lotul-martor (Mediana = 39,1; IQR = 5) au fost reduse, în afară de valoarea maximă din lotul C1, comparativ cu valorile din lotul C2 (Mediana = 41,5; IQR = 6,4), fiind comparabile cu lotul B1 (Mediana = 38,6; IQR = 3,78), cu lotul C1+B1 (Mediana = 39,4; IQR = 4,53), cu lotul C1+B2 (Mediana = 38,8; IQR = 5,05), cu lotul C2+B1 (Mediana = 39,4; IQR = 4,15), cu lotul C2+B2 (Mediana = 38; IQR = 3,5) (Anexa 8, Figura 44).

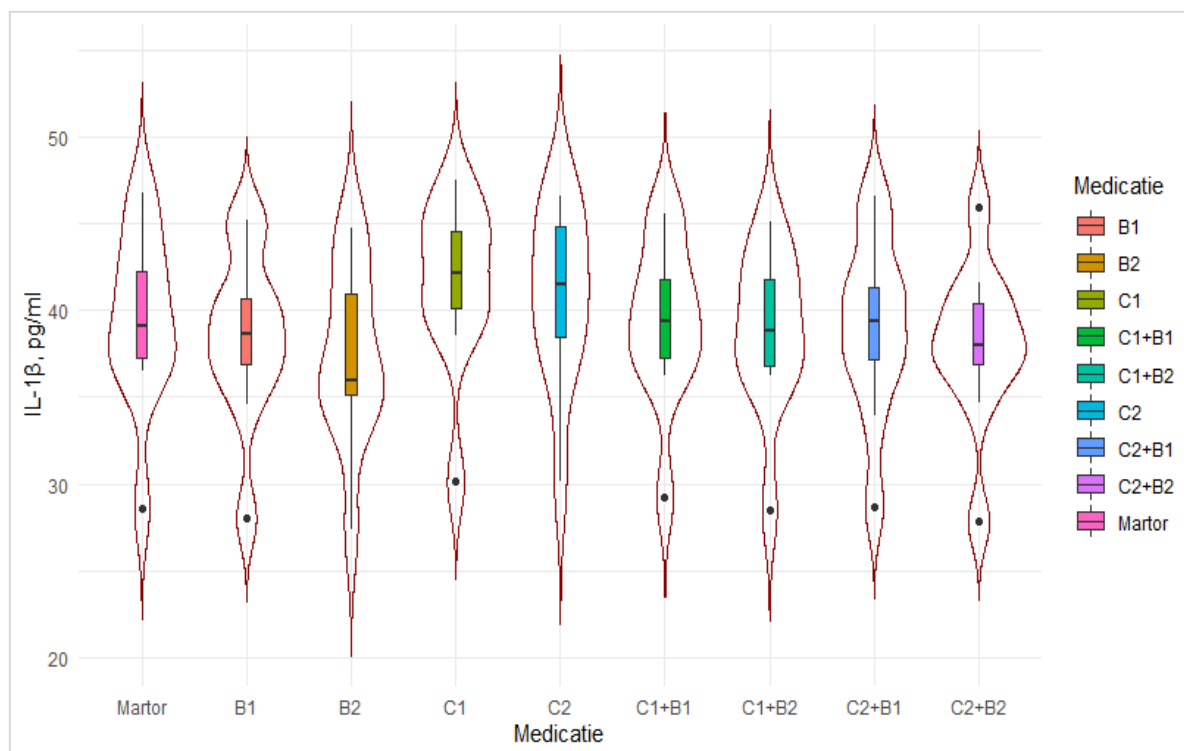


Figura 44. Distribuția valorilor IL-1 β , pg/ml după loturile de cercetare

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 $C_{14}H_{19}CuN_7O_4S$

Factorul de necroză tumorală (TNF- α , pg/ml) a demonstrat valoare maximă în lotul C2 (Mediana = 98,0; IQR = 17,9) și valoare minimă în lotul B2 (Mediana = 87,2; IQR = 16,4). Valorile absolute ale TNF- α (pg/ml) din lotul-martor (Mediana = 39,1; IQR = 5) au fost reduse, cu excepția valorii maxime înregistrată în lotul C2, comparativ cu valorile din lotul C1 (Mediana = 96,3; IQR = 13,4), fiind comparabile cu lotul B1 (Mediana = 89,5; IQR = 18,4), cu lotul C1+B1 (Mediana = 91,1; IQR = 16,5), cu lotul C1+B2 (Mediana = 88,8; IQR = 12,9), cu lotul C2+B1 (Mediana = 90,8; IQR = 24,6) și cu lotul C2+B2 (Mediana = 89,2; IQR = 20,2) (Anexa 8, Figura 45).

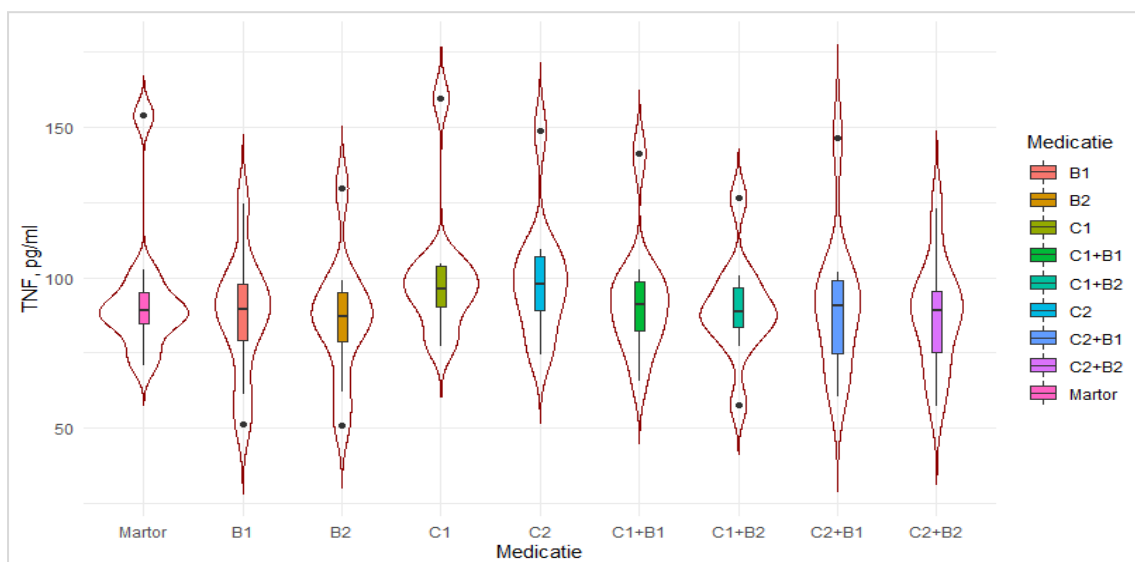


Figura 45. Distribuția valorilor TNF- α , pg/ml după loturile de cercetare

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 $C_{14}H_{19}CuN_7O_4S$

Rezultatele măsurărilor efectuate pentru IL-6, pg/ml au demonstrat valoare maximă în lotul C1 (Mediana = 130; IQR = 17,9) și valoare minimă în lotul B2 (Mediana = 115; IQR = 15,4). Valorile absolute ale IL-6 (pg/ml) din lotul-martor (Mediana = 125; IQR = 5,45) au fost reduse, cu excepția valorii maxime din lotul C1, comparativ cu valorile din lotul C2 (Mediana = 129; IQR = 15,5), fiind mai mare față de valorile IL-6 din lotul B1 (Mediana = 120; IQR = 14,2), din lotul B2 (Mediana = 115; IQR = 15,4), din lotul C1+B1 (Mediana = 123; IQR = 10,9), din lotul C1+B2 (Mediana = 121; IQR = 12,8), din lotul C2+B1 (Mediana = 122; IQR = 12,3), din lotul C2+B2 (Mediana = 118; IQR = 18,1) (Anexa 8, Figura 46).

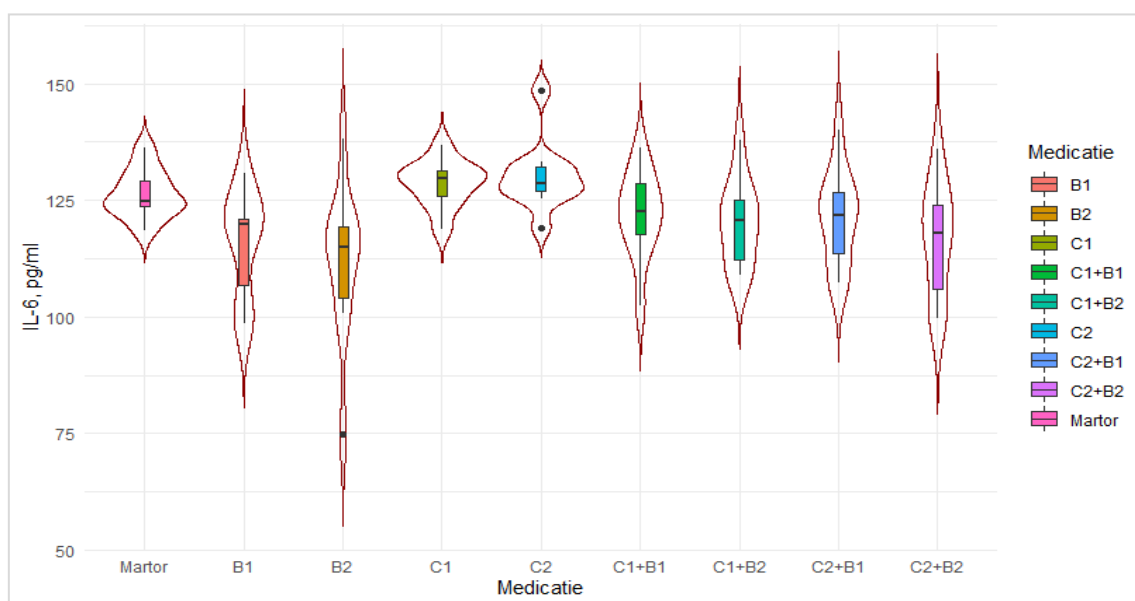


Figura 46. Distribuția valorilor IL-6, pg/ml după loturile de cercetare

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 $C_{14}H_{19}CuN_7O_4S$

Conform rezultatelor măsurărilor, interleukina-10 (IL-10, pg/ml) a înregistrat valoare maximă în lotul B2 (Mediana = 80,9; IQR = 2,6) și valoare minimă în lotul-martor (Mediana = 48,7; IQR = 3,9). Valorile absolute ale IL-10 (pg/ml) din lotul-martor au fost reduse, cu excepția lotului B2, comparativ cu valorile din lotul B1 (Mediana = 78,7; IQR = 3,08), din lotul C1 (Mediana = 54,1; IQR = 7,98), din lotul C2 (Mediana = 54,2, IQR = 8,10), din lotul C1+B1 (Mediana = 71,2; IQR = 3,4), din lotul C1+B2 (Mediana = 77,1; IQR = 5,2), din lotul C2+B1 (Mediana = 77,3; IQR = 8,48) și din lotul C2+B2 (Mediana = 79,6; IQR = 6,28) (Anexa 8, Figura 47).

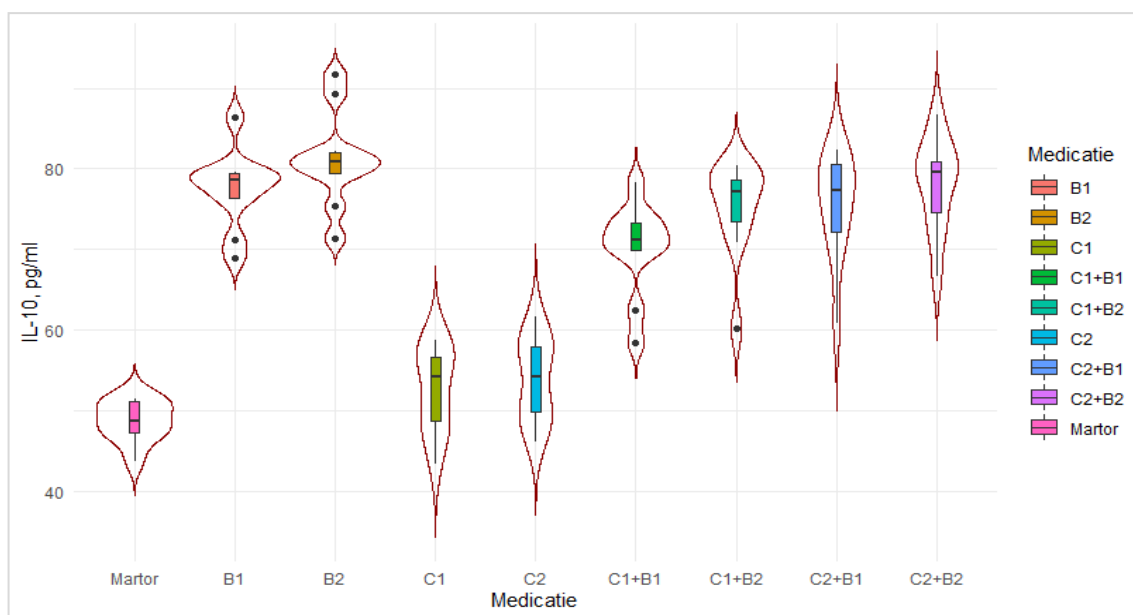


Figura 47. Distribuția valorilor IL-10, pg/ml după loturile de cercetare

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 $C_{14}H_{19}CuN_7O_4S$

6.3. Evaluarea comparativă a parametrilor din loturile studiate

Analiza descriptivă din subcapitolul anterior permite de a formula un șir de ipoteze științifice privind efectele compușilor studiați asupra indicatorilor fiziologici măsurați. Cum a fost argumentat în Capitolul 2, pentru evaluarea comparativă a loturilor de cercetare s-a utilizat testul Friedman, analiza post-hoc fiind efectuată cu utilizarea corecției Benjamini Hochberg.

Evaluarea comparativă a datelor pentru DAM ($\mu M/L$) din loturile de cercetare a arătat semnificație statistică (Friedman chi-squared = 75,758, df = 8, p-value = 3,478e-13), ceea ce permite de a considera ipoteza alternativă (cel puțin 2 loturi diferă după DAM, $\mu M/L$). Mărimea efectului medicației de asemenea a fost estimată ca una crescută (Kendall W = 0,947). Analiza post-hoc a evidențiat diferențe statistic semnificative între lotul-martor și toate loturile de cercetare, cu excepția lotului C2 ($p = 0,490$) (Tabelul 28).

Tabelul 28. Analiza post-hoc. Valorile p ajustate prin metoda Benjamini Hochberg pentru evaluarea comparativă a valorilor DAM, µM/L între loturile de cercetare

Loturile	B1	B2	C1	C1+B1	C1+B2	C2	C2+B1	C2+B2
B2	-	-	-	-	-	-	-	-
C1	0,0085	0,0085	-	-	-	-	-	-
C1+B1	0,0085	0,0085	0,0085	-	-	-	-	-
C1+B2	0,5982	0,0085	0,0085	0,0085	-	-	-	-
C2	0,0085	0,0085	0,0129	0,0256	0,0085	-	-	-
C2+B1	0,0211	0,0085	0,0085	0,0085	0,0166	0,0085	-	-
C2+B2	0,0109	0,0113	0,0085	0,0085	0,0113	0,0085	0,0085	-
Martor	0,0085	0,0085	0,0085	0,0166	0,0085	0,4908	0,0113	0,0085

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 $C_{14}H_{19}CuN_7O_4S$.

Evaluarea comparativă a datelor pentru PPOA, µM/L din loturile de cercetare a demonstrat semnificație statistică (Friedman chi-squared = 52,589, df = 8, p-value = 1,295e-08), ceea ce permite de a considera ipoteza alternativă (cel puțin două loturi diferă după PPOA, µM/L). Mărimea efectului medicației de asemenea a fost estimată ca una crescută (Kendall W = 0.657). Analiza post-hoc a evidențiat diferențe statistic semnificative între lotul-martor și o parte din loturile de cercetare, cu excepția lotului C1 (p = 0,08), C1+B1 (p = 0,695), C1+B2 (p = 0,409) și C2+B1 (p = 0,073) (Tabelul 29).

Tabelul 29. Analiza post-hoc. Valorile p ajustate prin metoda Benjamini Hochberg pentru evaluarea comparativă a valorilor PPOA, µM/L între loturile de cercetare

Loturile	B1	B2	C1	C1+B1	C1+B2	C2	C2+B1	C2+B2
B2	-	-	-	-	-	-	-	-
C1	0,073	0,063	-	-	-	-	-	-
C1+B1	0,012	0,019	0,080	-	-	-	-	-
C1+B2	0,073	0,012	0,080	0,080	-	-	-	-
C2	0,012	0,019	0,261	0,073	0,027	-	-	-
C2+B1	0,098	0,019	0,080	0,068	0,262	0,018	-	-
C2+B2	0,556	0,073	0,080	0,037	0,073	0,012	0,063	-
Martor	0,018	0,012	0,080	0,695	0,409	0,027	0,073	0,012

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 $C_{14}H_{19}CuN_7O_4S$.

Evaluarea comparativă a datelor pentru SOD (u/c) din loturile de cercetare a demonstrat semnificație statistică (Friedman chi-squared = 67,6; df = 8; p-value = 1,474e-11), ceea ce

permite de a considera ipoteza alternativă (cel puțin două loturi diferă după SOD, u/c). Mărimea efectului medicației de asemenea a fost estimată ca una crescută (Kendall W = 0,845). Analiza post-hoc a evidențiat diferențe statistic semnificative între lotul-martor și toate loturile de cercetare, fără excepții (Tabelul 30).

Tabelul 30. Analiza post-hoc. Valorile p ajustate prin metoda Benjamini Hochberg pentru evaluarea comparativă a valorilor SOD, u/c între loturile de cercetare

Loturile	B1	B2	C1	C1+B1	C1+B2	C2	C2+B1	C2+B2
B2	-	-	-	-	-	-	-	-
C1	0,0035	0,0035	-	-	-	-	-	-
C1+B1	0,0035	0,0035	0,0035	-	-	-	-	-
C1+B2	0,3797	0,0035	0,0153	0,6429	-	-	-	-
C2	0,0035	0,0035	0,0379	0,0096	0,1309	-	-	-
C2+B1	0,0035	0,0035	0,1860	0,0035	0,0829	0,9219	-	-
C2+B2	0,0281	0,0035	0,0829	0,2109	0,2109	0,1860	0,0035	-
Martor	0,0035	0,0096	0,0035	0,0035	0,0035	0,0035	0,0035	0,0035

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 $C_{14}H_{19}CuN_7O_4S$.

Evaluarea comparativă a datelor pentru catalază ($\mu\text{M/L}$) din loturile de cercetare a arătat semnificație statistică (Friedman chi-squared = 76,15; df = 8; p-value = 2,902e-13), ceea ce permite de a considera ipoteza alternativă (cel puțin două loturi diferă după CAT, $\mu\text{M/L}$). Mărimea efectului medicației de asemenea a fost estimată ca una crescută (Kendall W = 0,952). Analiza post-hoc a evidențiat diferențe statistic semnificative între lotul-martor și toate loturile de cercetare, fără excepții (Tabelul 31).

Tabelul 31. Analiza post-hoc. Valorile p ajustate prin metoda Benjamini Hochberg pentru evaluarea comparativă a valorilor CT, $\mu\text{M/L}$ între loturile de cercetare

Loturile	B1	B2	C1	C1+B1	C1+B2	C2	C2+B1	C2+B2
B2	-	-	-	-	-	-	-	-
C1	0,0029	0,0029	-	-	-	-	-	-
C1+B1	0,0029	0,0029	0,0029	-	-	-	-	-
C1+B2	0,0029	0,0029	0,0029	0,0279	-	-	-	-
C2	0,0029	0,0073	0,2846	0,0029	0,0029	-	-	-
C2+B1	0,0029	0,0029	0,0073	0,2069	0,0073	0,0029	-	-
C2+B2	0,0073	0,0029	0,0029	0,0029	0,0129	0,0029	0,0029	-
Martor	0,0029	0,0029	0,0248	0,0029	0,0029	0,0309	0,0073	0,0029

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 $C_{14}H_{19}CuN_7O_4S$.

Evaluarea comparativă a datelor pentru AAT cu ABTS, $\mu\text{M/L}$ din loturile de cercetare a demonstrat semnificație statistică (Friedman chi-squared = 60,257, df = 8, p-value = 4,149e-10), ceea ce permite de a considera ipoteza alternativă (cel puțin două loturi diferă după AAT cu ABTS, $\mu\text{M/L}$). Mărimia efectului medicației de asemenea a fost estimată ca una crescută (Kendall W = 0,753). Analiza post-hoc a evidențiat diferențe statistic semnificative între lotul-martor și toate loturile de cercetare, fără excepții (Tabelul 32).

Tabelul 32. Analiza post-hoc. Valorile p ajustate prin metoda Benjamini Hochberg pentru evaluarea comparativă a valorilor AAT cu ABTS, $\mu\text{M/L}$ între loturile de cercetare

Loturile	B1	B2	C1	C1+B1	C1+B2	C2	C2+B1	C2+B2
B2	-	-	-	-	-	-	-	-
C1	0,5369	0,0125	-	-	-	-	-	-
C1+B1	0,1296	0,0059	0,5724	-	-	-	-	-
C1+B2	0,2147	0,1163	0,0059	0,0100	-	-	-	-
C2	0,1163	0,0059	0,3098	0,6275	0,0100	-	-	-
C2+B1	0,1862	0,1163	0,1309	0,0234	0,8457	0,0059	-	-
C2+B2	0,0176	0,1309	0,0125	0,0059	0,1163	0,0059	0,0966	-
Martor	0,0059	0,0059	0,0173	0,0059	0,0059	0,0059	0,0125	0,0059

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 $C_{14}H_{19}CuN_7O_4S$.

Evaluarea comparativă a datelor pentru GST (nM/s.L) din loturile de cercetare a arătat semnificație statistică (Friedman chi-squared = 41,231, df = 8, p-value = 1,887e-06), ceea ce permite de a considera ipoteza alternativă (cel puțin două loturi diferă după GST, nM/s.L). Mărimia efectului medicației de asemenea a fost estimată ca una crescută (Kendall W = 0,515). Analiza post-hoc a evidențiat diferențe statistic semnificative între lotul-martor și toate loturile de cercetare, fără excepții (Tabelul 33).

Tabelul 33. Analiza post-hoc. Valorile p ajustate prin metoda Benjamini Hochberg pentru evaluarea comparativă a valorilor GST, nM/s.L între loturile de cercetare

Loturile	B1	B2	C1	C1+B1	C1+B2	C2	C2+B1	C2+B2
B2	-	-	-	-	-	-	-	-
C1	0,188	0,354	-	-	-	-	-	-
C1+B1	0,188	0,626	0,079	-	-	-	-	-
C1+B2	0,114	0,089	0,355	0,137	-	-	-	-
C2	0,079	0,079	0,059	0,049	0,079	-	-	-
C2+B1	0,114	0,222	0,310	0,643	0,643	0,059	-	-
C2+B2	0,014	0,068	0,626	0,591	0,906	0,161	0,088	-
Martor	0,024	0,014	0,023	0,024	0,014	0,014	0,014	0,024

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 $C_{14}H_{19}CuN_7O_4S$.

Evaluarea comparativă a datelor pentru GPO/nM/s.L, din loturile de cercetare a demonstrat semnificație statistică (Friedman chi-squared = 62,432, df = 8, p-value = 1,55e-10), ceea ce permite de a considera ipoteza alternativă (cel puțin două loturi diferă după GPO/nM/s.L). Mărimea efectului medicației de asemenea a fost estimată ca una crescută (Kendall W = 0,780). Analiza post-hoc a evidențiat diferențe statistic semnificative între lotul-martor și o parte din loturile de cercetare, cu excepția lotului C2 (p = 0,097) (Tabelul 34).

Tabelul 34. Analiza post-hoc. Valorile p ajustate prin metoda Benjamini Hochberg pentru evaluarea comparativă a valorilor GPO, nM/s.L, între loturile de cercetare

Loturile	B1	B2	C1	C1+B1	C1+B2	C2	C2+B1	C2+B2
B2	-	-	-	-	-	-	-	-
C1	0,0041	0,0041	-	-	-	-	-	-
C1+B1	0,0041	0,0041	0,0586	-	-	-	-	-
C1+B2	0,0365	0,1747	0,0041	0,0146	-	-	-	-
C2	0,0041	0,0041	0,6953	0,1556	0,0041	-	-	-
C2+B1	0,5211	0,5725	0,0096	0,0461	0,0146	0,0096	-	-
C2+B2	0,0281	0,0461	0,0041	0,0041	0,0070	0,0041	0,0041	-
Martor	0,0041	0,0041	0,0365	0,0070	0,0070	0,0975	0,0041	0,0041

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 $C_{14}H_{19}CuN_7O_4S$.

Evaluarea comparativă a datelor pentru GR, nM/s.L din loturile de cercetare a demonstrat semnificație statistică (Friedman chi-squared = 61,147, df = 8, p-value = 2,775e-10), ceea ce permite de a considera ipoteza alternativă (cel puțin două loturi diferă după GR, nM/s.L). Mărimea efectului medicației

de asemenea a fost estimată ca una crescută (Kendall W = 0,764). Analiza post-hoc a evidențiat diferențe statistic semnificative între lotul-martor și toate loturile de cercetare, fără excepții (Tabelul 35).

Tabelul 35. Analiza post-hoc. Valorile p ajustate prin metoda Benjamini Hochberg pentru evaluarea comparativă a valorilor GR, nM/s.L între loturile de cercetare

Loturile	B1	B2	C1	C1+B1	C1+B2	C2	C2+B1	C2+B2
B2	-	-	-	-	-	-	-	-
C1	0,0076	0,0064	-	-	-	-	-	-
C1+B1	0,0064	0,0064	0,0064	-	-	-	-	-
C1+B2	1,0000	0,0064	0,0064	0,0167	-	-	-	-
C2	0,0064	0,0064	0,0076	0,1151	0,0076	-	-	-
C2+B1	0,2916	0,0076	0,0064	0,0064	0,3315	0,0117	-	-
C2+B2	0,0064	0,1151	0,0064	0,0064	0,0064	0,0064	0,0117	-
Martor	0,0064	0,0064	0,0076	0,0064	0,0064	0,0064	0,0064	0,0064

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 $C_{14}H_{19}CuN_7O_4S$.

Evaluarea comparativă a datelor pentru IL-1 β , pg/ml din loturile de cercetare a demonstrat semnificație statistică (Friedman chi-squared = 56,047, df = 8, p-value = 2,762e-09), ceea ce permite de a considera ipoteza alternativă (cel puțin două loturi diferă după IL-1 β , pg/ml). Mărimea efectului medicației de asemenea a fost estimată ca una crescută (Kendall W = 0,701). Analiza post-hoc a evidențiat diferențe statistic semnificative între lotul-martor și o parte din loturile de cercetare, cu excepția loturilor C1+B1 (p = 0,822), C1+B2 (p = 0,196) și C2+B1 (p = 0,207) (Tabelul 36).

Tabelul 36. Analiza post-hoc. Valorile p ajustate prin metoda Benjamini Hochberg pentru evaluarea comparativă a valorilor IL-1 β , pg/ml între loturile de cercetare

Loturile	B1	B2	C1	C1+B1	C1+B2	C2	C2+B1	C2+B2
B2	-	-	-	-	-	-	-	-
C1	0,010	0,015	-	-	-	-	-	-
C1+B1	0,010	0,015	0,010	-	-	-	-	-
C1+B2	0,271	0,020	0,015	0,085	-	-	-	-
C2	0,010	0,010	0,207	0,015	0,015	-	-	-
C2+B1	0,085	0,033	0,019	0,312	0,661	0,020	-	-
C2+B2	0,959	0,152	0,015	0,040	0,215	0,010	0,103	-
Martor	0,020	0,015	0,010	0,822	0,196	0,020	0,207	0,033

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 $C_{14}H_{19}CuN_7O_4S$.

Evaluarea comparativă a datelor pentru TNF- α , pg/ml din loturile de cercetare a demonstrat semnificație statistică (Friedman chi-squared = 47,298, df = 8, p-value = 1,345e-07), ceea ce permite de

a considera ipoteza alternativă (cel puțin două loturi diferă după TNF- α , pg/ml). Mărimea efectului medicației de asemenea a fost estimată ca una crescută (Kendall W = 0,591). Analiza post-hoc a evidențiat diferențe statistic semnificative între lotul-martor și lotul C1 (p = 0,008), diferențele între alte loturi de cercetare fiind ne semnificative statistic (Tabelul 37).

Tabelul 37. Analiza post-hoc. Valorile p ajustate prin metoda Benjamini Hochberg pentru evaluarea comparativă a valorilor TNF- α , pg/ml între loturile de cercetare

Loturile	B1	B2	C1	C1+B1	C1+B2	C2	C2+B1	C2+B2
B2	-	-	-	-	-	-	-	-
C1	0,0088	0,0088	-	-	-	-	-	-
C1+B1	0,0610	0,0128	0,0128	-	-	-	-	-
C1+B2	0,6072	0,2784	0,0610	0,2784	-	-	-	-
C2	0,0088	0,0088	0,5716	0,0088	0,0502	-	-	-
C2+B1	0,0995	0,0668	0,0240	0,4001	0,6072	0,0128	-	-
C2+B2	0,8834	0,3541	0,0088	0,0345	0,2801	0,0088	0,0579	-
Martor	0,7362	0,0579	0,0088	1,0000	0,3541	0,0579	0,5716	0,2062

Notă: B1 – extract de S. platensis (ES); B2 – pigment carotenoidic mixoxantofila (MX); C1 – compusul chimic C₁₀H₁₄CuN₄O₅S₂; C2 – compusul chimic C₁₄H₁₉CuN₇O₄S.

Evaluarea comparativă a datelor pentru IL-6, pg/ml din loturile de cercetare a demonstrat semnificație statistică (Friedman chi-squared = 59,003, df = 8, p-value = 7,311e-10), ceea ce permite de a considera ipoteza alternativă (cel puțin 2 loturi din cele studiate diferă după IL-6, pg/ml). Mărimea efectului medicației de asemenea a fost estimată ca una crescută (Kendall W = 0,738). Analiza post-hoc nu a evidențiat diferențe statistic semnificative între lotul-martor și lotul C1+B1 (p = 0,1043), pe de o parte, și cu lotul C2+B1 (p = 0,859), pe de altă parte, diferențele între alte loturi de cercetare fiind statistic semnificative (Tabelul 38).

Tabelul 38. Analiza post-hoc. Valorile p ajustate prin metoda Benjamini Hochberg pentru evaluarea comparativă a valorilor IL-6, pg/ml între loturile de cercetare

Loturile	B1	B2	C1	C1+B1	C1+B2	C2	C2+B1	C2+B2
B2	-	-	-	-	-	-	-	-
C1	0,0088	0,0088	-	-	-	-	-	-
C1+B1	0,0054	0,0112	0,0112	-	-	-	-	-
C1+B2	0,1043	0,0293	0,0088	0,2615	-	-	-	-
C2	0,0054	0,0054	0,3004	0,0054	0,0054	-	-	-
C2+B1	0,0054	0,0054	0,0351	0,6953	0,3857	0,0054	-	-
C2+B2	0,3857	0,0224	0,0054	0,0392	0,1860	0,0054	0,0176	-
Martor	0,0054	0,0088	0,0224	0,1043	0,0293	0,0054	0,0859	0,0112

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 $C_{14}H_{19}CuN_7O_4S$.

Evaluarea comparativă a datelor pentru IL-10, pg/ml din loturile de cercetate a demonstrat semnificație statistică (Friedman chi-squared = 69,798, df = 8, p-value = 5,391e-12), ceea ce permite de a considera ipoteza alternativă (cel puțin 2 loturi din cele studiate diferă după IL-10, pg/ml). Mărimea efectului medicației de asemenea a fost estimată ca una crescută (Kendall W = 0,872). Analiza post-hoc a evidențiat diferențe statistic semnificative între lotul-martor, pe de o parte, și loturile de cercetare, pe de altă parte (Tabelul 39).

Tabelul 39. Analiza post-hoc. Valorile p ajustate prin metoda Benjamini Hochberg pentru evaluarea comparativă a valorilor IL-10, pg/ml între loturile de cercetare

Loturile	B1	B2	C1	C1+B1	C1+B2	C2	C2+B1	C2+B2
B2	-	-	-	-	-	-	-	-
C1	0,0035	0,0035	-	-	-	-	-	-
C1+B1	0,0035	0,0035	0,0035	-	-	-	-	-
C1+B2	0,3006	0,0176	0,0035	0,0234	-	-	-	-
C2	0,0082	0,0035	0,1185	0,0035	0,0035	-	-	-
C2+B1	0,2161	0,0064	0,0035	0,0130	0,7987	0,0035	-	-
C2+B2	0,4440	0,0082	0,0035	0,0035	0,2536	0,0035	0,0064	-
Martor	0,0082	0,0035	0,0204	0,0035	0,0035	0,0082	0,0035	0,0035

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 $C_{14}H_{19}CuN_7O_4S$.

Tabelul 40. Heatmap pentru sinteza evaluării comparative a parametrilor cercetați cu lotul-martor pentru compuși aparte și în combinație

Loturile	B1	B2	C1	C1+B1	C1+B2	C2	C2+B1	C2+B2
Martor, DAM, $\mu\text{M/L}$	0,0085	0,0085	0,0085	0,0166	0,0085	0,4908	0,0113	0,0085
Martor, PPOA, $\mu\text{M/L}$	0,018	0,012	0,080	0,695	0,409	0,027	0,073	0,012
Martor, SOD, u/c	0,0035	0,0096	0,0035	0,0035	0,0035	0,0035	0,0035	0,0035
Martor, CT, $\mu\text{M/L}$	0,0029	0,0029	0,0248	0,0029	0,0029	0,0309	0,0073	0,0029
Martor, AAT cu ABTS, $\mu\text{M/L}$	0,0059	0,0059	0,0173	0,0059	0,0059	0,0059	0,0125	0,0059
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	0,0041	0,0365	0,0070	0,0070	0,0975	0,0041	0,0041
Martor, GR, nM/s.L	0,0064	0,0064	0,0076	0,0064	0,0064	0,0064	0,0064	0,0064
Martor, IL-1 β , 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	0,0579	0,0088	1,0000	0,3541	0,0579	0,5716	0,2062
Martor, IL-6, pg/ml	0,0054	0,0088	0,0224	0,1043	0,0293	0,0054	0,0859	0,0112
Martor, IL-10, pg/ml	0,0082	0,0035	0,0204	0,0035	0,0035	0,0082	0,0035	0,0035
	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 – produse proteice de oxidare avansată, SOD – superoxid dismutaza, AAT – activitatea antioxidantă totală, GST – glutadion S-transferaza, GPO – glutadion peroxidaza, GR – glutation reductaza, IL – interleukina, TNF – factorul de necroză tumorală.

6.4. Concluzii la capitolul 6

1. Sinteza rezultatelor obținute la evaluarea comparativă a loturilor de cercetare, precum și a testelor post-hoc, permite de a concluziona că compușii biologici activi luați în studiu prezintă anumite efecte asupra parametrilor fiziologici *in vitro*.
2. 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 ($p = 0,008$)).
3. Compusul biologic *MX* a demonstrat efecte asemănătoare cu compusul *ES*: pe de o parte, a redus valorile DAM, $\mu\text{M/L}$ ($p = 0,0085$), PPOA, $\mu\text{M/L}$ ($p = 0,012$) și ale sistemului proinflamator (IL-1 β , pg/ml ($p = 0,015$), IL-6, pg/ml ($p = 0,0088$)), iar, pe de altă parte, a crescut potențialul antioxidant (SOD, u/c ($p = 0,0096$), CT, $\mu\text{M/L}$ ($p = 0,0029$), AAT cu ABTS, $\mu\text{M/L}$ ($p = 0,0059$), GST, nM/s.L ($p = 0,014$), GPO, nM/s.L ($p = 0,0041$), GR, nM/s.L ($p = 0,0064$)) și cel antiinflamator (IL-10, pg/ml ($p = 0,0035$)).
4. Sulfatul de {N-(prop-2-en-1-il)-2-[(piridin-2-il)-metiliden]hidrazin-1-carbotioamid}aqua-cupru(II) a prezentat efecte negative, determinând valori crescute pentru DAM, $\mu\text{M/L}$ ($p = 0,0085$), precum și pentru componentele sistemului proinflamator IL-1 β , pg/ml ($p = 0,010$), TNF- α , pg/ml ($p = 0,0088$), IL-6, pg/ml ($p = 0,0224$). Totodată, acest compus a favorizat sistemul antioxidant (SOD, u/c ($p = 0,0035$), CT, $\mu\text{M/L}$ ($p = 0,0248$), AAT cu ABTS, $\mu\text{M/L}$ ($p = 0,0173$), GST, nM/s.L ($p = 0,023$), GPO, nM/s.L ($p = 0,0365$), GR, nM/s.L ($p = 0,0076$)) și cel antiinflamator (IL-10, pg/ml ($p = 0,0204$)).
5. Compusul nitrato-{N-(prop-2-en-1-il)-N'-[1-(piridin-2-il)-etiliden]carbamohidrazontioato}-imidazolcupru monohidrat a exercitat efecte similare cu sulfatul de {N-(prop-2-en-1-il)-2-[(piridin-2-il)-metiliden]hidrazin-1-carbotioamid}aqua-cupru(II), 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 ($p = 0,008$).
6. Efecte pozitive, mai ales asupra sistemului antiinflamator și sistemului DAM – PPOA, au fost exercitate de compușii biologici *ES* și *MX*, caracteristici optimele înregistrând combinația nitrato-{N-(prop-2-en-1-il)-N'-[1-(piridin-2-il)-etiliden]carbamohidrazontioato}-imidazolcupru monohidrat + *MX*. Efectul de potențiere așteptat nu a fost constatat.

7. Compușii biologici *ES* și *MX*, datorită caracteristicilor optime privind efectele asupra sistemelor cercetate, prezintă potențial pentru a fi studiate ulterior.
8. Întrucât rezultatele obținute trebuie confirmare prin cercetări *in vivo*, nu pot fi trase concluzii despre efectul cantitativ al compușilor testați, dat fiind numărul relativ mic de respondenți ceea ce determină una dintre limitările cercetării efectuate – intervale de încredere largi.

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%; ÎÎ 5% 21,7-22,1), urmată în ordinea descreșterii frecvenței de *Pseudomonas aeruginosa* (15,2%; ÎÎ 95% 15,0-15,4), de *Klebsiella pneumoniae* (13,3%; ÎÎ 95% 13,1-13,5) și de speciile din genul *Enterococcus* spp. (11,9%; ÎÎ 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% (ÎÎ 95% 39,3-41,9), urmate de tulpinile de *K. pneumoniae* cu 36,9% (ÎÎ 95% 35,7-38,1) și de *E. coli* cu 33,9% (ÎÎ 95% 32,7-35,1). Producători de β -lactamazele de tip AmpC s-au dovedit a fi tulpinile de *A. baumannii* - 28,3% (ÎÎ 95% 27,0-29,6), de *K. pneumoniae* - 4,2% (ÎÎ 95% 3,47-4,93) și de *P. aeruginosa* - 4,2% (ÎÎ 95% 3,47-4,93). Tipurile de carbapenemaze frecvent înregistrate au fost OXA-48 (2,6%; ÎÎ 95% 2,5-2,7) și NDM (0,3%; ÎÎ 95% 0,26-0,34), iar la tulpinile de *A. baumannii* - OXA-23 (5,7%; ÎÎ 95% 4,8-6,6) și OXA-58 (3,8%; ÎÎ 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 antilozim. 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 (CL50 $5,53 \pm 0,90$), cât și compușii coordinați ai cuprului (Cu L Br – CL50 $4,4 \pm 0,96$; Cu L Cl – CL50 $3,5 \pm 0,91$) denotă o toxicitate mai redusă în comparație cu preparatul medicamentos clorhidratul de doxorubicină (CL50 $3,27 \pm 0,30$).
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, antilozim, 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.

BIBLIOGRAFIA

1. ABDULLAH, A. Antimicrobial activity of *Spirulina platensis* extracts against certain pathogenic bacteria and fungi. In: *Advances in Bioresearch*. 2017, 8(6), pp. 96-101. ISSN 0976-4585 (IF: 0.876).
2. ABELENDA-ALONSO, G., PADULLÉS, A., ROMBAUTS, A., et al. Antibiotic prescription during the COVID-19 pandemic: a biphasic pattern. In: *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2020, 41(11), pp. 1371-1372. ISSN 0899-823X (IF: 3.254).
3. ABRAHAM, E., CHAIN, E., FLETCHER, C., GARDNER, A., HEATLEY, N., JENNINGS, M., FLOREY, H. Further observations on penicillin. In: *Lancet*. 1941, nr. 238, pp. 177-189.
4. ABRAHAM, E., CHAIN, E. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. In: *Nature*. 1940, nr. 146, pp. 8-37. ISSN1476-4687.
5. AFONSO, A., OLIVEIRA, D., SAAVEDRA, M., BORGES, A., SIMÕES, A. Biofilms in Diabetic Foot Ulcers: Impact, Risk Factors and Control Strategies. In: *Int. J. Mol. Sci*. 2021, 22(15), p. 8278-8291. ISSN: 1422-0067 (IF: 5.923).
6. AGALE, S. Chronic Leg Ulcers: Epidemiology, Aetiopathogenesis and Management. In: *Hindawi Publ Corp Ulcers*. 2013, p. 9-23. ISSN 2314-6133.
7. AHMED, S., LAMIAA, A., NAZMY, E., REHAM, A. Expressed and Silent Carbapenemase Genes Detected by Multiplex PCR in both Carbapenem-Resistant and Phenotypically-Susceptible Gram Negative Bacilli. In: *Alexandria Journal of Medicine*. 2020, 56:1, pp. 181-188. ISSN 2090-5076.
8. AKKIDAS, S., TABBASSAM, A., SHAIK, S. Clinicopathological Study of Chronic Lower Limb Ulcers and Management. In: *Journal of Medical Science and Clinical Research*. 2019, vol. 7, pp. 19-27. ISSN 2455-0450 (IF: 1.746).
9. ALGHAZEER, R., ELMANSORI, A., SIDATI, M., GAMMOUDI, F., AZWAI, S., NAAS, H., GARBAJ, A., ELDAGHAYES, I. *In Vitro* Antibacterial Activity of Flavonoid Extracts of Two Selected Libyan Algae against Multi-Drug Resistant Bacteria Isolated from Food Products. In: *Journal of Biosciences and Medicines*. 2017, vol. 5. nr. 1, pp. 26-48. ISSN 2327-5081.
10. ALHUBAIL, A., SEWIFY, M., MESSENGER, G., MASOETSA, R., HUSSAIN, I., NAIR, S., et al. Microbiological profile of diabetic foot ulcers in Kuwait. In: *PLoS ONE*. 2020, 5(12), pp. 1-15. ISSN 1932-6203 (IF: 3.240).
11. AL-LAWATI, J. Diabetes Mellitus: A Local and Global Public Health Emergency! In: *Oman Med J*. 2017, vol. 32, nr. 3, pp. 177-179. ISSN 20705204 (IF: 1.265).
12. 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).
13. ALSENANI, F., TUPALLY, K., CHUA, E., ELTANAHY, E., ALSUFYANI, H., PAREKH, H., SCHENK, P. Evaluation of microalgae and cyanobacteria as potential sources of antimicrobial compounds. In: *Saudi Pharmaceutical Journal*. 2020, vol. 28, nr. 12, pp. 1834-1841. ISSN 13190164 (IF: 4.330).
14. ALTAMIMI, M., ALSALAMAH, A., ALKHULAIFI, M., et al. Comparison of phenotypic and PCR methods for detection of carbapenemases production by Enterobacteriaceae. In: *Saudi J Biol Sci*. 2017, 24(1), pp. 155-161. ISSN 1319562X (IF: 3.138).
15. AMBLER, R., COULSON, A., FRÈRE, J., GHUYSEN, J., JORIS et al. A standard numbering scheme for the class A betalactamases. In: *Biochem J*, 1991, pp. 269–270. ISSN 0264-6021.
16. 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).
17. ANDRES, S., BAJAJ, K., VISHNOSKY, N., PETERSON, M., MASHUTA, M., BUCHANAN, R., BATES, P., GRAPPERHAUS, C. Synthesis, Characterization, and

- Biological Activity of Hybrid Thiosemicarbazone–Alkylthiocarbamate Metal Complexes. In: *Inorganic Chemistry*. 2020, 59(7), pp. 4924-4935. ISSN 0020-1669 (IF: 5.165).
18. ANDRONACHE, L. *Influența unor compuși biologici activi autohtoni asupra ciclului glutationic în normă și în patologia hepatică experimentală: tz. de doc. în medicină*. Chișinău, 2016. 162 p.
 19. ANGST, D., TEPEKULE, B., SUN, L., BOGOS, B., BONHOEFFER, S. Comparing treatment strategies to reduce antibiotic resistance in an in vitro epidemiological setting. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2021, 118(13), pp. 1-7. ISSN 0027-8424. (IF: 11.205).
 20. AROKIYARAJ, S. et al. Rapid green synthesis of silver nanoparticles from *Chrysanthemum indicum* L and its antibacterial and cytotoxic effects: an *in vitro* study. In: *Journal of Nanomedicine*. 2014, 9(1), pp. 379-388. ISSN 2578-8760 (IF: 4.383).
 21. ARTIOMOV, L. Influența unor polifenoli de origine vegetală asupra microflorei alimentelor și siguranței lor. În: *Culegere de lucrări științifice ale Conferinței Științific Internațional "Competitivitate și Inovare în economia cunoașterii"*, Ediția a XXI-a, 27-28 septembrie 2019. Chișinău. ISBN 978-9975-75-968-7.
 22. ASLAM, B., WANG, W., ARSHAD, M., KHURSHID, M., MUZAMMIL, S., RASOOL, M., NISAR, M., ALVI, R., ASLAM, M., QAMAR, M., SALMATA, M., BALOCH, Z. Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis. In: *Infect Drug Resist*. 2018, 11, pp. 1645-1658. ISSN: 1178-6973 (IF: 1.354).
 23. ASTM E2315-16 *Standard Guide for Assessment of Antimicrobial Activity Using a Time-Kill Procedure*. ASTM International, West Conshohocken, PA, 2016. [citată 18.03.2020]. Disponibil: www.astm.org.
 24. 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.
 25. ATEF, N., SHANAB, S., NEGM, S. et al. Evaluation of antimicrobial activity of some plant extracts against antibiotic susceptible and resistant bacterial strains causing wound infection. In: *Bull Natl Res Cent*. 2019, nr. 43, p. 144-155. ISSN 2522-8307.
 26. AUN, E., KISAND, V., LAHT, M., TELLING, K., KALMUS, P., VÄLI, Ü., BRAUER, A., REMM, M., TENSON, T. Molecular Characterization of Enterococcus Isolates From Different Sources in Estonia Reveals Potential Transmission of Resistance Genes Among Different Reservoirs. In: Among Different Reservoirs. In: *Frontiers in Microbiology*. 2021, vol.12, p. 585-598. ISSN 1664302X (IF: 5.640).
 27. 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).
 28. BACIU, E., NASTAS, I. Procedeu de determinare a activității catalazei. *Certificat de inovator nr. 3122 din 09.11.1996.*, n.d.
 29. BAHEI-ELDIN, I., ELGAZZAR, M., AHMED, A., MOHAMED, S. The Effect of Spirulina Extract on the Healing of Skin Wounds in Adult Albino Rats: A Light and Scanning Electron Microscopic Study. In: *Egyptian Journal of Anatomy*. 2017, 40(1), pp. 33-35. ISSN 1110-2144.
 30. BALAN, G. Antibiotic susceptibility and factors involved in virulence and persistence of *Acinetobacter baumannii* strains. In: *The Moldovan Medical Journal*. 2021, 64(1):4, pp. 5-9. ISSN 2537-6373.
 31. BALAN, G. Antibiotic susceptibility and some persistence factors of Gram-negative bacilli isolated from trophic ulcers. In: *The Moldovan Medical Journal*. 2019, 62(3), pp. 13-17. ISSN 2537-6373.
 32. BALAN, G. The bacterial strains isolated from trophic ulcers their persistence factors. In: *The Moldovan Medical Journal*. 2019, 62(4), pp. 36-48. ISSN 2537-6373.

33. **BALAN, G., BURDUNIUC, O., RUDIC, V., LOZAN-TIRSU, C., GULEA, A.** 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.
34. **BALAN, G., BURDUNIUC, O., USATAIA, I., GRAUR, V., CHUMAKOV, YU., PETRENKO, P., GUDUMAC, V., GULEA, A., PAHONTU, E.** 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.* 2019, pp. 34-35. ISSN1099-0739 (IF: 4,105).
35. **BALAN, G., RIMIȘ, C., BURDUNIUC, O.** Prevalence and antibiotic sensitivity of bacteria isolated from nosocomial infections. In: *Antropological Research and Studies.* București, România. 2015, nr. 5, p. 12. ISSN 2360-3445.
36. **BĂLAN, G., RUDIC, V.** *Ghid privind managementul ulcerului trofic infectat.* Chisinau, 2021, 12p. ISSN 978-9975-56-905-7.
37. **BANDANA, K., JASHANDEEP, K., JAGDEEP, K.** Phospholipases in Bacterial Virulence and Pathogenesis. In: *Adv Biotech & Micro.* 2018, 10(5), pp. 106-113. ISSN: 2474-7637 (IF:1.023).
38. **BANOUSI, A., EVANGELOPOULOS, D.S., STYLIANAKIS, A. et al.** A comparative study of heterogeneous antibiotic resistance of microbial populations in conventional periprosthetic tissue cultures and sonication fluid cultures of orthopaedics explanted prostheses. In: *Eur J Orthop Surg Traumatol.* 2020, nr. 30, pp. 1307-1318. ISSN 14321068 (IF: 1.79).
39. **BAO, M., ZHANG, L., LIU, B., LI, L., ZHANG, Y., ZHAO, H., et al.** Synergistic effects of anti-MRSA herbal extracts combined with antibiotics. In: *Future Microbiology.* 2020, nr.13, vol. 15, pp. 1265-1276. ISSN 1746-0913 (IF: 3.165).
40. **BARBIERI, R., COPPO, E., MARCHESE, A., DAGLIA, M., SOBARZO-SANCHEZ, E., NABAVI, S., et al.** Phytochemicals for human disease: An update on plant-derived compounds antibacterial activity. In: *Microbiol Res.* 2017, nr. 196, pp. 44-68. ISSN 0944-5013 (IF: 2.777)
41. **BARSHES, N., SAEDI, S., WROBEL, J., KOUGIAS, P., KUNDAKCIOGLU, O., ARMSTRONG, D.** A model to estimate cost-savings in diabetic foot ulcer prevention efforts. In: *J Diabetes Complications.* 2017, nr. 31(4), pp. 700-707. ISSN 1056-8727 (IF: 2.792).
42. **BASSETTI, M., PEGHIN, M., VENA, A., et al.** Treatment of infections due to MDR Gram-negative bacteria. In: *Front Med (Lausanne).* 2019, (4)16, p. 74. ISSN 2296-858X (IF: 3.59).
43. **BATÎR, L., ZOSIM, L., ELENCIUC, D., ȚAPCOV, V., GULEA, A., RUDIC, V.** Procedee de obținere a biomasei de spirulină cu conținut sporit de cupru legat organic. În: *Intellectus.* 2013, nr. 1, pp. 73-76. ISSN1679-8902.
44. **BELLAHCEN, T., AAMIRI, A., TOUAM, I., HMIMID, F., AMRANI, A., CHERIF, A., CHERKI, M.** Evaluation of Moroccan microalgae: *Spirulina platensis* as a potential source of natural antioxidants. In: *J Complement Integr Med.* 2020, vol.17, nr. 3, pp.140-149. ISSN 15533840 (IF: 1.436).
45. **BENGTSSON-PALME, J., LARSSON, D.** Concentrations of antibiotics predicted to select for resistant bacteria: Proposed limits for environmental regulation. In: *Environ. Int.* 2016, nr. 86, pp. 140-149. ISSN 01604120 (IF: 7.088).
46. **BETCKERT, B., LEROY, E.C., SOTHISELVAM S. et al.** Structural and mechanistic basis for translation inhibition by macrolide and ketolide antibiotics. In: *Nat Commun.* 2021, nr. 12, pp. 4466-4481. ISSN 2041-1723 (IF: 14.919).
47. **BLAGOJEVIĆ, D., BABIĆ, O., RAŠETA, M., ŠIBUL, F., JANJUŠEVIĆ, L., SIMEUNOVIĆ, J.** Antioxidant activity and phenolic profile in filamentous cyanobacteria: the impact of nitrogen. In: *J Appl Phycol.* 2018, nr. 30, pp. 2337–2346. ISSN 0921-8971 (IF: 2.743).

48. BONDAR, A., POPA, A., PAPANAS, N., POPOVICIU, M., VESA, C., SABAU, M., DAINA, C., STOICA, R., KATSIKI, N., STOIAN, A., STOIAN, A., et al. Diabetic neuropathy: A narrative review of risk factors, classification, screening and current pathogenic treatment o options (Review). In: *Exp. Ther. Med.* 2021, 22(1), pp. 690-702. ISSN 1792-1015 (IF: 2.447).
49. 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).
50. BONNIN, R., JOUSSET, A., EMERAUD, C., OUESLATI, S., DORTET, L., NAAS, T. Genetic Diversity, Biochemical Properties, and Detection Methods of Minor Carbapenemases in Enterobacterales. In: *Frontiers in Medicine.* 2021, vol. 5, pp. 1061-1073. ISSN 2296-858X (IF: 5.091).
51. BOUSSADIA, A., BEGHIDJA, A., GALI, L., BEGHIDJA, C., ELHABIRI, M., et al. Coordination properties of two new Schiff-base phenoxy-carboxylates and comparative study of their antioxidant activities. In: *Inorganica Chimica Acta, Elsevier.* 2020, nr. 508, pp. 60-88. ISSN 0020-1693 (IF: 2.545).
52. BRITO, A., SILVA, A., DE OLIVEIRA, C. et al. *Spirulina platensis* prevents oxidative stress and inflammation promoted by strength training in rats: dose-response relation study. In: *Sci Rep.* 2020, nr. 10, pp. 6382-6400. ISSN 2045-2322 (IF: 4.379).
53. BUIUC, D. NEGUȚ, M. *Tratat de microbiologie clinică.* București: Ed. Medicală, 2017. 1250 p. ISBN 978-973-39-0593-6.
54. BUKHARIN, O., VALYSHEV, A., ELAGINA, N., IVANOV, I., CHERKASOV, S. Fotometricheskoe opredelenie antilizotsimnoi aktivnosti mikroorganizmov. The photometric determination of the antilysozyme activity of microorganisms. In: *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol.* 1997, nr.4, pp. 117-120. ISSN 0372-9311.
55. BULIMAGA, V., ZOSIM L., PISOVA, M., RUDIC, V., ȘOVA, S. Influența selenitului de Fe(III) și a intensității de iluminare asupra conținutului de ficobiliproteine, seleniu și fier în biomasa cianobacteriei *spirulina platensis*. In: *Studia Universitatis Moldaviae.* 2016, nr. 6(96). Seria "Științe reale și ale naturii", pp. 3-9. ISSN 1814-3237.
56. BULIMAGA, V., ZOSIM L., TROFIM, A., REVA, V., BULIMAGA M. Studiul polizaharidelor produse de cianobacteria *Spirulina platensis* la cultivare mixotrofă. In: *Studia Universitatis Moldaviae.* 2019, 1(121). Seria „Științe reale și ale naturii”, pp. 34-41. ISSN 1814-3237.
57. BURDUNIUC, O., BĂLAN, G., GRAUR, V., ȚAPCOV, V., GULEA, A. Compuși ai cuprului (II) cu 4-aliltiosemicarbazona 2-acetilpiridinei în calitate de inhibitori ai proliferării fungilor din specia *Cryptococcus neoformans*. *Brevet de invenție:* 4621 CI. MD, 09 30, 2019.
58. 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, pp. 118-123. ISSN 2306-2436.
59. BUSH, K., BRADFORD, P. β -Lactams and β -Lactamase Inhibitors: An Overview. In: *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2016, 6(8), p. 1-22. ISSN 21571422 (IF: 3.968).
60. BUSH, K., JACOBY, G. Updated functional classification of β -lactamases. In: *Antimicrob Agents Chemother.* 2010, nr. 10, pp. 969–976. ISSN 0066-4804 (IF: 4.659).
61. CALENDĂ, O., GHINDA, S., LESNIC, E. Reacțiile de adaptare și indicatorii reactivității immune în tuberculoza pulmonară sub influența adaptogenului BioR. În: *Sănătatea Publică, Economie și Management în Medicină.* 2015, 2(59), pp. 60-64. ISSN:1729-8687.
62. CAROLUS, H., PIERSON, S., LAGROU, K., VAN DIJCK, P. Amphotericin B and Other Polyenes—Discovery, Clinical Use, Mode of Action and Drug Resistance. In: *Journal of Fungi.* 2020, 6(4), p. 321-342. ISSN 2309-608X (IF: 5.816).
63. CASCO, D. Caracteristica generală și beneficiile spirulinei *platensis* în biologie și medicină. În: *Studia Universitatis, Revistă științifică a Universității de Stat din Moldova.* 2011, 6(46), pp 14-18. ISSN 1814-3237.

64. CASTANHEIRA, M., SIMNER, P., BRADFORD, P. Extended-spectrum β -lactamases: an update on their characteristics, epidemiology and detection. In: *JAC-Antimicrobial Resistance*. 2021, vol. 3, pp. 1-12. ISSN 2632-1823.
65. CAULIER, S., NANNAN, C., GILLIS, A., LICCIARDI, F., BRAGARD, C., MAHILLON, J. Overview of the Antimicrobial Compounds Produced by Members of the *Bacillus subtilis* Group. In: *Frontiers in Microbiology*. 2019, vol. 10, pp. 302-308. ISSN 1664302X (IF: 4.236).
66. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC) Antibiotic resistance threats in the United States. *Atlanta: U.S. Department of health and human services. - CDC*, 2019. <https://www.cdc.gov/drugresistance/biggest-threats.html>.
67. CEPOI, L., RUDI, L., CHIRIAC, T., MISCU, V., RUDIC, V. Dialdehida malonică – un potențial marcher al toxicității nanoparticulelor în mediul acvatic. In: *One health and risc management*. 2020, vol. 1, nr.1, pp. 64-71. ISSN 2587-3458.
68. CHIT, A, GROOTENDORST, P. Policy to encourage the development of antimicrobials. In: *Int J Health Gov*. 2018, 23(2), pp. 101-110. ISSN 2059464X.
69. CLAUDEL, M., SCHWARTE, J., FROMM, K. New Antimicrobial Strategies Based on Metal Complexes. In: *Chemistry*. 2020, 2(4), pp. 849-899. ISSN 1521-3765 (IF: 5.236).
70. CLSI. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. 29th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute. 2019.
71. CLSI. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically, Approved Standard*, 9 th ed Document M07-A9: Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087, USA, 2012.
72. COUNCIL OF CANADIAN ACADEMIES. When antibiotics fail 2019. [accesat 09.04.2020] Disponibil: <https://cca-reports.ca/wp-content/uploads/2018/10/When-Antibiotics-Fail-1.pdf>.
73. CURTEA DE CONTURI EUROPEANĂ. A sustained and robust pipeline of new antibacterial drugs and therapies is critical to preserve public health. In: *Pew Charitable Trusts*. 2019. [citat 12.06.2020] Disponibil: <https://op.europa.eu/webpub/eca/special-reports/amr-18-2019/ro/index.html>
74. 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).
75. 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).
76. DAVIES, J., DAVIES, D. Origins and evolution of antibiotic resistance. In: *Microbiol Mol Biol Rev*. 2010, nr. 74, pp. 417-133. ISSN 10985557.
77. DE ANGELIS, G., DEL GIACOMO, P., POSTERARO, B., SANGUINETTI, M, TUMBARELLO, M. Molecular Mechanisms, Epidemiology, and Clinical Importance of β -Lactam Resistance in *Enterobacteriaceae*. In: *Int J Mol Sci*. 2020, 21(14), p. 5090-5112. ISSN 1422-0067. (IF:4.556).
78. DEFOIRDT, T. Quorum-sensing systems as targets for antivirulence therapy. In: *Trends Microbiol*. 2017, nr. 26, pp. 313-328. ISSN 18784380.
79. DEPOPAS, E., BROWN, M. Varicose Veins and Lower Extremity Venous Insufficiency. In: *Semin Intervent Radiol*. 2018, 35(1), pp. 56-61. ISSN: 0739-9529. (IF:0.99).
80. DEVI, L., BROOR, S., RAUTELA, R., GROVER, S., CHAKRAVARTI, A., CHATTOPADHYA, D. Increasing Prevalence of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* Producing CTX-M-Type Extended-Spectrum Beta-Lactamase, Carbapenemase, and NDM-1 in Patients from a Rural Community with Community Acquired Infections: A 3-Year Study. In: *Int J Appl Basic Med Res*. 2020, 10(3), pp. 156-163. ISSN 2229-516X.

81. DHINGRA, S., RAHMAN, N., PEILE, E., RAHMAN, M., SARTELLI, M., HASSALI, M., ISLAM, T., ISLAM, S., HAQUE, M. Microbial Resistance Movements: An Overview of Global Public Health Threats Posed by Antimicrobial Resistance, and How Best to Counter. In: *Front Public Health*. 2020, vol. 8, pp. 1-22. ISSN 22962565 (IF: 3.018).
82. DI DOMENICO, E., FARULLA, I., PRIGNANO, G., GALLO, M., VESPAZIANI, M., CAVALLO, I., et al. Biofilm is a major virulence determinant in bacterial colonization of chronic skin ulcers independently from the multidrug resistant phenotype. In: *Int. J. Mol. Sci.* 2017, vol. 10, pp. 768-780. ISSN 2235-2988.
83. 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).
84. DJUR, S. *Biotehnologii de obținere a preparatelor cu conținut sporit de seleniu și germaniu în baza biomasei de spirulină: tz. de doc. în biologie*. Chișinău, 2021. 180p.
85. DONOHUE, C., ADLER, J., BOLTON, L. Peripheral arterial disease screening and diagnostic practice: A scoping review. In: *Int Wound J*. 2020, 17(1), pp. 32-44. ISSN 1742481X.
86. DUZHIY, I., POPADYNETS, V., NIKOLAIENKO, A., LYNDIN, M. et al. Hypertensive ulcer of lower extremity (Martorell's syndrome): clinical case with the treatment improvement. In: *Bangladesh Journal of Medical Science*. 2017, 16(2), pp. 325-328. ISSN 2076-0299.
87. DZIRI, O., DZIRI, R., ALI EL SALABI, A., CHOUCANI, C. Carbapenemase Producing Gram-Negative Bacteria in Tunisia: History of Thirteen Years of Challenge. In: *Infect Drug Resist.* 2020, nr. 13, pp. 4177-4191. ISSN 1178-6973.
88. EBINESHAN, K., SUKUMAR PALLAPATI, M. SRIKANTAM, A. Occurrence of bacterial biofilm in leprosy plantar ulcers. In: *Leprosy Review*. 2020, 91 (2), pp. 130-138. ISSN 3057518. (IF:0.537).
89. Editorial: Horizontal Gene Transfer Mediated Bacterial Antibiotic Resistance. In: *Frontiers in Microbiology*. 2019, vol. 10, p. 1933. ISSN 1664-302X. (IF:4.236).
90. 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.
91. ELBADAWI, H., ELHAG, K., MAHGOUB, E. et al. Detection and characterization of carbapenem resistant Gram-negative bacilli isolates recovered from hospitalized patients at Soba University Hospital, Sudan. In: *BMC Microbiol.* 2021, nr. 21, p. 136-142. ISSN 1471-2180. (IF:3.605).
92. 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.
93. ETEBU, E., ARIKEKPAR, I. Antibiotics: Classification and mechanisms of action with emphasis on molecular perspectives. In: *Int. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. Res.* 2016, nr. 4, pp. 90-101. ISSN: ISSN 2053-1818.
94. EUCAST. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 8.1. 2019 [citată 02.03.2020]. Disponibil: https://www.eucast.org/eucast_news
95. EUCAST. Guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance. Version 2.01 July 2017 [citată 02.03.2020]. Disponibil: https://aurosan.de/images/mediathek/servicematerial/EUCAST_detection_of_resistance_mechanisms.pdf
96. EVANS, R., KUHNKE, J., BURROWS, C., LABRECQUE, C. O'SULLIVAN-DROMBOLIS, D., HOUGHTON, P. Best practice recommendations for the prevention and management of venous leg ulcers. In: *Foundations of Best Practice for Skin and Wound Management*. A supplement of Wound Care Canada. 2019, 70 pp.

97. FARAHMANDFAR, R., ESMAEILZADEH KENARI, R., ASNAASHARI, M., SHAHRAMPOUR, D., BAKHSHANDEH, T. Bioactive compounds, antioxidant and antimicrobial activities of *Arum maculatum* leaves extracts as affected by various solvents and extraction methods. In: *Food Sci Nutr*. 2019, 28;7(2), pp. 465-475. ISSN: 2470-1076.
98. FELDMAN, E., CALLAGHAN, B., POP-BUSUI, R. et al. Diabetic neuropathy. In: *Nat Rev Dis Primers*. 2019, nr. 5, p. 41-59. ISSN 2056-676X. (IF:30.488).
99. FINAMORE, A., PALMERY, M., BENSEHAILA, S., PELUSO, I. Antioxidant, immunomodulating, and microbial-modulating activities of the sustainable and ecofriendly *Spirulina*. In: *Oxid Med Cell Longev*. 2017, 2017:3247528, pp.1-14. ISSN 19420900. (IF: 5.163).
100. 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.
101. FONKWO, P. Pricing infectious disease. The economic and health implications of infectious diseases. In: *EMBO Rep*. 2008, vol. 9, suppl 1, pp. 13-17. ISSN1469221X. (IF:4.678).
102. FOSTER, T. Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. Current status and future prospects. In: *FEMS Microbiology Reviews*. 2017, vol. 41, nr. 3, pp. 430-449. ISSN 0168-6445. (IF: 11.392).
103. 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.
104. FREI, A. et al. Metal Complexes as a Promising Source for New Antibiotics. In: *Chem. Sci*. 2020, nr. 11, pp. 2627-2639. ISSN: 2456-706X. (IF:9.825).
105. FRIEDRICH, M. WHO's Top Health Threats for 2019. In: *JAMA*. 2019, 321(11), p. 1041-1052. ISSN 0098-7484. (IF:56.3).
106. G20 HEALTH MINISTERS. Berlin Declaration of the G20 Health Ministers: Together Today for a Healthy Tomorrow. Berlin, Germany. 2017 [citat 10.02.20]. Disponibil: <http://www.g20.utoronto.ca/2017/170520-health-en.pdf>
107. 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.
108. GARDNER, S., HILLIS, S., HEILMANN, K., SEGRE, J., AND GRICE, E. The neuropathic diabetic foot ulcer microbiome is associated with clinical factors. In: *Diabetes*. 2013, nr. 62, pp. 923-930.
109. GASPAR, P., AL-BAYATI, F., ANDREW, P., NEVES, A., YESILKAYA, H. Lactate Dehydrogenase Is the Key Enzyme for Pneumococcal Pyruvate Metabolism and Pneumococcal Survival in Blood. In: *Infection and Immunity*. 2014, 81(12), pp. 5099-5109. ISSN 0019-9567. (IF:2.344).
110. GAYNES, R. The Discovery of Penicillin - New Insights after More Than 75 Years of Clinical Use. In: *Emerg. Infect. Dis*. 2017, nr. 23, pp. 849-853. ISSN 1080-6040. (IF: 7.673).
111. GELPI, A., GILBERTSON, A., TUCKER, J. Magic bullet: Paul Ehrlich, Salvarsan and the birth of venereology. In: *Sex Transm Infect*. 2015, nr. 91, pp. 68-69. ISSN: 0148-5717. (IF: 3.101).
112. GEORGESCU, M., GHEORGHE, I., CURUTIU, C. et al. Virulence and resistance features of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from chronic leg ulcers. In: *BMC Infect Dis*. 2016, nr. 16, p. 92. ISSN 1471-2334. (IF:3.037).
113. GHENDOV-MOŞANU, A., COJOCARI, D., BALAN, G., STURZA, R. Antimicrobial activity of rose hip and hawthorn powders on pathogenic bacteria. In: *Journal of Engineering Science*. 2018, nr. 3, vol. XXV, pp. 100-107. ISSN 2587-3474.

114. GHINDA, S., RUDIC, V., CHIRIAC, T., CHIROSCA, V., BRUMARU, A. *In vitro* action of the BioR and BioRZn preparations on the clinical and functional activity of T lymphocytes in patients with adverse reactions to anti-tuberculosis preparations. In: *Curierul medical*. 2013, 56(3), pp. 127-130. ISSN 2537-6373.
115. GIACOMINI, E., PERRONE, V., ALESAANDRINI, D., PAOLI, D., NSPPI, C., DEGLISPOSTI, L. Evidence of Antibiotic Resistance from Population-Based Studies: A Narrative Review. In: *Infect Drug Resist*. 2021, nr. 14, pp. 849-858. ISSN: 1178-6973.
116. GLADUN, N. et al. Ateroscleroza obliterantă a membrelor inferioare. În: *Arta Medica*. 2007, 3 (24), p. 44-46. ISSN 1810-1852.
117. GOLIŃSKA, E., VAN DER LINDEN, M., WIĘCEK, G., MIKOŁAJCZYK, D., et al. Virulence factors of *Streptococcus pyogenes* strains from women in peri-labor with invasive infections. In: *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2016, 35(5), pp. 747-754. ISSN: 0934-9723 (IF:2.727).
118. GÓRNIAK, I., BARTOSZEWSKI, R., KRÓLICZEWSKI, J. Comprehensive review of antimicrobial activities of plant flavonoids. In: *Phytochem Rev*. 2019, nr. 18(1), pp. 241-247.
119. GRAYSON, M., GIBBONS, G., BALOGH, K., LEVIN, E., KARCHMER, A. Probing to bone in infected pedal ulcers. A clinical sign of underlying osteomyelitis in diabetic patients. In: *JAMA*. 1995, pp. 720-723. ISSN 0098-7484.
120. 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).
121. GRIGORAS, A. Natural and synthetic polymeric antimicrobials with quaternary ammonium moieties: a review. In: *Environ Chem Lett*. 2021, nr. 19, pp. 3009-3022. ISSN 1610-3653. (IF:9.027).
122. GRYSZCZYŃSKA, B., FORMANOWICZ, D., BUDZYŃ, M., WANIC-KOSSOWSKA, M., PAWLICZAK, E., FORMANOWICZ, P., ISKRA, M. Advanced Oxidation Protein Products and Carbonylated Proteins as Biomarkers of Oxidative Stress in Selected Atherosclerosis-Mediated Diseases. In: *Bio Med Research International*. 2017, pp. 1-9. ISSN. 2314-6133. (IF:2.561).
123. 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).
124. GUDUMAC, V., TAGADIUC, O., ANDRONACHE, L., ȘTÎRBA, O., PANTEA, V. Procedeu de dozare a dialdehidei malonice în materialul biologic. *Certificat de inovator* nr. 5157 din 14.12.2012.
125. GUDUMAC, V., TAGADIUC, O., RÎVNEAC, V., SARDARI, V., PANTEA, V. Investigații biochimice. In: *Volumul II. Micrometode. Elaborare metodică*. Chișinău. 2010.
126. GUIBADO MUÑOZ, S., CONDE MONTERO, E., DE LA CUEVA DOBAO, P. Punch grafting for the treatment of martoell hypertensive ischemic leg ulcer. In: *Actas Dermosifiliogr*. 2019, nr. 110, pp. 689-690. ISSN: 00017310.
127. GULEA, A., BĂLAN, G., ș. a. [N⁷-(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 BI, 08 31, 2020.
128. 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)hidrazincarbotoamido(1-)]-O,N,S]}-{{[4-(2,4-dimetilfenil)-2-(oxo-3-metoxibenziliden)hidrazincarbotoamido(1-)]-O,N,S]}-{{[4-(2,4-dimetilfenil)-2-(oxo-3-metoxibenziliden)hidrazincarbotoamido(1-)]-O,N,S]}-{{[4-(2,4-dimetilfenil)-2-(oxo-3-metoxibenziliden)hidrazincarbotoamido(1-)]-O,N,S]}. *Brevet de invenție: MD 4675 CI.*, 11 30, 2020.

129. GULEA A., BURDUNIUC, O., **BĂLAN, G.** Utilizare a N-ciclohexil-2-[1-(piridin-2-il)]-hidrazincarbotoamidei în calitate de inhibitor al proliferării microorganismelor gram-pozitive și fungilor *Candida albicans*. *Brevet de invenție* MD 4648 C1 2020.04.30.
130. GULEA A., GUDUMAC, V., GARBUZ, O., ANDRONACHE, L. *In vitro* antiproliferative activity and antioxidant capacity of new organometallic coordination compounds, results correlation analysis. In: *Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științele vieții*. 2016, 330(3), pp. 65-72. ISSN 1857-0011.
131. GULEA, A., MITKEVICH, N., CHUMAKOV, Y., PETRENKO, P., **BALAN, G.**, BURDUNIUC, O., TSAPKOV, V. Synthesis, Structure and Biological Activity of Coordination Compounds of Cobalt (II), Nickel (II), and Copper (II) with N-(Methoxyphenyl)-2-[(5-nitrofuryl)methylene] hydrazinecarbothioanidess. In: *Russian Journal of General Chemistry*. 2019, 89(7), pp. 1415-1423 (IF: 0,761).
132. 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 antimicotică. *Brevet de invenție*: MD 4667 CI, 07. 31. 2020.
133. GULEA, A., ȚAPCOV, V., CEBOTARI, D., GARBUZ, O. Sinteza, structura și proprietățile compușilor coordinațivi ai unor metale 3d cu 4-(dimetilfenil)-tiosemicarbazone ale 2-hidroxi-3-metoxibenzaldehidei. In: *Studia Universitatis Moldaviae. Seria "Științe reale și ale naturii"*. 2020, 1(131), pp. 3-15. ISSN 1814-3237.
134. GULEA, A., TSAPKOV, V., GRAUR, V. Synthesis, structure and biological activity of substituted thiosemicarbazones and their coordination compounds. In: *COMPOUNDS AND MATERIALS FOR DRUG DEVELOPMENT AND BIOMEDICAL APPLICATIONS*. Chapter 8 / book auth. Duca Gh. Macaev F. București-Brăila: Editura Academiei Române, 2018. ISBN 978-976-27- 2944-1.
135. 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-ylcarbamoahidraz. In: *Russian Journal of Chemistry*. 2020, 90(4), pp. 630-639. ISSN 1070-3632.
136. GULEA, A., GRAUR, V., DIURICI, E., ULCHINA, IA., BOUROSH, P., **BALAN, G.**, BURDUNIUC, O., TSAPKOV, V., RUDIC, V. 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)carbomothioyl]hidrazinylidene}propanoic Acid. In: *Russ J Gen Chem*. 2020, 90(11), pp. 2120-2127. (IF: 0,716).
137. GUOZHI, Y., DESIREE, Y., REGOES, R., ROLFF, J. Combination Effects of Antimicrobial Peptides. In: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2016, 60(3), pp. 1717-1724. ISSN 0066-4804. (IF: 4.550).
138. GUREVA, Y., SLEPUKHIN, P., KUTCHIN, A. Palladium (II) complexes based on bidentate chiral Schiff base and amine ligands derived from (-)-myrtenal: Synthesis, characterization and catalytic activity in Suzuki reaction. In: *Inorg. Chim. Acta*. 2019, nr. 486 pp. 602-607. ISSN: 0009-898. (IF:2.695).
139. HAAS, L. Papyrus of Ebers and Smith. *J Neurol Neurosurg Psychiatr*. 1999, nr. 67, pp. 572-578. ISSN: 0022-3050.
140. HABIG, W., PABST, M., JAKOBY, W. Glutathione S transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. In: *Journal of Biological Chemistry*. 1974, nr. 249, pp. 7130-7139. ISSN 0021-9258.
141. HAONAN, G., WEI, D., YECHEN, L., MINFEI, J., DI, Z., 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, pp. 13-19. ISSN 2296-858X (IF: 5.091).
142. HASAN, T., AL-HARMOOSH, R. Mechanisms of Antibiotics Resistance in Bacteria. In: *Systematic Reviews in Pharmacy*. 2020, 11(6), pp. 817-823. ISSN 0975-8453. (IF: 5.373).

143. 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).
144. HE, J., KLAVAS, D., MCKISSACK, H., AHUERO, J., SHAH, A., GRANBERRY, W., SCHON, L. Don't Lose Your Nerve: Evaluation and Management of Neurogenic Pain in the Foot and Ankle. In: *Instr Course Lect.* 2020, nr. 69, pp. 509-522. ISSN: 0065-6895.
145. HELLSTRÖM, A., NILSSON, C., NILSSON3AND, A., FAGERSTRÖM, C. Leg ulcers in older people: A national study addressing variation in diagnosis, pain and sleep disturbance. In: *BMC Geriatrics.* 2016, pp. 16-25. ISSN 14712318. (IF:3.047).
146. HERNANDO-AMADO, S. COQUE T., BAQUERO F., JOSÉ M. Antibiotic Resistance: Moving From Individual Health Norms to Social Norms in One Health and Global Health. In: *Frontiers in Microbiology.* 2020, vol. 11, pp. 1-20. ISSN 1664302X (IF:5.64).
147. HOLMES, K., BERTOZZI, S., BLOOM, B., JHA, P., GELBAND, H., DEMARIA, L., HORTON, S. Major infectious diseases: key messages from disease control priorities. Third Edition. In: HOLMES, K., BERTOZZI, S., BLOOM, B., JHA, P., editors. Major Infectious Diseases. 3rd ed. Washington (DC): The International Bank for Reconstruction and Development. World Bank Publications. 2017, Chapter 1, 509 pp. ISBN: 978-1-4648-0524-0.
148. HUTCHINGS, M., TRUMAN, A., WILKINSON, B. Antibiotics: past, present and future. In: *Current Opinion in Microbiology.* 2019, vol. 51, pp. 72-80. ISSN 1369-5274. (IF: 7.934).
149. IDOMIR, M. Istorical terapiei antimicrobiene. In: *Jurnal Medical Braşovean – A XXXIX-a reuniune Naţională de Istoria Medicinii.* 2008, pp. 128-130. ISSN 2247-4706.
150. IMPEY, R., HAWKINS, D., SUTTON, J., SOARES, D. COSTA, T. Overcoming Intrinsic and Acquired Resistance Mechanisms Associated with the Cell Wall of Gram-Negative Bacteria. In: *Antibiotics.* 2020, nr. 9(9), pp. 623-642. ISSN 2079-6382. (IF: 4.639).
151. JAIN, A., VISWANATH, S. A study of diabetic foot patients in a tertiary care premier teaching hospital. In: *Int J Surg Sci.* 2019, 3(1), pp. 183-187. ISSN 2616-3462.
152. JAURIN, B., GRUNDSTRÖM, T. AmpC cephalosporinase of *Escherichia coli* K-12 has a different evolutionary origin from that of β -lactamases of the penicillinase type. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1981, nr. 78. pp. 4897–4901. ISSN: 0027-8424.
153. JENA, J., SUBUDHI, E. Microalgae: an untapped resource for natural antimicrobials. The role of microalgae in wastewater treatment. In: *Springer.* 2019, pp. 99-114.
154. JUNG, S., RYU, C., KIM, J. Bacterial persistence: Fundamentals and clinical importance. In: *J Microbiol.* 2019, nr. 57, pp. 829-835. ISSN 12258873.
155. JUNIE, M. *Microbiologie generală.* Cluj-Napoca: Editura Medicală Universitară "Iuliu Hațieganu". 2018, 306 p. ISBN 978-973-693-666-1.
156. KAPOOR, G., SAIGAL, S., ELONGAVAN, A. Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. In: *J Anaesthesiol Clin Pharmacol.* 2017, 33 (3), pp. 300-305.
157. KARKOS, P., LEONG, S., KARKOS, C., SIVAJI, N., Assimakopoulos, D. Spirulina in clinical practice: evidence-based human applications. In: *Evid Based Complement Alternat Med.* 2011, pp. 1-4.
158. KATZ, L., BALTZ, R. Natural product discovery: past, present, and future. In: *J Ind Microbiol Biotechnol.* 2016, vol. 43, pp. 155-176.
159. KAVITHA, P., RAMA CHARY, M., SINGAVARAPU, B., LAXMA REDDY, K. Synthesis, characterization, biological activity and DNA cleavage studies of tridentate Schiff bases and their Co(II) complexes. In: *Journal of Saudi Chemical Society.* 2016, vol. 20, pp. 69-80.
160. KHAFAGA, A., EL-SAYED, Y. Spirulina ameliorates methotrexate hepatotoxicity via antioxidant, immune stimulation, and proinflammatory cytokines and apoptotic proteins modulation. In: *Life Sci.* 2018, pp. 196:9-2017. doi: 10.1016/j.lfs.2018.01.010.

161. KHAN, Y., KHAN, M. M., FAROOQUI, M. R. Diabetic foot ulcers: a review of current management. In: *Int J Res Med Sci.* 2017, pp.4683-4689.
162. KRAGH, K., GIJÓN, D., MARURI, A., ANTONELLI, A., COPPI, M., KOLPEN, M., CRONE, S., TELLAPRAGADA, C., HASAN, B., RADMER, S., et al. Effective antimicrobial combination in vivo treatment predicted with microcalorimetry screening. In: *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 2021, 76(4), pp. 1001-1009. doi.org/10.1093/jac/dkaa543
163. KRAUSE, K., SERIO, A., KANE, T., CONNOLLY, L. Aminoglycosides: an overview. In: *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2016, vol. 6, nr. 6, pp.1-18.
164. 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.
165. KUOK, C., HOI, S., HOI, C., CHAN, C., FONG, I., NGOK, C., MENG, L., FONG, P. Synergistic antibacterial effects of herbal extracts and antibiotics on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: A computational and experimental study. In: *Exp Biol Med (Maywood).* 2017, 242(7), pp. 731-743. ISSN: 15353702.
166. LAARMAN, A., MILDNER, F., VAN STRIJP, J. et al. Complement inhibition by gram-positive pathogens: molecular mechanisms and therapeutic implications. In: *J Mol Med.* 2010, nr. 88, pp. 115-120. ISSN 09462716.
167. LACEY, K., GEOGHEGAN, J., MCLOUGHLIN, R. The Role of *Staphylococcus aureus* Virulence Factors in Skin Infection and Their Potential as Vaccine Antigens. In: *Pathogens.* 2016, 5(1), pp.22-39.
168. LERMINIAUX, N., CAMERON, A. Horizontal transfer of antibiotic resistance genes in clinical environments. In: *Can J Microbiol.* 2019, nr. 1, pp. 34-44. ISSN: 12258873.
169. LI, B., QIU, Y., SONG, Y., LIN, H., YIN, H. Dissecting horizontal and vertical gene transfer of antibiotic resistance plasmid in bacterial community using microfluidics. In: *Environ. Int.* 2019, pp. 131-140.
170. LI, P., CHEN, M., TANG, W. et al. Initiating polyketide biosynthesis by on-line methyl esterification. In: *Nat Commun.* 2021, nr. 12, pp. 4499-4521. doi.org/10.1038/s41467-021-24846-7.
171. 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.
172. LIU, P., CHOI, J., LEE, M., CHOI, Y.H., NAM, T. Spirulina protein promotes skin wound repair in a mouse model of full-thickness dermal excisional wound. In: *International Journal of Molecular Medicine.* 2020, nr. 46, pp. 351-359.
173. LIU, Y., TONG, Z., SHI, J., LI, R., UPTON, M., WANG, Z. Drug repurposing for next-generation combination therapies against multidrug-resistant bacteria. In: *Theranostics.* 2021, 11(10), pp. 4910-4928. ISSN1838-7640. (IF: 11.556).
174. LOZAN, V. *Studiul compușilor coordinativi macrociclici și cu contur deschis ai unor metale în baza 2,6- diformiltiofenolului: tz. de doct. hab. în chimie.* Chișinău, 2020. 307 p.
175. LOZAN-TÎRȘU, C. *Efecte antimicrobiene ale unor substanțe chimice din produse autohtone: tz. de doct. în medicină.* Chișinău, 2016. 167p.
176. LU, J., SHELDENKAR, A., LWIN, M. A decade of antimicrobial resistance research in social science fields: a scientometric review. In: *Antimicrob Resist Infect Control.* 2020, nr. 9, pp.178-191. ISSN 20472994 (IF: 1.456).
177. MA, B., FANG, C., LU, L., WANG, M., XUE, X., ZHOU, Y., LI, M., HU, Y., LUO, X., HOU, Z. The antimicrobial peptide thanatin disrupts the bacterial outer membrane and inactivates the NDM-1 metallo- β -lactamase. In: *Nat. Commun.* 2019, vol. 10, pp. 3517-3528.

178. MACARI, A., GUDUMAC, V., MACARI, V., PUTIN, V. Impactul remediului BioR asupra activității sistemului pro - antioxidant în ficat și mușchi la puii broiler. In: *Știința Agricolă*. 2015, nr. 2, pp. 115-121. ISSN 1857-0003.
179. MAGIORAKOS, AP., SRINIVASAN, A., CAREY, R. et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. In: *Clin Microbiol Infect*. 2012, 18(3), pp. 268–281.
180. MAHMOUDI, H., ZARE FAHIM, N., ALIKHANI, M., SHOKOOHIZADEH, L. Investigation of Antimicrobial Effect of Berberine on Ciprofloxacin and Imipenem Resistance Acinetobacter baumannii Isolated from Hamadan Hospitals. In: *Iran J Med Microbiol*. 2020, 14(1), pp. 44-45. ISSN 20083289.
181. MAIER, I., FILIMON, M. Spirulina platensis - natural components and biological importance. In: *Biostudent*. 2018, vol. 1, pp. 23-28.
182. MALONE, M., BJARNSHOLT, T., MCBAIN, A., JAMES, G., STOODLEY, P., LEAPER, D., et al. The prevalence of biofilms in chronic wounds: a systematic review and meta-analysis of published data. In: *Wound Care*. 2017, 26(1), pp. 20-25.
183. MANIGANDAN, M., KOLANJINATHAN, K. Antibacterial activity of various solvent extracts of Spirulina platensis against human pathogens. In: *Innovare Journal of Health Sciences*. 2017, vol. 5, nr. 1, pp. 10-12. ISSN: 2347-5536. (IF: 4.157).
184. MARK, A., BLASKOVICH, K., HANSFORD, M., BUTLER, Z., ALAN, M., MATTHEW, A. Developments in Glycopeptide Antibiotics. In: *ACS Infectious Diseases*. 2018, 4 (5), pp. 715-735. ISSN 2373-8227. (IF: 4.911).
185. 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).
186. MARTELLI, F., CIRLINI, M., LAZZI, C., NEVIANI, E., BERNINI, V. Edible Seaweeds and Spirulina Extracts for Food Application: *In Vitro* and *In Situ* Evaluation of Antimicrobial Activity towards Foodborne Pathogenic Bacteria. In: *Foods*. 2020, nr. 9, pp. 1442-1457.
187. MAST, Y., WOHLLEBEN, W. Streptogramins – Two are better than one. In: *International Journal of Medical Microbiology*. 2014, nr. 304, pp. 44-50.
188. MATHUR, D., PRAKASH, C., BHARGAVA, P., PALIWAL, V., MATHUR, K. Hereditary Sensory and Autonomic Neuropathy Presenting With Mutilating Trophic Ulcers. In: *Wounds*. 2018, 30(3), pp. 25-28. ISSN: 1742-481X (IF: 1.224).
189. MÉDÉRIC, D., WOLF-DIETRICH, H., Evolution of bacterial virulence. In: *FEMS Microbiology Reviews*. 2017, nr. 41(5), pp. 679-697. doi.org/10.1093/femsre/fux023.
190. MIAO, L., XU, J., YAO, Z., JIANG, Y., ZHOU, H., JIANG, W., DONG, K. The anti-quorum sensing activity and bioactive substance of a marine derived Streptomyces. In: *Biotechnol. Biotechnol. Equip*. 2017, nr. 31, pp. 1007-1015. ISSN 1314-3530.
191. MIHALCIUC, O. *Modificări imunobiochimice la acțiunea polizaharidelor sulfatate din spirulină în normă și patologie. tz. de doct. în medicină.* - Chișinău, 2017. 172 p.
192. MIHALCIUC, O., PROCOPIȘIN, L., RUDIC, V. Influența polizaharidelor sulfatate din Spirulina platensis asupra profilului citokinic sanguin în normă și astmul bronșic asociat. În: *Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științe Medicale*. 2016, 1(50), pp. 220-224. ISSN 1857-0011.
193. MIHALCIUC, O., SARDARI, V., PANTEA, V., ANDRONACHE, L., PROCOPIȘIN, L., TAGADIUC, O. Evaluarea indicilor stresului oxidativ și protecției antioxidante în măduva osoasă în hepatita toxică și la administrarea polizaharidelor sulfatate din spirulină. În: *Buletinul Academiei de Științe a Moldovei: Științe Medicale*. 2017, nr. 2 (54), pp. 91-97. ISSN 1857-0011.
194. MINISTERUL SĂNĂTĂȚII MINCII ȘI PROTECȚIEI SOCIALE AL REPUBLICII MOLDOVA. Săptămâna mondială de conștientizare a rezistenței la antimicrobiene, marcată

- în Republica Moldova. 2020, [citată 05.12.2020]. Disponibil: <https://msmps.gov.md/comunicare/buletin-informati.-2020>
195. MOLONEY, M. Natural products as a source for novel antibiotics. In: *Trends Pharmacol Sci.* 2016, 37(8), pp. 689-701.
 196. MORSI, S. Comparative evaluation of phenotypic and genotypic methods for detection of carbapenemases in clinically significant *Klebsiella pneumoniae* Isolates. In: *Egypt J Med Microbiol.* 2016, 38(87), pp. 1-8.
 197. MUHUHA, A., KANG'ETHE, S., KIRIRA, P. Antimicrobial Activity of Moringa oleifera, Aloe vera and Warbugia ugandensis on MultiDrug Resistant *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. In: *J Antimicrob Agents.* 2018, vol. 4, nr. 2, pp. 168-174. ISSN 2472-1212.
 198. MUNCK, C., SHETH, R., CUARESMA, E. et al. The effect of short-course antibiotics on the resistance profile of colonizing gut bacteria in the ICU: a prospective cohort study. In: *Crit Care.* 2020, nr. 24, pp. 404. doi.org/10.1186/s13054-020-03061-8.
 199. MUNITA, J., ARIAS, C. Mechanisms of antibiotic resistance. In: *Microbiol. Spectr.* – 2016, nr. 4, pp. 10-47. doi: 10.1128/microbiolspec.
 200. MUTLAK, O., ASLAM, M., STANDFIELD, N. Chronic venous insufficiency: a new concept to understand pathophysiology at the microvascular level - a pilot study. In: *Perfusion.* 2019, 34(1), pp. 84-89. doi: 10.1177/0267659118791682.
 201. NAG, F., CHATTERJEE, G., GHOSH, A., DE, A. Clinico-etiological evaluation of chronic leg ulcer in a tertiary care center of eastern India. In: *Indian J Dermatol.* 2020, nr. 65. pp. 495-499.
 202. NASCIMENTO, G., LOCATELLI, J., FREITAS, P., SILVA, G. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. In: *Brazilian Journal of Microbiology.* 2020, nr. 31, pp. 247-256. ISSN 1517-8382.
 203. NASIRIAN, F., DADKHAH, M., MORADI-KOR, N., OBEIDAVI, Z. Effects of *Spirulina platensis* microalgae on antioxidant and anti-inflammatory factors in diabetic rats. In: *Diabetes Metab Syndr Obes.* 2018, nr. 11, pp. 375-380. doi.org/10.2147/DMSO.S172104.
 204. 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.
 205. NDOZI, M., WRIGHT-HUGHES, A., BROWN, S., BACKHOUSE, M., LIPSKY, B.A., BHOGAL, M., REYNOLDS, C., VOWDEN, P., JUDE, E.B., NIXON, J., et al. Prognosis of the infected diabetic foot ulcer: A 12-month prospective observational study. In: *Diabet. Med.* 2018, nr. 35, pp. 78-88. doi: 10.1111/dme.13537.
 206. NERY, R., SKARE, T. Serum uric acid and leg ulcers. In: *An Bras Dermatol.* 2019, 94(3), pp. 369-370. doi: 10.1590/abd1806-4841.20198140.
 207. NHS. Improvement Pressure Ulcers: Revised Definition and Measurement. Summary and Recommendations. 2018, [citată 25.07.2020]. Disponibil: https://improvement.nhs.uk/documents/2932/NSTPP_summary_recommendations_2.pdf
 208. NIKKY, G., SYEDA WARISUL, F., SUMIT, K., RAJESHWARI, S., SUNIL, K. Antimicrobial resistance in biofilms: Exploring marine actinobacteria as a potential source of antibiotics and biofilm inhibitors. In: *Biotechnology Reports.* 2021, vol. 30, nr. 26, pp. 30-40.
 209. OH, Y., PARK, N. Isolation of an invertebrate-type lysozyme from the body wall of spoon worm, *Urechis unicinctus*. In: *Journal of Life Science.* 2018, 28(3), pp. 300-306.
 210. OKSUZ, E., MALHAN, S., SONMEZ, B., TEKIN, R. Cost of illness among patients with diabetic foot ulcer in Turkey. In: *World J Diabetes.* 2016, 7(18), pp. 462-469.
 211. OLTU, IU. *Acțiunea antifungică in vitro a remediilor de origine biologică și chimică asupra unor agenți cauzali ai micozelor. tz. de doct. în medicină.* Chișinău, 2016. 161p.
 212. OLTU, IU., CEPOI, L., RUDIC, V., RUDI, L., CHIRIAC, T., VALUTA, A., CODREANU, S. Current Research and New Perspectives in Antifungal Drug Development. In: (eds) *ADVANCES IN MICROBIOLOGY, INFECTIOUS DISEASES AND PUBLIC*

- HEALTH. (eds) Donelli G. In: *ADVANCES IN EXPERIMENTAL MEDICINE AND BIOLOGY*. Springer Cham. 2019, vol. 1282. doi.org/10.1007/5584_2019_453.
213. OTHMAN, L., SLEIMAN, A., ROULA A-M. Antimicrobial Activity of Polyphenols and Alkaloids in Middle Eastern Plants. In: *Frontiers in Microbiology*. 2019, vol. 10, pp. 1-28. ISSN 1664302X (IF:4.236).
214. OTTA, S., DEBATA, N., SWAIN, B. Bacteriological Profile of Diabetic Foot Ulcers. In: *CHRISMED J Health Res*. 2019, vol. 6, nr. 1, pp. 7-11. ISSN 2348-3334.
215. OUSEY, K., CHADWICK, P., JAWIEŃ, A., GULNAZ, T., et al. Identifying and treating foot ulcers in patients with diabetes: saving feet, legs and lives. In: *Journal of Wound Care*. 2018, 27(5), pp. 1-52. doi:10.12968/jowc.2018.27.
216. PAHONȚU, E., PROKS, M., SHOVA, S., LUPAȘCU, G., et al. Synthesis, characterization, molecular docking studies and *in vitro* screening of new metal complexes with Schiff base as antimicrobial and antiproliferative agents. In: *Appl. Organometal Chem*. 2019, vol. 33, nr. 11, pp. 1-17. ISSN:1099-0739. (IF: 3.140).
217. PAHONȚU, E., ILIEȘ, D-C., ȘOVA, S., OPREAN, C. et. al. Synthesis, Characterization, Antimicrobial and antiproliferative Activity Evaluation of Cu(II), Co(II), Zn(II), Ni(II) and Pt(II) Complexes with Isoniazid Derived Compound. In: *Molecules*. 2017, 22(4), pp. 650-667. ISSN 1420-3049 (IF: 3.098).
218. PAHONȚU, E., FALA, V., GULEA, A., POIRIER, D. et al. Synthesis and Characterization of Some New Cu(II), Ni(II) and Zn(II) Complexes with Salicylidene Tiosemicarbazones: Antibacterial, Antifungal and *In Vitro* Antileukemia Activity. In: *Molecules*. 2013, vol. 18, nr. 8, pp. 8812-8836. ISSN: 1420-3049. (IF: 2.095).
219. PAHONȚU, E., JULEA, F., CHUMAKOV, Y., PETRENCO, P., ROȘU, T., GULEA, A. Synthesis, characterization, crystal structure and antiproliferative activity studies of Cu (II), Ni (II) and Co (II) complexes with 4-benzoyl-5-pyrazolones derived compounds. In: *Journal of Organometallic Chemistry*. 2017, nr. 836, pp. 44-45. ISSN: 1582-4934 (IF: 4.938).
220. PAHONTU, E., SOCEA, L., BARBUCEANU, S., ILIES, D., BADEA, M., OLARU, O., GULEA, A., SOCEA, B., BRATU, O. Synthesis, characterization and toxicity evaluation of Cu (II), Mn (II), Co (II), Ni (II), Pd (II) complexes with ligand derived from hydrazinecarbothioamide. In: *Revista de chimie*. 2018, 69(11), pp. 2959-2963. ISSN: 0034-7752 (IF: 1.223).
221. PAHWA, S, SHARMA, R, SINGH, B. Role of glutathione S-transferase in coronary artery disease patients with and without type 2 diabetes mellitus. In: *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. 2017, vol. 11, nr. 1, pp. 5-8. ISSN 0973-709X (IF: 0.352).
222. PALAKURI, K., LAXMA, R. Synthesis, Structural Characterization, and Biological Activity Studies of Ni(II) and Zn(II) Complexes. Hindawi Publishing Corporation. In: *Bioinorganic Chemistry and Applications*. 2014, vol. 2014, pp. 1-13. doi.org/10.1155/2014/568741.
223. PETERSON, E., KAUR, P. Antibiotic Resistance Mechanisms in Bacteria: Relationships Between Resistance Determinants of Antibiotic Producers, Environmental Bacteria, and Clinical Pathogens. In: *Frontiers in Microbiology*. 2018, vol. 9, pp. 2928-2949. ISSN1664-302X. (IF:4.259).
224. PHAM, T., ZIORA, Z., BLASKOVICH, M. Quinolone antibiotics. In: *Medchemcomm*. 2019, 10(10), pp. 1719-1739. doi: 10.1039/c9md00120d.
225. PHAM, T., LEE, J. Anti-Inflammatory Effect of *Spirulina platensis* in Macrophages Is Beneficial for Adipocyte Differentiation and Maturation by Inhibiting Nuclear Factor- κ B Pathway in 3T3-L1 Adipocytes. In: *J Med Food*. 2016, 19(6), pp. 535-542. doi: 10.1089/jmf.2015.0156
226. PHAM, T., PARK, Y., LEE, J. Anti-Inflammatory Effects of *Spirulina platensis* Extract via the Modulation of Histone Deacetylases. In: *Nutrients*. 2016, 8(6), pp. 381. doi: 10.3390/nu8060381.

227. PHILIPPON, A., JACQUIER, H., RUPPÉ, E., LABIA, R. Structure-based classification of class A beta-lactamases, an update. In: *Current Research in Translational Medicine*. 2019, 67(4), pp. 115-122. ISSN 2452-3186.
228. PHITAKTIM, S., CHOMNAWANG, M., SIRICHAIWETCHAKOON, K., DUNKHUNTHOD, B., HOBBS, G., EUMKEB, G. Synergism and the mechanism of action of the combination of a-mangostin isolated from *Garcinia mangostana* L. and oxacillin against an oxacillin-resistant *Staphylococcus saprophyticus*. In: *BMC Microbiol.* 2016, nr. 16, pp. 195. ISSN 1471-2180.
229. PIKALUK, V., HRYVENKO, S., IZOSIMOV, V., UMEROV, E. Diagnosis and prognosis of the healing process of trophic ulcers in chronic venous insufficiency of the lower limbs. In: *Bulletin of problems biology and medicine*. 2019, 1(148), pp. 291-295. doi:10.29254/2077-4214-2019-1-1-148-291-295.
230. PILLAI, S., MOELLERING, R., ELIOPOULOS, G. *Antimicrobial Combinations*. In: Lorian, V., Ed., *ANTIBIOTICS IN LABORATORY MEDICINE*, 5th Edition, the Lippincott Williams & Wilkins Co., Philadelphia. 2005, pp. 365-440.
231. PINET, E., FRANCESCHI, C., COLLIN, V., DAVIN-REGLI, A., ZAMBARDI, G., PAGÈS, J. A simple phenotypic test for detecting the contribution of outer membrane permeability to carbapenem resistance. In: *J Med Microbiol.* 2020, nr. 69, pp. 63-71.
232. 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.
233. PODOLSKY, S. The evolving response to antibiotic resistance (1945–2018). *Palgrave Commun.* 2018, nr. 4, pp. 214-132.
234. POIREL, L., NORDMANN, P., RAPIDEC CARBA, NP. Test for Rapid Detection of Carbapenemase Producers. In: *J Clin Microbiol.* 2015, 53(9), pp. 3003-3008.
235. POPA, A. *Biochimie medicală*. - Craiova, România : Editura Sitech. 2019, pp. 216-219. ISBN:9786061166725.
236. POPA, R., CAZAN, I., BAROI, G., CAZAN, S., LEFTER, G., STROBESCU, C. Venous ulcer-a new therapeutic approach. In: *Rev Med Chir Soc Med Nat.* 2016, vol. 120, nr. 2, pp. 306-316.
237. POUGET, C., DUNYACH-REMY, C., PANTEL, A., SCHULDINER, S., SOTTO, A., LAVIGNE, J. Biofilms in Diabetic Foot Ulcers: Significance and Clinical Relevance. In: *Microorganisms*. 2020, 8(10), pp. 1580. doi: 10.3390/microorganisms8101580.
238. PREDĂ, M., MIHAI, M., POPA, L., DIȚU, L.-M., HOLBAN, A., MANOLESCU, L., et al. Phenotypic and genotypic virulence features of staphylococcal strains isolated from difficult-to-treat skin and soft tissue infections. In: *PLoS ONE*. 2021, 16(2), pp. 1-17. ISSN 1932-6203. (IF:3.240).
239. PRISACARI, V., ANDRONACHI, N. Studiu epidemiologic privind infecțiile nosocomiale cu *Acinetobacter*. În: *One Health & Risk Management*. 2021, vol.2, nr. 2, pp. 36-41. ISSN 2887-3458.
240. PRISACARI, V., BERDEU, I., SPATARU, D., NASTAS, A. Rezultatele studiului de evaluare a antibioticorezistenței microbiene în condițiile Republicii Moldova. În: *Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științe Medicale*. 2016, 2(51), pp. 53-68. ISSN 1857-0011.
241. PRISACARI, V., BUGA, D., BERDEU, I. Aspecte epidemiologice în ulcerul trofic cu *Staphylococcus* metilino-rezistent. În: *One Health & Risk Management*. 2021, vol.2, nr. 2, pp. 51-57. ISSN 2887-3458.
242. 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.
243. PURI, V., VENKATESHWARAN, N., NISHANT KHARE, N. Trophic ulcers-Practical management guidelines. In: *Indian J Plast Surg.* 2012, nr. 45, pp. 340-351. doi: 10.4103/0970-0358.101317.
244. RAFFETTO, J. Pathophysiology of Chronic Venous Disease and Venous Ulcers. In: *Surg Clin North Am.* 2018, 98(2), pp. 337-347. doi: 10.1016/j.suc.2017.11.002.

245. RAHIM, K., QASIM, M., RAHMAN, H., KHAN, T. A., AHMAD, I., KHAN, N., et al. Antimicrobial resistance among aerobic biofilm producing bacteria isolated from chronic wounds in the tertiary care hospitals of Peshawar. In: *Pakistan J Wound Care*. 2016, nr. 25, pp. 480-485. ISSN: 0969-0700. (IF:1.446).
246. RAHMAN, G., ADIGUN, I., FADEYI, A. Epidemiology, etiology, and treatment of chronic leg ulcer: experience with sixty patients. *Annals of African Medicine*. 2010, vol. 9, nr. 1, pp. 1-4. doi: 10.4103/1596-3519.62615. PMID: 20418641.
247. 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.
248. 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.
249. RAKESH, S., RAJESH K., ASHWANI K., JAGSIR, M. Diabetic Foot Disease—Incidence and Risk Factors: A Clinical Study. In: *The Journal of Foot and Ankle Surgery (Asia-Pacific)*. 2016, 3(1), pp. 41-46.
250. RAMMELKAMP, C., MAXON, T. Resistance of *Staphylococcus aureus* to the action of penicillin. In: *Exp Biol Med*. 1942, nr. 51, pp. 386-389.
251. RAMOTOWSKA, S., WYSOCKA, M., BRZESKI, J., CHYLEWSKA, A., MAKOWSKI, M. A comprehensive approach to the analysis of antibiotic-metalcomplexes. In: *Trends in Analytical Chemistry*. 2020, vol. 123, pp. 115771-115780. (IF: 12.296). doi.org/10.1016/j.trac.2019.115771.
252. RĂMPUNTEAN, S., MARIAN, I-C., RĂMPUNTEAN, GH. Efectul unor extracte apoase obținute din plante asupra diferitelor microorganisme. In: *Rom J Vet Med Pharm*. 2020, vol. 22, nr.22, pp. 70-77.
253. RANDHAWA, H., HUNDAL, K., AHIRRAO, P., JACHAK, S., NANDANWAR, H. Efflux pump inhibitory activity of flavonoids isolated from *Alpinia calcarata* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. In: *Biologia*. 2016, 71(5), pp. 484-493.
254. REBELO, J., DOMINGUES, C., MONTEIRO, F., NOGUEIRA, T., DIONISIO, F. Bacterial persistence is essential for susceptible cell survival in indirect resistance, mainly for lower cell densities. In: *PLoS ONE*. 2021, vol. 16, nr. 9, pp. 1-23. doi.org/10.1371/journal.pone.0246500.
255. Regulamentul (UE) 2019/1390 al Comisiei din 31 iulie 2019 de modificare, în scopul adaptării la progresul tehnic, a anexei la Regulamentul (CE) nr. 440/2008 de stabilire a metodelor de testare în temeiul Regulamentului (CE) nr. 1907/2006 al Parlamentului European și al Consiliului privind înregistrarea, evaluarea, autorizarea și restricționarea substanțelor chimice (REACH). [accesat 12.06.2020] Disponibil: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ro/TXT/?uri=CELEX:32019R1390>
256. REITER, J., LEVINA, N., VAN DER LINDEN, M., GRUHLKE, M., MARTIN, C., SLUSARENKO, A. Diallylthiosulfinate (Allicin), a Volatile Antimicrobial from Garlic (*Allium sativum*), Kills Human Lung Pathogenic Bacteria, Including MDR Strains, as a Vapor. In: *Molecules*. 2017, nr. 22(10), pp. 1711-1725.
257. REYGAERT, W. An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. In: *AIMS Microbiol*. 2018, 4(3), pp. 482-501. doi:10.3934/microbiol.2018.3.482.
258. 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.
259. RICHMOND, M. SYKES, R. The β -lactamases of Gram-negative bacteria and their possible physiological role. In: *Adv Microb Physiol*. 1973, nr. 9, p. 31–88.
260. RIWONG, S., TEETHAISONG, Y., THUMANU, K., DUNKHUNTHOD, B., EUMKEB, G. The synergy and mode of action of quercetin plus amoxicillin against amoxicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis*. In: *BMC Pharmacol Toxicol*. 2016, 17(1), pp. 39-51.

261. ROJAS, V., RIVAS, L., CÁRDENAS, C., GUZMÁN, F. Cyanobacteria and Eukaryotic Microalgae as Emerging Sources of Antibacterial Peptides. In: *Molecules*. 2020, nr. 25, pp. 5804-5831. doi:10.3390/molecules25245804.
262. ROME, K., ERIKSON, K., OTENE, C., SAHID, H., SANGSTER, K., GOW, P. Clinical characteristics of foot ulceration in people with chronic gout. In: *Int Wound J*. 2016, nr. 13, pp. 209-215. doi: 10.1111/iwj.12262.
263. ROSSITER, S., FLETCHER, M., WUEST, M. Natural products as platforms to overcome antibiotic resistance. In: *Chem Rev*. 2017, 117(19), pp. 12415–12474.
264. ROUHI, S., RAMAZANZADEH, R., MOHAMMADI, S., ABODOLLAHI, A. , SHAKIB, P., MOHAMMADI, B., AHMADI, A. Antibacterial effects of Artemisa aucheri leaf and Spirulina Blue-Green algae aqueous and alcoholic extracts on the multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolated from the patients with pneumonia. In: *Scientific Journal of Kurdistan University of Medical Sciences*. 2020, 25(4), pp. 124-139.
265. RUDIC, V., BĂLAN, G., COJOCARI, D. et al. Antibacterial and antifungal properties of algae product BioR. In: *International Scientific Conference on Microbial Biotechnology (3rd edition)*. Chişinău, 2016, pp. 81. ISBN 978-9975-3129-3-6.
266. RUSNAC, R., BÎRCĂ, M., ŞOVA, S., COTOVAIA, A., BALAN, G., et al. Sinteza și proprietățile antibacteriene și antifungice ale compușilor coordinativi ai Fe(III) Cu 4-ciclohexiltiosemicarbazona 4-benzoil-3-metil-1-fenil-2-pirazolin-5-onă. În: *Studia Universitatis Moldaviae. Seria "Științe Reale și ale Naturii"*. Chişinău, 2020, 1(131), pp. 32-37. ISSN 1814-3237.
267. 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.
268. SAHA, S PATRA AC, GOWDA SP, MONDAL N, RAHAMAN S, AHMED SK, DEBBARMA S, VITTHAL KP, SARKAR S, SIL A, DAS NK. Effectiveness and safety of autologous platelet-rich plasma therapy with total contact casting versus total contact casting alone in treatment of trophic ulcer in leprosy: An observer-blind, randomized controlled trial In: *Indian J Dermatol Venerol Leprol*. 2020, nr. 86, pp. 262-271.
269. SAQUIB, S., ALQAHTANI, N., AHMAD, I., KADER, M., AL SHAHRANI, S., ASIRI, E. Evaluation and Comparison of Antibacterial Efficacy of Herbal Extracts in Combination with Antibiotics on Periodontal pathobionts: An in vitro Microbiological Study. In: *Antibiotics (Basel)*. 2019, 8(3), pp. 89-101. doi: 10.3390/antibiotics8030089.
270. 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.
271. SAVIN, M., ALEXANDER, J., BIERBAUM, G. et al. Antibiotic-resistant bacteria, antibiotic resistance genes, and antibiotic residues in wastewater from a poultry slaughterhouse after conventional and advanced treatments. In: *Sci Rep*. 2021, nr. 11, pp. 16622-16633. doi.org/10.1038/s41598-021-96169-y.
272. SAWA, T., KOOGUCHI, K., MORIYAMA, K. Molecular diversity of extended-spectrum β -lactamases and carbapenemases, and antimicrobial resistance. In: *J Intensive Care*. 2020, nr. 8, pp. 13. ISSN: 2052-0492 (IF:3.103).
273. SAWAI, T., MITSUHASHI, S., YAMAGISHI, S. Drug resistance of enteric bacteria. XIV. Comparison of β -lactamases in gram-negative rod bacteria resistant to aminobenzylpenicillin. In: *Jpn J Microbiol*. 1968, nr. 12, pp. 423–434.
274. SELIVESTROV, E.I., AVAKYANTS, I.P., NIKISHKOV, A.S., & ZOLOTUKHIN, I. A. Epidemiology of Chronic Venous Disease. In: *Journal of Venous Disorders (Flebologia)*. 2016, nr. 1, pp. 35-40.
275. 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.

276. 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).
277. SHAKYA, A. Medicinal plants: Future source of new drugs. In: *Int J Herb Med*. 2016, 4(4), pp. 59-64.
278. SHANAB, N.M., NEGM, S.M. et al. Evaluation of antimicrobial activity of some plant extracts against antibiotic susceptible and resistant bacterial strains causing wound infection. In: *Bull Natl Res Cent*. 2019, nr. 43, pp. 144-150.
279. SHARMA, A., DHASMANA, N., DUBEY, N., KUMAR, N., GANGWAL, A., GUPTA, M., SINGH, Y. Bacterial Virulence Factors: Secreted for Survival. In: *Indian J Microbiol*. 2017, 57(1), pp. 1-10. ISSN: 12258873.
280. SHEARD, D., O'BRIEN-SIMPSON, N., WADE, J., SEPAROVIC, F. Combating bacterial resistance by combination of antibiotics with antimicrobial peptides. In: *Pure and Applied Chemistry*. 2019, 91(2), pp. 199-209.
281. SHENG, L., WANG, J., HUANG, M., XU, Q., MA, M. The changes of secondary structures and properties of lysozyme along with the egg storage. In: *International Journal of Biological Macromolecules*. 2016, nr. 92, pp. 600-606.
282. SHETTIGAR, K., MURALI, T. Virulence factors and clonal diversity of *Staphylococcus aureus* in colonization and wound infection with emphasis on diabetic foot infection. In: *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2020, nr. 39, pp 235-246. ISSN: 0934-9723 (IF:3.267).
283. 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.
284. SILLANKORV, S. , PEREIRA, M., HENRIQUES, M. *Antibiotic Alternatives and Combinational Therapies for Bacterial Infections*. In: *Front Microbiol*. 2019, vol. 9, pp. 3359-3361.
285. SILVA, D., COSTA, P., RIBON, A., PURGATO, G., DIAZ, G., DIAZ M. Plant Extracts Display Synergism with Different Classes of Antibiotics. *An Acad Bras Cienc*. In: *An Acad Bras Cienc*. 2019, pp. 1-8.
286. SINGH, R., DUBEY, A.K. Isolation and Characterization of a New Endophytic Actinobacterium *Streptomyces californicus* Strain ADR1 as a Promising Source of Anti-Bacterial, Anti-Biofilm and Antioxidant Metabolites. In: *Microorganisms*. 2020, 8(6), pp. 929.
287. SÎRBU, A. *Sinteza, structura și proprietățile compușilor coordinativi ai cuprului(II) cu unele tiosemicarbazone solubile în apă*. tz. de doc. în chimie. Chișinău, 2020. 166 p.
288. 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.
289. SPĂTARU, D., PRISACARI, V. Antibioticorezistența microbiană în infecțiile septico-purulente nosocomiale de profil ortopedie și traumatologie: studiu epidemiologic, descriptiv, transversal. *Moldovan Journal of Health Sciences*. 2017, 11 (1), pp. 44-57. ISSN 2345-1467.
290. SPICHLER, A., HURWITZ, B., ARMSTRONG, D., LIPSKY, B. Microbiology of diabetic foot infections: from Louis Pasteur to 'crime scene investigation'. In: *BMC Med*. 2015, nr. 13, pp. 2-15.
291. SPÍŽEK, J., ŘEZANKA, T. Lincosamides: Chemical structure, biosynthesis, mechanism of action, resistance, and applications. In: *Biochemical Pharmacology*. 2017, vol. 133, pp. 20-28. doi.org/10.1016/j.bcp.2016.12.001.
292. SRIDEVI, D., SHANKAR, C., PRAKASH, P., PARK, J., THAMARAISELVI, K. Inhibitory effects of reserpine against efflux pump activity of antibiotic resistance bacteria. In: *Chem Biol Lett*. 2017, 4(2), pp. 69-72.
293. SUDHIR, K., SUBBA, T. An Improved Crystal Violet Assay for Biofilm Quantification in 96-Well Microtitre Plate. In: *BioRxiv*. 2017, pp. 1-10. ISSN 2692-8205.

294. SULTAN, I., RAHMAN, S., JAN, A., SIDDIQUI, M., MONDAL, A., HAQ, Q. Antibiotics, Resistome and Resistance Mechanisms: A Bacterial Perspective. In: *Front Microbiol.* 2018, nr. 9, pp. 2066-2082. ISSN 1664302X (IF: 4.259).
295. SURYAWATI, N., PRAHARSINI, I., JULIYANTI, J. Management Non-healing Trophic Ulcer in a Leprosy Patient with Combination of Injection and Topical Platelet Rich Plasma. In: *J Skin Stem Cell.* 2019, 6(3), pp. 1460-1463. ISSN: 2423-7086.
296. SWENEY, M., LUBBERS, B., SCHWARZ, S., WATTS, J. Applying definitions for multidrug resistance, extensive drug resistance and pandrug resistance to clinically significant livestock and companion animal bacterial pathogens. In: *J. Antimicrob. Chemother.* 2018, nr. 73, pp. 1460-1463. ISSN 0305-7453 (IF: 5.113).
297. Tackling Drug-Resistant Infections Globally: Final Report and Recommendations Review on Antimicrobial Resistance. 2016, 84 p. [citat 15.07.21]. Disponibil la: 160518_Final paper_with cover.pdf.
298. TAGADIUC, O., ANDRONACHE, L., ȘTÎRBA O., SARDARI, V., PANTEA, V. Determinarea glutation peroxidazei. *Certificat de inovator nr. 5161* din 26.10.2012.
299. TAGADIUC, O., GUDUMAC, V., PANTEA, V. Procedeu de dozare a activității superoxidismutazei. *Certificat de inovator nr.4891* din 15.07.2010.
300. TAGADIUC, O., SARDARI, V., ANDRONACHE, L., ȘTÎRBA, O., PANTEA, V. Determinarea glutation-Stransferazei (GST). *Certificat de inovator nr.5163* din 29.10.2012.
301. TAM, K., TORRES, V. *Staphylococcus aureus* Secreted Toxins and Extracellular Enzymes. In: *Microbiol Spectr.* 2019, 7(2), pp. 10-69. ISSN 21650497 (IF: 5.01).
302. TATE, S., PRICE, A., HARDING, K. Dressings for venous leg ulcers. In: *BMJ.* 2018, pp. 361-371. ISSN 1756-1833 (IF: 27.604).
303. THAKUR, A., MIKKELSEN, H., JUNGENSEN, G. Intracellular Pathogens: Host Immunity and Microbial Persistence Strategies. In: *J Immunol Res.* 2019, pp. 1356540-1356565. ISSN: 23147156.
304. THUALFAKAR, H., RAAD, A. Mechanisms of Antibiotics Resistance in Bacteria. In: *Systematic Reviews in Pharmacy.* 2020, 11(6), pp. 817-823.
305. TIMOȘCO, M., VALICA, V. Explorarea etapelor tehnologice de producere a unor preparate microbiene biocomplexe. *Biotehnologii avansate – realizări și perspective. Ediția III-a*, 2013. pp. 70-71.
306. TRAN, B. Assessment and management of peripheral arterial disease: what every cardiologist should know. In: *Heart Published Online First.* 2021, pp. 1-9. ISSN 1355-6037. (IF: 5.994).
307. 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).
308. TSIKAS, D. Assessment of lipid peroxidation by measuring malondialdehyde (MDA) and relatives in biological samples. In: *Analytical and biological challenges.* 2017, nr. 524, pp. 13-30.
309. TYERS, M., WRIGHT, G. Drug combinations: a strategy to extend the life of antibiotics in the 21st century. In: *Nat Rev Microbiol.* 2019, nr. 17, pp. 141-155. ISSN 1740-1526 (IF: 34.209).
310. UK. *Standards for Microbiology Investigations. Investigation of swabs from skin and superficial soft tissue infections.* 2018, nr. 6.5, 37 p.
311. ULLAH, H., ALI, S. Classification of Anti-Bacterial Agents and Their Functions, Antibacterial Agents. *Ranjith N. Kumavath, IntechOpen.* 2017 [citat 21.05.21]. Disponibil: <https://www.intechopen.com/chapters/55303>.
312. USATAIA, I., GRAUR, V.; TSAPKOV, V.; GULEA, A. Synthesis, characterization and biological activity of cooper(II), nickel(II), cobalt(III) and iron(III) coordination compounds with 2-hydroxy3-methoxybenzaldehyde N(4)-allyl-S-methyliso-thiosemicarbazone. În:

- Studia Universitatis Moldaviae Seria "Științe reale și ale naturii"*. 2018, nr. 6(11), pp. 89-96. ISSN 1814-3237.
313. VAN BOECKEL, T., PIRES, J., SILVESTER, R., et al. Global trends in antimicrobial resistance in animals in low- and middle-income countries. In: *Science*. 2019, 365(6459), pp. 1251-1258. ISSN 0036-8075 (IF: 41.845).
 314. VAN DER, PLAS M., BHONGIR, R., KJELLSTRÖM, S. et al. Pseudomonas aeruginosa elastase cleaves a C-terminal peptide from human thrombin that inhibits host inflammatory responses. In: *Nat Commun*. 2016, 7 (11567), pp. 1-13. ISSN 2041-1723. (IF: 12.124).
 315. VARELA, M., KUMAR, S. Strategies for Discovery of New Molecular Targets for Anti-Infective Drugs. In: *Curr. Opin. Pharm.* 2019, nr. 48, pp. 57-68.
 316. VAZ, B., MOREIRA, J., MORAIS, M., COSTA, J. Microalgae as a new source of bioactive compounds in food supplements. In: *Current Opinion in Food Science*. 2016, vol. 7, pp. 73-77. ISSN 2214-8000.
 317. VÁZQUEZ-LÓPEZ, R., SOLANO-GÁLVEZ, S., JUÁREZ VIGNON-WHALEY, J., et al. Acinetobacter baumannii Resistance: A Real Challenge for Clinicians. In: *Antibiotics (Basel)*. 2020, 9(4), pp. 205.
 318. VINUESA, V., MCCONNELL, MJ. Recent Advances in Iron Chelation and Gallium-Based Therapies for Antibiotic Resistant Bacterial Infections. In: *Int J Mol Sci*. 2021, nr. 22(6). pp. 2876.
 319. VISHWAKARMA, N., REHMANI, B., AGARWAL, A., RAY, J. Reamputation rates, morbidity and rehabilitation after lower limb amputations. In: *Int Surg J*. 2019, nr. 6, pp. 1274-1279. doi: 10.18203/2349-2902.isj20191262.
 320. VOLOSHYN, O., SUZDALENKO, O. Early Versus Deferred Endovenous Superficial Venous Treatment in Patients with Varicose Trophic Ulcers. In: *European Journal of Vascular & Endovascular Surgery*. 2019, 58(6), pp. 3-25. ISSN: 15322165 (IF: 5.328).
 321. WAKSMAN, S., SCHATZ, A., REYNOLDS, D. Production of antibiotic substances by actinomycetes. In: *Ann N Y Acad Sci*. 1213, pp. 112-124.
 322. WATAHIKI, M., KAWAHARA, R., SUZUKI, M., AOKI, M., UCHIDA, K., MATSUMOTO, Y., et al. Single-tube multiplex polymerase chain reaction for the detection of genes encoding Enterobacteriaceae carbapenemase. In: *Jpn J Infect Dis*. 2019, nr. 2, pp. 166-172. ISSN : 1344-6304. (IF: 1.24). doi.org/10.7883/yoken.JJID.2019.041.
 323. WATANABE, T, FUKASAWA, T. Episome-mediated transfer of drug resistance in Enterobacteriaceae. In: *J Bacteriol*. 1960, nr. 81, pp. 669-678.
 324. WEAVING, L. The effect of diabetes on the skin before and after ulceration. In: *The Diabetic Foot Journal*. 2016, nr. 19, pp. 142-148.
 325. 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>.
 326. WHO. Antibiotic Resistance [online]. 2020. [citat 09.06.21].Disponibil: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance>.
 327. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Food and Agricultural Organization of the United Nations, World Organisation for Animal Health. In: *Monitoring global progress on addressing antimicrobial resistance: analysis report of the second round of results of AMR country self-assessment survey*. Geneva, Swintzerland. 2018, 59p. ISBN 9789241514422.
 328. WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). *Global Priority List of Antibiotic-Resistant Bacteria to Guide Research, Discovery, and Development of New Antibiotics*. - Geneva, Switzerland [online]. 2017. [citat 09.06.21]. Disponibil: https://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short_Summary_25Feb-ET_NM_WHO.pdf
 329. WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). *National policy on traditional medicine and regulation of herbal medicines: Report of a WHO global survey*. World Health

- Organization, Geneva, Switzerland. 2005 [citat 09.06.21]. Disponibil: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/43229>.
330. 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>.
331. WOLCOTT, R., HANSON, J., REES, E., KOENIG, L., PHILLIPS, C., WOLCOTT, R., et al. Analysis of the chronic wound microbiota of 2,963 patients by 16S rDNA pyrosequencing. In: *Wound Repair Regen.* – 2016. - 24. – pp. 163-174.
332. WOLLINA, U., VOICU, C., GIANFALDONI, S., LOTTI, T., FRANÇA, K., TCHERNEV, G. Arthrospira Platensis - Potential in Dermatology and Beyond. In: *Maced J Med Sci.* - 2018. - Jan 10;6(1). - pp. 176-180.
333. WU, D., DING, Y., YAO, K., GAO, W., WANG, Y. Antimicrobial Resistance Analysis of Clinical Escherichia coli Isolates in Neonatal Ward. In: *Frontiers in Pediatrics.* 2021, vol. 9, pp. 471-478.
334. WU, Q., LIU, L., MIRON, A., KLÍMOVÁ, B., WAN, D., KUČA, K. The antioxidant, immunomodulatory, and anti-inflammatory activities of Spirulina: an overview. In: *Arch Toxicol.* 2016, vol. 90, nr. 8, pp. 1817-1840. ISSN: 0340-5761. (IF:5.901).
335. WU X., LIU, Z., LIU, Y., YANG, Y., SHI, F., CHEONG, K., TENG, B. Immunostimulatory Effects of Polysaccharides from Spirulina platensis In Vivo and Vitro and Their Activation Mechanism on RAW246.7 Macrophages. In: *Mar Drugs.* 2020, vol. 18, nr. 11, pp. 538-556. ISSN 1660-3397. (IF: 4.073).
336. YANG, Q., LAROSE, C, DELLA PORTA, A., SCHULTZ, G., GIBSON, D. A surfactant-based wound dressing ca reduce bacterial biofilms in a porcine skin explant model. In: *Int Wound J.* 2017, pp. 408-413. ISSN: 17424801 (IF: 2.743).
337. YORK, J., VARADARAJAN, M., BARLOW, G. When are combinations of antibiotics clinically useful? In: *British Journal of Hospital Medicine.* 2020, vol. 81, nr. 2, pp. 1-9. ISSN: 1750-8460.
338. ZARICIUC, E. Activitatea antimicrobiană in vitro a unor compuși autohtoni noi. In: *Buletinul AȘM. Științele vieții.* 2017, nr. 2(332), pp. 146-153. ISSN: 1857–064X.
339. 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.
340. ZHANG, W., HU, E., WANG, Y., MIAO, S., LIU, Y., HU, Y., LIU, J., XU, B., CHEN, D., SHEN, Y. Emerging Antibacterial Strategies with Application of Targeting Drug Delivery System and Combined Treatment. In: *Int J Nanomedicine.* 2021, nr. 1, pp. 6141-6156. ISSN: 11782013 (IF: 6.400).
341. 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).
342. ZHONG, H., WU, M., FENG, W., HUANG, S., YANG, P. Accuracy and applicability of different phenotypic methods for carbapenemase detection in Enterobacteriaceae: a systematic review and meta-analysis. In: *J Glob Antimicrob Resist.* 2019, vol. 52(1), pp.18-27. ISSN: 22137173 (IF: 2.706).
343. ZHOU, M., WANG, D., KUDINHA, T., et al. A comparative evaluation of four phenotypic methods for detection of class A and B carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in China. In: *J Clin Microbiol.* 2018, vol. 56, nr. 8, pp. 18-29. ISSN 0095-1137 (IF: 4.959).
344. БУХАРИН, О.В., БРУДАСТОВ, Ю.А., ДЕРЯБИН, Д. Г., ЧЕРНОВА, О. Л. Способ определения антикомплементарной активности микроорганизмов. *Патент* - RU 2010860 C1. 1994.

345. ВЛАСОВА, С.Н., ШАБУНИНА, Е.И., ПЕРЕСЛЕГИНА, И.А. Активность глутатионзависимых ферментов эритроцитов при хронических заболеваниях печени у детей. В: *Лаб. дело*. 1990, № 8, с. 19-22. ISSN 0023-6748.
346. ДУБИНИНА, Е.Е., САЛЬНИКОВА, Л.А., ЕФИМОВА, Л.Ф. Активность и изоферментный спектр супероксиддисмутазы эритроцитов и плазмы крови. В: *Лаб. дело*. 1983, №10, с. 30-33. ISSN 0023-6748.
347. КОСТЮК, В.А., ПОТАПОВИЧ, А.И., ЛУНЕЦ, Е.Ф. Спектрофотометрическое определение диеновых конъюгатов. В: *Вопр. мед. химии*. 1984, №4, с. 125-127. ISSN 2310-6905.
348. ЛАБИНСКАЯ, А.С., ЕЩИНА А.С., БЛИНКОВА Л.П., *Общая и санитарная микробиология с техникой микробиологических исследований*. Москва: Медицина, 2021, 588 с. ISBN: 978-5-8114-7723-4.
349. 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.
350. РЫЖИКОВА, С.Л. ДРУЖИНИНА, Ю.Г., РЯБИЧЕВА, Т.Г., ВАРАКСИН, Н.А. Стандартизация методики определения продукции цитокинов клетками крови *ex vivo*. В: *Клин.лабор.д-ка*. 2011, №11, с. 49-53.

ANEXE

Anexa 1. Profilurile de sensibilitate/rezistență la antimicrobiene a tulpinilor de Enterobacteriaceae izolate din ulcere trofice

Preparatul antimicrobian	<i>E. coli</i> n=53		<i>K. pneumoniae</i> n=84		<i>Proteus spp.</i> n=54		Alte enterobacterii n=15	
	Sensibil	Rezistent	Sensibil	Rezistent	Sensibil	Rezistent	Sensibil	Rezistent
	%±ES Î 95%	%±ES Î 95%	%±ES Î 95%	%±ES Î 95%	%±ES Î 95%	%±ES Î 95%	%±ES Î 95%	%±ES Î 95%
<i>Aminopeniciline</i>								
Ampicilină	13,2±1,36	86,8±3,50	0±0,00	100±2,37	9,3±1,12	90,7±3,51	13,3±4,84	86,8±12,36
<i>Peniciline cu IBL</i>								
Amoxiclav	15,1±1,46	84,9±3,46	0±0,00	100±2,37	20,4±1,66	79,6±3,29	20,0±5,93	80,0±11,87
<i>Cefalosporine</i>								
Cefepim	7,5±1,03	92,5±3,61	11,9±0,82	88,1±2,22	51,5±2,64	68,5±3,05	13,3±4,48	86,7±12,35
Ceftazidim	5,7±0,90	94,3±3,65	9,5±0,73	90,5±2,25	27,8±1,94	72,2±3,13	20,0±5,93	80,0±11,87
Cefotaxim	22,6±1,78	77,4±3,30	13,1±0,86	86,9±2,21	51,5±2,64	68,5±3,05	33,3±7,66	66,7±10,83
<i>Fluorchinolone</i>								
Ciprofloxacină	34,0±2,19	66,0±3,05	29,8±2,05	70,2±3,15	33,3±2,17	66,7±3,07	33,3±7,66	66,7±10,83
Levofloxacină	69,8±3,14	30,2±2,06	55,9±2,81	44,1±2,49	66,7±3,07	33,3±2,17	46,7±9,07	53,3±9,69
<i>Aminoglicozide</i>								
Amicacină	67,9±3,09	32,1±2,06	78,6±3,33	21,4±1,74	74,1±3,23	25,9±3,21	73,3±11,36	26,7±6,86
Gentamicină	69,8±3,14	30,2±2,06	58,3±2,87	41,7±2,42	74,1±3,23	25,9±1,91	86,7±12,35	13,3±4,84
Tobramicină	77,4±3,30	22,6±1,78	81,0±3,38	19,0±1,64	75,9±3,27	24,1±1,84	93,3±12,81	13,3±4,84
<i>Carbapeneme</i>								
Imipenem	69,8±3,14	30,2±2,06	88,6±3,53	21,4±1,74	85,2±3,47	14,8±1,44	86,7±12,35	13,3±4,84
Meropenem	67,9±3,09	32,1±2,13	76,2±3,28	23,8±1,83	79,6±3,35	20,4±1,70	80,0±11,87	20,0±5,93
Ertapenem	84,9±3,46	15,1±1,46	84,5±3,45	15,5±1,48	100%±3,75	0%±0,00	100±13,27	0%±0,00
<i>Monobactame</i>								
Aztreonam	73,6±3,22	26,4±1,93	85,7±3,48	14,3±1,42	94,4±3,65	5,6±0,89	93,3±12,81	6,7±3,43
<i>Sulfonamide</i>								
Trimetoprim/sulfametoxazol	79,2±3,34	20,8±1,71	75,0±3,25	25,0±1,88	90,7±3,57	9,3±1,15	93,3±12,81	6,7±3,43

Anexa 2. Patternurile multidrog-rezistente de bacili gram-negativi izolați din ulcere trofice, n (%±ES Î 95%)

Patternurile de rezistență la antimicrobiene							
Microorganismul	Total	R0	R1	R2	R3	R4	≥R5
<i>P. aeruginosa</i>	96	0 (0,0±0,00)	0 (0,0±0,00)	11 (11,4±0,0)	23 (23,9±1,01)	18 (18,8±0,90)	44 (45,8±1,40)
<i>A. baumannii</i>	53	0 (0,0±0,00)	0 (0,0±0,00)	15 (28,3±2,00)	9 (17,0±1,55)	8 (15,1±1,46)	21 (39,6±2,36)
<i>E. coli</i>	53	0 (0,0±0,55)	9 (17,0±1,55)	7 (13,2±1,36)	11 (20,7±1,71)	9 (17,0±1,55)	17 (32,1±2,13)
<i>K. pneumoniae</i>	84	0 (0,0±0,00)	2 (2,4±0,37)	14 (16,7±0,97)	41 (48,8±1,65)	9 (10,7±0,77)	18 (21,4±1,10)
<i>Proteus spp.</i>	54	0 (0,0±0,00)	15 (27,8±1,94)	18 (33,3±2,13)	5 (9,3±1,12)	5 (9,3±1,12)	11 (20,4±1,66)
<i>Serratia spp.</i>	10	1 (10,0±6,29)	1 (10,0±6,29)	5 (50,0±14,07)	3 (30,0±10,90)	0 (0,0±0,00)	0 (0,0±0,00)
<i>Citrobacter spp.</i>	5	0 (0,0±0,00)	2 (40,0±25,17)	2 (40,0±25,17)	1 (20,0±17,80)	0 (0,0±0,00)	0 (0,0±0,00)
Total	355	1 (0,28±0,03)	29 (8,2±0,16)	72 (20,3±0,25)	93 (26,2±0,29)	49 (13,8±0,21)	111 (31,3±0,31)

Notă: R0 – tulpini sensibile la toate preparatele antimicrobiene; R1 – tulpini rezistente la un preparat antimicrobian; R2 - tulpini rezistente la două preparate antimicrobiene din diferite grupuri; R3 - tulpini rezistente la trei preparate antimicrobiene din diferite grupuri; R4 - tulpini rezistente la patru preparate antimicrobiene din diferite grupuri; ≥R5 - tulpini rezistente la cinci sau mai multe preparate antimicrobiene din diferite grupuri.

Anexa 3. Exprimarea factorilor enzimatici de patogenitate a tulpinilor izolate din ulcere trofice, n (%±ES Î 95%)

	Hemolizina	Lecitinaza	Lipaza	Gelatinaza	Cazeinaza	ADN-aza	Amilaza
<i>Enterobacteriaceae</i>							
<i>Escherichia coli</i>	18 (33,9±0,33)	3 (5,7±0,14)	31 (58,5±0,33)	28 (52,8±0,34)	8 (15,1±0,33)	41 (77,3±0,66)	12 (22,6±0,35)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	46 (54,8±0,41)	48 (57,1±0,45)	65 (77,4±0,38)	75 (89,3±0,44)	18 (21,4±0,39)	54 (64,3±0,60)	58 (69,0±0,61)
<i>Proteus spp.</i>	24 (44,4±0,37)	38 (70,4±1,60)	44 (81,5±0,39)	45 (83,3±0,42)	9 (16,7±0,35)	26 (48,1±0,52)	43 (79,6±0,66)
Alte enterobacterii	8 (53,3±0,41)	10 (66,7±0,49)	14 (93,3±0,42)	14 (93,3±0,45)	5 (33,3±0,49)	6 (40,0±0,47)	6 (40,0±0,46)
Total enterobacterii	96 (46,6±0,38)	99 (48,1±0,42)	154 (74,6±0,38)	162 (78,6±0,41)	40 (19,4±0,37)	127 (61,7±0,59)	119 (57,8±0,56)
Bacili gram-negativi nefermentativi							
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	57 (59,4±0,43)	63 (65,6±0,49)	80 (83,3±0,40)	64 (66,7±0,38)	87 (90,6±0,81)	21 (21,9±0,35)	52 (54,2±0,54)
<i>Acinetobacter baumannii</i>	31 (58,5±0,43)	15 (28,3±0,32)	40 (75,5±0,38)	32 (60,4±0,36)	0 (0±0,00)	2 (3,8±0,15)	27 (50,9±0,52)
Total BGN nefermentativi	88 (59,1±0,43)	78 (52,30±0,43)	120 (80,5±0,39)	96 (64,4±0,37)	87 (58,4±0,65)	23 (15,4±0,29)	79 (53,0±0,53)
Coci gram-pozitivi							
<i>Staphylococcus aureus</i>	103 (74,6±0,48)	138 (100±0,60)	101 (73,2±0,37)	111 (80,4±0,41)	118 (85,5±0,78)	99 (71,7±0,64)	71 (51,4±0,53)
SCN	13 (65,0±0,45)	4 (16,0±0,24)	5 (25,0±0,22)	3 (15,0±0,18)	4 (16,0±0,34)	0 (0±0,00)	2 (10±0,23)
<i>Enterococcus spp.</i>	27 (36,0±0,34)	9 (12,0±0,21)	54 (72,0±0,37)	58 (77,3±0,41)	56 (74,7±0,73)	0 (0±0,00)	0 (0±0,00)
<i>Streptococcus pyogenes</i>	29 (100±0,56)	3 (10,3±0,19)	24 (82,7±0,40)	0 (0±0,00)	20 (68,9±0,70)	16 (55,2±0,56)	0 (0±0,00)
Total coci gram-pozitivi	172 (65,6±0,45)	154 (58,8±0,46)	184 (70,2±0,36)	172 (65,6±0,37)	198 (75,6±0,74)	115 (43,9±0,50)	73 (27,9±0,39)
TOTAL	356 (57,7±0,42)	331 (53,6±0,44)	458 (74,2±0,37)	430 (69,7±0,39)	325 (52,7±0,51)	265 (42,9±0,49%)	271 (43,9±0,49)

Anexa 4. Activitatea antimicrobiană a compușilor coordinativi asupra microorganismelor gram-pozitive (μg/ml)

Compusul chimic	<i>S. aureus</i>		<i>B. cereus</i>		<i>B. subtilis</i>		<i>S. pyogenes</i>		<i>E. faecalis</i>		<i>E. faecium</i>	
	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB
C ₁₀ H ₁₂ CuN ₆ O ₆ S	0,12	0,24	0,12	0,24	0,12	0,24	0,03	0,06	0,49	0,98	0,24	0,49
C ₁₀ H ₁₁ BrCuN ₄ S	0,24	0,49	0,12	0,24	0,06	0,12	0,03	0,06	0,12	0,24	0,49	0,98
C ₂₄ H ₃₂ Cu ₂ N ₈ O ₆ S ₂	0,24	0,49	0,49	0,98	0,49	0,98	0,002	0,004	0,12	0,24	0,49	0,98
C ₁₀ H ₁₄ CuN ₄ O ₅ S ₂	0,12	0,24	0,24	0,49	0,12	0,24	0,24	0,49	0,49	0,98	0,49	0,98
C ₁₁ H ₁₄ CuN ₆ O ₆ S	0,49	0,98	0,007	0,03	0,003	0,007	0,002	0,004	0,12	0,24	0,12	0,24
C ₁₁ H ₁₃ BrCuN ₄ S	0,24	0,49	0,06	0,12	0,03	0,06	0,03	0,06	0,06	0,12	0,24	0,49
C ₁₃ H ₁₇ ClCuN ₄ S	0,49	1,95	0,24	0,49	0,12	0,12	0,06	0,06	0,98	1,95	1,95	3,91
C ₁₃ H ₁₇ CuN ₅ O ₃ S	0,12	0,24	0,12	0,12	0,12	0,12	0,03	0,06	0,12	0,12	0,24	0,24
C ₁₄ H ₂₀ ClCuN ₃ O ₆ S	1,95	3,91	1,95	1,95	0,98	0,98	0,49	0,49	1,95	1,95	3,91	3,91
C ₁₅ H ₂₀ N ₄ NiO ₂ S	1,95	3,91	1,95	3,91	1,95	1,95	0,49	0,49	1,95	1,95	3,91	3,91
C ₁₈ H ₂₀ CuN ₄ O ₂ S	0,49	0,98	0,49	0,98	0,24	0,49	0,24	0,24	1,95	1,95	0,98	1,95
C ₂₄ H ₂₃ CuN ₇ O ₇ S	1,95	3,91	1,95	3,91	1,95	1,95	0,98	0,98	3,90	7,81	15,6	31,2
C ₁₁ H ₁₁ Br ₂ CuN ₃ O ₂ S	0,03	0,98	0,49	0,98	0,24	0,49	0,007	0,007	0,98	1,95	3,91	3,91
C ₁₆ H ₁₄ Br ₂ CuN ₄ OS	0,49	0,98	0,007	0,03	0,007	0,03	0,007	0,007	0,98	0,98	0,98	0,98
C ₁₃ H ₁₆ Br ₂ CuN ₄ S	0,98	1,95	1,95	3,91	0,98	1,95	0,24	0,24	0,49	0,49	0,98	0,98
C ₁₄ H ₂₀ N ₄ S	0,06	0,24	1,95	3,91	1,95	3,91	0,03	0,06	125	250	125	125
C ₁₄ H ₁₉ ClCuN ₄ S	0,98	1,95	0,98	0,98	0,49	0,98	0,12	0,12	62,5	62,5	62,5	125
C ₁₈ H ₂₂ CuN ₆ O ₃ S	0,98	1,95	0,98	1,95	0,98	0,98	0,24	0,49	1,95	3,91	3,91	7,81
C ₁₄ H ₁₉ CuN ₇ O ₄ S	0,98	1,95	0,98	1,95	0,98	0,98	0,49	0,49	1,95	3,91	3,91	7,81

Notă: *S. aureus* ATCC 25923, *B. cereus* ATCC 11778, *B. subtilis* ATCC 6633, *S. pyogenes* ATCC 12344, *E. faecalis* ATCC 19433, *E. faecium* ATCC 6569.

Anexa 5. Activitatea antimicrobiană a compușilor coordinativi asupra microorganismelor gram-negative (μg/ml)

Compusul chimic	<i>E. coli</i>		<i>P. mirabilis</i>		<i>K.pneumoniae</i>		<i>E. cloacae</i>		<i>P.aeruginosa</i>		<i>A.baumannii</i>	
	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB
C ₁₀ H ₁₂ CuN ₆ O ₆ S	1,95	3,91	1,95	3,91	1,95	3,91	3,91	7,81	7,81	15,6	1,95	3,91
C ₁₀ H ₁₁ BrCuN ₄ S	7,81	15,6	7,81	15,6	1,95	3,91	0,98	1,95	15,6	31,2	3,91	7,81
C ₂₄ H ₃₂ Cu ₂ N ₈ O ₆ S ₂	1,95	3,91	3,91	7,81	1,95	3,91	1,95	3,91	3,91	7,81	1,95	3,91
C ₁₀ H ₁₄ CuN ₄ O ₅ S ₂	3,91	7,81	7,81	15,6	3,91	7,81	3,91	7,81	15,6	31,2	1,95	3,91
C ₁₁ H ₁₄ CuN ₆ O ₆ S	0,24	0,49	1,95	3,91	0,98	1,95	0,98	1,95	3,91	7,81	0,98	1,95
C ₁₁ H ₁₃ BrCuN ₄ S	3,91	7,81	7,81	15,6	1,95	3,91	1,95	3,91	3,91	7,81	1,95	3,91
C ₁₃ H ₁₇ ClCuN ₄ S	15,6	31,2	125	250	15,6	31,2	15,6	15,6	n/a	n/a	7,81	15,6
C ₁₃ H ₁₇ CuN ₅ O ₃ S	31,2	62,5	250	250	31,2	62,5	31,2	31,2	n/a	n/a	15,6	15,6
C ₁₄ H ₂₀ ClCuN ₃ O ₆ S	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
C ₁₅ H ₂₀ N ₄ NiO ₂ S	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
C ₁₈ H ₂₀ CuN ₄ O ₂ S	7,81	15,6	n/a	n/a	250	500	7,81	15,6	125	250	3,91	7,81
C ₂₄ H ₂₃ CuN ₇ O ₇ S	7,81	15,6	31,2	62,5	31,2	62,5	7,81	15,6	62,5	125	7,81	15,6
C ₁₁ H ₁₁ Br ₂ CuN ₃ O ₂ S	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
C ₁₆ H ₁₄ Br ₂ CuN ₄ OS	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
C ₁₃ H ₁₆ Br ₂ CuN ₄ S	15,6	31,2	62,5	125	125	250	15,6	31,2	125	250	15,6	31,25
C ₁₄ H ₂₀ N ₄ S	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	250	500
C ₁₄ H ₁₉ ClCuN ₄ S	31,2	62,5	n/a	n/a	125	250	62,5	62,5	n/a	n/a	62,5	125
C ₁₈ H ₂₂ CuN ₆ O ₃ S	3,91	7,81	62,5	125	7,81	15,6	3,91	3,91	125	250	1,95	3,91
C ₁₄ H ₁₉ CuN ₇ O ₄ S	7,81	15,6	62,5	125	7,81	15,6	7,81	15,6	250	500	0,98	1,95

Notă: *E. coli* ATCC 25922, *P. mirabilis* ATCC 25933, *K. pneumoniae* ATCC 13883, *E. cloacae* ATCC 13047, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *A. baumannii* BAA-747; n/a – compusul nu a demonstrat activitate la concentrația de <500 μg/ml.

Anexa 6.

Tabelul A6.1. Activitatea antimicrobiană a compușilor biologici asupra microorganismelor gram-pozitive (mg/ml)

Compusul biologic	<i>S. aureus</i>		<i>B. cereus</i>		<i>B. subtilis</i>		<i>S. pyogenes</i>		<i>E. faecalis</i>		<i>E. faecium</i>	
	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB
<i>ES</i>	0,62	1,25	0,16	0,31	0,16	0,16	0,62	0,62	0,62	1,25	0,62	0,62
<i>ES 1</i>	2,5	5,0	2,5	5,0	2,5	5,0	2,5	5,0	2,5	5,0	2,5	5,0
<i>ES 2</i>	2,5	5,0	1,25	2,5	1,25	2,5	1,25	1,25	2,5	5,0	2,5	5,0
<i>MX 1</i>	0,02	0,04	0,004	0,009	0,004	0,004	0,004	0,004	0,02	0,04	0,02	0,02
<i>MX 2</i>	0,03	0,05	0,01	0,03	0,01	0,01	0,01	0,01	0,03	0,05	0,03	0,03

Notă: *S. aureus* ATCC 25923, *B. cereus* ATCC 11778, *B. subtilis* ATCC 6633, *S. pyogenes* ATCC 12344, *E. faecalis* ATCC 19433, *E. faecium* ATCC 6569.

Tabelul A6.2. Activitatea antimicrobiană a compușilor biologici asupra microorganismelor gram-negative (mg/ml)

Compusul biologic	<i>E. coli</i>		<i>P. mirabilis</i>		<i>K.pneumoniae</i>		<i>E. cloacae</i>		<i>P.aeruginosa</i>		<i>A.baumannii</i>	
	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB
<i>ES</i>	0,625	1,25	1,25	1,25	1,25	2,5	0,625	1,25	1,25	1,25	1,25	2,5
<i>ES 1</i>	2,5	5,0	2,5	5,0	2,5	5,0	2,5	5,0	2,5	5,0	2,5	5,0
<i>ES 2</i>	2,5	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	2,5	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
<i>MX 1</i>	0,009	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,009	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
<i>MX 2</i>	0,02	0,03	0,02	0,03	0,03	0,03	0,02	0,03	0,02	0,03	0,03	0,03

Notă: *E. coli* ATCC 25922, *P. mirabilis* ATCC 25933, *K. pneumoniae* ATCC 13883, *E. cloacae* ATCC 13047, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *A. baumannii* BAA-747; n/a – compusul nu a demonstrat activitate la concentrația de 500 µg/ml.

Anexa 7. Efectul antimicrobian sinergic dintre compușii chimici și biologici pe tulpini de referință

Compușii testați		<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	<i>A. baumannii</i> BAA-747	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>P. aeruginosa</i> ATCC27853	<i>C. albicans</i> ATCC 10231
C ₁₄ H ₁₉ CuN ₇ O ₄ S	<i>ES</i>	1/32 _C + 1/16 _B	1/32 _C + 1/32 _B	1/4 _C + 1/4 _B	1/16 _C + 1/8 _B	-	1/16 _C + 1/8 _B
	<i>ES I</i>	1/16 _C + 1/8 _B	1/32 _C + 1/16 _B	1/4 _C + 1/4 _B	1/8 _C + 1/8 _B	-	1/16 _C + 1/32 _B
	<i>MX</i>	1/32 _C + 1/16 _B	1/32 _C + 1/32 _B	1/16 _C + 1/4 _B	1/8 _C + 1/16 _B	1/4 _C + 1/4 _B	1/16 _C + 1/8 _B
C ₁₃ H ₁₆ Br ₂ CuN ₄ S	<i>ES</i>	1/8 _C + 1/16 _B	1/32 _C + 1/16 _B	1/8 _C + 1/32 _B	1/32 _C + 1/16 _B	1/4 _C + 1/4 _B	1/8 _C + 1/4 _B
	<i>ES I</i>	1/16 _C + 1/32 _B	1/32 _C + 1/16 _B	1/8 _C + 1/32 _B	1/16 _C + 1/32 _B	-	1/4 _C + 1/8 _B
	<i>MX</i>	1/32 _C + 1/32 _B	1/32 _C + 1/32 _B	1/16 _C + 1/8 _B	1/32 _C + 1/16 _B	1/4 _C + 1/4 _B	1/8 _C + 1/8 _B
C ₁₀ H ₁₄ CuN ₄ O ₅ S ₂	<i>ES</i>	1/8 _C + 1/8 _B	1/32 _C + 1/16 _B	1/16 _C + 1/8 _B	1/16 _C + 1/8 _B	-	1/4 _C + 1/4 _B
	<i>ES I</i>	1/8 _C + 1/4 _B	1/16 _C + 1/8 _B	1/4 _C + 1/8 _B	-	-	-
	<i>MX</i>	1/16 _C + 1/8 _B	1/32 _C + 1/32 _B	1/16 _C + 1/16 _B	1/16 _C + 1/8 _B	-	1/4 _C + 1/8 _B
C ₁₃ H ₁₇ ClCuN ₄ S	<i>ES</i>	1/16 _C + 1/8 _B	1/32 _C + 1/16 _B	1/4 _C + 1/4 _B	1/4 _C + 1/8 _B	1/4 _C + 1/4 _B	1/8 _C + 1/8 _B
	<i>ES I</i>	1/8 _C + 1/8 _B	1/16 _C + 1/8 _B	1/4 _C + 1/4 _B	1/4 _C + 1/4 _B	-	1/8 _C + 1/4 _B
	<i>MX</i>	1/8 _C + 1/16 _B	1/8 _C + 1/16 _B	1/8 _C + 1/4 _B	1/8 _C + 1/4 _B	1/8 _C + 1/4 _B	1/16 _C + 1/8 _B
C ₁₈ H ₂₀ CuN ₄ O ₂ S	<i>ES</i>	1/16 _C + 1/8 _B	1/16 _C + 1/16 _B	1/16 _C + 1/8 _B	1/4 _C + 1/4 _B	-	1/8 _C + 1/4 _B
	<i>ES I</i>	1/8 _C + 1/16 _B	1/8 _C + 1/16 _B	1/8 _C + 1/8 _B	-	-	1/4 _C + 1/4 _B
	<i>MX</i>	1/32 _C + 1/8 _B	1/32 _C + 1/16 _B	1/16 _C + 1/8 _B	1/8 _C + 1/4 _B	1/4 _C + 1/4 _B	1/8 _C + 1/8 _B
C ₁₄ H ₂₀ N ₄ S	<i>ES</i>	1/32 _C + 1/16 _B	1/8 _C + 1/8 _B	-	NT	NT	1/16 _C + 1/8 _B
	<i>ES I</i>	1/16 _C + 1/8 _B	1/8 _C + 1/4 _B	-	NT	NT	1/8 _C + 1/8 _B
	<i>MX</i>	1/32 _C + 1/32 _B	1/16 _C + 1/8 _B	1/4 _C + 1/4 _B	NT	NT	1/32 _C + 1/16 _B
C ₁₄ H ₁₉ ClCuN ₄ S	<i>ES</i>	1/32 _C + 1/16 _B	1/16 _C + 1/16 _B	1/8 _C + 1/4 _B	1/4 _C + 1/4 _B	NT	1/4 _C + 1/16 _B
	<i>ES I</i>	1/8 _C + 1/16 _B	1/8 _C + 1/16 _B	1/4 _C + 1/4 _B	1/4 _C + 1/4 _B	NT	1/4 _C + 1/8 _B
	<i>MX</i>	1/8 _C + 1/16 _B	1/16 _C + 1/16 _B	1/8 _C + 1/8 _B	1/8 _C + 1/4 _B	NT	1/16 _C + 1/32 _B

Notă: c – compus chimic; b – compus biologic; NT – netestat.

Anexa 8. Statistica descriptivă a markerilor stresului oxidativ, sistemului antioxidant și patternului inflamator din loturile formate (Rstudio output)

Parametrul determinat	Martor	B1	B2	C1	C2	C1+B1	C1+B2	C2+B1	C2+B2
	(N=10)	(N=10)	(N=10)	(N=10)	(N=10)	(N=10)	(N=10)	(N=10)	(N=10)
DAM, μM/L									
Mean (SD)	4.14 (0.749)	3.29 (0.633)	2.68 (0.601)	4.73 (0.704)	4.07 (0.636)	3.75 (0.642)	3.30 (0.694)	3.45 (0.631)	3.02 (0.670)
Median (IQR)	4.20 (0.725)	3.35 (0.650)	2.80 (0.400)	4.85 (0.550)	4.20 (0.900)	3.85 (0.400)	3.30 (0.775)	3.55 (0.500)	3.05 (0.775)
[Min, Max]	[2.50, 5.20]	[2.00, 4.10]	[1.30, 3.40]	[3.10, 5.60]	[3.00, 4.90]	[2.30, 4.60]	[1.90, 4.10]	[2.10, 4.10]	[1.70, 3.90]
PPOA, μM/L									
Mean (SD)	20.8 (9.70)	19.8 (9.37)	19.0 (10.0)	24.0 (12.3)	22.6 (10.7)	21.1 (9.20)	20.5 (9.67)	20.2 (9.82)	19.7 (10.1)
Median (IQR)	16.1 (15.5)	15.9 (14.7)	15.0 (16.2)	19.1 (11.9)	18.0 (18.7)	16.6 (14.2)	15.9 (16.1)	16.0 (15.3)	15.3 (15.1)
[Min, Max]	[11.9, 35.7]	[10.7, 34.8]	[9.10, 34.1]	[12.7, 49.8]	[12.9, 39.7]	[11.4, 35.4]	[10.8, 34.8]	[10.3, 35.6]	[9.70, 35.6]
SOD, u/c									
Mean (SD)	683 (69.2)	861 (66.6)	873 (70.2)	807 (61.6)	821 (71.1)	847 (67.1)	847 (67.5)	818 (69.0)	835 (72.3)
Median (IQR)	693 (62.0)	878 (45.8)	894 (65.3)	801 (61.7)	819 (68.2)	865 (57.3)	853 (77.4)	820 (75.2)	839 (89.3)
[Min, Max]	[520, 754]	[697, 933]	[708, 947]	[673, 891]	[655, 916]	[689, 925]	[701, 944]	[664, 904]	[679, 920]
CT, μM/s.L									
Mean (SD)	14.8 (0.814)	48.8 (4.55)	50.0 (4.56)	15.2 (0.979)	15.3 (1.12)	38.2 (1.17)	39.5 (1.94)	37.9 (1.09)	41.8 (1.40)
Median (IQR)	14.8 (1.20)	50.3 (6.08)	51.0 (7.68)	15.4 (1.25)	15.7 (1.65)	38.3 (2.08)	39.1 (3.25)	37.7 (1.93)	42.2 (2.08)
[Min, Max]	[13.7, 16.2]	[41.6, 54.9]	[43.2, 55.2]	[13.5, 16.8]	[13.7, 17.1]	[36.3, 39.6]	[36.7, 42.2]	[36.8, 39.6]	[39.8, 44.1]
AAT cu ABTS, μM/L									
Mean (SD)	142 (28.5)	150 (33.0)	159 (29.6)	147 (30.1)	146 (28.9)	147 (31.4)	154 (31.3)	153 (32.2)	157 (28.7)
Median (IQR)	134 (15.1)	142 (14.1)	152 (16.7)	139 (15.5)	138 (14.1)	138 (16.4)	147 (19.3)	147 (16.3)	152 (16.1)
[Min, Max]	[119, 220]	[127, 240]	[139, 239]	[128, 230]	[129, 226]	[127, 233]	[128, 237]	[130, 240]	[135, 234]
G-S-T, nM/s.L									
Mean (SD)	37.5 (7.63)	40.7 (9.45)	41.1 (9.73)	44.7 (6.01)	48.7 (8.47)	41.7 (7.62)	42.7 (7.99)	42.1 (8.76)	43.4 (9.46)
Median (IQR)	38.6 (5.00)	40.4 (4.65)	41.5 (5.90)	46.1 (3.00)	50.1 (5.05)	42.9 (6.28)	43.0 (6.40)	43.1 (5.95)	43.5 (7.15)
[Min, Max]	[22.1, 49.2]	[25.6, 57.6]	[23.9, 56.3]	[28.9, 51.2]	[28.4, 58.9]	[28.3, 49.9]	[27.9, 53.7]	[28.1, 58.3]	[27.8, 61.1]

	Martor	B1	B2	C1	C2	C1+B1	C1+B2	C2+B1	C2+B2
	(N=10)	(N=10)	(N=10)	(N=10)	(N=10)	(N=10)	(N=10)	(N=10)	(N=10)
GPO, nM/s.L									
Mean (SD)	293 (40.1)	369 (31.4)	399 (36.4)	317 (30.4)	318 (23.6)	335 (36.8)	434 (67.2)	380 (43.2)	485 (85.4)
Median (IQR)	287 (32.3)	377 (48.5)	391 (39.3)	319 (39.9)	313 (24.2)	339 (61.7)	410 (79.6)	387 (42.6)	493 (126)
[Min, Max]	[246, 389]	[328, 416]	[349, 479]	[263, 357]	[289, 359]	[290, 379]	[366, 571]	[291, 443]	[377, 605]
GR, nM/s.L									
Mean (SD)	62.3 (9.97)	106 (15.0)	170 (63.6)	74.3 (8.23)	81.2 (6.42)	89.7 (13.1)	104 (18.1)	108 (20.4)	138 (38.6)
Median (IQR)	62.0 (14.5)	110 (13.4)	171 (88.7)	71.2 (8.53)	81.2 (2.85)	93.5 (21.9)	104 (13.0)	112 (19.1)	135 (52.8)
[Min, Max]	[47.4, 75.4]	[70.2, 125]	[59.7, 261]	[64.6, 89.4]	[70.7, 96.3]	[70.5, 103]	[61.4, 127]	[70.1, 132]	[68.3, 193]
IL-1β, pg/ml									
Mean (SD)	39.5 (5.20)	38.5 (5.00)	37.4 (5.20)	41.6 (4.97)	40.8 (5.09)	39.3 (4.80)	38.8 (4.72)	39.0 (5.25)	38.0 (4.74)
Median (IQR)	39.1 (5.00)	38.6 (3.78)	36.0 (5.78)	42.1 (4.43)	41.5 (6.40)	39.4 (4.53)	38.8 (5.05)	39.4 (4.15)	38.0 (3.50)
[Min, Max]	[28.6, 46.8]	[28.0, 45.2]	[27.4, 44.7]	[30.1, 47.5]	[30.1, 46.6]	[29.2, 45.6]	[28.5, 45.1]	[28.7, 46.6]	[27.8, 45.9]
TNF-α, pg/ml									
Mean (SD)	94.0 (22.9)	87.2 (20.6)	86.3 (21.3)	100 (22.8)	99.7 (20.9)	93.1 (20.2)	89.7 (17.6)	91.1 (23.8)	87.5 (18.5)
Median (IQR)	88.9 (10.4)	89.5 (18.4)	87.2 (16.4)	96.3 (13.4)	98.0 (17.9)	91.1 (16.5)	88.8 (12.9)	90.8 (24.6)	89.2 (20.2)
[Min, Max]	[70.9, 154]	[51.4, 124]	[50.9, 130]	[77.3, 160]	[74.2, 149]	[65.7, 141]	[57.8, 126]	[60.2, 146]	[57.2, 123]
IL-6, pg/ml									
Mean (SD)	126 (5.25)	116 (11.5)	112 (16.7)	129 (5.09)	130 (7.64)	122 (9.53)	120 (9.20)	121 (10.1)	117 (12.0)
Median (IQR)	125 (5.45)	120 (14.2)	115 (15.4)	130 (5.45)	129 (5.15)	123 (10.9)	121 (12.8)	122 (13.3)	118 (18.1)
[Min, Max]	[119, 136]	[98.5, 131]	[74.7, 138]	[119, 137]	[119, 149]	[102, 136]	[109, 138]	[107, 140]	[99.6, 136]
IL-10, pg/ml									
Mean (SD)	48.7 (2.52)	77.5 (4.82)	81.2 (5.91)	52.6 (5.37)	53.8 (5.28)	70.2 (5.78)	75.1 (6.14)	75.5 (6.57)	78.1 (5.87)
Median (IQR)	48.7 (3.90)	78.7 (3.08)	80.9 (2.60)	54.1 (7.98)	54.2 (8.10)	71.2 (3.40)	77.1 (5.20)	77.3 (8.48)	79.6 (6.28)
[Min, Max]	[43.7, 51.5]	[68.9, 86.4]	[71.4, 91.7]	[43.4, 58.7]	[46.1, 61.6]	[58.4, 78.3]	[60.1, 80.4]	[60.8, 82.3]	[66.7, 86.7]

Notă: Mean – media, median – mediana, SD – abaterea standard, IQR – abaterea intercvartilă, Min – valoarea minimală, Max – valoarea maximală, B1 – extract de S. platensis (ES); B2 – pigment carotenoidic mixoxantofila (MX); C1 – compusul chimic C10H14CuN4O5S2; C2 – compusul chimic C14H19CuN7O4S, DAM – dialdehida malonică, PPOA – produse proteice de oxidare avansată, SOD – superoxid dismutaza, AAT – activitatea antioxidantă totală, GST – glutadion S-transferaza, GPO – glutadion peroxidaza, GR – glutation reductaza, IL – interleukina, TNF – factorul de necroză tumorală.



MD 4742 B1 2021.02.28

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **4742** (13) **B1**
(51) Int.Cl: *A61K 31/60* (2006.01)
A61K 31/295 (2006.01)
A61P 31/10 (2006.01)
C07F 15/02 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)

(12) **BREVET DE INVENȚIE**

In termen de 6 luni de la data publicării mențiunii privind hotărârea de acordare a brevetului de invenție, orice persoană poate face opoziție la acordarea brevetului	
<p>(21) Nr. depozit: a 2019 0082 (22) Data depozit: 2019.11.15</p>	<p>(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2021.02.28, BOPI nr. 2/2021</p>
<p>(71) Solicitanți: INSTITUTUL DE CHIMIE, Ministerul Educației, Culturii și Cercetării, MD; UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, Ministerul Educației, Culturii și Cercetării, MD</p> <p>(72) Inventatori: GORINCIOI Viorina, MD; LOZAN Vasile, MD; BURDUNIUC Olga, MD; BALAN Greta, MD; ȚAPCOV Victor, MD; GULEA Aurelian, MD</p> <p>(73) Titulari: INSTITUTUL DE CHIMIE, Ministerul Educației, Culturii și Cercetării, MD; UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, Ministerul Educației, Culturii și Cercetării, MD</p> <p>(74) Mandatar autorizat: JOVMIR Tudor</p>	

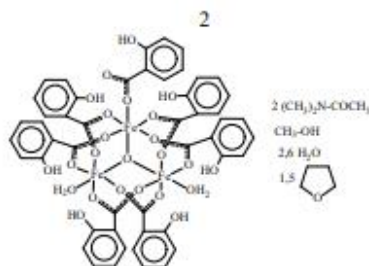
(54) **Utilizarea clusterului de oxohepta(salicilat)trifier(III)–polisolvat in calitate de inhibitor al proliferării fungilor din specia *Cryptococcus neoformans***

(57) **Rezumat:**

Invenția se referă la chimie și medicină, și anume la utilizarea unui compus coordinativ biologic activ din clasa carboxilaților metalelor de tranziție, care selectiv inhibă proliferarea fungilor din specia *Cryptococcus neoformans* și datorită acestor proprietăți poate găsi aplicare în medicină și veterinarie la profilaxia și tratarea micozelor.

Esența invenției constă în utilizarea în calitate de inhibitor al proliferării fungilor din specia *Cryptococcus neoformans* al oxohepta(salicilat)trifier(III)–polisolvat cu compoziția

$[Fe^{III}_3O(SalH)_7(H_2O)_2]-(DMAA)_2(H_2O)_2,6(CH_3OH)(THF)_{1,5}$, unde SalH reprezintă acidul salicilic monodeprotonat, DMAA - dimetilacetamida, THF - tetrahidrofuranul, totodată clusterul are următoarea formulă structurală:



Rezultatul tehnic al invenției constă în stabilirea la clusterul de oxohepta(salicilat)trifier(III)–polisolvat a activității fungistatice și fungicide față de fungii din specia *Cryptococcus neoformans* în limitele concentrațiilor 0,08...0,16 μg/mL.

Revendicări: 1

MD 4742 B1 2021.02.28



MD 4652 C1 2020.04.30

REPUBLICA MOLDOVA

(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) 4652 (13) C1

(51) Int.Cl.: C07F 1/08 (2006.01)
C07C 337/08 (2006.01)
C07C 47/52 (2006.01)
A61K 31/175 (2006.01)
A61K 31/30 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. depozit: a 2018 0021 (22) Data depozit: 2018.03.22	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2019.09.30, BOPI nr. 9/2019
(71) Solicitant: UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD (72) Inventatori: BĂLAN Greta, MD; BURDUNIUC Olga, MD; ȚAPCOV Victor, MD; MITKEVICH Natalia, RU; RUDIC Valeriu, MD; GULEA Aurelian, MD (73) Titular: UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD	

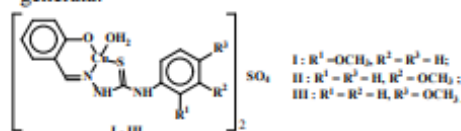
(54) Complecșii sulfatului de cupru(II) cu 2-(2-hidroxi-benziliden)-N-(metoxifenil)hidrazincarbotoamide, care manifestă activitate antimicrobiană față de microorganismele gram-pozitive

(57) Rezumat:

Invenția se referă la chimie și medicină, și anume la un șir de compuși coordinativi biologic activi ai cuprului din clasa tiosemicarbazonaților metalelor de tranziție. Acești complecși manifestă activitate bacteriostatică și bactericidă înaltă față de microorganismele gram-pozitive și datorită acestor proprietăți pot găsi aplicare în medicină și veterinarie în calitate de preparate antimicrobiene.

Esența invenției constă în obținerea compușilor coordinativi I-III ai sulfatului de cupru(II) cu 2-(2-hidroxi-benziliden)-N-(2-metoxifenil)hidrazincarbotoamida (I), 2-(2-hidroxi-benziliden)-N-(3-metoxifenil)

hidrazincarbotoamida (II) și 2-(2-hidroxi-benziliden)-N-(4-metoxifenil)hidrazincarbotoamida (III) cu formula generală:



Rezultatul invenției constă în obținerea unui șir de compuși complecși, care manifestă activitate antimicrobiană bacteriostatică și bactericidă față de microorganismele gram-pozitive.

Revendicări: 2

MD 4652 C1 2020.04.30



MD 4648 C1 2020.04.30

REPUBLICA MOLDOVA

(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală(11) **4648** (13) **C1**
(51) Int.Cl.: *A61K 31/175* (2006.01)
A61K 31/4402 (2006.01)
A61P 31/10 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)
C07C 337/08 (2006.01)
C07D 213/16 (2006.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE

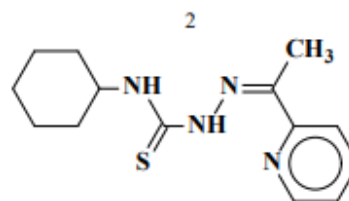
(21) Nr. depozit: a 2018 0079 (22) Data depozit: 2018.09.12	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2019.09.30, BOPI nr. 9/2019
(71) Solicitant: UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD (72) Inventatori: GULEA Aurelian, MD; BURDUNIUC Olga, MD; BĂLAN Greta, MD; RUSNAC Roman, MD; ȚAPCOV Victor, MD; RUDIC Valeriu, MD (73) Titular: UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD	

(54) Utilizare a N-ciclohexil-2-[1-(piridin-2-il)etiliden]hidrazincarbotoamiei în calitate de inhibitor al proliferării microorganismelor gram-pozitive și fungilor *Candida albicans*

(57) Rezumat:

1
Invenția se referă la chimie și medicină, și anume la utilizarea compusului din clasa tiosemicarbazonelor, care manifestă o activitate antimicrobiană și antimicotică înaltă și poate găsi aplicare în medicină și veterinarie în calitate de preparat cu acțiune antimicrobiană și antimicotică sau de ingredient la crearea mediilor nutritive selective de cultivare a microorganismelor și fungilor.

Esența invenției constă în utilizarea în calitate de inhibitor al proliferării microorganismelor gram-pozitive și fungilor *Candida albicans* a N-ciclohexil-2-[1-(piridin-2-il)etiliden]hidrazincarbotoamiei cu formula :



Rezultatul invenției constă în sporirea activității bacteriostatice și bactericide față de microorganismele gram-pozitive *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis* de 2...12 ori și asigurarea unei activități antimicotice înalte față de fungii *Candida albicans*.

Revendicări: 1

MD 4648 C1 2020.04.30



MD 4667 C1 2020.07.31

REPUBLICA MOLDOVA

(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) 4667 (13) C1

(51) Int.Cl: C07F 1/08 (2006.01)
C07C 47/56 (2006.01)
C07C 215/08 (2006.01)
A61K 31/30 (2006.01)
A61K 31/045 (2006.01)
A61P 31/10 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE

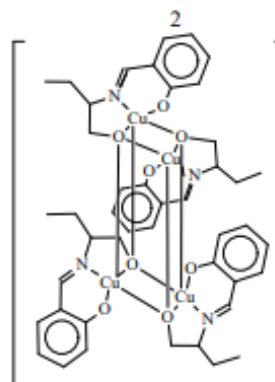
(21) Nr. depozit: a 2018 0048 (22) Data depozit: 2018.06.14	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2019.12.31, BOPI nr. 12/2019
(71) Solicitant: UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD	
(72) Inventatori: GULEA Aurelian, MD; ȚAPCOV Victor, MD; BĂLAN Greta, MD; BURDUNIUC Olga, MD	
(73) Titular: UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD	

(54) Tetrakis{[μ₃-2-(1-oxibutan-2-il)iminometil]-fenolato(2-)-O,N,O-O_{alc}}-
tetracupru(II), care manifestă activitate antimicrobiană și antimicotică

(57) Rezumat:

Invenția se referă la chimie și medicină, și anume la sinteza compusului coordinativ tetranuclear de cupru din clasa saliciliden-aminobutanolaților metalelor de tranziție de un nou tip structural. Acest complex manifestă activitate antimicrobiană și antimicotică față de un spectru larg de microorganisme gram-pozitive, gram-negativ și micete levuriforme. Datorită acestor proprietăți el poate găsi aplicare în medicină și veterinarie în calitate de preparat cu acțiune antimicrobiană și antifungică sau în calitate de ingredient în crearea mediilor nutritive selective de cultivare a microorganismelor și fungilor.

Esența invenției constă în sinteza compusului coordinativ tetranuclear de cupru - tetrakis{[μ₃-2-(1-oxibutan-2-il)iminometil]-fenolato(2-)-O,N,O-O_{alc}}-tetracupru(II), cu formula:



Compusul extinde arsenalul de inhibitori ai microorganismelor gram-pozitive, gram-negativ și micetelor levuriforme, cu activitate biologică înaltă.

Revendicări: 2

Figuri: 1

MD 4667 C1 2020.07.31



MD 4621 C1 2019.09.30

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **4621** (13) **C1**
(51) Int.Cl: *C07F 1/08* (2006.01)
C07C 337/08 (2006.01)
C07D 213/86 (2006.01)
A61K 31/30 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. depozit: a 2018 0052 (22) Data depozit: 2018.06.28	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2019.02.28, BOPI nr. 2/2019
(71) Solicitant: UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD (72) Inventatori: BURDUNIUC Olga, MD; BĂLAN Greta, MD; GRAUR Vasiliu, MD; ȚAPCOV Victor, MD; GULEA Aurelian, MD (73) Titular: UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD	

(54) **Compuși ai cuprului (II) cu 4-ailtiosemicarbazona 2-acetilpiridinei in calitate de inhibitori ai proliferării fungilor din specia *Cryptococcus neoformans***

(57) Rezumat:

1
Invenția se referă la chimie și medicină, și anume la compuși coordinați ai cuprului (II) biologic activi din clasa tiosemicarbazonaților metalelor de tranziție care pot fi aplicați în calitate de preparate cu proprietăți antifungice.

Esența invenției constă în aceea că se propune nitrato- {N-(prop-2-en-1-il)-N'-[1-(piridin-2-il)-etiliden]-
carbamohidrazontioato}imidazolcupru

2
monohidrat și nitrato- {N-(prop-2-en-1-il)-
N'-[1-(piridin-2-il)etiliden]-
carbamohidrazontioato}-(3,4-
dimetilpiridin)cupru pentru utilizare în calitate de inhibitori ai proliferării fungilor din specia *Cryptococcus neoformans*.

Revendicări: 2
Fig.: 1

MD 4621 C1 2019.09.30



MD 4675 C1 2020.11.30

REPUBLICA MOLDOVA

(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală(11) **4675** (13) **C1**
(51) Int.Cl: *C07F 1/08* (2006.01)
C07C 337/08 (2006.01)
C07C 47/58 (2006.01)
A61K 31/30 (2006.01)
A61K 31/175 (2006.01)
A61P 31/10 (2006.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE

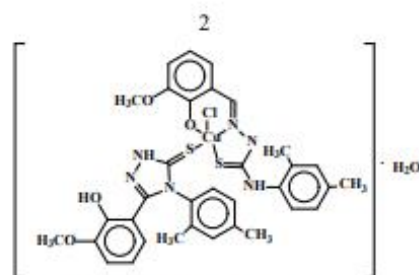
(21) Nr. depozit: a 2018 0088 (22) Data depozit: 2018.10.18	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2020.02.29, BOPI nr. 2/2020
(71) Solicitant: UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD	
(72) Inventatori: GULEA Aurelian, MD; ȚAPCOV Victor, MD; CEBOTARI Diana, MD; BĂLAN Greta, MD; BURDUNIUC Olga, MD; RUDIC Valeriu, MD	
(73) Titular: UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD	

(54) Inhibitor al proliferării fungilor din specia *Cryptococcus neoformans* în baza hidratului de cloro-{{4-(2,4-dimetilfenil)-2-(oxo-3-metoxibenziliden)hidrazincarbotoamido(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

(57) Rezumat:

Invenția se referă la chimie și medicină, și anume la un compus coordinativ biologic activ de cupru din clasa tiosemicarbazonaților metalelor de tranziție. Acest complex inhibă proliferarea fungilor din specia *Cryptococcus neoformans*. Datorită acestor proprietăți el poate găsi aplicare în medicină și veterinarie în calitate de preparat antifungic.

Conform invenției, se revendică utilizarea în calitate de inhibitor al proliferării fungilor din specia *Cryptococcus neoformans* a hidratului de cloro-{{4-(2,4-dimetilfenil)-2-(oxo-3-metoxibenziliden)hidrazincarbotoamido(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 cu formula:



Rezultatul tehnic al invenției constă în obținerea compusului coordinativ de cupru cu liganzi micști, care manifestă activitate antimicrobică față de fungii din specia *Cryptococcus neoformans*.

Revendicări: 2

Figuri: 1

MD 4675 C1 2020.11.30



MD 4707 B1 2020.08.31

REPUBLICA MOLDOVA

(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) 4707 (13) B1

(51) Int.Cl: C07F 1/08 (2006.01)
C07C 47/55 (2006.01)
C07C 47/56 (2006.01)
C07C 337/08 (2006.01)
C07D 213/00 (2006.01)
A61K 31/30 (2006.01)
A61K 31/175 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE

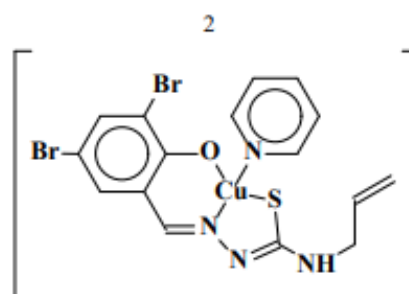
In termen de 6 luni de la data publicării mențiunii privind hotărârea de acordare a brevetului de invenție, orice persoană poate face opoziție la acordarea brevetului	
(21) Nr. depozit: a 2019 0051 (22) Data depozit: 2019.06.20	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2020.08.31, BOPI nr. 8/2020
(71) Solicitant: UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD (72) Inventatori: GULEA Aurelian, MD; BĂLAN Greta, MD; ULCHINA Ianina, MD; GRAUR Vasiliu, MD; ȚAPCOV Victor, MD (73) Titular: UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD	

(54) [N'-(3,5-dibromo-2-oxidobenziliden)-N-(prop-2-en-1-il)carbamohidrazonotioato]piridincupru, care manifestă activitate antimicrobiană față de bacteriile din speciile *Bacillus cereus* și *Bacillus subtilis*

(57) Rezumat:

Invenția se referă la chimie și medicină, și anume la un complex de cupru biologic activ din clasa tiosemicarbazonaților metalelor de tranziție. Acest compus coordinativ manifestă activitate bacteriostatică și bactericidă înaltă față de bacteriile din speciile *Bacillus cereus* și *Bacillus subtilis*. Datorită acestor proprietăți el poate găsi aplicare în medicină și veterinarie în calitate de preparat antimicrobian.

Conform invenției, se revendică compusul [N'-(3,5-dibromo-2-oxidobenziliden)-N-(prop-2-en-1-il)carbamohidrazonotioato]piridincupru cu formula:



Rezultatul tehnic al invenției constă în stabilirea la compusul revendicat a activității antimicrobiene înalte față de bacteriile din speciile *Bacillus cereus* și *Bacillus subtilis*.

Revendicări: 2

BREVET DE INVENȚIE



MD 4687 C1 2021.01.31

REPUBLICA MOLDOVA

(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală(11) **4687** (13) **C1**
(51) Int.Cl: *A61K 31/175* (2006.01)
A61K 31/155 (2006.01)
A61K 31/30 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)
C07F 1/08 (2006.01)
C07C 337/08 (2006.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE

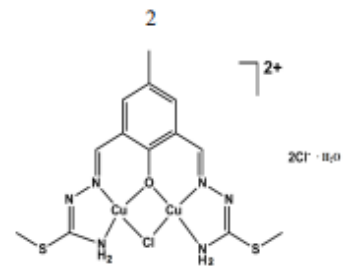
(21) Nr. depozit: a 2019 0026 (22) Data depozit: 2019.04.04	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2020.04.30, BOPI nr. 4/2020
(71) Solicitant: INSTITUTUL DE CHIMIE, MINISTERUL EDUCAȚIEI, CULTURII ȘI CERCETĂRII, MD; UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD (72) Inventatori: JOVMIR Tudor, MD; BĂLAN Greta, MD; POPA Tatiana, MD; DRUȚĂ Vadim, MD; GULEA Aurelian, MD; LOZAN Vasile, MD (73) Titular: INSTITUTUL DE CHIMIE, MINISTERUL EDUCAȚIEI, CULTURII ȘI CERCETĂRII, MD; UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD (74) Mandatar autorizat: JOVMIR Tudor	

(54) **Compus hidrosolubil 2,6-bis(S-metilzotiosemicarbazidometiliden)-4-metilfenolato-tricloro-dicupru-hidrat pentru utilizare în calitate de remediu farmaceutic selectiv contra bacteriilor Gram-pozitive**

(57) Rezumat:

1
Invenția se referă la utilizarea unui compus coordinativ de cupru în bază de izotiosemicarbazone aromatice în calitate de remediu antibacterian și poate fi aplicată în medicină.

Compusul binuclear de cupru(II) hidrosolubil cu formula $[Cu_2(H_2DF-T_1)-\mu-Cl]Cl_2 \cdot H_2O$, unde H_2DF-T_1 reprezintă bis(S-metilzotiosemicarbazona) 2,6-diformil-4-metilfenolului:



posedă o activitate bactericidă selectivă până la concentrații minime de 1...2 $\mu\text{g/mL}$ față de bacteriile patogene Gram-pozitive.

Compusul binuclear de cupru susmenționat poate fi aplicat sub formă de soluții apoase diluate pentru combaterea diferitor bacterioze.

Revendicări: 1

MD 4687 C1 2021.01.31



MD 4712 B1 2020.09.30

REPUBLICA MOLDOVA

(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) 4712 (13) B1

(51) Int.Cl: A61K 31/60 (2006.01)
A61K 31/30 (2006.01)
A61K 31/16 (2006.01)
A61P 31/10 (2006.01)
C07C 65/10 (2006.01)
C07F 1/08 (2006.01)
C07F 3/00 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE

In termen de 6 luni de la data publicării mențiunii privind hotărârea de acordare a brevetului de invenție, orice persoană poate face opoziție la acordarea brevetului	
(21) Nr. depozit: a 2019 0081 (22) Data depozit: 2019.11.13	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2020.09.30, BOPI nr. 9/2020
(71) Solicitanți: INSTITUTUL DE CHIMIE AL MECC, MD; UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD	
(72) Inventatori: GORINCIOI Viorina, MD; LOZAN Vasile, MD; BURDUNIUC Olga, MD; BALAN Greta, MD; ȚAPCOV Victor, MD; GULEA Aurelian, MD	
(73) Titulari: INSTITUTUL DE CHIMIE AL MECC, MD; UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD	
(74) Mandatar autorizat: JOVMIR Tudor	

(54) Utilizarea tetrasalicilatului de bariu-cupru in calitate de inhibitor al proliferării fungilor *Cryptococcus neoformans*

(57) Rezumat:

1
Invenția se referă la chimie și medicină, și anume la utilizarea unui compus coordinativ biologic activ din clasa carboxilaților heterometalici, care selectiv inhibă proliferarea fungilor *Cryptococcus neoformans* și poate găsi aplicare în medicină și veterinarie la profilaxia și tratarea micozelor.

Esența invenției constă în utilizarea în calitate de inhibitor al proliferării fungilor *Cryptococcus neoformans* a compusului

2
heterobinuclear aqua-2κO-tetrakis(N,N-dimetilacetamid-1κO)-tetrakis(μ-salicilato-1κO:2κO?)-bariu(II)cupru(II).

Rezultatul tehnic al invenției constă în stabilirea la compusul sus-indicat a activității fungistatice și fungicide față de fungii *Cryptococcus neoformans* în limitele concentrațiilor de 0,10...0,20 μg/mL.

Revendicări: 1

MD 4712 B1 2020.09.30

Anexa 10. Certificate de inovator





Republica Moldova
Ministerul Sănătății,
Muncii și Protecției Sociale

CERTIFICAT DE INOVATOR

Nr. 5845

Pentru inovația cu titlul
**PROCEDEU DE DETERMINARE A
ACTIVITĂȚII ANTILIZOZIM A
MICROORGANISMELOR**

Inovația a fost înregistrată pe data de **07 Mai 2021**
la Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie
"Nicolae Testemițanu"

Se recunoaște calitatea de autor(i)

**BĂLAN Greta, BURDUNIUC Olga,
GUTU Luminița, RÎMIȘ Constantin**



07 Mai 2021

[Signature]
(Semnătura autorizată)





Republica Moldova
Ministerul Sănătății,
Muncii și Protecției Sociale

CERTIFICAT DE INOVATOR

Nr. 5844

Pentru inovația cu titlul
**GHID PRIVIND MANAGEMENTUL
ULCERULUI TROFIC INFECTAT**

Inovația a fost înregistrată pe data de **06 Mai 2021**
la Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie
"Nicolae Testemițanu"

Se recunoaște calitatea de autor(i)

BĂLAN Greta, RUDIC Valeriu



Data eliberării

06 Mai 2021

[Signature]
(Semnătura autorizată)

Anexa 11. Diplome de excelență la expoziții



EURO INVENT 10th EDITION
EUROPEAN EXHIBITION OF
CREATIVITY AND INNOVATION
2018

MINISTERUL
CERCETĂRII
ȘI INOVĂRII

100
ROMÂNIA
REPUBLICA ROMÂNIEI

CONCEPT ÎN ROMÂNIA
Ministerul Cercetării și Inovării

IAȘI - ROMÂNIA

DIPLOMA OF EXCELLENCE

is awarded to:

**COPPER CONTAINING AGENTS WITH ANTIBACTERIAL ACTIVITY
AGAINST GRAM POSITIVE MICROORGANISMS**

**Bălan Greta, Burduniuc Olga, Țapcov Victor, Mitkevich Natalia, Rudic
Valeriu, Gulea Aurelian**

President of International Jury
Dr.Eng. Mohd Mustafa Al Bakri ABDULLAH

President of Exhibition
Prof. Ion SANDU

May 19, 2018

europa
direct
EUROPE

ROMANIA

IFIA
INTERNATIONAL FEDERATION
OF INVENTORS ASSOCIATIONS

WIFA

EURO INVENT



EURO INVENT 10th EDITION
EUROPEAN EXHIBITION OF
CREATIVITY AND INNOVATION
2018

MINISTERUL
CERCETĂRII
ȘI INOVĂRII

100
ROMÂNIA
REPUBLICA ROMÂNIEI

CONCEPT ÎN ROMÂNIA
Ministerul Cercetării și Inovării

IAȘI - ROMÂNIA

DIPLOMA OF EXCELLENCE

is awarded to:

INHIBITOR OF INCREASE AND MULTIPLICATION OF THE FUNGI

**Burduniuc Olga, Balan Greta, Rusnac Roman,
Țapkov Victor, Grossu Trofim, Rudic Valeriu, Gulea Aurelian**

President of International Jury
Dr.Eng. Mohd Mustafa Al Bakri ABDULLAH

President of Exhibition
Prof. Ion SANDU

May 19, 2018

europa
direct
EUROPE

ROMANIA

IFIA
INTERNATIONAL FEDERATION
OF INVENTORS ASSOCIATIONS

WIFA

EURO INVENT



DIPLOMA

of

EXCELLENCE

IAȘI - ROMÂNIA



is awarded to



NEW ANTIBACTERIAL AGENT AGAINST *Bacillus cereus* AND *Bacillus subtilis*

Aurelian GULEA, Greta BĂLAN, IANINA ULCHINA,
VASILII GRAUR, VICTOR ȚAPCOV



President of International Jury
Prof. Dr. Eng. Mohd Mustafa Al Bakri ABDULLAH

President of Exhibition
Prof. Dr. Ion SANDU



SALONUL INTERNAȚIONAL AL CERCETĂRII ȘTIINȚIFICE, INOVĂRII ȘI INVENTICII

PRO INVENT

EDIȚIA XVII, 20-22 MARTIE 2019
CLUJ-NAPOCA



DIPLOMA

DE EXCELENȚĂ

Se acordă **Greta BĂLAN, Olga BURDUNIUC, Victor ȚAPCOV, Natalia MITKEVICI, Valeriu RUDIC, Aurelian GULEA**

De la **Universitatea de Stat din Moldova (Chișinău)**

Pentru **AGENȚII CARE CONȚIN CUPRU CU ACTIVITATE ANTIBACTERIANĂ ÎMPOTRIVA MICROORGANISMELOR GRAM-POZITIVE**

PREȘEDINTELE SALONULUI,
Prof. dr. ing. VASILE ȚOPA
Rector al Universității Tehnice din Cluj-Napoca



PREȘEDINTELE JURIULUI,
Prof. dr. ing. RADU MUNTEANU





"GHEORGHE ASACHI"
TECHNICAL UNIVERSITY, IASI

NATIONAL INSTITUTE
OF INVENTICS, IASI

Diploma of Achievement

MEDAL INVENTICA 2020

Offered to

**TUDOR JOVMIR, TATIANA POPA, GRETA BĂLAN, OLGA BURDUNIUC,
LUCIAN LUPAȘCU, VADIM DRUȚĂ, AURELIAN GULEA, VASILE LOZAN**

Moldova State University

**WATER-SOLUBLE DICOPPER COMPLEX
HAVING ANTIMICROBIAL ACTIVITY**

in recognition of high scientific contribution and loyalty to
the XXIV-th INTERNATIONAL EXHIBITION OF INVENTICS

INVENTICA 2020

Iasi, Romania

29-31 July 2020

GENERAL MANAGER
NATIONAL INSTITUTE OF INVENTICS
Prof. Neulai SEGHE DIN PhD

DIPLÔME

Ginventions
Geneva

SALON INTERNATIONAL DES INVENTIONS GENÈVE

Après examen, le Jury International a décidé

de remettre à: **Bălan Greta, Burduniuc Olga, Țapcov Victor,
Mitkevici Natalia, Rudic Valeriu, Gulea Aurelian**
pour l'invention: **Agents contenant de cuivre d'activité antibactérienne**



MÉDAILLE D'OR
GOLD MEDAL
GOLDMEDAILLE

Genève, le 13 avril 2018


Le Président du Jury: David Taj


Le Président du Salon: Jean-Luc Vincent

DIPLOMA

Eureka!

THE WORLD EXHIBITION ON INVENTIONS,
RESEARCH AND NEW TECHNOLOGIES

Moldova

BURDUNIUC Olga, BALAN Greta, RUSNAC Roman, TAPCOV Victor, GROSSU
Sergiu, RUDIC Valeriu, GULEA Aurelian


for the innovation

Inhibitor of proliferation and multiplication of fungi

Gold Medal

THE PRESIDENT OF
THE INTERNATIONAL JURY

THE PRESIDENT


8th of March 2018



Universitatea Tehnică
„Gheorghe Asachi” din Iași



Institutul National
de Inventica, Iasi

Diploma

GOLD MEDAL INVENTICA 2018

Offered to Mr / Ms

State University Of Moldova,
State University Of Medicine And Pharmacy
„Nicolae Testemitanu”, National Public Health Agency,
Institute Of Microbiology And Biotechnology

**COPPER CONTAINING AGENTS WITH ANTIBACTERIAL
ACTIVITY AGAINST GRAM POSITIVE MICROORGANISMS**

BĂLAN GRETA, BURDUNIUC OLGA,
ȚAPCOV VICTOR, MITKEVICH NATALIA, RUDIC VALERIU,
GULEA AURELIAN

in recognition of high scientific contribution
and loyalty to the XXII-th International Salon of Research,
Innovation and Technological Transfer

INVENTICA 2018

Iasi, Romania,
27 - 29 June 2018



MANAGER
NATIONAL INSTITUTE OF INVENTICS
Prof. Neculai SEGHEdin PhD



Universitatea Tehnică
„Gheorghe Asachi” din Iași



Institutul Național
de Inventică, Iași

Diploma

GOLD MEDAL

INVENTICA 2018

Offered to Mr / Ms

National Public Health Agency, State University Of Moldova,
State University Of Medicine And Pharmacy „Nicolae Testemitanu”

INHIBITOR OF INCREASE AND MULTIPLICATION OF THE FUNGI

BURDUNIUC OLGA, BALAN GRETA,
RUSNAC ROMAN,
TSAPKOV VICTOR, GROSSU TROFIM, RUDIC VALERIU,
GULEA AURELIAN

in recognition of high scientific contribution
and loyalty to the XXII-th International Salon of Research,
Innovation and Technological Transfer

INVENTICA 2018

Iasi, Romania,
27 - 29 June 2018



MANAGER
NATIONAL INSTITUTE OF INVENTICS
Prof. Neculai SEGHEIN PhD





DIPLOMA OF GOLD MEDAL

is awarded to:

**WATER-SOPLUBLE DICOPPER COMPLEX HAVING SELECTIVE ANTIMICROBIAN
ACTIVITY AGAINST MEDICAL AND AGRICULTURAL PATHOGENS**

JOVMIR Tudor, POPA Tatiana, LUPAȘCU Lucian, BĂLAN Greta, BURDUNIUC Olga,
GULEA Aurelian, LOZAN Vasile

President of International Jury
Dr.Eng. Mohd Mustafa Al Bakri ABDULLAH

President of Exhibition
Prof. Ion SANDU

May 23, 2020



DIPLOMA OF GOLD MEDAL

is awarded to:

**INHIBITOR OF THE PROLIFERATION OF FUNGI OF THE SPECIES
*Cryptococcus neoformans***

Aurelian GULEA, Victor ȚAPCOV, Diana CEBOTARI, Greta BĂLAN, Olga
BURDUNIUC, Valeriu RUDIC

President of International Jury
Prof.Dr.Eng. Mohd Mustafa Al Bakri ABDULLAH

President of Exhibition
Prof.Dr. Ion SANDU

May 22, 2021





SALONUL INTERNAȚIONAL DE
**INVENTII
INOVAȚII**
„TRAIAN VUIA” TIMIȘOARA



Diplomă

SE ACORDĂ



MEDALIA
DE AUR

pentru invenția

**COPPER CONTAINING AGENTS WITH ANTIBACTERIAL
ACTIVITY AGAINST GRAM POSITIVE MICROORGANISMS**

autori

**Bălan Greta, Burduniuc Olga, Țapcov Victor, Mitkevich Natalla, Rudic Valeriu,
Gulea Aurelian**

instituția

**UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA
UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE, „NICOLAE
TESTEMIȚANU”
NATIONAL PUBLIC HEALTH AGENCY
INSTITUTE OF MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY**

Președinte juriu
Radu Dimeca



Președinte salon
Remi RĂDULESCU

Data 15 iunie 2018



SALONUL INTERNAȚIONAL DE

**INVENȚII
INOVAȚII**

„TRAIAN VUIA” TIMIȘOARA



Diplomă

SE ACORDĂ



MEDALIA
DE AUR

pentru invenția
INHIBITOR OF INCREASE AND ULTIPLICATION OF THE FUNGI
autori

Burduniuc Olga, Balan Greta, Rusnac Roman, Tsapkov Victor, Grossu Trofim, Rudic Valeriu, Gulea Aurelian

instituția
**UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA
UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE „NICOLAE
TESTEMIȚANU”
NATIONAL PUBLIC HEALTH AGENCY
Republica Moldova**

Președinte juriu
Radu Dîmeca



Președinte salon
Remi RĂDULESCU

Data 15 iunie 2018



SALONUL INTERNAȚIONAL DE

**INVENTII
INOVAȚII**

„TRAIAN VUIA” TIMIȘOARA



Diplomă

SE ACORDĂ



MEDALIA
DE AUR

pentru invenția

**NEW ANTIBACTERIAL AGENT AGAINST BACILLUS CEREUS
AND BACILLUS SUBTILIS / NOU AGENT ANTIBACTERIAL
IMPOTRIVA BACILLUS CEREUS ȘI BACILLUS SUBTILIS**

a u t o r i

**Aurelian GULEA, Greta BĂLAN, Ianina ULCHINA, Vasilii GRAUR,
Victor ȚAPCOV**

i n s t i t u Ț i a

UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA

Președinte juriu
Camelia MARINESCU



Președinte salon
Remi RĂDULESCU

Data 15 octombrie 2020 .



SALONUL INTERNAȚIONAL DE

INVENȚII
INOVAȚII

„TRAIAN VUIA” TIMIȘOARA



Diplomă

SE ACORDĂ



MEDALIA
DE AUR

pentru invenția

MOLECULAR INHIBITORS AGAINST CANDIDA
ALBICANS AND GRAM-POSITIVE BACTERIA

autori

BURDUNIUC OLGA, BĂLAN GRETA, TSAPKOV VICTOR,
RUSNAC ROMAN, RUDIC VALERIU, GULEA AURELIAN

instituția

NATIONAL AGENCY FOR PUBLIC HEALTH
STATE UNIVERSITY OF MOLDOVA
STATE UNIVERSITY OF MEDICINE AND PHARMACY „NICOLAE TESTEMITANU”
REPUBLIC OF MOLDOVA

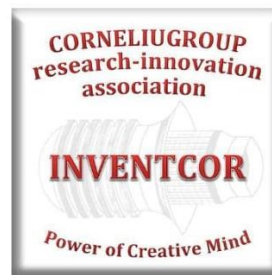
Președinte juriu
Camelia MARINESCU

Data 14 iunie 2015



Președinte salon
Remi RĂDULESCU

DIPLOMA



AWARDED FOR

**New antibacterial agent against *Bacillus cereus* and
*Bacillus subtilis***

MD 4707/2020.08.31

TO

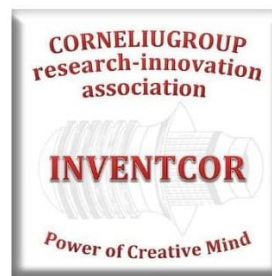
**Aurelian GULEA, Greta BĂLAN, Ianina ULCHINA,
Vasilii GRAUR, Victor ȚAPCOV**

MOLDOVA STATE UNIVERSITY

**INTERNATIONAL EXHIBITION INVENTCOR
DEVA 2020**



DIPLLOMA



AWARDED FOR

**Synthesis and characterization of new
transition metal coordination compounds for
applications in biology**

Project AUF-RM

TO

**Roman RUSNAC , Diana CEBOTARI, Arcadie FUIOR,
Mohamed HAOUAS, Jérôme MARROT, Greta BALAN,
Olga GARBUSZ, Ionel HUMELNICU, Sébastien FLOQUET
and Aurelian GULEA**

Moldova State University, Republic of Moldova (coordonator)
Lavoisier Institute à Versailles, University of Versailles, University Paris-Saclay, France
"Alexandru Ioan Cuza" University of Iasi, Romania
"Nicolae Testemiteanu" State University of Medicine and Pharmacy, Republic of Moldova
Institute of Zoology, Republic of Moldova

**INTERNATIONAL EXHIBITION INVENTCOR
DEVA 2020**





SALONUL INTERNAȚIONAL AL CERCETĂRII ȘTIINȚIFICE, INOVĂRII ȘI INVENTICII

PRO INVENT

EDIȚIA XIX, 20-22 OCTOMBRIE 2021
CLUJ-NAPOCA



DIPLOMA

DE EXCELENȚĂ
ȘI MEDALIA DE AUR

Se acordă **Aurelian GULEA, Victor ȚAPCOV, Diana CEBOTARI, Greta BĂLAN, Olga BURDUNIUC, Vasile LOZAN, Valeriu RUDIC**

De la **Universitatea de Stat din Moldova (Chișinău)**

Pentru **NOU AGENT ANTIFUNGIC SINTETIC**

PREȘEDINTELE SALONULUI,
Prof. dr. ing. VASILE ȚOPA
Rector al Universității Tehnice din Cluj-Napoca



PREȘEDINTELE JURIULUI,
Prof. dr. ing. RADU MUNTEANU

Radu Munteanu



SALONUL INTERNAȚIONAL AL CERCETĂRII ȘTIINȚIFICE, INOVĂRII ȘI INVENTICII

PRO INVENT

EDIȚIA XIX, 20-22 OCTOMBRIE 2021
CLUJ-NAPOCA



DIPLOMA

DE EXCELENȚĂ
ȘI MEDALIA DE AUR

Se acordă **Aurelian GULEA; Roman RUSNAC; Greta BĂLAN; Anna RUSNAC; Nicoleta NICOLENCO; Victor ȚAPCOV**

De la **Universitatea de Stat din Moldova (Chișinău)**

Pentru **UTILIZAREA NITRATO-[N-CICLOHEXIL-N'-(PIRIDIN-2-ILMETILIDEN) CARBAMOHDRAZONTIOATO] CUPRU ÎN CALITATE DE INHIBITOR AL PROLIFERĂRII BACTERIILOR DIN SPECIA ACINETOBACTER BAUMANNII**

PREȘEDINTELE SALONULUI,
Prof. dr. ing. VASILE ȚOPA
Rector al Universității Tehnice din Cluj-Napoca



PREȘEDINTELE JURIULUI,
Prof. dr. ing. RADU MUNTEANU

Radu Munteanu

Expoziția Internațională Specializată

„INFOINVENT”

Ediția a XVII-a

DIPLOMĂ

MEDALIA DE AUR

se acordă

Aurelian Gulea, Roman Rusnac, Greta Bălan, Anna Rusnac,
Nicoleta Nicolenco, Victor Țapcov

pentru

Utilizarea nitrato-[n-ciclohexil-n'-(piridin-2-ilmetiliden)
carbamoimidazolato] cupru în calitate de inhibitor al proliferației
bacteriilor din specia *Acinetobacter baumannii*



Eugeniu RUSU,
Președintele
Comitetului organizatoric



Svetlana COJOCARU,
Președintele Juriului

17-20 noiembrie 2021,
Chișinău, Republica Moldova

DIPLOMA



International Exhibition INVENTCOR
IInd edition, 16-18.12.2021, Deva, Romania



AWARDED FOR

USE OF
NITRATO-[N-CYCLOHEXYL-N'-(PYRIDIN-2-YLMETHYLIDENE)
CARBAMOHDRAZONETHIOATO] COPPER AS AN INHIBITOR
OF THE REPRODUCTION OF BACTERIA OF THE SPECIES
ACINETOBACTER BAUMANNII

MD 4761/05.03.2020

TO

**Aurelian GULEA, Roman RUSNAC, Greta BĂLAN,
Anna RUSNAC, Nicoleta NICOLENCO, Victor ȚAPCOV**

MOLDOVA STATE UNIVERSITY

Salon president,

Associate Professor Corneliu BIRTOK BĂNEASĂ

Jury president,

Professor Aurel Mihail ȚÎȚU







Expoziția Internațională Specializată

„INFOINVENT”

Ediția a XVI-a

DIPLOMĂ

MEDALIA DE ARGINT

se acordă

AURELIAN GULEA, OLGA BURDUNIUC, GRETA BĂLAN,
VICTOR ȚAPCOV, ROMAN RUSNAC, VALERIU RUDIC

pentru

UTILIZAREA N-CICLOHEXIL-2-[1-(PIRIDIN-2-IL)ETILIDEN]HIDRAZINCARBO-
TIOAMIDEI ÎN CALITATE DE INHIBITOR AL PROLIFERĂRII MICROORGANIS-
MELOR GRAM-POZITIVE ȘI FUNGILOR DIN SPECIA *CANDIDA ALBICANS*



PREȘEDINTELE
COMITETULUI ORGANIZATORIC

PREȘEDINTELE JURIULUI

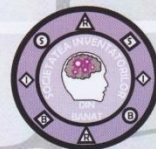
20-23 noiembrie 2019,
Chișinău, Republica Moldova



SALONUL INTERNAȚIONAL DE

**INVENȚII
INOVAȚII**

„TRAIAN VUIA” TIMIȘOARA



Diplomă

SE ACORDĂ



MEDALIA
DE ARGINT

pentru invenția

**SINTEZA ȘI CARACTERIZAREA NOILOR COMPUȘI DE
COORDONARE A METALELOR DE TRANZIȚIE PENTRU
APLICAȚII ÎN BIOLOGIE**

a u t o r i

*Roman RUSNAC, Diana CEBOTARI, Arcadie FUIOR, Mohamed HAOUAS,
Jerôme MARROT, Greta BALAN, Olga GARBUZ, Ionel HUMELNICU, Sébastien
FLOQUET, Aurelian GULEA*

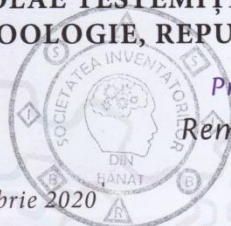
i n s t i t u Ț i a

**INSTITUTUL LAVOISIER DIN VERSAILLES, UNIVERSITATEA DIN
VERSAILLES, UNIVERSITATEA PARIS-SACLAY, FRANȚA, UNIVERSITATEA
„ALEXANDRU IOAN CUZA” DIN IAȘI, ROMÂNIA UNIVERSITATEA DE STAT DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE „NICOLAE TESTEMIȚEANU”,
REPUBLICA MOLDOVA, INSTITUTUL DE ZOOLOGIE, REPUBLICA MOLDOVA**

*Președinte juriu
Camelia MARINESCU*

*Președinte salon
Remi RĂDULESCU*

Data 15 octombrie 2020



Expoziția Internațională Specializată

„INFOINVENT”

Ediția a XVII-a

DIPLOMĂ

MEDALIA DE ARGINT

se acordă

Aurelian Gulea, Greta Bălan,
Ianina Ulchina, Vasilii Graur, Victor Țapcov

pentru

Nou agent antibacterial împotriva *Bacillus cereus* și *Bacillus subtilis*



Eugeniu RUSU,
Președintele
Comitetului organizatoric



Svetlana COJOCARU,
Președintele Juriului

17-20 noiembrie 2021,
Chișinău, Republica Moldova

Anexa 14. Medalii de bronz



Anexa 15. Acte de implementare

	Instituție Publică USMF „Nicolae Testemițanu” din Republica Moldova Institutul Național de Cercetare în Medicină și Sănătate	Pag. 6 / 6
<p>APROB</p> <p>Prorector pentru activitate de cercetare, USMF „Nicolae Testemițanu” din RM academician al AȘM, prof. univ., dr. hab. șt. med.  Stanislav GROPPA 2021</p> <p></p> <p>ACTUL nr. 26 DE IMPLEMENTARE A INOVAȚIEI (în procesul științifico-practic)</p> <ol style="list-style-type: none">Denumirea ofertei pentru implementare: PROCEDU DE DETERMINARE A ACTIVITĂȚII ANTICOMPLEMENTARE A MICROORGANISMELOR.Autori: BĂLAN Greta, dr. șt. med., conf. univ., BURDUNIUC Olga, dr. șt. med., conf. cercet., RUDIC Valeriu, academician AȘM, dr. hab. șt. biol., prof. univ.Numărul inovației: Nr. 5842 din 05 mai 2021.Unde și când a fost implementată: Departamentul Medicină Preventivă, Disciplina de microbiologie și imunologie a USMF „Nicolae Testemițanu”, perioada 2018-2021.Eficacitatea implementării: Problema pe care o rezolvă, inovația constă în identificarea precisă și în timp util a agentului etiologic a bolilor transmisibile cu determinarea unui factor important de patogenitate în scopul indicării tratamentului țintit, monitorizarea eficacității terapiei antimicrobiene și diminuarea evoluției fenomenului RAM.Rezultatele: Proceduul propus permite estimarea unui factor important de persistență a microorganismelor care permite ajustarea tratamentului medicamentos prin indicarea medicației țintite, monitorizarea eficacității tratamentului și prognosticul evoluției bolii, diagnosticul și tratamentul pacienților cu infecții persistente, în special cei cu recidive frecvente. Propunerea este utilizată în practică Disciplinei de microbiologie și imunologie, Departamentul Medicină Preventivă. <p><i>Prezenta inovație este implementată conform descrierii în cerere.</i></p> <p>Șef Departament de Medicină Preventivă dr. șt. med., conf. univ.  Serghei CEBANU</p> <p>Șef Departament Cercetare, dr. hab. șt. med., conf. univ.  Elena RAEVSCHI</p> <p></p>		



APROB



Prorector pentru activitate de cercetare,
USMF „Nicolae Testemițanu” din RM
academician al AȘM,
prof. univ., dr. hab. șt. med.

Stanislav GROPPA
2021

ACTUL nr. 29
DE IMPLEMENTARE A INOVAȚIEI
(în procesul științifico-practic)

1. Denumirea ofertei pentru implementare: **PROCEDEU DE DETERMINARE A ACTIVITĂȚII ANTILIZOZIM A MICROORGANISMELOR.**
2. **Auții:** BĂLAN Greta, dr. șt. med., conf. univ., BURDUNIUC Olga, dr. șt. med., conf. cercet., GUȚU Luminița, dr. șt. med., conf. univ., RÎMIȘ Constantin, dr. șt. med., conf. univ.
3. Numărul inovației: *Nr.:5845 din 07 mai 2021.*
4. **Unde și când a fost implementată:** Departamentul Medicină Preventivă, Disciplina de microbiologie și imunologie a USMF „Nicolae Testemițanu”, perioada 2018-2021.
5. **Eficacitatea implementării:** Problema pe care o rezolvă inovația constă în identificarea precisă și în timp util a agentului etiologic a maladiilor transmisibile cu determinarea unui factor important de patogenitate în scopul indicării tratamentului țintit, monitorizarea eficacității terapiei antimicrobiene și diminuarea evoluției fenomenului de rezistență la antimicrobiene.
6. **Rezultatele:** Procedul propus permite estimarea unui factor important de persistență a microorganismelor care permite ajustarea tratamentului medicamentos prin indicarea medicației țintite, monitorizarea eficacității tratamentului și prognosticul evoluției maladiei, diagnosticul și tratamentul pacienților cu infecții persistente, în special cei cu recidive frecvente. Propunerea este utilizată în practică Disciplinei de microbiologie și imunologie, Departamentul Medicină Preventivă.

Prezenta inovație este implementată conform descrierii în cerere.

Sef departament,
Departament de Medicină Preventivă
dr. șt. med., conf. univ.

Serghei CEBANU

Șef Departament Cercetare,
dr. hab. șt. med., conf. univ.

Elena RAEVSCHI

Coordonat:
E. Groza E. Groza



APROB

Prorector pentru activitate de cercetare,
USMF „Nicolae Testemițanu” din RM
academician al AȘM,

prof. univ., dr. hab. șt. med.

Stanislav GROPPA

2021



ACTUL nr. 28

DE IMPLEMENTARE A INOVAȚIEI

(în procesul științifico-practic)

1. **Denumirea ofertei pentru implementare:** GHID PRIVIND MANAGEMENTUL ULCERULUI TROFIC INFECTAT.
2. **Autori:** BĂLAN Greta, dr. șt. med., conf. univ., RUDIC Valeriu, academician AȘM, dr. hab. șt. biol., prof. univ.
3. **Numărul inovației:** Nr.: 5844 din 06 mai 2021.
4. **Unde și când a fost implementată:** Departamentul Medicină Preventivă, Disciplina de microbiologie și imunologie a USMF „Nicolae Testemițanu”, perioada 2019-2021.
5. **Eficacitatea implementării:** Problema pe care o rezolvă inovația constă în creșterea preciziei diagnosticului de laborator, selectarea terapiei antimicrobiene adecvate, monitorizarea eficacității tratamentului și prognosticul evoluției videcării ulcerelor trofice, evitarea eșecurilor terapeutice și diminuarea evoluției fenomenului de rezistență la antimicrobiene.
6. **Rezultatele:** Ghidul propus permite managementul adecvat al ulcerului trofic infectat care prevede recoltarea corectă a probelor pentru investigarea microbiologică precum și transportarea lor în timp util. Interpretarea corectă a rezultatelor investigațiilor de laborator, conlucrarea dintre medicul clinicist și medicul microbiolog oferă posibilitatea de a lua decizii corecte privind tratamentul ulcerului trofic și reducerea dezvoltării rezistenței microorganismelor la antimicrobiene. Propunerea este utilizată în practică Disciplinei de microbiologie și imunologie, Departamentul Medicină Preventivă.

Prezenta inovație este implementată conform descrierii în cerere.

Sef departament,
Departamentul Medicină Preventivă
dr. șt. med., conf. univ.

Serghei CEBANU

Șef Departament Cercetare,
dr. hab. șt. med., conf. univ.

Elena RAEVSCHI

Coordonat:
E. Groza

MINISTERUL SĂNĂTĂȚII,
MUNCII ȘI PROTECȚIEI SOCIALE
AL REPUBLICII MOLDOVA
INSTITUȚIA MEDICO-SANITARĂ
PUBLICĂ „CENTRUL DE SĂNĂTATE
CĂLĂRAȘI”

4400, or. Călărași, str. Bojole nr.1
tel.(0244)2.26.60/fax: 2.08.01
e-mail: escalarasi@ms.md
web:escalarasi.md



МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ,
ТРУДА И СОЦИАЛЬНОЙ ЗАЩИТЫ
РЕСПУБЛИКИ МОЛDOVA
ПУБЛИЧНОЕ МЕДИКО-САНИТАРНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ

ЦЕНТР ЗДОРОВЬЯ КЭЛЭРАШЬ

4400, г. Кэлэрашь, ул. Божоле 1
тел.(0244)2.26.60/факс: 2.08.01
e-mail: escalarasi@ms.md
web:escalarasi.md

nr. 0231/811 din 17.09.2021

APROB
Director IMSI

V. Triboi



ACT DE IMPLEMENTARE

1. **Denumirea ofertei pentru implementare:** „GHID PRIVIND MANAGEMENTUL ULCERULUI TROFIC INFECTAT”.
2. **Autori:** BĂLAN Greta, dr. șt. med., conf. univ., RUDIC Valeriu, academician AȘM, dr. hab. șt. biol., prof. univ.
3. **Numărul inovației:** Nr. 5844 din 06 mai 2021.
4. **Unde și când a fost implementată:** Centrul Medicilor de Familie Călărași.
5. **Eficiența implementării:** Problema pe care o rezolvă inovația constă în creșterea preciziei diagnosticului de laborator, selectarea terapiei antimicrobiene adecvate, monitorizarea eficacității tratamentului și prognosticul evoluției vindecării ulcerului trofic, evitarea eșecurilor terapeutice și diminuarea evoluției fenomenului de rezistență la antimicrobiene.
6. **Rezultatele:** Ghidul propus permite managementul adecvat al ulcerului trofic infectat care prevede recoltarea corectă a probelor pentru investigarea microbiologică precum și transportarea lor în timp util. Interpretarea corectă a rezultatelor investigațiilor de laborator, conlucrarea dintre medicul clinicist și medicul microbiolog oferă posibilitatea de a lua decizii corecte privind tratamentul ulcerului trofic și reducerea dezvoltării rezistenței microorganismelor la antimicrobiene. Ghidul este adresat personalului medical și este utilizat în practica medicilor de familie CMF Călărași.

Prezenta inovație este implementată conform descrierii în cerere.

Director IMSI



V. Triboi V. TRIBOI

MINISTERUL SĂNĂTĂȚII,
MUNCII ȘI PROTECȚIEI SOCIALE



МИНИСТЕРСТВО
ЗДРАВООХРАНЕНИЯ, ТРУДА И
СОЦИАЛЬНОЙ ЗАЩИТЫ

INSTITUȚIA MEDICO-SANITARĂ
PUBLICĂ SCMC „V.IGNATENCO”

str. Grenoble, nr.149
MD 2019, mun. Chișinău
Tel./fax +373 725766, +373 208850
e-mail: vignatenco@ms.md

ПУБЛИЧНОЕ МЕДИКО-САНИТАРНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ МДКБ ИМ.В.ИГНАТЕНКО

ул.Гренобля, № 149
МД 2019, г.Кишинев,
тел./факс +373 725766, +373 208850
e-mail: vignatenco@ms.md

21.05.2021 Nr. 01-9/226



APROB

Director IMSP
SCMC „Valentin Ignatenco”

A. HOLOSTENCO

ACT DE IMPLEMENTARE

- 1. Denumirea ofertei pentru implementare:** „GHID PRIVIND MANAGEMENTUL ULCERULUI TROFIC INFECTAT”.
- 2. Autori:** BĂLAN Greta, dr. șt. med., conf. univ., RUDIC Valeriu, academician AȘM, dr. hab. șt. biol., prof. univ.
- 3. Numărul inovației:** Nr. 5844 din 06 mai 2021.
- 4. Unde și când a fost implementată:** Laboratorul bacteriologic IMSP SCMC „Valentin Ignatenco”
- 5. Eficacitatea implementării:** Problema pe care o rezolvă inovația constă creșterea preciziei diagnosticului de laborator, selectarea terapiei antimicrobiene adecvate, monitorizarea eficacității tratamentului și prognosticul evoluției videcării ulcerelor trofice, evitarea eșecurilor terapeutice și diminuarea evoluției fenomenului de rezistență la antimicrobiene.
- 6. Rezultatele:** Ghidul propus permite managementul adecvat al ulcerului trofic infectat care prevede recoltarea corectă a probelor pentru investigarea microbiologică precum și transportarea lor în timp util. Interpretarea corectă a rezultatelor investigațiilor de laborator, conlucrarea dintre medicul clinicist și medicul microbiolog oferă posibilitatea de a lua decizii corecte privind tratamentul ulcerului trofic și reducerea dezvoltării rezistenței microorganismelor la antimicrobiene. Procedul este adresat medicilor de profil microbiologic și este utilizat în practica de laborator în IMSP SCMC „Valentin Ignatenco”.

Prezenta inovație este implementată conform descrierii în cerere.

Șef laborator bacteriologic,
IMSP SCMC „Valentin Ignatenco”

TALMAȚCHI Vladislav

MINISTERUL SĂNĂTĂȚII,
MUNCII ȘI PROTECȚIEI SOCIALE



МИНИСТЕРСТВО
ЗДРАВООХРАНЕНИЯ, ТРУДА И
СОЦИАЛЬНОЙ ЗАЩИТЫ

INSTITUȚIA MEDICO-SANITARĂ
PUBLICĂ SCMC „V.IGNATENCO”

ПУБЛИЧНОЕ МЕДИКО-САНИТАРНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ МДКБ им.В.ИГНАТЕНКО

str. Grenoble, nr.149
MD 2019, mun. Chișinău
Tel./fax +373 725766; +373 208850
e-mail: vignatenco@ms.md

ул.Гренобль, № 149
МД 2019, с.Кишинев,
тел./факс +373 725766; +373 208850
e-mail: vignatenco@ms.md

21-05-2021 Nr 01-9/226



APROB

Director IMSP
SCMC „Valentin Ignatenco”

A. HOLOSTENCO

ACT DE IMPLEMENTARE

- 1. Denumirea ofertei pentru implementare:** „PROCEDEU DE DETERMINARE A ACTIVITĂȚII ANTILIZOZIM A MICROORGANISMELOR”.
- 2. Autori:** BĂLAN Greta, dr. șt. med., conf. univ., BURDUNIUC Olga, dr. șt. med., conf. cercet., GUȚU Luminița, dr. șt. med., conf. univ., RÎMIȘ Constantin, dr. șt. med., conf. univ.
- 3. Numărul inovației:** Nr. 5845 din 07 mai 2021.
- 4. Unde și când a fost implementată:** Laboratorul bacteriologic IMSP SCMC „Valentin Ignatenco”
- 5. Eficacitatea implementării:** Procedul elaborat permite identificarea precisă și în timp util a agentului etiologic implicat în procesul infecțios cu determinarea unui factor de patogenitate în scopul indicării tratamentului țintit, monitorizarea eficacității terapiei antimicrobiene și diminarea evoluției fenomenului rezistenței la antimicrobiene.
- 6. Rezultatele:** Procedul propus estimează un factor important de persistență a microorganismelor care permite ajustarea tratamentului medicamentos prin indicarea medicației țintite, monitorizarea eficacității tratamentului și prognosticul evoluției maladiei, diagnosticul și tratamentul pacienților cu infecții persistente, în special cei cu recidive frecvente. Procedul este adresat medicilor de profil microbiologic și este utilizat în practica de laborator în IMSP SCMC „Valentin Ignatenco”.

Prezenta inovație este implementată conform descrierii în cerere.

Șef laborator bacteriologic,
IMSP SCMC „Valentin Ignatenco”

TALMAȚCHI Vladislav

MINISTERUL SĂNĂTĂȚII,
MUNCH ȘI PROTECȚIEI SOCIALE



МИНИСТЕРСТВО
ЗДРАВООХРАНЕНИЯ, ТРУДА И
СОЦИАЛЬНОЙ ЗАЩИТЫ

INSTITUȚIA MEDICO-SANITARĂ
PUBLICĂ SCMC „V.IGNATENCO”

str. Grenoble, nr.149
MD 2019, mun. Chișinău
Tel./fax +373 725766; +373 208850
e-mail: yignatenco@ms.md

ПУБЛИЧНОЕ МЕДИКО-САНИТАРНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ МДКБ им.В.ИГНАТЕНКО

ул.Гренобля, № 149
МД 2019, г Кишинев,
тел./факс +373 725766, +373 208850
e-mail: yignatenco@ms.md

21.05.2021 Nr. 01-9/226



APROB
Director IMSP
SCMC „Valentin Ignatenco”

A. HOLOSTENCO

ACT DE IMPLEMENTARE

- 1. Denumirea ofertei pentru implementare:** „PROCEDEU DE DETERMINARE A ACTIVITĂȚII ANTICOMPLEMENTARE A MICROORGANISMELOR”.
- 2. Autori:** BĂLAN Greta, dr. șt. med., conf. univ., BURDUNIUC Olga, dr. șt. med., conf. cercet., RUDIC Valeriu, academician AȘM, dr. hab. șt. biol., prof. univ.
- 3. Numărul inovației:** Nr. 5842 din 05 mai 2021.
- 4. Unde și când a fost implementată:** Laboratorul bacteriologic IMSP SCMC „Valentin Ignatenco”
- 5. Eficacitatea implementării:** Procedul elaborat permite identificarea precisă și în timp util a agentului etiologic implicat în procesul infecțios cu determinarea unui factor de patogenitate în scopul indicării tratamentului țintit, monitorizarea eficacității terapiei antimicrobiene și diminuarea evoluției fenomenului rezistenței la antimicrobiene.
- 6. Rezultatele:** Procedul propus estimează un factor important de persistență a microorganismelor care permite ajustarea tratamentului medicamentos prin indicarea medicației țintite, monitorizarea eficacității tratamentului și prognosticul evoluției maladiei, diagnosticul și tratamentul pacienților cu infecții persistente, în special cei cu recidive frecvente. Procedul este adresat medicilor de profil microbiologic și este utilizat în practica de laborator în IMSP SCMC „Valentin Ignatenco”.

Prezenta inovație este implementată conform descrierii în cerere.

Șef laborator bacteriologic,
IMSP SCMC „Valentin Ignatenco”

TALMAȚCHI Vladislav



MINISTERUL SĂNĂTĂȚII, MUNCII ȘI PROTECȚIEI SOCIALE
AL REPUBLICII MOLDOVA
Instituția Medico-Sanitară Publică
SPITALUL CLINIC REPUBLICAN „Timofei Moșneaga”

MD-2025, Chișinău, str. Nicolae Testemițanu, 29. Tel.: +373 022 72-85-85; 022 40-36-00; 022 40-34-85. Fax: +373 022 72-90-33.
<http://www.scr.md>, e-mail: scr@jms.md

Nr. 157/4450 din 25.06.2021
La nr. _____ din _____



[Signature] A. UNCUȚA

ACT DE IMPLEMENTARE

- Denumirea ofertei pentru implementare:** „GHID PRIVIND MANAGEMENTUL ULCERULUI TROFIC INFECTAT”.
- Autori:** BĂLAN Greta, dr. șt. med., conf. univ., RUDIC Valeriu, academician AȘM, dr. hab. șt. biol., prof. univ.
- Numărul inovației:** Nr. 5844 din 06 mai 2021.
- Unde și când a fost implementată:** Laboratorul bacteriologic IMSP SCR „Timofei Moșneaga”.
- Eficacitatea implementării:** Problema pe care o rezolvă inovația constă în creșterea preciziei diagnosticului de laborator, selectarea terapiei antimicrobiene adecvate, monitorizarea eficacității tratamentului și prognosticul evoluției vindecării ulcerelor trofice, evitarea eșecurilor terapeutice și diminuarea evoluției fenomenului de rezistență la antimicrobiene.
- Rezultatele:** Ghidul propus permite managementul adecvat al ulcerului trofic infectat care prevede recoltarea corectă a probelor pentru investigarea microbiologică precum și transportarea lor în timp util. Interpretarea corectă a rezultatelor investigațiilor de laborator, colaborarea dintre medicul clinicist și medicul microbiolog oferă posibilitatea de a lua decizii corecte privind tratamentul ulcerului trofic și reducerea dezvoltării rezistenței microorganismelor la antimicrobiene. Procedul este adresat personalului medical și este utilizat în practica de laborator în IMSP SCR „Timofei Moșneaga”.

Prezenta inovație este implementată conform descrierii în cerere.

Șef laborator bacteriologic,
IMSP SCR „Timofei Moșneaga” *[Signature]* SINIȚINA Iulia



MINISTERUL SĂNĂTĂȚII, MUNCII ȘI PROTECȚIEI SOCIALE
AL REPUBLICII MOLDOVA
Instituția Medico-Sanitară Publică
SPITALUL CLINIC REPUBLICAN „Timofei Moșneaga”

MD-2025, Chișinău, str. Nicolae Testemișanu, 29. Tel.: +373 022 72-85-85, 022 40-36-00, 022 40-34-85. Fax: +373 022 72-90-33.
<http://www.scr.md>, e-mail: scr@ms.md

Nr. 15/449 din 25.06.2021
La nr. _____ din _____



APROB

Director IMSP
SCR „Timofei Moșneaga”

A. UNCUȚA

ACT DE IMPLEMENTARE

- Denumirea ofertei pentru implementare:** „PROCEDEU DE DETERMINARE A ACTIVITĂȚII ANTICOMPLEMENTARE A MICROORGANISMELOR”.
- Autori:** BĂLAN Greta, dr. șt. med., conf. univ., BURDUNIUC Olga, dr. șt. med., conf. cercet., RUDIC Valeriu, academician AȘM, dr. hab. șt. biol., prof. univ.
- Numărul inovației:** Nr. 5842 din 05 mai 2021.
- Unde și când a fost implementată:** Laboratorul bacteriologic IMSP SCR „Timofei Moșneaga”.
- Eficacitatea implementării:** Procedul elaborat permite identificarea precisă și în timp util a agentului etiologic implicat în procesul infecțios cu determinarea unui factor de patogenitate în scopul indicării tratamentului țintit, monitorizarea eficacității terapiei antimicrobiene și diminuarea evoluției fenomenului rezistenței la antimicrobiene.
- Rezultatele:** Procedul propus estimează un factor important de persistență a microorganismelor care permite ajustarea tratamentului medicamentos prin indicarea medicației țintite, monitorizarea eficacității tratamentului și prognosticul evoluției maladiei, diagnosticul și tratamentul pacienților cu infecții persistente, în special cei cu recidive frecvente. Procedul este adresat medicilor de profil microbiologic și este utilizat în practica de laborator în IMSP SCR „Timofei Moșneaga”.

Prezenta inovație este implementată conform descrierii în cerere.

Șef laborator bacteriologic,
IMSP SCR „Timofei Moșneaga”

SINIȚINA Iulia



MINISTERUL SĂNĂTĂȚII, MUNCII ȘI PROTECȚIEI SOCIALE
AL REPUBLICII MOLDOVA
Instituția Medico-Sanitară Publică
SPITALUL CLINIC REPUBLICAN „Timofei Moșneaga”

MD-2025, Chișinău, str. Nicolae Testemițanu, 29. Tel.: +373 022 72-85-85, 022 40-36-00, 022 40-34-85. Fax: +373 022 72-90-33,
<http://www.scr.md>, e-mail: scr@ms.md

Nr. 157/1418 din 25.06.2021
La nr. _____ din _____



APROB
Director IMSP
SCR „Timofei Moșneaga”
A. UNCUȚA

ACT DE IMPLEMENTARE

- Denumirea ofertei pentru implementare:** „PROCEDEU DE DETERMINARE A ACTIVITĂȚII ANTILIZOZIM A MICROORGANISMELOR”.
- Autori:** BĂLAN Greta, dr. șt. med., conf. univ., BURDUNIUC Olga, dr. șt. med., conf. cercet., GUȚU Luminița, dr. șt. med., conf. univ., RÎMIȘ Constantin, dr. șt. med., conf. univ.
- Numărul inovației:** Nr. 5845 din 7 mai 2021.
- Unde și când a fost implementată:** Laboratorul bacteriologic IMSP SCR „Timofei Moșneaga”.
- Eficacitatea implementării:** Procedul elaborat permite identificarea precisă și în timp util a agentului etiologic implicat în procesul infecțios cu determinarea unui factor de patogenitate în scopul indicării tratamentului țintit, monitorizarea eficacității terapiei antimicrobiene și diminuarea evoluției fenomenului rezistenței la antimicrobiene.
- Rezultatele:** Procedul propus estimează un factor important de persistență a microorganismelor care permite ajustarea tratamentului medicamentos prin indicarea medicației țintite, monitorizarea eficacității tratamentului și prognosticul evoluției maladiei, diagnosticul și tratamentul pacienților cu infecții persistente, în special cei cu recidive frecvente. Procedul este adresat medicilor de profil microbiologic și este utilizat în practica de laborator în IMSP SCR „Timofei Moșneaga”.

Prezenta inovație este implementată conform descrierii în cerere.

Șef laborator bacteriologic,
IMSP SCR „Timofei Moșneaga”

209 -

SINIȚINA Iulia

APROB
Director IMSP
SCBI „Toma Ciorbă”

S. VASILIȚA



ACT DE IMPLEMENTARE

- 1. Denumirea ofertei pentru implementare:** „PROCEDEU DE DETERMINARE A ACTIVITĂȚII ANTICOMPLEMENTARE A MICROORGANISMELOR”.
- 2. Autori:** BĂLAN Greta, dr. șt. med., conf. univ., BURDUNIUC Olga, dr. șt. med., conf. cercet., RUDIC Valeriu, academician AȘM, dr. hab. șt. biol., prof. univ.
- 3. Numărul inovației:** Nr. 5842 din 05 mai 2021.
- 4. Unde și când a fost implementată:** Laboratorul bacteriologic IMSP SCBI „Toma Ciorbă”.
- 5. Eficacitatea implementării:** Procedul elaborat permite identificarea precisă și în timp util a agentului etiologic implicat în procesul infecțios cu determinarea unui factor de patogenitate în scopul indicării tratamentului țintit, monitorizarea eficacității terapiei antimicrobiene și diminarea evoluției fenomenului rezistenței la antimicrobiene.
- 6. Rezultatele:** Procedul propus estimează un factor important de persistență a microorganismelor care permite ajustarea tratamentului medicamentos prin indicarea medicației țintite, monitorizarea eficacității tratamentului și prognosticul evoluției maladiei, diagnosticul și tratamentul pacienților cu infecții persistente, în special cei cu recidive frecvente. Procedul este adresat medicilor de profil microbiologic și este utilizat în practica de laborator în IMSP SCBI „Toma Ciorbă”.

Prezenta inovație este implementată conform descrierii în cerere.

Șef laborator bacteriologic,
IMSP SCBI „Toma Ciorbă”



COTOS Viorica

MINISTERUL SĂNĂTĂȚII,
MUNCII ȘI PROTECȚIEI SOCIALE
AL REPUBLICII MOLDOVA
INSTITUȚIA MEDICO-SANITARĂ
PUBLICĂ SPITALUL RAIONAL
CĂLĂRAȘI

str. Testemișanu nr.59
MD-4400, or. Călărași,
tel/ fax. +373244.2.24.48
www.srcalarasi.md
e-mail: srcalarasi@ms.md



МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ,
ТРУДА И СОЦИАЛЬНОЙ ЗАЩИТЫ
РЕСПУБЛИКИ МОЛДОВА
ПУБЛИЧНОЕ МЕДИКО-САНИТАРНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ
РАЙОННАЯ БОЛЬНИЦА КЭЛЭРАШЬ

ул. Тестемішану 59
MD-4400, г. Кэлэрашъ,
tel/ fax. +373244.2.24.48
www.srcalarasi.md
e-mail: srcalarasi@ms.md

nr. 01.11/725 din 29.04.2021

APROB
Director IMSP
Spitalul Raional Călărași

S. Bobescu

ACT DE IMPLEMENTARE

- Denumirea ofertei pentru implementare:** „GHID PRIVIND MANAGEMENTUL ULCERULUI TROFIC INFECTAT”.
- Autori:** BĂLAN Greta, dr. șt. med., conf. univ., RUDIC Valeriu, academician AȘM, dr. hab. șt. biol., prof. univ.
- Numărul inovației:** Nr. 5844 din 06 mai 2021.
- Unde și când a fost implementată:** Secția chirurgie IMSP Spitalul Raional Călărași.
- Eficacitatea implementării:** Problema pe care o rezolvă inovația constă în creșterea preciziei diagnosticului de laborator, selectarea terapiei antimicrobiene adecvate, monitorizarea eficacității tratamentului și prognosticul evoluției vindecării ulcerului trofic, evitarea eșecurilor terapeutice și diminuarea evoluției fenomenului de rezistență la antimicrobiene.
- Rezultatele:** Ghidul propus permite managementul adecvat al ulcerului trofic infectat care prevede recoltarea corectă a probelor pentru investigarea microbiologică precum și transportarea lor în timp util. Interpretarea corectă a rezultatelor investigațiilor de laborator, conlucrarea dintre medicul clinicist și medicul microbiolog oferă posibilitatea de a lua decizii corecte privind tratamentul ulcerului trofic și reducerea dezvoltării rezistenței microorganismelor la antimicrobiene. Ghidul este adresat medicilor de profil chirurgical și este utilizat în practica IMSP Spitalul Raional Călărași.

Prezenta inovație este implementată conform descrierii în cerere.

Secție chirurgie
IMSP Spitalul Raional Călărași



Veveriță Ion

APROB
Director IMSP
SCBI „Toma Ciorbă”



S. VASILIȚA

ACT DE IMPLEMENTARE

1. **Denumirea ofertei pentru implementare:** „PROCEDEU DE DETERMINARE A ACTIVITĂȚII ANTILIZOZIM A MICROORGANISMELOR”.
2. **Autori:** BĂLAN Greta, dr. șt. med., conf. univ., BURDUNIUC Olga, dr. șt. med., conf. cercet., GUȚU Luminița, dr. șt. med., conf. univ., RÎMIȘ Constantin, dr. șt. med., conf. univ.
3. **Numărul inovației:** Nr. 5845 din 07 mai 2021.
4. **Unde și când a fost implementată:** Laboratorul bacteriologic IMSP SCBI „Toma Ciorbă”.
5. **Eficacitatea implementării:** Procedul elaborat permite identificarea precisă și în timp util a agentului etiologic implicat în procesul infecțios cu determinarea unui factor de patogenitate în scopul indicării tratamentului țintit, monitorizarea eficacității terapiei antimicrobiene și diminarea evoluției fenomenului rezistenței la antimicrobiene.
6. **Rezultatele:** Procedul propus estimează un factor important de persistență a microorganismelor care permite ajustarea tratamentului medicamentos prin indicarea medicației țintite, monitorizarea eficacității tratamentului și prognosticul evoluției maladiei, diagnosticul și tratamentul pacienților cu infecții persistente, în special cei cu recidive frecvente. Procedul este adresat medicilor de profil microbiologic și este utilizat în practica de laborator în IMSP SCBI „Toma Ciorbă”.

Prezenta inovație este implementată conform descrierii în cerere.

Șef laborator bacteriologic
IMSP SCBI „Toma Ciorbă”



COTOS Viorica



APROB
Director IMSP
SCBI „Toma Ciorbă”
S. VASILIȚA

ACT DE IMPLEMENTARE

- 1. Denumirea ofertei pentru implementare:** „GHID PRIVIND MANAGEMENTUL ULCERULUI TROFIC INFECTAT”.
- 2. Autori:** BĂLAN Greta, dr. șt. med., conf. univ., RUDIC Valeriu, academician AȘM, dr. hab. șt. biol., prof. univ.
- 3. Numărul inovației:** Nr. 5844 din 06 mai 2021.
- 4. Unde și când a fost implementată:** Laboratorul bacteriologic IMSP SCBI „Toma Ciorbă”.
- 5. Eficacitatea implementării:** Problema pe care o rezolvă inovația constă în creșterea preciziei diagnosticului de laborator, selectarea terapiei antimicrobiene adecvate, monitorizarea eficacității tratamentului și prognosticul evoluției vindecării ulcerelor trofice, evitarea eșecurilor terapeutice și diminuarea evoluției fenomenului de rezistență la antimicrobiene.
- 6. Rezultatele:** Ghidul propus permite managementul adecvat al ulcerului trofic infectat care prevede recoltarea corectă a probelor pentru investigarea microbiologică precum și transportarea lor în timp util. Interpretarea corectă a rezultatelor investigațiilor de laborator, conlucrarea dintre medicul clinicist și medicul microbiolog oferă posibilitatea de a lua decizii corecte privind tratamentul ulcerului trofic și reducerea dezvoltării rezistenței microorganismelor la antimicrobiene. Procedul este adresat medicilor de profil microbiologic și este utilizat în practica de laborator în IMSP SCBI „Toma Ciorbă”.

Prezenta inovație este implementată conform descrierii în cerere.



Șef laborator bacteriologic,
IMSP SCBI „Toma Ciorbă”

COTOS Viorica

DECLARAȚIA PRIVIND ASUMAREA RĂSPUNDERII

Subsemnata, Bălan Greta, declar pe propria răspundere că materialele prezentate în teza de doctor habilitat sunt rezultatul propriilor cercetări și realizări științifice. Conștientizez că, în caz contrar, urmează să suport consecințele în conformitate cu legislația în vigoare.

Bălan Greta

Semnătura

Data: 10 ianuarie 2022

CURRICULUM VITAE



INFORMAȚII PERSONALE

Nume / Prenume **Greta Bălan**

Adresă(e) Str. Constantin Vârnăv nr. 19, bl. 2, MD 2025, Chișinău, Republica Moldova

Telefon(oane) (+373 22) 20 54 61(serviciu) Mobil: (+373 69) 186619

E-mail(uri) greta.balan@usmf.md

Naționalitate Republica Moldova

Data nașterii 06 septembrie 1973

Sex Feminin

Titlul științific Doctor în științe medicale, diploma seria DR nr. 0919, eliberată la 26 februarie 2009.

Titlul științifico-didactic Conferențiar universitar, diploma seria diploma seria CU nr. 1062 eliberată la 26 ianuarie 2015.

EXPERIENȚA PROFESIONALĂ

Perioada 2020- prezent

Funcția sau postul ocupat Conferențiar universitar, Departamentul Medicină Preventivă, Disciplina de microbiologie și imunologie

Numele și adresa angajatorului Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”, Republica Moldova, bd. Ștefan cel Mare și Sfânt, 165, MD-2004, Chișinău, Republica Moldova

Perioada 2018- 2019

Funcția sau postul ocupat Post-doctorat

Perioada 2012-2018

Funcția sau postul ocupat Conferențiar universitar, Catedra de microbiologie și imunologie

Numele și adresa angajatorului Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”, Republica Moldova, bd. Ștefan cel Mare și Sfânt, 165, MD-2004, Chișinău, Republica Moldova

Perioada 2018- prezent

Funcția sau postul ocupat Medic bacteriolog, Laboratorul microbiologic.

Numele și adresa angajatorului Agenția Națională pentru Sănătate Publică, Republica Moldova, str. Gh. Asachi 67a, MD-2028, Chișinău, Republica Moldova

Perioada 2011- 2018

Funcția sau postul ocupat Medic bacteriolog, Laboratorul boli extrem de contagioase, diareice acute și zooantroponozelor.

Numele și adresa angajatorului Agenția Națională pentru Sănătate Publică, Republica Moldova, str. Gh. Asachi 67a, MD-2028, Chișinău, Republica Moldova

Perioada 2000- 2012

Funcția sau postul ocupat Asistent universitar, Catedra microbiologie, virusologie și imunologie

Numele și adresa angajatorului Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”, Republica Moldova, bd. Ștefan cel Mare și Sfânt, 165, MD-2004, Chișinău, Republica Moldova

EDUCAȚIE ȘI FORMARE

Perioada 2014 - 2016

Calificarea / diploma obținută Diplomă de Master în Sănătate Publică, seria AS nr. 001166, eliberată la 01.03.2018.

Disciplinele principale studiate Teza „Managementul infecțiilor de tract urinar asociate cateterizării urinare”.

Numele și tipul instituției de învățământ Școala de Management în Sănătate Publică, USMF „Nicolae Testemițanu”, Republica Moldova, bd. Ștefan cel Mare și Sfânt, 165, MD-2004, Chișinău, Republica Moldova

Perioada 2006-2008

Calificarea / diploma obținută Studii prin rezidențiat, specialitatea Microbiologie, Diplomă de licență Seria AL nr. 002923. Eliberată la 01 octombrie 2008.

Disciplinele principale studiate Microbiologie/Medic microbiolog

Numele și tipul instituției de învățământ Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”, Republica Moldova, bd. Ștefan cel Mare și Sfânt, 165, MD-2004, Chișinău, Republica Moldova

Perioada 1998-2000

Calificarea / diploma obținută Diplomă de magistru în profilul Microbiologie. Seria AM, nr 0000509. Eliberată la 29.09.2020.

Disciplinele principale studiate Microbiologie

Numele și tipul instituției de învățământ Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”, Republica Moldova, bd. Ștefan cel Mare și Sfânt, 165, MD-2004, Chișinău, Republica Moldova

Perioada 1992-1998

Calificarea / diploma obținută Specialitatea Medicină Preventivă. Diplomă seria AS nr. 001166. Eliberată la 30 iunie 1998.

Disciplinele principale studiate Calificarea medic igienist-epidemiolog.

Numele și tipul Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”,
instituției de Republica Moldova, bd. Ștefan cel Mare și Sfânt, 165, MD-2004,
învățământ Chișinău, Republica Moldova

STAGII

- Septembrie - Noiembrie 2020** Curs de instruire online „The global challenge of vector borne diseases and how to control them”. London School of Hygiene & Tropical Medicine, ARCTEC, Liverpool School of Tropical Medicine and IVCC.
- August - Septembrie 2020** Curs de instruire online „The role of diagnostics in the antimicrobial resistance response”. London School of Hygiene & Tropical Medicine.
- Martie 2019** Curs de instruire „Biorisk Management”, „Biological Spill Response Training”, Asociația de Biosiguranță din Asia Centrală și Caucaz, Tashkent, Uzbekistan.
- Martie 2019** Stagiul de perfecționare în microbiologie. Catedra de microbiologie, Universitatea de Medicină și Farmacie Craiova. Craiova, România.
- Iunie 2017** Curs de instruire „Higher Education Development”. KTH Royal Institute of Technology, Stockholm, Suedia.
- Mai 2016** Curs de instruire „Laboratory Quality Management System”. WHO Regional Office for Europe, Division of Communicable Diseases, Health Security and Environment. Copenhaga, Danemarca.
- Mai 2015** Curs de instruire „MPH 772 International Health Exchange Program”. Universitatea Old Dominion, SUA.
- Martie - Aprilie 2015** Curs de instruire „Provision of specialized and technical training to enhance the First Response capabilities”. Centrul de Excelență CBRN, Belgrad, Serbia.
- Aprilie 2013** Stagiul de perfecționare în microbiologie, Catedra de microbiologie, Universitatea de Medicină și Farmacie din Târgu Mureș, România.
- Septembrie 2011** Curs de perfecționare „Evaluarea rezultatelor academice și ale competențelor studenților”, Centrul Educațional PRO DIDACTICA, Chișinău, Republica Moldova.
- 2011** Cursul de perfecționare „Microbiologia infecțiilor sexual transmisibile”, USMF „Nicolae Testemițanu”, Chișinău, Republica Moldova.
- Mai 2009** Stagiul de perfecționare în microbiologie, Catedra de microbiologie, UMP „Iuliu Hatieganu”, Cluj-Napoca, Romania.
- 2007** Cursul de perfecționare „Microbiologia clinică asistată pe calculator”, USMF „Nicolae Testemițanu”, Chișinău, Republica Moldova.
- 2007** Cursul de perfecționare „Microbiologia clinică și epidemiologia rezistenței la antibiotice”, USMF „Nicolae Testemițanu”, Chișinău, Republica Moldova.
- 2005** Cursul de perfecționare „Microbiologia clinică”, USMF „Nicolae Testemițanu”, Chișinău, Republica Moldova.
- Iulie-Octombrie 2004** Centrul Educațional PRO DIDACTICA curs de perfecționare „Strategii Lectură și Scriere pentru Dezvoltarea Gândirii Critice”, Chișinău, Republica Moldova
- 2004** Cursul de perfecționare „Microbiologia infecțiilor intestinale”. USMF „Nicolae Testemițanu”, Chișinău, Republica Moldova.

INFORMAȚII SUPLIMENTARE

Participarea la Participări în proiecte internaționale proiecte

2022-2023 Determination of Bioactivity and Antimyeloma Properties of Various Cyanobacteria.

2022-2025 Phage treatment and wetland technology as intervention strategy to prevent dissemination of antibiotic resistance in surface waters.

2020-2021 Synthèse et caractérisations de nouveaux complexes de coordination pour des applications biologiques.

2019-2020 Changement climatique: impact et conséquences sur la santé, prévention et adaptation.

Participări în proiecte naționale

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

2018-2019 Diminuarea contaminării materiei prime și produselor alimentare cu microorganisme patogene.

2015-2018 Studierea particularităților clinico-epidemiologice ale infecțiilor respiratorii virale acute cu optimizarea măsurilor de control și răspuns.

2011-2014 Optimizarea supravegherii epidemiologice la unele maladii zooantroponoze cu elaborarea măsurilor de control și răspuns, Subtema: Studiul particularităților circulației salmonelelor cu optimizarea supravegherii epidemiologice.

2009-2010 Compuși cu proprietăți antimicrobiene și antifungice concomitente.

Recunoașterea Premii, mențiuni, distincții:

profesională Medalia de aur. International Exhibition INVENTCOR IInd Edition. Deva, Romania, 16-18 decembrie 2021.

2 medalii de aur. PRO INVENT ediția a XIX-a, Cluj-Napoca, România, 20-22 octombrie 2021.

2 medalii de argint. Inventica 2021, Iași, Romania, 23-25 iunie 2021.

Medalie de aur și argint. Innovation and Creative Education Fair for Youth ICE-USV – Vth Edition. Suceava, Romania, mai 2021.

Medalie de aur și diplomă de excelență. Euroinvent 2021, Iasi, Romania 22 mai 2021.

2 medalii de aur. International Exhibition. Deva, Romania, 17-19 decembrie 2020.

Diploma Ministerului Educației, Culturii și Cercetării din Republica Moldova, 2020.

Medalia de aur și argint. Salonul Internațional de Invenții și Inovații „Traian Vuia”, ediția a VI-a. Timișoara, România, 13-15 octombrie 2020.

Medalia de aur și argint. Innovation and Creative Education Fair for Youth ICE-USV – IVth Edition. Suceava, Romania, 3-5 septembrie 2020.

Medalia de aur. Inventica 2020, Iasi, Romania, 29-31 iunie 2020.

Medalia de aur. Euroinvent 2020, Iasi, Romania, 23 mai 2020.
 Medalie de argint. Infoinvent Ediția a XVI-a, Republica Moldova, Chișinău, 20-23 noiembrie 2019.
 Medalie de aur. Inventica 2019. Iasi, Romania 26-28 iunie 2019.
 Medalie de aur. Salonul Internațional de Invenții Inovații „Traian Vuia”. Timișoara, România 14 iunie 2019.
 Medalie de argint. 47^E Salon International des Inventions de Genève. Genève, 12 Avril, 2019.
 Diploma on behalf of the Scientific Community of Romania. 47th International Exhibition of Inventions Geneva. Genva, 12 April, 2019.
 Diplomă de excelență. PRO INVENT Ediția XVII. Cluj-Napoca, Romania 20-22 martie, 2019.
 Medalie de aur. Euroinvent 2019. Iasi, Romania 18 mai 2019.
 2 medalii de aur. Inventica 2018, Iasi, Romania 27-29 iunie 2018.
 Medalie de aur. Euroinvent 2018. Iasi, Romania, 19 mai 2018.
 Medalie de bronz. Euroinvent 2018, Iași, România 19 mai 2018.
 Medalie de aur. 46^E Salon International des Inventions de Genève. Genève, Avril, 2018.
 Diploma for high scientific and technological level of the invention on behalf of the Scientific Community of Romania. 46th International Exhibition of Inventions Geneva. Genva, 13 April,, 2018.
 Medalie de aur. The World Exhibition on Inventions, Research and New Technologies. Valencia, Spain 8th of March 2018.
 Diploma de gradul III, Guvernul Republicii Moldova, 2015.
 Medalie de bronz. Expoziția internațională specializată INFOINVENT 2005. Chișinău, Republica Moldova, 9-12 noiembrie 2005.

APTITUDINI ȘI COMPETENȚE PERSONALE

Autor și coautor 188 publicații științifice (din ele 23 fără coautori), inclusiv: 35 articole în reviste științifice recenzate naționale, 19 articole în reviste editate în străinătate (din ele două cu IF:4.565), 4 recomandări metodice, 5 indicații metodice, 6 ghiduri, 8 certificate de inovator, 14 brevete de invenție.

Comunicări la foruri

- 2021** Conferință științifică națională cu participare internațională „One Health approach in a Changing World”, Chișinău.
- 2021** Conferință științifică națională cu participare internațională „Materiale avansate în biofarmaceutică și tehnică”, Chișinău.
- 2020** Congresul consacrat aniversării a 75-a de la formarea USMF „Nicolae Testemițanu”, Chișinău.
- 2019** Al VIII-lea Congres Național în Sănătate Publică și Management cu participare internațională. Chișinău.
- 2019** Zilele Universității de Medicină și Farmacie din Craiova a XLIX-a ediție. Craiova, România.

- 2018** VII Ежегодная Международная Научно-Практическая Конференция „Актуальные вопросы медицины”. Баку, Азербайджан.
- 2018** Technical University of Moldova International Conference, Fourth Edition „Modern Technologies in the Food Industry”, Chişinău.
- 2018** International Scientific Conference on Microbial Biotechnology (4th edition). Academy of Sciences of Moldova, Institute of Microbiology and Biotechnology. Chisinau.
- 2018** First Balkan Conference of Medical Mycology and Mycotoxicology „Balkan Fungus 2018”, Timișoara, România.
- 2016** International Scientific Conference on Microbial Biotechnology (3rd edition). Academy of Sciences of Moldova, Institute of Microbiology and Biotechnology. Chisinau.
- 2015** International Conference titled “Socio-psycho-medical changes in the lifestyles of the contemporary family”. Antropological Research and Studies. Bucharest, Romania.
- 2016** International Scientific Conference on Microbial Biotechnology (2nd edition). Academy of Sciences of Moldova, Institute of Microbiology and Biotechnology. Chisinau.
- 2014** 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.
- 2013** Congresul Specialiștilor din Domeniul Sănătății Publice și Managementului Sanitar din Republica Moldova, Chişinău.
- 2012** Conferința Științifico-Practică Națională cu Participare Internațională „Sănătatea copiilor și factorii exogeni de risc”, Chişinău.
- 2010** Conferința Științifico-Practică Națională cu Participare Internațională „Factorii de risc din mediu și sănătatea”. Chişinău.
- 2008** Congresul al VI-lea al Igieniștilor, Epidemiologilor și Microbiologilor din Republica Moldova. Chişinău.
- 2006** Conferința a IV-a a Infecționiștilor din Republica Moldova „Actualități în patologia infecțioasă și parazitară”. Chişinău.
- 2006** Conferinței Științifico-Practică „Profilaxia maladiilor – garanția sănătății”. Chişinău.
- Congresul al V-lea al Igieniștilor, Epidemiologilor și Microbiologilor din Republica Moldova. Chişinău.
- 2001-2017** Conferințele științifice anuale ale colaboratorilor IP USMF „Nicolae Testemițanu”, Chişinău, 2001-2017.

ALTE ACTIVITĂȚI

- 2020-prezent** Membru al Seminarului științific de profil din cadrul Institutului de Microbiologie și Biotehnologie la profilul 163. Biologie celulară, specialitatea 163.04. Microbiologie (Decizia Consiliului de Conducere al ANACEC nr. 13 din 30 octombrie 2020)
- 2020-prezent** Membru al Seminarului Științific Profilurile: 313. Imunologie, microbiologie, virusologie; 321. Medicină generală. Specialitățile: 313.02. Microbiologie, virusologie medicală; 321.09. Boli infecțioase, tropicale și parazitologie medicală (Decizia Consiliului de Conducere al ANACEC nr. 11 din 31 iulie 2020).

2020-prezent	Secretar științific al Seminarului Științific Profilul: 313. Imunologie, microbiologie, virusologie, Specialitățile 313.01. Imunologie; 313.02. Microbiologie, virusologie medicală (Decizia Consiliului de Conducere al ANACEC nr. 11 din 31 iulie 2020).
2019- prezent	Editor de specialitate a revistei One Health & Risk Management.
2017- prezent	Membru al Federației Internaționale al Asociațiilor de Biosiguranță (IBFA)
2017- prezent	Membru al Asociației Europene de Biosecuritate (EBSA)
2017- prezent	Secretar Asociația de Biosiguranță și Biosecuritate din Republica Moldova (ABBRM)
2016– 2020	Membru al Seminarului Științific de Profil la specialitățile 163.04 Microbiologie; 313.02 Microbiologie, virusologie medicală (Hotărârea CNAA nr. AT 5/4.1 din 6 octombrie 2016, Institutul de Microbiologie și Biotehnologie al AȘM).
2016– 2020	Membru al Seminarului Științific de Profil la specialitățile 313.01. Imunologie; 313.02. Microbiologie, virusologie medicală (Hotărârea CNAA nr. AT 4/4.4 din 5 iulie 2016, Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”).
2016– 2020	Membru al Seminarului Științific de Profil la specialitățile 313.01. Imunologie; 313.02. Microbiologie, virusologie medicală (Hotărârea CNAA nr. AT 4/4.4 din 5 iulie 2016, Instituția Medico-Sanitară Publică Institutul de Ftiziopneumologie „Chiril Draganiuc”).
2015– prezent	Membru al Societății Europene de Microbiologie Clinică și Boli Infecțioase (ESCMID).
2015– prezent	Membru al Asociației Interregionale pentru Microbiologie Clinică și Chimioterapie Antimicrobiană (Межрегиональная Ассоциация по Клинической Микробиологии и Антимикробной Химиотерапии).
2015– prezent	Membru al Societății Științifice a Epidemiologilor și Microbiologilor din Republica Moldova (EpiMicS).
Limba maternă	Română
Limbi străine cunoscute	Engleza (B1), Franceza (B1), Rusa (C2)
COMPETENȚE ȘI APTITUDINI ORGANIZATORIE/MANAGERIALE	<ul style="list-style-type: none"> • Capacitate de analiză și sinteză. • Lucru în echipă • Punctualitate • Colaborare națională și internațională
Competențe și aptitudini PC	Windows, MS Office applications: Word, Excel, Power Point
Data	28. 02. 2022