

**MINISTERUL SĂNĂTĂȚII AL REPUBLICII MOLDOVA
INSTITUȚIA PUBLICĂ UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ ȘI
FARMACIE „NICOLAE TESTEMIȚANU”**

Cu titlu de manuscris

CZU: [615.282.015.8:616.992.282+582.282.23](043.2)

BURDUNIUC Olga

**PRODUSE INOVAȚIONALE CU ACȚIUNE ANTIFUNGICĂ
ASUPRA UNOR AGENȚI CAUZALI AI MICOZELOR UMANE**

313.02 - MICROBIOLOGIE, VIRUSOLOGIE MEDICALĂ

Teză de doctor habilitat în științe medicale

Consultanți științifici:

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

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

Autor:

Burduniuc Olga, doctor în științe medicale, conferențiar cercetător

CHIȘINĂU, 2023

© Olga Burduniuc, 2023

CUPRINS

ADNOTARE.....	6
АННОТАЦИЯ 7	
SUMMARY.....	8
LISTA TABELELOR	9
LISTA FIGURILOR	12
LISTA ABREVIERILOR	17
INTRODUCERE.....	19
1. SINTEZA DATELOR ȘI EVOLUȚIA CERCETĂRILOR PRIVIND ETIOLOGIA, CLASIFICAREA, DIAGNOSTICUL ȘI STRATEGIILE TERAPEUTICE ÎN INFECȚIILE FUNGICE.....	33
1.1. Fungii de importanță medicală, caractere generale. Factorii de patogenitate și relevanța clinică.....	33
1.2. Concepte contemporane privind factorii de risc, etiologia și tipurile de infecții fungice..	38
1.3. Aspecte contemporane în epidemiologia infecțiilor fungice invazive.....	40
1.4. Diagnosticul de laborator al infecțiilor fungice invazive.....	43
1.5. Preparatele antifungice: viziuni moderne privind principiile de clasificare și mecanismele de acțiune	47
1.6. Actualități în abordarea rezistenței la preparatele antifungice.....	57
1.7. Strategii inovative în design-ul preparatelor antifungice.....	61
1.8. Concluzii la capitolul 1	66
2. MATERIALE ȘI METODE APLICATE ÎN CERCETARE	68
2.1. Caracteristica generală și etapizarea cercetării	68
2.2. Obiectele de studiu.....	71
2.3. Metode de cercetare	77
2.4. Procesarea și analiza matematico-statistică a materialului	94
2.5. Concluzii la capitolul 2	95
3. DISTRIBUȚIA LEVURILOR DIN GENUL CANDIDA ÎN FUNCȚIE DE BIOSUBSTRATURI, PONDEREA FACTORILOR DE PATOGENITATE ȘI REZISTENȚA LA ANTIFUNGICE	97
3.1. Prevalența și spectrul speciilor de <i>Candida</i> implicate în micozele umane.....	97
3.2. Evaluarea sensibilității la preparatele antifungice a levurilor din genul <i>Candida</i>	101
3.3. Cercetarea exprimării factorilor de patogenitate la tulpinile de <i>Candida</i> spp. izolate din biosubstraturi clinice.....	109
3.4. Concluzii la capitolul 3	118

4. ACTIVITATEA ANTIFUNGICĂ A UNOR NOI COMPUȘI CHIMICI ȘI BIOLOGICI DE INTERES FARMACEUTIC	120
4.1. Activitatea antifungică a compușilor noi asupra tulpinilor tip de fungi	120
4.2. Evaluarea acțiunii antifungice a compușilor chimici și biologici testați față de tulpinile izolate din biosubstraturi umane	133
4.3. Acțiunea sinergică a compușilor chimici și biologici testați asupra tulpinilor tip de fungi levuriformi	140
4.4. Evaluarea toxicității acute a compușilor chimici testați cu ajutorul testului de imobilizare a crustaceului <i>Daphnia magna</i>	155
4.5. Influența compușilor chimici și biologici testați, și a combinațiilor lor asupra factorilor de patogenitate ai <i>Candida albicans</i> și ai <i>Candida tropicalis</i>	158
4.6. Concluzii la capitolul 4	169
5. NANOPARTICULE DE ARGINT STABILIZATE CU DIVERȘI DERIVAȚI NATURALI ȘI PROPRIETĂȚILE LOR ANTIFUNGICE	171
5.1. Caracterizarea noilor nanosisteme antifungice bazate pe nanoparticule de argint generate din pululan, 6-carboxipululan și derivați celulozici.....	171
5.2. Screening-ul calitativ al sensibilității tulpinilor tip și al izolatelor clinice de fungi față de potențiala acțiune antifungică a nanoparticulelor de argint generate din polizaharide.....	182
5.3. Testarea activității antifungice a AgNPs în vederea determinării unor parametri cantitativi ai acțiunii antifungice (CMI) pe izolate clinice și pe tulpini de referință	187
5.4. Concluzii la capitolul 5	191
6. MODIFICAREA MARKERILOR STRESULUI OXIDATIV, SISTEMULUI ANTIOXIDANT ȘI A PATTERNULUI INFLAMATOR SUB INFLUENȚA COMPUȘILOR BIOLOGIC ACTIVI	192
6.1. Activitatea compușilor biologic activi asupra parametrilor stresului oxidativ și ai sistemului antioxidant	192
6.2. Modificarea nivelului parametrilor citokinelor proinflamatoare și antiinflamatoare	200
6.3. Analiza comparativă a parametrilor din loturile cercetate	204
6.4. Analiza corelațională în cadrul loturilor cercetate	213
6.5. Concluzii la capitolul 6	223
CONCLUZII GENERALE.....	225
BIBLIOGRAFIA	229
ANEXE.....	263
Anexa 1. Designul și compoziția chimică a compușilor sintetici luați în studiu.....	264
Anexa 2. Sensibilitatea la preparatele antifungice testate a celor patru specii de <i>Candida</i> cel mai frecvent izolate, intervalele MIC și valorile MIC50 și MIC90	282

Anexa 3. Exprimarea factorilor enzimatici de patogenitate ai tulpinilor clinice de <i>Candida</i> spp.	283
Anexa 4. Activitatea antifungică a compușilor chimici asupra micetelor levuriforme (μg/ml)..	284
Anexa 5. Activitatea antifungică a compușilor biologici (mg/mL)	288
Anexa 6. Efectul antifungic sinergic al combinațiilor dintre compușii chimici și biologici asupra tulpinilor de referință	289
Anexa 7. Activitatea antifungică a nanoparticulelor de argint (AgNPs) generate din pululan și din 6-carboxipululan asupra unor izolate clinice de fungi	290
Anexa 8. Statistica descriptivă a markerilor stresului oxidativ, sistemului antioxidant și patternului inflamator din loturile formate (Rstudio output).....	295
Anexa 9. Brevete de invenție.....	298
Anexa 10. Certificate de inovator.....	308
Anexa 11. Diplome de excelență la expoziții	311
Anexa 12. Medalii de aur	317
Anexa 13. Medalii de argint	328
Anexa 14. Medalii de bronz	331
Anexa 15. Ordin Dispoziția Ministerului Sănătății al Republicii Moldova nr-1 din 03.01.2022 „Cu privire la pilotarea Programului de utilizare rațională a antimicrobienei (stewardship antimicrobial)”	333
Anexa 16. Ordin Ministerului Sănătății al Republicii Moldova nr-388 din 27.05.2016 „Cu privire la instituirea Grupului de lucru intersectorial pentru promovarea proiectelor Strategiei naționale pentru supravegherea și combaterea rezistenței antimicrobiene”.....	336
Anexa 17. Ordinul Ministerului Sănătății, Muncii și Protecției Sociale nr.696 din 29.07.2020 „Cu privire la aprobarea implementarea Ghidului: Principii și proceduri în testarea microbiologică a hemoculturilor”	338
Anexa 18. Ordinul Ministerului Sănătății, Muncii și Protecției Sociale nr.651 din 09.07.2021 „Cu privire la aprobarea implementarea Ghidului: Asigurarea calității în diagnosticul microbiologic al infecțiilor tractului urinar”	339
Anexa 19. Ordinul Ministerului Sănătății, Muncii și Protecției Sociale nr.26 din 21.01.2021 „Cu privire la aprobarea Ghidului: Diagnosticul microbiologic al infecțiilor tractului respirator”	340
Anexa 20. Acte de implementare	341
DECLARAȚIA PRIVIND ASUMAREA RĂSPUNDERII	369
CURRICULUM VITAE	370

ADNOTARE
BURDUNIUC Olga
PRODUSE INOVAȚIONALE CU ACȚIUNE ANTIFUNGICĂ ASUPRA UNOR AGENȚI
CAUZALI AI MICOZELOR UMANE

Teză de doctor habilitat în științe medicale, Chișinău, 2023

Structura tezei: introducere, șase capitole, concluzii generale și recomandări practice, bibliografia din 334 de titluri, 20 de anexe, 228 de pagini de text de bază, 80 de figuri, 38 de tabele. Rezultatele obținute sunt publicate în 60 de lucrări științifice și științifico-metodice.

Cuvinte-cheie: fungi, factori de patogenitate, antifungice, nanoparticule de Ag.

Domeniul de studiu: microbiologie, virusologie medicală.

Scopul cercetării: evaluarea activității antifungice a unor noi compuși în vederea argumentării principiilor de elaborare a medicamentelor policomponente eficiente în terapia infecțiilor fungice.

Obiectivele cercetării: (1) Stabilirea diversității speciilor și sensibilității la antifungice a micetelor levuriforme izolate din biosubstraturi; (2) Evidențierea fenotipică a expresiei factorilor de patogenitate ai tulpinilor clinice de *Candida* spp; (3) Cercetarea potențialului antifungic al noilor compuși chimici, biologici, nanoparticulelor de Ag generate din derivați celulozici asupra tulpinilor de referință și clinice de micete levuriforme; (4) Analiza activității sinergice, caracterizarea efectelor antifungice ale compușilor monocompenți și policompenți; (5) Evaluare acțiunii compușilor testați față de exprimarea factorilor de patogenitate ai *Candida* spp; (6) Studierea influenței compușilor biologic activi asupra parametrilor biochimici.

Noutatea și originalitatea științifică: pentru prima dată a fost identificată, fundamentată științific activitatea antifungică, antioxidantă și imunomodulatoare a unor noi substanțe biologic active asupra micetelor levuriforme cu evidențierea proprietăților de inhibiție a expresiei factorilor de patogenitate și cu brevetarea în calitate de produse inovaționale cu acțiune antifungică.

Problema științifică soluționată: evaluată acțiunea antifungică a unor noi compuși chimici, biologici și a nanoparticulelor de Ag generate din derivați celulozici, ce servesc ca punct de plecare pentru crearea direcției științifice aplicative și a principiilor de sinteză a nanocompozitelor naturale și a produselor inovaționale combinate cu potențial de acțiune antifungică la costuri reduse.

Semnificația teoretică și valoarea aplicativă a lucrării: studiu realizat vine în consens cu agendele de cercetare strategică a inițiativelor internaționale în domeniu, cu politicile în domeniul sănătății publice, cu obiectivele strategice ale Planului Global de acțiune privind rezistența la antimicrobiene, oferind dovezi fiabile pentru dezvoltarea de alternative antifungice combinate cu valorificarea acestora în vederea obținerii unor noi forme farmaceutice pentru terapia infecțiilor fungice și crearea unui sistem de supraveghere a rezistenței la antifungice în Republica Moldova.

Implementarea rezultatelor științifice: rezultatele privind evidențierea expresiei factorilor enzimatici ai levurilor, ghidurile practice privind diagnosticul fungilor în biosubstraturi au fost implementate în activitatea laboratoarelor microbiologice din cadrul rețelei naționale publice și private, în procesul didactic de pregătire a cadrelor medicale în cadrul USMF „Nicolae Testemițanu”, în Centrul de excelență în medicină și farmacie „Raisa Pacalo”.

АННОТАЦИЯ БУРДУНЮК Ольга

ИННОВАЦИОННЫЕ ПРЕПАРАТЫ С ПРОТИВОГРИБКОВЫМ ДЕЙСТВИЕМ НА НЕКОТОРЫЕ ВОЗБУДИТЕЛИ МИКОЗОВ ЧЕЛОВЕКА

Диссертация доктора медицинских наук. Кишинев, 2023

Структура диссертации: введение, шесть глав, общие выводы и практические рекомендации, библиография из 334 наименований, 20 приложений, 228 страниц основного текста, 80 рисунков, 38 таблицы. Полученные результаты опубликованы в 60 научной и научно-методической статье.

Ключевые слова: грибы, факторы патогенности, противогрибковые препараты наночастиц серебра.

Область исследования: Микробиология, Медицинская вирусология.

Цель исследования: Оценка противогрибковых свойств и механизмов действия некоторых комплексных соединений с целью обоснования разработки новых противогрибковых формул и установления перспективы клинического применения.

Задачи исследования: (1) Установление видовое разнообразие, чувствительности к противогрибковым препаратам дрожжевых грибов, выделенных из биосубстратов; (2) Выделение фенотипической экспрессии факторов патогенности у клинических штаммов *Candida* spp (3) Исследование противогрибкового потенциала новых химических, биологических соединений, наночастиц серебра полученных из производных целлюлозы, на эталонных и клинических штаммах; (4) Анализ синергетической активности, характеризующей потенциальные противогрибковые эффекты монокомпонентных и поликомпонентных соединений; (5) Оценка действия тестируемых соединений на экспрессию факторов вирулентности; (6) Изучение влияния биологически соединений на биохимические показатели.

Научная новизна и оригинальность: Впервые была определена и научно обоснована противогрибковая, антиоксидантная и иммуномодулирующая активность новых биологически активных веществ в отношении дрожжевых грибов с выявлением свойств ингибирования экспрессии факторов вирулентности. Они запатентованы как инновационные препараты с противогрибковым действием.

Решенная научная задача: проведена оценка противогрибкового действия некоторых новых химических, биологических соединений, наночастиц Ag, полученных из производных целлюлозы, что послужило отправной точкой для создания прикладного научного направления и принципов синтеза природных наноконструкций и инновационных продуктов в сочетании с потенциалом противогрибкового действия при низких затратах.

Теоретическая значимость и прикладная ценность работы: проведенное исследование согласуется со стратегическими исследовательскими программами международных инициатив в данной области, политикой в области общественного здравоохранения, стратегическими целями Глобального Плана действий по борьбе с резистентностью к противомикробным препаратам, предоставляя надежные доказательства для разработки противогрибковых альтернатив в сочетании с их капитализацией с целью получения новых лекарственных форм для терапии грибковых инфекций и создания системы надзора за устойчивостью к противогрибковым препаратам в Республике Молдова.

Внедрение научных результатов: Результаты по выявлению экспрессии ферментативных факторов дрожжей, практические руководства по диагностике грибов в биосубстратах были внедрены в деятельность микробиологических лабораторий в рамках национальной государственной и частной сети, в дидактический процесс обучения медицинского персонала КГМУ "Николае Тестемицану", Центр передового опыта в области медицины и фармации "Раиса Пакало".

SUMMARY
BURDUNIUC Olga
INNOVATIVE PRODUCTS WITH ANTIFUNGAL ACTION ON SOME CAUSAL
AGENTS OF HUMAN MYCOSES

PhD thesis in medical sciences, Chisinau, 2023

Thesis structure: introduction, six chapters, general conclusions and practical recommendations, bibliography of 334 titles, 20 appendices, 228 pages of basic text, 80 figures, 38 tables. The obtained results are published in 60 scientific and scientific-methodical works.

Key words: fungi, pathogenicity factors, antifungals, silver nanoparticles

Field of study: Microbiology, Medical Virology.

The purpose of the research: Evaluation of the antifungal activity of some new compounds in order to argue the principles of developing polycomponent drugs effective in the therapy of fungal infections.

The objectives of the research: (1) Establishing the diversity of species and sensitivity to antifungals of the yeast fungi isolated from biosubstrates; (2) Phenotypic highlighting of the expression of pathogenicity factors of clinical strains of *Candida* spp; (3) Research of the antifungal potential of new chemical, biological compounds, Ag nanoparticles generated from cellulosic derivatives on reference and clinical strains; (4) Synergistic activity analysis, characterization of the antifungal effects of monocomponent and polycomponent compounds; (5) Evaluation of the action of the tested compounds against the expression of pathogenicity factors of *Candida* spp; (6) Studying the influence of biologically compounds on biochemical parameters.

Scientific novelty and originality: For the first time, the antifungal, antioxidant and immunomodulatory activity of new biologically active substances on yeast fungi was identified and scientifically substantiated, highlighting the properties of inhibiting the expression of virulence factors and patented as innovative products with antifungal action.

The scientific problem solved: evaluated the antifungal action of some new chemical, biological compounds, Silver nanoparticles generated from cellulosic derivatives which serves as a starting point for the creation of the applied scientific direction and principles for the synthesis of natural nanocomposites and innovative products combined with the potential of antifungal action at low costs.

The theoretical significance and the applied value of the study: the study carried out is in agreement with the strategic research agendas of the international initiatives in the field, the policies in the field of public health, the strategic objectives of the Global Action Plan on Antimicrobial Resistance providing reliable evidence for development of antifungal alternatives combined with their capitalization in order to obtain new pharmaceutical forms for the therapy of fungal infections and the creation of a surveillance system for resistant to antifungals in the Republic of Moldova.

Implementation of the scientific results: The results regarding the highlighting of the expression of the enzymatic factors of the yeasts, the practical guidelines regarding the diagnosis of fungi in biosubstrates were implemented in the activity of the microbiological laboratories within the national public and private network, in the didactic process of training the USMF medical staff, "Nicolae Testemițanu", "Raisa Pacalo" Center of Excellence in Medicine and Pharmacy.

LISTA TABELELOR

Tabelul	Denumirea	Pagina
Tabelul 1.1	Mecanismele de acțiune ale preparatelor antifungice	57
Tabelul 2.1.	Numărul de tulpini de fiecare specie pentru valori medii	70
Tabelul 2.2.	Activitatea enzimatică în funcție de valoarea Hz și scorul atribuit	88
Tabelul 2.3.	Activitatea enzimatică în funcție de valoarea Fz și scorul atribuit	88
Tabelul 2.4.	Activitatea enzimatică în funcție de valoarea Pz și scorul atribuit	89
Tabelul 2.5.	Evidențierea capacității de aderare a fungilor la suprafață și de formare a biofilmului	89
Tabelul 3.1.	Sensibilitatea la antifungice a speciilor de <i>Candida</i> izolate din biosubstraturi clinice	103
Tabelul 3.2.	Capacitatea de inactivare a activității lizozimului de către izolatele de <i>Candida</i> spp.	113
Tabelul 3.3.	Capacitatea de a inactiva complementul de către izolatele <i>Candida</i> spp.	114
Tabelul 3.4.	Capacitatea de formare a biofilmelor de către izolatelor clinice de <i>Candida</i> spp.	116
Tabelul 3.5.	Relația dintre capacitatea de formare a biofilmelor și rezistența la antifungice a izolatelor de <i>Candida</i> spp.	118
Tabelul 4.1.	Activitatea antifungică a compușilor chimici testați față de tulpinile tip din genul <i>Candida</i> (CMI, CMF, μg/ml)	121
Tabelul 4.2.	Activitatea antifungică a compușilor chimici testați față de tulpinile tip din genurile <i>Saccharomyces</i> , <i>Cryptococcus</i> și <i>Meyerozyma</i> (CMI, CMF, μg/ml)	124
Tabelul 4.3.	Activitatea antifungică a compușilor naturali testați față de tulpinile tip din genul <i>Candida</i> (CMI, CMF, mg/ml)	128
Tabelul 4.4.	Activitatea antifungică a compușilor naturali testați față de tulpinile tip din genurile <i>Saccharomyces</i> , <i>Cryptococcus</i> și <i>Meyerozyma</i> (CMI,CMF, mg/ml)	131
Tabelul 4.5.	Activitatea antifungică a compușilor chimici testați față de tulpinile izolate din biosubstraturile umane (CMI, CMF, μg/ml)	135
Tabelul 4.6.	Activitatea antifungică a compușilor naturali obținuți din biomasa de spirulină față de tulpinile fungice izolate din biosubstraturi umane și față de tulpinile tip (CMI,CMF, CMI (T)*, CMF(T)* mg/ml)	139
Tabelul 4.7.	Tipul interacțiunii dintre compușii chimici și biologici cu proprietăți antifungice pe baza indicelui de concentrație al inhibiției factoriale (ICIF)	153
Tabelul 4.8.	Rezultatele biotestului cu <i>Daphnia magna</i> privind determinarea indicatorilor de toxicitate (LC50 (μM), SD)	156
Tabelul 5.1.	Semnificația codurilor utilizate în cazul nanoparticulelor de argint sintetizate în prezența de pululan (P)/pululan oxidat (PO)	174

Tabelul 5.2.	Valori medii ale mărimii determinate de DLS, indici de polidispersitate și valori potențiale ζ ale AgNP-urilor sintetizate din derivați de celuloză	180
Tabelul 5.3.	Dimensiunile și caracteristicile spectrale ale AgNPs determinate prin TEM	181
Tabelul 5.4.	Diametrul mediu al AgNPs determinat prin TEM și DLC, indicele de polidispersitate și valoarea potențialului zeta pentru nanoparticulele de argint stabilizate cu derivați celulozici	182
Tabelul 5.5.	Activitatea antifungică a nanoparticulelor de argint (AgNPs) generate din pululan și 6-carboxipululan asupra unor izolate clinice de fungi	187
Tabelul 5.6.	Activitatea antifungică (CMI; CMF; mM) a nanoparticulelor de argint stabilizate cu derivați celulozici	189
Tabelul 6.1.	Analiza post hoc. Valorile p ajustate prin metoda Benjamini Hochberg pentru evaluarea comparativă a valorilor DAM, $\mu\text{M/L}$ între loturile cercetate	205
Tabelul 6.2.	Analiza post hoc. Valorile p ajustate prin metoda Benjamini Hochberg pentru evaluarea comparativă a valorilor PPOA, $\mu\text{M/L}$ între loturile cercetate	205
Tabelul 6.3.	Analiza post hoc. Valorile p ajustate prin metoda Benjamini Hochberg pentru evaluarea comparativă a valorilor SOD, u/c între loturile cercetate	206
Tabelul 6.4.	Analiza post hoc. Valorile p ajustate prin metoda Benjamini Hochberg pentru evaluarea comparativă a valorilor catalaza, $\mu\text{M/L}$ între loturile cercetate	207
Tabelul 6.5.	Analiza post hoc. Valorile p ajustate prin metoda Benjamini Hochberg pentru evaluarea comparativă a valorilor AAT cu ABTS, $\mu\text{M/L}$ între loturile cercetate	207
Tabelul 6.6.	Analiza post hoc. Valorile p ajustate prin metoda Benjamini Hochberg pentru evaluarea comparativă a valorilor G-S-T, nM/s.L între loturile cercetate	208
Tabelul 6.7.	Analiza post hoc. Valorile p ajustate prin metoda Benjamini Hochberg pentru evaluarea comparativă a valorilor GPO, nM/s.L între loturile cercetate	209
Tabelul 6.8.	Analiza post hoc. Valorile p ajustate prin metoda Benjamini Hochberg pentru evaluarea comparativă a valorilor GR, nM/s.L între loturile cercetate	209
Tabelul 6.9.	Analiza post hoc. Valorile p ajustate prin metoda Benjamini Hochberg pentru evaluarea comparativă a valorilor IL-1, pg/ml între loturile cercetate	210
Tabelul 6.10.	Analiza post hoc. Valorile p ajustate prin metoda Benjamini Hochberg pentru evaluarea comparativă a valorilor TNF- α , pg/ml între loturile cercetate	211

Tabelul 6.11.	Analiza post hoc. Valorile p ajustate prin metoda Benjamini Hochberg pentru evaluarea comparativă a valorilor IL-6, pg/ml între loturile cercetate	211
Tabelul 6.12.	Analiza post hoc. Valorile p ajustate prin metoda Benjamini Hochberg pentru evaluarea comparativă a valorilor IL-10, pg/ml între loturile cercetate	212
Tabelul 6.13.	Heatmap pentru sinteza evaluării comparative a parametrilor cercetați cu lotul martor pentru substanțele aparte și în combinații	213

LISTA FIGURILOR

Numărul figurii	Denumirea figurii	Pagina
Figura 1.1.	Spectrul infecțiilor fungice și agenții etiologici ai acestor infecții la om	40
Figura 1.2.	Clasele de preparate antifungice (marcate cu roșu) și mecanismul lor de acțiune	49
Figura 1.3.	Structura chimică ale polienelor: a) amfotericina B; b) nistatina	51
Figura 1.4.	Structura chimică a azolilor: a) clotrimazol, b) ketoconazol, c) fluconazol, d) itraconazol, e) posaconazol, f) voriconazol	53
Figura 1.5.	Formula și structura chimică a echinocandinelor: a) caspofungină, b) micafungină, c) anidulafungină	53
Figura 1.6.	Formula și structura chimică ale alilaminelor și benzilaminelor: a) terbinafină, b) naftifină, c) butenafină	54
Figura 1.7.	Formula și structura chimică a 5-flucitozinei	55
Figura 1.8.	Formula și structura chimică a Griseofulvinei	55
Figura 1.9.	Formula și structura chimică ale a) ciclopiroxului, b) tolnaftalului, c) haloprogrinei	55
Figura 1.10.	Formula și structura chimică a amorfolinei	56
Figura 2.1.	Designul cercetării	69
Figura 2.2.	Metode de cercetare	78
Figura 2.3.	Oxidarea selectivă a grupărilor OH primare ale pululanului la grupări carboxilice prin intermediul sistemului TEMPO/hipoclorit de sodiu/bromură de sodiu, în apă la pH 10 (A); schema simplificată a generării AgNPs în prezența pululanului/pululanului oxidat (B)	80
Figura 3.1.	Structura principalelor specii de <i>Candida</i> din izolatele clinice (% din numărul total)	97
Figura 3.2.	Distribuția speciilor de <i>Candida</i> în funcție de biosubstraturi	100
Figura 3.3.	Sensibilitatea la antifungice a izolatelor de <i>Candida</i> din biosubstraturi clinice	101
Figura 3.4.	Fungigrama speciilor de <i>Candida</i> la preparatele antifungice testate	105
Figura 3.5.	Frecvența exprimării factorilor enzimatici de patogenitate la tulpinile de <i>Candida</i> spp. rezistente la fluconazol comparativ cu cele sensibile, (%)	111
Figura 3.6.	Frecvența exprimării factorilor enzimatici de patogenitate la tulpinile de <i>Candida</i> spp. rezistente la 5-flucitozină comparativ cu cele sensibile, (%)	112
Figura 3.7.	Capacitatea de inactivare a lizozimei a tulpinilor de <i>Candida</i> spp. rezistente și sensibile la fluconazol (%)	113
Figura 3.8.	Capacitatea de inactivare a lizozimei a tulpinilor de <i>Candida</i> spp. rezistente și sensibile la 5-flucitozină (%)	114
Figura 3.9.	Capacitatea de inactivare a complementului a tulpinilor de <i>Candida</i> spp. rezistente și sensibile la 5-flucitozină (%)	115
Figura 3.10.	Capacitatea de inactivare a complementului a tulpinilor de <i>Candida</i> spp. rezistente și sensibile la fluconazol (%)	115

Figura 3.11.	Capacitatea de formare a biofilmelor a tulpinilor de <i>Candida</i> spp. rezistente și sensibile la fluconazol (%)	117
Figura 3.12.	Capacitatea de formare a biofilmelor a tulpinilor de <i>Candida</i> spp. rezistente și sensibile la 5-flucitozină (%)	117
Figura 4.1.	Activitatea antifungică a compușilor coordinativi asupra <i>Candida</i> spp. ($\mu\text{G/ml}$)	123
Figura 4.2.	Activitatea antifungică a compușilor coordinativi asupra <i>Saccharomyces</i> spp., <i>Cryptococcus</i> spp. și <i>Meyerozyma</i> spp., ($\mu\text{g/ml}$)	125
Figura 4.3.	Acțiunea antifungică a compușilor naturali asupra <i>Candida</i> spp., ($\mu\text{g/ml}$)	129
Figura 4.4.	Acțiunea antifungică a compușilor naturali asupra <i>Saccharomyces</i> spp., <i>Cryptococcus</i> spp. și <i>Meyerozyma</i> spp., ($\mu\text{g/ml}$)	132
Figura 4.5.	Activitatea antifungică a compușilor chimici selectați în raport cu tulpinile clinice de <i>Candida albicans</i> și în raport cu tulpina tip <i>C. albicans</i> ATCC 90028. 1. $\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{CuN}_5\text{O}_3\text{S}$; 2. $\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{BrCuN}_4\text{S}$; 3. $\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{CuN}_5\text{O}_3\text{S}$; 4. $\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{Cl}_2\text{CuN}_4\text{S}$; CMI(T), CMF(T) – concentrațiile minime de inhibiție și fungicide față de tulpina tip	136
Figura 4.6.	Activitatea antifungică a compușilor chimici selectați în raport cu tulpinile clinice de <i>Candida parapsilosis</i> și în raport cu tulpina tip <i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019. 1. $\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{CuN}_5\text{O}_3\text{S}$; 2. $\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{BrCuN}_4\text{S}$; 3. $\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{CuN}_5\text{O}_3\text{S}$; 4. $\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{Cl}_2\text{CuN}_4\text{S}$; CMI(T), CMF(T) – concentrațiile minime de inhibiție și fungicide față de tulpina tip. În cazul compușilor 3 și 4 valorile CMI(T) și CMF(T) se suprapun	137
Figura 4.7.	Activitatea antifungică a compușilor chimici selectați în raport cu tulpinile clinice de <i>Candida glabrata</i> și în raport cu tulpina tip <i>C. glabrata</i> ATCC 2001. 1. $\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{CuN}_5\text{O}_3\text{S}$; 2. $\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{BrCuN}_4\text{S}$; 3. $\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{CuN}_5\text{O}_3\text{S}$; CMF(T) – concentrațiile minime de inhibiție și fungicide față de tulpina tip. În cazul compusului 1, valorile CMI(T) și CMF(T) se suprapun	138
Figura 4.8.	Curbele timpului de ucidere a compușilor chimici și biologici selectați, și a combinațiilor lor în raport cu tulpina <i>Candida albicans</i> ATCC 90028. C1 - bromo{N-ciclohexil-N'-[fenil(piridin-2-il)metiliden] carbamohidrazono-tioat}cupru; C2 - dicloro{(prop-2-en-1-il)-N-(prop-2-en-1-il)-N'-[(piridin-2-il)metili-den] carbamo-hidrazonotioat}cupru, C3 - nitrato{N-ciclohexil-N'-[(1-(piridin-2-il)etiliden] carbamohidrazonotioato}cupru; B1 – PCM1; B2 – PCM2	142
Figura 4.9.	Curbele timpului de ucidere a compușilor chimici și biologici selectați, și a combinațiilor lor în raport cu tulpina <i>Candida glabrata</i> ATCC 2001. C1 - bromo{N-ciclohexil-N'-[fenil(piridin-2-il)metiliden]carbamohidrazono-tioat}cupru; C2 - dicloro{(prop-2-en-1-il)-N-(prop-2-en-1-il)-N'-[(piridin-2-il)metili-den] carbamo-hidrazonotioat}cupru, C3 - nitrato{N-ciclohexil-N'-[(1-(piridin-2-il)etiliden] carbamohidra-zonotioato}cupru; B1 – PCM1; B2 – PCM2	144
Figura 4.10.	Curbele timpului de ucidere a compușilor chimici și biologici și a combinațiilor lor în raport cu tulpina <i>Cryptococcus neoformans</i> ATCC 13690. C1 - bromo{N-ciclohexil-N'-[fenil(piridin-2-	147

- il)metiliden]carbamohidrazono-tioat}cupru; C2 - dicloro{(prop-2-en-1-il)-N-(prop-2-en-1-il)-N'-[(piridin-2-il)metili-den] carbamo-hidrazonotioat}cupru, C3 - nitrato{N-ciclohexil-N'-[(1-(piridin-2-il)etiliden] carbamohidra-zonotioato}cupru; B1 – PCM1; B2 – PCM2
- Figura 4.11. Curbele timpului de ucidere a compușilor chimici și biologici selectați, și a combinațiilor lor în raport cu *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 4098. C1 - bromo{N-ciclohexil-N'-[fenil(piridin-2-il)metiliden]carbamohidrazono-tioat}cupru; C2 - dicloro{(prop-2-en-1-il)-N-(prop-2-en-1-il)-N'-[(piridin-2-il)metili-den] carbamo-hidrazonotioat}cupru, C3 - nitrato{N-ciclohexil-N'-[(1-(piridin-2-il)etiliden] carbamohidra-zonotioato}cupru; B1 – PCM1; B2 – PCM2 150
- Figura 4.12. Toxicitatea compușilor testați prezentată sub forma valorilor de concentrație medie letală (LC50) 157
- Figura 4.13. *Daphnia magna* (microscopia optică) sub influența compușilor chimici: a) *Daphnia magna* fără contact cu compuși chimici: nu se vizualizează modificări patologice; b) *Daphnia magna* după contact cu compuși chimici: membrele și corpul sunt deformat și conținutul amestecat cu mediul de creștere. 157
- Figura 4.14. Acțiunea compușilor chimici și biologici selectați, și a combinațiilor lor asupra activității hemolizinei la *Candida albicans* și la *Candida tropicalis*. C1 - C₁₉H₂₁BrCuN₄S; C2 - C₁₇H₁₉CuN₅O₃S; C3 - C₁₇H₁₆N₆OS₂; B1 -ES; B2 PCM2 160
- Figura 4.15. Acțiunea compușilor chimici și biologici selectați, și a combinațiilor lor asupra activității fosfolipazei la *Candida albicans* și la *Candida tropicalis*. C1 - C₁₉H₂₁BrCuN₄S; C2 - C₁₇H₁₉CuN₅O₃S; C3 - C₁₇H₁₆N₆OS₂; B1 -ES; B2 PCM2 162
- Figura 4.16. Acțiunea compușilor chimici și biologici selectați, și a combinațiilor lor asupra activității proteinazei la *Candida albicans* și la *Candida tropicalis*. C1 - C₁₉H₂₁BrCuN₄S; C2 - C₁₇H₁₉CuN₅O₃S; C3 - C₁₇H₁₆N₆OS₂; B1 -ES; B2 PCM2 164
- Figura 4.17. Acțiunea compușilor chimici și biologici selectați, și a combinațiilor lor asupra capacității de formare a fiofilmului la *Candida albicans* și la *Candida tropicalis*. C1 - C₁₉H₂₁BrCuN₄S; C2 - C₁₇H₁₉CuN₅O₃S; C3 - C₁₇H₁₆N₆OS₂; B1 -ES; B2 PCM2 165
- Figura 4.18. Acțiunea compușilor chimici și biologici selectați, și a combinațiilor lor asupra activității antilozozimice la *Candida albicans* și la *Candida tropicalis*. C1 - C₁₉H₂₁BrCuN₄S; C2 - C₁₇H₁₉CuN₅O₃S; C3 - C₁₇H₁₆N₆OS₂; B1 -ES; B2 PCM2 166
- Figura 4.19. Acțiunea compușilor chimici și biologici selectați, și a combinațiilor lor asupra activității anticomplementare la tulpinile clinice de *Candida albicans* (n=90). C₁₉H₂₁BrCuN₄S; C2 - C₁₇H₁₉CuN₅O₃S; C3 - C₁₇H₁₆N₆OS₂; B1 -ES; B2 PCM2 168
- Figura 5.1. Mecanismul procesului de oxidare a pululanului în prezența sistemului TEMPO/NaBr/NaOCl 171

Figura 5.2.	Spectrele FTIR ale pululanului (P - pululan) și ale produsului său de oxidare mediat de radicalul TEMPO (PO – pululan oxidat)	172
Figura 5.3.	Spectrul ¹³ C-RMN pentru compusul inițial (pululan neoxidat - P) în D ₂ O și spectrul ¹³ C-RMN pentru compusul oxidat (PO) în D ₂ O	173
Figura 5.4.	Indicația formării nanoparticulelor de argint (AgNPs)	173
Figura 5.5.	Spectrele FT-IR ale pululanului și ale nanoparticulelor de argint stabilizate cu pululan	174
Figura 5.6.	Spectrele FT-IR ale pululanului oxidat și ale nanoparticulelor de argint stabilizate cu pululan oxidat	175
Figura 5.7.	Date SEM-EDAX ale nanoparticulelor de argint și spectrele EDAX corespunzătoare	175
Figura 5.8.	Obținerea nanoparticulelor de argint mediată de derivații de celuloză: acetatul de celuloză (CA), etilceluloza (EC), metilceluloza (MC) și hidroxipropilceluloza (HPC)	177
Figura 5.9.	Spectrele de absorbție UV-VIS pentru nanoparticulele de argint stabilizate cu derivați celulozici (nanoparticule de argint stabilizate cu acetat de celuloză AgNPs-CA, nanoparticule de argint stabilizate cu etilceluloză AgNPs-EC, nanoparticule de argint stabilizate cu metilceluloză AgNPs-MC, nanoparticule de argint stabilizate cu hidroxipropilceluloză AgNPs-HPC)	178
Figura 5.10.	Imagini STEM ale nanoparticulelor de argint stabilizate cu derivați celulozici	180
Figura 5.11.	Imagini TEM ale nanoparticulelor de argint stabilizate cu derivați celulozici	181
Figura 5.12.	Rezistența la preparatele antifungice a tulpinilor de <i>Candida</i> testate	184
Figura 5.13.	Sensibilitatea la preparatele antifungice a tulpinilor de <i>Candida</i> testate	185
Figura 5.14.	Efectul activității antifungice a nanoparticulelor de argint (AgNPs): a) generate din pululan și 6-carboxipululan; b) stabilizate cu derivați celulozici pe tulpini microbiene asupra izolatelor clinice de <i>Candida albicans</i>	186
Figura 5.15.	Reprezentarea grafică a efectului AgNPs asupra <i>C. albicans</i> utilizând microscopia electronică [SEM]: a) <i>C. albicans</i> fără tratament: celulele sunt bine definite, cu suprafața netedă și formă ovală b) <i>C. albicans</i> după tratamentul cu AgNP: se observă reducția și distorsiunea celulelor levurice prin eliberarea conținutului intracitoplasmatic	190
Figura 6.1.	Tendențele distribuirii valorilor DAM, nM/s.L din loturile cercetate	193
Figura 6.2.	Tendențele distribuirii valorilor PPOA, μM/L din loturile cercetate	194
Figura 6.3.	Tendențele distribuirii valorilor SOD, u/c din loturile cercetate	195
Figura 6.4.	Tendențele distribuirii valorilor Catalaza, μM/s.L din loturile cercetate	196
Figura 6.5.	Tendențele distribuirii valorilor AAT cu ABTS, μM/L din loturile cercetate	197
Figura 6.6.	Tendențele distribuirii valorilor G-S-T, nM/s.L din loturile cercetate	198
Figura 6.7.	Tendențele distribuirii valorilor GPO, nM/s.L din loturile cercetate	199
Figura 6.8.	Tendențele distribuirii valorilor GR, nM/s.L din loturile cercetate	200

Figura 6.9.	Tendințele distribuirii valorilor IL-1, pg/ml din loturile cercetate	201
Figura 6.10.	Tendințele distribuirii valorilor TNF- α , pg/ml din loturile cercetate	202
Figura 6.11.	Tendințele distribuirii valorilor IL-6, pg/ml din loturile cercetate	203
Figura 6.12.	Tendințele distribuirii valorilor IL-10, pg/ml din loturile cercetate	204
Figura 6.13.	Analiza corelațională în lotul martor	214
Figura 6.14.	Analiza corelațională în lotul de studiu C1	215
Figura 6.15.	Analiza corelațională în lotul de studiu C2	216
Figura 6.16.	Analiza corelațională în lotul de studiu N1	217
Figura 6.17.	Analiza corelațională în lotul de studiu N2	218
Figura 6.18.	Analiza corelațională în lotul de studiu C1+N1	219
Figura 6.19.	Analiza corelațională în lotul de studiu C1+N2	220
Figura 6.20.	Analiza corelațională în lotul de studiu C2+N1	221
Figura 6.21.	Analiza corelațională în lotul de studiu C2+N2	222

LISTA ABREVIERILOR

Abreviere	Denumirea deplină
AAL	Activitatea antilozim
AAT	Activitatea antioxidantă totală
Ag	Argint
AgNPs	Nanoparticule de argint
AgNPs-CA	Nanoparticule de argint pe baza de celuloză
AgNPs-EC	Nanoparticule de argint pe baza de etilceluloză
AgNPs-HPC	Nanoparticule de argint pe baza de hidroxipropilceluloză
AgNPs-MC	Nanoparticule de argint pe bază de metilceluloză
ANSP	Agencia Națională pentru Sănătate Publică
ARN	Acid ribonucleic
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CA	Acetat de celuloză
CL ₅₀	Concentrația letală medie
CLSI	<i>Clinical&Laboratory Standards Institute</i>
CMF	Concentrația minimă fungică
CMI	Concentrația minimă inhibitoare
CMI ₅₀	Concentrația de preparat care asigură inhibiția a 50% de izolate cercetate
CMI ₉₀	Concentrația de preparat care asigură inhibiția a 90% de izolate cercetate
CT	Catalaza
CV	Curriculum vitae
DAM	Dialdehida malonică
DL	Doză letală
DLS	Metoda împrăstierii luminii în regim dinamic
DMSO	Dimetilsulfid
DN-aza	Deoxiribonucleaza extracelulară
DO	Densitate optică
EC	Etilceluloză
ECDC	Centrul European pentru Prevenirea și Controlul Bolilor
EDX	Spectroscopia de dispersie energetică a razelor X
ELISA	<i>eng. Enzyme-linked immunosorbent assay/analiza imunoenzimatică</i>
ES	Extract din spirulină
EUCAST	<i>eng. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing/Comitetul European pentru Testarea Sensibilitatii la Antimicrobiene</i>
FIC	<i>eng. Fractional Inhibitory Concentration/Concentrația inhibitorie a fracțiunilor</i>
GLASS	<i>eng. Global Antimicrobial Resistance Surveillance System/Sistemul global de supraveghere a rezistenței la antimicrobiene</i>
GPO	Glutation peroxidaza
GR	Glutation reductaza
GST	Glutation S transferaza

Hb	Hemoglobină
HPC	Hidroxipropilceluloză
IAE	Indicele de activitate enzimatică
IÎ	interval de încredere
IL	Interleukină
IL-10	Interleukina-10
IL-1β	Interleukina-1 β
IL-6	Interleukina-6
IMSP	Instituție Medico-Sanitară Publică
L	Litru
LDH	Lactat dehidrogenaza
MALDI-TOF MS	<i>Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry</i>
MC	Metilceluloză
MS	Ministerul Sănătății
NADP	Nicotinamid dinucleotid fosfat
NADPH	Nicotinamid dinucleotid fosfat redus
NBT	Nitroblue tetrazolium
OMS	Organizația Mondială a Sănătății
PCM	Pigment carotenoid mixoxantofila
PCR	eng. <i>Polymerase chain reaction</i> /Reacția de polimerizare în lanț
PPOA	Produse proteice de oxidare avansată
R	Rezistent
RPMI	eng. <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
S	Sensibil
SDA	<i>Sabouraud Dextrose Agar</i>
SOD	Superoxid dismutaza
SSD	Sensibile la doze înalte
STEM	eng. <i>Scanning transmission electron microscopy</i>
TEM	eng. <i>Transmission electron microscopy (Microscopie electronică de transmisie)</i>
TNF α	Factorul de necroză tumorală alfa
UFC	Unități formatoare de colonii
UH	Unitate hemolitică
UHM	Unitate hemolitică minimă
USMF	Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie
UV-Vis	Spec spectroscopia în domeniul ultraviolet și vizibil
WHO FPPL	Lista de agenți fungici patogeni prioritari (eng. <i>WHO fungal priority pathogens list</i>)

INTRODUCERE

Actualitatea și importanța problemei abordate

Potrivit Centrului pentru Controlul și Prevenirea Bolilor (CDC), pe pământ (în aer liber, în sol, pe plante, pe suprafața pielii și în organsimul uman) există milioane de diverse specii de fungi și doar unele pot cauza boli [3, 108, 160].

Fungii patogeni cauzează peste un miliard de infecții umane, fiind responsabili de mai mult de 1,6 milioane de decese anual (o rată egală cu cea a tuberculozei și de peste trei ori mai mare decât cea a malariei), iar povara globală a acestor boli este enormă. Aceste date sunt alarmante, având în vedere insuficiența dovezilor științifice publicate ce țin de biologia agenților patogeni fungici și de sarcina infecțiilor fungice asupra sănătății publice [121, 184].

Schimbările climatice, creșterea numărului de călătorii, migrația populației și dezvoltarea comerțului sunt doar unele cauze ale incidenței înalte și a diversității geografice a infecțiilor fungice [48, 101, 141, 219].

Stadiul actual al dovezilor științifice privind aspectele generale ale fungilor patogeni, caracteristicile individuale bazate pe particularitățile ecologice și patogenitate permite o abordare specifică pentru evaluarea relevantă a semnificației clinice a speciilor respective [42, 115, 123].

Apariția mai multor agenți patogeni fungici noi rezistenți la antimicrobiene (de exemplu, *Candida auris*) impune atenție din partea statelor și implicarea lor în dezvoltarea politicilor, inclusiv realizarea studiilor științifice în acest domeniu [101, 143, 158].

Provocările, ce necesită abordare urgentă din partea statelor, inclusiv studii științifice, sunt: înțelegerea biodiversității și a ecologiei fungilor; caracterizarea în mod sistematic a agenților fungici patogeni și nepatogeni; relația dintre genotip și fenotip referitor la patogenitate și virulență. Soluțiile pentru aceste provocări vor facilita potențialul de dezvoltare a modelelor care prognozează apariția speciilor de fungi emergente și a tratamentelor eficiente pentru infecțiile fungice [123, 158].

OMS declară că în pofida îngrijorării la nivel global față de tendința de creștere a prevalenței infecțiilor fungice, acestea sunt subestimate. Din cauza că se acordă puțină atenție și resurse, se atestă insuficiența dovezilor privind distribuția fungilor patogeni și a profilurilor de rezistență la antifungice. Ca urmare, povara reală a acestor infecții și a rezistenței antifungice este necunoscută, iar măsurile de prevenire și de control sunt insuficient dezvoltate [44, 48, 101, 114, 253, 309].

Astfel, reflectând asupra celor mai recente studii științifice se poate afirma că regnul fungilor este mai puțin studiat și comunitatea științifică a neglijat fungii patogeni, spre deosebire

de bacterii și de virusuri. Conform informațiilor din literatura de specialitate, până în prezent au fost descrise 150 mii de specii de fungi, dar se estimează existența încă a câtorva milioane de specii care urmează să fie identificate și descrise [114, 143, 259, 311].

Unul din motivele subestimării agenților patogeni fungici rezidă în natura lor oportunistă și în recunoașterea lor ca agenți patogeni doar în ultimele decenii, în urma schimbărilor în epidemiologia și în patogenia maladiilor infecțioase. Aceste modificări includ creșterea dramatică a numărului de pacienți imunocompromiși ca urmare a mutațiilor ce afectează funcția imună a gazdei (de exemplu, chimioterapia cancerului sau efectul terapiei imunosupresoare care împiedică rejețul alogrefei) sau dezvoltarea bolilor care compromit funcția sistemului imun (de exemplu, HIV/SIDA, infecția tuberculoasă) [42, 162, 176, 298].

Unele studii prezintă dovezi ale implicării agenților fungici în dezvoltarea infecțiilor secundare la persoane cu formă severă de COVID-19. Acest comportament oportunist indică că multe dintre trăsăturile și elementele genetice, responsabile de patogenitatea agenților fungici, nu sunt determinanți unici sau specifici ai acestor infecții, dar au dezvoltat mecanisme pentru supraviețuire în condiții independente de infecția umană.

Elucidarea deplină a patogenității fungice necesită cunoașterea și înțelegerea evoluției proprietăților biologice, ecologiei și adaptării fungilor la mediile lor naturale [162, 271, 309].

Cercetările în domeniu au demonstrat că diversitatea mecanismelor moleculare contribuie la evoluția patogenității fungice, iar diferențele genetice specifice permit distingerea agenților patogeni de cei nepatogeni [101, 143, 158, 285].

Studiile relevante referitor la patogenitatea fungică au demonstrat că interacțiunea dintre agenții patogeni, gazdele umane și mediu este un proces complex și multifactorial. Diferențele dintre elementele genetice asociate cu trăsăturile ecologice relevante sunt considerate esențiale în dezvoltarea acestor infecții. În ultima perioadă, tot mai mulți cercetători își orientează eforturile asupra studierii caracteristicilor factorilor de patogenitate ai fungilor și implicării acestora în apariția infecțiilor fungice umane [158, 162, 176, 219].

Specialiștii din practica medicală sunt alarmați de eșecurile terapeutice în cazul infecțiilor fungice invazive cauzate de agenți rezistenți, în special de comunitățile microbiene organizate în biofilme [123, 141, 271, 275].

Autorii studiilor recente estimează că micozele superficiale (de exemplu, afecțiunile pielii, părului, unghiilor și ochilor) afectează circa un miliard de persoane, micozele mucoaselor (de exemplu, afecțiunile cavității orale și vaginale) în jur de 135 de milioane, procesele alergice – 23,3 milioane, iar infecțiile cronice severe și cele acute invazive - milioane de persoane cu o rată de

mortalitate extrem de ridicată. În anumite grupuri de pacienți imunocompromiși cu aspergiloză invazivă, rata mortalității poate ajunge până la 50% [3, 42, 115, 143].

Unul din dezideratele științei moderne este implementarea soluțiilor inovatoare bazate pe cercetări științifice ce țin de dezvoltarea de noi formule farmaceutice cu acțiune antifungică.

Fungii devin din ce în ce mai frecvent implicați în micoze umane și mai rezistenți la tratamente în timp ce există doar patru clase de antifungice disponibile și doar câteva preparate în curs de dezvoltare. În 2022, OMS în premieră a publicat lista de agenți fungici patogeni prioritari (eng.: *WHO fungal priority pathogens list - WHO FPPL*) ce include 19 specii care reprezintă amenințare majoră pentru sănătatea publică. Conform acestei liste și reieșind din impactul lor potențial și nivelul de rezistență, agenții patogeni fungici au fost împărțiți, în funcție de impactul lor asupra sănătății publice, riscul evoluției rezistenței la preparatele antifungice și existența metodelor de diagnostic în timp util, în trei categorii: critici, cu prioritate mare și medie. Dintre agenții fungici prioritari, patru au fost clasati pe primul loc ca fiind „critici”, și anume: *A. fumigatus*, *C. albicans*, *C. neoformans*, *C. auris* [114, 158, 162, 174, 204].

Experții OMS afirmă că sunt necesare mai multe dovezi pentru cunoașterea poverii infecțiilor fungice invazive pentru a elabora măsuri de prevenire și control. De asemenea, sunt necesare acțiuni coordonate pentru a evalua în complex impactul rezistenței antifungice și riscurile utilizării acestor preparate prin prisma abordării *One Health*. Printre acțiunile principale se numără consolidarea capacității de diagnostic de laborator, susținerea investițiilor în cercetare, dezvoltare și inovare, precum și îmbunătățirea intervențiilor de sănătate publică pentru prevenirea și controlul acestor maladii [48, 101, 162, 258, 271].

Provocările actuale ce țin de strategiile farmaceutice convenționale rezultă din conexiunea dintre limitările legate de tratamentul și statutul clinic al pacientului, și includ: nespecificitatea sau neselectivitatea medicamentului utilizat, administrarea necorespunzătoare sau incorectă a tratamentului și apariția efectelor farmacologice secundare [115, 162, 176, 275].

Având în vedere că patogenitatea și rezistența la antifungice a agenților microbieni au evoluat în timp, pentru depășirea eșecurilor condiționate de terapia antifungică sunt depuse eforturi academice considerabile, îndreptate către utilizarea intensă a produselor nanotehnologiei la fabricarea și implementarea de noi formule farmaceutice active, cu eficacitate înaltă [162, 176, 185, 285].

În încercarea de a preveni complicațiile asociate infecțiilor fungice, cercetările la nivel mondial și-au îndreptat eforturile la studierea relației dintre agenții patogeni și organismul-gazdă infectat. În acest sens sunt studiate și analizate mecanismele dezvoltării rezistenței antifungice și a eficienței unor formule antimicrobiene.

Intersul modest al științei naționale pentru infecțiile fungice, comparativ cu cercetările la nivel global, dorința evaluării speciilor implicate, a rezistenței la antifungice, a activității antimicrobiene și a unor noi formule farmaceutice pe bază de substanțe naturale, combinate cu cele de origine sintetică, au impulsionat această cercetare [49, 96, 59, 60, 229].

Scopul cercetării: evaluarea activității antifungice a unor noi compuși în vederea argumentării principiilor de elaborare a medicamentelor policomponente eficiente în terapia infecțiilor fungice.

Obiectivele cercetării:

1. Stabilirea diversității speciilor și a sensibilității la antifungice a micetelor levuriforme izolate din biosubstraturi;
2. Evidențierea fenotipică a expresiei factorilor de patogenitate ai tulpinilor clinice de *Candida* spp;
3. Cercetarea potențialului antifungic al noilor compuși chimici, biologici, a nanoparticulelor de Ag generate din derivați celulozici asupra tulpinilor de referință și clinice;
4. Analiza activității sinergice și caracterizarea efectelor antifungice ale compușilor monocompenți și policompenți;
5. Evaluarea acțiunii compușilor testați față de exprimarea factorilor de patogenitate ai *Candida* spp;
6. Studiarea influenței compușilor biologic activi asupra unor parametri biochimici și a patternului inflamator (imunochimici).

Ipotezele de cercetare

În prezenta lucrare ipoteza de cercetare a fundamentat direcția cercetării și a permis determinarea esenței fenomenelor studiate, elucidarea relațiilor cauză-efect, confirmate ulterior experimental. În baza analizei comprehensive a literaturii de specialitate și a evaluării obiectivelor de cercetare, au fost formulate următoarele ipoteze de lucru:

Ipoteza 1. Necesitatea stringentă în proiectarea de structuri moleculare cu proprietăți antifungice care ar putea servi ca compuși biologic activi pentru obținerea unor noi medicamente policomponente, eficiente în tratamentul infecțiilor fungice. Pentru realizarea acestui deziderat o atenție deosebită trebuie acordată sintezei de noi compuși chimici și biologic activi (de exemplu, chimici cu diverse familii de tiosemicarbazone și de origine naturală) cu evaluarea activității lor antifungice în scopul extinderii arsenalului de preparate antifungice.

Ipoteza 2. Mecanismele implicate în dezvoltarea patogenității fungilor constituie un domeniu de interes științific în dezvoltarea de soluții terapeutice antifungice. Agenții fungici dispun de factori de patogenitate responsabili de patogenitatea infecțiilor fungice, de consecințele

nefavorabile și de deficiențele în tratamentul acestora. Astfel, majoritatea antifungicelor disponibile la moment nu sunt axate pe inhibiția factorilor de patogenitate, cum ar fi formarea biofilmelor, producerea enzimelor extracelulare ș.a. Pentru depășirea acestor neajunsuri sunt necesare studii privind dezvoltarea de noi medicamente și de strategii în direcția diminuării factorilor de patogenitate ai agenților fungici.

Ipoteza 3. În prezent accentul se pune pe elaborarea de antifungice noi, pe bază de nanoparticule de argint (AgNP) și de materie primă locală cu acțiune antifungică, prin metode ecologice, cost-eficiente. Biosinteza AgNP, caracterizarea, testarea potențialului antifungic reprezintă o direcție de perspectivă ce merită concentrarea eforturilor cercetătorilor. Astfel, dezvoltarea de platforme nanostructurate și evaluarea activității asupra agenților fungici poate sta la baza obținerii unor noi medicamente eficiente în terapia infecțiilor fungice.

Noutatea și originalitatea științifică

Pentru prima dată a fost identificată și fundamentată științific activitatea antifungică, antioxidantă și imunomodulatoare asupra micetelor levuriforme a unor noi substanțe biologice active cu evidențierea proprietăților lor de inhibiție a expresiei factorilor de patogenitate și cu brevetarea lor în calitate de produse inovatoare cu acțiune antifungică. Acești compuși prezintă interes sporit prin acțiunea eficientă asupra micetelor levuriforme și potențială aplicabilitate în industria farmaceutică.

În premieră a fost elaborat un procedeu nou simplu și eficient de obținere a nanocompozitelor pe bază de nanoparticule de argint stabilizate cu derivați celulozici (hidroxipropilceluloza, metilceluloza, etilceluloza și acetat de celuloză) cu activitate antifungică *in vitro* față de speciile de *Candida*. Aceste nanocompozite pot servi ca suport rațional în extinderea arsenalului de remedii antifungice la concentrații minime inhibitorii cât mai joase și costuri reduse.

Rezultatele obținute au permis elaborarea ghidurilor de diagnostic privind standardizarea în practica laboratoarelor microbiologice a metodelor de izolare, de identificare și de testare a sensibilității la antifungice a izolatelor clinice.

Problema științifică soluționată: A fost evaluată acțiunea antifungică a unor noi compuși chimici, biologici, a nanoparticulelor de Ag generate din derivați celulozici ce servesc ca punct de plecare pentru trasarea direcției științifice aplicative și a principiilor de sinteză a nanocompozitelor naturale și a produselor inovatoare combinate, cu potențial de acțiune antifungică la costuri reduse.

Semnificația teoretică și valoarea aplicativă a lucrării. Studiul realizat vine în consens cu agendele de cercetare strategică ale inițiativelor internaționale, cu politicile în domeniul

sănătății publice, cu obiectivele strategice ale Planului Global de acțiune privind rezistența la antimicrobiene oferind dovezi fiabile pentru dezvoltarea de alternative antifungice combinate cu valorificarea acestora în vederea obținerii unor noi forme farmaceutice pentru terapia infecțiilor fungice și crearea unui sistem de supraveghere a rezistenței la antifungice în Republica Moldova.

Rezultatele cercetării contribuie la suplimentarea dovezilor științifice privind metodele de sinteză a nanoparticulelor de argint din materia primă cost-eficientă, utilizând extracte naturale. Important de menționat este și impactul pozitiv asupra mediului înconjurător cu referire la aplicarea metodelor și tehnologiilor cost-eficiente, ecologice, blânde (non-agresive).

Principalele rezultate științifice înaintate spre susținere:

1. Speciile de fungi levuriformi prioritar implicați în etiologia infecțiilor fungice;
2. Profiluri de rezistență la antifungice a tulpinilor clinice de fungi levuriformi;
3. Principalii factori de patogenitate responsabili de invazia fungilor și de dezvoltarea procesului infecțios;
4. Date privind activitatea antifungică a unor compuși chimici și extracte biologice asupra tulpinilor de referință și a izolatelor clinice;
5. Dovezi ale efectelor sinergice generate între compușii biologic activi care determină potențierea proprietății de inhibare a dezvoltării celulelor fungice;
6. Rezultate ale acțiunii compușilor monocomponenți și policomponenți asupra timpului de omorâre a fungilor levuriformi;
7. Evidențe științifice cu referire la activitatea compușilor testați separat și în combinație asupra expresiei factorilor de patogenitate ai fungilor;
8. Dovezi ale efectului fungistatic și fungicid al nanoparticulelor de argint generate din pululan, 6-carboxipululan și derivați celulozici;
9. Informații relevante cu referire la activitatea compușilor biologic activi asupra intensității reacțiilor de oxidare cu radicali liberi prin aprecierea unor indici ai stresului oxidativ și ai sistemului antioxidant;
10. Dovezi fundamentate științific a acțiunii compușilor biologic activi asupra pattern-ului inflamator pentru trasarea direcțiilor de elaborare a preparatelor antifungice eficiente.

Implementarea rezultatelor științifice

Au fost elaborate trei ghiduri practice care au fost implementate în cadrul laboratoarelor microbiologice din domeniul public și privat din țară prin Ordinele Ministerului Sănătății (MS): nr. 696/2020 și nr. 26/2021 nr. 652/2021.

Rezultatele studiului, valorificate prin ghiduri și procedee de diagnostic, 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”, a Rețelei Naționale de laboratoare medicale MedExpert, în activitatea medicilor din cadrul: IMSP Spitalul Clinic Municipal de Boli Contagioase de Copii și IMSP Institutul de Ftiziopneumologie „Chiril Draganiuc”. Rezultatele cercetării au fost implementate și în procesul didactic în următoarele subdiviziuni ale Universității de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”: Disciplina de microbiologie și imunologie și Disciplina de igienă, Departamentul Medicină Preventivă, Catedra de urologie și nefrologie chirurgicală, Catedra de medicină de laborator, Catedra de boli infecțioase, tropicale și parazitologie medicală, dar și în procesul didactic din cadrul Centrului de Excelență în Medicină și Farmacie „Raisa Pacalo”.

Aprobarea rezultatelor științifice

Datele obținute pe perioada realizării tematicii tezei au fost diseminate în articole științifice, în articole de tip review publicate în reviste de specialitate recunoscute internațional, în monografii ș.a. Aceste lucrări științifice, elaborate în cadrul prezentei cercetări, au adus contribuții atât la dezvoltarea personală, cât și la progresul științific al domeniului de cercetare vizat prin participarea și prezentarea lor la congrese, conferințe de specialitate și la alte foruri științifice naționale și internaționale:

- **în formă orală:**

1. International Conference titled „Socio-psycho-medical changes in the lifestyles of the contemporary family”. Bucharest, Romania, 2015: *„Biosafety and biosecurity in microbiological laboratories - challenges and opportunities”*.
2. Ежегодная Международная Научно- Практическая Конференция „Актуальные вопросы медицины”. Баку, Азербайджан, 2018: *„Влияние препарата BioR на персистентные свойства микроорганизмов”*.
3. International Scientific Conference on Microbial Biotechnology (4nd edition). Academy of Sciences of Moldova, Institute of Microbiology and Biotechnology. Chisinau, 2018: *„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”*; *„Antimicrobial and antifungal effect of some biometal coordination compounds with 2-[(3-methyl-5-oxo-1-phenyl-4,5-dihydro-1H-pyrazol-4-YL)-(phenyl) methylidene] hydrazine carboximida-mide”*; *„Bacteriostatic and bactericide activities of some 3D metal complexes with 2-[2- (prop-2-en-1-ylcarbamothioyl)-*

hydrazinylidene]propanoic acid".

4. Congresul național al specialiștilor din domeniul sănătății publice și al managementului sanitar din Republica Moldova cu participare internațională „O singură sănătate”. Chișinău, 2019: *„Actualități în diagnosticul infecțiilor fungice invazive”*.
 5. Conferința Științifică Internațională Sănătatea, medicina și bioetica în societatea contemporană: studii inter și pluridisciplinare = Health, Medicine and Bioethics in Contemporary Society: Inter-and Pluridisciplinary Studies: mater. conf. șt. internaț., ed. a 2-a. Chișinău, 2019: *Rezistența antimicrobiană ca problemă sociomedicală stringentă*.
 6. Congresul consacrat aniversării a 75-a de la formarea USMF „Nicolae Testemițanu”. Chișinău, 2020: *„Distribuția speciilor clinice de Candida și sensibilitatea acestora la antifungice”*.
 7. Conferință științifică națională cu participare internațională „Materiale avansate în biofarmaceutică și tehnică”. Chișinău, 2021: *„Synergistic Action of Some Chemical and Biological Compounds”*.
 8. The 1st edition of the National Conference with International participation „One Health Approach in a Changing World”. Chișinău, 2021: *„Silver nanoparticles as new antifungal agents against Candida species”; One Health approach and prevention, control of antimicrobial resistance*.
 9. Conferința Internațională „Pandemia de COVID-19 - atitudini, contraverse și provocări în asistența perinatală”. Chișinău, 2021: *„Rezistența la antimicrobiene, problemă majoră de sănătate publică care necesită eforturi comune”*.
 10. Conferința națională cu participare internațională „Stopați pneumonia: investiți în sănătatea copiilor” dedicată Zilei Mondiale a Pneumoniei celebrată în 12 noiembrie. Chișinău, 2022: *„Abordarea multidisciplinară în diagnosticul, prevenirea și controlul infecțiilor cauzate de patogenii multirezistenți la antibiotice”*.
 11. Conferința științifică națională cu participare internațională Optimizarea supravegherii epidemiologice în infecțiile nosocomiale. Chișinău, 2017: *„Infecțiile fungice preocupare actuală pentru comunitatea medicală”*.
- **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: 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, Iași, România 19 mai 2018: „*Copper containing agents with antibacterial activity against gram positive microorganisms*”, Medalie de aur și diplomă de excelență; „*Inhibitor of increase and multiplication of the fungi*”, Medalie de bronz și diplomă de excelență.
4. Inventica 2018, Iasi, România 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, Iași, România 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. 47E Salon International des Inventions de Genève. Genève, 12 Avril, 2019: „*Composés qui exercent une activité antimicrobienne sélective contre les bactéries gram-positiv 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. Salonul Internațional al Inovării și Cercetării Științifice Studentești „Cadet INOVA’19”. Academia Forțelor Terestre” Nicolae Bălcescu”, Sibiu, România 11-13 aprilie 2019: „*Inhibitor of proliferation of gram-positive microorganisms and Candida albicans species*”. Diploma de onoare a Salonului.
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. Euroinvent 2023, Iași, România 13 mai 2023: „*Procedure for obtaining materials based on silver nanoparticles with antifungal activity*”, Medalie de aur și diplomă Medicine Award: „*Procedure for obtaining materials based on silver nanoparticles with antifungal activity*”.
13. Infoinvent Ediția a XVI-a, Chișinău, Republica Moldova 20-23 noiembrie 2019: „*Utilizarea N-ciclohexil-2-[1-(piridin-2-IL)etiliden]hidrazincarbotioamidei în calitate de inhibitor al proliferării microorganismelor gram-pozitive și fungilor din specia Candida albicans*”, Medalie de argint.
14. Inventica 2020, Iași, România 29-31 iunie 2020: „*Water-soluble dicopper complex having*

antimicrobial activity”, Diplomă de Performanță.

15. The 24th International Exhibition of Inventions Inventica 2020, Iași, România 29-31 iulie 2020: „Inhibitors of the proliferation of fungi of the species *Cryptococcus neoformans*”, Medalie de aur, Diplomă de Performanță.
16. Salonul Internațional de Invenții și Inovații „Traian Vuia”, ediția a VI-a. Timișoara, România 13-15 octombrie 2020: „*Noi compuși coordinativi a molibdenului cu activități biologice importante*”, Medalie de aur.
17. Euroinvent 2021, Iași, România 22 mai 2021: „*Inhibitor of the proliferation of fungi of the species Cryptococcus neoformans*”, Medalie de aur.
18. 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.
19. Inventica 2021, Iași, România 23-25 iunie 2021: „*Inhibitor of the proliferation of fungi of the species Cryptococcus neoformans*”, Medalie de argint.
20. Salonul Internațional de Invenții și Inovații „Traian VUIA`21”, Timișoara, Romania 06-08 octombrie 2021: „*Inhibitor of the proliferation of fungi of the species Cryptococcus neoformans*”, Medalie de aur.
21. PRO INVENT Ediția a XIX-a. Cluj-Napoca, România 20-22 octombrie, 2021: „*Nou agent antifungic*”, Medalie de aur.
22. International Exhibition INVENTCOR IInd edition, Deva, România 16-18 decembrie 2021: „*New molybdenum coordination compounds with important biological activities*”, Medalie de aur.

• **în formă de poster:**

1. 20th Congress of the International Society for Human and Animal Mycology. Amsterdam, Netherlands, 2018: „*Burden of Serious Fungal Diseases in Republic of Moldova*”.
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)-hydrazinethioamide*”.

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] benzo-hydrazide.*
4. International Conference Achievements and Perspectives of Modern Chemistry dedicated to the 60th anniversary from the foundation of the Institute of Chemistry. Chișinău, 2019: „*Water-soluble dicopper complex having antimicrobial activity*”; „*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: „*Particularitățile folosirii antimicrobienelelor de către studenții mediciști*”; *Formarea biofilmelor – unul din factorii de virulență ai fungilor.*
6. National Conference with International Participation „One Health Approach in a Changing World”. Chișinău, 2021: „*Synergistic antifungal effect of new compounds against Candida albicans biofilms*”.
7. 2nd Balkan Conference of Medical Mycology and Mycotoxicology „Balkan Fungus 2022”. Thessaloniki, Greece, 2022: „*Synergistic antifungal activity of thiosemicarbazone-metal complexes combined with Spirulina platensis extracts against Candida spp*”; „*The vulnerable characteristics of the fungal infective endocarditis*”.

Publicații la temă

Rezultatele studiului au fost reflectate și publicate în 60 de lucrări științifice, dintre care o monografie în monoautorat „*Fungii patogeni și rezistența la antimicotice*” (274 pag.), două capitole în monografie colectivă, zece articole în reviste din baze de date Web of Science și SCOPUS, cinci articole în diferite reviste științifice din străinătate recunoscute, 15 articole în revistele științifice din Registrul Național al revistelor de profil, în materialele congreselor, conferințelor științifice, dintre care patru publicații de monoautorat, nouă rezumate în culegeri de lucrări în cadrul conferințelor internaționale, zece rezumate la conferințe internaționale din republică, șase rezumate la conferințe naționale, șase ghiduri, două lucrări metodico-didactice, zece brevete de invenție, trei inovații. Materialele obținute în urma realizării tematicii tezei au fost prezentate la 17 foruri științifice internaționale, patru foruri naționale cu participare internațională și la nouă foruri științifice naționale.

Sumarul compartimentelor tezei

Lucrarea este expusă în limba română, pe 241 de pagini de text de bază tehnoredactat la computer, și include adnotări în limbile română, engleză și rusă, introducere, șase capitole, în patru

dintre ele fiind analizate rezultatele cercetărilor personale, concluzii generale, recomandări practice și bibliografia cu 334 de referințe, 20 de anexe. Materialul iconografic include 38 de tabele, 80 de figuri și trei formule.

Introducerea include actualitatea și importanța subiectului abordat prin prezentarea datelor elocvente, conceptelor teoretice, argumentarea ipotezei de cercetare în conformitate cu care au fost formulate scopul și obiectivele studiului. Este expusă sinteza metodologiei de cercetare și justificarea metodelor selectate, noutatea și originalitatea științifică a rezultatelor obținute, semnificația teoretică și valoarea aplicativă, implementarea rezultatelor științifice, participările la forurile științifice unde au fost prezentate rezultatele studiului și sumarul tezei pe capitole.

Teza cuprinde șase capitole privind studiul bibliografic al subiectului abordat, materiale și metode de cercetare, dar și rezultate originale.

Capitolul 1. Sinteza datelor și evoluția cercetărilor privind etiologia, clasificarea, diagnosticul și strategiile terapeutice în infecțiile fungice. În baza unei documentări comprehensive, care a inclus studii recente din sursele bibliografice naționale și internaționale despre agenții fungici, proritari implicați în dezvoltarea infecțiilor fungice, sunt elucidate principiile de clasificare a fungilor; etiologia, principiile de clasificare și metodologiile de diagnostic al infecțiilor fungice; mecanismele de acțiune ale preparatelor antifungice; conceptele fundamentale ale mecanismelor de rezistență la preparatele antifungice și posibilitățile de elaborare a unor noi molecule active asupra agenților fungici. În urma evaluării informațiilor la tema de cercetare din literatura de specialitate trecută în revistă, cu descrierea și interpretarea datelor, a fost documentat conceptul științific, care a servit ca suport teoretico-metodologic al cercetării. La finele capitolului sunt expuse concluziile, care reflectă povara globală a infecțiilor fungice și provocările cu care se confruntă medicina în domeniul de interes al prezentei lucrări.

Capitolul 2. Materiale și metode aplicate în cercetare. Sunt prezentate date cu referire la metodologia studiului descriptiv, design-ul general al studiului, metodologia cercetării, metode și tehnici aplicate la realizarea obiectivelor înaintate. Este descris obiectul de studiu, volumul eșantionului, metodele de investigație utilizate în conformitate cu cele existente în domeniul de specialitate, materialele primare, metodele statistice de prelucrare și de analiză a rezultatelor obținute. Concluziile formulate la finele capitolului reflectă în totalitate stadiul actual al metodologiei de studiu în domeniu și al proiectării metodelor pentru cercetarea curentă.

Capitolul 3. Distribuția levurilor din genul *Candida* în funcție de biosubstrat, ponderea factorilor de patogenitate și rezistența la antifungice. În cele câteva compartimente sunt descrise rezultatele obținute la acest capitol al prezentului studiu referitor la: ponderea și diversitatea speciilor de *Candida* implicate în unele micoze umane în funcție de biosubstraturile

cercetate; susceptibilitatea acestor specii de *Candida* la preparatele antifungice; exprimarea factorilor de patogenitate ai izolatelor clinice; corelarea rezistenței izolatelor clinice la antifungice cu factorii de patogenitate ai acestora. Capitolul se încheie cu concluzii ce sumarizează datele obținute în baza prezentării problematicii abordate pentru acest subiect.

Capitolul 4. Activitatea antifungică a unor compuși noi de origine chimică și biologică de interes farmaceutic. În acest capitol este abordată problema identificării unor noi formule farmaceutice cu acțiune antifungică și sunt descrise rezultatele analizei comparative ale activității antifungice a unor noi compuși chimici și biologici. Astfel, la această etapă a studiului a fost determinată activitatea fungistatică și fungicidă asupra micetelor levuriforme prin screening-ul a 980 de compuși chimici și extracte biologice; a fost stabilită concentrația minimă inhibitorie și minimă fungicidă atât pe tulpini de referință, cât și pe fungi izolați din diverse biosubstraturi umane; a fost evaluată activitatea compușilor monocompenți și policompenți asupra exprimării factorilor de patogenitate ai izolatelor clinice; au fost modelate experimental în combinație compușii care au prezentat o activitate antifungică mai evidentă pentru evaluarea sinergismului și timpului de ucidere a fungilor; a fost investigată acțiunea citotoxică a noilor compuși față de *Daphnia magna*. În baza datelor obținute la această etapă a studiului au fost obținute două certificate de inovație și nouă brevete de invenție. Capitolul se încheie cu concluzii formulate în baza analizei rezultatelor obținute la tema abordată.

Capitolul 5. Nanoparticulele de argint stabilizate cu diverși derivați naturali și proprietățile lor antifungice. Acest capitol cuprinde caracteristica noilor nanosisteme antifungice bazate pe nanoparticule de argint (AgNPs) generate din pululan, 6-carboxipululan și derivați celulozici. Sunt descrise rezultatele: screening-ului calitativ al sensibilității diferitor tulpini fungice față de nanoparticulele cu potențială acțiune antifungică; studierii activității antifungice a nanoparticulelor în urma determinării unor parametri cantitativi ai efectului indus de AgNPs stabilizate cu pululan, comparativ cu acțiunea derivaților celulozici, asupra izolatelor clinice și a tulpinilor de referință. Concluziile prezentate la sfârșitul capitolului, sunt axate pe rezultatele originale obținute la această etapă a studiului.

Capitolul 6. Markerii stresului oxidativ, sistemului antioxidant și pattern-ului inflamator ca rezultat al influenței compușilor biologic activi. Capitolul cuprinde descrierea rezultatelor obținute la: studierea acțiunii compușilor monocompenți și policompenți asupra intensității reacțiilor de oxidare cu radicali liberi în materialul biologic prin aprecierea unor indici ai stresului oxidativ și ai sistemului antioxidant; evaluarea expresiei unor citokine pro- (IL-6, IL-1 β și TNF- α) și antiinflamatoare (IL-10) sub influența compușilor chimici și biologici testați,

separat și în combinație. La finele capitolului sunt expuse concluziile, în care sunt reflectate ideile generate din rezultatele investigațiilor efectuate la etapa dată a studiului.

Concluziile generale, expuse la finalul tezei, reflectă esența rezultatelor obținute și sunt în corelație cu scopul și cu obiectivele trasate. Recomandările înaintate sunt adresate atât direcțiilor de cercetare, cât și aplicării lor în practica medicală.

Cuvinte-cheie: fungi, factori de patogenitate, antifungice, nanoparticule de Ag.

1. SINTEZA DATELOR ȘI EVOLUȚIA CERCETĂRILOR PRIVIND ETIOLOGIA, CLASIFICAREA, DIAGNOSTICUL ȘI STRATEGIILE TERAPEUTICE ÎN INFECȚIILE FUNGICE

1.1. Fungii de importanță medicală, caractere generale. Factorii de patogenitate și relevanța clinică

Fungii se întâlnesc pretutindeni în mediul înconjurător. Aceste microorganisme, suficient diferențiate de alte forme de viață, sunt considerate un univers aparte [3, 41, 42, 44, 48].

Fungii de importanță medicală constituie o provocare și o problemă gravă de sănătate publică și o povară economică majoră la nivel global [42, 44, 114, 253, 289].

Pe lângă faptul că provoacă infecții fungice superficiale, invazive, acute sau cronice, a fost demonstrată corelația între colonizarea fungică și evoluția unor boli, precum cancerul pancreatic și ciroza hepatică [9, 69, 91, 123, 155, 170].

Taxonomia fungilor este în continuă evoluție, iar posibilitățile de studiere detaliată a fungilor, datorită dezvoltării tehnologiilor inovative de diagnostic, implică modificări permanente ale nomenclaturii acestora [121, 139, 203, 308].

Fungii au fost evidențiați într-un regn aparte, structura căruia ulterior a fost supusă unor modificări, ținând cont de complexitatea și de diversitatea acestora [3, 101]. În prezent, regnul *Fungi* cuprinde următoarele încrengături: *Chytridiomycota*, *Zygomycota*, *Ascomycota* și *Basidiomycota* [114, 229, 307, 309, 316].

Încrengătura *Chytridiomycota* cuprinde agenți microbieni cu tal unicelular sau de natură micelară, al căror perete celular conține chitină. Aceste două caracteristici au stat la baza includerii lor în regnul *Fungi*. Prezența gameților sau a meiosporilor flagelați, deci mobili, produși în zoosporangi, a generat discuții între taxonomiști și au determinat atribuirea acestor fungi în regnul *Protista* [124, 166, 259, 309, 317].

Fungii, ce aparțin încrengăturii *Zygomycota* se pot multiplica atât asexuat, cât și sexuat. Interes medical prezintă doar două dintre cele 11 ordine din această încrengătură: *Mucorales* (genurile *Rhizopus*, *Absidia*, mai rar *Cokeromyces*, *Saksenaea*, *Apophysomyces* și *Chlamydoabsidia*) și *Entomophthorales* care include și specii ocazional patogene pentru om: *Basidiobolus ranarum*, *Conidiobolus incongruus* și *Conidiobolus coronatus*) [48, 115, 278, 300].

Încrengătura *Ascomycota* este cea mai bogată în specii. Prezența asciilor ca organul de reproducere sexuată este una din caracteristicile de bază de încadrare a speciilor de fungi în această încrengătură [101, 151, 177, 259, 298].

Pe baza rezultatelor secvențierii genei pentru subunitatea ribozomală 18S, ascomicetele au fost clasificate în trei grupe: primare, filamentoase sau unicelulare fără ascocarp și filamentoase cu ascocarp [44, 146, 241, 259, 309].

Încregătura *Ascomycota* cuprinde 46 de ordine, dintre care nouă includ fungi de interes medical: *Pneumocystidales*, *Microascales*, *Ophiostomatales*, *Sordariales*, *Hypocreales*, *Dothideales*, *Eurotiales*, *Onygenales* și *Saccharomycetales* [48, 101, 167, 190].

Încregătura *Basidiomycota* cuprinde aproximativ o treime din speciile de fungi (>40 000), repartizate în 18 clase cu 68 de ordine și 241 de familii. Reprezentanții acestei încregături joacă un rol esențial în ecosistem, fiind implicați în circuitul nutrienților. Principala caracteristică a bazidiomicetelor este prezența bazidiilor ca organ de înmulțire sexuată. O mare parte din bazidiomicete sunt fungi filamentoși și doar câteva genuri cuprind specii de micete levuriforme, majoritatea fiind patogene [3, 123, 141, 275].

Încregătura *Deuteromycota* (fungi imperfecti, asexuați sau mitosporici) reunește fungii fără înmulțire sexuată. Morfologia majorității deuteromicetelor este similară cu cea a fazelor anamorfe ale ascomicetelor și mai rar ale bazidiomicetelor. Studiile moleculare permit studierea detaliată și atribuirea lor într-o încregătură separată [114, 134, 180, 219, 298].

Grupări taxonomice, precum *Oomycota* și *Hyphochytriomycota*, acceptate în trecut ca încregături ale regnului *Fungi*, la moment sunt incluse în subregnul *Chromista*. Această modificare a fost motivată prin faptul că peretele celular al acestora nu conține chitină, fiind format preponderent din celuloză și β -glucan. Studiarea acestor fungi în cadrul micologiei medicale este motivată de unele considerente clinice. Astfel, cel puțin două specii pot cauza infecții oportuniste la oameni și la alte animale homeoterme: *Pythium insidiosum* și *Rinosporidium seeberi* [46].

Pe parcursul anilor, cercetătorii au identificat mai multe criterii de clasificare a fungilor. Criteriul morfologic, cel mai simplu, cunoscut și agreat în micologia medicală, se bazează pe caracteristicile structurale ale talului [259, 275, 288, 298].

În funcție de aspectele morfologice distingem [3, 101, 259, 275, 298]:

1. Levuri: micete unicelulare care se reproduc prin înmugurire, formând colonii netede, cremoase ex.: *Cryptococcus neoformans* (levuri capsulate);
2. Fungi similari levurilor (micete levuriforme): cresc parțial ca levurile și parțial formează celule alungite asemănătoare hifelor, numite pseudohife, de ex.: *Candida albicans*;
3. Fungi filamentoși: cresc ca filamente (hife) unicelulare sau pluricelulare și produc o rețea denumită miceliu, pe care se dezvoltă spori asexuați, conidii, amplasați sub formă de lanțuri sau în hife (conidiofori), ca de exemplu reprezentanții: *Aspergillus*, *Trichophyton* și *Zygomycetes*;

4. Fungi dimorfi: în funcție de temperatură se pot dezvolta atât sub aspect de levuri, cât și de filamente. Levurile se dezvoltă în organismul-gazdă și *in vitro* la 37 °C. Formele filamentoase au fost observate *in vitro*, în culturi obținute la temperatura de 25-28 °C.

Majoritatea fungilor, care provoacă infecții sistemice, sunt dimorfi: *Histoplasma capsulatum*; *Blastomyces dermatidis*; *Paracoccidioides brasiliensis*; *Coccidioides immitis*; *Penicillium marneffeii*; *Sporothrix schenckii* [3, 101, 238, 259, 275].

Un alt criteriu de clasificare a fungilor este *faza ciclului de viață* (prezența sau absența stadiului sexuat în ontogeneză). Acest criteriu este mai puțin important pentru micologia clinică, dar prezintă o valoare deosebită pentru micologia taxonomică [271, 275, 285].

Fungii se pot reproduce sexuat sau asexuat. La unii fungi, înmulțirea sexuată nu a fost demonstrată, aceștia fiind desemnați ca fungi imperfecti. Majoritatea fungilor, ce cauzează afecțiuni la om, sunt fungi imperfecti [115, 123, 271]. Reproducerea sexuată este descrisă ca un proces de contopire a două celule de gen diferit în două etape distincte: plasmogamia (fuzionarea citoplasmelor) și cariogamia (fuzionarea nucleilor). Ca rezultat, se formează spori. Înmulțirea vegetativă se realizează prin porțiuni de miceliu, înmugurire și prin spori asexuați specializați. Aceștia din urmă se formează în organe specializate (conidiile și sporangiosporii) sau direct în celulele hifale sau levurice (blastosporii, clamidosporii și artrosporii) [114, 143].

În funcție de faza ciclului de viață, distingem două forme de fungi [3, 158]:

1. Teleomorfă – forma sexuată, reproductivă a fungilor. Morfologia teleomorfei este baza clasificării pentru *Ascomycota* și *Basidiomycota*. Fungii teleomorfi sunt fungi perfecti. Ei produc atât spori sexuați, cât și asexuați.
2. Anamorfă – forma asexuată, vegetativă a fungilor în care aceștia produc sporii prin mitoză în niște structuri numite conidii sau sporangiofori. Fungii anamorfi sunt fungi imperfecti, produc doar spori asexuați, iar ca exemplu pot servi familia *Deuteromycetes*.

În funcție de calea de infectare a omului, fungii pot fi reuniți în trei grupe: antropofili (fungii se răspândesc de la o persoană la alta), zoofili (fungii se transmit de la animal la om) și geofili (fungii se transmit din sol la om) [47, 50, 213, 261, 305].

Factorii de patogenitate ai fungilor implicați în determinarea infecțiilor fungice

Lucrările științifice publicate recent în domeniul micologiei medicale pun accent pe relevanța clinică a factorilor de patogenitate în infecțiile fungice, pe estimarea incidenței și a prevalenței acestor infecții, pe impactul lor social și pe povara economică exercitată asupra sistemelor de sănătate [65, 147, 178, 205].

În acest subcapitol sunt prezentate cele mai recente studii cu referire la virulența și factorii de patogenitate ai fungilor [47, 142, 261, 265].

Virulența, descrisă de majoritatea cercetătorilor ca un proces complex constituit dintr-un șir de mecanisme biochimice, este proprietatea esențială a agenților fungici de a provoca un proces infecțios, manifestat prin dezvoltarea bolii în urma pătrunderii pe cale naturală sau experimentală într-un organism-gazdă susceptibil. Această proprietate a apărut ca rezultat al interacțiunii dintre organismul-gazdă și cel parazit, și presupune mai multe etape. Mai întâi are loc pătrunderea și localizarea în organismul-gazdă, după care urmează multiplicarea și elaborarea toxinelor ce facilitează invadarea organismului-gazdă, elaborarea răspunsului imun și dezvoltarea rezistenței la mecanismele de apărare ale organismului-gazdă, și, în final, inducerea de leziuni specifice organismului-gazdă [147, 178, 195, 205].

Unii cercetătorii descriu virulența ca capacitate relativă a unor fungi patogeni de a determina producerea de leziuni tisulare, generând o stare patologică a organismului receptiv. Cantitativ, virulența fungilor exprimă gradul de patogenitate pe care un agent fungic patogen îl poate exercita în organismul-gazdă. Această caracteristică este dependentă de particularitățile structurale și fiziologice ale agentului fungic, manifestate prin infecțiozitate, agresivitate, toxigenitate. Factorul de patogenitate este descris ca factor care sporește virulența fungilor [50, 65]. Acești factori s-au dezvoltat în procesul de interacțiune dintre factorii de mediu și flora comensală, însă pot evolua și pe parcursul colonizării, infectării organismului-gazdă (ex.: termotoleranța, rezistența la antifungice) [205, 213, 252, 261].

Pentru speciile de fungi relevante din punct de vedere medical, cei mai comuni factorii de patogenitate descriși în majoritatea studiilor sunt: capacitatea de aderare la țesuturi, producerea enzimelor hidrolitice, polimorfismul, termotoleranța la 37°C, formarea biofilmelor și efectele imunomodulatoare ce diminuează rezistența gazdei [68, 165, 202, 274].

Tranziția de la forma comensală la parazitism reprezintă o provocare metabolică, fiind necesară adaptarea la schimbările de temperatură, a conținutului de CO₂ și a valorilor pH-ului pentru a supraviețui în mediul gazdei. În cazul în care sistemul imun al gazdei nu este capabil să lupte cu acești factori de patogenitate, ea devine receptivă și dezvoltă boala [65, 71, 178, 252].

Capacitatea agenților fungici de a adera la țesuturile gazdei și de a elibera enzime capabile să le afecteze, le permite să interfereze direct cu mecanismele de apărare ale gazdei. Adezinele, structuri specializate, localizate pe suprafața exterioară a peretelui celulei fungice, permit fungilor să colonizeze diverse substraturi și să se atașeze de țesuturile-gazdă (în mod special la epiteliu și la endoteliu) [47, 50, 198, 220].

Elementele structurale fungice de aderență dispar la cultivarea *in vitro*, fiind facilitată de interdependența sarcinilor electrice ale suprafețelor. Procesul de aderență reprezintă un beneficiu pentru fungii patogeni, deoarece îi asigură cu nutrienți și evită acțiunea anticorpilor și lizozimei.

Celulele, ce au aderat la substrat, se multiplică mult mai intens comparativ cu cele neaderente [50, 178, 213].

La fungii levuriformi a fost detectată proprietatea de aderență, formarea biofilmelor, polimorfismul, elaborarea de enzime (*ex.*, proteaze, fosfolipaze, lipaze), variabilitatea morfologică, efecte imunomodulatoare, care reduc eficacitatea mecanismelor de rezistență antifungică ale gazdei; toxicitate, datorată hemolizinei și endotoxinelor, suprimarea membranelor mucoase ale gazdei și dezvoltarea infecției mixte [23, 99, 215, 296].

Proprietatea de aderare a speciilor din genul *Candida* variază, fiind mai accentuată la speciile *C.albicans*, *C. tropicalis*, *C. dubliniensis* și mai puțin accentuată la speciile *C.glabrata* și *C.krusei*. A fost demonstrată accentuarea proprietăților de adeziune ale fungilor la acțiunea antimicrobienele, hormonilor glucocorticoizi, citostaticelor ș.a. [47, 175, 178, 234, 261].

La fungii din genul *Candida* a fost demonstrată prezența și a altui factor de patogenitate cum ar fi proprietatea de formare a biofilmelor asociată rezistenței la antifungice, ceea ce și explică antrenarea acestui patogen în dezvoltarea frecventă a candidemiei persistente [65, 147].

Aderarea la epiteliul intestinal a celulelor de candida este datorată proteazelor ce acționează asupra proteinelor endoteliale vasculare [99, 214, 216].

Dovezi științifice cu referire la DNA-ze atestă că aceste enzime asigură reducerea vâscozității secrețiilor unde se acumulează ADN-ul din celulele distruse, favorizând diseminarea fungilor. Detectarea acestor enzime la fungi demonstrează virulența lor [23].

Un rol semnificativ în invadarea sistemului nervos central de către fungi revine ureazei. *Coccidioides immitis* de asemenea produce urează și induce creșterea nivelului de alcalinitate în locul de pătrundere, ceea ce-i permite să disemineze în organismul-gazdă. Tulpinile cu deficit de urează nu se pot răspândi [215, 296].

Metodologia de detectare a factorilor de patogenitate *in vitro*, descrisă de cele mai relevante publicații, în special cercetarea exprimării factorilor asociați elementelor din peretele celular, producerea de enzime extracelulare (proteaze, lipaze, fosfolipaze și DNA-ze), proprietatea de a lega ioni de Fe^{3+} , dar și rezistența la compuși cu acțiune antifungică, pot fi evaluate prin metode fenotipice. În prezent au apărut studii care permit evidențierea factorilor de patogenitate prin tehnici de biologie moleculară [18, 178, 205, 213, 252].

În ultimul timp apar tot mai des cercetări de biologie moleculară asupra genelor responsabile de factorii de patogenitate cu funcții metabolice specifice. Aceste cercetări sunt importante, iar posibilele rezultate ar putea fi utilizate în procesul de elaborare a țintelor noi de antifungice selective sau epitopi de vaccin [47, 50, 65].

Înțelegerea factorilor de patogenitate are o importanță majoră pentru managementul eficient al infecțiilor fungice invazive, pentru decizii argumentate privind diagnosticul, tratamentul cu acordarea îngrijirilor sigure de sănătate.

În decembrie 2022, OMS a publicat lista fungilor prioritari care necesită acțiuni urgente din partea țărilor, cum ar fi cercetările fundamentale și aplicative asupra elucidării metodologiilor rapide de diagnostic, factorii de patogenitate, mecanismelor de rezistență, dezvoltarea de noi molecule antifungice și implementarea strategiilor de prevenire și de control a infecțiilor fungice.

1.2. Concepte contemporane privind factorii de risc, etiologia și tipurile de infecții fungice

În prezent, infecțiile fungice invazive sunt declarate ca provocare majoră pentru sistemele de sănătate, incidența acestora crescând considerabil în ultimile decenii ca rezultat al utilizării neargumentate a antifungicelor, corticosteroizilor, medicației imunosupresoare, citostaticelor etc. Peste un miliard de persoane din întreaga lume suferă de infecții fungice, iar contribuția lor la povara bolii la nivel global este în mare parte subestimată [3, 41, 48, 114, 162, 219, 297].

Numărul deceselor atribuite infecțiilor fungice a crescut semnificativ în ultimile decenii. Astfel, în anul 2020 au fost raportate aproximativ 1,7 milioane de decese [48, 101, 115].

În ultimele două decenii, spectrul agenților fungici responsabili de dezvoltarea infecțiilor fungice s-a schimbat pe motivul modificărilor parvenite în rândul populației susceptibile (*ex.*, creșterea numărului persoanelor imunocompromise) și utilizării neargumentate a preparatelor antifungice. Microbiota fungică, care populează anumite părți ale organismului uman în anumite condiții pot dezvolta infecții oportuniste, iar uneori și invazive, punând în pericol viața și sănătatea persoanelor cu sistem imun deprimat [48, 123, 141, 143].

Totodată, pe lângă infecțiile oportuniste și invazive, persoanele cu dereglări ale statutului imun dezvoltă infecții asociate asistenței medicale cauzate de agenți patogeni fungici, precum *Candida*, *Aspergillus*, *Fusarium* și *Mucorales* [7, 61, 62, 230].

Infecțiile fungice invazive sunt determinate cel mai frecvent de fungii din genurile *Candida*, *Blastomyces*, *Coccidioides*, *Paracoccidioides*, *Histoplasma* și *Cryptococcus*. A patra, cea mai frecventă infecție oportunistă înregistrată în cadrul instituțiilor medicale spitalicești este infecția cu *C. albicans* [17, 242].

În pofida existenței oportunităților de tratament, mortalitatea în candidozele invazive, continuie să fie înaltă și constituie ~ 42% din numărul total de cazuri înregistrate [19, 62, 82, 87].

Fungii subregului *Dikarya*, din încregăturile *Ascomycota* și *Basidiomycota* sunt principalii agenți etiologici ai infecțiilor fungice antropofile. Reprezentanții încregăturii *Ascomycota* sunt responsabili de dezvoltarea afecțiunilor orofaringiene, otorinolaringiene,

dermatologice, oftalmologice, renale, genitourinare, cardiace, pulmonare și invazive (Figura 1.1). Agenții fungici ai regnului *Basidiomycota*, cum ar fi *Cryptococcus* și *Malassezia*, sunt implicați în dezvoltarea meningitelor invazive și a afecțiunilor superficiale ale pielii [19, 82, 156, 294].

Infecțiile fungice pot fi clasificate în funcție de locul de pătrundere a infecției (superficiale, subcutanate, invazive, oportuniste), calea de transmitere a agentului patogen (exogenă, endogenă) și tipul de patogenitate manifestat de fungi (primare sau oportuniste) [1, 11, 21].

În funcție de calea de pătrundere a fungilor, ce poate avea loc prin traversarea tegumentului, inoculare prin intermediul plăgilor sau diseminare, se pot dezvolta afecțiuni fungice superficiale (dermatofite), subcutanate și invazive (sistemice).

Infecțiile dermatofite sunt cauzate de infectarea straturilor superficiale ale pielii de către agenții dermatofiți. Definiția dată este bazată pe localizarea specifică a afecțiunilor și nu pe apartenența sistematică a agenților cauzali, cu toate că majoritatea dermatofiților fac parte din genurile *Microsporum*, *Trichophyton* și *Epidermophyton* [40, 62, 82].

Infecțiile fungice superficiale se consideră ar fi cele care presupun afectarea în cea mai mare parte a stratului cornos, exterior al pielii, precum și a membranelor mucoase, unghiilor și părului. Aceste infecții, inclusiv cele cauzate de *Dermatophytes*, *Trichophyton* spp., *Microsporum* spp. și *Epidermophyton* spp., sunt cele mai frecvent înregistrate în lume [26].

La nivel global, se consideră că 20-25% din populație suferă de micoze superficiale, iar prevalența acestora este în creștere continuă [176, 219, 253, 259]. Sunt notificate și infecții fungice cauzate de *Candida* spp. definite ca candidoze superficiale (*mucoase*: bucofaringiene, genitourinare, *cutanate*: onix, intertrigo, foliculite ș.a.) [1, 11, 294].

Infecțiile fungice invazive predominant sunt cauzate de fungii din genurile *Candida*, *Aspergillus* și *Mucor*, mai rar de fungii din genurile *Blastomyces*, *Coccidioides*, *Paracoccidioides*, *Histoplasma* și *Cryptococcus* spp. [21, 58, 82, 87].

Infecțiile fungice invazive se dezvoltă în urma diseminării fungilor în organismul uman dintr-un focar profund sau dintr-un organ intern (*ex.*, sinusurile paranazale, tractul digestiv, plămâni). Toți acești fungi, cu excepția *Cryptococcus neoformans*, sunt fungi dimorfi, existând sub formă de filamente în mediul înconjurător și transformându-se în levuri în țesuturile-gazdă [102, 111, 156].

Infecțiile fungice invazive (IFI) sunt înregistrate mai rar în practica medicală comparativ cu cele superficiale, însă prezintă o problemă stringentă, fiind asociate cu mortalitate înaltă, circa 1,5 milioane de decese la nivel global [85, 250].

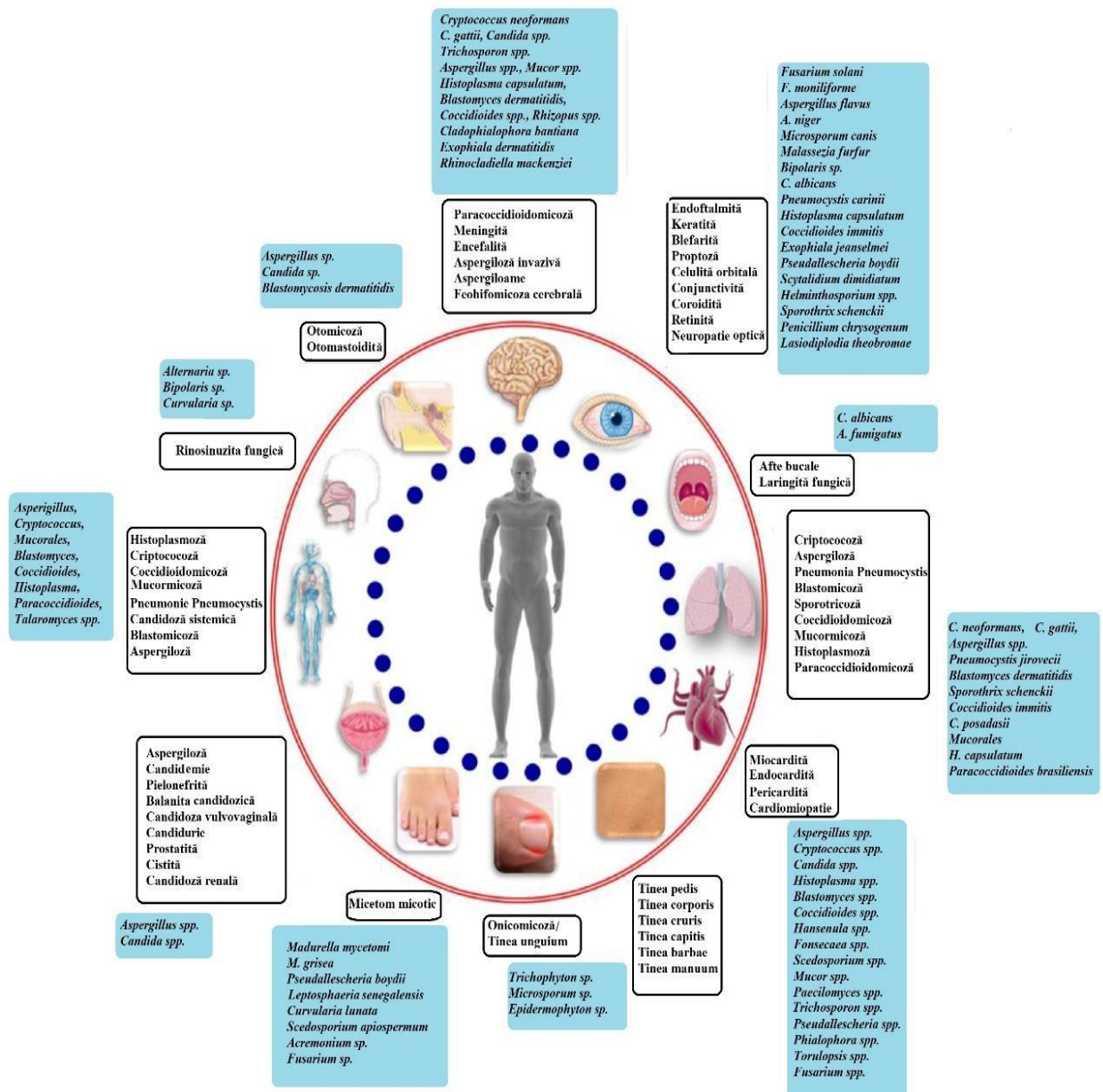


Fig. 1.1. Spectrul infecțiilor fungice și agenții etiologici ai acestor infecții la om

Proporții îngrijorătoare a atins numărul de pacienți susceptibili la infecții invazive provocate de fungi filamentoși, întâlniți în diverse habitate naturale (sol, substraturi organice ș.a.). Cei mai cunoscuți agenți ai micozelor invazive fac parte din genul *Aspergillus* și *Mucor* [21, 87].

1.3. Aspecte contemporane în epidemiologia infecțiilor fungice invazive

Importanța abordării principiilor epidemiologice ale infecțiilor fungice invazive reiese din indicatorii de frecvență, de gravitate și evoluția etiologică în dinamică [42, 43]. Date reale despre incidența și mortalitatea atribuitele infecțiilor fungice invazive sunt dificil de obținut din cauza subdiagnosticării, subraportării și a diferențelor în cerințele de confirmare a diagnosticului [289].

Motivele pentru care infecțiile fungice invazive au devenit mai frecvente în ultimii 20 de ani nu au fost încă pe deplin elucidate. Cercetătorii consideră că factorii determinați ce țin atât de starea pacientului, cât și de mediu înconjurător sunt la fel de importanți în patogeneza infecțiilor fungice invazive [43]. Frecvența și severitatea infecțiilor fungice invazive depind de mulți factori, inclusiv de utilizarea intensă a imunosupresoarelor, preparatelor anticanceroase, antibioticelor cu spectru larg de acțiune, protezelor și transplanturilor. Îmbunătățirea nivelului de asistență medicală a dus la o creștere a speranței de viață a pacienților aflați în stare critică, făcându-i vulnerabili la aceste infecții [114, 163].

O gamă largă de agenți patogeni pot fi asociați cu infecțiile fungice invazive, dar speciile din genul *Candida* au fost, din punct de vedere istoric, cei mai comuni agenți patogeni [253]. Conform datelor din literatura de specialitate, 90% din infecțiile invazive sunt cauzate de speciile *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* și *Candida krusei*. În condiții normale *Candida* spp. nu provoacă afecțiuni, doar când persoana devine imunocompromisă acești agenți se pot disemina în organele interne [44, 253, 267].

Referitor la infecțiile fungice invazive cauzate de speciile din genul *Candida* spp., studiile atestă ca manifestări clinice generale: sindrom inflamator sistemic (febră, tahicardie, tahipnee), alterarea stării generale [163, 225, 272].

Diseminarea infecției fungice cu specii de *Candida* pe cale hematogenă poate afecta rinichii, SNC, miocardul, ochii, mai rar plămânii, tubul digestiv și pielea. Întrucât manifestările clinice sunt în general reduse, mai puțin de jumătate din cazurile de candidoză diseminată sunt diagnosticate în timpul vieții pacientului [38, 43, 76].

În cazul afectării SNC, simptomatologia clinică este polimorfă, nespecifică, manifestată prin cefalee, redoare de ceafă, confuzie, dezorientare, ceea ce prezintă deficiențe în diagnosticul precoce al acestei afecțiuni [43, 267].

La implicarea speciilor de *Candida* în afecțiunile pulmonare apar semnele sindromului de detresă respiratorie acută, iar afectarea plămânului este însoțită de simptomatologie minimă și modificări radiologice nespecifice [277, 282, 321].

Afecțiunile oculare cauzate de speciile din genul *Candida* se manifestă prin dureri, pete negre sau colorate, uneori spumante, vedere neclară, abcese retiniene. Consultul medicului cu examen oftalmologic poate stabili un diagnostic prezumptiv, confirmat prin cercetări de laborator.

Speciile din genul *Candida* spp. [128], responsabile de 8–10% din toate infecțiile asociate asitenței medicale, rămân agenți patogeni importanți în secțiile de terapie intensivă [163]. Candidemia apare în 17% din cazurile de complicații infecțioase la pacienții din secțiile de terapie intensivă, dintre care agentul etiologic este *C. albicans* în 15–60% din cazuri, *C. parapsilosis* în

5–40%, *C. glabrata* – în 5–25%, *C. tropicalis* – în 5-15%, *C. krusei* – în 3-7% din cazuri. Dintre agenții patogeni cel mai frecvent izolați din sânge, speciile din genul *Candida spp.* s-au clasat pe locul patru, după speciile *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* și *Enterococcus spp.* [42, 321, 329].

Pe baza datelor din sursele evaluate, frecvența candidozei invazive este de 2,6–3,1% în rândul nou-născuților cu greutate foarte mică la naștere și de 10–16% la nou-născuții cu greutate extrem de mică la naștere, în timp ce mortalitatea poate ajunge la 40% [3, 42]. Infecțiile fungice la nou-născuții prematuri tratați în secțiile de terapie intensivă ocupă locul trei în rândul infecțiilor asociate asistenței medicale [114, 299]. Alături de candidoza invazivă, acești pacienți prezintă și un risc crescut de a dezvolta IFI cauzate de fungii filamentoși și levuri [42, 253, 321].

Datele din literatură arată că speciile din genul *Candida* sunt agenți patogeni oportuniști care reprezintă o cauză majoră de morbiditate și mortalitate la nivel mondial. Anume din acest motiv reprezentanții acestui gen sunt considerați o amenințare serioasă pentru sănătatea publică. Printre cele mai frecvente afecțiuni cauzate de speciile de *Candida* pot fi enumerate vaginita, candidoza orală, candidoza cutanată, infecțiile invazive ș.a. [10, 42, 54, 247, 248, 320, 323, 325].

Aspergiloza pulmonară invazivă autorii o descriu ca afecțiune cu o simptomatologie puțin mai specifică, comparativ cu cea candidozică, caracterizată prin febră, tuse seacă, dispnee, dureri toracale cu caracter pleural, hemoptizie, rar pneumotorax. În stabilirea diagnosticului definitiv de aspergiloză este hotărâtor examenul radiologic și detectarea opacităților la nivelul plămânilor cu tendința la abcedare, infiltrate alveolare, din ce în ce mai difuze, pe măsură ce progresează afecțiunea. În cazul pacienților cu imunosupresie severă această maladie se poate complica cu diseminarea agentului fungic pe cale hematogenă cu dezvoltarea aspergilozei invazive diseminate, asociată cu afectarea SNC, cordului, ochilor, rinichilor, tractului digestiv și cu mortalitate foarte înaltă [212, 303].

Analiza celor mai recente dovezi din literatura de specialitate a arătat că căile de transmitere a infecțiilor fungice invazive sunt: *aeriană*, prin inhalarea de aerosoli conținând conidii sau apă contaminată cu *Aspergillus spp.*, urmată de apariția unor mici izbucniri epidemice asociate unor riscuri de mediu spitalicesc; *digestivă*, prin ingestia unor alimente mucegăite, cu apariția de cazuri sporadice de mucormicoză, descrise uneori chiar la persoane imunocompetente; *de contact*, cel mai frecvent asociată cu transmiterea în colectivități a micozelor pielii și a anexelor pielii (unghiile, părul), mai rar cu bandaje în coccidiodomicoză; *prin instrumentar medical*, cateterizări prelungite și nutriție parenterală totală – *Candida spp.*, *Malassezia furfur*, *Tricophyton spp.* [302].

Receptivitatea organismului-gazdă este cel mai important factor implicat în determinarea infecțiilor fungice invazive. Condiția de imunosupresie se regăsește în cele cinci mari grupe de

risc enumerate anterior. Afectarea uneia sau a mai multor bariere de apărare creează condiții de oportunitate pentru infecțiile fungice invazive [3, 114, 289].

În ultimul deceniu, focarele de infecții fungice invazive asociate asistenței medicale au devenit mai frecvente, în special cu fungi rari și reemergenți. Agenții patogeni fungici predominanți implicați în IAAM sunt *Candida* spp., *Aspergillus* spp., *Mucorales*, *Fusarium* spp. și alte mucegaiuri, inclusiv *Scedosporium* spp. [3, 111]. Genul *Aspergillus* include aproximativ 175 de specii, dintre care doar câteva sunt asociate cu maladii umane, în principal de *A. fumigatus*, urmat de *A. flavus*, *A. terreus*, *A. niger* și *A. nidulans*. Aceste infecții au fost descrise frecvent la pacienții cu afecțiuni hematologice maligne, la 1-15% dintre pacienții care beneficiază de transplant de organe parenchimatose și la cei cu hemodializă intermitentă cronică [34, 42, 111, 114]. În cazul pacienților cu boală pulmonară obstructivă cronică, factorii de risc pentru dezvoltarea aspergilozei sunt cursurile repetate de antibioterapii combinate cu terapia îndelungată de glucocorticosteroizi [289]. Mai multe studii au evidențiat incidența în creștere a infecțiilor invazive cu *Aspergillus* asociate cu terapie intensivă [44].

În prezent, infecțiile fungice invazive se plasează pe locul patru printre cauzele IAAM ale fluxului sangvin [3, 42].

Rolul crescând al infecțiilor fungice invazive în etiologia IAAM a dus la introducerea unui număr semnificativ de medicamente noi în practica clinică și la utilizarea lor pe scară largă, ceea ce a favorizat dezvoltarea rezistenței antifungice [3].

În condițiile moderne, pentru a preveni un eșec global în controlul infecțiilor fungice invazive ar trebui să fie realizate activități care vizează: dezvoltarea unor strategii optime de combatere a rezistenței antifungice; elucidarea continuă a mecanismelor responsabile de dezvoltarea rezistenței la antifungice; utilizarea rațională a antifungicilor existente în practica clinică; supravegherea epidemiologică direcționată a rezistenței la antifungice, ținând cont de monitorizarea în dinamică a spectrului agenților patogeni și a sensibilității acestora la antifungice; elaborarea unor metode și criterii standardizate de evaluare a sensibilității fungilor la preparatele antifungice în vederea selectării mijloacelor optime în managementul infecțiilor fungice.

1.4. Diagnosticul de laborator al infecțiilor fungice invazive

Anual, la nivel global, se atestă o creștere evidentă a numărului de decese din cauza IFI. Diagnosticul IFI în secțiile de terapie intensivă prezintă multe provocări și particularități distinctive pentru candidoza și aspergiloza invazivă. Detectarea precoce și rapidă este crucială pentru a reduce rata mortalității asociate cu aceste infecții. În acest subcapitol vor fi prezentate metodele de diagnostic pentru detectarea IFI [43, 101, 190, 201, 323].

Stabilirea unui diagnostic veridic de infecție fungică invazivă depinde în totalitate de selectarea și de recoltarea corectă a prelevatelor unui specimen clinic. Infecțiile fungice sunt similare din punct de vedere clinic cu infecțiile microbiene și, adesea, același specimen este cultivat atât pentru fungi, cât și pentru bacterii [279, 300].

Diagnosticul infecției fungice prin metode tradiționale, cum ar fi examinarea microscopică directă a probelor clinice, histopatologia și cultura, s-a dovedit a fi convențional și de o sensibilitate redusă. Prevalența crescută a infecțiilor fungice invazive a impus oamenii de știință să dezvolte și să aplice noi metode de diagnostic, mai sensibile și mai rapide. În prezent, majoritatea cercetătorilor pun accent sporit pe utilizarea metodelor serologice de detectare a antigenelor [3, 9, 46, 93, 105, 109].

Element-cheie în prelevarea corectă a biosubstraturilor pentru diagnosticul infecțiilor fungice se consideră transportarea rapidă a probei la laboratorul clinic. Savanții recomandă adăugarea antibioticelor, precum penicilină (20U/mL), streptomycină (1,00,000μg/mL) sau cloramfenicol (0,2 mg/mL), pentru a inhiba și preveni dezvoltarea excesivă a microflorei bacteriene comensale. În lipsa posibilității transportării imediate, proba trebuie depozitată la frigider la 4 °C pentru cel mult 24 de ore. La această temperatură se păstrează viabilitatea agenților patogeni și se reduce multiplicarea contaminanților. Specimenele, care nu trebuie refrigerate, includ sângele, care trebuie păstrat la temperatura camerei sau într-un incubator la 35°C și LCR, transportat imediat la temperatura camerei [57, 190, 200, 240, 298].

Investigații de laborator. Examenul microscopic direct al biosubstraturilor și culturilor suspecte trebuie realizat de fiecare dată când este necesar un rezultat preventiv pentru a ghida medicul clinician. Cu atât mai mult că de multe ori constituie singura cercetare de natură biologică. Metodele de examinare microscopică directă recomandate sunt amprente umede (KOH, alb de calcofluor, cerneală de India); histopatologia și colorarea cu anticorpi fluorescenți [173, 192, 200].

Pentru a distinge celulele fungice este foarte utilă o prelucrare cu hidroxid de potasiu. Dacă levurile și hifele se află în același câmp microscopic, este probabil să fie vorba de *Candida albicans*. Speciile de *Aspergillus*.spp. sunt, de obicei, prezente sub formă de hife subțiri septate care se ramifică în unghiuri ascuțite. Fungii *Mucorales* prezintă structuri hifale neseptate, largi, asemănătoare unor panglici care se ramifică la 90°; fungii *Cryptococcus* pot fi identificați după prezența capsulei. *Blasatomyces* este o levură cu un model de înmugurire largă, în formă de opt. *Histoplasma capsulatum* este un fung foarte mic, amplasat intracelular, iar sferoidul cu endospori este sugestiv pentru *Coccidioides immitis* [57, 155, 170].

Colorantul alb de calcofluor cu KOH este util pentru a evidenția prezența celulelor fungice în probele clinice, deoarece se leagă de polizaharidele β 1-3, β 1-4 prezente în pereții celulelor

fungice. Colorantul devine fluorescent la expunerea la lungimi de undă mai mici decât cele ale luminii UV. În prezența celulelor de levuri, a pseudohifelor și a hifelor, se observă o fluorescență de culoare alb-cenușie sau verde-crud strălucitor. Caracterul fluorescenței depinde, de obicei, de un filtru utilizat care le separă de materialul de fond. Pentru detectarea celulelor fungice preparate cu alb de calcofluor este necesar un microscop cu fluorescență, ceea ce, de multe ori, reprezintă un dezavantaj al utilizării acestei metode [9, 44, 155].

Colorația Gram evidențiază fungii *Cryptococcus spp.* care prezintă doar o punctiformitate și se colorează slab în unele cazuri, iar izolatele de *Nocardia spp.* nu se colorează sau se colorează foarte slab [46].

Cerneala de India se recomandă pentru a indica prezența sau absența capsulelor polizaharidice extracelulare ale celulelor fungice, în special ale speciei *Cryptococcus neoformans* în LCR. Prin intermediul acestui colorant, celulele fungice încapsulate pot fi detectate cu ușurință pe un fundal întunecat [46, 48, 170, 259, 300].

Lactofenol cotton sau preparat umed cu albastru de anilină este cea mai utilizată metodă în micologia medicală. Acidul lactic conservă structurile peretelui celular al fungilor și lamelele pot fi constante pe o perioadă îndelungată [139, 316].

Una dintre cele mai utilizate metode de colorație pentru histopatologia fungică este PAS. Această metodă permite detectarea glicogenului în țesuturi, în pereții celulelor fungice ce-l conțin în cantități suficiente [69, 91].

În colorația cu argint metenamină Gomori (modificarea lui Grocott), grupările aldehidice sunt eliberate și identificate prin metoda argintului redus care proiectează polizaharidele prezente în pereții celulelor fungice. Aldehidele determină reducerea complexului de nitrat de argint de metenamină, care are ca rezultat colorarea brun-negru a peretelui celular fungic. Colorația de argint cu metenamină Gomori este mai bună decât alte colorații utilizate în diagnosticul micologic, deoarece colorează atât celulele fungice vii, cât și cele moarte, spre deosebire de PAS, care le colorează numai pe cele vii [123, 155, 170].

Colorația cu anticorpi fluorescenți se recomandă pentru detectarea antigenului fungic în materialul clinic, cum ar fi puroi, sânge, LCR, frotiuri de amprentă tisulară și în secțiuni de parafină din țesuturi fixate în formol. Autorii descriu avantajul acestei tehnici prin detectarea fungilor chiar dacă sunt prezente doar câteva celule, așa cum se atestă în puroiul din sporotricoză [57, 114].

Examinarea histologică a țesuturilor pentru a detecta peretele celular al fungilor rămâne un instrument important pentru a defini semnificația diagnostică a izolatelor de cultură pozitive, inclusiv invazia fungică a țesuturilor și a vaselor, precum și reacția gazdei la fungi [300, 308].

Izolarea culturii de agenți fungici dintr-un biosubstrat a fost întotdeauna diagnosticul-cheie pentru depistarea infecțiilor fungice. În plus, cultura permite testarea sensibilității la antifungice. Culturile sunt incubate la 25-30°C și la 37°C, deoarece mulți agenți patogeni fungici se dezvoltă la temperaturi sub 37°C. După ce se notează caracteristicile coloniei, cum ar fi culoarea și textura creșterii, se fac amprente pe lame în colorație cu lactofenol albastru cotton pentru a studia detaliile morfologice. Pentru fungii care cresc în 7-14 zile sau care au un miceliu aerian în formă de pânză de păianjen, trebuie luată în considerare una dintre speciile dimorfe [48, 134, 155].

Însămânțarea sângelui se face imediat după prelevarea unei cantități suficiente. Chiar și o singură hemocultură cu rezultat pozitiv, prelevată cu respectarea riguroasă a tuturor cerințelor, indică prezența infecției și necesitatea inițierii terapiei empirice [57, 101, 123, 155, 286].

În cazul suspjecției unei infecții urinare cauzată de *Candida* spp., pentru diagnosticul diferențial de alți agenți infecțioși, se recomandă să se ia în considerare prezența sau absența piuriei, numărul de colonii care permit confirmarea sau excluderea unei infecții urinare cu *Candida* spp. De asemenea se va preciza dacă pacienții sunt cateterizați sau nu. Infecția urinară cu *Candida* spp. va fi confirmată în cazul când examinarea uroculturii atestă prezența > 10000 UFC/ml la nonneutropenici și 1000 UFC/ml la neutropenici. Majoritatea autorilor menționează că la pacienții cateterizați, în urocultura cărora au fost izolate specii de *Candida*, dar lipsesc simptomele clinice, nu este necesară terapia antifungică, fiind recomandată doar schimbarea cateterului urinar și repetarea prelevării. Izolarea *Candida* spp. la pacienții necateterizați, care nu au avut în ultima perioadă proceduri cu implicarea pelvisului sau vezicii urinare, este sugestivă de infecție urinară dezvoltată pe cale hematogenă [42, 305].

Referitor la spută, la lavajul bronhoalveolar, evidențierea *Candida* spp. nu are valoare diagnostică și, în general, nu are consecințe clinice, dacă pacientul nu este simptomatic. Schimbarea sondei de intubație și aplicarea orofaringiană de preparat antifungic poate duce la sterilizare. Acest criteriu aduce dovezi pentru colonizare și trebuie luat în considerare ca factor de risc. Prezența *Candida* spp. în secreția traheală nu este marker de infecție pulmonară cu acest agent, iar confirmarea candidozei pulmonare se face prin examen bioptic [57, 69, 91, 123].

Aspergillus spp. poate fi izolat în spută și la pacienții sănătoși, iar evidențierea acestui agent în lavajul bronhoalveolar, la pacienții cu risc, confirmă diagnosticul.

Diagnosticul serologic se bazează pe detectarea fie a anticorpilor, fie a antigenului în serul pacientului și are mai multe avantaje. În primul rând, este mai sensibilă decât metodele de cultură și oferă rezultate chiar și atunci când prelevatele sunt în cantitate mică. În al doilea rând, în cazul în care rezultatele serologice sunt pozitive, acestea pot reduce nevoia de pregătire a culturii pentru fungii potențial periculoși (ex., *Coccidioides* spp.), fiind minim invazivă. Nivelurile scăzute de

sensibilitate și de specificitate sunt dezavantajele serologiei. Un test serologic negativ nu ar trebui să excludă prezența unei infecții fungice. Punctul slab al serologiei este de a face distincția între infecția prezentă și cea trecută. În cele din urmă, sensibilitatea depinde de tipul de boală și de momentul efectuării testului în raport cu procesul bolii, de exemplu, timpuriu față de tardiv [123, 155, 171, 177, 203].

Latexaglutinarea, imunodifuziunea, imunoelectroforeza în contracurent, anticorpii imunofluorescenți, ELISA și Western Blot sunt tehnici serologice recomandate. Testele deosebit de utile includ detectarea antigenelor specifice agentului fungic, cum ar fi galactomananii, considerați specifici pentru diagnosticul de aspergiloză. Detectia serică a β -glucanilor este utilizată ca instrument de diagnostic pentru detectarea unui spectru larg de agenți patogeni fungici, cu excepția *Mucorales* și *Cryptococcus neoformans* [57, 139, 203, 206, 308, 316].

Pentru stabilirea diagnosticului de infecție fungică cauzată de *Candida* spp. se cercetează compusul manan și manoproteinele din structura peretelui celular (markeri de infecție invazivă). Pentru aspergiloză se investighează compusul galactomanan în lichidele seroase, urină, lavajul bronhoalveolar. În cazul criptococozei se pot evidenția antigene sau anticorpii în ser, LCR. Diagnosticul de histoplasmoză se va pune pe baza evidențierii antigenului polizaharidic de *H. capsulatum* în ser, în lavajul bronhoalveolar și în urină [114, 229, 259].

Diagnosticul imagistic, precum ecografia, imagistica prin rezonanță magnetică (RMN), tomografia computerizată (CT), este recomandat pentru evidențierea focarelor septice abdominale sau cardiace. În cazul suspjecției afectării oculare, se va efectua examen oftalmologic [3, 9, 48].

În ultimii ani, majoritatea savanților recomandă înlocuirea metodelor convenționale cu cele de biologie moleculară. În general, aceste metode au avut și vor continua să aibă un impact major asupra diagnosticului și tratamentului adecvat al infecțiilor fungice. Parametrii analitici ai acestor metode trebuie să fie standardizați pentru a optimiza sensibilitatea și specificitatea și trebuie efectuate studii comparative pentru a le determina pe cele mai bune de utilizat în laborator. În mod ideal, testele ar trebui să fie cât mai simplu de realizat, astfel încât majoritatea laboratoarelor clinice să le poată utiliza [101, 110, 134, 190, 254, 281].

Ținând cont de numărul mare de fungi în mediul înconjurător, care pot infecta în special pacienții imunocompromiși, este necesar un parteneriat strâns între micologia clasică și biologia moleculară [265, 298, 300].

1.5. Preparatele antifungice: viziuni moderne privind principiile de clasificare și mecanismele de acțiune

Cele mai utilizate preparate antifungice sunt azolii, polienele, echinocandinele, analogii de pirimidină, alilaminele, tiocarbamații și morfolinele [19]. Clasele de medicamente și țintele lor în

celulele fungice, inclusiv și câteva clase de preparate potențiale noi, investigate la moment și descrise în cadrul unui studiu, sunt reprezentate pe Figura 1.2 [64]. Preparatele antifungice se consideră eficiente când utilizarea lor în terapia infecțiilor fungice, în special invazive, permit atingerea nivelului eficient al concentrației acestora la locul infecției, evitând concentrațiile toxice din plasmă și din organe [67, 74, 82, 95, 112].

Autorii definesc termenul de preparat antifungic ca substanță cu acțiune farmacologică fungicidă, fungistatică utilizată pentru tratamentul, profilaxia infecțiilor fungice, manifestatând o toxicitate minimă pentru organismul-gazdă [53, 84, 97].

Dinamica evoluției terapiei antifungice s-a dovedit a fi mult mai lentă comparativ cu cea antibacteriană din cauza incidenței scăzute în trecut a infecțiilor fungice și a unor similarități între celulele fungice și organismul uman [109, 116, 140].

Domeniul medicinei farmaceutice și subiectele cu referire la cercetarea mecanismelor de acțiune a preparatelor antifungice, a mecanismelor de dezvoltare a rezistenței la acțiunea lor, au drept scop descoperirea de noi compuși cu proprietăți antifungice [140].

Nistatina – primul antifungic descoperit în 1951 – face parte din clasa polienelor este utilizat sub formă topică și orală în tratamentul candidozelor [181, 187].

Nitamicina și amfotericina B, utilizate în tratamentul micozelor sistemice, de asemenea fac parte din clasa antifungicelor polienice. Griseofulvina, antifungic administrat pe cale orală și produs în 1959 din *Penicillium griseofulvum*, s-a dovedit a fi eficient față de dermatofiți.

Introducerea antifungicelor azolice a marcat dezvoltarea dermatoterapiei. Derivații azolici se disting prin spectru larg de acțiune, fiind activi pe dermatofiți, levuri și o mare parte dintre fungii patogeni pentru om [144, 149, 150, 153].

În 1958 a fost elaborat preparatul antifungic amfotericină B deoxicolat care a marcat un progres major în terapia infecțiilor fungice. Acest preparat are o activitate antifungică evidentă, spectru larg, dar este asociat cu toxicitate renală semnificativă și reacții adverse la administrarea parenterală [88, 92, 187].

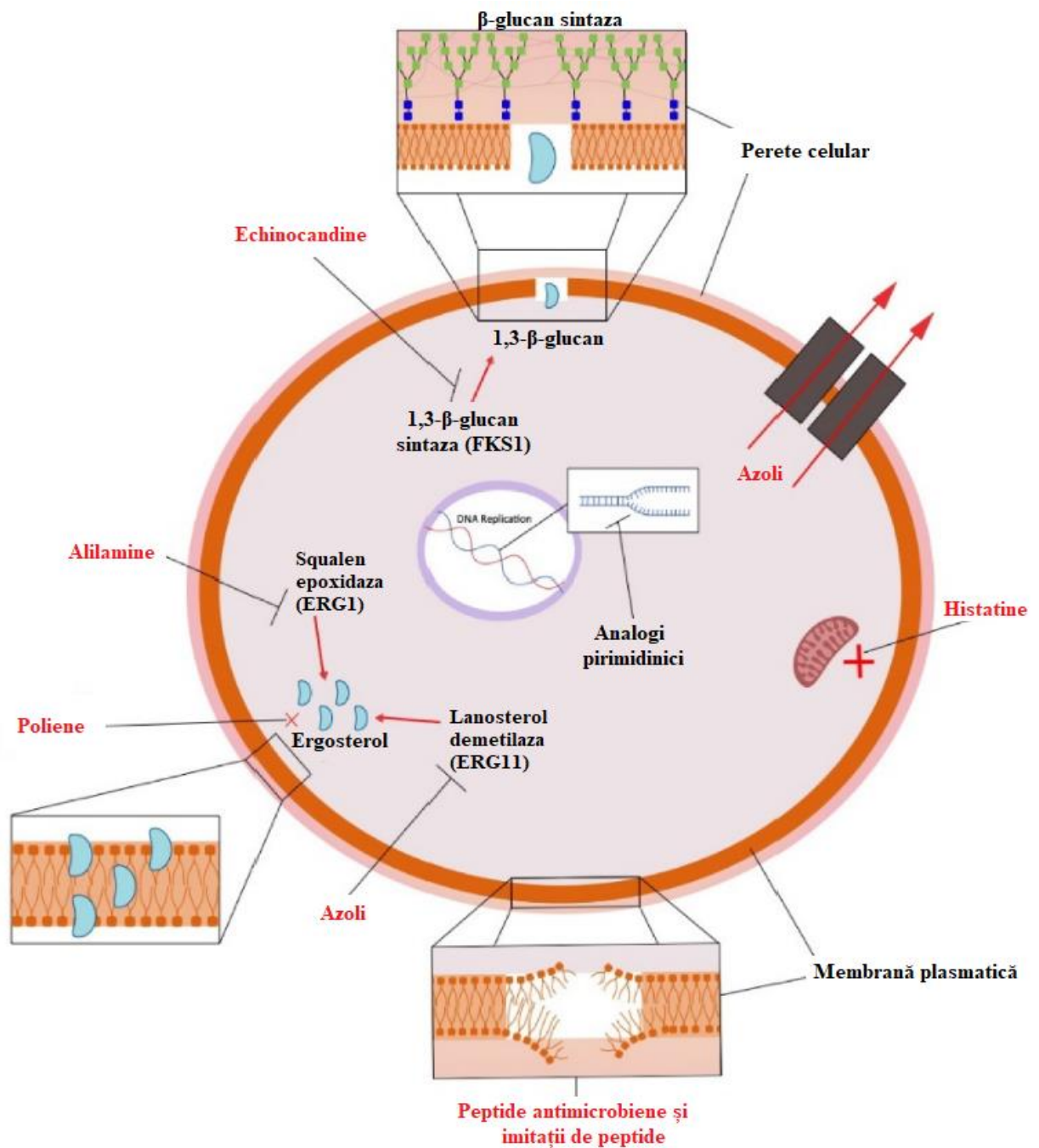


Fig. 1.2. Clasele de preparate antifungice (marcate cu roșu) și mecanismul de acțiune

Flucitozina, analogul pirimidinei elaborat în 1970, este activ împotriva speciilor de *Candida* și de *Criptococcus*. Utilizarea sa este însă limitată din cauza toxicității și evoluției rezistenței celulelor fungice și supresia măduvei osoase [276, 283].

La mijlocul anilor 1990 a fost dezvoltată formula de amfotericină B pe bază de lipide. Lipsită de efecte secundare, nefrotoxicitatea fiind redusă, este pilonul de bază pentru tratamentul multor infecții fungice care pun în pericol viața pacienților [51, 270, 295, 314].

Azoli, cea mai extinsă clasă de antifungice, au fost dezvoltați pe bază de imidazol (ex., miconazol prima dată fiind disponibil pe piață în 1974, clotrimazol - 1975, econazol - 1982, ketoconazol - 1981, tioconazol - 1983 și sulconazol - 1989) [8, 12, 95, 97].

Azoli de prima generație (fluconazolul-1990, itraconazolul-1992) au devenit disponibili în anii 1990. Acești agenți antifungici au oferit unele avantaje: posibilitatea administrării orale, activitate excelentă împotriva unui spectru larg de fungi levurici patogeni. Spectrul de activitate al itraconazolului include și agenți fungici endemici, cum ar fi *Histoplasma capsulatum* [59, 100].

Echinocandinele au devenit disponibile la începutul anilor 2000 (capsfungina în 2001, iar micafungin și anidulafungina mai târziu). Aceste antifungice se disting printr-o activitate excelentă împotriva speciilor de *Candida*, fiind o opțiune de tratament și împotriva tulpinilor rezistente la azoli, și a *C. glabrata*. Prezintă activitate modestă și împotriva speciilor de *Aspergillus*. Avantajele echinocandinelor sunt efectele secundare și interacțiunile medicamentoase reduse. La moment este disponibilă numai forma parentală a acestei clase de preparate [109, 169, 314, 326].

Începând cu anii 2000 a fost dezvoltată și introdusă pe piața farmaceutică a doua generație de azoli (voriconazol - 2002, posaconazol - 2006, luliconazolul - 2013 și isavuconazol - 2015). Luliconazolul poate fi utilizat pentru tratamentul topic al infecției dermatofite. Avantajul major al acestor agenți este spectrul extins de activitate împotriva fungilor filamentoși. Astfel, isavuconazolul se distinge printr-o activitate mai largă, proprietăți farmacologice îmbunătățite (ex., biodisponibilitatea), niveluri mai previzibile ale preparatului și mai puține interacțiuni între preparatele medicamentoase [187, 197, 225].

Preparate pe bază de triazol de asemenea au fost dezvoltate, inclusiv fluconazolul și itraconazolul, prezentând un spectru mai larg de activitate. Triazolii sunt utilizați atât pentru infecții sistemice, cât și pentru infecții ale mucoasei, în timp ce imidazolii sunt utilizați, în principal, pentru infecțiile fungice ale mucoasei [206, 217, 243, 291].

Numeroase cercetări au indicat la prezența dificultăților în distribuția preparatului antimicrobian în organism (locul infecției fungice), respectiv absorbția în tractul gastrointestinal (pentru formulările orale), distribuția anatomică, metabolizarea (biotransformarea) și eliminarea.

Astfel, s-a constatat că amfotericina B și echinocandinele au o absorbție gastrointestinală minimă și sunt disponibile exclusiv în formule parenterale. În schimb, azoli pot fi absorbiți prin mucoasa gastrointestinală, deși amploarea variază în funcție de antifungic: fluconazolul și isavuconazolul sunt absorbite ușor cu o biodisponibilitate ridicată, în timp ce absorbția posaconazolului este limitată. Formula nouă, îmbunătățită a posaconazolului, evită această limitare prin eliberarea întârziată a compusului, rezultând o biodisponibilitate mai mare cu niveluri mai previzibile ale preparatului [27, 86, 187, 206, 225].

O particularitate importantă, ce trebuie luată în considerare, este metabolismul preparatelor antifungice (ex., rata metabolismului determină durata și intensitatea acțiunii farmacologice a preparatului). Metabolizarea preparatelor antifungice afectează și evoluția multirezistenței fungilor (substraturi sau inhibitori de enzime implicate în metabolismul xenobiotic), fiind o cauză frecventă a interacțiunilor nefaste ale preparatelor antifungice. Polimorfismele sunt frecvente în enzima CYP2C19 care metabolizează voriconazolul. Metabolismul variabil duce la niveluri imprevizibile ale preparatului ceea ce poate expune pacienții la risc de toxicitate și la eșec terapeutic [5, 13, 14, 19].

Distribuția preparatelor antifungice variază anatomic, de exemplu, pătrunderea limitată a echinocandinelor în lichidul cefalorahidian, în ochi și în urină, și trebuie luată în considerare la prescrierea acestor preparate [5, 13, 14].

În prezent este crucială dezvoltarea de preparate antifungice care depășesc sau influențează mecanismele de rezistență ale fungilor [25, 30, 32, 144].

Studiile publicate în ultimii ani descriu principalele criterii de clasificare ale antifungicelor folosite în medicină: structura chimică, spectrul antifungic, mecanismul de acțiune, calea de administrare sau locul de acțiune.

În funcție de mecanismul de acțiune, toate medicamentele antifungice se divid în:

1. *Preparate ce modifică structura, permeabilitatea membranei fungice prin fixarea selectivă de ergosterol.* Din acest grup fac parte polienele (ex., nistatina, amfotericina B) care reprezintă antifungice ce au în structură un hapten amfoter, constituit dintr-un inel lactonic de dimensiuni mari, lanț de hidrocarburi lipofilice, lanț polihidroxil hidrofил. Structura acestor preparate este redată pe Figura 1.3.

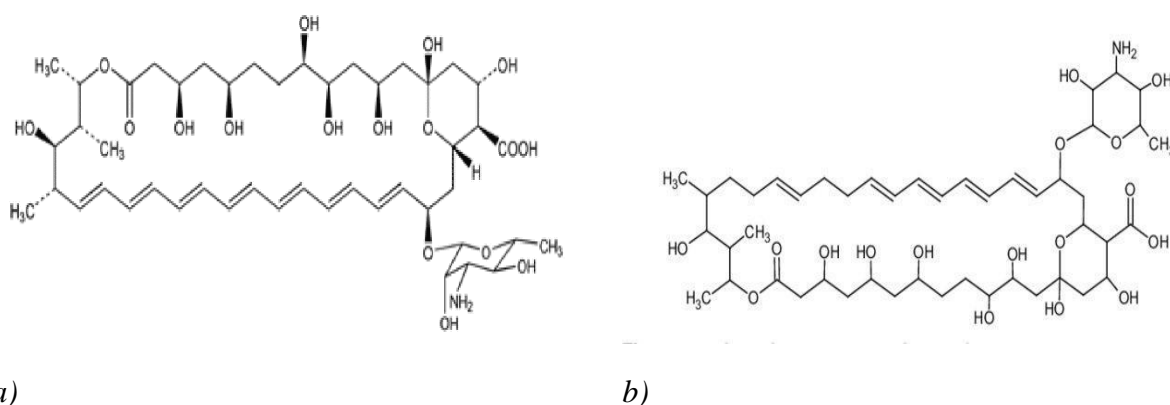


Fig. 1.3. Formulele structurale ale polienelor: a) amfotericina B; b) nistatina

Savanții au demonstrat că acțiunea polienelor se caracterizează prin atașarea la nivelul membranei celulei fungice și schimbarea structurii și permeabilității acesteia prin fixarea selectivă

de ergosterol. Complexul polien-ergosterol formează pori în peretele și membrana celulei fungice, determinând efluxul ionilor de potasiu și al altor componente celulare și, ca rezultat, liză și moartea celulară [79, 80].

Amfotericina B este frecvent utilizată în terapia candidozelor invazive, iar amfotericina B suplimentată cu dezoxicolat de sodiu (Figura 1.3) este destinată administrării parenterale. Unul din punctele slabe și dezavantajul acestei formule farmaceutice este toxicitatea ridicată. Mai târziu au fost dezvoltate noi formule mai puțin toxice, bazate pe combinații cu lipide carier: complex lipidic cu amfotericină B, complex lipidic cu amfotericină; dispersie coloidală și amfotericină B liposomală [52, 67, 70, 77].

Cercetătorii descriu și un alt mod de acțiune al amfotericinei B și a derivaților acesteia ce implică un sistem de reacții oxidative proprii așa ca interacțiunile specifice cu lipoproteinele, ceea ce determină formarea de radicali liberi și creșterea permeabilității membranei celulare.

Nistatina, preparatul antifungic cu structură chimică similară amfotericinei B (Figura 1.3), prezintă un spectru larg de activitate antifungică asupra *Candida* spp., *C. neoformans* și *Aspergillus* spp. Întrucât prezintă o toxicitate înaltă asupra organismului uman, a apărut necesitatea elaborării unui nou preparat ce are la bază nistatina încorporată într-un liposom format din dimiristol fosfatidilcolină și dimiristol fosfatidilglicerol numit nistatină liposomală [28, 181].

2. *Inhibitori ai sintezei ergosterolului* sunt reprezentați de compușii antifungici azolici (de ex., clotrimazol, ketoconazol, fluconazol, itraconazol, posaconazol, voriconazol, miconazol). Acest grup de preparate inhibă enzima fungică lanosterol 14-alfa-demetilază care limitează viteza de biosinteză a ergosterolului (element important al membranei celulare ce asigură integritatea și creșterea fungilor). Inhibarea lanosterol 14-alfa-demetilazei determină depleția ergosterolului la nivelul membranei celulare și acumularea în exces a sterolilor 14-a-metilati, ceea ce dereglează funcția enzimatică care rezultă cu stoparea creșterii celulare, dereglarea permeabilității și rigidității membranei celulei fungice. Biosinteză ergosterolului este blocată de azoli deoarece se leagă de fier [79, 83, 168].

Compușii antifungici azolici sunt pe larg utilizați în tratamentul infecțiilor fungice superficiale, profunde și sistemice. În funcție de numărul atomilor din inelul azolic, azolii au fost divizați în imidazoli, cu doi atomi de azot și triazoli, cu trei atomi de azot. Clasa imidazolilor, constituită din clotrimazol, ketoconazol, econazol, miconazol, oxiconazol, este utilizată frecvent în terapia infecțiilor fungice superficiale. Triazolii, fluconazolul, itraconazolul, posaconazolul, ravuconazolul și voriconazolul sunt preparate folosite pentru terapia infecțiilor fungice invazive [24, 90, 97, 109, 206].

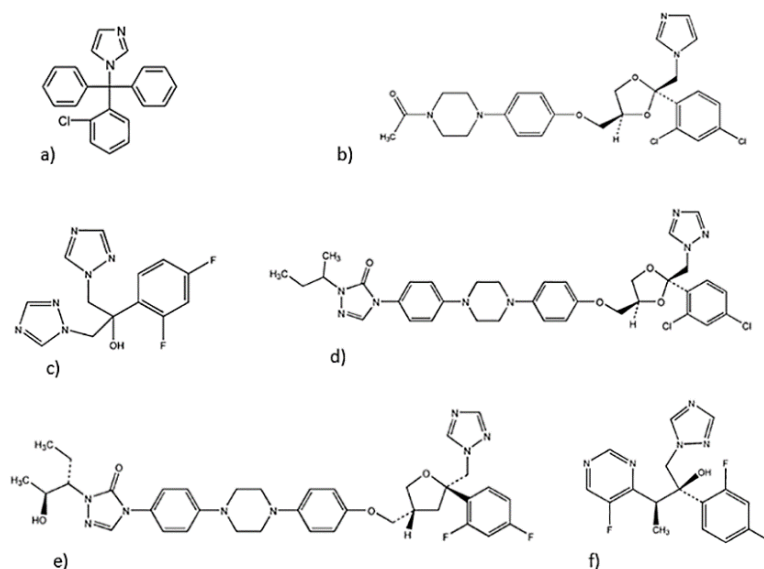


Fig. 1.4. Formulele structurale ale azolilor: a) clotrimazol, b) ketoconazol, c) fluconazol, d) itraconazol, e) posaconazol, f) voriconazol

3. *Inhibitori ai sintezei glucanului din compoziția peretelui celular fungic.* Reprezentanți ai acestui grup sunt echinocandinele – antifungice de semisinteză (de ex., caspofungina, micafungina și anidulafungina).

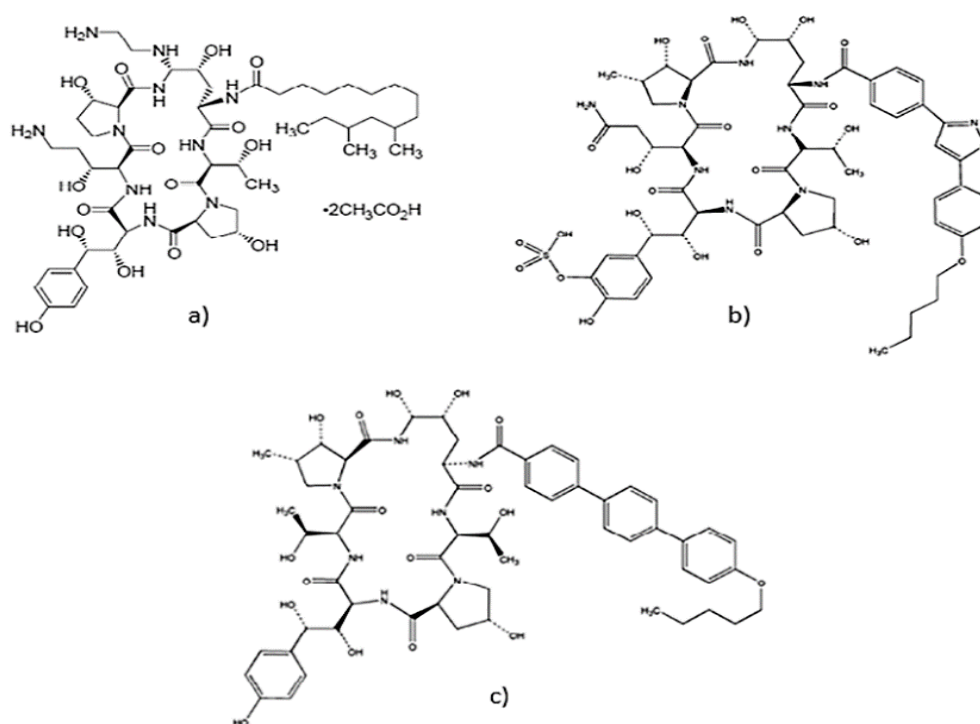


Fig. 1.5. Formulele structurale ale echinocandinelor: a) caspofungina, b) micafungina, c) anidulafungina [169]

Această clasă de antifungice afectează integritatea peretelui celular prin inhibarea beta-(1,3)-D-glucanaza – enzimă complexă (sintetază) responsabilă de formarea de polimeri ai glicanului în peretele celular. Beta-(1,3)-D-glucanaza este o componentă importantă a peretelui celulei fungice care asigură forma, rezistența, fiind implicată și în procesele de osmoză, de creștere și de diviziune a celulei. Astfel, distrugerea acestei componente duce la instabilitate, la liză osmotică și, în final, la moartea celulei fungice. Studiile au demonstrat că echinocandinele manifestă un spectru larg de acțiune asupra diverselor specii de *Candida*, *Aspergillus*, a fungilor dimorfici, a speciei *Pneumocystis carinii* ș.a. [106, 107, 117, 128, 206].

4. *Inhibitori ai biosintezei ergosterolului și lanosterolului.* Acest grup este reprezentat de alilamine și benzilamine (ex., terbinafina, naftifina, butenafina) care sunt antifungice ce inhibă enzima implicată în sinteză precursorilor ergosterolului, în special squalen epoxidaza. Ca rezultat are loc pierderea integrității membranei celulare prin acumularea de squalen, scăderea concentrației de ergosterol, dereglarea permeabilității celulare, fragmentarea elementelor celulare. Toate aceste schimbări și duc la moartea celulei fungice [24, 28, 36, 136].

Savantii aduc dovezi că acești compuși chimici manifestă acțiune fungicidă și fungistatică asupra fungilor din genurile *Tricophyton* și *Epydermophyton*, *Candida* și *Microsporum* – agenți cauzali ai infecțiilor fungice superficiale [149, 153, 156, 171].

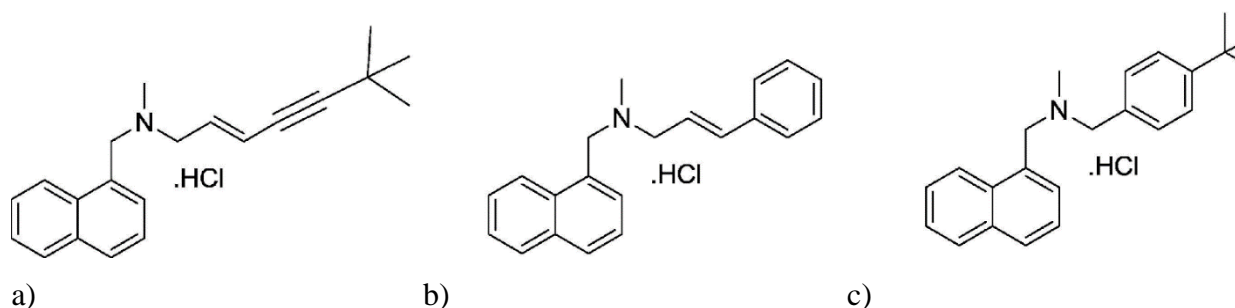


Fig. 1.6. Formulele structurale ale alilaminelor și ale benzilaminelor: a) terbinafina, b) naftifina, c) butenafina

5. *Inhibitori ai sintezei acizilor nucleici (de ex. 5-flucitozina).* Se caracterizează ca antimetabolit absorbit de celulele fungice prin intermediul citozin permeazei. După pătrunderea în celula fungică, 5-flucitozina este convertită în 5-fluorouracil care inhibă replicarea ARN-ului și biosinteza proteinelor [29, 172, 188]. Compușul 5-flucitozina este o pirimidină fluorurată care are un mecanism de acțiune diferit de alte antifungice [36, 209, 225, 232, 233].

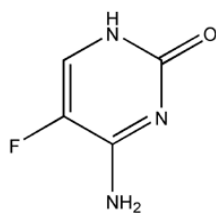


Fig. 1.7. Formula structurală a 5-flucitozinei

Studiile realizate cu acest antifungic au demonstrat că acesta prezintă activitate asupra speciilor din genurile *Candida*, *Criptococcus*, *Aspergillus*, a fungilor dimorfici. Predominant este utilizat în asociere cu amfotericina B (eficient în meningita criptococică) deoarece în monoterapie fungii foarte repede dezvoltă rezistență [29, 77, 94, 245, 249].

6. *Inhibitori ai fusului mitotic, determinând alterarea polimerizării microtubulilor citoscheletului fungic* (de ex. griseofulvina). Aceste preparate au proprietatea de a inhiba ciclul mitotic prin atașarea de microtubulii fungici polimerizați și, ca rezultat, se inhibă depolimerizarea, determinând eșecul replicării celulelor fungice [86, 225, 233, 284].

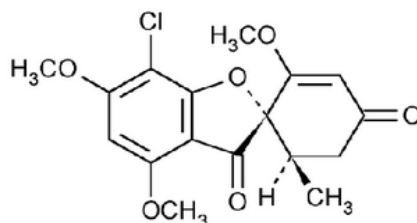
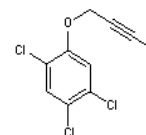
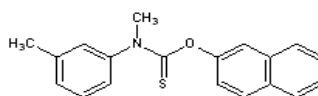
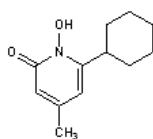


Fig. 1.8. Formula structurală a griseofulvinei

7. *Preparate ce produc chelații cationilor metalici polivalenți* (ex. ciclopiroxul, tolnaftalul, taloprogina).



a)

b)

c)

Fig. 1.9. Formulele structurale ale: a) ciclopiroxulului, b) tolnaftalului, c) haloproginei

Mecanismul de acțiune al acestor antifungice nu este completamente elucidat, dar studiile existente prezintă ipoteze privind interferarea acestor molecule cu integritatea membranei celulei fungice [52, 56, 64, 119, 233]

8. *Alte preparate antifungice ce acționează asupra ergosterolului prin inhibiția reductazei D14 și izomerasei D7-D8* (ex., amorfolina).

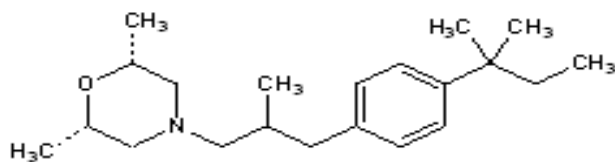


Fig. 1.10. Formula structurală a amorfolinei

În funcție de structura chimică, antifungicele se împart în următoarele grupe [79, 80]:

1. Azoli (ketoconazolul, clotrimazolul, miconazolul, itraconazolul, voriconazolul ș.a.);
2. Alilamine (terbinafina, butenafina);
3. Poliene (amfotericina, nistatina, hamicina);
4. Antimetaboliți (flucitozina);
5. Echinocandine (caspongina, anidulafungina, micafungina ș.a);
6. Alte preparate antifungice (ciclopirox, griseofulvina, amorfolina).

Unele grupe structurale de preparate antifungice au țință și mecanisme similare de acțiune. Astfel, polienele, azolii și alilaminele au drept țință ergosterolul, asupra căruia acționează pe diferite căi. Prin urmare, preparatele antifungice, precum azolii și alilaminele, inhibă biosinteza ergosterolului, în timp ce polienele se leagă de ergosterolul din componența membranei citoplasmatică, ceea ce duce la formarea porilor și modificarea permeabilității membranare. 5-flucitozina inhibă metabolismul pirimidinic și sinteza ADN-ului, iar echinocandinele au activitate asupra peretelui celular, blocând sinteza de β -1,3-D glucan, ce reprezintă componentul structural principal al peretelui celular la fungi.

În funcție de modul și locul de acțiune, antifungicele sunt divizate în trei grupe [29, 233]:

- a) preparate cu acțiune topică (locală în infecții fungice superficiale);
- b) preparate cu acțiune sistemică (în infecții fungice invazive);
- c) preparate cu activitate mixtă.

În funcție de spectrul antifungic, se cunosc preparate cu [84, 117]:

- spectru larg: amfotericina B, natamicină, ketoconazol, miconazol, econazol, fluconazol, itraconazol, terbinafină, naftitină, amarolfină, ciclopirox.
- spectru îngust: griseofulvină, clotrimazol, flucitozină, haloprogin, tolnaftat.

Terapia infecțiilor fungice invazive întotdeauna a fost dificilă, fiind asociată cu efecte secundare (ex., insuficiența renală, anomaliile electrolitice, reacții adverse la perfuzie), ceea ce limitează frecvent posibilitatea utilizării acestora [29, 84]. La moment, la nivel global, o preocupare

stringentă a industriei farmaceutice este dezvoltarea de noi molecule active pe un spectru mai extins de agenți fungici, în special active asupra speciilor cu grad înalt de rezistență, mai bine tolerate, cu reacții adverse reduse. Autorii mai multor studii atestă că una dintre deosebirile, care pot fi exploatate în design-ul farmaceutic al elaborării preparatelor antifungice, este prezența unui sterol specific în membrana celulară a levurilor, precum ergosterolul (la mamifere colesterolul) [57, 114].

Tabelul 1.1 Mecanismele de acțiune ale preparatelor antifungice

Clasa de antifungice	Mecanism de acțiune	Antifungice	
Azoli	Acționează asupra căii de sinteză a ergosterolului prin inhibarea 14-sterol demetilazei – enzimă dependentă de citocromul P450, blocând astfel o etapă în biosinteza de ergosterol din structura membranei celulare fungice	Imidazoli cu doi atomi de azot	Miconazol Econazol Ketoconazol Clotrimazol
		Triazolii cu trei atomi de azot	Itroconazol Fluconazol Voriconazol
Alilamine	Inhibitori ai biosintezei ergosterolului	Terbinafina, Naftifina, Butenafina	
Poliene	Acționează prin legarea la nivelul membranei celulare, determinând modificarea structurii și a permeabilității membranei fungice prin legarea selectivă de ergosterol	Amfotericina B Nistatina	
Antimetaboliți	Determină o sinteză incorectă a moleculelor de ADN	Flucitozina	
Echinocandine	Inhibitorii sintezei glucanului din compoziția peretelui celular fungic	Caspofungina Micafungina Anidulafungina	
Alte preparate antifungice	Acționează la nivelul fusului mitotic, determinând alterarea polimerizării microtubulilor citoscheletului fungic	Griseofulvina	
	Chelații cationilor metalici polivalenți	Ciclopiroxul	
	Blochează sinteza ergosterolului prin inhibiția reductazei D14 și izomerzei D7-D8	Amorolfina	

Ca țintă specifică pentru acțiunea preparatelor antifungice sunt descrise, în majoritatea studiilor, manoproteinele și β -glucanii, elemente ale peretelui celular fungic.

1.6. Actualități în abordarea rezistenței la preparatele antifungice

Dezvoltarea rezistenței agenților fungici patogeni la preparatele disponibile este o problemă clinică emergentă în terapia infecțiilor fungice [33, 57, 114, 123, 237].

Rezistența fungilor la preparatele antifungice este rezultatul luptei continuă pentru dominare. Flexibilitatea, plasticitatea genomică a fungilor le-a permis supraviețuirea în condiții

extreme de mediu, inclusiv și la preparatele antifungice. Astfel, plasticitatea fenotipică adaptivă, mutațiile în genele țintă, urmate de selecție, aneuploidia cromozomială, reproducerea sexuată și transferul orizontal de gene sunt forțele motrice ale dezvoltării rezistenței antifungice [176, 182, 233].

Prescrierea, administrarea irațională, excesivă a antifungicelor, practicile deficitare de control al infecțiilor atât în medicina umană, cât și în cea veterinară, au transformat în timp rezistența la antifungice într-o amenințare gravă la adresa sănătății publice [5, 182].

În pofida măsurilor întreprinse la nivel global, prevalența infecțiilor fungice cauzate de fungii rezistenți la mai multe clase de antifungice are o tendință de creștere, în schimb ritmul de dezvoltare a unor clase noi de preparate antifungice a încetinit [217, 223, 224, 229, 233].

Infecțiile fungice grave au nevoie de strategii terapeutice adecvate, eficiente și de succes pentru fiecare pacient. Arsenalul antifungicelor fiind limitat, rezistența la câteva dintre ele are impact foarte negativ asupra managementului pacienților cu infecție fungică [225, 245, 262, 273].

Majoritatea statelor se confruntă cu această problemă în procesul de management al pacienților cu infecții fungice, și anume cu fenomenul de majorare evidentă a ponderii agenților fungici multirezistenți, ceea ce presupune prelungirea perioadei de spitalizare și o rată înaltă de mortalitate. Centrul pentru Prevenirea și Controlul Bolilor evidențiază importanța creșterii gradului de conștientizare a acestui subiect și necesitatea studiilor ce țin de cercetarea mecanismelor de rezistență la antifungice care sunt mult mai puține comparativ cu mecanismele de rezistență la antibacteriene [287, 290].

Rezistența la azoli a speciilor de *Candida* și de *Aspergillus* este una dintre cele mai mari provocări pentru succesul terapiei antifungice, urmată de rezistența la echinocandine și multirezistența în rândul unor specii de *Candida* spp. (*C. albicans*, *C. lusitaniae*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*), în special, *C. glabrata* [12, 95, 100, 225, 236, 291, 301, 315].

Diseminarea izolatelor de *Aspergillus fumigatus* rezistente la azoli, amenințările emergente cum ar fi *Candida auris* rezistentă la mai multe preparate, necesită măsuri urgente [103, 104, 111, 327].

Lista agenților patogeni fungici prioritari (*eng.*, WHO fungal *priority pathogens list* - WHO FPPL), publicată în decembrie 2022, a fost elaborată pe baza mai multor criterii, semnificația fiecăruia pentru ierarhizarea acestor patogeni a variat considerabil. Astfel, ponderea cea mai mare s-a atribuit rezistenței la antifungice (38,5%), urmată de cauza deceselor (13,9%), tratamentul bazat pe dovezi (11,9%), accesul la diagnostic (10,4%), incidența anuală (8,5%) complicații/sechele (8,4%). Prin această listă se urmărește concentrarea și impulsivarea în

continuare a cercetărilor, a intervențiilor politice pentru a consolida răspunsul global la infecțiile fungice și la rezistența antifungică.

Pe măsură ce fungii implicați în dezvoltarea candidozei orale și vaginale devin tot mai rezistenți la tratament, cresc și riscurile de apariție a unor forme mai invazive de infecții în rândul populației generale. Raportul OMS propune acțiuni și strategii pentru factorii de decizie, profesioniștii din domeniul sănătății publice și alte părți interesate, care vizează îmbunătățirea răspunsului general la acești agenți patogeni fungici prioritari, inclusiv prevenirea dezvoltării rezistenței antifungice. Printre domeniile principale de acțiune se numără: (1) consolidarea capacității de diagnostic de laborator și de supraveghere; (2) investiții durabile în cercetare, dezvoltare și inovare; și (3) intervenții de sănătate publică pentru prevenire și control [16, 78].

Mecanisme de rezistență la preparatele antifungice

Savanții au demonstrat că pentru a evita efectele (fungicide, fungistatice) preparatelor antifungice, agenții patogeni evolutiv au dezvoltat diverse mecanisme de rezistență [12, 113, 232].

Din punct de vedere clinic, rezistența este un fenomen determinat de incapacitatea preparatului antifungic de a inactiva celula fungică, inclusiv la doze maxime. Rezistența clinică nu este asociată în permanență cu rezistența *in vitro*, manifestată prin creșterea CMI către un anumit antifungic. *In vivo*, rezistența la un preparat antifungic poate fi caracterizată și categorisită ca primară (intrinsecă, înnăscută) sau secundară (dobândită în urma adaptării la preparatele antifungice prin diferite mecanisme de rezistență) [112, 116, 122, 145, 150, 232].

În prezent, în literatură se descriu patru *mecanisme importante care determină rezistența la antifungice* a agenților microbieni: reducerea acumulării preparatului în interiorul celulei fungice; eliminarea antifungicelor prin pompe de eflux; reducerea afinității preparatului față de ținta sa; modificarea metabolismului în scopul evitării efectului preparatului antifungic [195, 232].

Unii cercetători au descris mecanismele celulare de rezistență la antifungice pentru levuri. Un astfel de mecanism este *substituția tulpinilor fungice sensibile cu tulpini rezistente de alte specii de fungi* (ex., substituirea *C. albicans* cu *C. glabrata*), ce atestă o rezistență primară la azoli. Aceste tulpini prezintă o problemă serioasă pentru pacienții cu sistemul imun deprimat care necesită preparate antifungice pentru terapia infecțiilor cauzate de *Candida*. spp. [207, 217, 232].

Un alt mecanism celular ce determină rezistența antifungică este *apariția în cadrul populației existente a unor clone de agenți microbieni cu rezistență la antifungice* ce pot fi preluate din mediu sau dezvoltate de la microflora normală prin achiziționarea de mecanisme de rezistență [39, 45, 224, 227, 229, 232].

Majoritatea studiilor promovează un alt mecanism celular frecvent înregistrat ce vizează *dobândirea rezistenței secundare la un anumit antifungic ca rezultat al perioadelor lungi de*

expunere la acest preparat. Este bine cunoscut faptul că frecvența mutațiilor genetice în organismul uman este mai mică decât la nivelul unei populații de fungi aflate sub presiunea preparatelor antifungice. Astfel, mutația într-o celulă fungică face această tulpină dominantă în populație, exercitând impact negativ asupra eficienței antifungicelor [225, 226, 228, 232, 246].

Rezistența naturală (adaptarea epigenetică) se întâlnește la fungii care în mod constant sunt supuși nivelurilor subinhibitorii ale preparatului antifungic, prea mici pentru a ucide populația fungică, dar care pot dezvolta o rezistență temporară la preparatele antifungice. Acest mecanism *celular* este caracterizat prin *exprimare tranzitorie a unor gene care pot determina rezistența temporară*. Este un fenomen reversibil și în absența presiunii induse de către antifungic, celula fungică revine la fenotipul inițial sensibil [232, 244, 249, 263].

În literatură este descris și un mecanism de rezistență celular ce vizează *modificările serotipului celular* observat la tulpinile de *C. albicans* care prezintă două serotipuri A și B, în funcție de markerii carbohidrați de la suprafața membranei [232, 283, 284, 287, 291].

Mecanismele moleculare ce determină rezistența la antifungice sunt extrem de diverse și specifice fiecărui preparat antifungic. Astfel, un mecanism molecular important de dezvoltare a rezistența la antifungice a fungilor miceliali este procesul mutagen sau superexpresia enzimelor implicate în biosinteza ergosterolului: enzima lanosterol 14a-demetilaza citocrom P450-dependență (cunoscută ca Erg11 la levuri și ca Cyp51A) [232, 290, 293].

În urma cercetărilor au fost evidențiate și alte mecanisme prin care o tulpină devine rezistentă la azoli, și anume *scăderea afinității enzimei 14-a-sterol dimetilaza citocrom P-450 dependentă pentru azoli*. Acest fenomen are la bază mutațiile punctiforme care inhibă legarea preparatelor antifungice, precum azolii, la nivelul enzimei [46, 232, 295].

Un mecanism molecular responsabil de rezistență antifungică este și *supraexprimarea enzimei 14-sterol dimetilaza citocrom P-450*. Acest fenomen este posibil ca urmare a creșterii numărului de copii ale enzimei-țintă. Unii cercetători au demonstrat că creșterea de 20 de ori a nivelului acestei enzime cauzează o creștere de cinci ori a valorii CMI la fluconazol. A fost observată și corelația dintre nivelul crescut de ergosterol care a provocat scăderea sensibilității atât la amfotericina B, cât și la azoli [14, 46, 314, 315].

Reducerea concentrației intracelulare a preparatului antifungic este un alt mecanism molecular manifestat prin diminuarea nivelului de acumulare a azolilor în celula fungică prin accelerarea efluxului acestuia. Pătrunderea azolilor în celulă este un mecanism pasiv, prin urmare alterările peretelui celular, prin modificarea glicozilării proteinelor de suprafață, au ca rezultat modificarea sensibilității față de azoli [22, 25, 164, 168, 232].

Modificări ale fazei lipidice și de asimetrie la nivelul membranei celulare este un mecanism molecular responsabil de rezistența la antifungice ce are la bază modificarea fluidității, asimetriei membranei, transportului moleculelor prin membrane în urma interacțiunii dintre fosfolipide și steroli [83, 89, 98, 232].

1.7. Strategii inovative în design-ul preparatelor antifungice

Design-ul unor noi antifungice se bazează pe mai multe premise, pornind de la ideea că funगी prezintă un regn foarte important al lumii vii, iar numărul total de specii este estimat de a fi la un nivel de aproximativ 3,8 milioane. Dintre acestea doar aproximativ 300 sunt specii patogene pentru oameni și animale [182, 225]. Emergența fenomenului de rezistență la antifungice este o amenințare globală pentru sănătatea publică atât din țările cu venituri mici, cât și în cele bogate.

Agenții fungici patogeni multirezistenți circulă frecvent în instituțiile medicale, iar eradicarea lor în multe cazuri este dificilă și costisitoare [159, 182, 206, 313] în special pentru speciile din genul *Candida*. Astfel, 90% din izolatele de *Candida auris* dezvoltă rezistență la preparatele antifungice de prima linie. Sunt rezistente la antifungice și speciile *Candida albicans*, *Candida krusei* și *Candida glabrata*. Și alți agenți fungici clinic relevanți au dezvoltat rezistență multiplă la agenții antifungici, de exemplu, *Aspergillus fumigatus* [136, 168, 193, 233, 268].

Rezistența în creștere la preparatele din grupul azolilor și echinocandinelor, precum și toxicitatea ridicată a polienelor este o provocare care pune la ordinea zilei căutarea de terapii principial noi și de preparate antifungice cu alte mecanisme de acțiune, decât cele generale cunoscute. Prin urmare, diminuarea numărului de medicamente antifungice eficiente clinic a stimulat interesul pentru dezvoltarea de noi clase de compuși chimici cu proprietăți antifungice, în special, a celor active față de funगी care pot provoca îmbolnăviri severe atât la oamenii cu imunitate compromisă, cât și la cei sănătoși [13, 73, 87, 232].

Strategiile farmaceutice inovative convenționale presupun combinarea limitărilor legate de tratamentul și de statul clinic al pacientului, și anume lipsa specificității sau selectivității agentului antifungic ales, administrarea inadecvată a terapiei recomandate și dezvoltarea efectelor farmacologice secundare. În încercarea soluționării acestor provocări, comunitatea academică la nivel mondial și național au realizat studii și întreprins un șir de acțiuni și măsuri focusate pe sinteza de compuși chimici inclusiv din grupul carbazonelor (ex., tiosemicarbazone și aminoguanizone), biologici, produse nanotehnologice pentru elaborarea și implementarea de noi formule active, cu eficacitate terapeutică sporită [30, 93, 99, 110, 137, 312].

Mai mulți ani la rând se lucrează în direcția elaborării agenților antifungici care conțin metale coordonate cu diferiți liganzi, inclusiv baze Schiff, amine, tiosemicarbazone, bis tiosemicarbazon și complecșii lor metalici [127, 136, 133, 138]. Tiosemicarbazonele sunt un grup

de compuși cu proprietăți medicinale și farmacologice cunoscute, recunoscute pentru activitate antifungică, antitumorală, antivirală, antimicrobiană și antiparazitară. Scheletul tiosemicarbazonei constă din trei ioni de azot, dintre care doi hidrazinici și unul amino, tiocarbonilul S și grupările substituente variabile R1, R2 și R3. Ca ligand, tiosemicarbazonele se pot coordona ca chelate NS neutre, bidentate sau mai frecvent ca chelate NS bidentate anionice la deprotonarea azotului azometinic. Motivul ligandului tiosemicarbazonic poate fi modificat pentru a include un donator suplimentar de heteroatomi care își extinde denticitatea de la doi la trei, adesea ca chelați N_2S sau ONS. Bistiosemicarbazonele rezultă fie din coordonarea ionilor metalici a doi chelați NS bidentate individuali, fie din coordonarea unui singur chelat tetradentat N_2S_2 . Complexele metalice rezultate se caracterizează prin proprietăți medicinale și farmacologice valoroase [125, 132, 133].

Studiile care abordează în mod specific mecanismele de acțiune antifungică a tiosemicarbazonei arată că cele mai frecvent întâlnite situsuri de acțiune a acestor compuși sunt: inhibarea sintezei ergosterolului, interacțiunea fizico-chimică cu sterolii membranei celulei fungice, dereglarea permeabilității și fluidității, rigidității exostructurii și a formei celulelor cu inhibarea sintezei macromoleculare, cum ar fi biogeneza componentelor membranei citoplasmice [6, 127, 152, 232].

Recent, un grup de cercetători a realizat o analiză a publicațiilor cu referire la activitatea antifungică a peste 700 de compuși tiosemicarbazonici, inclusiv a complexelor lor metalice cu cuprul, nichelul, zincul, mercurul, cadmiul, paladiul, platina ș.a. S-a observat că complexele metalice depășesc foarte des liganzii fără metal în ceea ce ține de activitatea fungistatică a compușilor. Această proprietate a fost atribuită dispersiei de sarcină la chelare, care crește lipofilitatea complexelor, favorizând pătrunderea lor prin învelișurile celulare fungice. Nu doar prezența metalului, dar și natura lui determină nivelul de activitate antifungică a complexelor tiosemicarbazonice [26, 124, 132, 137].

Cel mai frecvent studiate sunt complexele tiosemicarbazonice de cupru (II) și de zinc (II), în primul rând pentru că acestea sunt cele mai active. Această afirmație nu este generală, fiind întâlniți și compuși cu aceste metale lipsiți de activitate antifungică sau cu activitate antifungică joasă. Activitatea compușilor cu cupru determinată, cel mai probabil, de activitatea lor redox cu potențiale de reducere accesibile din punct de vedere biologic. Complecșii de zinc cu tiosemicarbazonele nu au activitate redox centrată pe metal, ceea ce sugerează existența altor mecanisme implicate [125, 132, 133, 135].

Conform rezultatelor publicate, mai multe tiosemicarbazone și complexele lor metalice pot fi considerate potențiali agenți antifungici. Astfel, de Araujo Neto și colaboratorii au realizat

sinteza a 12 derivați ai 2-(5-nitro-tiofen)-tiosemicarbazonei N-substituite (L1-12). Compușii au prezentat o activitate antifungică destul de bună, în special împotriva *Cryptococcus neoformans* la o valoare a CMI de 0,06 $\mu\text{g/mL}$, asociată cu o citotoxicitate moderată. Compușii sintetizați nu au capacitatea de a se lega de ergosterolul din membrana fungilor și nu acționează prin inhibarea sintezei peretelui celulelor fungice [268].

O serie de noi derivați 2,3-dihidro-4H-1-benzoselenin-4-onă ai (tio)semicarbazonei au fost proiectați și sintetizați prin utilizarea abordării hibridizării moleculare. Activitatea lor antifungică a fost evaluată *in vitro* împotriva a cinci tulpini patogene de fungi levuriformi. În comparație cu precursorii de sinteză, moleculele hibride din acest studiu au arătat o îmbunătățire semnificativă a activităților antifungice, valorile CMI fiind între 0,25 și 8,00 $\mu\text{g/mL}$ față de *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* [125, 126, 133, 137, 186, 218, 324].

Tiosemicarbazonele 3-acetilcumarine substituie, având un fragment d-glucoză, sintetizate de cercetători, au manifestat activitate antifungică față de *Candida albicans* și față de *Sacharomyces cerevisiae* cu valoarea CMI de 0,78 μM [135, 137, 182, 318]. La testarea derivaților de tiosemicarbazone chelați cu fierul în calitate de compuși antifungici de către Duan și colaboratori s-a constatat că acești compuși exercită activitate antifungică cu spectru larg cu o potență comparabilă sau superioară celei a fluconazolului. Rezultatele obținute arată că acești compuși inhibă respirația mitocondrială, în principal, prin întârzierea activității complexului I al lanțului respirator mitocondrial prin chelarea fierului și reducea în continuare a potențialul membranei mitocondriale și sinteza de ATP la 13 tulpini de *Candida albicans*. Activitatea acestor compuși se manifestă la valori ale CMI de 0,125 $\mu\text{g/ml}$ [127, 182, 268].

Mai mulți derivați tiosemicarbazonici cu Zn (II) au fost testați pentru a stabili activitatea antifungică a liganzilor liberi și a compușilor sintetizați împotriva *Candida albicans* (ATCC 90028), *Candida tropicalis* (ATCC 13803) și *Candida glabrata* (ATCC 2001). Dintre compușii cu metal au fost identificați reprezentanți pentru care valorile obținute ale CMI sunt de la 3,18 până 25,95 μM , ceea ce este un rezultat promițător, compușii fiind foarte activi împotriva tulpinilor evaluate [157, 182, 228].

Trebuie menționată și sinteza unui nou ligand cu proprietăți de chelare multi-dentată terț-butil-calixarene funcționalizate la 1, 3 poziții ale marginii inferioare cu două fragmente terminale de 2-hidroxibenzeleden-tiosemicarbazonă. Au fost obținuți și derivații lor cu metalele (Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} și Zn^{2+}) și evaluată activitatea biologică, inclusiv cea antifungică. Activitate semnificativă față de *Candida albicans* a manifestat atât ligandul (CMI = 31,25 $\mu\text{g/mL}$ și CMF = 125 $\mu\text{g/mL}$), cât și derivatul său cu Co^{2+} (CMF = 62,5 $\mu\text{g/mL}$) [4, 66, 127, 129, 228].

Prin reacția 4-(naftalen-1-il)tiosemicarbazidei cu aldehidele aromatice fluorosubstituie au fost obținuți mai mulți derivați noi ai tiosemicarbazonelor. Dintre speciile patogene testate, *Candida zeylanoides* a fost cea mai sensibilă levură la compușii testați. Toți compușii au prezentat o activitate antifungică remarcabilă împotriva *C. zeylanoides* cu o valoare a CMI de 250 μg/mL egală cu cea a ketoconazolului. Rezultatele investigărilor microbiologice au arătat că efectele antifungice ale compușilor asupra *C. zeylanoides* nu depind de substituenți, fiind mai degrabă determinate de ligand. Câțiva compuși din acest grup au prezentat activitate antifungică înaltă împotriva *Candida glabrata* cu o valoare a CMI de 125 μg/mL comparativ cu cea a ketoconazolului, care este de 62,50 μg/mL, efectul fiind determinat de poziția substituentului fluor pe inelul benzenic. Exemplele prezentate demonstrează clar, că compușii chimici cu segment tiosemicarbazonic în structura lor posedă activitate antifungică foarte pronunțată în raport cu fungii levuriformi patogeni. În același timp, intensitatea efectului este determinată de foarte mulți factori, cum ar fi particularitățile biologice ale patogenului, apartenența lui sistematică, structura compusului, tipul de substituenți introduși în moleculă, prezența metalelor coordonate în aceste structuri, tipul metalului, concentrația compusului ș.a. [125, 129, 182].

Pentru evidențierea compușilor chimici noi cu efecte antifungice față de speciile de interes este necesar în continuare de a efectua screening-uri masive, iar pentru compușii evidențiați ca potențiali agenți antifungici sunt necesare cercetări în vederea identificării țintelor și mecanismelor de acțiune [37, 55, 63, 75, 132].

La combinarea glabridinei și fluconazolului, ambele în concentrații subterapeutice, a fost înregistrat un efect sinergic puternic împotriva *C. albicans* și *C. tropicalis* rezistente la medicamente. A fost observat și efectul antifungic sinergic al licofelonei, care este un inhibitor dublu microzomal al prostaglandinei E2 sintetaza/lipoxigenază în combinație cu fluconazolul împotriva tulpinilor rezistente de *C. albicans*. Licofelona (16 μg/mL) poate funcționa sinergic cu fluconazoluul (1 μg/mL) împotriva *C. albicans* rezistentă la fluconazol. Combinația de două medicamente a inhibat formarea biofilmului de *C. albicans* timp de 12 ore și a redus expresia genelor fosfolipazei extracelulare și a genelor specifice biofilmului genelor legate [52, 72, 292].

Combinația de două preparate a inhibat tranziția de la forma de creștere levuriformă la forma de creștere hifală și a scăzut activitatea aspartil proteinazei secretate, fără a afecta activitatea pompelor de eflux. Interacțiunea uleiurilor eterice de mentă cu azolii asigură o activitate fungicidă împotriva candidelor și o activitate fungistatică împotriva dermatofităilor. Studiile de interacțiune cu azolii au indicat, în principal, profiluri sinergice între itraconazol și uleiurile de mentă față de *Candida spp.*, *Cryptococcus neoformans* și *Trichophyton mentagrophytes*. Resveratrolul poate reduce doza de ketoconazol și itraconazol la 1/64 din doza terapeutică a acestor antifungice

convenționale. Activitatea antifungică sinergică a resveratrolului combinat cu azoli a fost verificată asupra unui grup de izolate clinice de *C. albicans*, iar strategia de combinare a îmbunătățit susceptibilitatea la azoli a trei izolate rezistente la fluconazol [21, 70, 111, 206, 322].

Strategia combinării compușilor cu efect antifungic de natura biologică și chimică, care acționează în baza diferitor mecanisme, este o metodologie bună pentru a identifica combinații sinergice, capabile să asigure efecte terapeutice pronunțate în lipsa toxicității față de celulele care nu sunt ținta terapiei [114, 117, 148, 179].

Dezvoltarea continuă a preparatelor antifungice oferă opțiuni de supravețuire a pacienților cu infecții fungice, în special invazive, prevalența cărora a crescut semnificativ în ultimii ani [119, 150, 182, 225].

Agenții antifungici utilizați aparțin la șapte clase de medicamente: poliene, azoli, alilamine, candine, morfoline, tiocarbamați și analogi de pirimidină. Toți acești agenți vizează creșterea celulară și mecanismul lor de acțiune constă în inhibarea biosintezei ergosterolului; inhibarea sintezei ADN-ului sau ARN-ului; inhibarea sintezei glucanului, chitinei sau mananului [150]. Dezvoltarea de preparate antifungice țintite pe factorii de patogenitate ai fungilor are avantaje față de alte strategii, deoarece mărește numărul de ținte potențiale care pot fi implicate în descoperirea noilor substanțe antifungice; permite menținerea microflorei gazdei naturale, care este de cea mai mare importanță, în special în infecțiile cu *C. albicans*; exercită un nivel scăzut de presiune selectivă și, prin urmare, minimizează dezvoltarea rezistenței la antifungice [35, 232, 119, 182].

Majoritatea speciilor din genul *Candida* pot secreta o serie de exoenzime, de exemplu fosfolipaza, esteraza, hemolizina, proteinază ș.a., necesare pentru a coloniza și ataca organele-gazdă. A fost demonstrat că marea majoritate a tulpinilor clinice de *C. albicans* produc hemolizine, fosfolipază și proteinază. Alți reprezentanți ai genului *Candida* de asemenea produc fosfolipază și proteinază [154, 222].

Deosebire există între specia *Candida albicans* și *Candida non-albicans* în ceea ce ține producerea de hemolizină, sintetizată de peste 80% din tulpinile studiate. Cu toate deosebirile observate, evidențierea ori elaborarea de compuși noi și combinații ale lor, care au drept țintă de acțiune factorii de patogenitate ai fungilor, rămâne una dintre cele mai de perspectivă căi pentru a obține preparate antifungice principial noi. Cele mai recente studii elucidează acțiunea anumitor compuși chimici și naturali asupra factorilor de patogenitate la *C. albicans* și alte specii de *Candida*. Majoritatea studiilor atestă că potențialele ținte pentru terapia antifungică sunt mananele, chitina, α - și β -glucanii și enzimele căilor de biosinteză a ergosterolului [27, 52, 189, 191, 221].

La mijlocul anilor 80 ai secolului trecut a demarat o nouă direcție de cercetare – dezvoltarea de noi bionanotehnologii care să sugereze abordări inovaționale în vederea îmbunătățirii

formulelor farmaceutice existente și soluții cost-eficiente. Savanții din întreaga lume afirmă că introducerea nanotehnologiei în diferite ramuri ale medicinei va permite soluționarea unui șir de probleme, inclusiv a moleculelor antifungice eficiente [239, 266, 304].

În ultimele decenii au fost realizate o multitudine de studii interdisciplinare în diverse domenii (biologie, chimie, biofizică, farmacologie) prin intermediul cărora s-a efectuat conlucrarea cu domeniul nano în scopul obținerii de noi nanosisteme cu potențiale efecte antifungice. În contextul dat s-a determinat că nanoparticulele anorganice oferă posibilități atractive pentru producerea preparatelor destinate terapiei antiinfecțioase datorită următoarelor proprietăți: biocompatibilitate intrinsecă, efecte toxice minime asupra celulelor sănătoase, activitatea biocidă sau biostatică împotriva celulelor patogene și modul de manifestare unic datorat nanodimensionalității [239, 304].

Nanosistemele constituie o alegere de perspectivă pentru crearea de noi molecule cu eficacitate antifungică pe motivul biocompatibilității intrinseci, efectelor toxice reduse asupra celulelor care nu sunt ținta terapiei, activitate antifungică eficientă ș.a. [5, 31, 266].

Nanoparticulele de argint în calitate de antifungice pot fi utilizat separat sau în combinație cu alte medicamentele cu efect terapeutic antifungic promițător. Interacțiunea nanoparticulelor de argint cu sistemele biologice se produce în trei zone, precum cea a reacțiilor oxidative, a sistemului inflamator și de transport a unor substanțe către țesutul țintă [36, 60, 266].

În pofida eforturilor considerabile la nivel global în direcția dezvoltării de noi molecule antifungice, se atestă o insuficiență stringentă a acestora pe piața farmaceutică. În scopul limitării urmărilor asociate rezistenței la antifungice și a lupta cu astfel de agenți microbieni, cercetarea la nivel mondial se axează pe bidirecționalitatea relației dintre fungii patogeni și organisme-gazdă. În acest sens este evidentă necesitatea cercetărilor în vederea dezvoltării unor noi molecule, formulări antimicrobiene optimizate, terapii alternative noi bazate pe cercetarea mecanismelor de rezistență la antifungice.

1.8. Concluzii la capitolul 1

În rezultatul analizei de sinteză a referințelor bibliografice din literatura de specialitate accesibilă putem puncta următoarele concluzii:

1. Fungii patogeni, prin cauzarea a peste un miliard de infecții umane și mai mult de un milion de decese anual, reprezintă o povară globală enormă.
2. Infecțiile fungice invazive sunt emergente și au o incidență înaltă, sporind morbiditatea și mortalitatea prin aceste infecții în rândul persoanelor imunocompromise.

3. Virulența fungilor este determinată de o gamă variată de factori de patogenitate care favorizează pătrunderea lor în organismul uman, evitarea mecanismelor de apărare ale acestuia și răspândirea în țesuturile, în organele și în sistemele de organe ale acestuia.
4. Identificarea rapidă și corectă a agenților fungici, cu elucidarea mecanismelor de rezistență a acestora, are o importanță clinică majoră în stabilirea unui diagnostic prompt și instituirea unei terapii empirice.
5. Fortificarea capacităților laboratoarelor de diagnosticare a fungilor patogeni va influența pozitiv managementul infecțiilor fungice invazive.
6. Utilizarea excesivă și necontrolată a antifungicelor la tratarea infecțiilor fungice la oameni și la animale accelerează dezvoltarea rezistenței la aceste preparate care este o amenințare tot mai mare pentru sănătate la nivel global.
7. Raportarea către laboratoare a datelor despre agenții fungici prioritari și de interes pentru sănătatea publică trebuie armonizate la rigorile europene și adaptate la necesitățile sistemelor naționale de supraveghere a maladiilor transmisibile.
8. Prevenirea și reducerea incidenței infecțiilor fungice la nivel național și global poate fi realizată și prin diminuarea incidenței afecțiunilor ce necesită transplant, chimioterapie, antibioterapie, terapie hormonală și a imunosupresiei.
9. Nanoparticulele de argint se regăsesc în topul celor mai explorate nanomateriale ce servesc ca bază în dezvoltarea de biomateriale avansate și de dispozitive eficiente pentru domeniul medical.
10. Industria farmaceutică este în căutarea de noi molecule active asupra unui spectru larg de agenți fungici, în special asupra speciilor cu un grad înalt de rezistență, mai bine tolerate de organismul uman, cu mai puține reacții adverse.

2. MATERIALE ȘI METODE APLICATE ÎN CERCETARE

2.1. Caracteristica generală și etapizarea cercetării

Cercetarea a fost realizată în perioada 2014-2021, în cadrul Disciplinei de microbiologie și imunologie, în Laboratorul microbiologic al Agenției Naționale pentru Sănătate Publică, în Laboratorul de biochimie al Universității de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”, în Laboratorul de Chimioterapie Antimicrobiană, Universitatea de Științe Agricole și Medicină Veterinară „Ion Ionescu de la Brad” și în Institutul de Chimie Macromoleculară „Petru Poni”, Iași.

Metodologia cercetării a fost aprobată de către Comitetul de Etică a Cercetării USMF „Nicolae Testemițanu”, avizul nr. 67 din 12 mai 2017.

Cercetarea a fost realizată sub îndrumarea și ghidarea consultanților 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).

Proiectarea cercetării a fost efectuată în baza direcțiilor trasate de obiectivele prevăzute pentru realizarea scopului prestabilit. În vederea cercetării produselor inovatoare cu acțiune antifungică asupra unor agenți cauzali ai micozelor umane s-a planificat un studiu analitic, care prevede câteva etape, ce diferă prin metodologia aplicată și profunzimea investigațiilor, fiecare, în funcție de obiectiv, a determinat raționamentul de studiu prevăzut spre realizare. Astfel, au fost obținute dovezi, ce au stat la baza atingerii scopului cercetării realizate pe etape, conform designului redat în Figura 2.1.

Etapa I-a. Stadiul actual al cunoașterii problemei cercetate în lucrare. La această etapă fiecare aspect al prezentei cercetări a fost supus cunoașterii prin analiza studiilor efectuate de alți cercetători atât din țară, cât și de peste hotare. A fost realizată sinteza literaturii de specialitate din domeniul ce vizează cercetarea prin prezentarea critică a rezultatelor studiilor științifice și expunerea principalelor puncte de vedere ale lucrărilor consacrate domeniului abordat. Totodată, a fost stabilit scopul și obiectivele studiului, precizat volumul eșantionului de studiu și elaborat planul general de cercetare. A fost formulată ipoteza de cercetare, stabilite modalitățile și metodele de investigare, și de colectare a datelor.

Etapa a II-a. Evaluarea diversității speciilor de fungi implicate în etiologia micozelor umane. S-a inițiat acumularea materialului de cercetare, identificarea speciilor și a profilului de rezistență la antifungice, stabilirea diversității agenților fungici implicați în dezvoltarea patologiei infecțioase. A fost cercetată exprimarea factorilor de patogenitate ai izolatele clinice de fungi,

analizate datele privind sensibilitatea la preparatele antifungice și stabilite patternurile de rezistență.

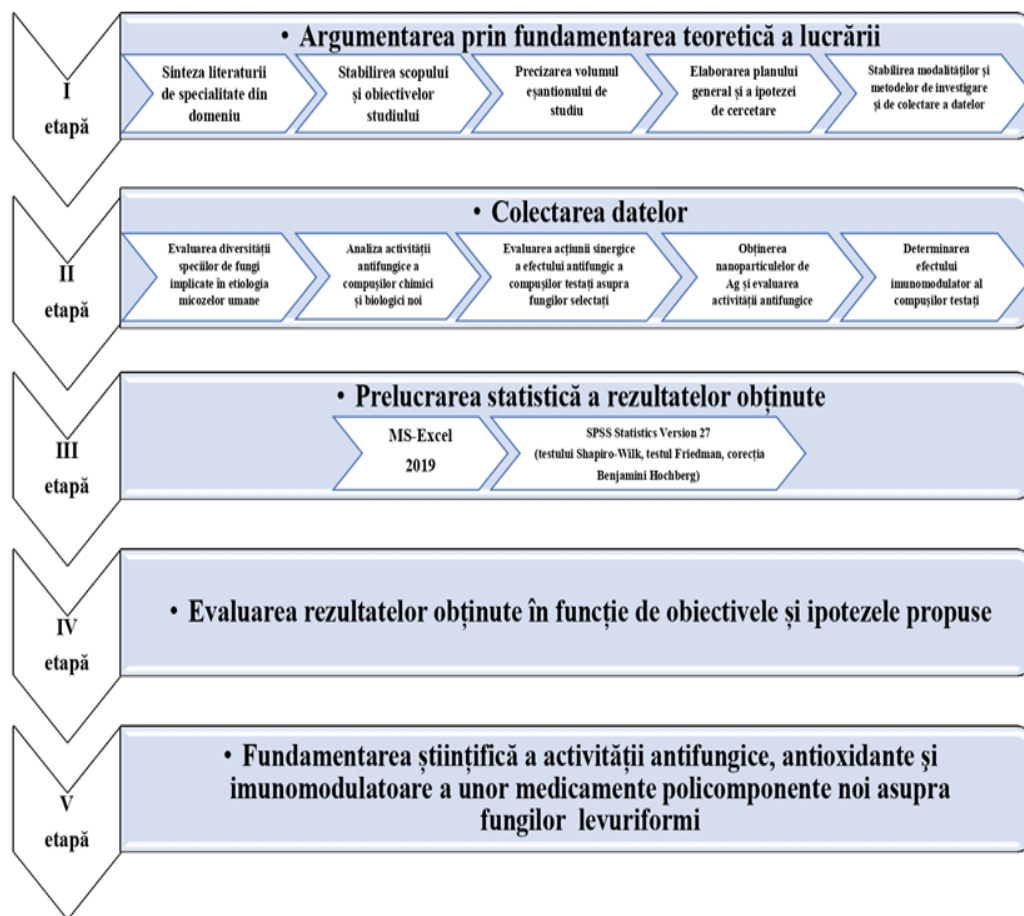


Fig. 2.1. Designul cercetării

Etapa a III-a. Analiza activității antifungice a compușilor chimici și biologici noi. Inițial a fost cercetată activitatea antifungică a compușilor noi asupra tulpinilor de referință și a izolatelor clinice de fungi levuriformi calitativ, prin metoda difuzimetrică, și cantitativ, prin cea a diluțiilor succesive în medii lichide. A fost determinată concentrația minimă inhibitorie și minimă fungicidă a acestor compuși. Ulterior, în conformitate cu rezultatele obținute, au fost selectați compușii care au prezentat activitate antifungică în concentrații mici. A fost studiată și acțiunea sinergică a compușilor chimici și biologici noi, influența acestora asupra factorilor de patogenitate ai fungilor. A fost investigată acțiunea citotoxică a compușilor noi față de *Daphnia magna*.

Etapa IV-a. Evaluarea acțiunii sinergice a efectului antifungic al compușilor testați asupra fungilor selectați pentru cercetare. Pentru început s-a evaluat acțiunea sinergică a compușilor chimici și biologici asupra tulpinilor de referință, identificând combinațiile de compuși care au potențiat efectul antifungic. Ulterior a fost determinat timpul de omorâre a fungilor sub acțiunea compușilor separat și în combinație. Au urmat experimentele privind determinarea activității compușilor noi asupra expresiei unor factori de patogenitate (fosfolipazei, proteinazei și

hemolizinei) și de persistență a fungilor (acțiunea anticomplementară, antilozim). A fost determinată influența compușilor noi asupra capacității de aderență a fungilor la substratul inert și acțiunea antibiofilm a acestora.

Etapa V-a. Obținerea nanoparticulelor de Ag și evaluarea activității antifungice. La această etapă au fost realizate cercetări asupra sintezei nanoparticulelor de Ag de diferite dimensiuni și concentrații stabilizate cu diverși derivați naturali. Ulterior, s-a efectuat screening-ul calitativ al sensibilității tulpinilor fungice față de nanoparticule de Ag stabilizate cu pululan, comparativ cu cele stabilizate cu derivați celulozici. Apoi a fost testată cantitativ activitatea antifungică în vederea determinării concentrației minime inhibitorii și a concentrației minime fungicide pe tulpini de referință și pe izolate clinice. În final, au fost determinate modificările viabilității, a caracterelor morfologice ale celulelor fungice sub acțiunea nanocompozitelor.

Etapa VI-a. Determinarea efectului imunomodulator al compușilor testați. Au fost efectuate cercetări de determinare a efectului imunomodulator al compușilor chimici și biologici separat și în combinație. S-a studiat influența acestora asupra unor indicatori biochimici și a nivelului uiseric al unor citokine pro- (IL-1 β , IL-6, TNF- α) și antiinflamatoare (IL-10).

Etapa VII-a. Evaluarea statistică a rezultatelor obținute, formularea concluziilor generale și argumentarea științifică a recomandărilor și strategiilor de intervenție.

Rezultatele obținute au fost prelucrate statistic și evaluate în funcție de obiectivele, și ipotezele propuse în cadrul acestei cercetări cu formularea de concluzii generale care reflectă rezultatele obținute și exprimă valoarea aplicativă a lucrării în recomandările expuse.

Calcularea eșantionului s-a efectuat după formula 1.

Tabelul 2.1. Numărul de tulpini de fiecare specie pentru valori medii

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

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

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

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

Înlocuind datele, obținem numărul total de tulpini clinice pentru testare – 602.

Volumul eșantionului va fi constituit din tulpinile de *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei*, *Candida kefyr* și *Candida dublinensis* izolate de la pacienții cu infecții micotice.

2.2. Obiectele de studiu

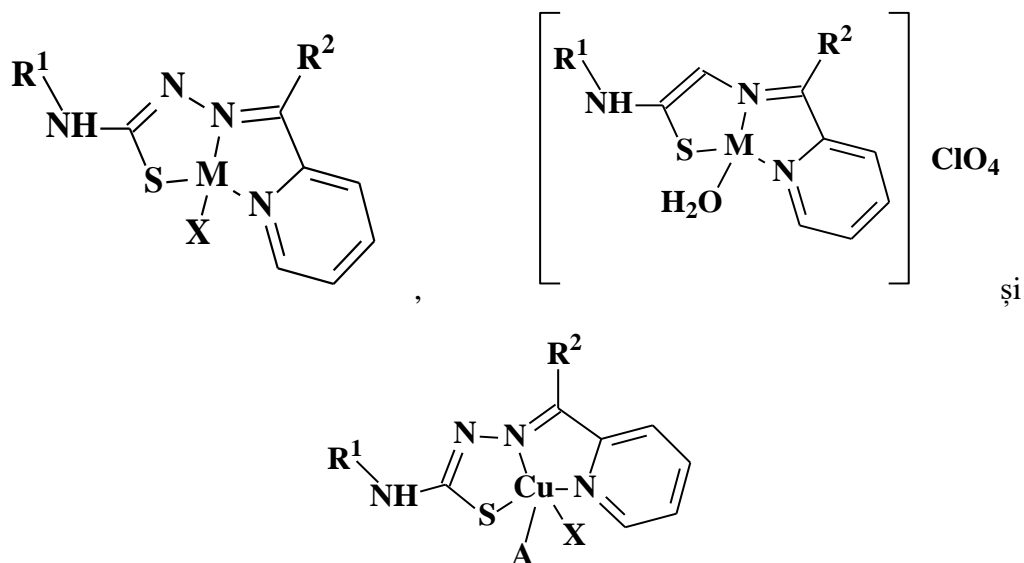
Tulpinile tip provin din colecții internaționale *American Type Culture Collection* (ATCC): *Candida albicans* ATCC 90028, *Candida parapsilosis* ATCC 22019, *Candida krusei* ATCC 6258, *Candida albicans* ATCC 10231, *Candida albicans* ATCC 14053, *Candida lusitaniae* ATCC 34449, *Candida glabrata* ATCC 2001, *Cryptococcus neoformans* ATCC 13690, *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 4098, *Meyerozyma guilliermondii* ATCC 626.

Tulpinile de fungii izolate din hemoculturi, de la pacienții cu infecții invazive, aparțin la 19 specii din cinci genuri: *Candida* cu 15 specii reprezentate de 94 de tulpini. Majoritatea izolatelor din hemoculturi au fost oferite pentru testare de Universitatea de Științe Agricole și Medicină Veterinară „Ion Ionescu de la Brad”. În studiu au fost incluse și izolate clinice din: urină, secreții vaginale, aspirat bronșic, secreții otice, tub endotraheal, secreții oftalmice ș.a. colectate în cadrul sistemului de supraveghere a rezistenței la antimicrobiene.

Compuși coordinați. În calitate de compuși chimici cu potențiale efecte antifungice au fost testați compușii coordinați ai tiosemicarbazonelor sintetizați în Laboratorul de cercetări științifice „Materiale Avansate în Biofarmaceutică și Tehnică” al Universității de Stat din Moldova de către un grup de autori ghidat de academicianul Aurelian Gulea. În calitate de precursori de sinteză ai compușilor chimici au fost utilizați reactivi de puritate înaltă „Sigma-Aldrich”. În total au fost testați 980 de compuși coordinați ai clorurilor, bromurilor, nitraților, percloraților, sulfaților și acetaților de cupru, fier, cobalt, nichel și zinc cu N(4)-ciclohexil, hexil-, *terț*-butil-, etoxicarbonil-fenil, alil-metoxifeniltiosemicarbazone și S-alkilizotiosemicarbazone 2-formilpirininelor și aldehydelor salicilice substituie, acidului piruvic, aminoguanazona pirazolonei și complecșii cu liganzi micști, care conțin amine aromatice, azometine (Anexa 1). Într-un final, au fost selectați 22 de compuși, care au prezentat activitate antifungică în concentrații mai mici asupra tulpinilor tip.

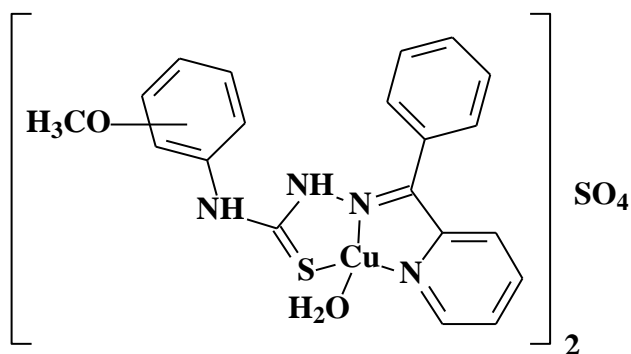
Pentru descrierea mai concisă a rezultatelor cercetării, compușii au fost repartizați în nouă grupe, în funcție de compoziție și structura lor:

1) Compuși coordinați ai cuprului și nichelului cu tiosemicarbazone N(4) substituie cu următoarele formule generale:

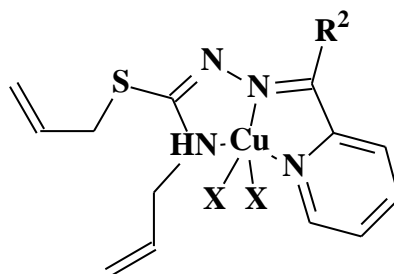


Unde: M = Cu, Ni; R¹ = -C₆H₁₁, -(CH₂)₅CH₃, -C(CH₃)₃, -C₆H₄-COOC₂H₅, -C₆H₄(OCH₃), -CH₂CH=CH₂; R² = H, CH₃, C₆H₅, X = Cl⁻, Br⁻, NO₃⁻, CH₃COO⁻; A = C₃H₅N₂, (CH₃)₂(C₆H₃N)

2) Compușii coordinativi ai sulfatului de cupru(II) cu metoxifeniltiosemicarbazone 2-benzoilpiridinei cu formula generală:

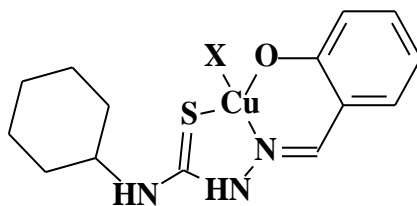


3) Compuși coordinativi ai cuprului cu 4-ail-S-ailizotiosemicarbazona 2-formilpiridinei cu formula generală:



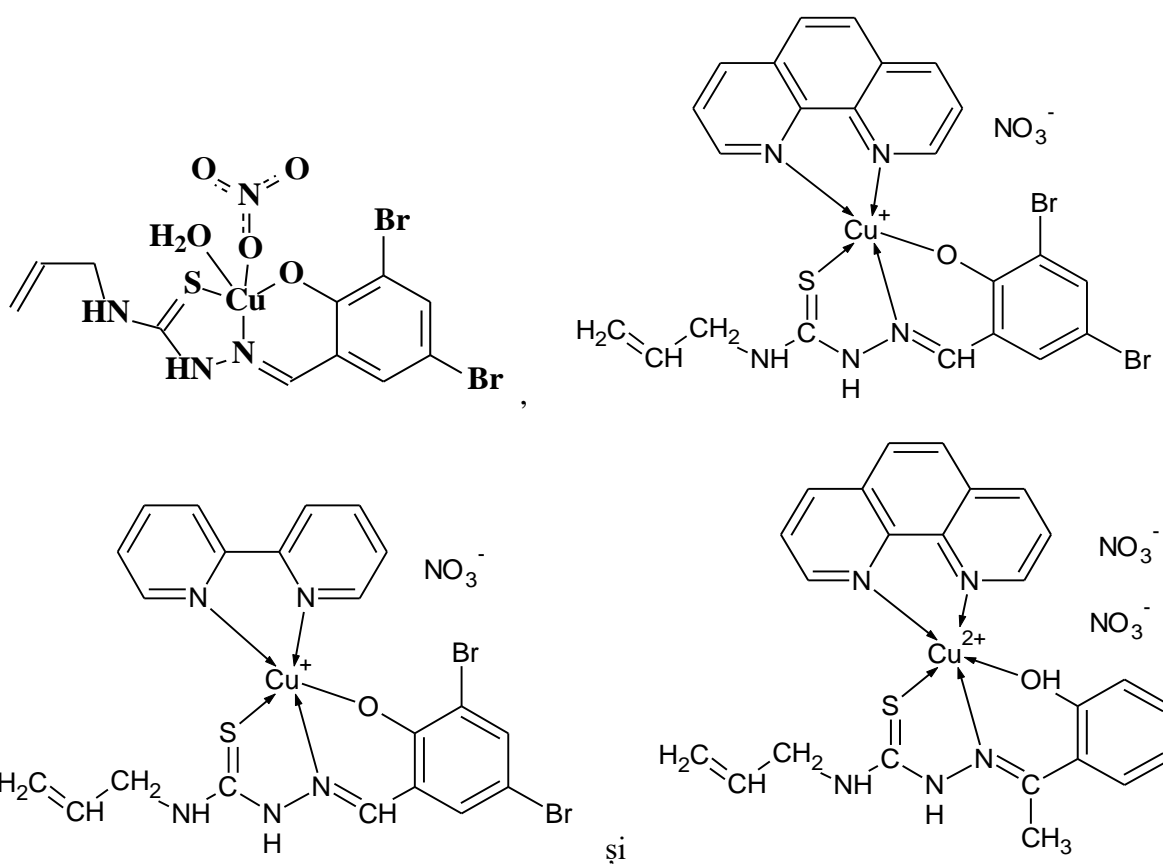
Unde: X = Cl⁻, Br⁻

4) Compușii coordinativi ai cuprului (II) cu N(4)-ciclohexiltiosemicarbazona aldehidei salicilice cu formula generală:

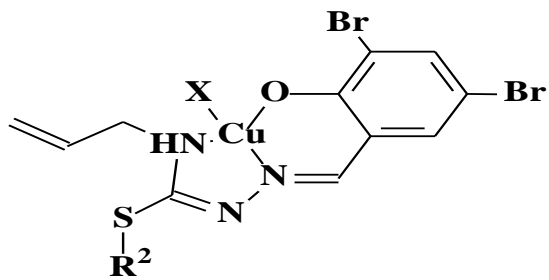


Unde: $X = \text{Cl}^-, \text{NO}_3^-, \text{CH}_3\text{COO}^-$

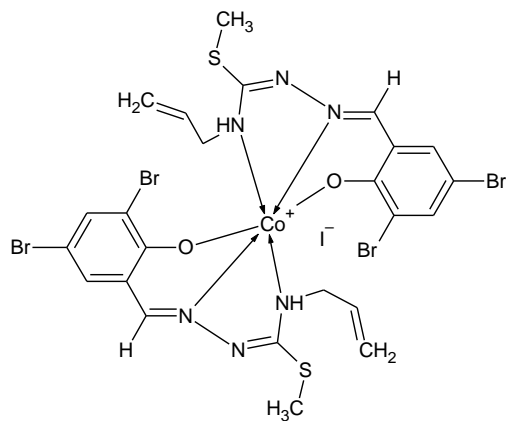
5) Compuși coordinativi ai nitratului de cupru(II) cu 4-alil-tiosemicarbazona aldehidei 3,5-dibromosalicilice cu formulele:



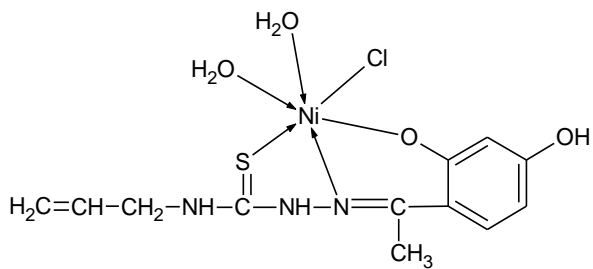
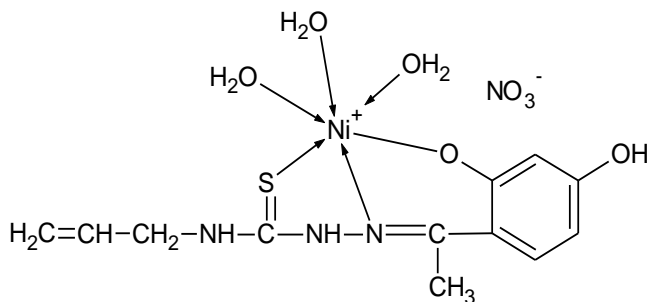
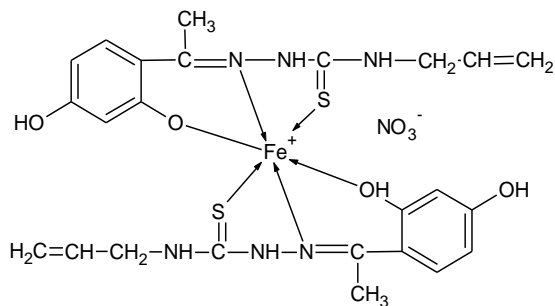
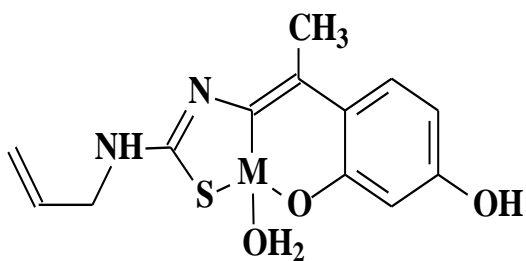
6) Compuși coordinativi ai cuprului și cobaltului cu 4-alil-S-alciltiosemicarbazone aldehidelor 3,5-dibromosalicilice cu formulele generale:

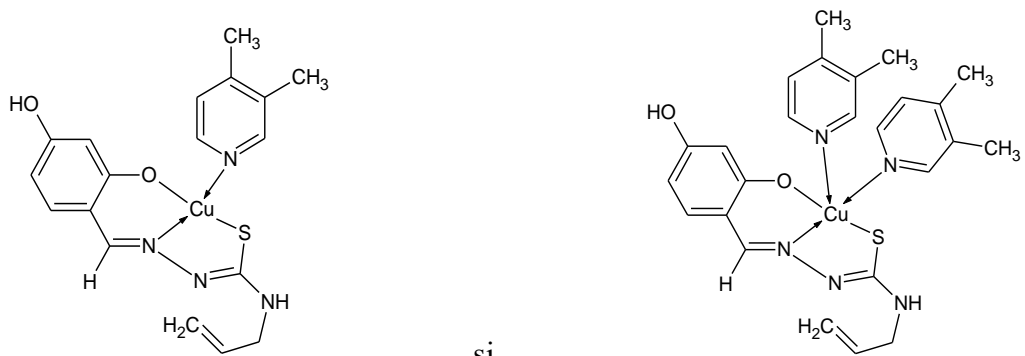


și



7) Compuși coordinativi ai unor metale 3d cu 4-aliitiosemicarbazona 2,4-dihidroxiacetofenonei cu formulele generale:

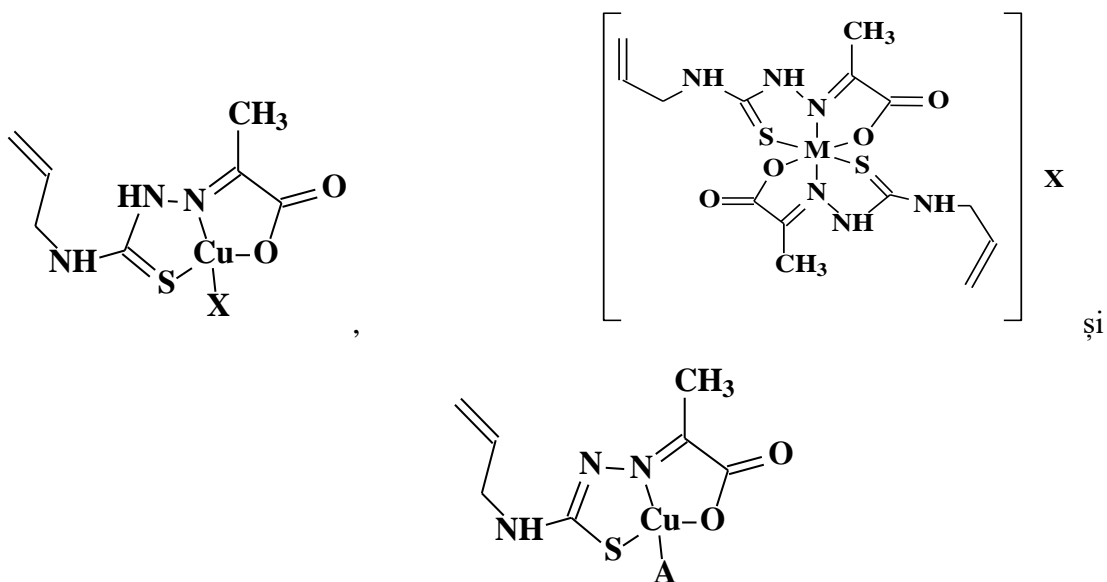




și

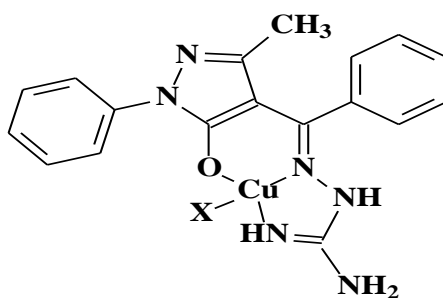
unde: M = Cu, Zn;

8) Compușii coordinativi ai unor metale 3d cu 4-allylthiosemicarbazona acidului piruvic cu formula generală:



Unde: M = Co, Fe; X = Cl⁻, NO₃⁻; A = C₃H₅N₂, (CH₃)₂(C₆H₃N)

9) Compușii coordinativi ai cuprului(II) cu aminoguanazona pirazolonei cu formula generală:



Unde: X = Cl⁻, NO₃⁻

Materialul utilizat pentru determinarea toxicității prin testul imobilizării acute a fost specia de crustaceu *Daphnia magna*.

Materialele utilizate pentru sinteza nanoparticulelor de argint – pululan

Pululan (TCI Europe, Mw = 150 kDa), 2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxil (TEMPO), hipocloritul de sodiu (NaClO, 9% clorit, Compania de Chimie, Iași, România), bromura de sodiu (99% Alfa Aesar, București, România) și azotatul de argint (AgNO₃) (≥99% Sigma-Aldrich, București, România) au fost folosite fără o purificare suplimentară. Fluconazol, mediu RPMI1640, acid 3-(N-morfolino) propansulfonic (MOPS), glucoză și dimetilsulfoxid (DMSO, analytical grade, ≥99,9%) au fost achiziționate de la Sigma-Aldrich. Toate soluțiile au fost preparate cu apă bidistilată.

Materialele utilizate pentru sinteza nanoparticulelor de argint – derivați celulozici

Azotatul de argint (AgNO₃) (≥99% SigmaAldrich, Bucuresti, Romania), hidroxipropilceluloza (HPC, 80 kDa), metilceluloza (MC, viscozitate 4.000 cP), etilceluloza (EC, 48,8% ethoxyl basis, viscosity 310 cP) și acetatul de celuloză (CA, average Mn ~ 50.000) au fost achiziționate de la Sigma-Aldrich Chemicals. Toate substanțele utilizate au fost de puritate analitică, nefiind necesară o purificare suplimentară. În toate sintezele s-au utilizat drept solvenți apa bidistilată și dimetilsulfoxidul (DMSO, analytical grade ≥99,9%).

Compușii biologici (PCM1, PCM2, ES1, ES2, ES3) au fost oferiți pentru testare 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. Inițial au fost testați 25 de compuși biologici, fiind selectați cinci care au prezentat o acțiune antifungică asupra tulpinilor tip în concentrații mai mici.

Compusul biologic PCM1, utilizat în acest studiu, reprezintă un pigment carotenoid cu mixoxantofilă obținut în concentrație de 0,149 mg/ml în soluție apoasă de alcool etilic de 80%, iar compusul PCM2 în concentrație de 0,214 mg/ml în soluție apoasă de alcool etilic de 80%. Acești compuși au fost obținuți pe cale biotehlogică din *Spirulina platensis* CNMN CB-02 – tulpină de cianobacterie din Colecția Națională de Microorganisme Neputogene a Institutului de Microbiologie și Biotehnologie al AȘM.

Compusul ES1 reprezintă un 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 combinați în oligopeptide (până la 10 kDa), macro- și

microelemente funcționalizate biologic. În cercetarea curentă, pentru testări s-a utilizat extractul ES soluție alcoolică, cu concentrația extractului de 10 mg/ml și a alcoolului de 50%.

Compusul ES2 este o combinație sinergică dintre complexul aminoacid/oligopeptidic, polizaharide sulfatate, proteine, macro- și microelemente funcționalizate biologic, derivate din spirulină. Pentru testare *in vitro* s-a utilizat forma ES2 soluție alcoolică, cu concentrația extractului de 20 mg/mL și concentrația alcoolului de 45%.

Compusul ES3 reprezintă o combinație sinergică dintre fosfolipide, polizaharide sulfatate, complexul aminoacid/oligopeptidic, proteine, macro- și microelemente funcționalizate biologic, derivate din spirulină, cu concentrația extractului de 20 mg/mL și a alcoolului de 45%.

2.3. Metode de cercetare

La realizarea acestui studiu, pentru atingerea scopului și obiectivelor propuse, au fost utilizate metode standardizate, ajustate cercetării realizate (Figura 2.2.):

- ✓ *istorice, descriptive, bibliografico-analitice, logice* – la studierea teoretică a bibliografiei;
- ✓ *metode de determinare a activității antifungice* a compușilor chimici, biologici și a nanoparticulelor de argint prin metoda difuziunii în geloză, metoda diluțiilor succesive, metoda standardizată pentru levuri EUCAST EDef 7.2;
- ✓ *metode biochimice* pentru determinarea activității enzimelor (superoxid dismutaza, catalaza, activitatea antioxidantă totală, glutatión S-transferaza, glutatión peroxidaza și glutatión reductaza), capacității antioxidante totale și a conținutului produselor finale ale peroxidării lipidelor (dialdehida malonică și produșii proteici de oxidare avansată).
- ✓ *metode culturale*: izolarea agenților fungici, determinarea factorilor de patogenitate: DNA-ze, hemolizine, fosfolipaze, proteaze, esteraze, acțiunea anticomplimentară și antilizoșim, sensibilității la preparatele antifungice și determinarea activității antifungice a compușilor chimici și biologici asupra tulpinilor de referință și a izolatelor clinice, separat și în combinație; evidențierea posibilelor efecte împotriva formării biofilmelor ale compușilor chimici și biologici separat și în combinație;
- ✓ *analiza imunoenzimatică* (abreviat *ELISA*, eng. *enzyme-linked immunosorbent assay*), utilizată pentru evaluarea efectelor imunomodulatorii induse de acțiunea compușilor testați prin analiza de citokine pro- și antiinflamatoare: interleukina-1B (IL-1B), factorul de necroză tumorală alfa (TNF α), interleukina-6 (IL-6) și interleukina-10 (IL-10).
- ✓ *epidemiologice* – la evaluarea indicatorilor epidemiologici prin realizarea analizei descriptive, comparativă și analitică.
- ✓ *analiza comparativă* a activității antifungice a compușilor chimici și biologici, separat și în combinație, asupra tulpinilor de referință și clinice, determinarea efectului de sinergism;

- ✓ *statistică*: volumul cercetării și interpretarea rezultatelor studiului au fost bazate pe metode statistice tradiționale, asigurând gradul de reprezentativitate a datelor acceptate pentru studii în medicină. Baza de date a fost supusă prelucrării statistice cu ajutorul programelor existente acceptate pentru astfel de studii (MS-Excel 2019 și SPSS Statistics Version 27).

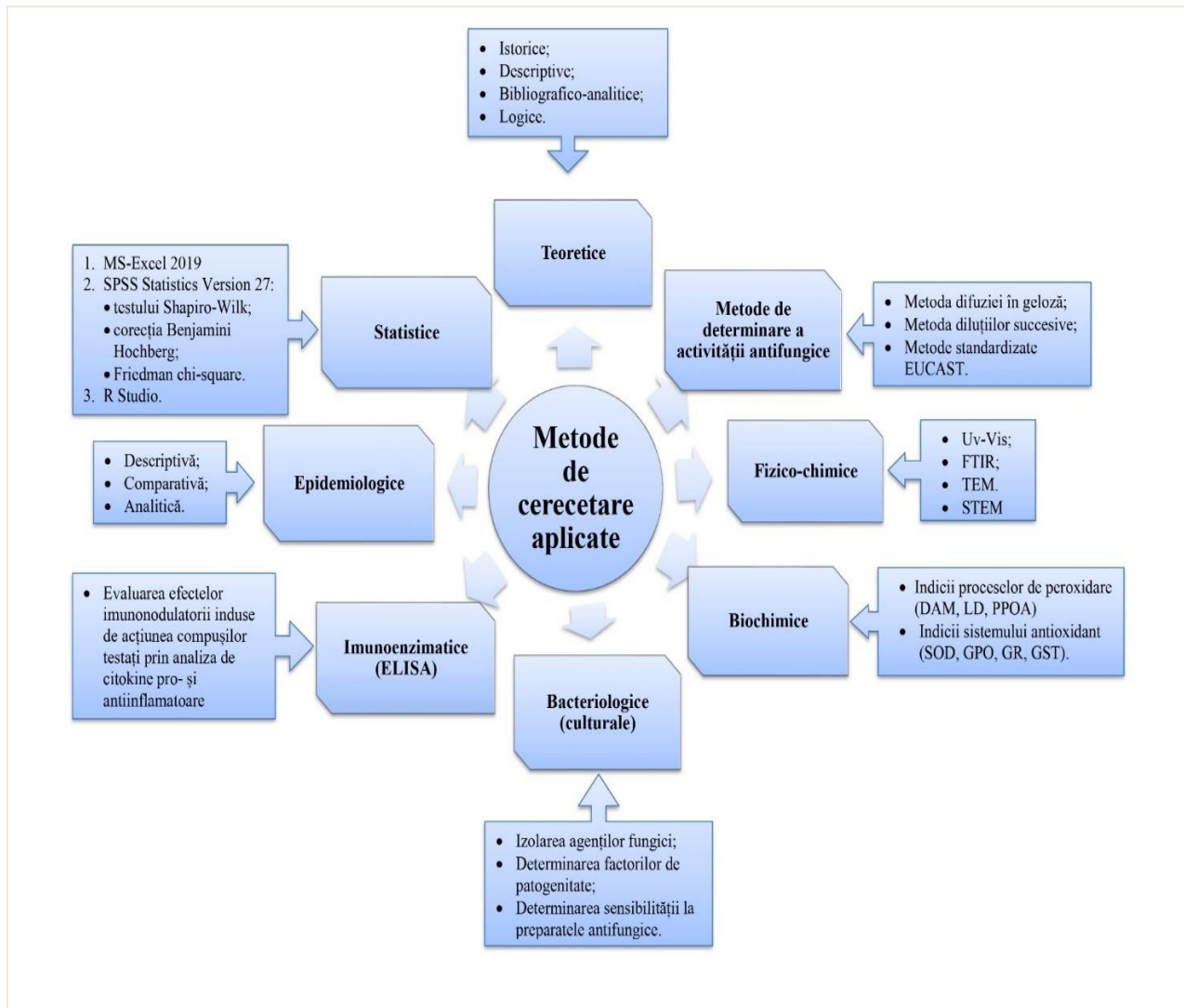


Fig. 2.2. Metodele de cercetare folosite în prezentul studiu

Izolarea, identificarea și determinarea susceptibilității la antifungice a izolatelor clinice

Examenul microscopic a fost realizat pentru a identifica forma și dimensiunile componentelor structurale ale levurilor: blastospori, pseudohife, hife, eventual artrospori, prezența sau absența capsulei, modul de înmugurire. Următoarea etapă a presupus obținerea culturii pure de fungi. Pentru aceasta, materialul de examinat a fost epuizat pe geloză Sabouraud cu cloramfenicol și gentamicină (mediu care a permis dezvoltarea levurilor și inhibiția multiplicării altor contaminanți). Plăcile au fost expuse în termostat la temperatura de 37°C timp de 48-72 ore. Ulterior, coloniile dezvoltate, specifice conform aspectelor culturale genului de levuri, au fost verificate la puritate. În acest scop s-au efectuat frotiuri colorate Gram și s-au examinat la

microscop, la necesitate s-au făcut repicări în vederea purificării culturii primare. Identificarea s-a realizat prin metode microbiologice clasice și confirmate prin tehnica MALDI-TOF (eng. *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight*) [46].

Determinarea susceptibilității la antifungice a levurilor prin sistemul VITEK 2

Patternul de susceptibilitate al tulpinilor luate în studiu s-a efectuat prin utilizarea cardului VITEK 2 care reprezintă o versiune miniaturizată pentru determinarea CMI prin tehnica de microdiluție. Suspensia de fungi destinată testării a fost supusă diluării până la concentrație standardizată în soluție salină 0,45% prealabil de a fi rehidratat cardul cu mediul de cultură ce conține agent antifungic, ulterior fiind introdus în incubatorul de citire. În interiorul echipamentului a fost posibilă monitorizarea creșterii din fiecare godeu de pe card până la 36 de ore. La finalul incubării au fost stabilite valorile CMI pentru fiecare agent antifungic din componența cardului [118].

Determinarea susceptibilității la antifungice cu sistemul Sensititre

Spre deosebire de sistemul VITEK 2, unde determinarea susceptibilității la antifungice se bazează pe raportarea unei valori a CMI obținute indirect prin calcule, sistemul Sensititre permite utilizarea metodei de referință recomandate de OMS, cu determinarea directă a CMI. Stabilirea CMI permite nu numai luarea unor decizii terapeutice argumentate, dar și ghidează epidemiologii la stabilirea măsurilor eficiente de prevenire și control a răspândirii infecțiilor asociate asistenței medicale și a rezistenței la antifungice. Utilizarea acestui sistem exclude necesitatea confirmării prin retestări sau utilizarea altor teste fenotipice. Prin acest studiu a fost reconfirmată semnificația metodologiei date în obținerea rezultatelor veridice într-un timp util, redus și la costuri mai mici. A fost utilizată placa standard ce conține un număr mai mare de antifungice în diferite diluții, precum: *amfotericina B*, *anidulafungină*, *micafungină*, *fluconazol*, *itraconazol*, *posaconazol*, *voriconazole*, *5-fluorocitozină*, *caspofungină*. Inițial a fost preparat inocul din trei-cinci colonii (cultură pură, de 24-48 ore) izolate de pe mediul de cultură Sabouraud, ulterior panelurile au fost inoculate automat și introduse în incubatorul de citire al instrumentului. Rezultatele au fost citite automat prin tehnologii bazate pe fluorescență. Interpretarea a fost efectuată în baza standardului EUCAST EDef 7.2. [15, 113].

Sinteza și caracterizarea nanoparticulelor de argint din polizaharide (derivați celulozici, pululan și 6-carboxipululan)

Nanoparticulele de argint (AgNPs) generate din pululan și 6-carboxipululan. Pentru sinteza nanoparticulelor de argint s-au utilizat patru seturi de probe prin variația concentrației de pululan/pululan oxidat, obținându-se trei probe în cazul pululanului și o probă în cazul pululanului oxidat. Astfel, s-au utilizat trei concentrații diferite de pululan (1%, 5% și 7%) și o concentrație de

pululan oxidat (1%) care s-au amestecat cu o soluție apoasă de azotat de argint (AgNO_3) proaspăt preparată în apa bidistilată sub agitare magnetică, obținându-se o concentrație finală a AgNO_3 de 5 mM (AgNPs/P-1%), de 5 mM (AgNPs/PO-1%), de 0,5 mM (AgNPs/P-5%) și de 1,6 mM (AgNPs/P-7%). După amestecarea soluțiilor, probele au fost lăsate la agitat timp de câteva ore (~ 6 ore), la temperatura camerei (25°C), observându-se schimbarea culorii amestecului de la incolor la galben.

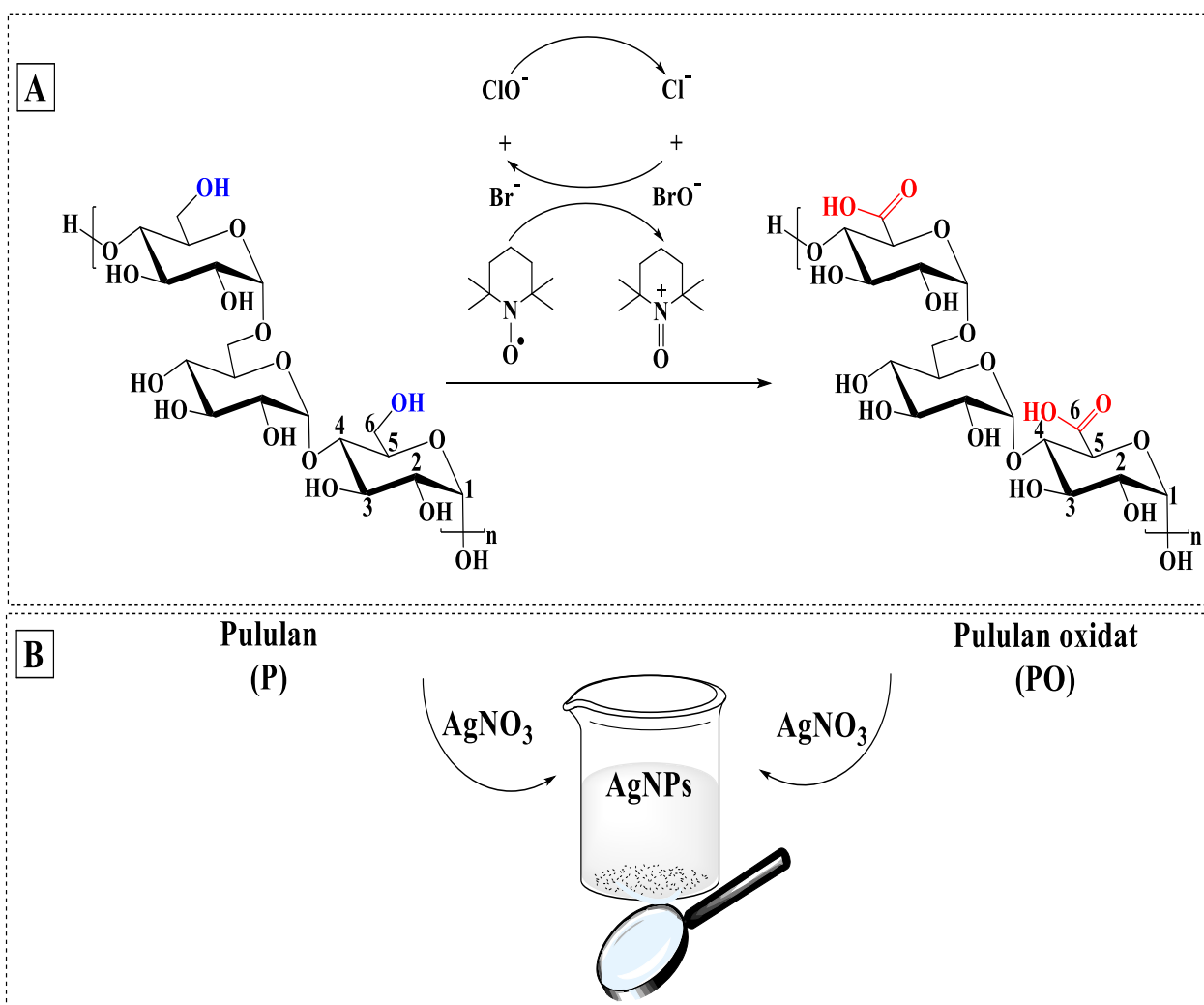


Fig. 2.3. Oxidarea selectivă a grupărilor OH primare ale pululanului la grupări carboxilice prin intermediul sistemului TEMPO/hipoclorit de sodiu/bromură de sodiu, în apă la pH 10 (A); schema simplificată a generării AgNPs în prezența pululanului/pululanului oxidat (B)

Oxidarea pululanului la 6-carboxipululan în prezența radicalului TEMPO s-a efectuat în următoarele condiții: într-un balon cu fund rotund de 250 ml, cu trei găuri, prevăzut cu agitator, se adaugă 50 ml apă distilată, 0,5 g de pululan, 0,1 mM/g TEMPO și 1 mM/g NaBr și amestecul obținut se agită la temperatura camerei. O soluție de 8% NaOCl (10 mM/g pululan), adusă la pH 10 prin adăugarea unei soluții de HCl 0,5 M, este adăugată în amestecul de reacție. Valoarea pH-

ului a fost atent monitorizată cu ajutorul unui pH-metru și menținută la valoarea 10 prin picurarea unei soluții de NaOH 0,5 M. După 2 ore, reacția a fost stopată cu 5 ml de etanol, iar amestecul a fost precipitat cu 500 ml de etanol și menținut la rece timp de 24 h. Precipitatul format a fost recuperat prin centrifugare și solubilizat cu apă distilată. Soluția de polimer a fost dializată într-o celulă Amicon, echipată cu un rezervor umplut cu apă distilată (conductivitate mai mică de $3 \mu\text{S}/\text{cm}^{-1}$), prin intermediul unei membrane de ultrafiltrare Milipore Amicon din polietersulfonă (cut off: 10,000 g/mol). Prin dializa soluției de pululan sunt îndepărtați oligomerii și impuritățile. Dializa a fost oprită în momentul în care conductivitatea soluției filtrate a fost mai mică de $10 \mu\text{S}/\text{m}^{-1}$, polimerul fiind recuperat prin liofilizare (Liofilizator Martin Christ, Alpha 1-2 LD) [36].

Reacția de oxidare a pululanului în prezența sistemului TEMPO/NaBr/NaOCl poate fi privită ca un proces în trepte:

- a) Formarea hipobromitului de sodiu (NaOBr) în mediul de reacție, în prezența hipocloritului de sodiu (NaOCl) și a bromurii de sodiu (NaBr);
- b) Formarea ionului oxoamoniu în mediul de reacție;
- c) Oxidarea grupelor alcoolice primare la grupe carboxilice, cu formarea intermediară a grupelor aldehidice [36, 60].

Nanoparticule de argint (AgNPs) generate din derivați celulozici a presupus utilizarea unui derivat celulozic, precum hidroxipropilceluloza (HPC), metilceluloza (MC), etilceluloza (EC) și acetatul de celuloză (CA), și a unei soluții de azotat de argint. Pentru prepararea soluțiilor, drept solvenți s-au utilizat fie apă bidistilată, fie dimetilsulfoxidul, în funcție de derivatul celulozic utilizat. Pentru fiecare derivat celulozic s-a preparat o soluție de concentrație 1%, care ulterior s-a amestecat cu o soluție de azotat de argint de concentrație 0,01 M, soluțiile fiind agitate împreună timp de 2 ore la temperatura camerei. Metodologia pentru fiecare tip de derivat celulozic este redată mai jos:

- *nanoparticulele de argint pe bază de metilceluloză (AgNPs-MC)* au fost obținute la temperatura mediului ambiant, utilizând apă bidistilată ca solvent, azotatul de argint ca precursor și metilceluloza ca agent de reducere a precursorului metalic și de stabilizare a nanoparticulelor de argint în mediul de reacție. Astfel, pentru sinteza nanoparticulelor s-a preparat o soluție de concentrație 1% metilceluloză (MC) în apă bidistilată. Soluția de azotat de argint a fost preparată prin dizolvarea azotatului de argint în DMSO, concentrația soluției de azotat de argint fiind de 0,01 M. În soluția de polimer s-au adăugat 2,5 ml de soluție de AgNO_3 0,01 M, volumul final al soluției de amestec fiind de 12,5 ml. Soluția a fost lăsată timp de 2 ore sub agitare continuă, la temperatura mediului ambiant, în lipsa oricărui agent suplimentar de reducere sau de stabilizare.

O primă indicație a formării nanoparticulelor de argint a fost modificarea culorii soluției inițiale de la incolor la maro-închis [36, 60].

- *nanoparticulele de argint pe baza de hidroxipropilceluloza (AgNPs-HPC)* au fost obținute la temperatura mediului ambiant, utilizând apa bidistilată ca solvent, azotatul de argint ca precursor și hidroxipropilceluloza ca agent de reducere a precursorului metalic și de stabilizare a nanoparticulelor de argint în mediul de reacție. Astfel, pentru sinteza nanoparticulelor s-a preparat o soluție de concentrație 1% hidroxipropilceluloză (HPC), utilizându-se apa bidistilată drept solvent. Soluția de azotat de argint a fost preparată prin dizolvarea azotatului de argint în apă bidistilată, concentrația soluției de azotat de argint fiind de 0,01 M. În soluția de polimer s-au adăugat 2,5 ml de soluție de AgNO_3 0,01 M, volumul final al soluției de amestec fiind de 12,5 ml. Soluția a fost lăsată timp de 2 ore sub agitare continuă, la temperatura mediului ambiant, în lipsa oricărui agent suplimentar de reducere sau de stabilizare. O primă indicație a formării nanoparticulelor de argint a fost modificarea culorii soluției inițiale de la incolor la maro-deschis.

- *nanoparticulele de argint pe baza de etilceluloză (AgNPs-EC)* au fost obținute la temperatura mediului ambiant, utilizând dimetilsulfoxidul (DMSO) ca solvent, azotatul de argint ca precursor și etilceluloza ca agent de reducere a precursorului metalic și de stabilizare a nanoparticulelor de argint în mediul de reacție. Astfel, pentru sinteza nanoparticulelor s-a preparat o soluție de concentrație 1% etilceluloză (EC), folosind dimetilsulfoxidul drept solvent. Soluția de azotat de argint a fost preparată prin dizolvarea azotatului de argint în DMSO, concentrația soluției de azotat de argint fiind de 0,01 M. În soluția de polimer s-au adăugat 2,5 ml de soluție de AgNO_3 0,01 M, volumul final al soluției de amestec fiind de 12,5 ml. Soluția a fost lăsată timp de 2 ore sub agitare continuă, la temperatura mediului ambiant, în lipsa oricărui agent suplimentar de reducere sau destabilizare. O primă indicație a formării AgNPs a fost modificarea culorii soluției inițiale de la incolor la galben-pai.

- *nanoparticulele de argint pe baza de celuloză (AgNPs-CA)* au fost obținute la temperatura mediului ambiant, utilizând dimetilsulfoxidul (DMSO) ca solvent, azotatul de argint ca precursor și acetatul de celuloză ca agent de reducere a precursorului metalic și de stabilizare a nanoparticulelor de argint în mediul de reacție. Astfel, pentru sinteza nanoparticulelor s-a preparat o soluție de concentrație 1% acetat de celuloză (CA), utilizând dimetilsulfoxidul în calitate de solvent. Soluția de azotat de argint a fost preparată prin dizolvarea azotatului de argint în DMSO, concentrația soluției de azotat de argint fiind de 0,01 M. În soluția de polimer s-au adăugat 2,5 ml de soluție de AgNO_3 0,01 M, volumul final al soluției de amestec fiind de 12,5 ml. Soluția a fost lăsată timp de 2 ore sub agitare continuă, la temperatura mediului ambiant, în lipsa oricărui agent

suplimentar de reducere sau de stabilizare. O primă indicație a formării nanoparticulelor de argint a fost modificarea culorii soluției inițiale de la incolor la galben-deschis.

Formarea tuturor tipurilor de nanoparticule de argint a implicat următoarele etape: reducerea precursorului (azotatul de argint) de către derivații celulozici prin intermediul grupelor hidroxilice reducătoare, disponibile de-a lungul lanțului polizaharidic, responsabile de reducerea ionilor de argint (Ag^+) la atomi liberi de argint (Ag^0); nucleația atomilor liberi; creșterea nanoparticulelor de argint și stabilizarea lor prin interacțiunea cu moleculele de derivat celulozic care, prin intermediul grupelor hidroxilice, formează un înveliș protector la suprafața particulelor, stabilizându-le.

Caracterizarea nanoparticulelor de Ag generate din derivați celulozici s-a realizat prin:

- *spectroscopia în domeniul ultraviolet și vizibil (UV-Vis)* a fost utilizată pentru confirmarea inițială a nanoparticulelor de argint sintetizate, folosind spectrofotometrul UV-vizibil JascoV-550, în domeniul lungimii de undă de 200-600 nm;
- *microscopia electronică de transmisie cu scanare (STEM)* a permis studierea morfologiei, suprafeței și dimensiunii nanoparticulelor de argint sintetizate, utilizând microscopul electronic de transmisie cu scanare și Supra Zeiss cu rezoluție de 1 nm la 30 kV cu detector Oxford EDS de 20 mm. Astfel, 1 μl de probă a fost aplicat pe suport și uscat în condiții atmosferice înainte de analiză;
- *microscopie electronică de transmisie (TEM)*: imaginile TEM au fost efectuate cu microscopul electronic Hitachi High-Tech HT7700 (Hitachi High-Technologies Corporation, Tokyo, Japonia), folosind câte 1 μl soluție de AgNPs plasată direct pe o rețea de cupru acoperită cu carbon și lăsată să se usuce înainte de analiza TEM, în condiții atmosferice. Nu este necesară acoperirea probelor pentru acest tip de instrument ca urmare a utilizării unui obiectiv de înaltă rezoluție care este încorporat în acest aparat. Determinarea dimensiunii nanoparticulelor a fost efectuată cu ajutorul programului UTHSCSA Image Tool Version 3.00 (UTHSCSA Dental Diagnostic Science, San Antonio, TX, SUA);
- *metoda împrăștierii luminii în regim dinamic (DLS)*. Potențialul zeta (ζ) și dimensiunea medie a particulelor au fost măsurate prin intermediul aparatului Zeta Sizer model Nano ZS (Malvern Instruments, UK), dotat cu un laser He-Ne. Tehnica DLS aplică ca principiu de măsurare a dimensiunii particulei difracția luminii laser (633 nm) și electroforeza laser cu efect Doppler pentru determinarea potențialului zeta, folosind formula:

$$\zeta = \frac{\eta\mu}{\varepsilon} , \quad \text{Formula (1)}$$

unde: μ – mobilitatea electroforetică determinată la 25°C, η – viscozitatea soluției analizate, ε – constanta dielectrică.

Rezultatele prezintă o reproductibilitate bună cu o abatere de la diametrul mediu de maxim 5% [36, 60].

Caracterizarea nanoparticulelor de argint (AgNPs) pe baza de pululan și 6-carboxipululan a fost efectuată cu ajutorul următoarelor tehnici:

- *spectroscopie FT-IR*. Spectrele de absorbție în infraroșu al probelor analizate au fost înregistrate cu ajutorul spectrometrului Bruker Vertex 70, în intervalul de scanare 4000 cm^{-1} și 500 cm^{-1} , la o rezoluție de scanare cuprinsă între 2 și 32. Probele au fost analizate după o pastilare prealabilă în KBr.;

- *spectroscopia de dispersie energetică a razelor X (EDX)*. Studiile morfologice de suprafață și analiza elementală a probelor s-a realizat cu ajutorul unui microscop electronic tip Quanta 200 (FEI) cu sistem de analiză elementală EDX [36, 60].

Evaluarea activității antifungice a compușilor chimici, biologici, nanoparticulelor de Ag

Determinarea activității antifungice a compușilor chimici, biologici și a nanoparticulelor de Ag asupra tulpinilor incluse în cercetare s-a realizat prin metode calitative (metoda difuzimetrică) și cantitative (metoda microdiluțiilor seriale binare).

Metode calitative. Inițial, activitatea antifungică a compușilor chimici și biologici a fost determinată prin metoda godeurilor, descrisă în standardul CLSI (*eng.* Clinical&Laboratory Standards Institute). Astfel, în geloza Müller-Hinton au fost modelate godeuri cu diametrul de $8 \pm 0,1$ mm, respectând distanțe egale între godeuri și marginea gelozei. Inoculul de cultură de fungi, pregătit în corespundere cu standardul de turbiditate 1 MacFarland, a fost distribuit pe geloză Müller-Hinton cu un tampon steril. Compușii testați și martorii pozitivi au fost plasați în cantități egale în godeurile prealabil modelate, expuse în termostat la temperatura de 37°C timp de 48-72, la temperaturi optime (în funcție de specie) pentru 5-7 zile. Zona de inhibiție totală a creșterii culturilor de levuri s-a măsurat cu exactitate de 0,1 mm și diametrul a fost interpretat conform standardelor în vigoare [83, 84, 255].

În cazul compușilor biologici, rezultatele au fost interpretate după ce a fost eliminat efectul inhibitor indus de solvent (etanol).

Screening-ul calitativ al activității antifungice a nanoparticulelor de argint s-a realizat folosind metodă difuzimetrică adaptată. Suspensii de tulpini fungice cu turbiditatea echivalentă standardului 1 McFarland au fost inoculate în pânză pe mediu agarizat (Potato Dextrose Agar și Mueller Hinton), iar soluțiile nanoparticulelor în DMSO (10 mg/mL) au fost distribuite sub formă

de spot. Plăcile inoculate au fost incubate timp de 5-7 zile la 22°C, rezultatul pozitiv fiind indicat de apariția unei zone de inhibiție a creșterii culturii de fungi în vecinătatea spotului cu AgNPs.

Diametrul zonei de inhibiție a fost convertit în unități arbitrare: „0” indicând lipsa activității antifungice, valoarea „1” fiind atribuită intervalului 1-10 mm și „2” pentru zonele de inhibiție a creșterii cu dimensiunea diametrului cuprinsă între 11 și 20 mm.

Metode cantitative. Evaluarea activității antifungice a compușilor chimici, biologici și AgNPs asupra tulpinilor de referință și a izolatelor clinice de fungi s-a efectuat prin metoda microdiluțiilor seriale binare tehnica modificată (standardul EUCAST E.Def. 7.3.2 pentru levuri) [113].

Testările pe compușii luați în studiu au fost efectuate în mediul RPMI 1640 (*eng. Roswell Park Memorial Institute*). Din fiecare compus a fost preparată o soluție stoc, care conține o concentrație de 200 de ori mai mare decât cea mai mare concentrație finală, care trebuie testată prin dizolvarea unei cantități adecvate de compus în DMSO. Soluțiile compușilor testați au fost preparate printr-o diluție în serie de două ori pornind de la soluțiile stoc, în vederea atingerii următoarelor concentrații finale: 40, 20, 16, 12, 8, 4, 2, 1, 0,5 și 0,25 mM. Microplăcile cu 96 de godeuri, care conțin diluțiile în serie a compușilor testați, au fost preparate și depozitate la – 20°C până la utilizare. Din tulpinile de fungi testate s-au preparat inocul ajustat la 10⁵ UFC/mL. Ulterior, fiecare godeu a fost inoculat cu această suspensie fungică.

În cazul nanoparticulelor de Ag s-au efectuat diluții seriale binare în mediul RPMI 1640 în volum final de 100 μl. S-au realizat diluții în serie pentru AgNPs generate din pululan, 6-carboxipululan și pentru toți cei patru derivați celulozici cu AgNO₃ (hidroxipropilceluloză, metilceluloză, etilceluloză și acetat de celuloză), variind de la 2 până la 0,0312 mM. Concentrația finală de DMSO nu a depășit 1%. S-a folosit martorul de creștere al levurilor și martorul sterilității pentru a asigura fiabilitatea testărilor.

Monitorizarea creșterii s-a realizat spectrofotometric prin determinarea densității optice la lungimea de undă 450 nm, utilizând cititorul de microplăci ELISA-96 după 24 sau 48 de ore (în funcție de specie) de incubare la 35°C. CMI a fost considerată cea mai scăzută concentrație minimă inhibitorie fără creștere vizibilă a levurilor testate. Concentrația minimă fungică (CMF) a fost evaluată prin inocularea a 10 μL din godeurile care nu au prezentat creștere pe plăcile cu Sabouraud Dextrose Agar (SDA), urmat de expunere în termostat la temperatura de 37°C timp de 24-48 de ore. Valoarea CMF a fost considerată cea mai scăzută concentrație care nu a prezentat creștere sau cu mai puțin de trei colonii, în cazul subculturilor așa cum se reflectă prin rezultatele densității optice. *C. parapsilosis* ATCC 22019 și fluconazolul au fost utilizate pentru controlul calității fiecărui test.

Derivații celulozici, pululanul și pululanul oxidat, precum și compușii chimici și biologici au fost testați pentru activitatea lor antifungică folosind metodologia descrisă.

Evaluarea capacității de omorâre a fungilor

Testul evaluării capacității de omorâre a fungilor (*eng.* killing assays), realizat *in vitro*, a dat posibilitate de a evidenția prin măsurare modificările apărute la speciile de levuri într-o anumită perioadă de timp la acțiunea unor substanțe cu potențial efect antifungic [20].

Montarea testului s-a realizat prin obținerea mai întâi a unei suspensii din cultură de funghi de 24-72 h în corespundere cu standardul de turbiditate 1 MacFarland. Suspensia obținută a fost adăugată în cantități egale (100 μ L) în patru eprubete: 1) bulion Müeller-Hinton (martor creștere); 2) bulion Müeller-Hinton suplimentat cu CMI₂₅ compusul biologic; 3) bulion Müeller-Hinton suplimentat cu CMI₂₅ compus chimic; 3) bulion Müeller-Hinton suplimentat cu CMI₂₅ compus biologic suplimentat cu CMI₂₅ compus chimic.

Eprubetele au fost termostate la temperatura de 35°C timp de 48 de ore. La intervale de timp stabilite (0, 4, 8, 12, 16, 20 și 24 ore), s-au repicat câte 100 μ L din fiecare eprubetă pe mediul de cultură. Ulterior, plăcile au fost termostate la temperatura de 37°C timp de 48 de ore, după care s-a stabilit, prin numărare, UFC/placă, apoi UFC/mL (numărul de colonii dezvoltate pe mediu de cultură multiplicat cu factorul de diluție). Experimentele s-au realizat în trei repetiții, iar datele au fost prelucrate.

Evaluarea sinergismului cu ajutorul metodei „tabla de șah”

Evaluarea sinergismului antifungic al preparatelor combinate (compus chimic + compus biologic) a fost realizat cu ajutorul metodei tablei de șah, după care s-a calculat indicele FIC (*eng.* Fractional Inhibitory Concentration) [235]. Această metodă a permis evidențierea efectului antifungic al compușilor testați în combinație. Evaluarea interacțiunii compușilor s-a efectuat după valoarea indicelui FIC: 1) efect sinergic – acțiunea compușilor testați în combinație scade CMI la unul sau la ambii compuși comparativ cu CMI a compușilor testați separat; 2) efect aditiv – acțiunea compușilor testați în combinație este egală cu suma efectelor compușilor testați separat; 3) efect indiferent – acțiunea compușilor testați în combinație este echivalentă cu efectul oricărui compus testat separat; 4) efect antagonist – acțiunea compușilor în combinație este mai redusă comparativ cu suma efectelor compușilor testați separat.

Tehnica efectuării. Soluțiile stoc și diluțiile duble ale fiecărui compus au fost preparate prealabil în conformitate cu standardul EUCAST. Experimentele s-au realizat în plăci cu godeuri. Astfel, în fiecare godeu s-au introdus câte 50 μ L de mediu lichid 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). Tulpina de funghi testată a fost utilizată pentru a prepara o suspensie, în

conformitate cu standardul de turbiditate 1 McFarland, ulterior în fiecare godeu al microplăcii cu 96 de godeuri, cu excepția primei coloane, s-au introdus câte 100 μL de suspensie fungică, apoi plăcile au fost expuse în termostat la temperatura de 35°C timp de 24-48 ore [84]. Sinergismul a fost evaluat în baza concentrației inhibitoare a fracțiunilor, calculată în conformitate cu CMI a compușilor combinați și CMI a fiecărui compus în parte, obținute în paralel în același test, conform formulei 2:

$$\Sigma FIC = FIC (A) + FIC (B) \quad \text{Formula (2)}$$

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.

- $\Sigma FIC < 0,5$ – efect sinergic;
- $0,5 < \Sigma FIC \leq 1$ – efect aditiv;
- $1 < \Sigma FIC \leq 4$ – efect indiferent;
- $\Sigma FIC > 4,0$ – efect antagonist.

Evidențierea factorilor de patogenitate de natură enzimatică la tulpini clinice de levuri

Determinarea exprimării activității hemolitice s-a efectuat conform metodei descrise de Manns și colab., cu unele modificări [210].

Principiul testului s-a bazat pe suplimentarea mediului SDA după sterilizare, când a atins temperatura de 45°C, cu 5% sânge de berbec defibrinat.

Inițial a fost obținută cultura pură prin epuizarea culturii de fungi levuriformi pe suprafața mediului SDA, care conține cloramfenicol și glucoză 3%. pH-ul final a fost ajustat la $5,6 \pm 0,2$. Plăcile au fost incubate la 37°C timp de 48 de ore într-o atmosferă de 5% CO₂. Din cultura obținută s-a preparat suspensia de 10⁸ UFC/mL în soluția salină tamponată cu fosfat (0,1 M, pH 7,2), determinată turbiditatea cu densimetrul electronic. 10 μl de suspensie microbială de 16-18 ore (10⁸ celule/ml) a fost epuizată pe suprafața mediului, iar plăcile incubate la 37°C timp de 24 de ore. Prezența zonei distincte translucide în jurul coloniei indică o activitate hemolitică pozitivă (Hz). Experimentul a fost efectuat în trei repetiții pentru fiecare izolat și calculat Hz conform metodelor acceptate, unde, Hz corespunde raportului dintre diametrul coloniei în mm la diametrul coloniei plus haloul format în urma activității enzimactice. Conform sistemului dat, Hz = 1,00 atestă

lipsă de activitate enzimatică. Cu cât valoarea Hz este mai mică, cu atât activitatea enzimatică a tulpinii este mai înaltă. Rezultatele obținute au fost convertite în scoruri (Tabelul 2.2.).

Tabelul 2.2. Activitatea enzimatică în funcție de valoarea Hz și scorul atribuit [46]

Hz	Activitatea enzimatică	Scorul
1,00	lipsă	1
$> 0,63 < 0,99$	moderată	2
$\leq 0,63$	Înaltă	3

Determinarea exprimării activității fosfolipazei extracelulare [46].

Principiul tehnicii s-a bazat pe epuizarea pe suprafața mediului geloză salină cu gălbenuș de ou a 10 μ l de suspensie de cultură de funghi de 16-18 ore (10⁸UFC/ml), resuspendată preventiv în soluția salină tamponată cu fosfat. Plăcile au fost incubate la 37°C timp de 24 de ore. După recomandarea autorilor acestui procedeu, adăugarea gălbenușului de ou în mediu s-a efectuat după sterilizare, când mediul a atins temperatura de 50°C. Plăcile au fost incubate la 37°C timp de 48 de ore. Zona de precipitare din jurul coloniei corespunde producerii de fosfolipază (Fz) [46]. Fz corespunde raportului dintre diametrul coloniei în mm la diametrul coloniei plus haloul format în urma activității enzimaticice. Conform sistemului dat, Fz = 1,00 atestă lipsa activității enzimaticice. Cu cât valoarea Fz este mai mică, cu atât activitatea enzimatică a tulpinii este mai înaltă. Rezultatele experimentelor au fost convertite în scoruri (Tabelul 2.3.).

Tabelul 2.3. Activitatea enzimatică în funcție de valoarea Fz și scorul atribuit [46]

Fz	Activitatea enzimatică	Scorul
1,00	lipsă	1
$> 0,63 < 0,99$	moderată	2
$\leq 0,63$	Înaltă	3

Determinarea exprimării proteazei [46].

Principiul metodei s-a bazat pe utilizarea plăcilor de agar care conțin albumină serică bovină, pH-ul ajustat la 4,0, incubate la 37°C timp de 7 zile. Activitatea proteazelor a fost determinată și calculată conform procedurii. Cercetările au fost efectuate în trei repetiții pentru fiecare izolat și calculată conform metodelor acceptate. Valorile medii Pz au fost grupate în trei clase, conform Tabelului 2.4. Pz corespunde raportului dintre diametrul coloniei în mm la diametrul coloniei plus diametrul haloului de precipitare format în urma activității enzimaticice. Conform sistemului dat, Pz = 1,00 atestă lipsa activității enzimaticice. Cu cât valoarea Pz este mai mică, cu atât activitatea enzimatică a tulpinii este mai înaltă. Rezultatele experimentelor au fost convertite în scoruri (Tabelul 2.4.).

Tabelul 2.4. Activitatea enzimatică în funcție de valoarea Pz și scorul atribuit [210]

Pz	Activitatea enzimatică	Scorul
1,00	lipsă (negativă)	1
$> 0,63 < 0,99$	moderată	2
$\leq 0,63$	întă	3

Evidențierea esterazei. Gradul de activitate al esterazei a fost determinat folosind mediul de cultură cu adaos de Tween 80. Mediul de bază conține 10 g de peptonă, 5 g de clorură de sodiu, 0,1 g de clorură de calciu, 15 g de agar și 1000 ml de apă distilată. După ce mediul se sterilizează prin autoclavare, se adaugă 5 ml de Tween 80 steril. Apoi, 10 microlitri de suspensie de levuri din genul *Candida* (10^6 UFC/ml) sunt inoculate sub formă de spot și incubate la 30°C timp de 10 zile. Pentru interpretarea rezultatelor, se măsoară diametrul coloniei (a) și diametrul coloniei plus zona de precipitare (b). Activitatea esterazelor a fost exprimată ca valoare Ez (a/b) [210].

Evidențierea DNA-azei. DNA-aza fost determinată la tulpinile de candidae utilizând mediul de cultură ce conține ADN și albastru de toluidină. La scindarea AND-ului din mediu de către enzima DNA-aza, produsele de degradare rezultate se colorează în roz-roșu. Tulpinile de levuri supuse testării au fost inoculate sub formă de spot și incubate la 30°C timp de 24 ore. Pentru interpretarea rezultatelor se măsoară diametrul coloniei (a) și diametrul coloniei plus zona de precipitare (b). Activitatea DNA-azelor a fost exprimată ca valoare Ez (a/b) [46].

Testul producerii de biofilm

Metoda cantitativă – metoda microtitrării a fost utilizată pentru evidențierea și evaluarea procesului de producere a biofilmului de către tulpinile de fungi izolate din biosubstraturi [275]. Tulpina de fungi a fost cultivată în bulion tripticază de soia și ulterior ajustată la etalonul de turbiditate 1 McFarland. În fiecare trei godeuri, din placa cu 96 de godeuri, s-au adăugat câte 200 μL de suspensie de fungi. În godeurile pentru martor negativ s-a adăugat doar 200 μL de bulion tripticază din soia. Plăcile însămânțate au fost incubate la temperatura de 35°C timp de 48 de ore.

Tabelul 2.5. Evidențierea capacității de aderare a fungilor la suprafață și de formare a biofilmului

Nr. d/o	Calcularea valorii limită	Media rezultatelor valorilor DO	Abilitatea de formare a biofilmului
1.	$DO > 4DOc$	$DO > 0,220$	<i>Biofilm puternic</i>
2.	$2DOc < DO \leq 4DOc$	$0,112 < DO \leq 0,220$	<i>Biofilm moderat</i>
3.	$DOc < DO \leq 2DOc$	$0,056 < DO \leq 0,112$	<i>Biofilm slab</i>
4.	$DO \leq DOc$	$DO \leq 0,056$	<i>Lipsa biofilmului</i>

Ulterior, conținutul godeurilor a fost eliminat și fiecare godeu a fost clătit de câteva ori cu 250 μL de soluție fiziologică sterilă, după care a fost lăsată să se usuce la temperatura camerei. Apoi, placa a fost colorată timp de 30 min cu 170 μL soluție de cristal violet de 1%.

A urmat etapa de spălare a plăcilor sub jet de apă, uscarea la temperatura camerei și eluarea colorantului prin adăugarea a 150 μL acid acetic glacial 33%. Eluentul a fost transferat pe alte plăci cu 96 de godeuri, iar densitatea optică (DO) a fost citită cu un cititor ELISA la o lungime de undă de 590 nm. Proprietatea de formarea a biofilmului la tulpinile de fungi testate a fost evaluată și categorisită în baza adsorbției de către celule a colorantului cristal violet (Tabelul 2.5.). În calitate de tulpini-martori ale producerii de biofilm au fost utilizate tulpinile de referință *Candida albicans* ATCC 14053.

Evaluarea activității antilizoim a fungilor

Tulpinile de levuri au fost însămânțate pe geloză în pantă timp de 18-24 de ore la temperatura de 37°C, a urmat inocularea în bulion Sabouraud și termostatarea timp de 6 ore la temperatura de 37°C. Densitatea optică a culturii în bulionul Sabouraud a fost ajustată până la $1 \times 10^8 \text{UFC/ml}$.

Concomitent a fost pregătită suspensia de lizoim în bulion cu concentrația de 12,5 $\mu\text{g/mL}$, concentrațiile mai mari de lizoim vor inhiba dezvoltarea, iar concentrațiile mai mici nu permit testarea acestui factor. În placa de microtitrare cu format de microplacă cu 96 de godeuri s-au introdus câte 100 μL de bulion cu lizoim în concentrație de 12,5 $\mu\text{g/mL}$ și 25 μL de suspensie de fungi. Ca martori, în două godeuri s-au adăugat câte 100 μL de bulion Sabouraud și 25 μL de suspensie de fungi. Placa de microtitrare a fost expusă în termostat timp de 4 ore. După expirarea timpului de incubare s-a măsurat densitatea optică. Rezultatele au fost citite cu ajutorul cititorului ELISA, iar densitatea optică (DO) s-a măsurat la lungimea de undă de 600 nm [47, 214, 260].

Activitatea antilizoim (AAL) a tulpinilor cercetate a fost evaluată după valoarea coeficientului acțiunii antilizoim (K):

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

Evaluarea activității anticomplementare a fungilor

Pentru determinarea activității anticomplementare a fungilor inițial au fost pregătite toate componentele pentru montarea testării [333]. Ulterior, pe suprafața gelozei de 1,5%, cu pipeta Pasteur, s-a introdus suspensia de fungi (densitatea optică a suspensiei de fungi în conformitate cu standardul de turbiditate 1,0 Mac Farland). Plăcile inoculate au fost expuse în termostat la

temperatura de 37°C timp de 24-48 ore, apoi inactivate timp de 10 min în vapori de cloroform, după care mediul de cultură s-a 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 15 UH/50ml, 5-15 UA/50ml, 5 UH/50ml). A urmat expunerea acestora în termostat la temperatura de 37°C timp de 1 oră pentru a realiza acțiunea anticomplementară a fungilor și a produselor vitale. După incubare, plăcile au fost acoperite cu al treilea strat de geloză de 0,7% care conținea 0,1 ml de suspensie de fungi din cultura indicator (conform standardului 0,5 Mac Farland) cu o sensibilitate crescută la acțiunea fungicidă a sistemului complement. Plăcile au fost incubate la temperatura de 37°C timp de 18-24 de ore, pentru inactivarea complementului de către fungi. Activitatea anticomplementară a fost stabilită în baza prezenței zonelor de creștere a culturii indicator în jurul culturilor de fungi testate, unde s-a produs inactivarea complementului.

Studierea acțiunii compușilor chimici și biologici asupra exprimării factorilor de patogenitate ai fungilor

Pentru a studia efectul compușilor chimici și biologici asupra exprimării factorilor de patogenitate, culturile de fungi levuriformi de 24 de ore au fost coincubate 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 35°C timp de 24 ore. În scopul excluderii probabilității acțiunii compușilor testați asupra componentelor tehnicii utilizate, culturile au fost supuse centrifugării timp de 15 min la 3000 rotații pe minut, după care supernatantul a fost separat de celule fungice. Martori au servit aceleași tulpini de fungi levuriformi, cultivate în bulion Sabouraud și incubate în aceleași condiții. Exprimarea enzimelor de patogenitate a fost determinată conform metodelor descrise mai sus [333].

Determinarea toxicității acute cu testul de imobilizare a crustaceului *Daphnia magna*

Pentru determinarea toxicității compușilor chimici s-a efectuat testul de imobilizare a crustaceului *Daphnia magna* conform metodologiei europene standardizate (OECD) [241].

Principiul metodei de testare. Femelele tinere de dafnii (animale-părinți), în vârstă de mai puțin de 24 ore la începutul testului, sunt expuse la compusul testat într-o serie de concentrații diferite, pe o perioadă de 24 de ore. Durata testului a fost de 48 de ore. La sfârșitul testului, s-a evaluat cum diferite concentrații ale compusului testat, în condiții identice, exercită diferite efecte asupra capacității de înot a dafniilor. Pentru fiecare concentrație testată s-au folosit câteva dafnii, repartizate în trei repetiții, iar mobilitatea lor s-a înregistrat timp de 48 de ore. Pe baza datelor obținute s-a determinat valoarea CL₅₀. La citirea și interpretarea rezultatelor au fost considerate imobile dafniile care nu erau capabile să înoate 15 s după o agitare ușoară a vasului. Concentrația

letală medie (CL₅₀) a reprezentat concentrația compusului testat care induce imobilizarea a 50% din dafnii.

Determinarea citokinelor prin analiza imunoenzimatică. Această metodă, caracterizată printr-o sensibilitate și specificitate înaltă, a fost utilizată pentru evaluarea efectelor imunomodulatorii induse de acțiunea compușilor testați (chimici, biologici și în combinație). Principiul metodei constă în utilizarea anticorpilor anticitokinici adsorbiți pe suprafața godeurilor plăcii ELISA, care se leagă cu antigenul, ce reprezintă citokinele din proba biologică, și formează complexul Ag-Ac. Testul a fost realizat în conformitate cu metodologia indicată în instrucțiunea producătorului Vector Best (Federația Rusă) pentru IL1B, IL6, IL10 și TNFa. Proba a fost distribuită în godeurile microplăcii, la fel și martorii (pozitiv și negativ), după care au urmat: incubarea, spălarea pentru îndepărtarea elementelor nefixate, adăugarea conjugatului și incubarea repetată, apoi spălarea repetată, pentru îndepărtarea excesului de conjugat, adăugarea substratului cromogen și incubarea, și, în final, adăugarea soluției pentru stoparea reacției. Citirea și interpretare rezultatelor s-a efectuat în primele 15 min după stoparea reacției, la lungimea de undă indicată de producător (540nm) [46].

Metode de determinare a indicatorilor biochimici

Determinarea intensității reacțiilor de oxidare cu radicali liberi în biosubstratul biologic s-a realizat prin dozarea unor indici ai proceselor de peroxidare, precum: activitatea dialdehidei malonice (DAM), unul din produsele finale ce determină creșterea permeabilității membranelor cu dereglarea funcționalității celulei; activitatea lactat dehidrogenazei (LD); produsele proteice de oxidare avansată (PPOA); *activitatea superoxid dismutazei (SOD)*; *activitatea glutatation peroxidazei (GPO)*; *activitatea glutatation reductazei (GR)*, *activitatea glutatation S transferazei (GST)* conform metodologiilor standardizate redate mai jos. Metodologia și procedeele menționate anterior privind evaluarea nivelului activității enzimelor și a conținutului de substanțe au fost executate după tehnici standardizate, armonizate și adaptate pentru aplicarea în cadrul Laboratorului de biochimie al USMF „Nicolae Testemițanu” pentru spectrofluorimetrul cu microplăci Synergy H1 (Hydrid Reader) (BioTek Instruments, SUA) și spectrofotometrul Power Wave HT (BioTek Instruments, SUA) [334].

Determinarea nivelului dialdehidei malonice s-a efectuat cu ajutorul procedeeului descris de către cercetătorii studiului, cu unele modificări [130, 131, 288].

Principiul testului de determinare a nivelului DAM se bazează pe determinarea spectrofotometrică a complexului trimetic format în urma interacțiunii DAM cu acidul tiobarbituric. Conținutul de DAM s-a calculat în baza coeficientului molar de absorbție $\Sigma=1,56 \times 10^5 \text{ mol/cm}^{-1}$ și s-a exprimat în $\mu\text{mol/L}$ supernatant sau $\mu\text{mol/s.g}$ Hb în lizatul eritocitar.

Acest compus este un marker recunoscut al stresului oxidativ ce indică direct nivelul de degradare al lipidelor în celule.

Studierea produselor proteice de oxidare avansată. Printre indicii biochimici care au fost analizați în contextul modificărilor oxidative ale proteinelor induse de stresul oxidativ sunt produsele proteice de oxidare avansată [131].

Principiul testului se bazează pe apreciere/măsurarea valorii absorbantei probei de cercetat la 340 nm după prelucrarea acesteia cu o soluție de acid acetic. Calculul se efectuează după curba de calibrare construită în baza diluțiilor succesive ale soluției standard de cloramină-T, cuprinse între 0-100 $\mu\text{mol/l}$, și se exprimă în $\mu\text{mol/l}$ echivalente de cloramină-T.

Determinarea activității superoxid dismutazei s-a efectuat conform procedurii descris de Capeillere-Blandin C. și coaut., modificat de Gudumac V. și coaut. [279, 331].

Principiul testului se bazează pe inhibiția reducerii sării de tetrazoliu nitroblue (NBT) în sistemul ce conține fenazinmetosulfat și NADH sub acțiunea SOD. Gradul de inhibiție a acestui proces depinde de activitatea enzimei care se exprimă în unități convenționale. În calitate de unitate a activității SOD se ia cantitatea de enzimă necesară pentru inhibiția cu 50% a reacției de reducere a NBT. Activitatea enzimei se raportează în unități convenționale la 1L supernatant sau în unități convenționale/g Hb în lizatul eritrocitar.

Determinarea activității glutatation peroxidazei s-a efectuat prin metoda în care glutadion peroxidaza joacă rol de catalizator al reacției de oxidare a glutatationului de către hidroperoxidul 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 [278, 330].

Principiul testului se bazează pe capacitatea enzimei de a oxida glutatationul intracelular redus (GSH) în prezența peroxidului de hidrogen. Paralel are loc oxidarea coenzimei NADPH în NADP, fapt ce duce la micșorarea absorbantei mediului de reacție la 340 nm, proporțională cu activitatea enzimei. Calcularea activității enzimei se efectuează reieșind din coeficientul molar de absorbție al NADP-ului (la 37°C și 340 nm $\epsilon = 6,22 \mu\text{mol} \cdot \text{cm}^{-1}$) și se exprimă în $\mu\text{mol}/(\text{s} \cdot \text{L})$ supernatant sau $\mu\text{mol}/\text{s} \cdot \text{g}$ Hb în lizatul eritrocitar.

Determinarea activității catalazei a fost realizată conform metodei descrise de autorii studiului, cu unele modificări efectuate de Gudumac V. și coaut. [24].

Principiul testului se bazează pe proprietatea enzimei de a scinda peroxidul de hidrogen cu formarea de H_2O și de O_2 . Peroxidul de hidrogen formează cu molibdatul de amoniu un compus complex de culoare galbenă. În procesul reacției se micșorează cantitatea de peroxid de hidrogen, fapt ce determină decolorarea mediului de reacție. Gradul de decolorare este direct proporțional

cu activitatea enzimei în proba de cercetat. Activitatea catalazei s-a exprimat în $\mu\text{mol/s}$ la 1 L supernatant sau $\mu\text{mol/s.g Hb}$ în lizatul eritrocitar.

Determinarea activității antioxidante totale s-a efectuat conform procedurii elaborat de un grup de autori , cu unele modificări realizate de Gudumac V. și coaut. [131,332].

Principiul testului se bazează pe degradarea radicalului 2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolină 6 sulfonat) (ABTS) la interacțiunea acestuia cu compușii testați, atât hidrofilii, cât și lipofili, cu proprietăți antioxidante, deoarece acest radical este solubil în apă și în mai mulți solvenți organici. Degradarea radicalului ABTS este monitorizată prin măsurarea descreșterii absorbantei la 734 nm și se exprimă în $\mu\text{mol/L}$ supernatant sau $\mu\text{mol/s.g Hb}$ în lizatul eritrocitar .

Determinarea activității glutatation reductazei s-a efectuat conform metodei descrise de autorii studiului și modificată de Gudumac V. și coaut. [131, 330].

Principiul testului rezidă în capacitatea enzimei de a reduce glutatationul oxidat în glutatation redus. Oxidarea coenzimei nicotinamid dinucleotid fosfat redus (NADPH) în nicotinamid dinucleotid fosfat (NADP) duce la micșorarea absorbantei mediului de reacție la 340 nm și această micșorare este proporțională cu activitatea enzimei. Activitatea GR a fost exprimată în $\mu\text{mol/s/L}$ supernatant.

Determinarea activității glutatation S transferazei s-a efectuat conform metodei propuse de un grup de cercetători și modificată de Tagadiuc O. și coaut. [144, 280].

Principiul testului s-a bazat pe capacitatea enzimei GST de a cataliza reacția în care este utilizat GSH și un substrat electrophil, fapt ce duce la creșterea absorbantei mediului de reacție la 346 nm, proporțională cu activitatea enzimei. Activitatea GST a fost exprimată în $\mu\text{mol/s/L}$ supernatant.

2.4. Procesarea și analiza matematico-statistică a materialului

Volumul cercetării și interpretarea rezultatelor studiului au fost bazate pe metodele statistice actuale, asigurând gradul de reprezentativitate a datelor acceptate pentru studii în medicină [269].

Rezultatele experimentale obținute au fost supuse analizei prin aplicarea următoarelor statistici descriptive: media, mediana, abaterea standard, abaterea intercuartilă, valoarea minimă și cea maximă, vizualizate prin graficul jitterplot în combinația cu boxplot. Testul Friedman a fost folosit în capitolul de evaluare comparativă dintre loturile studiate și lotul martor, deoarece unele date la compartimentul dat nu au avut distribuție normală (testate prin testul Shapiro Wilk), numărul unităților statistice fiind relativ mic. Având în vedere designul cercetării, analiza post-hoc impune o libertate aparte în sensul identificării efectelor studiate. În acest scop, pentru a compara

datele din loturile studiate a fost utilizată corecția Benjamini Hochberg. Baza de date și protocolul analizei statistice pot fi consultate în repozitoriul GitHub (https://github.com/arnautoleg/Burduniuc_Olga).

2.5. Concluzii la capitolul 2

1. Pentru atingerea scopului și obiectivelor propuse a fost stabilit designul cercetării, proiectate șapte etape și subetape consecutive, în conformitate cu cerințele metodologiei aplicate în cercetările medicale.
2. În studiile experimentale au fost utilizate tehnici și protocoale de cercetare standardizate la nivel național și internațional, testate în practică în studii similare, care corespund principiilor contemporane de cercetare.
3. Metodele adecvate principiilor moderne de cercetare (microbiologice, biochimice, imunochimice ș.a.) au permis evaluarea efectului antifungic al compușilor chimici și biologici testați asupra expresiei unor factori de patogenitate ai fungilor levuriformi cu stabilirea acțiunii lor sinergice.
4. În calitate de inhibitori ai agenților fungici patogeni au fost testați compuși chimici reuniți în nouă grupe: 1) compuși coordinativi ai cuprului și ai nichelului cu tiosemicarbazone N(4); 2) compuși coordinativi ai sulfatului de cupru(II) cu metoxifeniltiosemicarbazone 2-benzoilpiridinei; 3) compuși coordinativi ai cuprului cu 4-alil-S-alilizotiosemicarbazona 2-formilpiridinei; 4) compuși coordinativi ai cuprului (II) cu N(4)-ciclohexiltiosemicarbazona aldehidei salicilice; 5) compuși coordinativi ai nitratului de cupru (II) cu 4-alil-tiosemicarbazona aldehidei 3,5-dibromosalicilice; 6) compuși coordinativi ai cuprului și ai cobaltului cu 4-alil-S-alchiltiosemicarbazone aldehidelor 3,5-dibromosalicilice; 7) compuși coordinativi ai unor metale 3d cu 4-aliltiosemicarbazona 2,4-dihidroxiacetofenonei; 8) compuși coordinativi ai unor metale 3d cu 4-aliltiosemicarbazona acidului piruvic; 9) compuși coordinativi ai cuprului(II) cu aminoguanazona pirazolonei.
5. În scopul dezvoltării de noi sisteme cu eliberare controlată și țintită de preparate antifungice s-au obținut nanoparticule de Ag cu dimensiuni reduse (<100 nm), utilizând derivați naturali pe bază de polizaharide (ex., pululan, celuloză) printr-o metodă eficientă, relativ ușoară (coprecipitare) cu posibilitate de internalizare celulară și studierea ulterioară a potențialei acțiuni antifungice.
6. Evidențierea activității antifungice a compușilor testați a fost realizată pe șapte tulpini de referință din colecțiile internaționale și pe 50 de izolate clinice prin stabilirea parametrilor calitativi și cantitativi.
7. Pentru elucidarea mecanismelor de acțiune antifungică și aprecierea adecvată a proprietăților farmacologice ale compușilor testați au fost determinați un șir de indici biochimici și imunologici, precum markerii stresului oxidativ, sistemului antioxidant și patternului inflamator sub influența compușilor biologic activi.

8. Rezultatele cercetării au fost supuse analizei statistice detaliate cu utilizarea metodelor matematice, cu posibilitatea de apreciere a veridicității datelor și de formulare a concluziilor și a recomandărilor practice.

3. DISTRIBUȚIA LEVURILOR DIN GENUL CANDIDA ÎN FUNCȚIE DE BIOSUBSTRATURI, PONDEREA FACTORILOR DE PATOGENITATE ȘI REZISTENȚA LA ANTIFUNGICE

3.1. Prevalența și spectrul speciilor de *Candida* implicate în micozele umane

Infecțiile cauzate de levuri din genul *Candida* sunt unele dintre cele mai răspândite infecții fungice. Acest compartiment include analiza datelor ce țin de diversitatea speciilor de micete levuriforme depistate în prelevatele clinice colectate din unele instituții medicale din Republica Moldova în perioada anilor 2018-2022. Datele au fost recepționate pe suport de hârtie în baza fișei de însoțire a tulpinii izolate de către laboratoarele microbiologice din cadrul sistemului de supraveghere RAM și în conformitate cu criteriile stabilite de protocoalele internaționale. Verificarea datelor, inclusiv a dublărilor, validarea, în special în baza corectitudinii și completitudinii setului de variabile, a fost următoarea etapă. În cazul depistării dublărilor, datele au fost eliminate în baza metodologiei existente. Ca rezultat al procedurilor descrise mai sus, în studiu au fost selectate 4478 de izolate clinice. Repartizarea agenților fungici levuriformi identificați după apartenența de specie poate fi urmărită pe Figura 3.1.

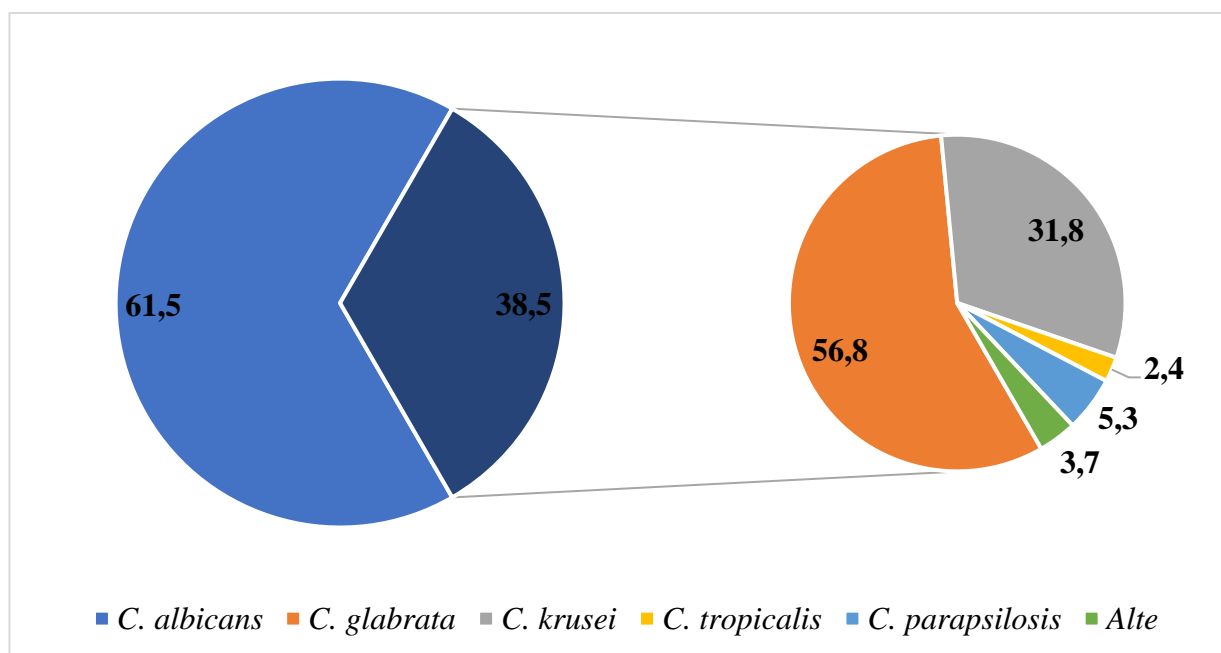


Fig. 3.1. Structura principalelor specii de *Candida* din izolatele clinice (%)

Din numărul total de izolate clinice, în 2754 s-a dovedit a fi prezentă specia *Candida albicans*, ceea ce reprezintă o pondere de 61,5% (Î 95% 59,4-63,7) care confirmă că această specie este cea mai frecvent implicată în patologia infecțioasă fungică. Reprezentanții *Candida non-albicans* au fost identificați în 38,5% (Î 95% 36,4-40,7) din izolatele clinice. Dintre speciile de *Candida non-albicans*, în 56,8% (Î 95% 54,7-59,0) (n=946) din cazuri au fost izolate tulpini de

Candida glabrata. Cu toate că frecvența izolării acestei specii din biosubstraturile clinice este destul de înaltă, în comparație cu cea a speciei *Candida albicans* este de trei ori mai mică. Pe locul trei se situează specia *Candida krusei*, care a fost izolată în 31,8% (ÎÎ 95% 29,7-34,0) (n=418) din izolatele clinice. Speciile de *Candida parapsilosis* și *Candida tropicalis* pot fi clasate pe locul patru, cu 5,3% (ÎÎ 95% 3,2-7,5) (n=58) și 2,4% (ÎÎ 95% 0,3-4,6) (n=24) din cazuri, respectiv. Alte 12 specii de *Candida* au fost identificate în 3,7% (ÎÎ 95% 1,6-5,9) din cazuri, multe dintre ele fiind izolate într-o singură probă. Rezultatele obținute sunt în consens cu cele publicate la nivel mondial cu referire la agenții cauzali ai diferitor tipuri de candidoze.

Diversitatea biosubstraturilor și numărul de probe sunt prezentate pe Figura 3.2. Cele mai multe probe biologice au fost prelevate din căile respiratorii, în 64,1% (ÎÎ 95% 62,0-66,3) din care au fost izolate și identificate 11 specii de *Candida*. Cea mai des întâlnită specie în probele din căile respiratorii a fost *C. albicans*, în 64,3% (ÎÎ 95% 62,3-66,5) din cazuri, urmată de *Candida glabrata*, prezentă în 24,5% (ÎÎ 95% 22,4-26,7) din cazuri. În 10,2% (ÎÎ 95% 8,1-12,4) din cazuri a fost izolată specia *Candida krusei*, iar în 0,4% (ÎÎ 95% 1,8-2,6) – *Candida tropicalis*. Celelalte șapte specii (*Candida famata*, *Candida kefyr*, *Candida dublinensis*, *Candida lambica*, *Candida norvegensis*, *Candida parapsilosis*, *Candida lipolytica*) au fost izolate din unul până la patru prelevate biologice recoltate din căile respiratorii.

Speciile din genul *Candida* au prevalat și în 16,7% (ÎÎ 95% 14,6-18,9) din probele de secreții vaginale. Din cele cinci specii de *Candida* identificate, întâietatea a revenit speciei *Candida albicans* cu 90,7% (ÎÎ 95% 88,6-92,9) din cazuri, urmată în ordinea descreșterii ponderii de *Candida krusei* și de *Candida glabrata* cu 4,2% (ÎÎ 95% 2,1-6,4) și cu 4,8% (ÎÎ 95% 2,7-7,0), respectiv. Altor două specii le-au revenit, după cum urmează: *Candida ciferii* – 0,7% (ÎÎ 95% 1,5-2,9) (n=5) și *Candida kefyr* – 0,3% (ÎÎ 95% 1,9-2,5).

Al treilea biosubstrat, după prevalența reprezentanților genului *Candida*, a fost urina – 9,2% (ÎÎ 95% 7,1-11,4). În probele de urină au fost izolate și identificate șapte specii de *Candida*: *Candida albicans* – 43,2% (ÎÎ 95% 41,1-45,4) (n=168); *Candida glabrata* – 29,8% (ÎÎ 95% 27,7-32,0) (n=116); *Candida krusei* – 22,1% (ÎÎ 95% 20,0-24,3) (n=86). Alte patru specii de *Candida* au fost identificate în 4,9% (ÎÎ 95% 2,8-7,1) (n=19) din probele de urină: *Candida tropicalis* – în 3,1% (ÎÎ 95% 1,0-5,3) (n=12); *Candida parapsilosis* – în 0,7% (ÎÎ 95% 1,5-2,9) (n=3); *Candida famata* – în 0,7% (ÎÎ 95% 1,5-2,9) (n=3) și *Candida lipolytica* – în 0,3% (ÎÎ 95% 1,9-2,5) (n=1).

Specii din genul *Candida* au fost identificate și în 4,0% (ÎÎ 95% 1,9-6,2) din probele de mase fecale, din care au fost izolate trei specii: *Candida albicans* – 47,7% (ÎÎ 95% 45,6-49,9), *Candida glabrata* – 44,8% (ÎÎ 95% 42,7-47,0) și *Candida krusei* – 7,6% (ÎÎ 95% 5,5-9,8) cazuri.

În 0,5% (Î 95% 1,7-2,7) din probele de lichidul peritoneal au fost izolate aceleași specii de *Candida*: *Candida albicans* – 59,1% (Î 95% 57,0-61,3), *Candida glabrata* – 22,7% (Î 95% 20,6-24,9) și *Candida krusei* – 18,2% (Î 95% 16,1-20,4).

În 17 probe de sânge au fost identificate cinci specii de levuri din genul *Candida*: 52,9% (Î 95% 50,8-55,1) (n=9) – *Candida albicans*, 23,5% (Î 95% 21,4-25,7) (n=4) – *Candida glabrata*, 11,8% (Î 95% 9,7-14,0) (n=2) – *Candida parapsilosis* și câte 5,9% (Î 95% 3,8-8,1) (n=1) – *Candida tropicalis* și *Candida krusei* fiecare.

În 89 de probe prelevate din plăgi, au prevalat două specii de candidide: în 57,3% (Î 95% 55,2-59,5) (n=51) – *Candida albicans*, iar în 20,2% (Î 95% 18,1-22,4) – *Candida glabrata*.

Alte șapte specii de candidide au fost identificate în 20 de probe prelevate din plăgi: *Candida parapsilosis* – 7,9% (Î 95% 5,8-10,1), *Candida krusei* – 6,7% (Î 95% 4,6-8,9), *Candida famata* – 3,4% (Î 95% 1,3-5,6), *Candida lusitaniae*, *Candida guilhermondii* și *Geotrichum candidum* – 1,1% (Î 95% 1,1-3,3) fiecare.

În 38,2% (Î 95% 36,1-40,4) din 123 de alte tipuri de probe biologice a fost izolată *Candida albicans*, în 36,6% (Î 95% 34,5-38,8) – *Candida parapsilosis*, în 9,5% (Î 95% 17,4-21,7) – *Candida glabrata*, iar alte cinci specii – *Candida lipolytica*, *Candida lusitaniae*, *Candida rugosa*, *Candida brocorensis* și *Candida metapsilosis* – au fost izolate în 1-2 probe.

Evaluarea distribuției pe grupe a speciilor identificate în funcție de biosubstratul analizat este reprezentată pe Figura 3.2. Astfel, 25,9% (Î 95% 23,8-28,1) din biosubstraturile analizate din care au fost izolate tulpini de *Candida* au constituit secrețiile vaginale, 21,9% (Î 95% 19,8-24,1) – sputa/aspirat bronșic, 14,1% (Î 95% 12,0-16,3) – urina, 7,0% (Î 95% 4,9-9,2) – masele fecale, 3,3% (Î 95% 1,2-5,5) – secrețiile otice, 3,2% (Î 95% 1,1-5,4) – exsudat din plăgi. Cele mai puține specimene biologice din care au fost izolate levuri din genul *Candida* au fost prelevatele din catetere – 0,9% (Î 95% 1,3-3,1) și sângele – 0,6% (Î 95% 1,6-2,8). 24,7% (Î 95% 22,6-26,9) din totalul de probe analizate au fost categorisite ca altele, fiind reprezentate de lichid amniotic, tub endotraheal, bilă, secreții oftalmice ș.a.

Analizând ponderea speciilor de *Candida* în structura biosubstraturilor cercetate s-a observat că *Candida albicans* mai frecvent a fost izolată din secrețiile vaginale – 38,0% (Î 95% 35,9-40,2), urmată de spută/ aspirat bronșic – 22,5% (Î 95% 20,4-24,7), urină – 10,0% (Î 95% 7,9-12,2). Din masele fecale *Candida albicans* a fost izolată în 6,1% (Î 95% 4,0-8,3) din cazuri, din exsudatul din plăgi – 3,0% (Î 95% 0,9-5,2), din sânge și din caterere – 0,5% (Î 95% 1,7-2,7) și 0,9% (Î 95% 1,3-3,1), respectiv. 17,5% (Î 95% 15,4-19,7) dintre tulpinile de *C. albicans* au fost izolate din grupul biosubstraturilor catalogate ca altele.

Candida glabrata, cel mai frecvent a fost izolată din biosubstraturile catalogate ca altele – 31,3% (ÎÎ 95% 29,2-33,5). Această specie a mai fost identificată și în 24,9% (ÎÎ 95% 22,8-27,1) din n probele de spută și de aspirat bronșic, în 19,2% (ÎÎ 95% 17,1-21,4) din probele de urină, în 12,8% (ÎÎ 95% 10,7-15,0) din probele fecale, în 5,6% (ÎÎ 95% 3,5-7,8) din probele de secreții vaginale și în 3,0% (ÎÎ 95% 0,9-5,2) din probele de exsudat din plăgi și de secreții otice. *Candida glabrata* a fost izolată mai rar din probele de sânge – 0,7% (ÎÎ 95% 1,5-2,9) și din vârful cateterelor – 1,2% (ÎÎ 95% 1,0-3,4).

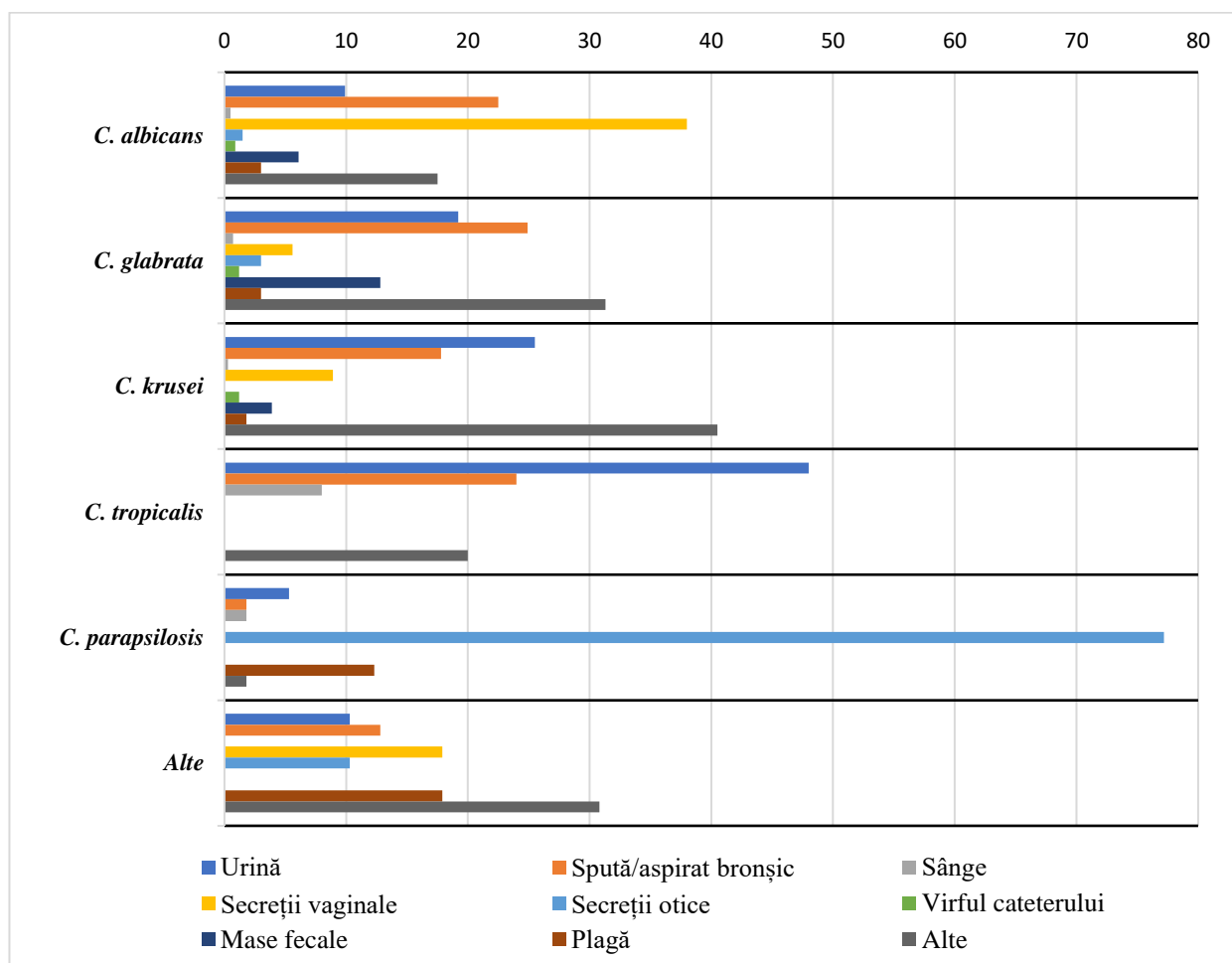


Fig. 3.2. Distribuția speciilor de *Candida* în funcție de biosubstrat

Specia *Candida krusei* a fost izolată în 40,5% (ÎÎ 95% 38,4-42,7) din biosubstraturile clasificate ca altele, în 25,5% (ÎÎ 95% 23,4-27,7) din probele de urină, în 17,8% (ÎÎ 95% 15,7-20,0) din probele de spută și de aspirat bronșic și în 8,9% (ÎÎ 95% 6,8-11,1) din secrețiile vaginale. În probele din masele fecale, de exsudat din plăgi, din vârful cateterelor și de sânge *C. krusei* a fost prezentă în 3,9% (ÎÎ 95% 1,8-6,1), 1,8% (ÎÎ 95% 0,4-4,0), 1,2% (ÎÎ 95% 1,0-3,4) și 0,3% (ÎÎ 95% 1,9-2,5) din probe, respectiv.

În acest studiu, *Candida tropicalis* cel mai frecvent a fost izolată din probele de urină – 48,0% (ÎÎ 95% 45,9-50,2), mai rar în spută și în aspiratul bronșic – 24,0% (ÎÎ 95% 21,9-26,2), în

sânge -8,0% (Î 95% 5,9-10,2) și în diverse biosubstraturi clasificate ca altele – în 20,0% (Î 95% 17,9-22,2). Nu a fost identificată în exsudatul din plăgi, în secrețiile vaginale și otice, în catetere și în masele fecale.

Specia *Candida parapsilosis* mai frecvent a fost izolată din secrețiile otice – 77,2 % (Î 95% 75,1-79,4), urmând, în ordine descrescătoare a ponderii, exudatele din plăgi – 12,3% (Î 95% 10,2-14,5), probele de urină – 5,3% (Î 95% 3,2-7,5), spută/aspirat bronșic, sânge și specimene clasificate ca altele – câte 1,8% (Î 95% 0,4-4,0) din probe.

Distribuția speciilor de *Candida* în funcție de substraturile biologice este neuniformă. Astfel, unele specii au fost izolate din toate biosubstraturile clinice, ex. *C. albicans* și *C. glabrata*, în timp ce altele au fost depistate numai în anumite biosubstraturi, ex. *C. dublinensis*, *C. norvegensis* și *C. lumbica* care au fost izolate doar din probele prelevatele din tractul respirator.

3.2. Evaluarea sensibilității la preparatele antifungice a levurilor din genul *Candida*

Tulpinile de fungi levuriformi din genul *Candida* au fost testate în vederea determinării sensibilității lor la cele mai utilizate preparate antifungice, precum amfotericină B, fluconazol, itraconazol și 5-fluorocitozină. Rezultatele obținute au fost interpretate în baza a trei criterii: sensibile (S), sensibile la doze înalte (SSD) și rezistente (R). Rezultatele obținute sunt prezentate pe Figura 3.3.

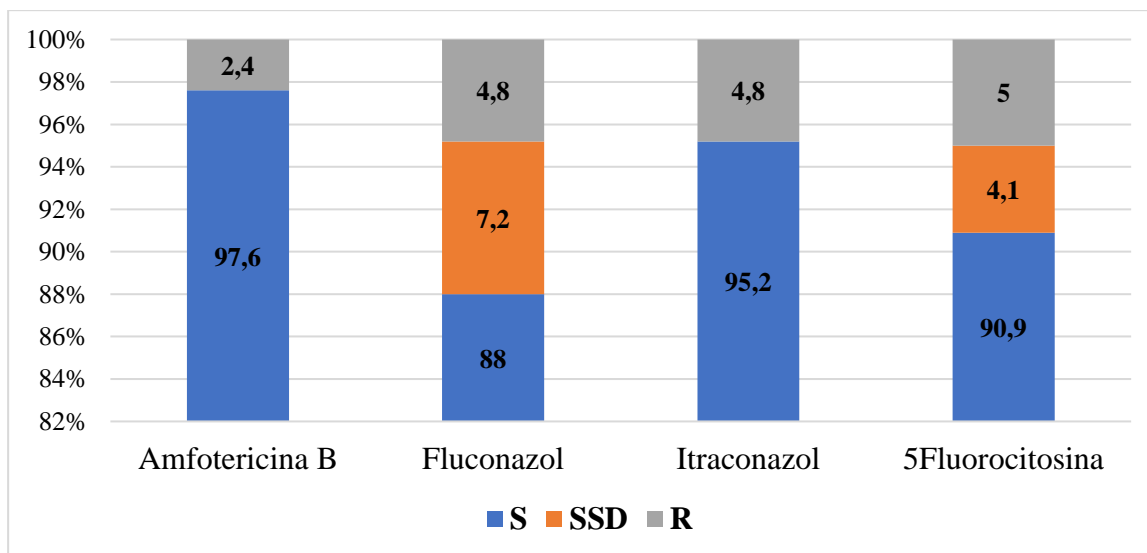


Fig. 3.3. Sensibilitatea la antifungice a izolatelor de *Candida* din biosubstraturile clinice

Dintre agenții antifungici testați, amfotericina B a prezentat cea mai mare activitate antifungică, urmată de itraconazol, 5-fluorocitozină și fluconazol. Ponderea tulpinilor sensibile la acțiunea dozelor terapeutice de amfotericină B, în funcție de specie, a variat între 100 (Î 95% 97,9-102,2) și 96% (Î 95% 93,9-98,2), tulpinile sensibile la itraconazol între 100 (Î 95% 97,9-

102,2) și 76% (ÎÎ 95% 73,9-78,2), la 5-fluorocitozină între 96 (ÎÎ 95% 93,9-98,2) și 82,7% (ÎÎ 95% 80,6-84,9), iar la fluconazol între 100(ÎÎ 95% 97,9-102,2) și 74,9% (ÎÎ 95% 72,8-77,1).

Din totalitatea izolatelor de *Candida* studiate, 97,6% (ÎÎ 95% 95,5-99,8) s-au dovedit a fi sensibile (S) la amfotericina B și 2,4% (ÎÎ 95% 0,3-4,6) rezistente (R). În mod similar, profilul antifungic (S, SSD, R) pentru fluconazol a fost: 88,0% (ÎÎ 95% 85,9-90,2) – S, 7,2% (ÎÎ 95% 5,1-9,4) – SSD și 4,8% (ÎÎ 95% 2,7-7,0) – R. Pentru itraconazol – 95,2% (ÎÎ 95% 93,1-97,4) – S, 4,8% (ÎÎ 95% 2,7-7,0) – R, iar pentru 5-fluorocitozină – 90,9% (ÎÎ 95% 88,8-93,1) – S, 4,1% (ÎÎ 95% 2,0-6,3) – SSD și 5% (ÎÎ 95% 2,9-7,2) – R.

Profilul de sensibilitate al izolatelor de *Candida* la preparatele antifungice testate poate fi urmărită pe Tabelul 3.1.

În acest studiu, 98,0% (ÎÎ 95% 95,9-100,2) din izolatele de *C. albicans* au prezentat sensibilitate la amfotericina B, iar rezistente s-au dovedit a fi 2,0% (ÎÎ 95% 0,2-4,2). Concentrația de preparat, care asigură inhibiția a 50,0% din cele 1693 de izolate cercetate a fost de 0,25 μg/ml, iar concentrația care a asigurat inhibiția a 90,0% dintre acestea a fost de 0,5 μg/ml. Aproape aceeași repartizare pe grupe de sensibilitate s-a observat la această specie și față de itraconazol: au fost sensibile 95,3% (ÎÎ 95% 93,2-97,5) din izolate, iar 4,7% (ÎÎ 95% 2,6-6,9) – rezistente. Valorile concentrațiilor minime inhibitorii MIC50 și MIC90 au fost egale și au constituit 0,006 μg/ml.

Profilul de rezistență al speciei *Candida albicans* la 5-fluorocitozină și la fluconazol a inclus și un număr de izolate cu sensibilitate doar la dozele înalte de preparat, iar valorile obținute pentru toate cele trei categorii de sensibilitate au fost foarte apropiate. O diferență nesemnificativă a fost semnalată între ponderea izolatelor sensibile la 5-fluorocitozină și la fluconazol – 93,7% (ÎÎ 95% 91,6-95,9) și 92,3% (ÎÎ 95% 90,2-94,5), respectiv, precum și între valorile ratelor sensibilității dependentă de doză – 2,1% (ÎÎ 95% 0,1-4,3) și 3,0% (ÎÎ 95% 0,9-5,2), respectiv și a rezistenței – 4,2% (ÎÎ 95% 2,1-6,4) și, respectiv, 4,7% (ÎÎ 95% 2,6-6,9) cazuri. Concentrația de fluconazol ce asigură inhibiția a 50,0% dintre izolatele cercetate de *Candida albicans* a fost de 0,5 μg/ml, iar concentrația care a asigurat inhibiția a 90% dintre acestea a fost de 1,0 μg/ml. În cazul 5-fluorocitozinei aceste valori au fost de 0,03 și de 0,06 μg/ml, respectiv.

Izolatele de *Candida glabrata* în proporție de 97,2% (ÎÎ 95% 95,1-99,4) au fost sensibile la amfotericină B, în timp ce 2,8% (ÎÎ 95% 0,7-5,0) dintre acestea au fost rezistente. Concentrația de preparat, care asigură inhibiția a 50% dintre cele 603 de izolate de *C. glabrata* cercetate a fost de 0,5 μg/ml, iar concentrația care a asigurat inhibiția a 90% dintre acestea a fost de 1,0 μg/ml. Fluconazolul și 5-fluorocitozina și-au exercitat acțiunea în doze foarte mici. Astfel, pentru fluconazol concentrația de preparat, care asigură inhibiția a 50% din izolate, a fost de 0,001 μg/ml, fiind egală cu MIC90.

Tabelul 3.1. Sensibilitatea la antifungice a speciilor de *Candida* izolate din biosubstraturile clinice

Preparatul antifungic	Concentrația minimă inhibitorie (CMI) µg/ml			Numărul/% izolatelor în fiecare categorie, interpretarea*					
	Range	MIC ₅₀	MIC ₉₀	S		SSD		R	
				n	%	n	%	n	%
<i>Candida albicans</i> (n=1693)									
Amfotericina B	1 – 1	0,25	0,5	1636	98	-	-	34	2
Fluconazol	2 – 4	0,5	1	1541	92,3	51	3	78	4,7
Itraconazol	0,06 - 0,06	0,06	0,06	1591	95,3	-	-	79	4,7
5-fluorocitozină	0,06-0,25	0,03	0,06	1565	93,7	35	2,1	70	4,2
<i>Candida glabrata</i> (n=603)									
Amfotericina B	1 – 1	0,5	1	584	97,2	-	-	17	2,8
Fluconazol	0,001 – 16	0,001	0,001	450	74,9	119	19,8	32	5,3
Itraconazol	ND			-	-	-	-	-	-
5-fluorocitozină	0,006-0,12	0,001	0,006	497	82,7	59	9,8	45	7,5
<i>Candida krusei</i> (n=337)									
Amfotericina B	1 - 1	0,25	0,5	294	95,8	-	-	13	4,2
Fluconazol	ND			-	-	-	-	-	-
Itraconazol	ND			-	-	-	-	-	-
5-fluorocitozină	ND			-	-	-	-	-	-
<i>Candida parapsilosis</i> (n=57)									
Amfotericina B	1 - 1	0,25	0,5	57	100	-	-	-	-
Fluconazol	2 - 4	1	2	55	96,5	-	-	2	3,5
Itraconazol	0,125 - 0,125	0,06	0,125	57	100	-	-	-	-
5-fluorocitozină	ND			-	-	-	-	-	-
<i>Candida tropicalis</i> (n=25)									
Amfotericina B	1 - 1	0,25	0,5	24	96	-	-	1	4
Fluconazol	2 - 4	0,5	1	24	96	-	-	1	4
Itraconazol	0,06 - 0,06	0,03	0,06	19	76	-	-	6	24
5-fluorocitozină	ND			24	96	-	-	1	4
<i>Candida dublinensis</i> (n=2)									
Amfotericina B	1 - 1	1	1	2	100	-	-	-	-
Fluconazol	2 - 4	0,5	1	2	100	-	-	-	-
Itraconazol	0,06 - 0,06	0,06	0,06	2	100	-	-	-	-
5-fluorocitozină	ND			-	-	-	-	-	-

*S - sensibil; SSD - sensibil la doze înalte de antifungice; R - rezistent

Pentru 5-fluorocitozină, concentrația de preparat, care asigură inhibiția a 50% de izolate de *C. glabrata* cercetate, a fost de 0,001 μg/ml, iar concentrația, care a asigurat inhibiția a 90% dintre acestea, a fost de 0,006 μg/ml. Profilul de sensibilitate față de fluconazol pentru această specie include 74,9% (Î 95% 72,8-77,1) de izolate sensibile, 19,8% (Î 95% 17,7-22,0) – cu sensibilitate dependentă de doză și 5,3% (Î 95% 3,2-7,5) – rezistente. În cazul 5-fluorocitozinei, ponderea grupurilor de sensibilitate printre izolatele de *Candida glabrata* a fost următoarea: 82,7% (Î 95% 80,6-84,9) – S, 19,8% (Î 95% 17,7-22,0) – SSD și 5,3% (Î 95% 3,2-7,5) – R.

Din izolatele de *C. krusei* testate la sensibilitatea față de amfotericina B, 95,8% (Î 95% 93,7-98,0) s-au dovedit a fi sensibile, în timp ce 4,2% (Î 95% 2,1-6,4) au prezentat rezistență. Concentrația de preparat, care asigură inhibiția a 50% din izolate, a fost de 0,25 μg/ml, iar concentrația, care a asigurat inhibiția a 90% dintre acestea, de 0,5 μg/ml.

Analizând sensibilitatea față de preparatele antifungice a izolatelor de *Candida parapsilosis* (n=57) s-a constatat că toate manifestă sensibilitate la amfotericina B și la itraconazol. Concentrația de amfotericină B, care asigură inhibiția a 50% dintre izolatele speciei de *C. parapsilosis*, a fost de 0,25 μg/ml, iar concentrația care a asigurat inhibiția a 90% dintre acestea de 0,5 μg/ml. Pentru itraconazol, CMI50 a fost de 0,06 μg/ml, iar CMI90 – de 0,125 μg/ml. 96,5% (Î 95% 94,4-98,7) de tulpini de *C. parapsilosis* au fost sensibile la fluconazol și 3,5% (Î 95% 1,4-5,7) – rezistente.

Conform rezultatelor testării sensibilității la antifungice a tulpinilor de *Candida tropicalis* (n=25), sensibilitate la amfotericina B și la fluconazol au demonstrat 96,0% (Î 95% 93,9-98,2) din izolate, iar rezistente la ambele preparate doar 4,0% (Î 95% 1,9-6,2). Concentrația de amfotericină B, care a asigurat inhibiția a 50% dintre izolatele cercetate de *C. tropicalis*, a fost de 0,25 μg/ml, iar concentrația care a asigurat inhibiția a 90% dintre acestea de 0,5 μg/ml. Pentru fluconazol, CMI50 a fost de 0,5 μg/ml, iar CMI90 – de 1,0 μg/ml. 76,0% (Î 95% 73,9-78,2) din izolatele acestei specii au prezentat sensibilitate la itraconazol, iar 24,0% (Î 95% 21,9-26,2) – rezistență. Pentru itraconazol, în cazul speciei *C. tropicalis*, CMI50 a fost de 0,03 μg/ml, iar CMI90 – 0,06 μg/ml.

Tulpinile de *C. dublinensis* s-au dovedit a fi sensibile 100% (Î 95% 97,9-102,2) față de amfotericină B, fluconazol și itraconazol. Concentrația de amfotericină B, care asigură inhibiția a 50% dintre izolatele cercetate a acestei specii, a fost de 1,0 μg/ml, egală cu concentrația care a asigurat inhibiția a 90% dintre acestea. Pentru fluconazol, CMI50 a fost de 0,5 μg/ml și CMI90 de 1,0 μg/ml, iar pentru itraconazol aceste valori au constituit 0,06 μg/ml pentru fiecare.

O serie de tulpini izolate din cele mai relevante biosubstraturi clinice au fost testate la o gamă mai largă de preparate antifungice: amfotericina B, anidulafungina, micafungina, fluconazol,

itraconazol, posaconazol, voriconazol, 5-flucitozina și caspofungina. Rezultatele obținute pot fi urmărite pe Figura 3.4.

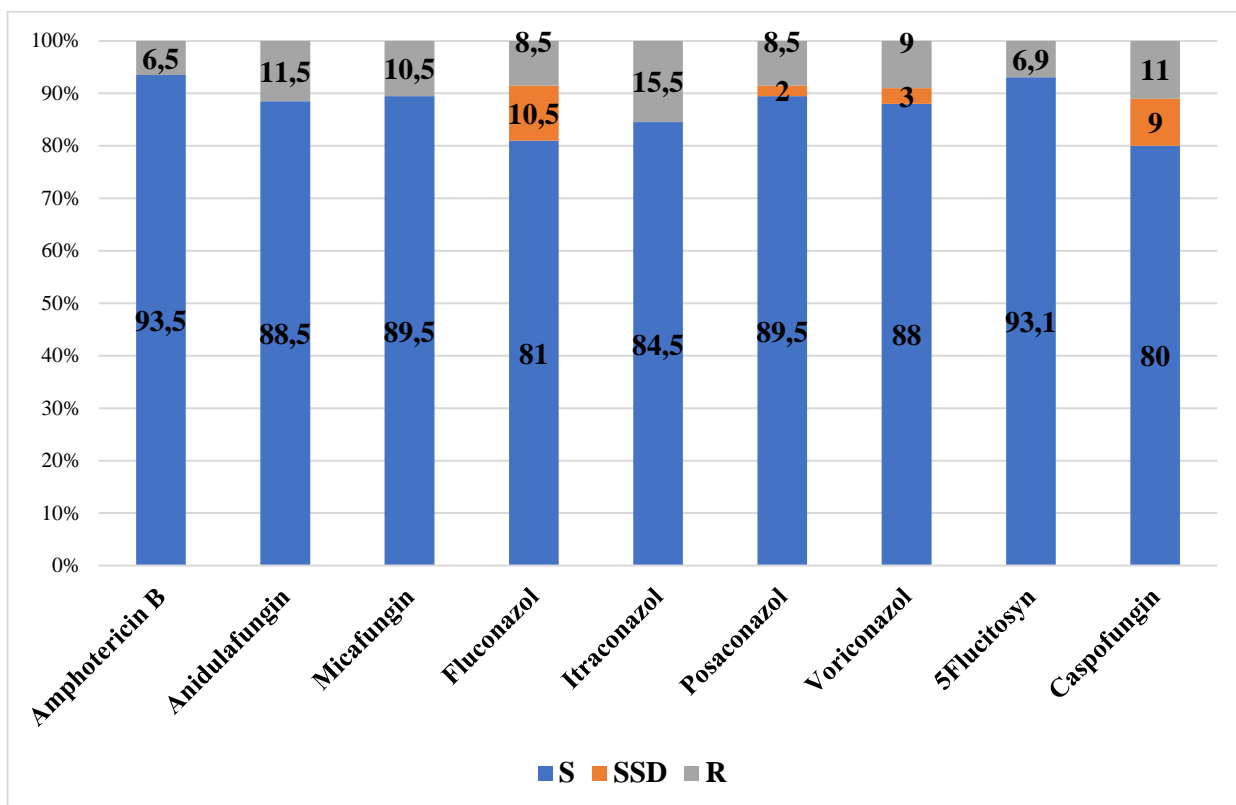


Fig. 3.4. Fungigrama speciilor de *Candida* la preparatele antifungice testate

Izolatele studiate au prezentat un nivel ridicat de sensibilitate față de toate preparatele antifungice testate. Pentru cinci dintre cele nouă preparate au fost identificate doar două categorii de sensibilitate – S și R, în timp ce pentru preparatele fluconazol, posaconazol, voriconazol și caspofungină au fost identificate izolate cu profil de sensibilitate la doze înalte de preparat. Nivelul de sensibilitate în eșantionul studiat față de cele nouă preparate testate a fost între 93,5% (Î 95% 91,2-95,5) și 80,0% (Î 95% 77,9-82,2), cel mai înalt fiind față de amfotericina B și 5-fluorocitozină, iar cel mai scăzut – față de fluconazol și caspofungină. Din totalitatea izolatelor de *Candida* studiate, 93,5% (Î 95% 91,2-95,5) s-au dovedit a fi sensibile la amfotericina B și 6,5% (Î 95% 4,4-8,7) - rezistente. Analiza profilului de sensibilitate la antifungice a arătat că la anidulafungină 88,5% (Î 95% 86,4-90,7) din izolate au fost sensibile și 11,5% (Î 95% 9,4-13,7) – rezistente; la micafungină – 89,5% (Î 95% 87,4-91,7) – S și 10,5% (Î 95% 8,4-2,7) – R; la fluconazol – 81,0% (Î 95% 78,9-83,2) – S, 10,5% (Î 95% 8,4-12,7) – SSD și 8,5% (Î 95% 6,4-10,7) – R; la itraconazol – 84,5% (Î 95% 82,4-86,7) – S, 15,5% (Î 95% 13,4-17,7) – R; la posaconazol – 89,5% (Î 95% 87,4-91,7) – S, 2,0% (Î 95% -0,2-4,2) – SSD și 8,5% (Î 95% 6,4-10,7) – R; la voriconazol – 88,0% (Î 95% 85,9-90,2) – S, 3,0% (Î 95% 0,9-5,2) – SSD și 9,0%

(Î 95% 6,9-11,2) – R; la 5-fluorocitozină – 93,1% (Î 95% 91,0-95,3) – S și 6,9% (Î 95% 4,8-9,1) – R și la caspofungină – 80,0% (Î 95% 77,9-82,2) – S, 9,0% (Î 95% 6,9-11,2) – SSD și 11,0% (Î 95% 8,9-13,2) – R.

Profilul de sensibilitate al izolatelor de *Candida* la cele nouă preparate antifungice testate în funcție de specie poate fi urmărită în Anexa 2.

În acest studiu, 97,5% (Î 95% 95,4-99,7) din izolatele de *C. albicans* au prezentat sensibilitate la amfotericina B, iar rezistente s-au dovedit a fi 2,5% (Î 95% 0,4-4,7). Concentrația de preparat, care asigură inhibiția a 50% de izolate cercetate, a fost de 0,25 μg/ml, iar concentrația care a asigurat inhibiția a 90% dintre acestea, a fost de 0,5 μg/ml. O repartizare asemănătoare pe grupe a fost și în cazul preparatelor antifungice posaconazol și micafungină. În cazul posaconazolului, 95,9% (Î 95% 93,8-98,1) din izolate au fost sensibile, iar 4,1% (Î 95% 2,0-6,3) – rezistente. Valorile concentrațiilor minime inhibitorii CMI50 și CMI90 ale posaconazolului au constituit 0,006 μg/ml fiecare. Sensibile la acțiunea micafunginei au fost 94,2% (Î 95% 92,1-96,4) din izolate, iar rezistente – 5,8% (Î 95% 3,7-8,0). Valorile CMI50 și CMI90 pentru acest preparat au fost de 0,016 μg/ml. La 5-fluorocitozină au manifestat sensibilitate 93,4% (Î 95% 91,3-95,6) din izolatele cercetate, iar 6,6% (Î 95% 4,5-8,8) au fost rezistente, valorile CMI50 și CMI90 au fost de 0,06 și de 0,25 μg/ml, respectiv.

La anidulafungină au fost sensibile 87,6% (Î 95% 85,5-89,8) dintre izolatele de *C. albicans*, iar 12,4% (Î 95% 10,3-14,6) – rezistente. Valorile CMI50 și CMI90 au fost identice și au constituit 0,03 μg/ml. La itraconazol au fost sensibile 85,1% (Î 95% 83,0-87,3) din izolatele de *C. albicans*, iar 14,9% (Î 95% 12,8-17,1) – rezistente. Concentrația de itraconazol care asigură inhibiția a 50% din izolatele de *C. albicans* a fost de 0,03 μg/ml, iar a 90% din izolate – 0,06 μg/ml.

Printre izolatele de *C. albicans* testate la preparatele antifungice fluconazol, voriconazol și caspofungină au fost identificate și tulpini cu sensibilitate dependentă de doza preparatului aplicat. 90,9% (Î 95% 88,8-93,1) din izolatele de *C. albicans* testate au prezentat sensibilitate la fluconazol, 0,8% (Î 95% 1,4-3,0) – sensibilitate dependentă de doza preparatului și 8,3% (Î 95% 6,2-10,5) au fost rezistente la preparat. Concentrația de fluconazol, care asigură inhibiția a 50% din izolatele de *C. albicans*, a fost de 0,5 μg/ml, iar a 90% din izolate – 1,0 μg/ml. La acțiunea voriconazolului au fost sensibile 91,7% (Î 95% 89,6-93,9) din izolatele de *C. albicans*, 1,7% (Î 95% 0,5-3,9) au manifestat sensibilitate dependentă de doză, iar 6,6% (Î 95% 4,5-8,8) au fost rezistente. Concentrația de voriconazol, care asigură inhibiția a 50% din izolatele de *C. albicans*, a fost de 0,06 μg/ml, iar a 90% din izolate – de 0,25 μg/ml. În cazul caspofunginei, rata izolatelor sensibile a fost de 81,0% (Î 95% 78,9-83,2), a celor SSD – 8,3% (Î 95% 5,9-10,8), iar a izolatelor

rezistente – 10,7% (Î 95% 8,6-12,9). CMI50 a acestui preparat a constituit 0,016 µg/ml, iar CMI90 – 0,25 µg/ml.

82,7% (Î 95% 80,6-84,9) din cele 52 de izolate de *C. glabrata* au prezentat sensibilitate la amfotericina B, iar rezistente la acest preparat s-au dovedit a fi 17,3% (Î 95% 15,2-19,5). Concentrația de preparat, care asigură inhibiția a 50% din cele 52 izolate cercetate, a fost de 0,25 µg/ml, iar a 90% dintre acestea – de 0,5 µg/ml.

O repartizare asemănătoare pe grupe a fost și în cazul preparatelor anidulafungină, micafungină și 5-fluorocitozină. În cazul anidulafunginei, rata izolatelor sensibile a constituit 94,2%, (Î 95% 92,1-96,4), iar a celor rezistente – 5,8% (Î 95% 3,7-8,0). Valorile concentrațiilor minime inhibitorii CMI50 și CMI 90 ale anidulafunginei au fost egale cu 0,03 și cu 0,06 µg/ml, respectiv. Sensibile la acțiunea micafunginei au fost 84,6% (Î 95% 82,5-86,8) din izolate, iar rezistente – 15,4% (Î 95% 13,3-17,6). Valorile concentrațiilor minime inhibitorii CMI50 și CMI90 au constituit 0,03 µg/ml fiecare. La acțiunea 5-fluorocitozinei au manifestat sensibilitate 88,5% (Î 95% 86,4-90,7) din izolatele cercetate, iar 11,5% (Î 95% 9,4-13,7) au fost rezistente. Valorile concentrațiilor minime inhibitorii CMI50 și CMI90 pentru 5-fluorocitozină pentru izolatele de *C. glabrata* au fost de 0,006 și de 0,12 µg/ml, respectiv.

La testarea a patru dintre preparatele antifungice (fluconazol, posaconazol, voriconazol și caspofungină) față de izolatele de *C. glabrata* au fost identificate tulpini care au manifestat sensibilitate, sensibilitate la doze înalte și rezistență. Doar 50% (Î 95% 47,9-52,2) din izolatele de *C. glabrata* testate au fost sensibile la fluconazol, 38,5% (Î 95% 36,4-40,7) au manifestat sensibilitate dependentă de doză, iar 11,5% (Î 95% 9,4-13,7) au fost rezistente la acest preparat. Concentrația de fluconazol care a asigurat inhibiția a 50% din izolatele de *C. glabrata* a fost de 0,5 µg/ml, iar a 90% din izolate – 1,0 µg/ml. La acțiunea posaconazolului s-au dovedit a fi sensibile 82,7% (Î 95% 80,6-84,9) din izolatele de *C. glabrata*, 3,8% (Î 95% 1,7-6,0) au manifestat sensibilitate dependentă de doză, iar 13,5% (Î 95% 11,4-15,7) au fost rezistente. CMI50 a posaconazolului în raport cu *C. glabrata* a fost de 0,5 µg/ml, iar CMI90 – 1,0 µg/ml. La acțiunea voriconazolului au fost sensibile 88,5% (Î 95% 86,4-90,7) din izolatele de *C. glabrata*, 3,8% (Î 95% 1,7-6,0) au prezentat sensibilitate dependentă de doză, iar alte 3,8% (Î 95% 1,7-6,0) – rezistență. Concentrația de voriconazol care asigură inhibiția a 50% din izolatele de *C. glabrata* a fost de 1,0 µg/ml, iar a 90% din izolate – 2,0 µg/ml. În cazul caspofunginei, rata izolatelor sensibile a fost de 84,6% (Î 95% 82,5-86,8), a celor sensibile la doze înalte – 5,8% (Î 95% 3,7-8,0), iar rezistente – 9,6% (Î 95% 7,5-11,8). CMI50 a acestui preparat în raport cu izolatele de *C. glabrata* a fost de 0,03 µg/ml, iar CMI90 – 0,06 µg/ml.

Speciile de *C. parapsilosis* au fost 100% (ÎÎ 95% 97,9-102,2) sensibile la amfotericina B, concentrația preparatului care a asigurat inhibiția a 50% din izolatele cercetate a fost de 0,25 µg/ml, iar a 90% din izolate – 0,5 µg/ml. La anidulafungină doar 75,0% (ÎÎ 95% 72,9-77,2) din tulpini s-au dovedit a fi sensibile și, respectiv, 25,0% (ÎÎ 95% 22,9-27,2) rezistente. Valorile concentrațiilor minime inhibitorii CMI50 și CMI90 ale anidulafunginei au fost egale cu 1,0 și cu 2,0 µg/ml, respectiv. În cazul preparatului micafungină, izolatele sensibile au constituit 83,3% (ÎÎ 95% 81,2-85,5), iar cele rezistente – 16,7% (ÎÎ 95% 14,6-18,9). Valorile concentrațiilor minime inhibitorii CMI50 și CMI90 au fost 0,5 µg/ml și 1,0 µg/ml. Conform standardelor pentru testarea speciilor de *Candida* la preparatele antifungice nu se recomandă testarea 5-fluorocitozinei pentru speciile de *C. parapsilosis*, din cauza lipsei valorilor de interpretare.

La preparatele din grupa azolilor, tulpinile de *C. parapsilosis* au prezentat sensibilitate înaltă. Astfel, 100% (ÎÎ 95% 97,9-102,2) din tulpini au fost sensibile la fluconazol, itraconazol și voriconazol, iar valorile concentrațiilor minime inhibitorii CMI50 și CMI90 au fost diferite pentru aceste preparate. Concentrația preparatului care a asigurat inhibiția a 50% din izolatele cercetate a fost de 0,5 µg/ml, iar concentrația care a inhibat 90% – 2,0 µg/ml. Pentru itraconazol, CMI50 și CMI90 au fost identice și au constituit 0,125 µg/ml, iar pentru voriconazol CMI50 a constituit 0,125 µg/ml și pentru CMI90 – 0,25 µg/ml. Tulpinile testate la posaconazol au înregistrat o sensibilitate înaltă, 91,7% (ÎÎ 95% 89,6-93,9) tulpini fiind sensibile și doar 8,3% (ÎÎ 95% 6,2-10,5) rezistente. Valorile concentrațiilor minime inhibitorii pentru acest preparat, care au asigurat inhibiția a 50% și a 90% din tulpini, au fost de 0,03 µg/ml și de 0,06 µg/ml, respectiv.

În cazul caspofunginei situația a fost diferită, comparativ cu antifungicele menționate mai sus. Doar 50% (ÎÎ 95% 47,9-52,2) din tulpinile de *C. parapsilosis* au prezentat sensibilitate la acest preparat, iar 33,3% (ÎÎ 95% 31,2-35,5) au fost sensibile la doze înalte, rata izolatelor rezistente a constituit 16,7% (ÎÎ 95% 14,6-18,9). CMI50 a acestui preparat în raport cu izolatele de *C. parapsilosis* a fost de 0,5 µg/ml, iar CMI90 – 1,0 µg/ml.

Specia *C. tropicalis* s-a dovedit a fi mai rezistentă la antifungicele testate, comparativ cu restul speciilor de *Candida*. Astfel, aceste tulpini au prezentat o rezistență marcată la preparatele din grupa azolilor. La fluconazol, itraconazol și voriconazol, 66,7% (ÎÎ 95% 64,6-68,9) din tulpinile de *C. tropicalis* au fost sensibile, iar 26,7% (ÎÎ 95% 24,6-28,9) – rezistente la fluconazol și itraconazol. La voriconazol, 20,0% (ÎÎ 95% 18,9-22,2) din tulpinile de *C. tropicalis* au fost rezistente, iar 13,3% (ÎÎ 95% 11,2-15,5) au fost sensibile în dependență de doză. CMI50 și CMI90 pentru fluconazol a fost de 0,5 µg/ml și de 1,0 µg/ml, respectiv, pentru itraconazol 0,125 µg/ml atât pentru CMI50, cât și pentru CMI90, iar pentru voriconazol CMI50 a fost de 1,0 µg/ml, iar pentru CMI90 de 2,0 µg/ml. În cazul posaconazolului sensibilitatea tulpinilor testate s-a dovedit a

fi de 73,3% (Î 95% 71,2-75,5), sensibile la doze înalte de preparat și rezistente au fost câte 13,3% (Î 95% 11,2-15,5) din tulpini. CMI50 pentru posaconazol a fost de 0,25 µg/ml, iar pentru CMI90 – 0,5 µg/ml. Sensibilitatea la caspofungină a tulpinilor de *C. tropicalis* a fost de 86,7% (Î 95% 84,6-88,9), la anidulafungină – 86,7% (Î 95% 84,6-88,9) și la micafungină – 73,3% (Î 95% 71,2-75,5). Rezistența tulpinilor de *C. tropicalis* la aceste preparate a constituit 13,3% (Î 95% 11,2-15,5), 6,7% (Î 95% 4,6-8,9) și 26,7% (Î 95% 24,6-28,9), respectiv. Valoarea CMI50 pentru toate aceste trei preparate testate a fost egală cu 0,03 µg/ml, iar CMI90 pentru anidulafungină și micafungină a fost de 3 0,06 µg/ml, în timp ce pentru caspofungină – 0,03 µg/ml.

C. tropicalis s-a dovedit a fi sensibilă la amfotericina B în 93,3% din cazuri (Î 95% 91,2-95,5), la 5-flucitozină – 93,3% cazuri, (Î 95% 91,2-95,5) și doar 6,7% (Î 95% 4,6-8,9) din tulpini au prezentat rezistență la aceste preparate. CMI50 și CMI90 pentru amfotericina B a constituit 0,25 µg/ml și 0,5 µg/ml, respectiv. Pentru 5-flucitozină, CMI50 și CMI90 a fost de 0,06 µg/ml pentru fiecare.

3.3. Cercetarea exprimării factorilor de patogenitate la tulpinile de *Candida* spp. izolate din biosubstraturi clinice

Fungii patogeni posedă proprietăți importante, precum patogenitatea și virulența. Patogenitatea permite fungilor de a iniția un proces infecțios, dar aceasta nu se va dezvolta dacă fungii nu vor fi suficient de virulenți pentru a străbate barierele de apărare ale organismului uman și a pătrunde în el. Actualmente, identificarea factorilor de patogenitate la levuri joacă un rol major în elucidarea patogenezei infecțiilor fungice în vederea dezvoltării de noi preparate antifungice pentru a crește eficacitatea tratamentului acestora.

Mecanismele care modulează virulența fungilor levuriformi la moment nu sunt pe deplin cunoscute, însă deja sunt dovezi că deteriorarea și liza celulelor-gazdă sunt principalii factorii care contribuie la patogenitatea fungică. Fungii patogeni produc enzime degradante care depolimerizează structurile care le împiedică să pătrundă în organismul-gazdă, facilitând diseminarea și stabilirea bolii. Astfel, aceste enzime provoacă leziuni ale țesutului gazdei, afectând imunitatea. Pentru a invada, fungii utilizează acești factori de patogenitate și penetrează epitelul/endoteliul cu ajutorul enzimelor hidrolitice, cum ar fi fosfolipaze extracelulare, proteaze, lipaze ș.a. Astfel, fungii levuriformi dispun de un arsenal important de factori de patogenitate, precum sistemul enzimatic și formarea biofilmelor, studiați în prezenta lucrare.

Astfel, în urma studiului a fost dovedită semnificația fosfolipazei extracelulare ca marker de diagnosticare al infecțiilor fungice și s-au obținut unele dovezi ale folosirii acesteia ca potențială țintă terapeutică împotriva dezvoltării bolii. În studiul dat, fosfolipaza extracelulară a fost pusă în evidență la 94% (74,6%; Î 95% 67,0-82,2) din tulpinile de *C. albicans*, 12,8% (Î 95% 4,4-14,6)

dintre ele prezentând activitate enzimatică moderată și 87,2% (Î 95% 85,1-89,4) – activitate enzimatică înaltă, iar 25,4% (17,8-33,0) de tulpini nu au produs această enzimă. Dintre speciile de *C. non-albicans*, cele mai multe tulpini producătoare de fosfolipază au fost înregistrate printre *C. tropicalis* – 53,8% (Î 95% 35,5-72,1), 94,3% (Î 95% 92,5-96,5) înregistrând activitate enzimatică moderată și 5,7% (Î 95% 3,6-7,9) – activitate enzimatică înaltă, iar la 46,2% (Î 95% 34,0-58,3) din tulpini nu a fost pusă în evidență această enzimă.

Producerea de proteaze este un alt factor de patogenitate care permite fungilor să invadeze organismul-gazdă și să hidrolizeze proteinele. În cercetarea realizată de noi a fost înregistrată producerea de proteaze la un număr mai mare de *C. albicans* - 78,6% (Î 95% 71,4-85,7), în comparație cu tulpinile de *C. non-albicans* – 52,5% (Î 95% 50,4-54,7). Sinteza acestei enzime a fost pusă în evidență la 55,4% (Î 95% 37,1-73,6) din tulpinile de *C. tropicalis*, 53,1% (Î 95% 18,2-88,1) din tulpinile de *C. glabrata* și la 42,9% (Î 95% 40,8-45,1) din tulpinile de *C. krusei*. Lipsa activității enzimatice a fost înregistrată la 21,4% (Î 95% 14,3-28,6) din tulpinile de *C. albicans*, la 44,6% (Î 95% 32,5-56,7) de *C. tropicalis*, la 46,9% (Î 95% 29,6-64,2) de *C. glabrata* și la 57,1% (Î 95% 36,0-78,3) de *C. krusei*.

Este foarte important de menționat rolul hemolizinelor în supraviețuirea levurilor și în invadarea organismului uman. Prin formarea porilor în membrana celulară, hemolizinele asigură diseminarea infecției în macroorganism și dezvoltarea simptomelor severe ale bolii. Producători de hemolizine s-au dovedit a fi 90,5% (Î 95% 85,4-95,6) din tulpinile de *C. albicans*, dintre care 50,9% (Î 95% 37,3-54,7) au manifestat activitate enzimatică moderată și 49,1% (Î 95% 35,8-53,1) - activitate enzimatică înaltă. Activitate enzimatică nu s-a înregistrat doar la 19,5% (Î 95% 17,4-21,7) din izolatele de *C. albicans*. Rata de exprimare a acestei enzime a fost înregistrată și la 88 din tulpinile de *C. non-albicans*, întâietatea revenind speciei *C. tropicalis* – 56,9% (Î 95% 38,7-75,1), urmată de *C. glabrata* – 96,9% (Î 95% 94,8-99,1) și *C. krusei* – 95,2% (Î 95% 93,1-97,4). La nici o tulpină de *C. glabrata* și de *C. krusei* nu s-a înregistrat activitate hemolizinică înaltă.

O altă enzimă determinată la tulpinile clinice de levuri a fost esteraza. Dintre speciile de *Candida*, toate tulpinile de *C. tropicalis* au prezentat activitate esterazică. În total, 80,5% (Î 95% 74,1-87,8) din tulpinile de *C. albicans* au fost producătoare de esterază, 56,9% (54,8-59,1) au manifestat activitate enzimatică moderată, iar 43,1% (Î 95% 41,0-45,3) – activitate enzimatică înaltă. La 19,5% (Î 95% 12,2-25,9) din izolate nu a fost detectată prezența acestei enzime. Dintre speciile de *C. tropicalis*, activitate enzimatică au prezentat 100% (Î 95% 97,9-102,2) din izolate: 35,4% (Î 95% 23,8-47,0) – moderată și 64,6% (Î 95% 53,0-76,2) – înaltă. La 45,0% (Î 95% 21,7-64,0) din tulpinile de *C. krusei* a fost demonstrată prezența activității enzimatice moderate,

la 55,0% (31,0-73,7) – activitate enzimatică înaltă, iar la 4,8% (ÎÎ 95% 4,3-18,9) din tulpini nu a fost pusă în evidență această enzimă. Dintre tulpinile de *C. glabrata*, 80,0% (ÎÎ 95% 48,9-92,2) au manifestat activitate esterazică moderată și 20,0% (ÎÎ 95% 0,5-35,8) – înaltă. Nu au fost producătoare de esteraze 53,1% (ÎÎ 95% 51,0-55,3) din izolatele de *C. glabrata*.

Exprimarea producerii deoxiribonucleazei extracelulare (DNA-azei) este sugestivă în determinarea patogenității tulpinilor de *Candida* spp. DNA-aza este o enzimă care scindează acizii nucleici și asigură reducerea viscozității secrețiilor, în care se adună ADN-ul din celulele lezate, asigurându-le cu nucleotide pentru metabolismul de sinteză, favorizând răspândirea lor în organismul-gazdă. Această enzimă a fost detectată mai des la tulpinile clinice de *C. albicans* – 26,2% (ÎÎ 95% 18,5-33,9), comparativ cu *C. tropicalis* – 20,0% (ÎÎ 95% 5,3-34,7), *C. krusei* – 42,9% (ÎÎ 95% 40,8-45,1) și *C. glabrata* – 3,1% (ÎÎ 95% 1,0-5,3). Nu a prezentat activitate enzimatică înaltă în raport cu DNA-aza nici o tulpină de *C. glabrata* (Anexa 3).

Exprimarea factorilor de patogenitate enzimatică la izolatele de *Candida* spp. rezistente la antifungice s-a dovedit a fi mai înaltă comparativ cu tulpinile sensibile. Tulpinile de *Candida* spp. rezistente la fluconazol au prezentat o pondere de exprimare a fosfolipazei, proteazei, hemolizinei și esterazei mai mare, constituind 83,0% (ÎÎ 95% 80,9-85,2), 84,5% (ÎÎ 95% 82,4-86,7), 92,3% (ÎÎ 95% 90,2-94,5) și 72,3% (ÎÎ 95% 70,2-74,5), respectiv, față de tulpinile sensibile – 35,0% (ÎÎ 95% 32,9-37,2), 37,4% (ÎÎ 95% 35,3-39,6), 26,6% (ÎÎ 95% 24,5-28,8) și 36,4% (ÎÎ 95% 34,3-38,6), respectiv. Diferențe mai puțin evidente au fost observate la producerea DNA-azei, tulpinile rezistente depășind cu 30,9% (ÎÎ 95% 28,8-33,1) pe cele sensibile (Figura 3.5).

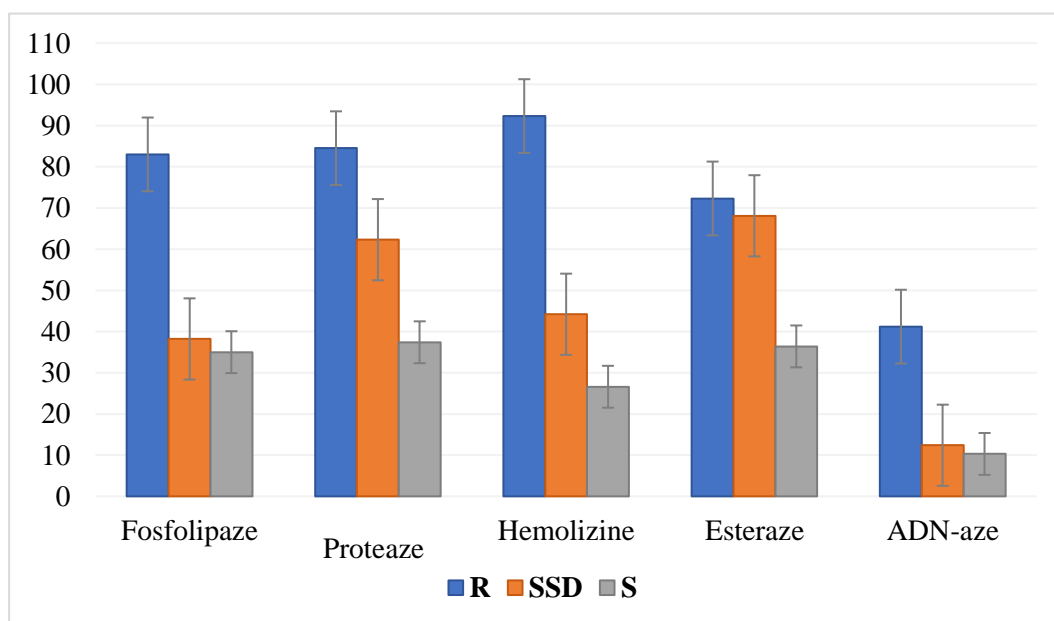


Fig. 3.5. Frecvența exprimării factorilor enzimatici de patogenitate la tulpinile de *Candida* spp. rezistente la fluconazol comparativ cu cele sensibile (%)

Tulpinile de *Candida* spp. rezistente la 5-flucitozină au prezentat o pondere de exprimare a fosfolipazei, proteazei, hemolizinei și esterazei mai mare, constituind 74,2% (ÎÎ 95% 72,1-76,4), 88,4% (ÎÎ 95% 86,3-90,6), 100% (ÎÎ 95% 97,9-102,2) și 64,6% (ÎÎ 95% 62,5-66,8), respectiv, față de tulpinile sensibile. Diferențe mai puțin evidente au fost observate la producerea DNA-azei, depășind cu 42,2% (ÎÎ 95% 40,1-44,4) tulpinile sensibile (Figura 3.6.).

Pe Figura 3.6. este prezentat aspectul fenotipic al unor factori de patogenitate investigați la tulpinile de *Candida* spp. cercetate în lucrarea dată.

Un alt factor de patogenitate cercetat în acest studiu a fost activitatea antilizozei a speciilor de *Candida*. S-a dovedit că lizozimul provine din degradarea celulelor liniei granulocitare, monocitare, care conțin aceasta enzimă în lizozomi. Creșterea toleranței fungilor la acțiunea lizozimului este una dintre strategiile adoptate de fungi pentru a-și asigura persistența pe termen lung în organismul-gazdă.

Astfel, din cele 244 de tulpini izolate din biosubstraturi clinice, activitate antilizozei au prezentat 95,9% (ÎÎ 95% 93,8-98,1) în timp ce doar 4,1% (ÎÎ 95% 1,6-6,6) au fost inactive. Marea majoritate a tulpinilor clinice au manifestat grad mediu de exprimare a activității antilizozei – 53,4% (ÎÎ 95% 40,5-66,3) de *Candida* spp., inclusiv 54,5% (ÎÎ 95% 44,4-61,5) *C. albicans*, 47,6% (ÎÎ 95% 34,0-58,3) *C. tropicalis*, 53,6% (ÎÎ 95% 29,6-64,2) *C. glabrata* și 65,0% (ÎÎ 95% 41,1-82,7) *C. krusei*.

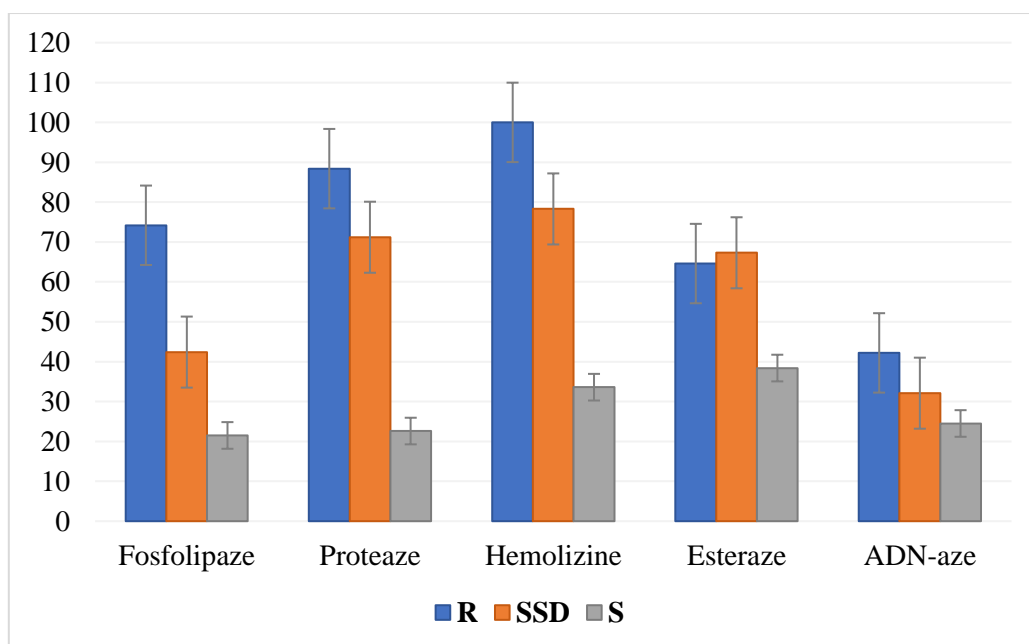


Fig. 3.6. Frecvența exprimării factorilor enzimatici de patogenitate la tulpinile de *Candida* spp. rezistente la 5-flucitozină comparativ cu cele sensibile (%)

Grad înalt de exprimare a activității antilizozim au prezentat 30,9% (ÎÎ 95% 22,1-38,2) din izolatele de *Candida* spp., dintre care *C. albicans* – 30,9% (ÎÎ 95% 22,1-38,2), *C. tropicalis* – 41,3% (ÎÎ 95% 28,1-51,9), *C. glabrata* – 7,1% (ÎÎ 95% 2,1-14,6) și *C. krusei* – 15,0% (ÎÎ 95% 0,7-29,2). Un grad mic de exprimare a activității antilizozim au prezentat 14,6% (ÎÎ 95% 8,2-20,4) din izolatele de *C. albicans*, 11,1% (ÎÎ 95% 3,2-18,3) – de *C. tropicalis*, 39,3% (ÎÎ 95% 17,9-50,8) – de *C. glabrata* și 20,0% (ÎÎ 95% 2,2-35,8) – de *C. krusei* (Tabelul 3.2).

Tabelul 3.2. Capacitatea de inactivare a activității lizozimului de către izolatele de *Candida* spp.

Specia de <i>Candida</i>	Nu au inactivat lizozimul n (%; ÎÎ 95%)	Gradul de exprimare a AAL		
		Înalt (K>2,5) n (%; ÎÎ 95%)	Mediu (K0,5-2,49) n (%; ÎÎ 95%)	Mic (K<0,49) n (%; ÎÎ 95%)
<i>C. albicans</i>	3 (2,4; 0,3-5,0)	38 (30,9; 22,1-38,2)	67 (54,5; 44,4-61,9)	18 (14,6; 8,2-20,4)
<i>C. tropicalis</i>	2 (3,1; -1,1-7,3)	26 (41,3; 28,1-51,9)	30 (47,6; 34,0-58,3)	7 (11,1; 3,2-18,3)
<i>C. glabrata</i>	4 (12,5; 1,0-23,9)	2 (7,1; -2,1-14,6)	15 (53,6; 29,6-64,2)	11 (39,3; 17,9-50,8)
<i>C. krusei</i>	1 (4,8; -4,3-13,9)	3 (15,0; -0,7-29,2)	13 (65,0; 41,1-82,7)	4 (20,0; 2,2-35,8)
Total	10 (4,1%; 1,6-6,6)	69 (29,5; 20,7-38,3)	125 (53,4; 40,5-66,3)	40 (17,1; 4,9-29,3)

Notă: AAL – activitate antilizozim

Rezultatele evaluării proprietății de inactivare a lizozimului a tulpinilor de *Candida* spp. rezistente și sensibile la fluconazol sunt prezentate pe Figura 3.7. Tulpinile rezistente au prezentat în 38,5% (ÎÎ 95% 36,4-40,6) din cazuri grad înalt de exprimare a activității antilizozim, 58,9% (ÎÎ 95% 56,8-61,1) – grad mediu și 2,6% (ÎÎ 95% 0,5-4,8) – grad mic.

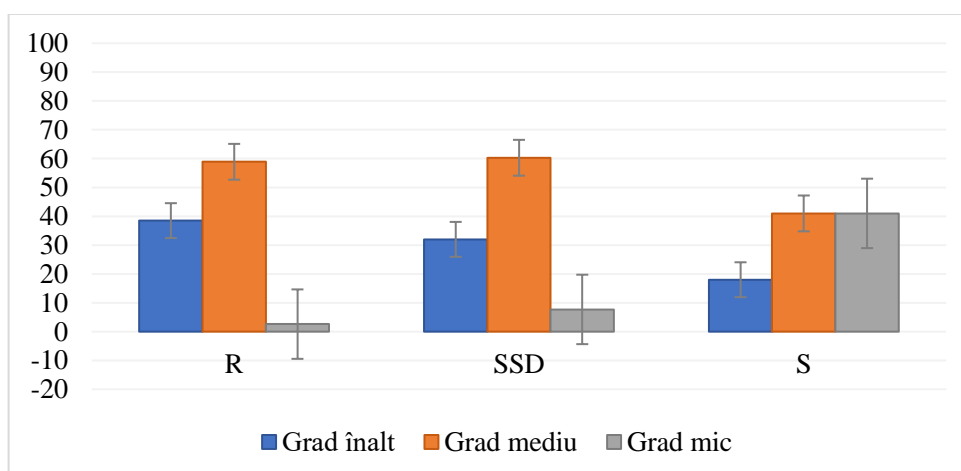


Fig. 3.7. Capacitatea de inactivare a lizozimului a tulpinilor de *Candida* spp. rezistente și sensibile la fluconazol (%)

Tulpinile sensibile au prezentat un grad înalt de inactivare a lizozimului în 18,0% (ÎÎ 95% 15,9-20,2) din cazuri, iar grad mediu și mic de inactivare a lizozimului s-a înregistrat la câte 41,0% (ÎÎ 95% 38,9-43,2) din tulpini. Tulpinile sensibile la 5-flucitozină au prezentat un grad înalt de inactivare a lizozimului în 9,0% (ÎÎ 95% 6,9-11,2) din cazuri, grad mediu – în 51,3% (ÎÎ 95% 49,2-53,5) și grad mic – în 39,7% (ÎÎ 95% 37,6-41,9) (Figura 3.8.).

Sistemul complement, un set complex de proteine și glicoproteine plasmatică (C1, C2, C3, ..., C9, B, D, P s.a.) ce se pot activa în cascadă, are proprietatea de a distruge agenții fungici patogeni și deține un rol primordial în apărarea antiinfecțioasă și în reglarea funcției imune.

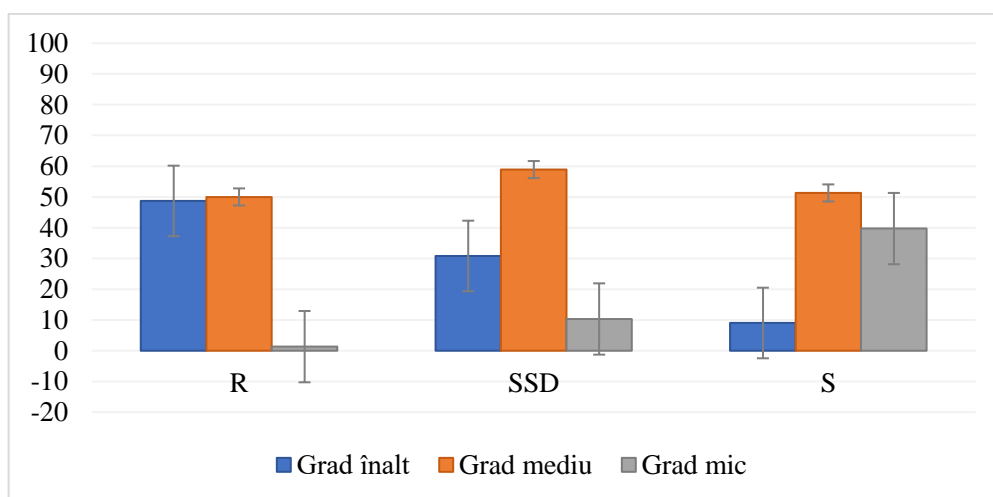


Fig. 3.8. Capacitatea de inactivare a lizozimului a tulpinilor de *Candida* spp. rezistente și sensibile la 5-flucitozină (%)

Pentru supraviețuire, fungii levuriformi patogeni au dezvoltat diverse mecanisme pentru inactivarea sistemului complement al organismului (Tabelul 3.3).

Tabelul 3.3. Capacitatea de a inactiva complementul a izolatelor de *Candida* spp.

Specia de <i>Candida</i>	Tulpinile care au inactivat complementul, n (%; ÎÎ 95%)	Concentrația complementului		
		15 UH50/ml, n (%; ÎÎ 95%)	5-15 UH50/ml, n (%; ÎÎ 95%)	5 UH50/ml, n (%; ÎÎ 95%)
<i>C. albicans</i>	117 (92,9; 90,8-95,4)	98 (83,8; 70,5-85,0)	18 (15,4; 8,2-20,4)	1 (0,8; 0,7-2,3)
<i>C. tropicalis</i>	65 (100; 97,9-102,2)	25 (38,5; 26,6-50,3)	34 (52,3; 40,2-64,4)	6 (9,2; 2,2-16,3)
<i>C. glabrata</i>	27 (84,4; 82,3-86,6)	13 (48,2; 23,6-57,6)	12 (44,4; 20,7-54,3)	2 (7,4; 2,1-14,6)
<i>C. krusei</i>	19 (90,5; 88,4-92,7)	6 (31,6; 9,2-47,9)	7 (36,8; 13,2-53,5)	6 (31,6; 9,2-47,9)
Total	228 (93,4; 91,3-95,6)	142 (62,3; 52,8-71,8)	71 (31,1; 19,0-43,3)	15 (6,6; 4,5-8,8)

În prezenta cercetare, din cele 244 de tulpini studiate, 93,4% (ÎÎ 95% 91,3-95,6) au prezentat activitate anticomplement, dintre care 62,3% (ÎÎ 95% 52,8-71,8) au inactivat complementul la o concentrație mai mare de 15 UH50/ml, 31,1% (ÎÎ 95% 19,0-43,3) – la o concentrație de la 5 UH50/ml până la 15 UH50/ml și 6,6% (ÎÎ 95% 4,5-8,8) – la o concentrație de 5 UH50/ml. Nu au inactivat complementul doar 16 tulpini sau 6,6% (ÎÎ 95% 4,5-8,8%).

Izolatele de *Candida* spp. rezistente la 5-flucitozină au inactivat complementul în proporție de 100% (ÎÎ 95% 97,9-102,2), iar tulpinile sensibile dependent de doză în proporție de 89,5% (ÎÎ 95% 87,4-91,7) (Figura 3.9.)

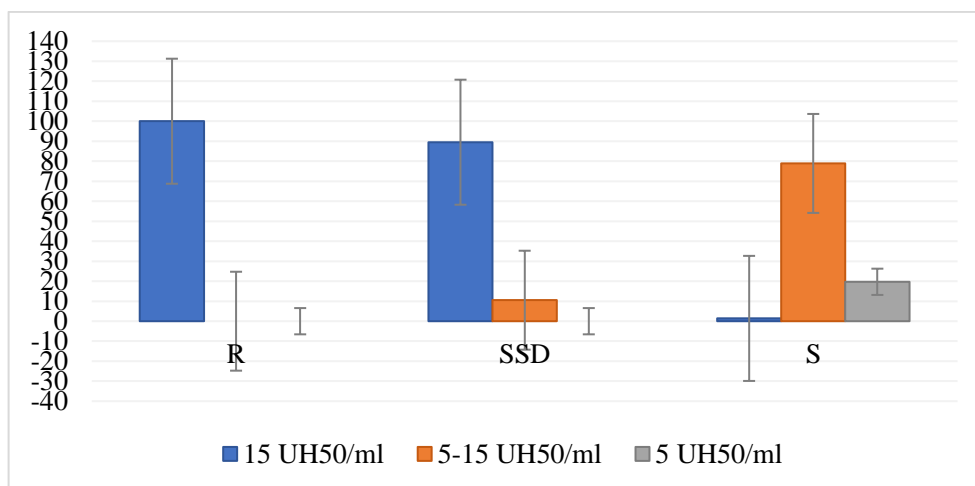


Fig. 3.9. Capacitatea de inactivare a complementului a tulpinilor de *Candida* spp. rezistente și sensibile la 5-flucitozină (%)

Majoritatea tulpinilor rezistente la fluconazol și sensibile dependent de doză au inactivat complementul la o concentrație de 15 UH50/ml, 97,4% (ÎÎ 95% 95,3-99,6) și 84,2% (ÎÎ 95% 82,1-86,4), respectiv (Figura 3.10.).

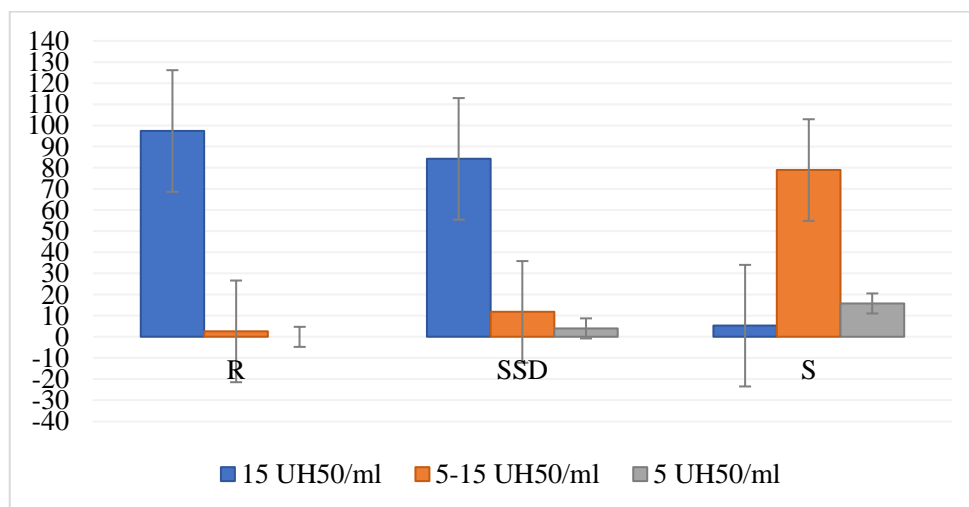


Fig. 3.10. Capacitatea de inactivare a complementului a tulpinilor de *Candida* spp. rezistente și sensibile la fluconazol (%)

Formarea biofilmelor joacă un rol semnificativ în patogenitatea fungilor. Acesta un sistem complex, dinamic din punct de vedere structural, constituit de agenți microbieni atașați în mod ireversibil de suprafețe solide inerte sau vii, înconjurate de o matrice polimerică extracelulară. Această particularitate a fungilor, de a se organiza sub formă de biofilme, constituie una dintre principalele caracteristici ce facilitează și dezvoltarea rezistenței la antifungice a levurilor. Studiarea acestui fenomen prezintă importanță din punct de vedere clinic în cazul genului *Candida*, deoarece această caracteristică sporește probabilitatea dezvoltării candidemiei persistente, inclusiv ca rezultat al rezistenței crescute la agenții antifungici. În prezentul studiu, din cele 244 de tulpini izolate din biosubstraturi clinice, 52,9% (ÎÎ 95% 50,8-55,1) au produs biofilm detectabil ($DO > 0,056$), iar 47,1% (ÎÎ 95% 40,9-53,4) nu au produs biofilm ($DO \leq 0,056$). În ceea ce privește statutul de biofilm, 46,5% (ÎÎ 95% 33,5-59,5) de izolate au produs biofilm puternic aderent ($DO > 0,220$), 12,4% (ÎÎ 95% 0,9-23,9) – biofilm moderat aderent ($DO 0,112-0,220$) și 41,1% (ÎÎ 95% 19,6-62,6) – biofilm slab aderent ($0,056 < DO \leq 0,112$).

Cel mai înalt grad de aderență și de formare a biofilmelor a fost înregistrat la speciile de *Candida non-albicans*, în special la *C. tropicalis* – 65,9% (ÎÎ 95% 63,8-68,1), urmată de *C. krusei* – 62,5% (ÎÎ 95% 60,4-64,7) și *C. glabrata* – 50,0% (ÎÎ 95% 47,9-52,2).

Dintre speciile de *C. albicans*, biofilm puternic aderent au format 30,8% (ÎÎ 95% 28,7-33,0) dintre tulpini, 12,3% (ÎÎ 95% 10,2-14,5) – biofilm moderat aderent și 56,9% (ÎÎ 95% 54,8-59,1) – biofilm slab aderent (Tabelul 3.4.).

Tabelul 3.4. Capacitatea de formare a biofilmelor a izolatelor clinice de *Candida* spp.

Specia de <i>Candida</i>	Non-producătoare de biofilm	Producătoare de biofilm (n=129)		
		Puternic aderent	Moderat aderent	Slab aderent
	n (%; ÎÎ 95%)	n (%; ÎÎ 95%)	n (%; ÎÎ 95%)	n (%; ÎÎ 95%)
<i>C. albicans</i>	61 (48,4; 39,7-57,1)	20 (30,8; 28,7-33,0)	8 (12,3; 10,2-14,5)	37 (56,9; 54,8-59,1)
<i>C. tropicalis</i>	21 (32,3; 20,9-43,7)	29 (65,9; 63,8-68,1)	3 (6,8; -0,5-9,7)	12 (27,3; 25,2-29,5)
<i>C. glabrata</i>	20 (62,5; 45,7-79,3)	6 (50,0; 47,9-52,2)	4 (33,3; 31,2-35,5)	2 (16,7; 2,1-14,6)
<i>C. krusei</i>	13 (61,9; 41,1-82,7)	5 (62,5; 60,4-64,7)	1 (12,5; 4,3-13,9)	2 (25,0; 22,9-27,2)
Total	115 (47,1; 40,9-53,4)	60 (46,5; 33,5-59, 5)	16 (12,4; 0,9-23,9)	53 (41,1; 19,6-62,6)

Evaluarea corelației dintre capacitatea de formare a biofilmelor și rezistența izolatelor de *Candida* spp. la fluconazol a arătat că din izolatele care formează biofilm puternic aderent 52,6%

(Î 95% 50,5-54,8) au constituit izolatelor rezistente la fluconazol, în timp ce la tulpinile sensibile nu s-a înregistrat capacitatea de formare de biofilm puternic aderent (Figura 3.11).

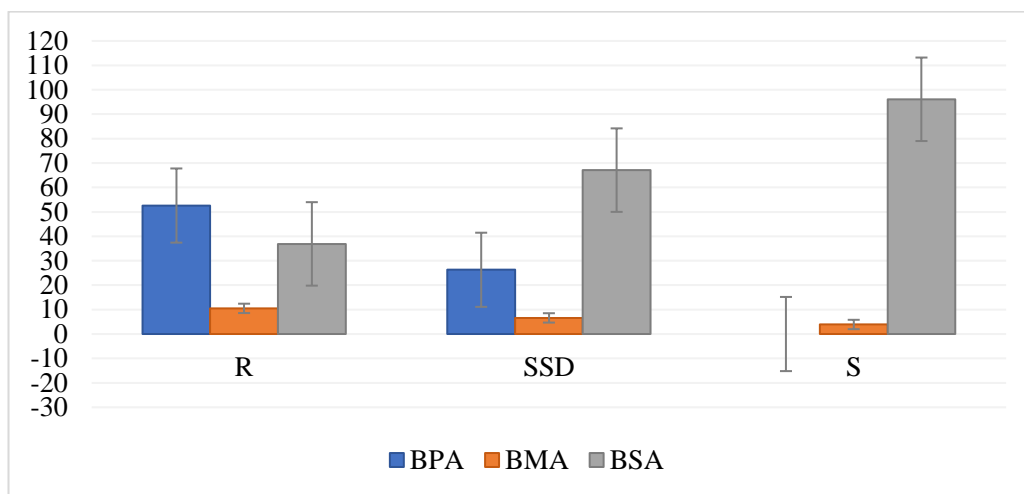


Fig. 3.11. Capacitatea de formare a biofilmelor a tulpinilor de *Candida* spp. rezistente și sensibile la fluconazol (%)

Izolatelor rezistente la 5-flucitozină au format, în principal, biofilm puternic aderent – 68,4% (Î 95% 66,3-70,6) din tulpini, 11,9% (Î 95% 9,8-14,1) au format biofilm moderat aderent și 19,7% (Î 95% 17,6-21,9) – biofilm slab aderent. Izolatelor sensibile la 5-flucitozină au format preponderent biofilme slab aderente – 97,4% (Î 95% 95,3-99,6) (Figura 3.12).

În urma analizei relației dintre capacitatea de formare a biofilmelor și rezistența la antifungice a tulpinilor de levuri din genul *Candida* s-a constatat că tulpinile rezistente au avut o capacitate semnificativ mai mare de formare a biofilmului – 89,5% (Î 95% 87,4-91,7, comparativ cu tulpinile sensibile – 44,1 (Î 95% 43,8-44,4) (Tabelul 3.5).

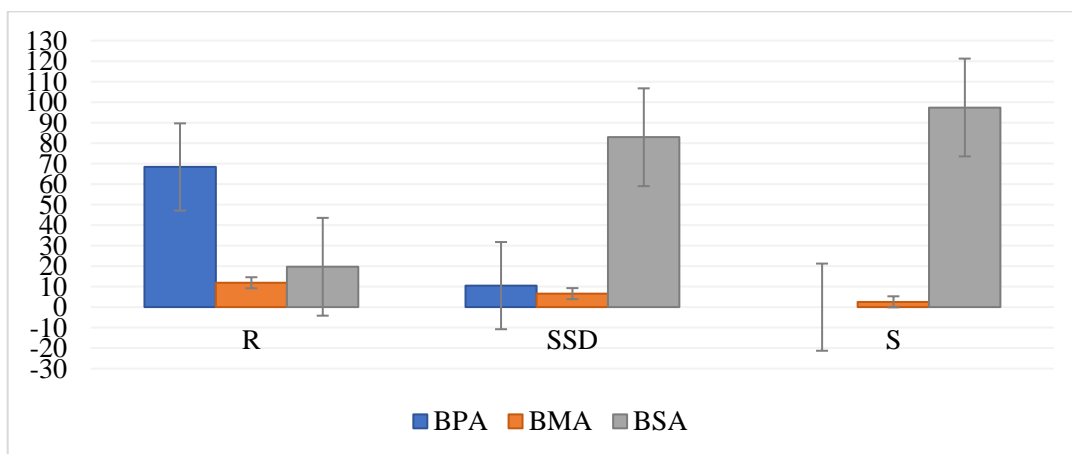


Fig. 3.12. Capacitatea de formare a biofilmelor a tulpinilor de *Candida* spp. rezistente și sensibile la 5-flucitozină (%)

La fel, tulpinile de levuri rezistente au format preponderent biofilme moderat aderente – 57,2 (Î 95% 56,0-58,4) și puternic aderente – 41,4 (Î 95% 40,4-42,4), pe când tulpinile sensibile la antifungice au format preponderent biofilme slab aderente – 60,0% (Î 95% 56,3-63,7).

Dintre tulpinile rezistente doar 10,5% (9,3-11,7) nu au format biofilm detectabil, iar dintre tulpinile sensibile – 55,9% (Î 95% 53,7-58,1).

Tabelul 3.5. Relația dintre capacitatea de formare a biofilmelor și rezistența la antifungice a izolatelor de *Candida* spp.

Capacitatea de formare a biofilmelor	Profilurile de sensibilitate la antifungice ale izolatelor de <i>Candida</i> spp.		
	Tulpini izolate (n=355)	Inclusiv	
		Sensibile 28,7% (102/355)	Rezistente 45,6% (162/355)
	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)
Formare de biofilme	277 (78,0; 77,5-78,5)	45 (44,1; 43,8-44,4)	145 (89,5; 89,0-90,0)
-biofilm puternic aderent	124 (44,8; 43,8-45,9)	4 (8,9; 7,8-10,0)	60 (41,4; 40,4-42,4)
-biofilm moderat aderent	119 (43,0; 41,9-44,1)	14 (31,1; 30,7-31,7)	83 (57,2; 56,0-58,4)
-biofilm slab aderent	34 (12,2; 10,2-14,2)	18 (60,0; 56,3-63,7)	2 (1,4; 0,1-2,5)

Conform datelor obținute la studierea factorilor de patogenitate ai speciilor de *Candida* izolate din biosubstraturile clinice, nivelul de exprimare a acestora este mai mare la izolatele rezistente la antifungice, comparativ cu cele sensibile la aceste preparate.

3.4. Concluzii la capitolul 3

1. Evaluarea distribuției speciilor de *Candida* izolate din biosubstraturile cercetate atestă predominarea *Candida albicans* cu o pondere de 61,5% (Î95% 59,4-63,7), comparativ cu speciile de *Candida non-albicans* identificate în 38,5% (Î95% 36,4-40,7) din probe. Această distribuție a speciilor de candidide este o consecință a lipsei metodologiilor standardizate și a echipamentelor performante de identificare a speciilor de fungi sau o reflectare a ponderii reale a acestor specii de levuri în arealul geografic al țării.
2. Izolatele clinice de levuri au demonstrat niveluri diferite de rezistență la antifungice în funcție de biosubstraturi și speciile de *Candida* cercetate. 20% (Î95% 19,5-20,5) dintre tulpini s-au dovedit a fi sensibile la doze înalte de preparat și rezistente la caspofungină, 19,0% (Î95% 16,9-21,2) au fost rezistente la fluconazol și 15,5% (Î95% 15,1-15,9) – la itraconazol. Fungii levuriformi au prezentat

sensibilitate înaltă la amfotericina B în 93,5% (ÎI95% 93,2-93,8) din cazuri și la 5-flucitozină – 93,1% (ÎI95% 92,8-93,4) din cazuri.

3. Studiarea fenotipică a factorilor de patogenitate ai levurilor nu a arătat diferențe semnificative în expresia lor în funcție de biosubstrat și de specia testată. Totodată, la *C. albicans* au fost semnalate rate de exprimare mai înalte ale enzimelor, comparativ cu *Candida non-albicans*, ceea ce reflectă rolul factorilor enzimatici în patogenitatea infecțiilor fungice invazive și implicarea acestor specii în dezvoltarea formelor severe de boală și a complicațiilor.
4. Analiza rezultatelor expresiei factorilor de patogenitate la speciile de *Candida non-albicans* a scos în evidență unele diferențe privind gradul de exprimare. Astfel, *C. tropicalis* a prezentat cel mai frecvent activitate esterazică, *C. glabrata* – activitate hemolizinică și capacitatea de inactivare a lizozimului, *C. krusei* – activitate hemolizinică și capacitate de inactivare a complementului. Enzimele detectate denotă capacitatea de supraviețuire a fungilor, implicarea lor în invazie și evitarea răspunsului imun al gazdei.
5. Izolatele cercetate au prezentat și o capacitate înaltă de inactivare a complementului și lizozimului, proprietăți ce asigură persistența în procesul infecțios. Astfel, activitate anticomplementară au demonstrat 228 de izolate (93,4%; ÎI 95% 91,3-95,6), 142 (62,3%; ÎI 95% 60,2-64,5), inactivând complementul la o concentrație mai mare de 15 UH50/ml. Lizozimul a fost inactivat de 95,9% (ÎI 95% 95,3-96,5) din tulpini, majoritatea (53,4%; ÎI 95% 40,5-66,3) prezentând grad mediu de exprimare a activității antilizozim.
6. Producerea de biofilme microbiene a fost înregistrată la 52,9% (ÎI 95% 50,8-55,1) din izolatele clinice, dintre care 46,5% (ÎI 95% 33,5-59,5) s-au dovedit a fi producătoare de biofilm puternic aderent, 12,4% (ÎI 95% 0,9-23,9) – de biofilm moderat aderent și 41,1% (ÎI 95% 19,6-62,6) – de biofilm slab aderent. Prezența biofilmului necesită evaluarea diferitor strategii de prevenire și de control a colonizării suprafețelor și de formare a biofilmelor.

4. ACTIVITATEA ANTIFUNGICĂ A UNOR NOI COMPUȘI CHIMICI ȘI BIOLOGICI DE INTERES FARMACEUTIC

4.1. Activitatea antifungică a compușilor noi asupra tulpinilor tip de fungi

Evaluarea activității antifungice a compușilor noi se concentrează în mare măsură pe activitatea fungistatică a acestora, adică pe capacitatea lor de a inhiba creșterea și dezvoltarea fungilor. Activitatea unui compus individual poate varia mult în funcție de specia de fungi, asupra căreia se acționează. La compararea activității noilor compuși este important să se compare valorile activității obținute pentru diferiți compuși cu aceeași specie de fungi, iar în mod ideal, cu tulpini tip. Cele trei tehnici principale utilizate pentru cuantificarea activității fungistatice sunt: măsurarea zonei de inhibiție a creșterii, evaluarea concentrației minime de inhibiție (CMI și calculul procentului de inhibare al creșterii). În mod ideal, studiile orientate spre identificarea noilor agenți chimici și naturali cu proprietăți antifungice trebuie să includă mai multe specii de fungi pentru a permite indentificarea compușilor cu activitate antifungică generalizată. În același timp, CMI este cel mai fiabil indicator cantitativ pentru a realiza o comparație adecvată între diferite studii.

Pentru ca rezultatele obținute să fie comparabile cu rezultatele altor cercetări, a fost evaluată activitatea antifungică a compușilor noi, de origine chimică și biologică, în raport cu tulpinile tip de fungi levuriformi. Astfel, în calitate de obiecte de studiu au fost utilizate următoarele tulpini: *Candida albicans* ATCC 90028, *Candida parapsilosis* ATCC 22019, *Candida krusei* ATCC 6258, *Candida glabrata* ATCC 2001, *Candida lusitaniae* ATCC 34449, *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 4098, *Meyerozyma guilliermondii* ATCC 4098 și *Cryptococcus neoformans* ATCC 13690. Pentru toți compușii chimici și biologici testați a fost determinată și CMF, în raport cu toate cele opt tulpini tip luate în studiu.

În screening-ul primar au fost incluși 84 de compuși chimici noi din două grupe. În grupa A au intrat compuși coordinați ai metalelor 3d cu tiosemicarbazone, aldehide și cetone, iar în grupa B – compușii coordinați ai metalelor 3d cu aminoguanazonă, aldehide și cetone. În conformitate cu rezultatele screening-ului primar, din prima grupă au fost selectați 11 compuși, iar din cea de-a doua – un compus. Acești compuși au fost incluși în cercetările efectuate ulterior.

Valorile CMI și CMF ale compușilor selectați în raport cu tulpinile tip din genul *Candida* sunt prezentate pe Tabelul 4.1.

Activitatea antifungică a compușilor din grupa A a fost foarte pronunțată, iar compusul din grupa B (cloro-{2-[(3-metil-5-oxo-1-fenil-4,5-dihidro-1h-pirazol-4-il)-(fenil)metilidene]-hidra-zin-carboximidamido}cupru) (B. I (1.83)) a fost mai puțin activ comparativ cu ceilalți compuși testați, fiind un inhibitor de 4-260 ori mai slab. Cele mai mici valori pentru CMI și CMF au fost obținute

în cazul compusului bromo {N-ciclohexil-N'-[fenil(piridin-2-il)metiliden]carbamohidrazono-
tioat}cupru (A. I (1.7)) în raport cu tulpina *Candida lusitaniae* ATCC 34449.

**Tabelul 4.1. Activitatea antifungică a compușilor chimici selectați față de tulpinile tip din
genul *Candida* (CMI, CMF, µg/ml)**

Compusul testat	<i>C. albicans</i> ATCC 90028		<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019		<i>C. lusitaniae</i> ATCC 34449		<i>C. krusei</i> ATCC 6258		<i>C. glabrata</i> ATCC 2001	
	CMI	CMF	CMI	CMF	CMI	CMF	CMI	CMF	CMI	CMF
C ₁₄ H ₁₉ CuN ₅ O ₃ S	0,97	1,95	0,97	1,95	0,97	0,97	0,24	0,48	3,90	3,90
C ₁₉ H ₂₁ BrCuN ₄ S	0,97	1,95	0,97	1,95	0,06	0,06	0,97	0,97	0,97	1,95
C ₁₇ H ₁₉ CuN ₅ O ₃ S	0,48	0,97	0,97	0,97	0,48	0,48	0,48	0,97	1,95	3,90
C ₁₇ H ₁₇ ClCuN ₄ O ₂ S	0,97	1,95	1,95	1,95	1,95	1,95	1,95	3,90	3,90	7,81
C ₄₀ H ₃₈ CuO ₈ S ₃ N ₄ S ₃	15,62	31,25	31,25	62,50	15,6 2	31,25	15,6 2	31,25	31,25	62,50
C ₁₃ H ₁₆ C ₁₂ CuN ₄ S	1,95	3,90	1,95	1,95	31,2 5	31,25	1,95	3,90	15,62	15,62
C ₁₆ H ₂₁ CuN ₃ O ₃ S	31,25	62,50	62,50	125,0	15,6 2	31,25	31,2 5	31,25	62,50	62,50
C ₁₇ H ₁₆ N ₆ OS ₂	0,97	1,95	0,97	0,97	0,48	0,48	0,48	0,97	1,95	3,90
C ₁₄ H ₁₅ Br ₂ CuN ₃ O ₃ S	15,62	31,25	31,25	31,25	15,6 2	15,62	15,6 2	15,62	31,25	62,50
C ₁₈ H ₂₀ CuN ₄ O ₂ S	7,81	15,62	15,62	31,25	7,81	15,62	3,90	15,62	31,25	62,50
C ₁₀ H ₁₃ CuN ₅ O ₂ S	31,25	62,50	31,25	31,25	15,6 2	31,25	15,6 2	31,25	31,25	31,25
C ₁₈ H ₁₇ ClCuN ₆ O	125,0	250,0	125,0	250,0	250, 0	250,0	125, 0	125,0	125,0	250,0
Martor Amphotericină B	0,12	0,25	0,12	2,0	1,0	4,0	0,5	0,5	1,0	2,0

În acest caz particular, valorile CMI și CMF sunt minimale și au constituit 0,06 µg/ml. Este de menționat că acest compus s-a arătat a fi destul de eficient în raport cu toate cele cinci tulpini tip de fungi din genul *Candida* luate în studiu. Cu excepția *Candida lusitaniae* ATCC 34449, CMI pentru celelalte tulpini a fost de 0,97 µg/ml, iar CMF – între 0,97 și 1,95 µg/ml.

Rezultate foarte promițătoare au fost obținute și pentru compusul nitrato{N-ciclohexil-N'-
[(1-(piridin-2-il)etiliden]carbamohidrazono}cupru (A. I (1.6)) în raport cu tulpina *C. krusei*
ATCC 6258. În acest caz, CMI este de 0,24 µg/ml, iar CMF – de 0,48 µg/ml. În raport cu trei

dintre tulpinile testate, și anume *C. albicans* ATCC 90028, *C. parapsilosis* ATCC 22019 și *C. lusitaniae* ATCC 34449 valorile CMI și CMF ale acestui compus sunt între 0,97 și 1,95 μg/ml. Puțin mai mari sunt valorile obținute în raport cu tulpina *C. glabrata* ATCC 2001, atât CMI, cât și CMF fiind de 3,90 μg/ml.

Următorii compuși după nivelul de activitate antifungică față de tulpinile de *Candida* sunt nitrato{N-tert-butil-N[fenil(piridin-2-il) metiliden]carbamo-hidrazono- tioat}cupru (A. I (1.13)), cloro{N-[4-(etoxycarbonil)fenil]-N'-[(1-(piridin-2-il)etiliden]carbamo-hidrazonotioato} cupru (A. I (1.24)) și 2-[(2-hidroxi-fenil) metiliden]-N-[4-(3-metil-5-sulfanil-4H-1,2,4-triazol-4-il)fenil] hidrazin-1-carbotioamidă (A. V (5.60)). În cazul primului dintre acești trei compuși, valorile CMI în raport cu tulpinile de *Candida* se înscriu între 0,48 și 0,97 μg/ml, iar cele ale CMF – între 0,48 și 3,9 μg/ml. În cazul compusului cloro{N-[4-(etoxycarbonil)fenil]-N'-[(1-(piridin-2-il)etiliden]carbamo-hidrazonotioato} cupru (A. I (1.24)) valorile CMI sunt între 0,97 și 3,9 μg/ml, iar cele ale CMF – între 1,95 și 7,81 μg/ml. CMI pentru 2-[(2-hidroxi-fenil) metiliden]-N-[4-(3-metil-5-sulfanil-4H-1,2,4-triazol-4-il)fenil] hidrazin-1-carbotioamidă (A.V. (5.60)) este cuprins în intervalul 0,48 – 1,95 μg/ml, iar CMF în intervalul 0,48-3,9 μg/ml.

Un alt grup, care include șase compuși din grupa A (Sulfatul de aqua-{N-(2-metoxifenil)-2-[fenil(piridin-2-il)metiliden]-hidrazincarbotioamido}cupru(II) (AII(2.52)); Dicloro{(prop-2-en-1-il)-N-(prop-2-en-1-il)-N'-[(piridin-2-il)metiliden]carbamo-hidrazonotioat}cupru (AIII(3.55)); Acetato{2-{[2-(ciclohexil-carbamo-tioil) hidraziniliden]metil}fenolato}-cupru (A IV(4.57)); Acetato-(2,4-dibromo-6-[(metal-sulfanil)[(prop-2-en-1-yl)amino]-metiliden]hidraziniliden)metil] fenolato}cupru (A VI (6.64)); {N'-[(4-hidroxi-2-oxidofenil) metiliden]-N-prop-2-en-1-ilcarbamo-hidrazonotioato}(3,4-dimetilpiridin)cupru (A VII (7.71)) și [2-({[(prop-2-en-1-il)amino]-sulfido)metiliden]hidraziniliden)-propanoato}-(imidazol)cupru) (A VIII (8.82)) au arătat proprietăți antifungice la un nivel al CMI și al CMF între 1,95 și 62,50 μg/ml. Cea mai slabă activitate antifungică față de tulpinile din genul *Candida*, din această serie de compuși chimici, o are compusul din grupa B - Cloro-{2-[(3-methyl-5-oxo-1-phenyl-4,5-dihydro-1h-pyrazol-4-yl)-(phenyl) methylidene]-hydra-zin-carboximidamido}cupru, pentru care valorile CMI și CMF s-au încadrat în intervalul 125-250 μg/ml.

Tulpinile tip de *Candida* au manifestat un nivel diferit de sensibilitate față de compușii chimici testați Astfel, în cazul *C. glabrata* ATCC 2001 doar pentru un compus CMI este mai mică de 1 μg/ml, iar pentru alți trei compuși mai mică de 10 μg/ml, tulpina prezentând un nivel mai scăzut de sensibilitate comparativ cu celelalte patru tulpini luate pentru testare. Tulpina *C. krusei* ATCC 6258 a prezentat un nivel foarte înalt de sensibilitate la acțiunea antifungică a compușilor chimici testați. Astfel, CMI pentru patru dintre compuși a fost mai mică de 1 μg/ml,

iar pentru alți trei – mai mică de 10 $\mu\text{g/ml}$ și doar pentru doi dintre compuși CMI a fost mai mare de 30 $\mu\text{g/ml}$. Tulpinile *C. lusitaniae* ATCC 34449 și *C. parapsilosis* ATCC 22019 au manifestat aproximativ același grad de sensibilitate, cu un nivel al CMI de până la 1 $\mu\text{g/ml}$ pentru aceiași patru compuși și un nivel al CMF de până la 10 $\mu\text{g/ml}$ pentru unul și doi compuși respectiv. Cea mai sensibilă la acțiunea compușilor testați pare a fi tulpina *C. albicans* ATCC 90028, în cazul căreia CMI a cinci dintre compușii testați a fost de până la 1 $\mu\text{g/ml}$ și a doi compuși – mai mică de 10 $\mu\text{g/ml}$ (Figura 4.1).

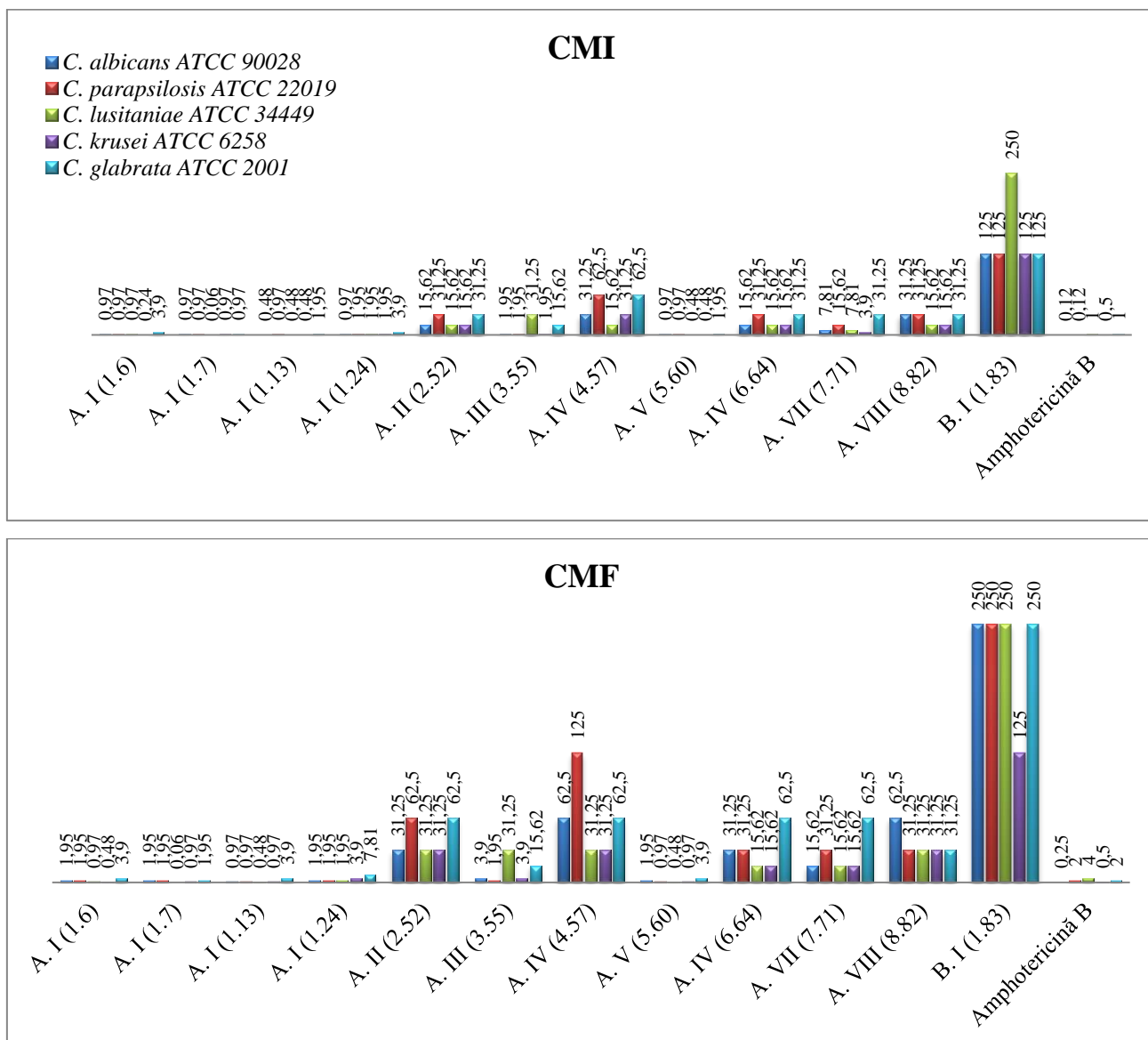


Fig. 4.1. Activitatea antifungică a compușilor coordinați selectați față de *Candida* spp., ($\mu\text{G/ml}$)

Astfel, au fost evidențiați cinci compuși chimici noi cu activitate antifungică înaltă, CMI fiind $< 1\mu\text{g/ml}$, iar $\text{CMF} < 10\mu\text{g/ml}$. Acești compuși sunt: Nitratonitro{N-ciclohexil-N'-[(1-(piridin-2-il)etiliden]carbamohidrazonotio-ato}cupru; Bromonitro{N-ciclohexil-N'-[fenil(piridin-2-il)metiliden]

carbamohidrazono-tioat}cupru; Nitrato{N-tert-butil-N'-[fenil(piridin-2-il)metiliden]carbamohidra-zono-tioat}cupru, cloro{N-[4-(etoxycarbonil)fenil]-N'-[(1-(piridin-2-il) etiliden] carbamo-hidrazonotioato}cupru și 2-[(2-Hidroxifenil)metiliden]-N-[4-(3-metil-5-sulfanil-4H-1,2,4-triazol-4-il)fenil]hidrazin-1-carbotioamidă.

Compușii analizați mai sus au prezentat activitate antifungică și față de tulpinile tip din genurile *Saccharomyces*, *Cryptococcus* și *Meyerozyma*. Rezultatele pot fi urmărite pe Tabelul 4.2.

Tabelul 4.2. Activitatea antifungică a compușilor chimici selectați față de tulpinile tip din genurile *Saccharomyces*, *Cryptococcus* și *Meyerozyma* (CMI, CMF, μg/ml)

Compusul testat	<i>S. cerevisiae</i> ATCC 4098		<i>M. guilliermondii</i> ATCC 6260		<i>C. neoformans</i> ATCC 13690	
	CMI	CMF	CMI	CMF	CMI	CMF
C ₁₄ H ₁₉ CuN ₅ O ₃ S	0,12	0,24	0,12	0,12	0,12	0,12
C ₁₉ H ₂₁ BrCuN ₄ S	0,06	0,48	0,24	0,97	0,97	0,97
C ₁₇ H ₁₉ CuN ₅ O ₃ S	0,97	0,97	0,24	0,48	0,97	1,95
C ₁₇ H ₁₇ ClCuN ₄ O ₂ S	0,48	0,97	0,24	0,97	0,97	1,95
C ₄₀ H ₃₈ CuO ₈ S ₃ N ₄ S ₃	31,25	62,50	15,62	15,62	62,50	62,50
C ₁₃ H ₁₆ C ₁₂ CuN ₄ S	1,95	15,62	31,25	62,50	0,97	1,95
C ₁₆ H ₂₁ CuN ₃ O ₃ S	15,62	31,25	7,81	15,62	15,62	15,62
C ₁₇ H ₁₆ N ₆ OS ₂	0,48	0,48	0,24	0,48	0,48	0,97
C ₁₄ H ₁₅ Br ₂ CuN ₃ O ₃ S	15,62	15,62	7,81	15,62	7,81	15,62
C ₁₈ H ₂₀ CuN ₄ O ₂ S	3,90	7,81	62,50	125,0	3,90	3,90
C ₁₀ H ₁₃ CuN ₅ O ₂ S	7,81	31,25	31,25	62,50	15,62	15,62
C ₁₈ H ₁₇ ClCuN ₆ O	125,0	125,0	>500,0	>500,0	>500,0	>500,0
Martor (Amfotericina B)	1,0	1,0	2,0	2,0	8,0	16,0

Ca și în cazul tulpinilor de *Candida*, compușii din grupa A au manifestat activitate antifungică înaltă și față de tulpinile tip din genurile *Saccharomyces*, *Cryptococcus* și *Meyerozyma*, iar compusul Cloro-{2-[(3-methyl-5-oxo-1-phenyl-4,5-dihydro-1h-pyrazol-4-yl)-(phenyl) methylidene]-hydra-zin-carboximidamido}cupru, care aparține grupei B a prezentat activitate față de tulpina *S. cerevisiae* ATCC 4098 cu valori egale pentru CMI și CMF de 125 μg/ml, și nu a prezentat activitate în limita concentrațiilor de până la 500 μg/ml. Dintre compușii din grupa A, cinci au arătat un nivel al CMI mai mic de 1 μg/ml față de *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 4098 și *Meyerozyma guilliermondii* ATCC 6260 (aceiași cinci compuși care au prezentat activitate antifungică înaltă față de tulpinile tip de *Candida*). Tulpina tip *Cryptococcus neoformans*

ATCC 13690 s-a dovedit a fi și mai sensibilă față de noii compuși testați. Astfel, șase dintre aceștia au arătat valori ale CMI mai mici de 1 μg/ml, iar doi – mai mici de 10 μg/ml.

Suplimentar la cei cinci compuși activi față de toate tulpinile de *Candida*, *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 4098 și *Meyerozyma guilliermondii* ATCC 6260, manifestă o activitate antifungică înaltă și compusul dicloro{(prop-2-en-1-il)-N-(prop-2-en-1-il)-N'-[(piridin-2-il)metili-den] carbamohidrazonotioat}cupru. Menționăm de asemenea că în cazul tulpinilor *S. cerevisiae* ATCC 4098, *M. guilliermondii* ATCC 6260, *C. neoformans* ATCC 13690 nu numai CMI are valori sub 1 μg/ml, ci și CMF este în același diapazon de concentrații. Astfel, aceste trei tulpini au manifestat sensibilitate foarte înaltă pentru compușii testați. Compusul {N'-[(4-hidroxi-2-oxidofenil)metiliden]-N-prop-2-en-1-ilcarbamohidrazonotioato}(3,4-dimetilpiridin)cupru, care a avut un nivel mediu de activitate față de tulpinile de *Candida*, s-a dovedit a fi mai activ față de *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 4098 și *C. neoformans* ATCC 13690. În cazul acestor două tulpini, CMI și CMF ale acestui compus au fost sub 10 μg/ml (Figura 4.2.).

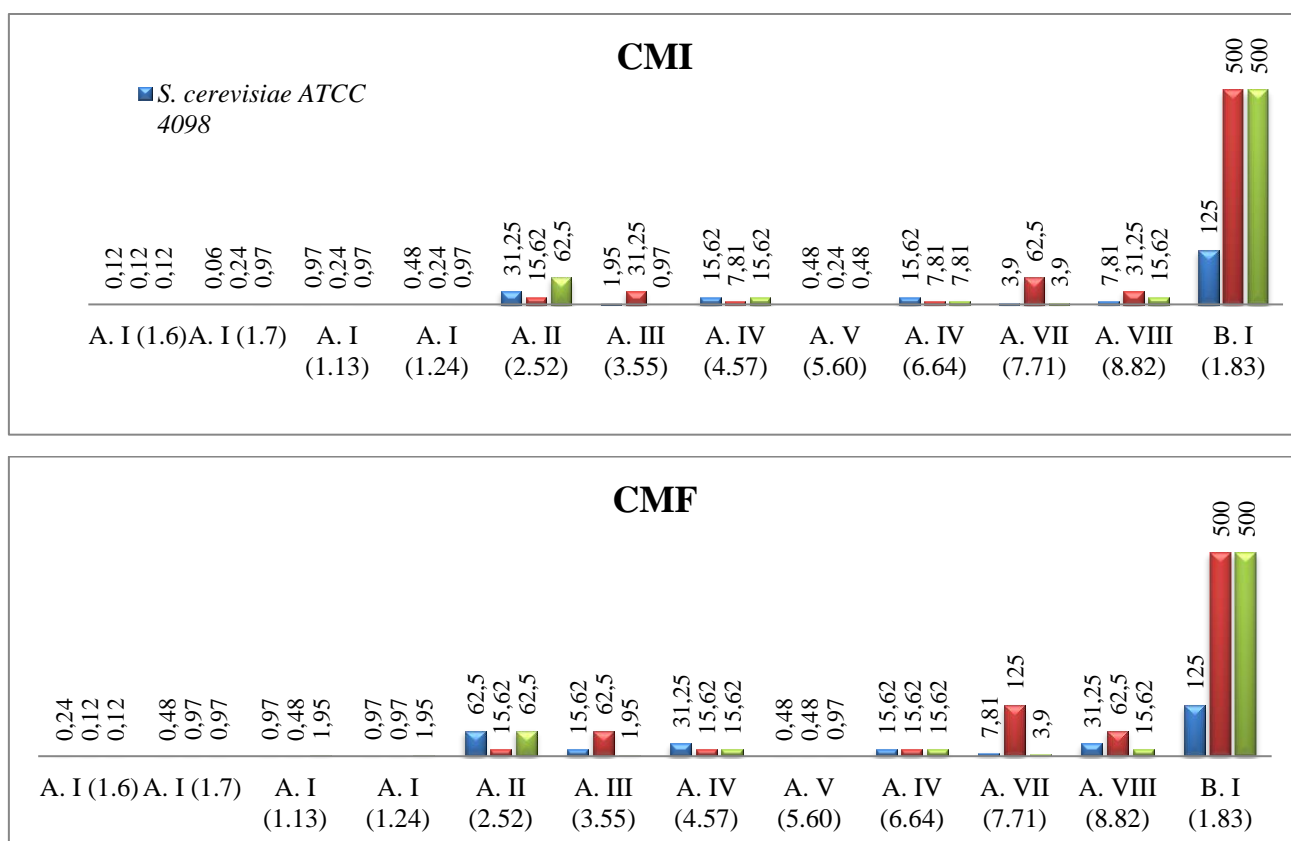


Fig. 4.2. Activitatea antifungică a compușilor coordinațivi selectați față de *Saccharomyces* spp., *Cryptococcus* spp. și *Meyerozyma* spp., (μg/ml)

Activitatea antifungică a compușilor analizați mai sus în raport cu cele opt tulpini de referință de fungi levuriformi a fost comparată cu activitatea antifungică a unui preparat antifungic

luat ca martor- amfotericina B. CMI pentru martor a variat, în funcție de tulpina de referință, de la 0.12 până la 8,0 $\mu\text{g/ml}$, iar CMF – între 0,25 și 16,0 $\mu\text{g/ml}$. În cazul a două tulpini de referință, și anume, în cazul *C. albicans* ATCC 90028 și *C. parapsilosis* ATCC 22019 nici unul dintre compușii chimici nu au demonstrat valori ale CMI mai mici comparativ cu cele caracteristice pentru martor. Față de tulpina *C. albicans* ATCC 90028, unul dintre compuși, $\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{CuN}_5\text{O}_3\text{S}$, a înregistrat valoarea CMI de 0,48 $\mu\text{g/ml}$. Trebuie menționat faptul că deși toate valorile obținute sunt comparabile, totuși CMI pentru compusul chimic este de patru ori mai mare decât CMI a amfotericinei B. Valorile CMF ale compușilor chimici în raport cu această tulpină au fost de asemenea mai mari comparativ cu valoarea CMF obținută pentru amfotericina B.

Față de tulpina *C. parapsilosis* ATCC 22019, compușii chimici au demonstrat valori ale CMI de minim opt ori mai mari comparativ cu cele ale amfotericinei B față de această tulpină de referință. Cu toate acestea, în raport cu tulpina dată compușii chimici din această grupă prezintă un interes practic important, valoarea CMF pentru șase dintre ei, și anume $\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{CuN}_5\text{O}_3\text{S}$, $\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{BrCuN}_4\text{S}$, $\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{CuN}_5\text{O}_3\text{S}$, $\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{ClCuN}_4\text{O}_2\text{S}$, $\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{C}_{12}\text{CuN}_4\text{S}$ și $\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{C}_{12}\text{CuN}_4\text{S}$, este mai mică comparativ cu valoarea CMF pentru compusul antifungic de referință.

Compușii chimici din grupa analizată mai sus au prezentat activitate antifungică înaltă comparativ cu amfotericina B în raport cu tulpina de referință *C. lusitaniae* ATCC 34449. În acest caz, spre deosebire de primele două tulpini de referință analizate, patru compuși au arătat un nivel mai ridicat de acțiune, atât după valorile CMI, cât și a CMF. Patru dintre compușii chimici testați, $\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{CuN}_5\text{O}_3\text{S}$, $\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{BrCuN}_4\text{S}$, $\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{CuN}_5\text{O}_3\text{S}$ și $\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{C}_{12}\text{CuN}_4\text{S}$, au avut CMI mai mică comparativ cu martorul. CMF pentru cinci dintre compușii chimici testați au fost mai mici comparativ cu CMF pentru amfotericina B în raport cu tulpina de referință *C. lusitaniae* ATCC 34449. În acest caz, la cei patru compuși, cu valori ale CMI mai mici ca martorul, se adaugă compusul $\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{ClCuN}_4\text{O}_2\text{S}$.

Față de tulpina de referință *C. krusei* ATCC 6258, compusul de referință amfotericina B a arătat aceleași valori atât pentru CMI, cât și pentru CMF - 0,5 $\mu\text{g/ml}$. În cazul acestei tulpini de referință de asemenea au fost identificați compuși chimici noi cu activitate mai mică sau egală cu cea a martorului. Astfel, trei dintre compuși au demonstrat valori ale CMI mai mici comparativ cu amfotericina B: $\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{CuN}_5\text{O}_3\text{S}$, $\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{CuN}_5\text{O}_3\text{S}$ și $\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{C}_{12}\text{CuN}_4\text{S}$. Primul dintre acești compuși a arătat și o activitate fungicidă mai înaltă, valoarea CMF pentru acest compus fiind la nivelul martorului. În raport cu tulpina *C. glabrata* ATCC 2001 doar unul dintre compușii chimici testați din acest grup a demonstrat o activitate antifungică mai bună, comparativ cu amfotericina B. Acest compus este $\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{BrCuN}_4\text{S}$, cur valori ale CMI și ale CMF de 0.95 și de 1,95 $\mu\text{g/l}$, respectiv.

În cazul tulpinilor non-candida, performanțele antifungice ale compușilor chimici testați au fost mai pronunțate și în multe cazuri mai bune comparativ cu martorul. Cinci dintre compușii testați – $C_{14}H_{19}CuN_5O_3S$, $C_{19}H_{21}BrCuN_4S$, $C_{17}H_{19}CuN_5O_3S$, $C_{17}H_{17}ClCuN_4O_2S$ și $C_{17}H_{16}N_6OS_2$ – au arătat valori mai mici atât pentru CMI, cât și pentru CMF, comparativ cu valorile respective pentru amfotericina B. Valorile CMI și ale CMF pentru toți acești compuși în raport cu tulpinile *S. cerevisiae* ATCC 4098, *M. guilliermondii* ATCC 6260 și *C. neoformans* ATCC 13690 au fost, cu mici excepții, mai mici decât 1,0 $\mu\text{g/ml}$.

În cazul tulpinii *S. cerevisiae* ATCC 4098, valorile CMI și ale CMF pentru amfotericina B au fost de 1,0 $\mu\text{g/ml}$, iar CMI pentru cei cinci compuși chimici noi, identificați ca fiind de perspectivă, valoarea CMI a fost între 0,06 și 0,97 $\mu\text{g/ml}$, iar valoarea CMF – între 0,24 și 0,97 $\mu\text{g/ml}$. Față de tulpina *M. guilliermondii* ATCC 6260, amfotericina B a avut o acțiune de două ori mai slabă, comparativ cu activitatea antifungică față de *S. cerevisiae* ATCC 4098. Astfel, valorile CMI și ale CMF pentru amfotericina B față de tulpina *M. guilliermondii* ATCC 6260 au fost ambele de 2,0 $\mu\text{g/ml}$. În același timp, valorile CMI pentru cei cinci compuși chimici testați au fost între 0.12 și 0.24 $\mu\text{g/ml}$, iar valorile CMF – între 0.12 și 0.97 $\mu\text{g/ml}$. Rezultate foarte promițătoare prezintă compușii chimici noi în raport cu tulpina *C. neoformans* ATCC 13690, care a demonstrat un grad înalt de rezistență în raport cu antifungicul de referință – amfotericina B. Astfel, valorile CMI și ale CMF ale martorului în raport cu această tulpină au fost de 8,0 și de 16,0 $\mu\text{g/ml}$, respectiv. Față de tulpina *C. neoformans* ATCC 13690, pe lângă cei cinci compuși chimici noi menționați, o activitate mai pronunțată, comparativ cu martorul, au avut și alți trei compuși: $C_{13}H_{16}Cl_2CuN_4S$, $C_{14}H_{15}Br_2CuN_3O_3$ și $C_{18}H_{20}CuN_4O_2S$. Primul dintre cei trei compuși menționați a manifestat o activitate antifungică în raport cu tulpina *C. neoformans* ATCC 13690 la nivelul primilor cinci compuși analizați mai sus, în timp ce compusul $C_{18}H_{20}CuN_4O_2S$ a avut CMI de două ori mai mică comparativ cu martorul, iar CMF – de patru ori mai mică. Compusul $C_{14}H_{15}Br_2CuN_3O_3$ a demonstrat valori pentru CMI și pentru CMF practic egale cu cele ale martorului. În cazul acestui compus valoarea CMI a fost de 7,81 $\mu\text{g/ml}$, iar valoarea CMF – de 15,62 $\mu\text{g/ml}$, comparativ cu valorile de 8,0 și de 16,0 $\mu\text{g/ml}$, respectiv, pentru amfotericina B.

Încă unul dintre compuși, $C_{16}H_{21}CuN_3O_3S$, cu toate că a arătat o valoare a CMI de două ori mai mare ca martorul, a manifestat activitate fungicidă echivalentă cu amfotericina B, valoarea CMF fiind de 15,62 $\mu\text{g/ml}$.

În cadrul acestui studiu au fost identificați cinci compuși chimici noi ai cuprului cu tiosemicarbazone, aldehide și cetone care au avut activitate antifungală înaltă față de opt tulpini de fungi levuriformi din patru genuri, cu valori ale CMI de până la 1 $\mu\text{g/ml}$ și ale CMF de până la 10 $\mu\text{g/ml}$. Acești compuși sunt: nitrato{N-ciclohexil-N'-[(1-(piridin-2-il)etiliden]carba-

mohidrazonotio-ato}cupru; bromo{N-ciclohexil-N'-[fenil(piridin-2-il)metiliden]carbamohidrazono-tioat}cupru; nitrato{N-tert-butil-N'-[fenil(piridin-2-il)metiliden]carbamohidrazono-tioat}cupru; cloro{N-[4-(etoxycarbonil)fenil]-N'-[(1-(piridin-2-il)etiliden]carbamohidrazonotioato}cupru și 2-[(2-hid-roxifenil)metiliden]-N-[4-(3-metil-5-sulfanil-4H-1,2,4-triazol-4-il)fenil]hidrazin-1-carbotioamidă. Acești compuși chimici noi prezintă interes în calitate de potențiali candidați pentru dezvoltarea de preparate antifungice cu efecte direcționate asupra fungilor levuriformi.

Este cunoscut faptul că activitatea compușilor biologici este mai scăzută comparativ cu cea a compușilor chimici. În schimb, compușii biologici au alte puncte forte, cum ar fi: acceptarea de către pacienți mai mare față de acceptarea compușilor de sinteză, nivel minim sau lipsa completă a efectelor adverse, polifuncționalitate, care presupune acțiunea asupra mai multor ținte datorită matricei complexe ș.a.

În această lucrare au fost incluși pentru testare, similară cele descrise mai sus, și cinci compuși naturali, extracte din biomasa cianobacteriei *Spirulina*. Rezultatele cu referire la efectele acestor compuși asupra tulpinilor tip de fungi levuriformi sunt prezentate în Tabelele 4.3 și 4.4.

Extractele de spirulină au manifestat activitate antifungică față de tulpinile de referință din genul *Candida* la valori ale CMI de 0,62-1,25 mg/ml și ale CMF de 1,25-5,0 mg/ml. Extractul ES1, care este un complex sinergic din aminoacizi liberi și polipeptide cu masa moleculară de până la 10 kD, este cel mai activ, manifestându-și efectele la valori ale CMI de 0,62 mg/ml și ale CMF de 1,25 mg/ml pentru patru din cele cinci tulpini tip din acest gen. Doar în cazul tulpinii *C. krusei* ATCC 6258, CMI este mai mare și constituie 1,25 mg/ml, iar CMF – 2,5 mg/ml (Tabelul 4.3.).

Tabelul 4.3. Activitatea antifungică a compușilor naturali testați față de tulpinile tip din genul *Candida* (CMI, CMF, mg/ml)

Compusul	<i>C. albicans</i> ATCC 90028		<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019		<i>C. lusitaniae</i> ATCC 34449		<i>C. krusei</i> ATCC 6258		<i>C. glabrata</i> ATCC 2001	
	CMI	CMF	CMI	CMF	CMI	CMF	CMI	CMF	CMI	CMF
ES1	0,62	1,25	0,62	1,25	0,62	0,62	1,25	2,5	0,62	1,25
ES2	1,25	2,5	1,25	2,5	1,25	1,25	1,25	2,5	2,5	5,0
ES3	1,25	2,5	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	2,5	2,5	2,5
PCM1	0,007	0,01	0,007	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02	0,007	0,01
PCM2	0,004	0,009	0,004	0,009	0,009	0,009	0,009	0,02	0,004	0,009
Martor (Amfotericina B)	0,12	0,25	0,12	2,0	1,0	4,0	0,5	0,5	1,0	2,0

Cel de-al doilea extract de spirulină ES2 are o activitate puțin mai joasă față de tulpinile tip de *Candida* testate în această lucrare, iar valorile CMI pentru patru din cele cinci tulpini este de 1,25 mg/ml și valorile CMF – de 2,5 mg/ml. Doar pentru tulpina *C. glabrata* ATCC 2001, CMI și CMF sunt de două ori mai mari și constituie 2,5 și 5,0 mg/ml, respectiv.

Extractul de spirulină ES3 manifestă activitate similară extractului ES2. Este de menționat că în cazul extractului ES3 avem trei tulpini tip pentru care valorile CMI și ale CMF sunt egale și constituie 1,25 mg/ml pentru *C. parapsilosis* ATCC 22019 și *C. lusitaniae* ATCC 34449, și 2,5 mg/ml pentru tulpina *C. glabrata* ATCC 2001. O activitate antifungică mai pronunțată au avut preparatele carotenoide cu conținut de mixoxantofilă, care pot fi comparate cu compușii chimici analizați anterior. Astfel, CMI pentru preparatul PCM1 față de cele cinci tulpini de fungi de referință din genul *Candida* a fost între 7 și 10 $\mu\text{g/ml}$, iar a preparatului PCM 2 – 4-9 $\mu\text{g/ml}$. Valorile CMF pentru PCM 1 au fost între 10 și 20 $\mu\text{g/ml}$, iar pentru PCM 2 – de 9-20 $\mu\text{g/ml}$ (Figura 4.3.).

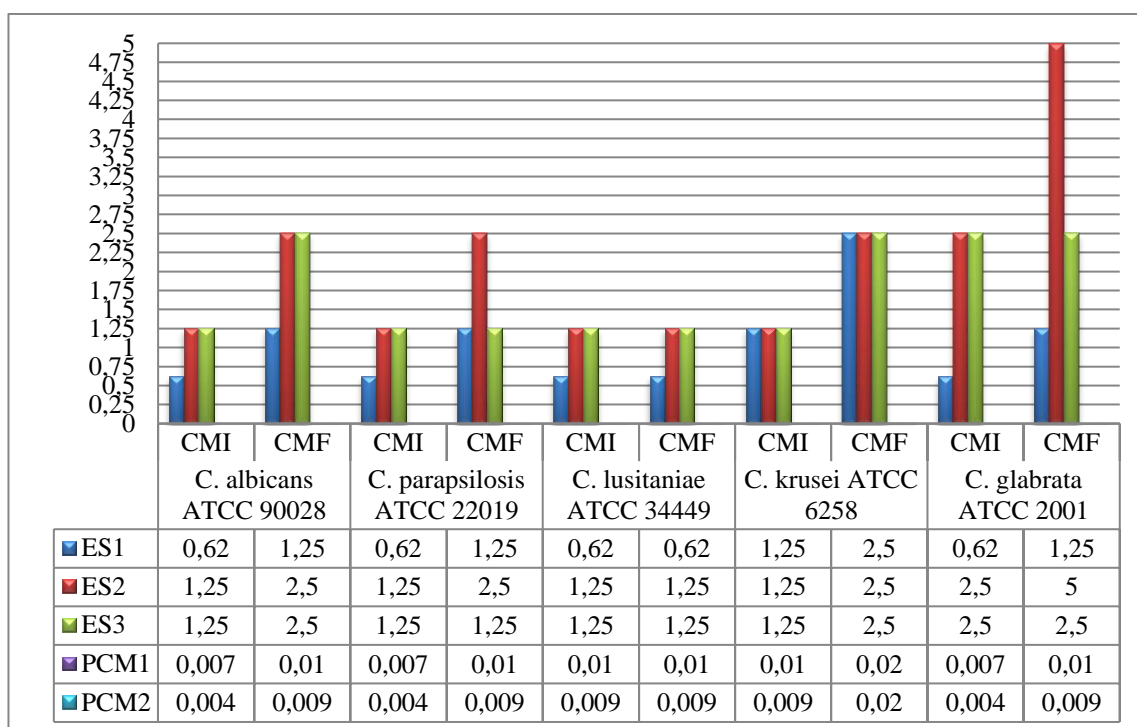


Fig. 4.3. Activitatea antifungică a compușilor naturali testați față de *Candida* spp., ($\mu\text{g/ml}$)

Activitatea compușilor de origine naturală față de cele cinci tulpini de fungi din genul *Candida* a fost comparată cu activitatea amfotericinei B, care a servit în calitate de martor pozitiv în cadrul acestor teste. În funcție de tulpină, valorile CMI pentru martor au variat între 0,12 și 1,0 $\mu\text{g/ml}$, iar valorile CMF – între 0,25 și 4,0 $\mu\text{g/ml}$. În cazul tulpinii *C. albicans* ATCC 90028, extractele de spirulină au avut o activitate mai joasă față de cea a martorului, valorile CMI și ale CMF fiind de 5-10 ori mai mari comparativ cu martorul. În schimb, preparatele carotinoide au fost

mult mai active, compartativ cu martorul, față de această tulpină – CMI a fost de 17 și 30 ori mai mică pentru preparatele PCM1 și PCM2, respectiv, iar CMF – de 25 și 27 ori mai mică, respectiv, comparativ cu valorile corespunzătoare înregistrate pentru amfotericina B.

În cazul tulpinii de referință *C. parapsilosis* ATCC 22019, observăm un tablou similar cu cel descris pentru tulpina *C. albicans* ATCC 90028, cu o diferență importantă. Astfel, în cazul tulpinii *C. parapsilosis* ATCC 22019 extractul de spirulină ES1 a demonstrat o valoare a CMF de 1,25 μg/ml, care este mai mică comparativ cu marorul – 2,0 μg/ml.

Tulpina de referință *C. lusitaniae* ATCC 34449 a demonstrat o sensibilitate mai mare la compușii chimici noi, comparabilă cu activitatea amfotericinei B față de această tulpină. Cu referire la valorile CMI pentru compușii naturali, pentru trei dintre aceștea, și anume ES1, PCM1 și PCM2, acestea au fost mai mici comparativ cu valoarea CMI a martorului (1,0 μg/ml) de 1,6 - 110 ori. Referitor la valorile CMF, toți compușii naturali au demonstrat valori mai mici ale acestui indicator valoros, comparativ cu valoarea respectivă înregistrată pentru amfotericina B. În cazul compusului PCM2, CMI a fost de peste 400 ori mai mică comparativ cu CMF a martorului.

Compușii naturali au manifestat același pattern de activitate comparativ cu martorul în raport cu tulpina *C. krusei* ATCC 6258, ca și cel menționat pentru *C. albicans* ATCC 90028. Astfel, în cazul acestei tulpini, doar extractele carotenoide au fost mai active, comparativ cu amfotericina B. În raport însă cu tulpina *C. glabrata* ATCC 2001. trei compuși naturali - ES1, PCM1 și PCM2 – au demonstrat valori mai mici atât pentru CMI, cât și pentru CMF, comparativ cu martorul.

În cazul extractului de spirulină, CMI și CMF au fost de 1,6 ori mai mici comparativ cu CMI și CMF ale martorului. Pentru compusul PCM1 și PCM2, valorile CMI au fost de 143 și de 250 ori mai mici comparativ cu CMI a amfotericinei B, iar valorile CMF pentru ambele extracte carotenoide au fost de aproximativ de 200 ori mai mici, comparativ cu CMF a martorului.

Acțiunea antifungică a compușilor naturali examinați se extinde și asupra tulpinilor tip din alte genuri: *Saccharomyces*, *Cryptococcus* și *Meyerozyma* (Tabelul 4.4). Astfel, extractul de spirulină ES1 are o activitate antifungică față de *Saccharomyces crevisiae* ATCC 4098 comparabilă cu acțiunea lui asupra tulpinilor tip din genul *Candida*. În acest caz, valorile CMI și ale CMF sunt egale cu 1,25 mg/ml. În schimb, activitatea față de tulpinile *C. neoformans* ATCC 13690 și *M. guilliermondii* ATCC 6260 este mai pronunțată.

CMI în aceste două cazuri este de 0,31 și de 0,07 mg/ml, respectiv, iar CMF este de 0,32 și de 0,31 mg/ml, respectiv. Extractul ES2 are o acțiune antifungică în raport cu tulpina *M. guilliermondii* ATCC 6260, egală cu acțiunea în raport cu tulpinile tip din genul *Candida*. În schimb, tulpinile *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 4098 și *Cryptococcus neoformans* ATCC

13690 sunt mult mai sensibile la acțiunea acestui extract. Astfel, CMI pentru cele două tulpini este de 0,15 și de 0,62 mg/ml, respectiv, iar CMF este de 0,62 și de 1,25 mg/ml, respectiv.

Tabelul 4.4. Activitatea antifungică a compușilor naturali testați față de tulpinile tip din genurile *Saccharomyces*, *Cryptococcus* și *Meyerozyma* (CMI,CMF, mg/ml)

Compusul testat	<i>S. cerevisiae</i> ATCC 4098		<i>M. guilliermondii</i> ATCC 6260		<i>C. neoformans</i> ATCC 13690	
	CMI	CMF	CMI	CMF	CMI	CMF
ES1	1,25	1,25	0,07	0,31	0,31	0,62
ES2	0,15	0,62	2,5	5,0	0,62	1,25
ES3	0,08	0,15	2,5	2,5	0,62	1,25
PCM1	0,003	0,007	0,01	0,02	0,007	0,01
PCM2	0,002	0,002	0,009	0,02	0,004	0,009
ES1	1,25	1,25	0,07	0,31	0,31	0,62
ES2	0,15	0,62	2,5	5,0	0,62	1,25
ES3	0,08	0,15	2,5	2,5	0,62	1,25
PCM1	0,003	0,007	0,01	0,02	0,007	0,01
PCM2	0,002	0,002	0,009	0,02	0,004	0,009
Martor (Amfotericina B)	1,0	1,0	2,0	2,0	8,0	16,0

CMI în aceste două cazuri este de 0,31 și de 0,07 mg/ml, respectiv, iar CMF este de 0,32 și de 0,31 mg/ml, respectiv. Extractul ES2 are o acțiune antifungică în raport cu tulpina *M. guilliermondii* ATCC 6260, egală cu acțiunea în raport cu tulpinile tip din genul *Candida*. În schimb, tulpinile *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 4098 și *Cryptococcus neoformans* ATCC 13690 sunt mult mai sensibile la acțiunea acestui extract. Astfel, CMI pentru cele două tulpini este de 0,15 și de 0,62 mg/ml, respectiv, iar CMF este de 0,62 și de 1,25 mg/ml, respectiv.

Cele mai pronunțate efecte antifungice au fost observate în cazul aplicării extractului ES3 în raport cu tulpina *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 4098, pentru care valoarea CMI este de 0,08 mg/ml, iar valoarea CMF – de 0,15 mg/l. Acțiunea acestui extract asupra tulpinii *Cryptococcus neoformans* ATCC 13690 este similară acțiunii extractului ES2 față de aceeași tulpină.

Preparatele carotenoide cu mixoxantofilă au efecte antifungice pronunțate față de toate cele trei tulpini de referință analizate. Cea mai mare sensibilitate o manifestă tulpina *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 4098, față de care CMI pentru PCM 1 este de 0,003 mg/ml și CMF – 0,007 mg/ml, iar pentru PCM 2, CMI și CMF au valori identice, egale cu 0,002 mg/ml (Figura 4.4).

Compararea acțiunii antifungice a compușilor de origine naturală asupra tulpinilor de referință *non-candida* cu acțiunea martorului – amfotericina B – a pus în evidență valoarea rezultatelor obținute. Astfel, rezultatele arată că acțiunea preratatelelor de origine naturală o poate depăși pe cea a martorului pozitiv de sute de ori. Valorile CMI și ale CMF pentru amfotericina B,

în raport cu tulpina *S. cerevisiae* ATCC 4098, au fost egale cu 1,0 µg/ml, iar patru din cinci compuși naturali testați (cu excepția extractului ES1) au arătat o activitate mai eficientă, comparativ cu martorul pozitiv. Pentru extractul de spirulină ES2, valoarea CMI a fost de 6,7 ori mai mică comparativ cu valoarea respectivă a matorului, iar valoarea CMF – de 1,6 ori mai mică.

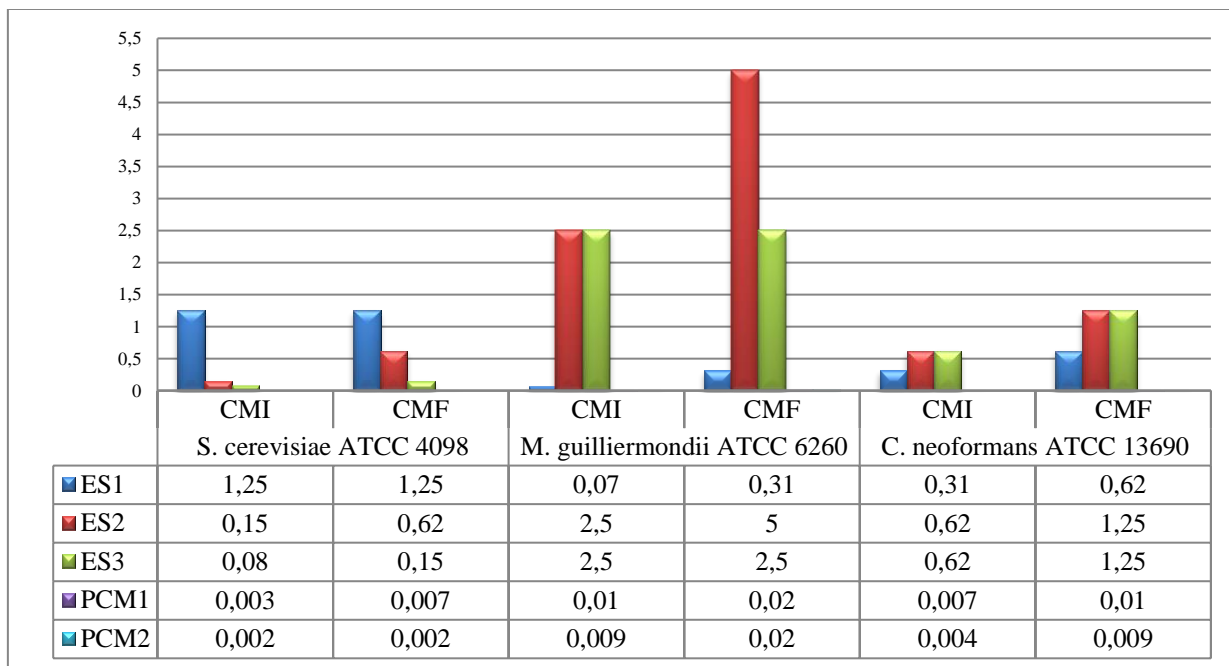


Fig. 4.4. Activitatea antifungică a compușilor naturali testați față de *Saccharomyces* spp., *Cryptococcus* spp. și *Meyerozyma* spp., (µg/ml)

Compararea acțiunii antifungice a compușilor de origine naturală asupra tulpinilor de referință *non-candida* cu acțiunea matorului – amfotericina B – a pus în evidență valoarea rezultatelor obținute. Astfel, rezultatele arată că acțiunea preratatele de origine naturală o poate depăși pe cea a matorului pozitiv de sute de ori. Valorile CMI și ale CMF pentru amfotericina B, în raport cu tulpina *S. cerevisiae* ATCC 4098, au fost egale cu 1,0 µg/ml, iar patru din cinci compuși naturali testați (cu excepția extractului ES1) au arătat o activitate mai eficientă, comparativ cu matorul pozitiv. Pentru extractul de spirulină ES2, valoarea CMI a fost de 6,7 ori mai mică comparativ cu valoarea respectivă a matorului, iar valoarea CMF – de 1,6 ori mai mică.

Mult mai impresionante sunt rezultatele comparării efectului matorului pozitiv față de efectul extractelor carotenoide. Astfel, CMI pentru preparatele naturale PCM1 și PCM2 au fost de 330 și de 500 ori, respectiv, mai mici comparativ cu CMI a amfotericinei B, iar CMF pentru aceste două preparate a fost de 140 și de 150 ori, respectiv, mai mici față de CMF a matorului pozitiv.

Extractul de spirulină ES1, care nu a rezistat comparației cu matorul pozitiv la tulpina *S. cerevisiae* ATCC 4098, s-a manifestat în cazul tulpinii *M. guilliermondii* ATCC 6260. CMI pentru ES1 în raport cu această tulpină a fost de 28 mai mică față de CMI a matorului, iar valoarea CMF

– de 6,5 ori mai mică. De asemenea, activitate antifungică mai pronunțată decât martorului pozitiv asupra acestei tulpini de referință au avut și preparatele carotenoide PCM1 și PCM2. În cazul acestora, valorile CMI au fost de 200 și de 210 ori mai mici, respectiv, comparativ cu CMI a amfotericinei B, iar valoarea CMF a fost de 100 ori mai mică pentru ambele preparate.

Anterior s-a menționat că tulpina *C. neoformans* ATCC 13690 manifestă rezistență față de acțiunea amfotericinei B, CMI a martorului fiind de 8,0 $\mu\text{g/ml}$, iar CMF – de 16,0 $\mu\text{g/ml}$. În acest sens, și preparatele de origine naturală sunt de perspectivă în calitate de preparate antifungice aplicate contra acestui patogen. Este de menționat că atât extractul de spirulină ES, cât și preparatele carotenoide au demonstrat activitate antifungică mult mai pronunțată față de această tulpină decât martorul pozitiv. Extractele de spirulină au arătat valori ale CMI și ale CMF de zeci de ori mai mici, în timp ce preparatele carotenoide – de mii de ori mai mici comparativ cu amfotericina în raport cu tulpina *C. neoformans* ATCC 13690. Dintre extractele de spirulină cel mai activ a fost ES1, care a demonstrat în raport cu tulpina dată valori pentru CMI și pentru CMF de 25,8 ori mai mici comparativ cu valorile respective obținute pentru martorul pozitiv. În cazul celorlalte două extracte de spirulină – ES2 și ES3 –, performanța lor a depășit-o pe cea a martorului de 12,8 ori pentru ambii indicatori monitorizați. Preparatele carotenoide au demonstrat o activitate antifungică în raport cu *C. neoformans* ATCC 13690 care o depășește cu mult pe cea a amfotericinei B. Astfel, CMI a preparatelor PCM1 și PCM2 a fost de 1140 și de 2000 ori, respectiv, mai mici comparativ cu CMI a martorului pozitiv, iar valorile CMF de 1600 și de 1778 ori, respectiv, mai mici comparativ cu amfotericina B. Așadar, datele obținute demonstrează nu doar activitatea antifungică a compușilor testați, dar și avantajele acestora în materie de activitate în raport cu un preparat antifungic recunoscut – amfotericina B.

Cercetările descrise în acest compartiment au finalizat cu identificarea a cinci compuși chimici și două complexe de origine naturală care manifestă activitate antifungică față de toate tulpinile tip de fungi levuriformi luați în cercetare. Valorile CMI ale compușilor chimici față de aceste tulpini sunt sub 1 $\mu\text{g/ml}$, iar ale compușilor de origine naturală – sub 10 $\mu\text{g/ml}$. Asemenea valori sunt considerate a fi foarte bune, iar compușii cu asemenea performanțe se consideră de perspectivă la dezvoltarea de produse antimicotice noi cu mecanisme de acțiune variate.

4.2. Evaluarea acțiunii antifungice a compușilor chimici și biologici testați față de tulpinile izolate din biosubstraturi umane

Este cunoscut faptul că tulpinile clinice pot avea un nivel de rezistență diferit de cel al tulpinilor tip la acțiunea compușilor antifungici, de aceea toți cei 12 compuși examinați în subcapitolul 4.1 au fost testați și în raport cu tulpinile clinice de fungi levuriformi. În total, în calitate de obiecte de studiu, au servit câte 50 de tulpini care se referă la trei specii: *Candida*

albicans, *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata*. Dintre cei 12 compuși chimici, șase s-au dovedit a fi activi în raport cu tulpinile clinice din cele trei specii de fungi levuriformi. Varole CMI și ale CMF obținute pentru acești compuși, exprimate în valoare medie±deviația standard, sunt prezentate pe Tabelul 4.5.

Tulpinile clinice de *Candida albicans* s-au dovedit a fi mai sensibile la acțiunea antifungică a compușilor chimici noi cu conținut de cupru. Pentru cinci din șase compuși, valoarea CMI este mai mică de 10 μg/ml, inclusiv pentru unul dintre compușii chimici noi – nitrato{N-tert-butil-N'-[fenil(piridin-2-il)metiliden]carbamo-hidrazono-tioat}cupru valoarea CMI este mai mică de 1 μg/ml. Un singur compus chimic – {N'-[(4-hidroxi-2-oxidofenil)metiliden]-N-prop-2-en-1-ilcarbamo-hidrazono-tioato}(3,4-dimetilpiridin)cupru – a avut CMI, în raport cu tulpinile clinice de *Candida albicans*, egală cu 16,6 μg/ml. Activitatea antifungică a compușilor chimici față de tulpinile clinice ale acestei specii este demonstrată și de valorile destul de joase ale CMF.

Astfel, pentru patru dintre compușii evidențiați (nitrato{N-ciclohexil-N'-[(1-(piridin-2-il)etiliden] carbamo-hidrazono-tioato}cupru; bromo{N-ciclohexil-N'-[fenil(piridin-2-il)metiliden]carbamo-hidrazono-tioat} cupru; nitrato{N-tert-butil-N'-[fenil(piridin-2-il)metiliden]carbamo-hidrazono-tioat}cupru; dicloro{(prop-2-en-1-il)-N-(prop-2-en-1-il)-N'-[(piridin-2-il)metiliden] carbamo-hidrazono-tioat} cupru) valoarea CMF este mai mică de 10 μg/ml.

Aceiași patru compuși menționați mai sus au manifestat activitate antifungică foarte înaltă și față de tulpinile clinice de *Candida parapsilosis*, înregistrând pentru CMI și CMF valori mai mici decât 10 μg/ml. În cazul acestor tulpini, valorile CMI și CMF sunt foarte apropiate, practic egale, pentru trei din cei patru compuși, iar diferențele dintre cei doi parametri sunt statistic neveridice. Doi compuși: acetato-(2,4-dibromo-6-[(metal-sulfanil)[(prop-2-en-1-yl)amino]-metiliden] hidraziniliden) metil]feno-lato) cupru și {N'-[(4-hidroxi-2-oxidofenil)metiliden]-N-prop-2-en-1-ilcarbamo-hidrazono-tioato} (3,4-dimetilpiridin) cupru de asemenea au avut activitate antifungică față de tulpinile clinice ale speciei *Candida parapsilosis*, dar valorile CMI și ale CMF sunt mai mari. Astfel, în cazul compusului acetato-(2,4-dibromo-6-[(metal-sulfanil)[(prop-2-en-1-yl)amino]-metiliden] hidraziniliden) metil]feno-lato) cupru, CMI este de 33,75 μg/ml, iar CMF – 35,0 μg/ml. Cel de-al doilea compus are CMI în raport cu *Candida parapsilosis* mai mică – 16,6, iar CMF – 32,5 μg/ml.

Tulpinile clinice ce aparțin speciei *Candida glabrata* au demonstrat sensibilitate pronunțată față de trei dintre compușii testați - nitrato{N-ciclohexil-N'-[(1-(piridin-2-il)etiliden] carbamo-hidrazono-tioato}cupru; bromo{N-ciclohexil-N'-[fenil(piridin-2-il)metiliden]carbamo-hidrazono-tioat} cupru și nitrato{N-tert-butil-N'-[fenil(piridin-2-il)metiliden]carbamo-hidrazono-tioat}cupru.

În cazul acestor compuși, valoarea medie a CMI, obținută la testarea pe 50 de tulpini clinice, a fost mai mică de 10 µg/ml, la fel și valoarea medie a CMF. Pentru compusul dicloro{(prop-2-en-1-il)-N-(prop-2-en-1-il)-N'-[(piridin-2-il)metili-den]carbamohidrazonotioat} cupru, în raport cu tulpinile clinice care se referă la specia *Candida glabrata*, s-au înregistrat valori medii ale CMI și ale CMF în jur de 20 µg/ml, diferențele dintre acești doi parametri fiind nesemnificative din punct de vedere statistic.

Tabelul 4.5. Activitatea antifungică a compușilor chimici testați față de tulpinile clinice de *Candida* (CMI, CMF, µg/ml)

Parametrul cercetat	<i>Candida albicans</i>		<i>Candida parapsilosis</i>		<i>Candida glabrata</i>	
	N=50		N=50		N=50	
	Media	Deviația standard	Media	Deviația standard	Media	Deviația standard
C₁₄H₁₉CuN₅O₃S (A. I (1,6))						
CMI	1,303	0,469	1,322	0,475	2,379	0,816
CMF	2,379	0,816	1,401	0,598	4,290	1,182
C₁₉H₂₁BrCuN₄S (A. I (1,7))						
CMI	1,283	0,574	1,303	0,468	1,263	0,567
CMF	2,145	0,590	2,262	0,722	2,34	0,787
C₁₇H₁₉CuN₅O₃S (- A. I (1,13))						
CMI	0,587	0,205	1,166	0,395	2,34	0,787
CMF	1,028	0,235	1,263	0,567	4,992	1,768
C₁₃H₁₆C₁₂CuN₄S (A. III (3,55))						
CMI	2,535	0,902 7	2,574	0,918	20,934	7,479
CMF	4,368	1,280	2,925	1,538	23,122	7,888
C₁₄H₁₅Br₂CuN₃O₃S (A. VI (6,64))						
CMI	16,557	3,749	33,75	8,563	33,125	7,496
CMF	32,5	6,185	35,00	10,258	66,25	14,993
C₁₈H₂₀CuN₄O₂S (A. VII (7,71))						
CMI	8,591	2,366	16,557	3,749	33,75	8,563
CMF	16,557	3,749	32,5	6,185	66,25	14,993
Amfotericina B						
CMI	0,25		1,0		0,5	
CMF	0,25		4,0		2,0	

În cazul acestor compuși, valoarea medie a CMI, obținută la testarea pe 50 de tulpini clinice, a fost mai mică de 10 µg/ml, la fel și valoarea medie a CMF. Pentru compusul dicloro{(prop-2-en-1-il)-N-(prop-2-en-1-il)-N'-[(piridin-2-il)metili-den]carbamohidrazonotioat} cupru, în raport cu tulpinile clinice care se referă la specia *Candida glabrata*, s-au înregistrat valori medii ale CMI și ale CMF în jur de 20 µg/ml, diferențele dintre acești doi parametri fiind nesemnificative din punct de vedere statistic.

Analiza comparativă a nivelului de activitate al compușilor chimici testați în raport cu tulpinile clinice și cu cele tip demonstrează mici diferențe, dar care nu sunt foarte importante. Astfel, valorile CMI pentru cele 50 de tulpini clinice de *Candida albicans* și tulpina tip din această specie sunt foarte apropiate, fără diferențe statistic semnificative (Figura 4.5)

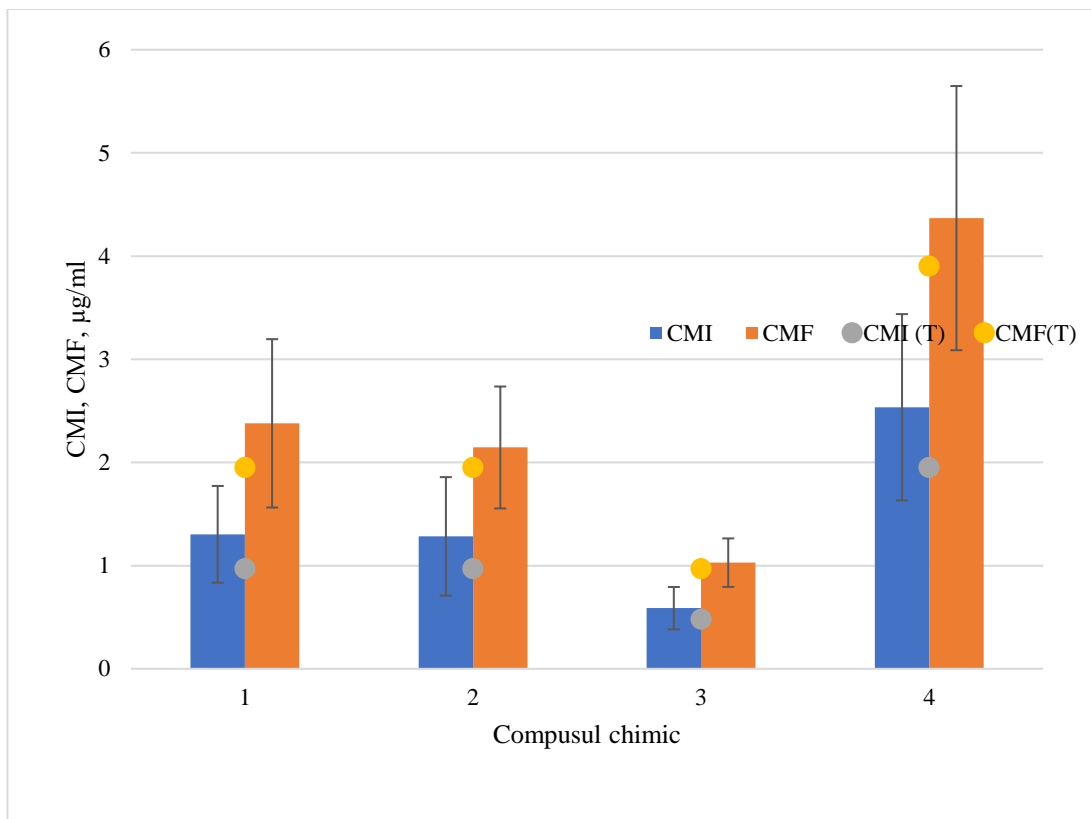


Fig. 4.5. Activitatea antifungică a compușilor chimici testați față de tulpinile clinice de *Candida albicans* și tulpina tip *C. albicans* ATCC 90028. 1. $C_{14}H_{19}CuN_5O_3S$; 2. $C_{19}H_{21}BrCuN_4S$; 3. $C_{17}H_{19}CuN_5O_3S$; 4. $C_{13}H_{16}C_{12}CuN_4S$; CMI(T), CMF(T) – concentrațiile minime de inhibiție și fungicidă față de tulpina tip

Concentrațiile minime de inhibiție ale celor patru compuși chimici cu activitatea cea mai înaltă în cazul speciei *C. albicans* sunt mai mici în cazul tulpinii tip, comparativ cu media obținută pentru cele 50 de tulpini clinice, valorile CMI(T) fiind în limitele deviației standard pentru seria analizată. La fel și valoarea CMF în cazul tulpinii tip este egală practic cu media obținută pentru tulpinile clinice de *C. albicans*. Diferențele observate sunt neimportante din punct de vedere statistic, CMF(T) fiind în limitele zonei de variație a CMF înregistrată în cazul tulpinilor clinice.

Tulpinile clinice de *C. parapsilosis* de asemenea au manifestat sensibilitate diferită, comparativ cu tulpina tip *C. parapsilosis* ATCC 22019, față de cei patru compuși chimici testați, identificați ca cei mai activi. Rezultatele pot fi urmărite pe Figura 4.6.

Valorile CMI (T) pentru compușii testați au fost mai mici comparativ cu valorile medii obținute pentru 50 de tulpini clinice care aparțin acestei specii, dar semnificația statistică a diferențelor lipsește, valorile caracteristice pentru tulpina tip fiind în limitele deviației standard a seriei de tulpini clinice.

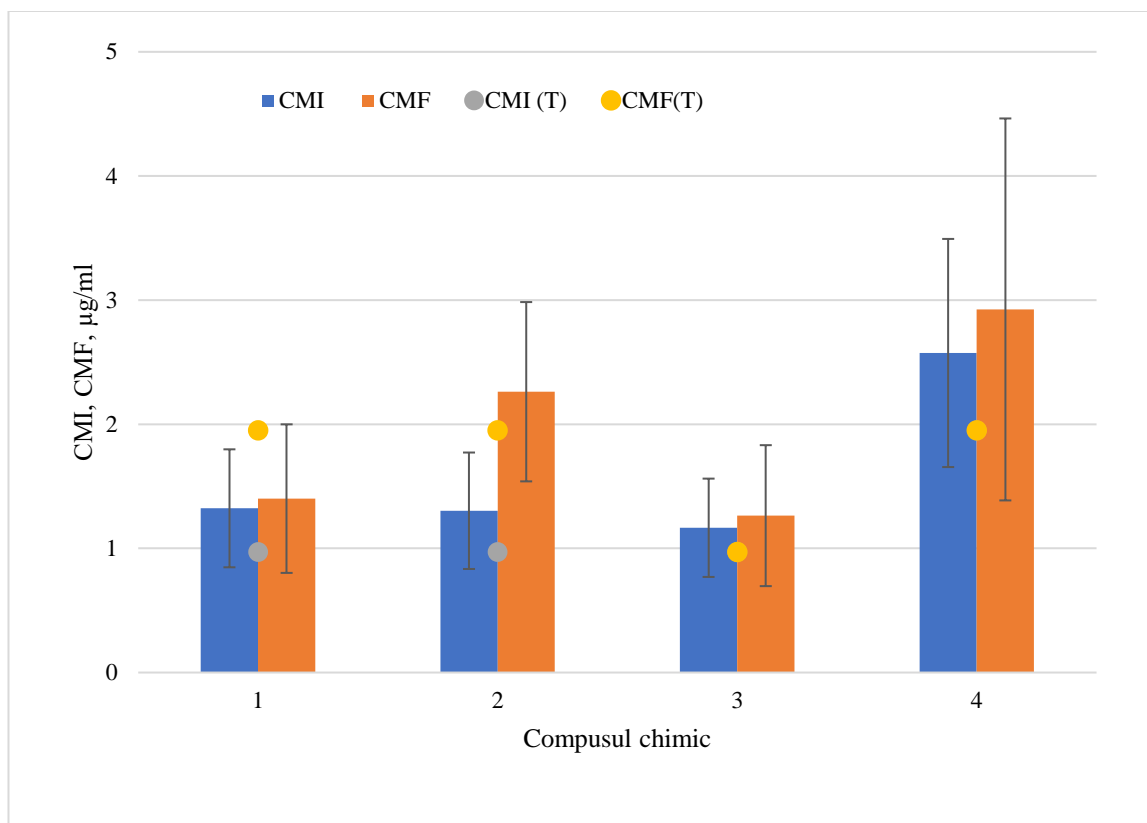


Fig. 4.6. Activitatea antifungică a compușilor chimici testați față de tulpinile clinice de *Candida parapsilosis* și tulpina tip *C. parapsilosis* ATCC 22019. 1. $C_{14}H_{19}CuN_5O_3S$; 2. $C_{19}H_{21}BrCuN_4S$; 3. $C_{17}H_{19}CuN_5O_3S$; 4. $C_{13}H_{16}C_{12}CuN_4S$; CMI(T), CMF(T) – concentrațiile minime de inhibiție și fungicidă față de tulpina tip. În cazul compușilor 3 și 4, valorile CMI(T) și CMF(T) se suprapun

Valorile CMF sunt foarte apropiate în cazul tulpinii tip și a celor clinice, pentru toți compușii fiind în limitele deviației standard a CMF caracteristică tulpinilor clinice din specia *C. parapsilosis*.

La testarea acțiunii asupra *C. glabrata* au fost identificați trei compușilor cu activitate antifungică performantă, doi dintre care au manifestat efecte identice asupra tulpinii tip și a tulpinilor clinice izolate din biosubstraturile umane. Rezultatele pot fi văzute pe Figura 4.7.

În cazul compusului nitrato{N-ciclohexil-N'-[(1-(piridin-2-il)etiliden] carbamohidrazonotioato} de cupru, valorile CMI(T) și CMF(T) sunt identice și egale cu 3,9 µg/ml. Valoarea

medie a CMI pentru cele 50 de tulpini clinice izolate din diferite biosubstraturi umane (2,4 µg/ml) a fost mai mică decât CMI(T), diferența fiind semnificativă din punct de vedere statistic.

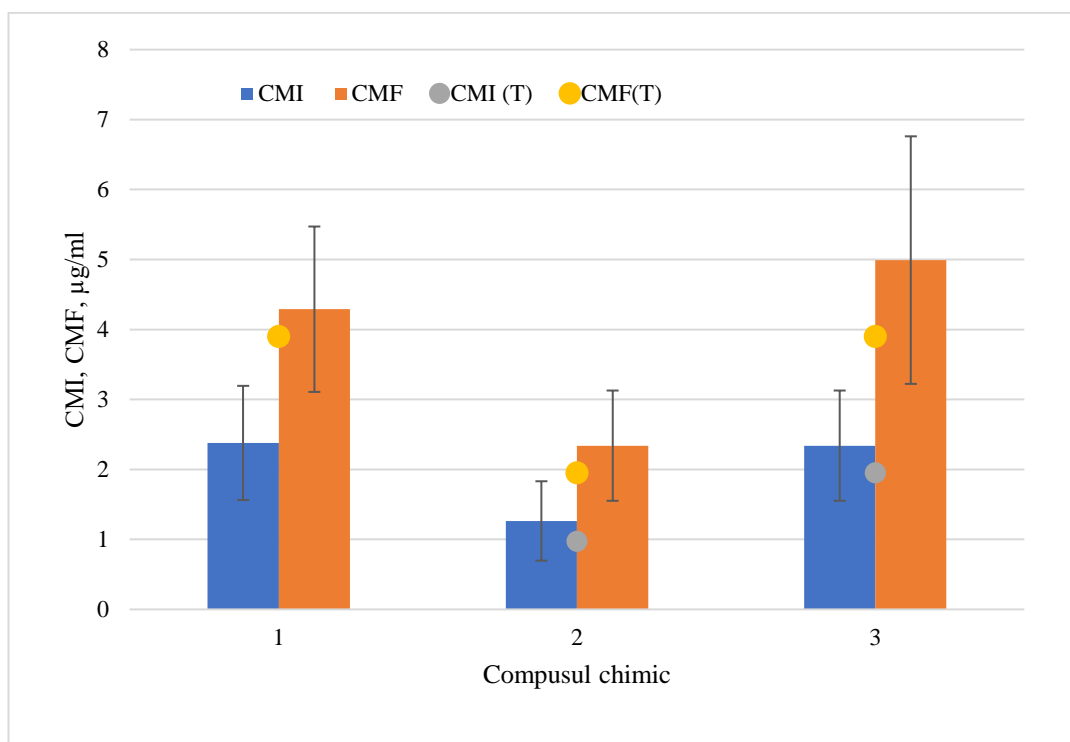


Fig. 4.7. Activitatea antifungică a compușilor chimici testați față de tulpinile clinice de *Candida glabrata* și tulpina tip *C. glabrata* ATCC 2001. 1. $C_{14}H_{19}CuN_5O_3S$; 2. $C_{19}H_{21}BrCuN_4S$; 3. $C_{17}H_{19}CuN_5O_3S$; CMI(T), CMF(T) – concentrațiile minime de inhibiție și fungicidă față de tulpina tip. În cazul compusului 1, valorile CMI(T) și CMF(T) se suprapun

În linii generale, compararea rezultatelor efectelor antifungice ale compușilor chimici testați față de tulpinile tip și izolatele clinice a arătat că, în linii mari, sensibilitatea tulpinilor tip este destul de apropiată de sensibilitatea tulpinilor clinice. Astfel, rezultatele testelor primare pe culturi-tip, în cadrul cărora au fost studiați compușii chimici tiosemicarbazonați cu conținut de cupru, pot fi extrapolate, cu un nivel foarte înalt de probabilitate, și asupra tulpinilor clinice.

La această etapă de cercetare a fost studiată și acțiunea antifungică a celor cinci compuși de origine naturală, obținuți din biomasa de spirulină, față de tulpinile clinice ale trei specii: *C. albicans*, *C. parapsilosis* și *C. glabrata* și de tulpinile tip *C. albicans* ATCC 90028, *C. parapsilosis* ATCC 22019, *C. glabrata* ATCC 2001. Rezultatele obținute sunt redată în Tabelul 4.6.

Analiza rezultatelor obținute ne permite să afirmăm că compușii de origine naturală au manifestat efecte similare cu compușii chimici testați atât față de tulpinile tip, cât și față de cele

clinice obținute din diferite biosubstraturi umane. Diferențele se încadrează în limitele de variație ale parametrilor monitorizați în seria de tulpini clinice.

Tabelul 4.6. Activitatea antifungică a compușilor naturali testați față de izolatele clinice și tulpinile tip (CMI,CMF, CMI (T)*, CMF(T)* mg/ml)

Compusul natural	<i>Candida albicans</i>		<i>Candida parapsilosis</i>		<i>Candida glabrata</i>	
	N=50		N=50		N=50	
	Media	Deviația standard	Media	Deviația standard	Media	Deviația standard
ES1						
CMI	0,847	0,305	0,733	0,244	0,759	0,264
CMF	1,425	0,438	1,525	0,523	1,4	0,410
CMI (T)	0,62		0,62		0,62	
CMF (T)	1,25		1,25		1,25	
ES2						
CMI	1,7	0,60609	1,55	0,53327	3,1	1,078
CMF	2,8	0,82065	2,9	0,32582	5,6	1,641
CMI (T)	1,25		1,25		2,5	
CMF(T)	2,5		2,5		5,0	
ES3						
CMI	1,375	0,37788	1,375	0,3788	2,75	0,757
CMF	2,7	0,6851	1,425	0,43813	2,85	0,876
CMI(T)	1,25		1,25		2,5	
CMF(T)	1,5		1,25		2,5	
PCM1						
CMI	0,00778	0,001329	0,00736	0,0009	0,007	0,001
CMF	0,0112	0,004797	0,0116	0,005481	0,0108	0,003
CMI(T)	0,007		0,007		0,007	
CMF(T)	0,01		0,01		0,01	
PCM2						
CMI	0,0047	0,001752	0,0042	0,0003897	0,004	0,0009
CMF	0,009	0,000239	0,00904	0,0001973	0,009	0,0002
CMI(T)	0,004		0,004		0,004	
CMF(T)	0,009		0,009		0,009	

CMI(T)*, CMF(T)* - concentrațiile minime de inhibiție și fungică în raport cu tulpina tip

Astfel, pentru extractul de spirulină ES1, CMI medie pentru izolatele clinice ale speciei *Candida albicans* a constituit $0,847 \pm 0,305$ mg/ml, în timp ce valoarea CMI(T) pentru tulpina tip *C. albicans* ATCC 90028 a fost de 0,62 mg/ml. Este de menționat că diapazonul variației valorii CMI pentru extractul ES1 în cazul celor 50 de izolate clinice ale speciei *C. albicans* a fost destul de îngust, încadrându-se între 0,62 și 1,25 mg/ml. Concentrațiile minime fungicide obținute în cadrul testării pentru extractul ES1 de asemenea nu s-au deosebit semnificativ în raport cu tulpina tip *C. albicans* ATCC 90028 și cu media pe cele 50 de tulpini clinice ale speciei *C. albicans* izolate

din biosubstraturi umane. Astfel, CMF în cazul tulpinii tip a fost de 1,25 mg/ml, iar media pe izolatele clinice a constituit $1,425 \pm 0,438$ mg/ml. Extractul ES1 a arătat aceleași valori ale CMI(T) și ale CMF(T) pentru celelalte două tulpini de referință – 0,62 și 1,25 mg/ml, respectiv, în timp ce CMI medie pentru cele 50 de tulpini clinice de *C. parapsilosis* a fost de $0,733 \pm 0,224$ mg/ml, iar CMF – $1,525 \pm 0,524$ mg/ml. CMI medie pentru tulpinile clinice de *C. glabrata* a fost de $0,759 \pm 0,264$, iar CMF de $1,4 \pm 0,41$ mg/ml.

Aceiași situație se atestă și în cazul extractului ES2. Nici acest compus natural nu a manifestat efecte diferite față de tulpinile clinice și cele trei tulpini tip studiate. În cazul acestui extract de spirulină ES3, se observă, în linii generale, aceeași situație, cu excepția tulpinilor clinice ale speciei *C. albicans*. Astfel, CMI și CMI(T) sunt foarte apropiate – 1,375 și 1,25 mg/ml, respectiv, în timp ce CMF este semnificativ mai mare comparativ cu CMF(T): 2,7 mg/ml față de 1,5 mg/ml.

Activitatea antifungică foarte înaltă observată pentru preparatele carotenoide cu conținut de mixoxantofilă în raport cu tulpinile de referință de fungi levuriformi s-a păstrat și în raport cu tulpinile clinice ale speciilor *C. albicans*, *C. parapsilosis* și *C. glabrata*. La tulpinile clinice, valorile medii ale CMI și ale CMF sunt practic egale (fără diferențe semnificative din punct de vedere statistic) cu valorile CMI(T) și ale CMF(T).

Astfel, ca și în cazul compușilor chimici, se poate concluziona că sensibilitatea tulpinilor tip este destul de apropiată de cea a tulpinilor clinice față de extractele de spirulină ES1, ES2 și ES3, și de preparatele carotenoide cu conținut de mixoxantofilă PCM1 și PCM 2.

4.3. Acțiunea sinergică a compușilor chimici și biologici testați asupra tulpinilor tip de fungi levuriformi

Problema majoră cu care se confruntă medicina contemporană, pe lângă dezvoltarea rapidă a formelor de rezistență la antimicrobiene de către microorganismele patogene, inclusiv fungi, este toxicitatea înaltă a antibioticelor de generațiile noi. O cale de a diminua efectele toxice ale acestor preparate asupra organismului uman este identificarea posibilității de a micșora dozele utilizate în scopuri terapeutice. Acest deziderat poate fi atins prin explorarea fenomenului de sinergism. Există numeroase dovezi ale posibilității de reducere semnificativă a dozelor de antifungice convenționale, când acestea sunt combinate cu alte preparate antifungice sintetice sau naturale. Fenomenul se bazează pe combinarea mai multor mecanisme de acțiune, ceea ce permite realizarea unui atac multidirecționat, care nu numai că mărește eficiența terapiilor, dar și reduce substanțial probabilitatea dezvoltării rezistenței la antimicrobienele respective. Sinergism în raport cu tulpinile rezistente de *Candida albicans* a fost observat la combinarea compușilor chimici obținuți

pe bază de pirazolină și ale complexelor lor de cupru (II) și de nichel (II) cu antifungicele convenționale.

În cadrul testelor primare au fost identificați mai mulți compuși chimici și biologici noi cu proprietăți antifungice în raport cu fungii levuriformi, iar la această etapă de realizare a tezei de doctor habilitat au fost realizate cercetări în vederea evidențierii unor combinații sinergice între compușii chimici și cei biologici.

Concentrațiile aplicate pentru toți compușii luați în studiu au constituit 1/4 din CMI identificate. Culturile fungice au fost incubate pe durata a 48 de ore cu trei compuși chimici (bromo{N-ciclohexil-N'-[fenil(piridin-2-il)metiliden]carbamo-hidrazono-tioat}cupru; dicloro{(prop-2-en-1-il)-N-(prop-2-en-1-il)-N'-[(piridin-2-il)metiliden]carbamo-hidrazonotioat}cupru; nitrato{N-ciclohexil-N'-[(1-(piridin-2-il)etiliden]carbamo-hidrazonotioato}cupru) și cu doi compuși biologici (PCM1 și PCM2), aplicați atât separat, cât și în combinație. Numărul de celule viabile a fost determinat la 4, 8, 12, 24 și 48 de ore de la momentul inițierii contactului dintre compușii aplicați și cultura fungică.

Rezultatele obținute reflectă rezultatele obținute în cazul tulpinii *C. albicans* ATCC 90028. Martorul netratat se caracterizează prin creșterea numărului de celule viabile pe durata celor 48 de ore de monitorizare a culturii, creșterea devenind semnificativă față de momentul de inițiere a experienței deja la 8 ore. După 48 de ore, numărul de celulele viabile în cultură crește cu peste 30% față de începutul experienței.

Ambii compuși biologici provoacă o reducere statistic semnificativă a numărului de celule viabile, comparativ cu martorul netratat, la fel, începând cu timpul de 8 ore de la inițierea contactului. La sfârșitul perioadei de monitorizare, numărul de celule viabile în cultura tratată cu compuși biologici este la același nivel cu numărul lor la începutul experienței. Este de menționat că între efectele celor doi compuși biologici asupra *C. albicans* ATCC 90028 nu se deosebesc între ele.

Cei trei compuși chimici aplicați în concentrația care constituie 1/4 (0,25) din valoarea CMI au provocat modificări diferite ale numărului de celule viabile în cultura de *C. albicans* ATCC 90028. Astfel, C1 (bromo{N-ciclohexil-N'-[fenil(piridin-2-il)metiliden]carbamo-hidrazono-tioat}cupru) provoacă o descreștere semnificativă a numărului de celule viabile după 4 ore de contact cu cultura fungică (cu peste 17%), după care urmează o ameliorare a situației prin creșterea numărului de celule viabile, care atinge valorile caracteristice culturii tratate cu compuși biologici. Cu toate acestea, și în cazul compusului chimic C1, la finalul perioadei de monitorizare, numărul celulelor viabile este cu aproximativ 1/3 mai mic comparativ cu cultura netratată.

Combinăția dintre compusul chimic bromo{N-ciclohexil-N'-[fenil(piridin-2-il)metiliden]carbamo-hidrazono-tioat}cupru și ambii compuși biologici testați duc la o scădere semnificativă a numărului de celule viabile de *Candida albicans* ATCC 90028 (Figura 4.8).

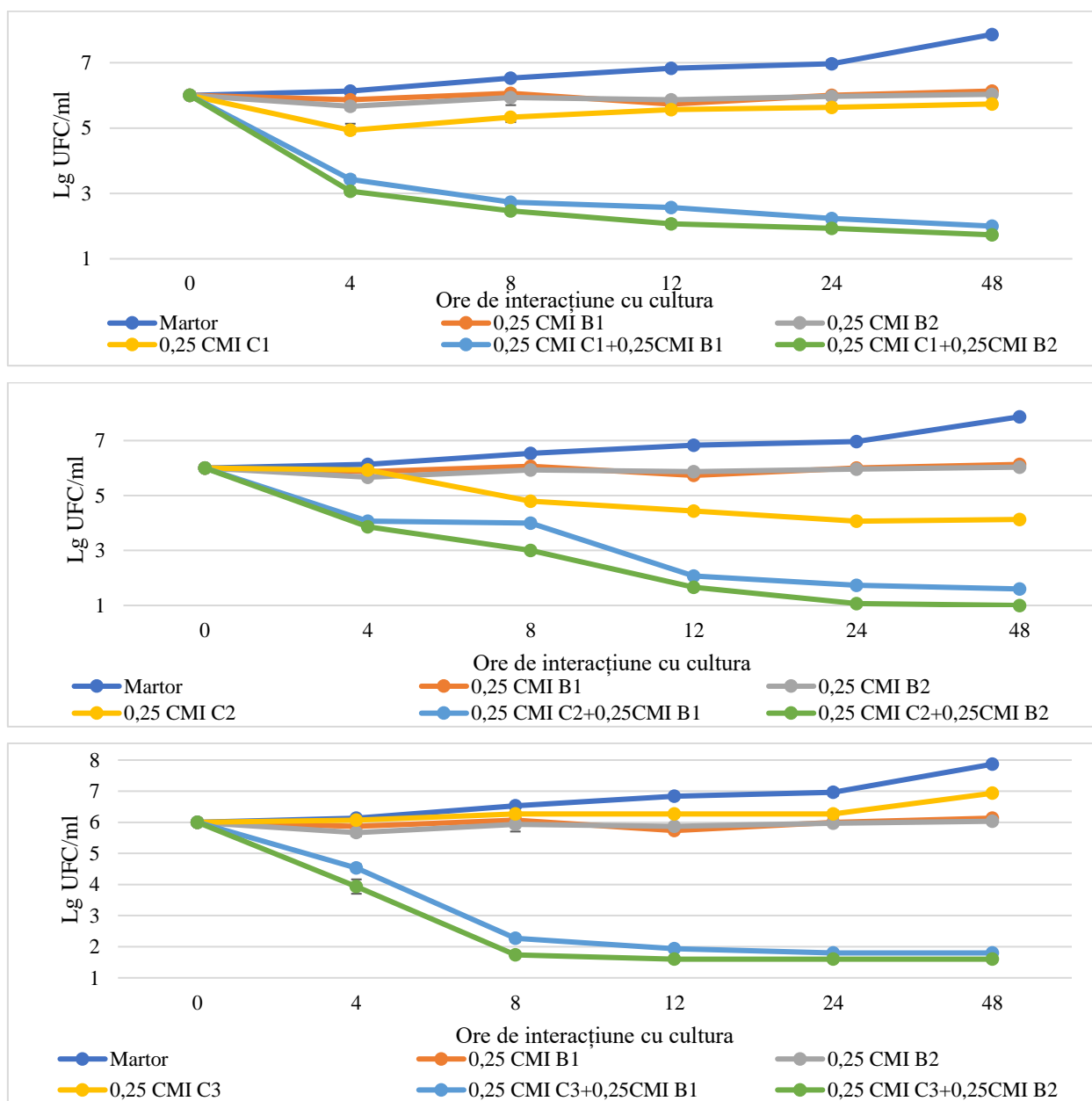


Fig. 4.8. Curbele timpului de ucidere a compușilor chimici și biologici, și a combinațiilor lor în raport cu tulpina *Candida albicans* ATCC 90028. C1 - bromo{N-ciclohexil-N'-[fenil(piridin-2-il)metiliden]carbamo-hidrazono-tioat}cupru; C2 - dicloro{(prop-2-en-1-il)-N-(prop-2-en-1-il)-N'-[(piridin-2-il)metiliden] carbamo-hidrazonotioat}cupru, C3 - nitrato{N-ciclohexil-N'-[(1-(piridin-2-il)etiliden] carbamo-hidra-zonotioato}cupru; B1 – PCM1; B2 – PCM2

La intervalul de 4 ore de la inițierea contactului combinației dintre compusul chimic și cel biologic cu substratul are loc o reducere de circa două ori a numărului de celule viabile față de momentul 0.

În timp, efectul inhibitor al combinațiilor continuă să se amplifice, iar la finalul experienței (48 de ore) numărul celulelor viabile se reduce de până la trei ori față de nivelul inițial și de până la patru ori comparativ cu martorul netratat. Cu toate că diferența numerică dintre combinațiile cu compușii biologici nu este foarte mare, ea este semnificativă din punct de vedere statistic, iar al doilea compus biologic asigură efecte mai pronunțate în combinație cu compusul C1.

Cel de-al doilea compus chimic dicloro{(prop-2-en-1-il)-N-(prop-2-en-1-il)-N'-[(piridin-2-il)metili-den] carbamo-hidrazonotioat}cupru, aplicat în concentrație ce constituie 1/4 din CMI, produce o reducere semnificativă și progresivă în timp, începând cu intervalul de 8 ore de la inițierea contactului, a numărului de celule viabile de *Candida albicans* ATCC 90028. Efectul maximal inhibitor este atins la 24 ore de contact și se păstrează următoarele 24 de ore. Descreșterea numărului de celule viabile constituie peste 30% față de nivelul de până la contact și 50% față de martorul netratat. Combinațiile dintre compusul chimic C2 și cei doi compuși biologici au exercitat un efect inhibitori mai puternic, înregistrându-se o reducere a numărului de celule viabile de până la șase ori, comparativ cu situația de până la contactul culturii cu combinațiile, și de până la opt ori comparativ cu martorul netratat. Ca și în cazul compusului C1, o activitate mai pronunțată o are combinația dintre compusul chimic C2 și PCM2. Pentru această combinație, efectul maxim este atins după 24 de ore de contact, iar nivelul de inhibiție a tulpinii *Candida albicans* ATCC 90028 este semnificativ statistic mai mare, comparativ cu combinația dintre C2 și PCM1.

Cel mai mare interes prezintă cel de-al treilea compus chimic C3 – nitrato{N-ciclohexil-N'-[(1-(piridin-2-il)etiliden] carbamohidra-zonotioato}cupru care, aplicat în doză de ¼ din CMI, este tolerat destul de bine de cultura fungică, după 48 de ore înregistrându-se chiar o creștere cu peste 16% a numărului de celule viabile față de momentul 0. În schimb combinațiile dintre acest compus chimic și preparatele cu conținut de mixoxantofilă produc o reducere semnificativă (de peste trei ori față de începutul experienței și de peste patru ori față de martorul netratat) a numărului de celule viabile.

Curbele timpului de ucidere a compușilor chimici și biologici și a combinațiilor lor în raport cu tulpina *Candida glabrata* ATCC 2001 sunt prezentate pe Figura 4.9.

Martorul netratat în cazul tulpinii *Candida glabrata* ATCC 2001 se caracterizează prin creșterea numărului de celule viabile pe durata celor 48 de ore de monitorizare a culturii, creșterea devenint mai pronunțată între 24 și 48 de ore, atingând valori de peste 130% față de nivelul inițial.

Ambii compuși biologici provoacă o reducere mică din punct de vedere al valorilor absolute, dar statistic semnificativă a numărului de celule viabile, comparativ cu martorul netratat.

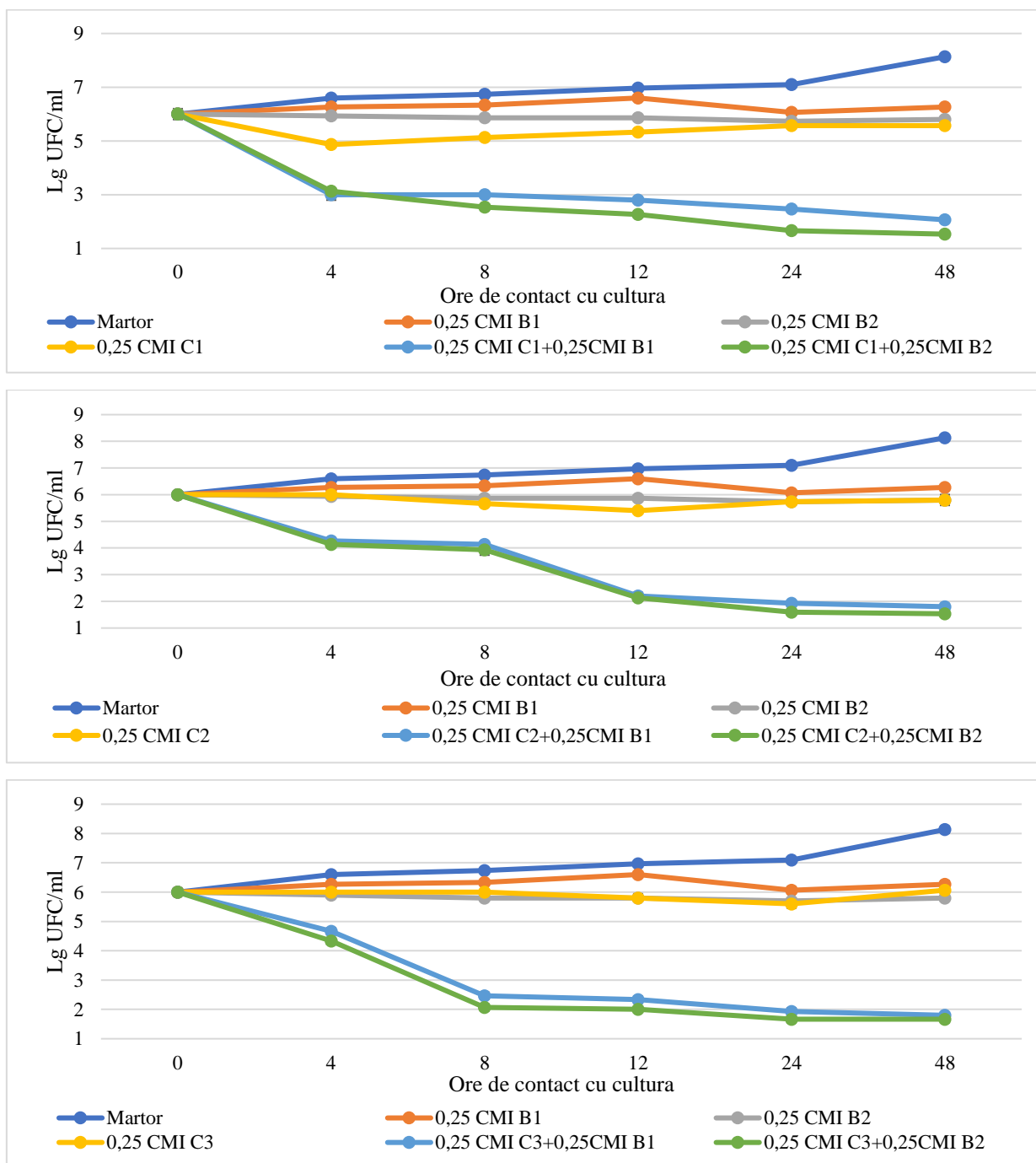


Fig. 4.9. Curbele timpului de ucidere a compușilor chimici și biologici, și a combinațiilor lor în raport cu tulpina *Candida glabrata* ATCC 2001. C1 - bromo{N-ciclohexil-N'-[fenil(piridin-2-il)metiliden]carbamo-hidrazono-tioat}cupru; C2 - dicloro{(prop-2-en-1-il)-N-(prop-2-en-1-il)-N'-[(piridin-2-il)metili-den] carbamo-hidrazonotioat}cupru, C3 - nitrato{N-ciclohexil-N'-[(1-(piridin-2-il)etiliden] carbamo-hidra-zonotioato}cupru; B1 – PCM1; B2 – PCM2

Efectul inhibitor al compusului biologic PCM1 se observă mai pronunțat în intervalul 24-48 de ore de la contactul culturii cu compusul, în timp ce efectul compusului biologic PCM 2 este stabil pe întreaga durată a monitorizării.

La finalul perioadei experimentale, numărul de celule viabile de *Candida glabrata* ATCC 2001 în variantele tratate cu compușii biologici PCM 1 și PCM 2 capătă valori foarte apropiate și este la nivelul de până la începutul experienței. Este de menționat că între efectele celor doi compuși biologici asupra tulpinii *C. glabrata* ATCC 2001 cele mai semnificative deosebiri se observă în intervalul 0-24 de ore de contact.

Cei trei compuși chimici aplicați în concentrația care constituie $\frac{1}{4}$ (0,25) din valoarea CMI au provocat modificări diferite ale numărului de celule viabile în cultura de *C. glabrata* ATCC 2001. Astfel, C1 (bromo{N-ciclohexil-N'-[fenil(piridin-2-il) metili-den]carbamo-hidrazono-tioat}cupru) provoacă o descreștere semnificativă a numărului de celule viabile după 4 ore de contact cu cultura fungică (cu peste 17%), după care urmează o ameliorare a situației prin creșterea numărului de celule viabile, care atinge valorile caracteristice culturii tratate cu biologici. La finalul perioadei de monitorizare, numărul celulelor viabile este cu aproximativ 30% mai mic comparativ cu cultura netratată. Se atestă o repetare a patternului de acțiune caracteristic acestui compus în cazul tulpinii examinate anterior (*Candida albicans* ATCC 90028).

Combinăția dintre compusul chimic C1 bromo{N-ciclohexil-N'-[fenil(piridin-2-il)metiliden]carbamo-hidrazono-tioat}cupru și ambii compuși biologici testați duce la o scădere semnificativă a numărului de celule viabile de *Candida glabrata* ATCC 2001. La intervalul de 4 ore de la inițierea contactului combinațiilor dintre compusul chimic și substanțele biologice cu substratul fungic are loc o reducere de până la două ori a numărului de celule viabile față de situația de la începutul experienței. Ambele combinații au efecte egale asupra tulpinii studiate. În timp, efectul inhibitor al combinațiilor continuă să se amplifice și apar unele deosebiri între parametrii cantitativi ai acestor combinații. Astfel, acțiunea antifungică a combinației dintre bromo{N-ciclohexil-N'-[fenil(piridin-2-il) metili-den]carbamo-hidrazono-tioat}cupru și PCM2 este mai pronunțată comparativ cu cea a combinației dintre compusul C1 și PCM1. La finalul experienței (48 de ore), numărul celulelor viabile în cultura tratată cu combinația C1+B1 se reduce de ori ori față de nivelul inițial și de patru ori comparativ cu martorul netratat, iar în cazul combinației C1+B2 factorul crește cu trei sutimi. Deși diferența numerică dintre combinațiile cu compușii biologici nu este foarte mare, ea este semnificativă din punct de vedere statistic.

Cel de-al doilea compus chimic C2 dicloro{(prop-2-en-1-il)-N-(prop-2-en-1-il)-N'-[(piridin-2-il)metili-den] carbamo-hidrazono-tioat}cupru, aplicat în concentrația care constituie $\frac{1}{4}$ din CMI, produce o reducere mică în valori absolute, dar veridică statistic a numărului de celule

viabile de *Candida glabrata* ATCC 2001. Curba timpului de ucidere pentru acest compus practic o repetă pe cea a compusului biologic B2 (PCM2), cu unica diferență, veridică din punct de vedere statistic, la interval de 12 ore, când nivelul de inhibiție produs de compusul chimic este mai esențial comparativ cu cel produs de PCM2. Descreșterea numărului de celule viabile constituie 25% față de martorul netratat, iar în comparație cu numărul de celule viabile în cultură la începutul experienței, diferențe nu au fost observate.

Combi-națiile dintre compusul chimic C2 și cei doi compuși biologici au un efect de inhibiție a creșterii tulpinii *Candida glabrata* ATCC 2001, înregistrându-se o reducere a numărului de celule viabile de până la 3,2 ori comparativ cu situația de până la contactul culturii cu combinațiile acestor compuși și de până la 4,3 ori comparativ cu martorul netratat. Ambele combinații au manifestat efect inhibitor de același nivel, deosebirile observate fiind minime și ne semnificative din punct de vedere statistic. Acțiunea inhibitorie față de tulpina *Candida glabrata* ATCC 2001 s-a manifestat în două salturi importante: unul la 4 ore și altul la 12 ore.

Curba timpului de ucidere a celui de-al treilea compus chimic C3 – nitrato{N-ciclohexil-N'-[(1-(piridin-2-il)etiliden] carbamohidra-zonotioato}cupru practiv s-a suprapus pe curba compusului biologic B2. Fiind aplicat în doză de $\frac{1}{4}$ din CMI, acest compus nu permite obținerea unei creșteri a numărului de celule viabile, acesta rămânând la nivelul caracteristic culturii la începutul experienței. În schimb, combinațiile dintre acest compus și preparatele cu conținut de mixoxantofilă produc o diminuare semnificativă (de peste 3 ori față de începutul experienței și de peste 4 ori față de martorul netratat) a numărului de celule viabile. Cea mai importantă scădere a numărului de celule viabile de *Candida glabrata* ATCC 2001 se produce pe durata primelor 8 ore de contact a culturii cu combinațiile dintre compusul C3 și cele două preparate biologice cu conținut de mixoxantofilă. Acest parametru rămâne stabil între 8 și 12 ore, după care urmează o nouă descreștere, de data aceasta mai puțin pronunțată. Dacă la 4, la 8 și la 12 ore între combinații sunt diferențe statistice, atunci la 24 și la 48 de ore acestea lipsesc.

Curbele timpului de ucidere a compușilor chimici și biologici și a combinațiilor lor în raport cu tulpina *Cryptococcus neoformans* ATCC 13690 sunt prezentate pe Figura 4.10.

Numărul de celule viabile în cultura martorului netratat în cazul tulpinii *Cryptococcus neoformans* ATCC 13690 crește lent și constant pe durata celor 48 ore de monitorizare, atingând valori de până la 117% față de nivelul inițial.

Ambii compuși biologici provoacă o reducere neînsemnată, din punct de vedere al valorilor absolute, a numărului de celule viabile, dar care în cazul compusului B2 este statistic semnificativă, comparativ cu martorul netratat. Curbele timpului de omorâre a culturii de *Cryptococcus neoformans* ATCC 13690 repetă patternul caracteristic pentru martorul netratat, cu diferența că

valorile obținute pentru LgUFC sunt puțin mai mici. La finalul perioadei experimentale, numărul de celule viabile de *Cryptococcus neoformans* ATCC 13690 în variantele tratate cu compușii biologici PCM 1 și PCM 2 capătă valori foarte apropiate și este mai mare ca până la începutul experienței.

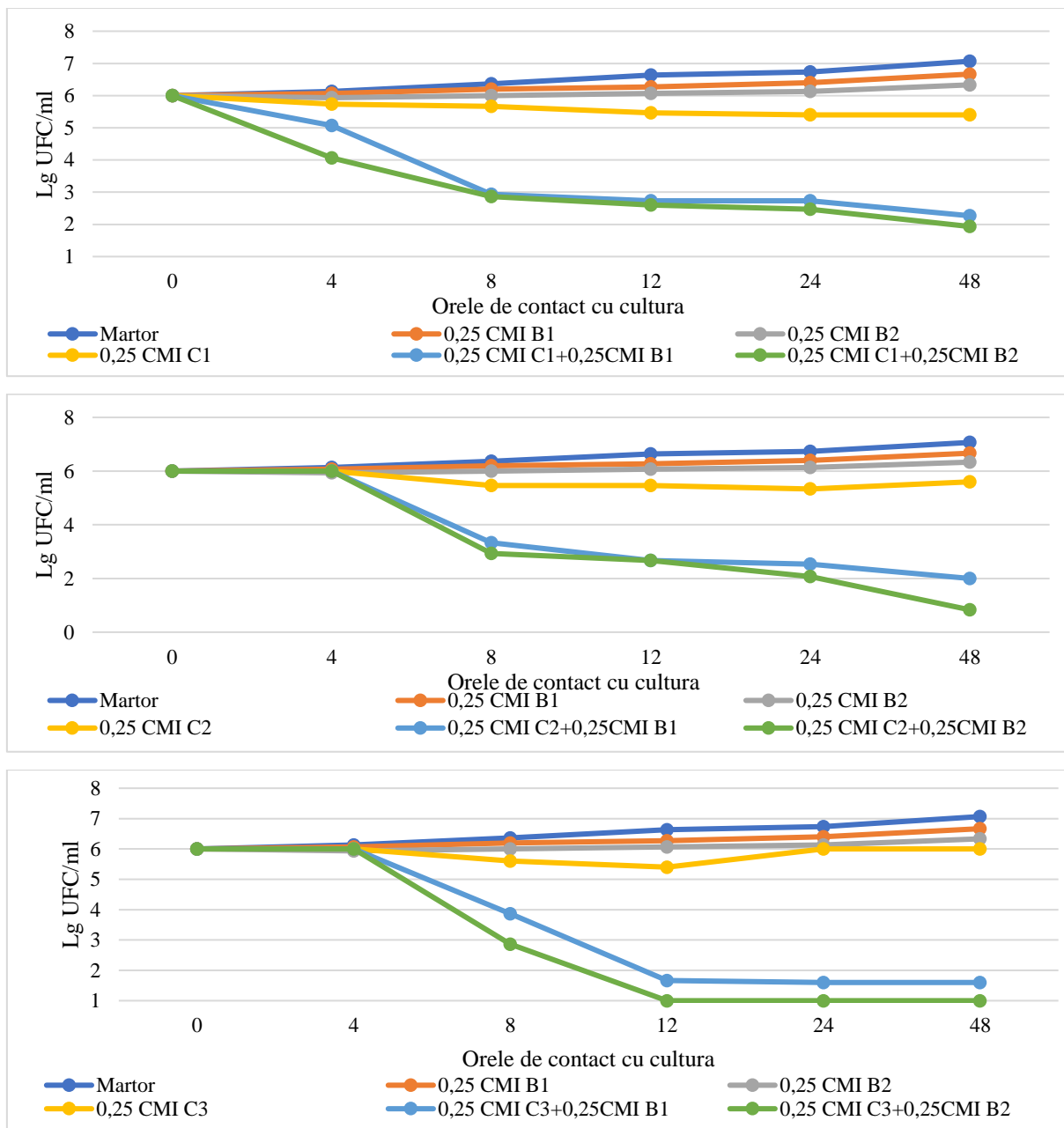


Fig. 4.10. Curbele timpului de ucidere a compușilor chimici și biologici, și a combinațiilor lor în raport cu tulpina *Cryptococcus neoformans* ATCC 13690. C1 - bromo{N-ciclohexil-N'-[fenil(piridin-2-il)metiliden]carbamo-hidrazono-tioat}cupru; C2 - dicloro{(prop-2-en-1-il)-N-(prop-2-en-1-il)-N'-[(piridin-2-il)metili-den] carbamo-hidrazonotioat}cupru, C3 - nitrato{N-ciclohexil-N'-[(1-(piridin-2-il)etiliden] carbamo-hidra-zonotioato}cupru; B1 – PCM1; B2 – PCM2

Ambii compuși biologici provoacă o reducere neînsemnată, din punct de vedere al valorilor absolute, a numărului de celule viabile, dar care în cazul compusului B2 este statistic semnificativă, comparativ cu martorul netratat. Curbele timpului de omorâre a culturii de *Cryptococcus neoformans* ATCC 13690 repetă patternul caracteristic pentru martorul netratat, cu diferența că valorile obținute pentru LgUFC sunt puțin mai mici. La finalul perioadei experimentale, numărul de celule viabile de *Cryptococcus neoformans* ATCC 13690 în variantele tratate cu compușii biologici PCM 1 și PCM 2 capătă valori foarte apropiate și este mai mare ca până la începutul experienței.

Cei trei compuși chimici aplicați în concentrația de 1/4 (0,25) din valoarea CMI s-au comportat diferit în raport cu cultura de *Cryptococcus neoformans* ATCC 13690. Astfel, C1 (bromo{N-ciclohexil-N'-[fenil(piridin-2-il) metili-den]carbamo-hidrazono-tioat}cupru) provoacă o descreștere cu peste 20% a numărului de celule viabile după 12 ore de contact cu cultura fungică, după care urmează o nouă descreștere a numărului de celule viabile, dar mai lentă. Drept urmare, între punctele de verificare vecine diferențe statistic veridice nu se atestă. La finalul perioadei de monitorizare, numărul celulelor viabile este cu aproximativ 21% mai mic comparativ cu cultura netratată.

Combi-națiunile dintre compusul chimic C1 bromo{N-ciclohexil-N'-[fenil(piridin-2-il)metiliden]carbamo-hidrazono-tioat}cupru și ambii compuși biologici testați duc la o scădere semnificativă a numărului de celule viabile de *Cryptococcus neoformans* ATCC 13690. La intervalul de 4 ore de la inițierea contactului combinațiilor dintre compusul chimic și biologici cu substratul se observă cea mai mare diferență între efectele acestor două combinații. Combinația compusului chimic C1 și a celui biologic B2 este de două ori mai activă comparativ cu combinația C1+B1. În prima combinație, reducerea numărului de celule viabile este de 1/3 față de nivelul inițial. În celelalte puncte de control, ambele combinații au efecte egale asupra tulpinii cercetate, numărul de celule viabile la 8, 12, 24 și 48 ore fiind practic identic.

Cel de-al doilea compus chimic C2 dicloro{(prop-2-en-1-il)-N-(prop-2-en-1-il)-N'-[(piridin-2-il)metili-den] carbamo-hidrazonotioat}cupru, aplicat în concentrația care constituie 1/4 din CMI, produce o reducere mai pronunțată, veridică statistic, a numărului de celule viabile de *Cryptococcus neoformans* ATCC 13690. Curba timpului de ucidere pentru acest compus practic o repetă pe cea a compusului chimic C1 pe intervalul 4-24 ore. Comparativ cu martorul netratat se observă o diminuare cu aproximativ 1/4 a numărului total de unități formatoare de colonii în cultura tratată cu compusul chimic C2 la momentul de 24 de ore. La 48 de ore se observă o mică creștere a numărului de celule viabile, dar acesta rămâne mai mic atât în comparație cu martorul netratat, cât și cu nivelul inițial, de până la tratarea culturii cu compusul chimic.

Combi-națiunile dintre compusul chimic C2 și cei doi compuși biologici au un puternic efect de inhibiție a creșterii tulpinii *Cryptococcus neoformans* ATCC 13690, înregistrându-se o reducere a numărului de celule viabile de 3-4 ori comparativ cu situația de până la contactul culturii cu combinațiile de compuși. La intervalele de timp de 4, 8 și 12 ore ambele combinații au manifestat efect inhibitor de același nivel, deosebirile observate fiind minime și ne semnificative din punct de vedere statistic. În schimb, la 24 de ore se observă diferența dintre efectele celor două combinații. Acțiunea antifungică a compusului dicloro{(prop-2-en-1-il)-N-(prop-2-en-1-il)-N'-[(piridin-2-il)metili-den] carbamo-hidrazonotioat}cupru cu preparatul biologic B2 este mult mai pronunțată, comparativ cu cea a combinației dintre compusul chimic și preparatul biologic B1. La 48 de ore de contact, această diferență se păstrează, iar efectul general al ambelor combinații se amplifică considerabil.

Curba timpului de ucidere a celui de-al treilea compus chimic C3 nitrato{N-ciclohexil-N'-[(1-(piridin-2-il)etiliden] carbamohidra-zonotioato}cupru se deosebește de curbele primilor doi compuși chimici. Fiind aplicat în doză de 1/4 din CMI, acest compus se manifestă ca inhibitor al creșterii tulpinii *Cryptococcus neoformans* ATCC 13690 la intervalele de timp de 8 și de 12 ore de la momentul contactului culturii cu compusul C3. La intervalele de timp de 24 și de 48 de ore curba timpului de ucidere pentru compusul C3 se suprapune cu cea a compusului biologic B2. Combi-națiunile dintre acest compus și preparatele cu conținut de mixoxantofilă produc o diminuare semnificativă (de 3,5-4,0 ori față de începutul experienței) a numărului de celule viabile (Figura 4.10).

Cea mai importantă scădere a numărului de celule viabile de *Cryptococcus neoformans* ATCC 13690 se produce pe durata primelor 12 ore de contact a culturii cu combinațiile dintre compusul C3 și cei doi compuși biologici cu conținut de mixoxantofilă. Acest nivel de inhibiție se păstrează stabil până la finalul etapei de monitorizare. Conform datelor înregistrate, și în cazul tulpinii de *Cryptococcus neoformans*, caracterizate printr-un ritm mai lent de creștere, patternuri-ole de interacțiune a culturii cu compușii chimici, biologici și cu combinațiile acestora sunt foarte apropiate cu cele caracteristice tulpinilor ce aparțin genului *Candida* analizate anterior.

Ultima tulpină studiată în cadrul acestui compartiment a fost *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 4098. Curbele timpului de ucidere a compușilor chimici și biologici, și a combinațiilor lor în raport cu tulpina *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 4098 sunt prezentate pe Figura 4.11. *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 4098 se caracterizează printr-o creștere lentă în timp constant pe durata celor 48 de ore de monitorizare, atingând valori de până la 125% față de nivelul inițial. Ambii compuși biologici se comportă practic identic față de cultura de drojdie, provocând o

reducere semnificativă, din punct de vedere al valorilor absolute, a numărului de celule viabile, la punctele de control la 8 și la 12 ore.

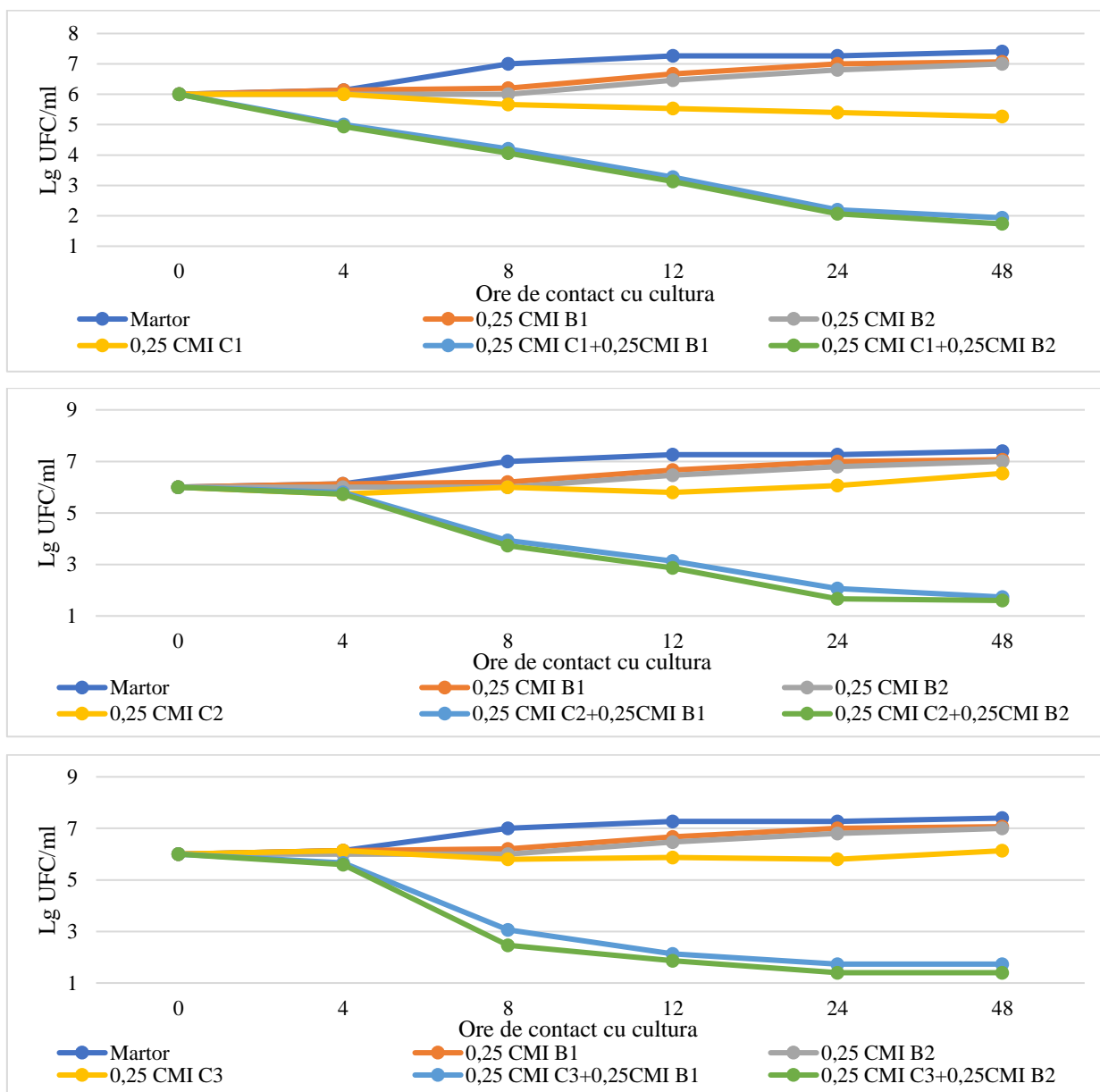


Fig. 4.11. Curbele timpului de ucidere a compuşilor chimici și biologici, și a combinațiilor lor în raport cu *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 4098. C1 - bromo{N-ciclohexil-N'-[fenil(piridin-2-il)metiliden]carbamo-hidrazono-tioat}cupru; C2 - dicloro{(prop-2-en-1-il)-N-(prop-2-en-1-il)-N'-[(piridin-2-il)metili-den] carbamo-hidrazonotioat}cupru, C3 - nitrato{N-ciclohexil-N'-[(1-(piridin-2-il)etiliden] carbamo-hidra-zonotioato}cupru; B1 – PCM1; B2 – PCM2

La 24 și la 48 de ore de contact, efectul inhibitor al dozelor subinhibitorii de compuși biologici se reduce semnificativ, valorile Lg UFC/ml apropiindu-se foarte mult de cele caracteristice matorului netratat.

Cei trei compuși chimici aplicați în concentrația care constituie 1/4 sau 0,25 din valoarea CMI s-au comportat diferit în raport cu cultura *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 4098. Astfel, C1 (bromo{N-ciclohexil-N'-[fenil(piridin-2-il) metili-den]carbamohidrazono-tioat}cupru) provoacă o reducere semnificativă a numărului de celule viabile, care devine vizibilă la 12 ore de contact cu cultura fungică. Pe durata monitorizării, valoarea Lg UFC/ml descrește lent dar stabil, comparativ cu valoare minimă în punctul 48 de ore. La finalul perioadei de monitorizare, numărul celulelor viabile este cu aproximativ 30% mai mic comparativ cu martorul netratat.

Combi-națiunile dintre compusul chimic C1 bromo{N-ciclohexil-N'-[fenil(piridin-2-il)metiliden]carbamohidrazono-tioat}cupru și ambii compuși biologici testați provoacă o scădere semnificativă a numărului de celule viabile de *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 4098. La intervalul de 4 ore de la inițierea contactului combinațiilor dintre compusul chimic și cel biologic cu substratul se observă deja o scădere semnificativă a valorilor Lg UFC/ml.

Valoarea parametrului dat scade constant până la 24 ore, după care se stabilizează. Este de menționat că curbele timpului de ucidere, în raport cu tulpina de levuri, a ambelor combinații sunt practic identice, suprapunându-se pe aproape toată lungimea lor. Numărul de celule viabile de *Saccharomyces cerevisiae*, ca rezultat al interacțiunii culturii de drojdie cu combinațiile între compusul chimic C1 și cei doi compuși biologici, se reduce spre finalul perioadei de monitorizare de aproximativ trei ori.

Cel de-al doilea compus chimic C2 dicloro{(prop-2-en-1-il)-N-(prop-2-en-1-il)-N'-[(piridin-2-il)metili-den] carbamo-hidrazonotioat}cupru, aplicat în concentrația care constituie ¼ din CMI, produce o reducere mai puțin pronunțată, dar veridică statistic, a numărului de celule viabile de *Saccharomyces cerevisiae*. Curba timpului de ucidere pentru acest compus diferă de cea a compusului chimic C1 prin faptul că nu se atestă o scădere progresivă a numărului de celule viabile cu trecerea timpului. Acest parametru rămâne la nivelul caracteristic momentului inițial al experienței. Comparativ cu martorul netratat, se observă o diminuare cu aproximativ 17% a numărului total de unități formatoare de colonii în cultura tratată cu compusul chimic C2 la momentul de timp de 12 ore, care se păstrează și la 24 de ore. La 48 de ore se observă o mică creștere a numărului de celule viabile, dar acesta rămâne mai mic în comparație cu martorul netratat și puțin mai mare în comparație cu nivelul inițial, de până la tratarea culturii cu compusul chimic.

Combi-națiunile dintre compusul chimic C2 și cei doi compuși biologici au un puternic efect de inhibiție al creșterii tulpinii *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 4098, înregistrându-se o reducere a numărului de celule viabile de 3,1-3,2 ori comparativ cu situația de până la contactul culturii cu

combinațiile acestor compuși. Ambele combinații au manifestat efect inhibitor de același nivel, deosebirile observate fiind minime și ne semnificative din punct de vedere statistic.

Curba timpului de ucidere a celui de-al treilea compus chimic C3 nitrato{N-ciclohexil-N'-[(1-(piridin-2-il)etiliden] carbamohidra-zonotioato} cupru repetă patternul de modificare a curbei celui de-al doilea compus chimic C2. Fiind aplicat în doză de 1/4 din CMI, acest compus se manifestă ca inhibitor al creșterii tulpinii *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 4098, numărul de celule viabile fiind semnificativ mai mic comparativ cu martorul netratat.

Combinațiile dintre acest compus și preparatele cu conținut de mixoxantofilă produc o diminuare semnificativă (de 3,2-3,5 ori față de începutul experienței) a numărului de celule viabile. Cea mai importantă scădere a numărului de celule viabile de *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 4098 se produce pe durata primelor 8 ore de contact al culturii cu combinațiile dintre compusul C3 și cele două preparate biologice cu conținut de mixoxantofilă. Acest nivel de inhibiție scade între 8 și 24 de ore, după care se păstrează stabil până la finalul etapei de monitorizare.

Astfel, patternurile de interacțiune ale culturilor de fungi levuriformi cu compușii chimici, biologici și combinațiile acestora sunt foarte apropiate între ele și scot în evidență efecte foarte pronunțate ale combinațiilor de compuși, în comparație cu compușii aplicați în mod individual.

Efectul antifungic mai pronunțat al combinațiilor dintre compușii chimici și cei biologici studiați în cadrul acestei lucrări, comparativ cu efectele pe care le prezintă fiecare dintre acești compuși aplicați în mod individual, poate fi rezultat al fenomenului de sinergism (efectele combinate ale două medicamente sunt mai mari decât suma efectelor celor două medicamente care acționează independent) sau de aditivism (efectele combinate ale două medicamente sunt egale cu suma efectelor celor două medicamente care acționează independent).

În vederea stabilirii tipului de interacțiune dintre compușii din combinații s-a apelat la metoda de determinare a indicelui de concentrație al inhibiției factoriale, care permite de a evalua cantitativ tipul efectului generat de combinațiile de compuși în raport cu activitatea lor totală.

Cu acest scop, șapte compuși chimici, cu activitate antifungică determinată față de tulpinile tip și cele clinice, au fost combinați cu trei extracte de spirulină, iar efectele lor au fost testate pe șase tulpini tip de fungi levuriformi. Concentrațiile aplicate au fost de 1/4-1/32 din CMI pentru fiecare dintre compuși (valori stabilite în cercetările descrise în subcapitolul 4.1). Valorile obținute ale ICIF pentru cele mai reușite combinații pot fi urmărite în Tabelul 4.7., iar concentrațiile compușilor pot fi urmărite în Anexa 1.

Interacțiunea dintre compusul chimic nitrato{N-ciclohexil-N'-[(1-(piridin-2-il)etiliden] carbamo-hidrazonotio-ato} cupru, aplicat în concentrație de 1/4-1/8 din CMI, și extractele de spirulină ES1 și ES3, precum și cu preparatul cu mixoxantofilină PCM2, aplicate în concentrație

de 1/4-1/8 din CMI, au demonstrat efecte antimicrobiene de tip sinergist în raport cu toate cele șase tulpini tip testate.

Tabelul 4.7. Tipul interacțiunii dintre compușii chimici și biologici cu proprietăți antifungice pe baza indicelui de concentrație al inhibiției factoriale (ICIF)

Compușii testați		<i>C. albicans</i> ATCC 90028	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	<i>C. glabrata</i> ATCC 2001	<i>S. cerevisiae</i> ATCC 4098	<i>M. guilliermondii</i> ATCC 6260	<i>C. neoformans</i> ATCC 13690
C ₁₄ H ₁₉ CuN ₅ O ₃ S	ES1	0,44 (S)	0,5 (S)	0,5 (S)	0,5 (S)	0,25 (S)	0,5 (S)
	ES3	0,5 (S)	0,5(Ad)	0,5 (S)	0,5 (S)	0,32 (S)	0,5 (S)
	PCM2	0,37 (S)	0,5 (S)	0,32 (S)	0,25 (S)	0,25 (S)	0,44 (S)
C ₁₇ H ₁₉ CuN ₅ O ₃ S	ES1	0,32 (S)	0,32 (S)	0,40 (S)	0,5 (S)	0,35 (S)	0,5 (S)
	ES3	0,35 (S)	0,37 (S)	0,5 (S)	0,56 (Ad)	0,35 (S)	0,5 (S)
	PCM2	0,25 (S)	0,32 (S)	0,37 (S)	0,5 (S)	0,25 (S)	0,37 (S)
C ₁₉ H ₂₁ BrCuN ₄ S	ES1	0,32 (S)	0,35 (S)	0,35 (S)	0,44 (S)	0,32 (S)	0,44 (S)
	ES3	0,32 (S)	0,32 (S)	0,32 (S)	0,5 (S)	0,32 (S)	0,44 (S)
	PCM2	0,12 (S)	0,32 (S)	0,32 (S)	0,37 (S)	0,32 (S)	0,5 (S)
C ₁₇ H ₁₇ ClCuN ₄ O ₂ S	ES1	0,44 (S)	0,5 (S)	0,5 (S)	0,56 (Ad)	0,5 (S)	1,37 (I)
	ES3	0,5 (S)	0,5 (S)	0,56 (Ad)	0,84 (Ad)	0,5 (S)	1,44 (I)
	PCM2	0,37 (S)	0,44 (S)	0,5 (S)	0,61 (Ad)	0,44 (S)	1,23 (I)
C ₁₃ H ₁₆ C ₁₂ CuN ₄ S	ES1	0,44 (S)	0,32 (S)	0,32 (S)	0,5 (S)	0,44 (S)	0,5 (S)
	ES3	0,44 (S)	0,44 (S)	0,5 (S)	0,44 (S)	0,32 (S)	0,5 (S)
	PCM2	0,32 (S)	0,32 (S)	0,32 (S)	0,44 (S)	0,25 (S)	0,5 (S)
C ₁₇ H ₁₆ N ₆ OS ₂	ES1	0,35 (S)	0,44 (S)	0,32 (S)	0,5 (S)	0,32 (S)	0,44 (S)
	ES3	0,32 (S)	0,5 (S)	0,37 (S)	0,5 (S)	0,32 (S)	1,42 (I)
	PCM2	0,32 (S)	0,25 (S)	0,25 (S)	0,5 (S)	0,25 (S)	0,5 (S)
C ₁₈ H ₂₀ CuN ₄ O ₂ S	ES1	0,44 (S)	0,5 (S)	0,5 (S)	0,84 (Ad)	0,44 (S)	0,84 (Ad)
	ES3	0,5 (S)	0,5 (S)	0,5 (S)	0,84 (Ad)	0,5 (S)	0,84 (Ad)
	PCM2	0,37 (S)	0,44 (S)	0,5 (S)	0,61 (Ad)	0,44 (S)	0,84 (Ad)

Notă: Sinergism (S) – $FIC \leq 0,5$; Aditivitate (Ad) – $0,5 < FIC \leq 1$; Indiferență (I) – $1 < FIC \leq 4$

Rezultatele obținute demonstrează posibilitatea de a reduce povara chimică asupra organismului de 4-8 ori la combinarea compusului chimic cu conținut de cupru cu extractele din biomasa de spirulină. De asemenea, se pot presupune efecte mai sigure la acțiunea combinațiilor asupra mai multor ținte celulare, ceea ce ar putea asigura stabilitatea și repetabilitatea rezultatelor clinice la aplicarea acestor combinații.

Nitrato{N-tert-butil-N'-[fenil(piridin-2-il)metiliden]carbamohi-dra-zono-tioat}cupru la combinarea cu cele trei preparate de origine biologică a generat de asemenea, în absoluta majoritate a variantelor studiate, efecte antifungice sinergice. Unica excepție este combinația acestui compus cu extractul ES3 în raport cu tulpina tip *S. cerevisiae* ATCC 4098. În acest caz efectul este de tip aditiv (suma efectelor individuale ale compușilor din combinație). Compusul chimic în componența combinației a fost aplicat în concentrație de 1/8 -1/32 CMI, iar preparatele

biologice – 1/8-1/16 CMI. Astfel, la aplicarea acestor combinații, sarcina chimică asupra organismului ar putea fi redusă de 32 de ori, în condițiile unei acțiuni antifungice suficiente.

Bromo{N-ciclohexil-N'-[fenil(piridin-2-il)metiliden]carbamo-hidrazono-tioat}cupru a fost combinat cu compușii biologici în concentrații de 1/8 -1/32 din CMI, iar compușii biologici în concentrații de la 1/16 până la 1/32 din CMI. Toate efectele antifungice observate asupra celor șase tulpini tip au fost de tip sigergist. Astfel, și în cazul acestui compus putem reduce cantitatea de compus chimic de 32 ori pentru un efect antimicrobian solicitat.

Cloro{N-[4-(etoxycarbonil)fenil]-N'-[(1-(piridin-2-il)etiliden]carbamo-hidrazonotioato} cupru și compușii biologici au fost combinați în concentrații de la ¼ până la 1/8 din CMI. În cazul acestor combinații efectele generate în raport cu tulpinile tip au fost grupate în trei categorii: sinergice, aditive și indiferente. În cazul efectului indiferent, care a fost observat la aplicarea combinațiilor respective asupra tulpini *Cryptococcus neoformans* ATCC 13690, efectul compusului chimic nu a fost modificat în combinație cu preparatele de origine biologică. În cazul tulpinii *S. cerevisiae* ATCC 4098, efectele combinațiilor au fost de natură aditivă, iar în cazul tulpinii *C. glabrata* ATCC 2001 efectul unei singure combinații (compusul chimic cu preparatul ES3) a fost de natură aditivă. În toate celelalte cazuri efectele combinațiilor au fost de natură sinergică.

Dicloro{(prop-2-en-1-il)-N-(prop-2-en-1-il)-N'-[(piridin-2-il)metiliden]carbamo-hidrazonotioat}cupru a fost luat în concentrații de 1/4 -1/8 din CMI și combinat cu preparatele de natură biologică aplicate în concentrație de 1/8 din CMI. Toate combinațiile au avut efecte antifungice sinergice în raport cu cele șase tulpini tip testate. Astfel, sarcina chimică în cazul unui eventual tratament cu asemenea combinații poate fi diminuată de opt ori comparativ cu aplicarea compusului chimic de unul singur.

2-[(2-Hidroxifenil)metiliden]-N-[4-(3-metil-5-sulfanil-4H-1,2,4-triazol-4-il)fenil]hidrazin-1-carbotioamidă a fost luat în concentrații de 1/8 -1/32 din CMI și combinat cu preparatele de natură biologică aplicate în concentrații de 1/8-1/16 din CMI. Toate combinațiile obținute au avut efecte antifungice sinergice în raport cu cele șase tulpini tip testate, cu o singură excepție. Combinația dintre compusul chimic și ES3 a avut același efect ca și compusul chimic aplicat independent în raport cu tulpina *Cryptococcus neoformans* ATCC 13690. În celelalte cazuri, sarcina chimică în cazul unui eventual tratament cu asemenea combinație poate fi diminuată de 32 de ori comparativ cu cazul aplicării compusului chimic de unul singur.

{N'-[(4-hidroxi-2-oxidofenil)metiliden]-N-prop-2-en-1-ilcarbamo-hidrazonotioato}(3,4-dimetilpiridin)cupru a fost luat în concentrații de 1/4 -1/8 din CMI și combinat cu preparatele de natură biologică aplicate în concentrație de 1/4-1/8 din CMI. În cazul a două dintre tulpinile tip

testate (*Cryptococcus neoformans* ATCC 13690 și *S. cerevisiae* ATCC 4098), efectul combinațiilor obținute a fost de natură aditivă. Toate celelalte combinații au avut efecte antifungice sinergice în raport cu cele patru tulpini tip testate. În cazul acestor combinații, doza de compus chimic poate fi redusă de opt ori ca rezultat al combinării lui cu preparatele de natură biologică.

4.4. Evaluarea toxicității acute a compușilor chimici testați cu ajutorul testului de imobilizare a crustaceului *Daphnia magna*

Studierea toxicității compușilor noi cercetați în această lucrare reprezintă o etapă importantă în selectarea compușilor ce vor fi cercetați ulterior în studii preclinice și clinice. Pentru determinarea toxicității compușilor chimici s-a efectuat testul de imobilizare a crustaceului *Daphnia magna* conform metodologiei europene standardizată (OECD). Directiva 2010/63/UE privind protecția animalelor utilizate în scopuri științifice include o referire explicită la abordarea „3R” ceea ce presupune (*eng.*, *Replacement, Reduction and Refinement*) înlocuirea, reducerea și perfecționarea metodologiilor în testările de laborator cu utilizarea animalelor. Savanții au elaborat și au validat metode de alternativă, care să permită utilizarea produselor mai sigure pentru sănătatea umană, decât testarea pe animale.

Organismele internaționale privind protecția animalelor recomandă efectuarea cercetărilor de toxicitate *in vivo* pe *Daphnia magna*. În acest context, ca metodă de alternativă utilizată în prezenta lucrare a fost înlocuirea pe deplin a testării toxicității pe animale cu testarea pe organisme nevertebrate. Subcapitolul cuprinde informație relevantă privind rezultatele unei serii de experimente prin care s-a urmărit evaluarea toxicității compușilor testați prin realizarea biotestelor de toxicitate acută asupra unei specii de organisme acvatice din subîncrângătura artropode, precum crustaceele, reprezentate de *Daphnia magna*.

Acest organism este utilizat frecvent în experimente de laborator deoarece, datorită structurii, transparenței și capacității de supraviețuire sub o lamelă, pot fi mai ușor explorate microscopic.

Realizarea testului a permis evaluarea toxicității acute a compușilor testați la 24 și la 48 de ore de acțiune asupra crustaceului *Daphnia magna*, exprimată sub formă de concentrație mediană efectivă (CE50), care a rezultat în imobilizare, și cea mai mare concentrație care nu provoacă imobilizare. Activitățile biologice ale compușilor testați au fost comparate cu cele ale compușilor de referință.

Toxicitatea compușilor chimici supuși testării a fost prezentată sub forma valorilor de concentrație medie letală (LC50), care au fost calculate prin formula și raportul doză-răspuns determinat prin metoda potrivirii celor mai mici pătrate cu ajutorul software-ului GraphPad Prism. Toate datele sunt prezentate ca medii \pm o deviere standard (DS).

Tabelul 4.8. Rezultatele biotestului cu *Daphnia magna* privind determinarea indicatorilor de toxicitate (LC50 (μM), SD) ai compușilor chimici testați

Nr. d/o	Codul compusului	Compoziția chimică	Denumirea chimică	<i>Daphnia magna</i> (24h) LC ₅₀ (μM)	<i>Daphnia magna</i> (48h) LC ₅₀ (μM)
1.	A. I (1.1)	C ₁₃ H ₁₇ ClCu N ₄ S	Cloro-[N-ciclohexil-2-(piridin-2-il-metiliden)hidrazincarbonat]cupru	3,48±2,80	2,19±1,16
2.	A. I (1.3)	C ₁₃ H ₁₇ CuN ₅ O ₃ S	Nitrato{N-ciclohexil-N'-[(piridin-2-il)metiliden]carbamo-hidrazonotioato}cupru	2,60±0,85	1,55±0,03
3.	A. I (1.7)	C ₁₉ H ₂₁ BrCu N ₄ S	Bromo{N-ciclohexil-N'-[fenil(piridin-2-il)metiliden]carbamo-hidrazonotioat}cupru	0,12±0,01	0,11±0,01
4.	A. I (1.9)	C ₁₁ H ₁₅ ClCu N ₄ S	Cloro{N-tert-butil-N'-[(piridin-2-il)metiliden]carbamo-hidrazonotioat}-cupru	3,62±2,61	1,43±0,47
5.	A. I (1.15)	C ₁₂ H ₁₇ ClCu N ₄ S	Cloro{N-tert-butil-N'-[1-(piridin-2-il)etiliden]carbamo-hidrazonotioat}cupru	0,11±0,01	0,11±0,01
6.	A. I (1.41)	C ₁₃ H ₁₉ ClCu N ₄ O ₅ S	Perclorat de {N-ciclohexil-N'-[(piridin-2-il)metiliden]carbamo-hidrazonotioato}aquacupru	1,40±0,33	2,09±1,30
7.	Martor	Clotrimazol		2,06±0,10	1,5±0,2

Toxicitatea compușilor chimici supuși testării a fost prezentată sub forma valorilor de concentrație medie letală (LC50), care au fost calculate prin formula și raportul doză-răspuns determinat prin metoda potrivirii celor mai mici pătrate cu ajutorul software-ului GraphPad Prism. Toate datele sunt prezentate ca medii \pm o deviere standard (DS).

Astfel, au fost stabilite valorile concentrației letale medii (LC50) și evaluate efectele generate asupra *Daphnia magna*. Valorile LC50 ale compușilor testați au fost utilizate ca indicatori cantitativi ai toxicității lor și pentru evaluarea comparativă a rezultatelor obținute.

Datele din Tabelul 4.8 denotă că compușii testați manifestă toxicitate pentru *Daphnia magna* în intervalul de concentrație semi-maximală (LC50) de 0,1-3,6 μM și 0,1-2,2 μM , după 24 și, respectiv, 48 de ore de expunere. Clotrimazolul, luat ca martor/referință, a arătat toxicitate la LC50 de 2,1 și 1,5 μM după 24 și, respectiv, 48 de ore de expunere. Astfel, compușii A. I (1,41), A. I (1,9), A. I (1,3), A. I (1,1) sunt mai puțin toxici în comparație cu clotrimazolul.

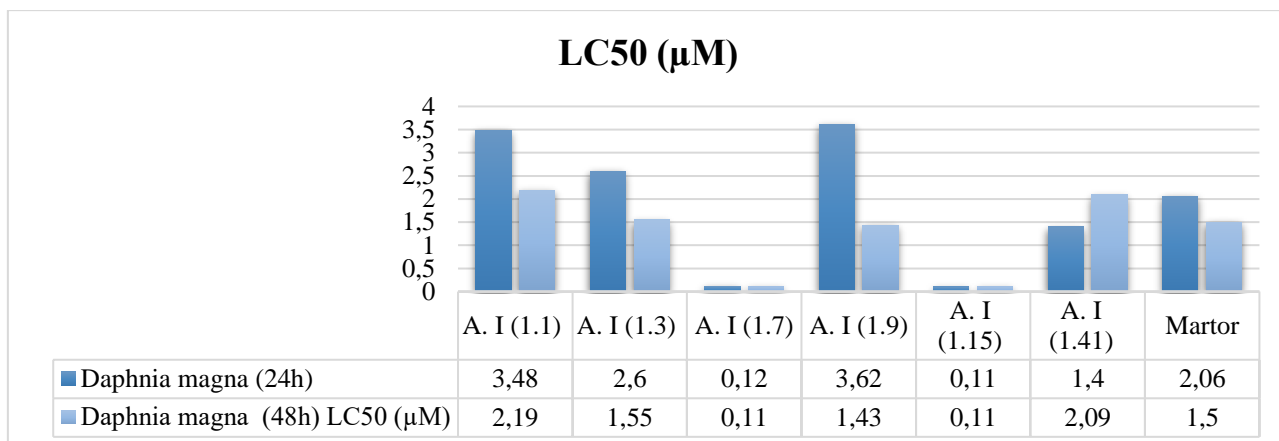


Fig.4.12. Toxicitatea compușilor chimici testați prezentată sub forma valorilor de concentrație medie letală (LC50)

Efectul influenței compușilor în concentrație medie letală (LC50) asupra *Daphnia magna* a fost determinată prin examenul microscopic care denotă evidențierea a unor mișcări ușoare a peste 50% din aceste organisme nevertebrate.

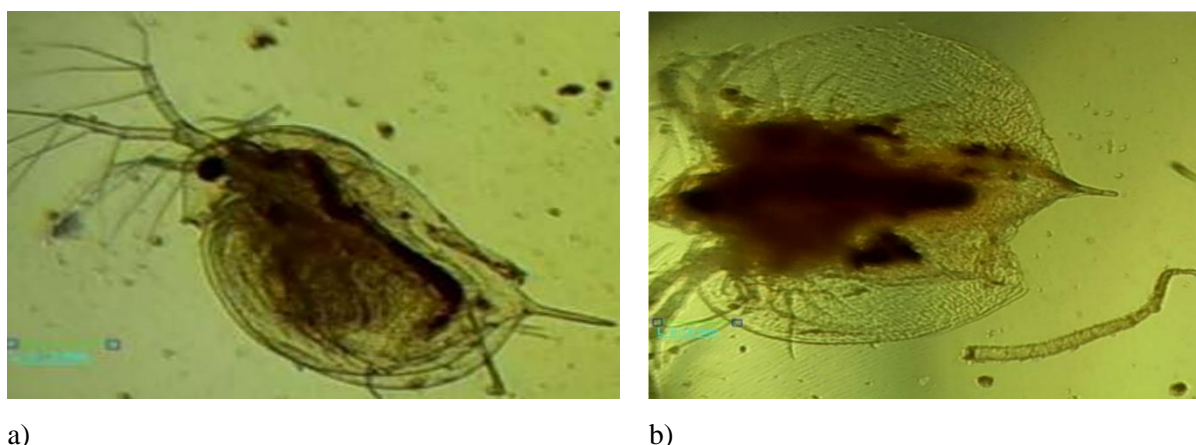


Fig. 4.13. Imagini ale *Daphnia magna* (microscopia optică) sub influența compușilor chimici: a) *Daphnia magna* fără contact cu compuși chimici: nu se vizualizează modificări patologice; b) *Daphnia magna* după contact cu compuși chimici: se observă că membrele și corpul au fost deformați și conținutul s-a amestecat cu mediul de creștere

Totodată, s-a observat că o bună parte din dafnii au rămas nemișcate, în special la concentrații mari ale compusului chimic, deoarece au prezentat un efect citotoxic total. La examinare s-a observat că membrele și trunchiurile *Daphniei magna* au fost deformați și conținutul lor a fost amestecat cu mediile de creștere. Evident că la analiză microscopică a exemplarelor de control de *Daphnia magna*, care nu au fost puse în contact cu compuși chimici, nu s-au observat modificări patologice.

4.5. Influența compușilor chimici și biologici testați, și a combinațiilor lor asupra factorilor de patogenitate ai *Candida albicans* și ai *Candida tropicalis*

În studiul dat s-a urmărit, de asemenea, evidențierea modificărilor expresiei factorilor de patogenitate ai tulpinilor ce se referă la două specii de *Candida* – *Candida albicans* și *Candida tropicalis*. În acest compartiment al lucrării au fost testate atât compușii individuali, cât și combinațiile lor. Astfel, în regim de monosistem, au fost testate două extracte de spirulină ES1 (B1) și PCM2 (B2), și trei compuși chimici: bromo{N-ciclohexil-N'-[fenil(piridin-2-il)metiliden]carbamohiprazono-tioat}cupru (C1), nitrato{N-tert-butil-N'-[fenil(piridin-2-il)metiliden]carbamohiprazono-tioat}cupru (C2) și 2-[(2-Hidroxfenil)metiliden]-N-[4-(3-metil-5-sulfanil-4H-1,2,4-triazol-4-il)fenil]hidrazin-1-carbotioamida (C3). Compușii au fost aplicați în concentrații, care constituie 25, 50 și 75% din valoarea CMI pentru fiecare în mod individual. De asemenea, au fost testate și combinațiile dintre compușii chimici și cei naturali, în aceleași concentrații, care constituie 25, 50 și 75% din CMI pentru fiecare compus în parte.

În Figura 4.14 este ilustrată modificarea activității hemolizinei exocelulare eliberată de cele două specii de fungi sub acțiunea celor două extracte de spirulină și a trei compuși chimici cu activitate antifungică. Analiza a fost realizată în baza indicelui Hz, valoarea căruia indică în ce măsură compusul sau combinația de compuși inhibă activitatea hemolizinei eliberate de cultura fungică. Creșterea valorilor indicelui Hz reflectă creșterea gradului de inhibiție a activității enzimatică. Din rezultatele prezentate pe Figura 4.14 se vede că cea mai slabă activitate antihemolizinică o au extractele de spirulină aplicate în mod individual la toate cele trei concentrații. Totuși, la concentrația de 75% din CMI a acestor două extracte de spirulină se atestă o creștere a nivelului de inhibiție a hemolizinei eliberate atât de *Candida albicans*, cât și de *Candida tropicalis*.

Rezultatele obținute la aplicarea celor trei compuși chimici noi sunt, de asemenea, foarte asemănătoare, valorile maxime ale indicelui Hz fiind identificate în cazul concentrațiilor de 75% din CMI pentru fiecare dintre aceste substanțe. Bromo{N-ciclohexil-N'-[fenil(piridin-2-il)metiliden]carbamohiprazono-tioat}cupru are un efect mai pronunțat în cazul *Candida albicans*, comparativ cu *Candida tropicalis*, și arată în acest caz cel mai bun rezultat din această serie de experiențe. În cazul celei de-a doua specie, doi compuși, bromo{N-ciclohexil-N'-[fenil(piridin-2-il)metiliden]carbamohiprazono-tioat}cupru și -[(2-Hidroxfenil)metiliden]-N-[4-(3-metil-5-sulfanil-4H-1,2,4-triazol-4-il)fenil]hidrazin-1-carbotioamida, s-au dovedit a fi la fel de eficienți, prezentând valori maxime de inhibiție a activității hemolizinei la concentrațiile care au constituit 75% din CMI pentru fiecare dintre ele.

Rezultate foarte promițătoare au fost obținute în cazul combinațiilor dintre compușii chimici și cei biologici. În cazul concentrațiilor, care au constituit 25% din CMI, cu toate că a fost atinsă o majorare a nivelului de inhibiție prezentat de compușii aplicați individual, aceasta nu a fost semnificativă. În schimb, la concentrația de 50% din CMI, combinațiile dintre extractul carotenoid cu conținut de mixoxantofilă (PCM2) și doi dintre compușii chimici, bromo{N-ciclohexil-N'-[fenil(piridin-2-il)metiliden]carbamohidrazono-tioat}cupru (C1) și nitrato{N-tert-butil-N'-[fenil(piridin-2-il)metiliden]carbamohidrazono-tioat}cupru (C2), ambele cu conținut de cupru, au dus la inhibarea practic completă a activității hemolizinei eliberate de ambele specii de *Candida*. Astfel, în cazul *Candida albicans* valoarea indicelui Hz pentru ambele combinații a fost de 0,97, iar în cazul *Candida tropicalis* – de 0,84-0,95.

Cele mai bune rezultate au fost obținute în cazul aplicării combinațiilor de 75% din CMI a compușilor chimici și biologici testați. În acest caz, pentru *Candida albicans* cele două combinații menționate mai sus au arătat inhibiție totală a activității hemolizice, în timp ce alte combinații au atins performanța prin valori Hz de la 0,88 la 0,98. În cazul *Candida tropicalis* de asemenea au fost obținute rezultate foarte bune la acest nivel de concentrații, dar puțin mai modeste comparativ cu specia *C. albicans*. Astfel, valorile Hz au fost între 0,7 și 0,98, valorile maxime fiind caracteristice pentru combinațiile PCM2 cu bromo{N-ciclohexil-N'-[fenil(piridin-2-il)metiliden]carbamohidrazono-tioat}cupru (C1) și nitrato{N-tert-butil-N'-[fenil(piridin-2-il)metiliden]carbamohidrazono-tioat}cupru (C2).

Activitatea altui factor de patogenitate – fosfolipaza fungică – și modificarea acestuia sub acțiunea compușilor biologici și chimici selectați, precum și a combinațiilor acestora poate fi urmărită pe Figura 4.15. La aplicarea în monosistem a compușilor în concentrație, care constituie 25% din CMI, în cazul *Candida tropicalis* nu a fost observat un careva efect benefic de inhibare a activității fosfolipazei eliberate.

Altfel stau lucrurile în cazul *C. albicans*, la care chiar și în aceste concentrații mici atât compușii biologice, cât și cei chimici au dus la creșterea indicelui Fz cu 17,0-21,8% comparativ cu martorul netratat. Concentrația de 50% din CMI a compușilor testați a avut un efect de inhibiție mai pronunțat asupra fosfolipazei fungice. Astfel, în cazul *C. tropicalis* cei trei compuși chimici au dus la o creștere a valorii indicelui Fz cu 9,2-11,5% față de martor. Mai semnificativă a fost inhibiția fosfolipazei la *C. albicans*. În acest caz, valorile indicelui Fz au crescut în funcție de compus cu 20,4-36,7% față de martor.

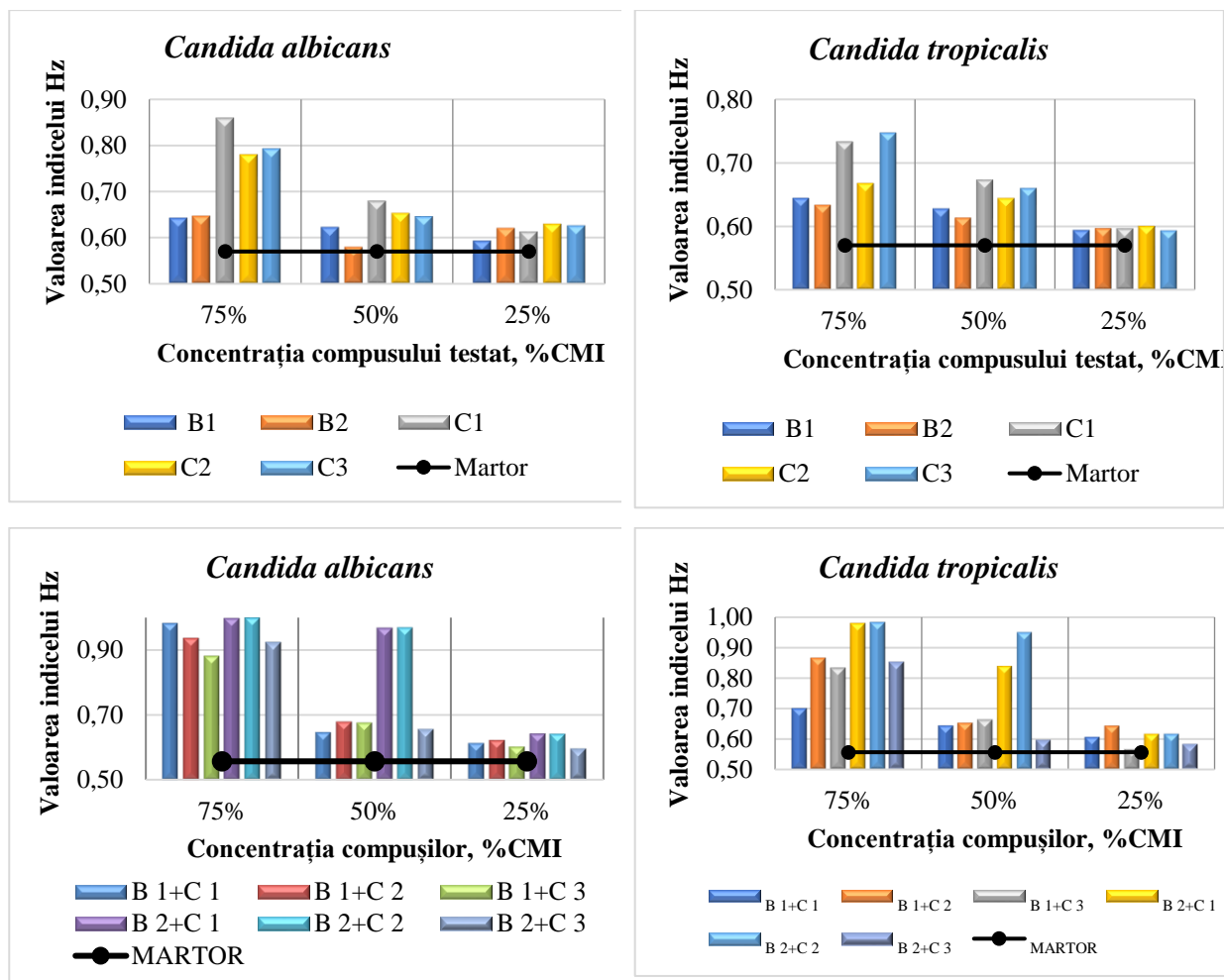


Fig. 4.14. Acțiunea compușilor chimici și biologici, și a combinațiilor lor asupra activității hemolizinei la *Candida albicans* și la *Candida tropicalis*. C1 - $C_{19}H_{21}BrCuN_4S$; C2 - $C_{17}H_{19}CuN_5O_3S$; C3 - $C_{17}H_{16}N_6OS_2$; B1 - ES; B2 – PCM2

Valoarea minimă a efectului de inhibiție în această serie de experiențe a fost în cazul preparatului biologic cu conținut de mixoxantofilă, iar efectul maxim – în cazul compusului bromo{N-ciclohexil-N'-[fenil(piridin-2-il)metiliden]carbamohidrazono-tioat}cupru.

Cele mai pronunțate efecte inhibitorii le-au avut compușii aplicați în mod individual în concentrație de 75% din CMI. În cazul *C. tropicalis*, rezultatul a fost mai puțin pronunțat, dar semnificativ. Astfel, compușii biologici au provocat o creștere a valorii indicatorului Fz cu 9,8-11,5% față de martor, iar compușii chimici – cu 18,4-27,6%. În cazul *C. albicans*, concentrațiile de 75% din CMI ale compușilor biologici au asigurat o creștere a valorii Fz cu 34,7-37,4%, iar compușii chimici – cu 49,0-72,8% față de martor. Ca și în cazul hemolizinei, combinațiile dintre compușii biologici și cei chimici au avut un efect mai pronunțat în ceea ce ține de inhibarea fosfolipazei eliberate de ambele specii de *Candida* luate în studiu.

Concentrațiile de 0,25% din CMI ale compușilor în combinațiile testate au asigurat un nivel minim de inhibiție a activității fosfolipazei fungice. Astfel, valorile Fz obținute în variantele experimentale sunt doar cu 11,7-14,6% mai mari ca cele specifice matorului, ceea ce a fost valabil pentru ambele specii de fungi și pentru toate variantele de combinații testate. Este de menționat că în cazul *C. tropicalis* această concentrație nu a dat nici un rezultat la aplicarea individuală a compușilor, iar combinațiile totuși s-au manifestat ca inhibitori slabi, ceea ce confirmă încă o dată caracterul sinergic al acțiunii combinațiilor respective, observate în alte teste prezentate mai sus.

În cazul concentrațiilor de 50% din CMI a compușilor în combinații observăm o diferență majoră dintre efectele combinațiilor care conțin extract ES1 și combinațiile care conțin preparatul cu mixoxantofilă. Astfel, dacă combinațiile cu ES1 în concentrație de 50% din CMI au dus la mărirea valorii indicelui Fz cu 14,6-18,7% în cazul *C. tropicalis* și cu 17,5 – 33,3% în cazul *C. albicans*.

Se evidențiază în mod pozitiv combinațiile dintre PCM2 și compușii chimici care conțin cupru – C1 și C2. În cazul acestor combinații, la concentrația de 50% din CMI avem o creștere a valorii Fz cu 56,1-67,3% față de mator pentru ambele specii. Combinația PCM2 cu cel de-al treilea compus chimic, care nu conține metal, a dus la creșterea valorii Fz cu 22,8% în cazul *C. tropicalis* și cu 23,4% în cazul *C. albicans*.

O inhibiție totală sau foarte aproape de totală a activității fosfolipazei fungice a fost obținută sub acțiunea combinațiilor dintre compușii biologici și cei chimici aplicate în concentrație de 75% diCMI. Valorile Fz se apropie de 1 sau ating această valoare în cazul *C. albicans*, acestea fiind între 0,94 și 1,0. În cazul *C. tropicalis*, indicele Fz de asemenea atinge valori foarte mari – între 0,82 și 0,99. De menționat că în cazul ambelor specii efectul maximal este atins de combinațiile dintre PCM2 și cei trei compuși chimici selectați. Chiar și în cazul 2-[(2-Hidroxifenil)metiliden]-N-[4-(3-metil-5-sulfanil-4H-1,2,4-triazol-4-il)fenil]hidrazin-1-carbotioamidei, care nu conține cupru și a fost mai puțin activ în concentrațiile mai mici, avem valori ale Fz de 0,95 pentru ambele specii.

Un alt factor de patogenitate fungic studiat a fost activitatea proteinazei. Rezultatele obținute la aplicarea compușilor biologici și chimici, și a combinațiilor lor pot fi văzute pe Figura 4.16. Concentrațiile de 25% din CMI ale compușilor biologici și chimici aplicați în mod individual nu au avut un efect de inhibare a activității proteinazei eliberate de *C. tropicalis*. La *C. albicans*, chiar și această concentrație a dus la o creștere cu 12,4 – 20,9% a valorii indicelui Fz comparativ cu matorul.

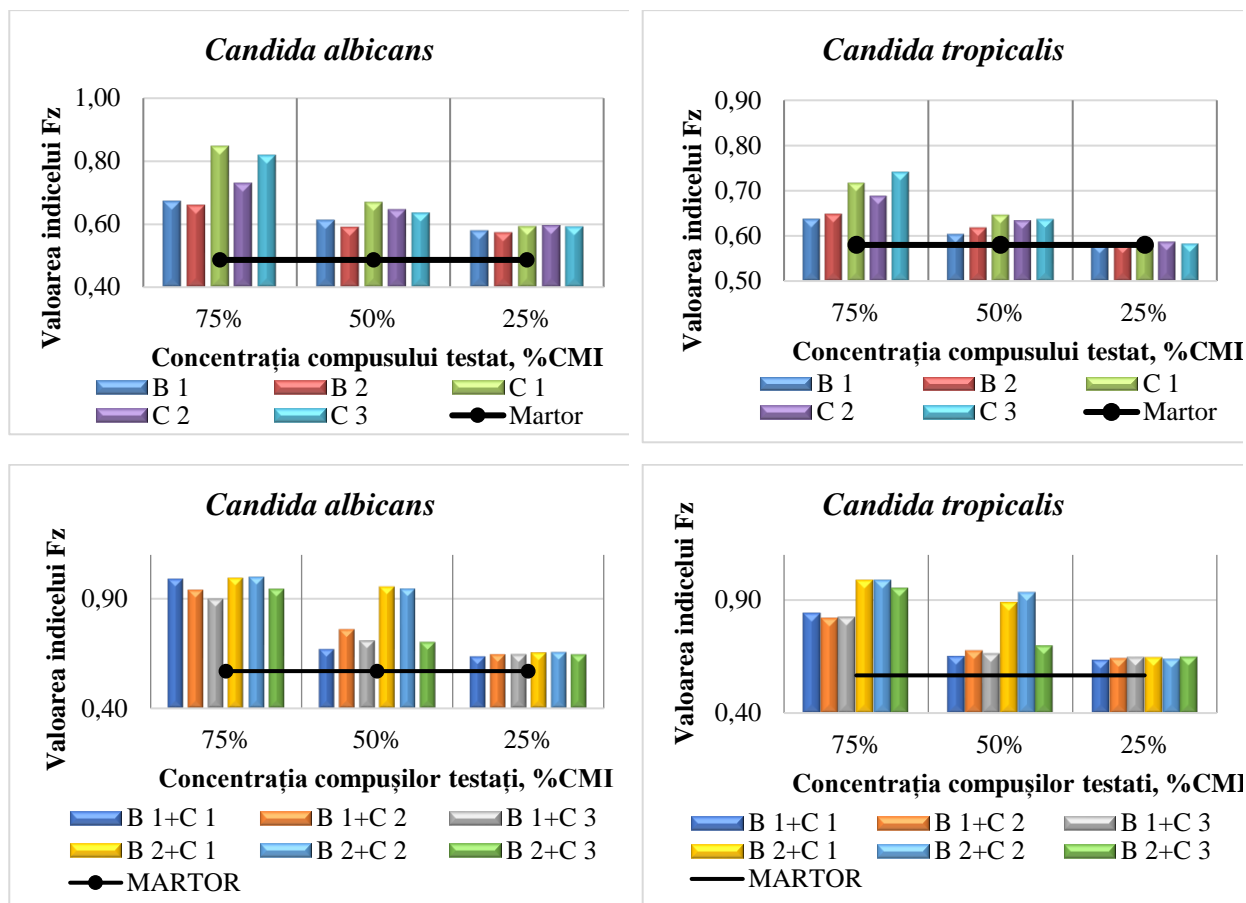


Fig. 4.15. Acțiunea compușilor chimici și biologici, și a combinațiilor lor asupra activității fosfolipazei la *Candida albicans* și *Candida tropicalis*. C1 - $C_{19}H_{21}BrCuN_4S$; C2 - $C_{17}H_{19}CuN_5O_3S$; C3 - $C_{17}H_{16}N_6OS_2$; B1 - ES; B2 – PCM2

Concentrația de 50% din CMI a compușilor biologici și chimici a avut un efect destul de uniform în cazul *C. tropicalis*, provocând o creștere a indicelui Fz cu 11,3-14,9% față de martor. În cazul concentrației de 50% din CMI, indicele Fz la *C. albicans*, de asemenea, a crescut în limite destul de înguste – cu 16,3-28,1% față de martor, dar totuși, mai pronunțat în cazul compușilor chimici, decât a celor biologici.

Concentrația de 75% din CMI a dus la o majorare uniformă a valorii Fz, aceasta variind în limite destul de înguste în funcție de specie și de compus – de la 0,64 până la 0,80.

Acest factor de patogenitate pare a fi cel mai rezistent la acțiunea compușilor selectați aplicați în mod individual, comparativ cu hemolizina și fosfolipaza fungică, care au fost mai sensibile.

Combinațiile dintre compușii biologici și cei chimici au fost mai active, comparativ cu compușii aplicați în mod individual. La concentrațiile de 25% din CMI ale compușilor în combinații, valoarea indicelui Fz a crescut cu 12,9-24,6%, comparativ cu martorul la ambele

specii. Excepție face combinația dintre extractul de spirulină ES1 cu compusul nitrato{N-tert-butil-N'-[fenil(piridin-2-il)metiliden]carbamoimidrazono-tioat}cupru, care a dus la o creștere cu aproape 60% a valorii Fz pentru *C. tropicalis*, aceasta constituind 0,91 unități. Este de menționat că cu creșterea concentrației compușilor în această combinație, gradul de inhibiție a activității proteinizice nu se mai modifică la această specie.

La concentrația de 50% din CMI a compușilor testați încă două combinații ies în evidență: combinațiile dintre PCM2 și cei doi compuși chimici cu conținut de cupru care, de altfel, s-au manifestat și în cazul tuturor factorilor de patogenitate analizați mai sus. În cazul acestor combinații, valoarea Fz atinge 0,95 de unități pentru ambele specii.

Concentrațiile de 75% din CMI a compușilor în combinații au asigurat un nivel foarte înalt de inhibiție al activității proteinazei, valorile Fz fiind peste 0.9 pentru ambele specii și pentru toate combinațiile analizate.

Astfel, chiar dacă la nivel de compuși aplicați în regim de monosistem, proteinaza părea a fi un factor de patogenitate mai puțin sensibil la acțiunea compușilor selectați, combinațiile dintre aceștia au manifestat efecte sinergice pronunțate, inhibând semnificativ activitatea acestui factor. Capacitatea de formare a biofilmelor constituie un factor de patogenitate esențial pentru reprezentanții genului *Candida*, asigurând colonizarea organelor atacate și protecția de factorii imuni ai organismului atacat. Rezultatele obținute în cazul testării capacității compușilor selectați și a combinațiilor lor de a inhiba formarea de biofilme de către *C. albicans* și *C. tropicalis* pot fi urmărite pe Figura 4.17.

Concentrațiile de 25% din CMI a compușilor analizați nu au provocat careva modificări în capacitatea celor două specii de *Candida* de a forma biofilme. În schimb, la aplicarea concentrațiilor de 50% din CMI efectul de inhibiție al acestui factor de patogenitate a fost foarte pronunțat și a constituit 11,3-38,6% în cazul *C. tropicalis* și 18,7-50,6% în cazul *C. albicans*. Este de menționat că efect maxim la această concentrație, în raport cu cele două specii, au avut aceiași doi compuși: extractul de spirulină ES1 și compusul chimic nitrato{N-tert-butil-N'-[fenil(piridin-2-il) metiliden]carbamoimidrazono-tioat}cupru.

La concentrația de 75% a compușilor testați, aplicați în regim de monosistem, efectul de inhibare al capacității de formare a biofilmului este și mai pronunțat, iar diferențele dintre compușii testați devin mai puțin vizibile. Astfel, capacitatea de formare a biofilmului la *C. albicans* în funcție de compusul aplicat se reduce cu 49,6-62,4% față de martor, iar la *C. tropicalis* – cu 37,5-51,8%.

Combinațiile dintre compușii biologici și chimici au fost mult mai active în ceea ce ține de inhibarea procesului de formare a biofilmelor de către *C. albicans* și *C. tropicalis*. Deja la

concentrația de 25% din CMI a compușilor se înregistrează o reducere a acestui factor de patogenitate practic în toate variantele experimentale.

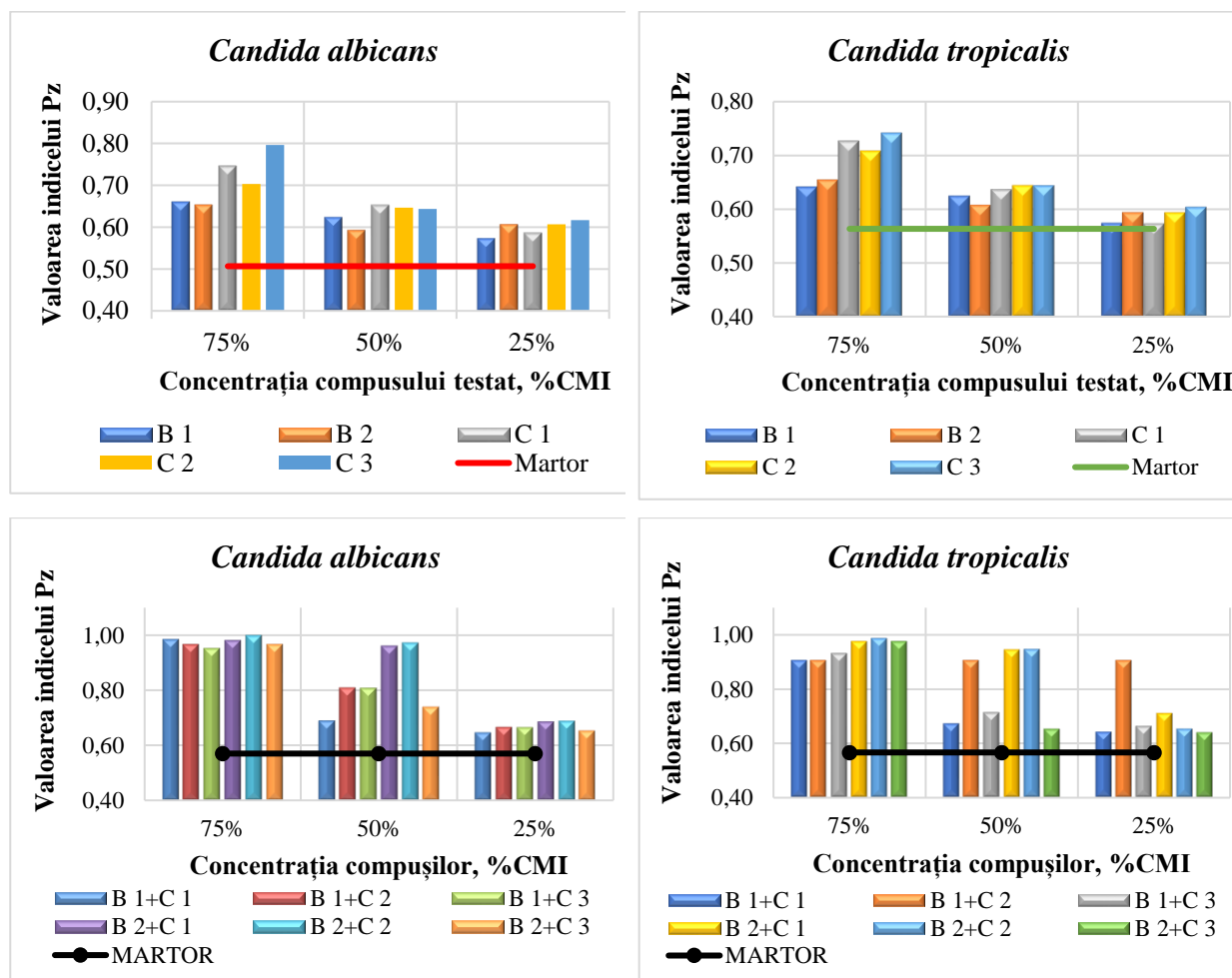


Fig. 4.16. Acțiunea compușilor chimici și biologici, și a combinațiilor lor asupra activității proteinazei la *Candida albicans* și la *Candida tropicalis*. C1 - $C_{19}H_{21}BrCuN_4S$; C2 - $C_{17}H_{19}CuN_5O_3S$; C3 - $C_{17}H_{16}N_6OS_2$; B1 - ES; B2 – PCM2

Cele mai semnificative rezultate au fost obținute în cazul combinației dintre extractul de spirulină ES1 și compusul bromo{N-ciclohexil-N'-[fenil(piridin-2-il)metiliden]carbamohidrazono-tioat}cupru, care produce la ambele specii o reducere de două ori a capacității de formare a biofilmului.

În cazul concentrațiilor de 50% din CMI a compușilor din componența combinațiilor, se pare că rolul primordial aparține compusului biologic. Astfel, la concentrația menționată toate combinațiile care conțin extract de spirulină ES1 au fost mult mai active, comparativ cu cele care au avut în componență preparat carotenoid cu mixoxantofilă. Astfel, în cazul combinațiilor cu ES1 reducerea capacității de formare a biofilmului de către cele două specii a constituit 89,7-92,8% în cazul *C. albicans* și 74,5-90,3% în cazul *C. tropicalis*, comparativ cu culturile respective netratate.

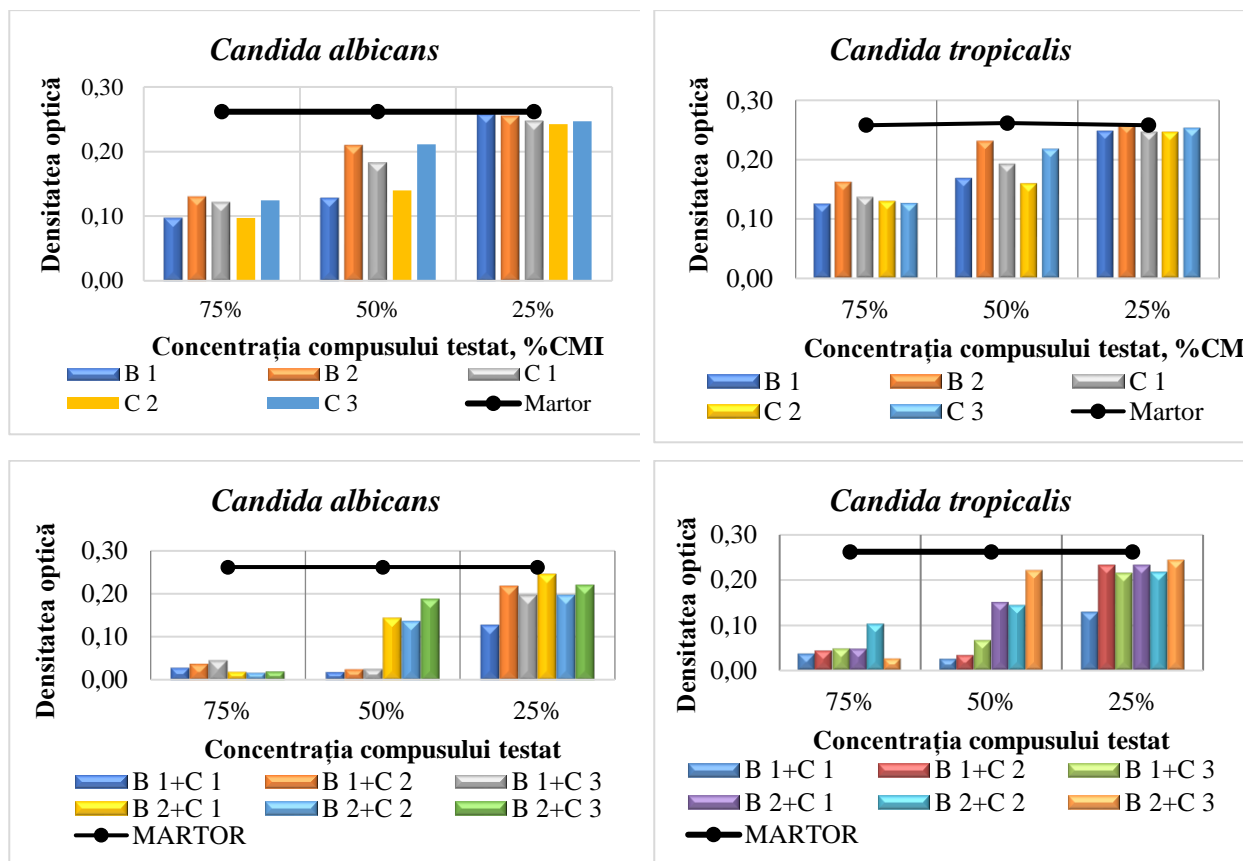


Fig. 4.17. Acțiunea compușilor chimici și biologici, și a combinațiilor lor asupra capacității de formare a biofilmului la *Candida albicans* și la *Candida tropicalis*. C1 - $C_{19}H_{21}BrCuN_4S$; C2 - $C_{17}H_{19}CuN_5O_3S$; C3 - $C_{17}H_{16}N_6OS_2$; B1 - ES; B2 – PCM2

În cazul concentrațiilor de 75% din CMI, combinațiile cu PCM2 devin mult mai active. În cazul *C. albicans* practic toate combinațiile ating valori ale reducerii capacității de formare a biofilmelor între 82,3-92,2% față de martor. În cazul *C. tropicalis*, valorile de inhibiție sunt foarte apropiate de cele obținute pentru prima specie, cu excepția unei singure combinații – cea dintre PCM2 și compusul nitrato{N-tert-butil-N'-[fenil(piridin-2-il)metiliden]carbamoimidrazono-tioat}cupru, care asigură reducerea doar cu 60% a capacității de formare a biofilmului, comparativ cu tulpina netratată.

Modificarea activității antilizoim a celor două specii de fungi sub acțiunea compușilor testați și a combinațiilor acestora poate fi urmărită pe Figura 4.18.

Concentrația de 25% din CMI a compușilor chimici și biologici aplicați în mod individual nu produce modificări ale activității antilizoim a celor două specii de *Candida*, în schimb modificări se observă la concentrația de 50% din CMI. Compușii chimici aplicați în această concentrație produc o reducere semnificativă a activității antilizoim cu până la 28,5% față de martor în cazul *C. albicans* și cu până la 24,2% față de martor în cazul *C. tropicalis*.

Concentrațiile de 75% din CMI au asigurat o activitate antilizozim și mai activă. Astfel, în cazul *C. albicans* activitatea antilizozim descrește cu 46,2-73,8% față de cultura netratată, iar în cazul *C. tropicalis* – cu 14,4- 52,2%. Cel mai puțin activ compus în această concentrație este extractul de spirulină ES1, iar cel mai activ – compusul chimic bromo{N-ciclohexil-N'-[fenil(piridin-2-il)metiliden]carbamohidrazono-tioat}cupru, pentru care avem valorile extreme în cazul ambelor specii.

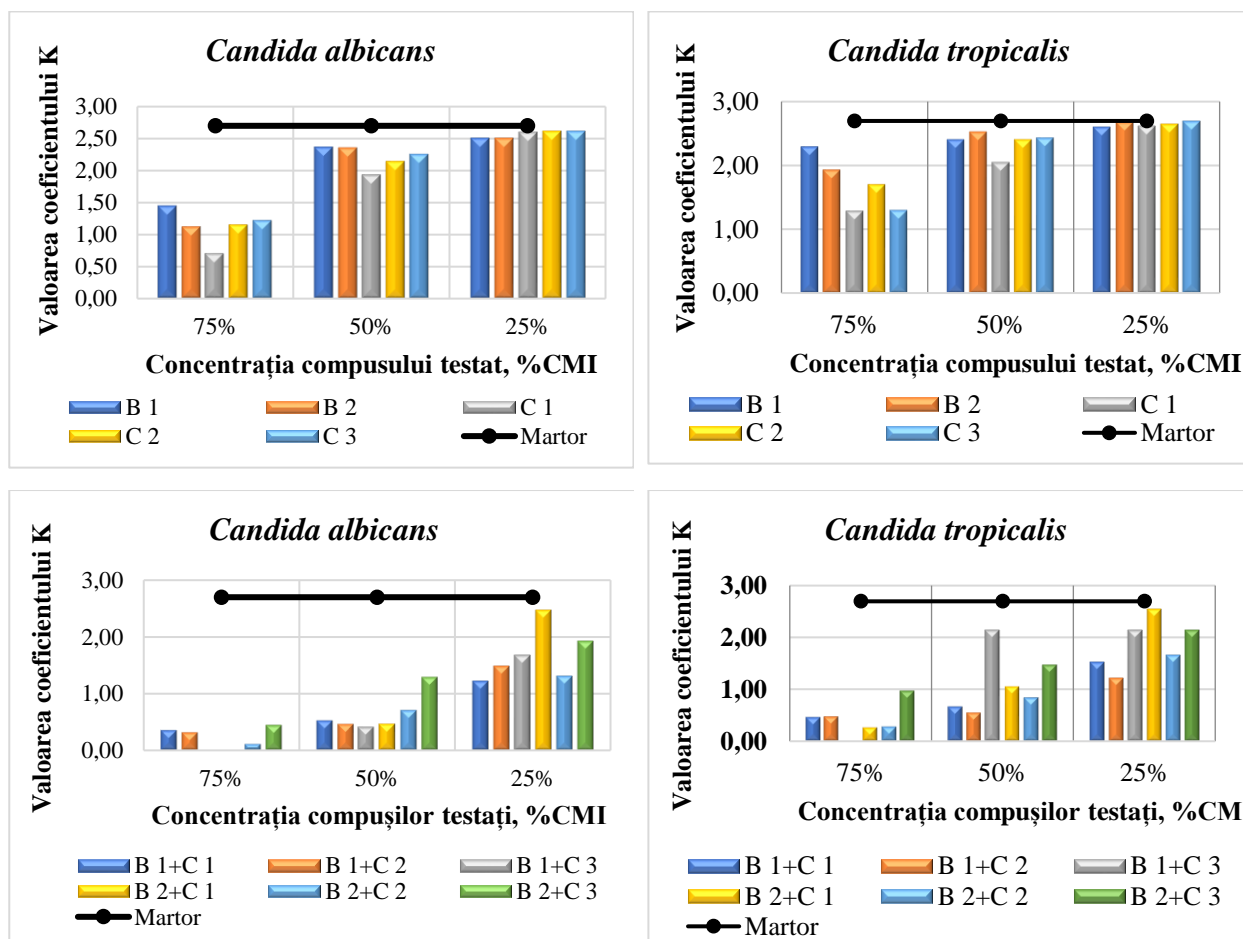


Fig. 4.18. Acțiunea compușilor chimici și biologici, și a combinațiilor lor asupra activității antilizozim la *Candida albicans* și la *Candida tropicalis*. C1 - $C_{19}H_{21}BrCuN_4S$; C2 - $C_{17}H_{19}CuN_5O_3S$; C3 - $C_{17}H_{16}N_6OS_2$; B1 - ES; B2 – PCM2

Ca și în cazul altor factori de patogenitate, combinațiile dintre compușii biologici și cei chimici s-au dovedit a fi mai eficiente în ceea ce ține inhibarea activității antilizozim. Chiar la concentrația de 25% din CMI valorile de inhibiție a activității antilizozim au constituit 20,2- 54,9% comparativ cu martorul netratat. Excepție face combinația preparatului cu conținut de mixoxantofilă cu compusul chimic bromo{N-ciclohexil-N'-[fenil(piridin-2-il)metiliden]carbamohidrazono-tioat}cupru, unde nu avem o modificare veridică a acestui factor de patogenitate.

Odată cu creșterea concentrației compușilor în combinațiile respective crește și capacitatea lor de a inhiba activitatea antilozim a fungilor. Astfel, la concentrația de 50% din CMI, în cazul *C. albicans* se atestă o reducere a activității antilozim cu 52,3-84,4% față de martor, iar în cazul *C. tropicalis* – cu 20,7-79,6%.

La concentrația de 75% din CMI a compușilor în combinații, procentul de reducere a activității antilozim este de peste 80% în majoritatea variantelor, iar în câteva – de 100%. Astfel, acest factor de patogenitate este blocat foarte eficient de combinațiile dintre compușii biologici și chimici selectați pentru activitatea lor antifungică.

Activitatea anticomplementară este un alt factor de patogenitate al microorganismelor patogene, de aceea a fost pus drept scop identificarea capacității compușilor biologici și chimici de a inhiba activitatea anticomplementară a fungilor levuriformi în monosistem și în combinații. Acest test a fost realizat pe 90 de tulpini clinice de *Candida albicans*, care la etapa de screening au inactivat complementul la concentrații de 15 CH50/mL.

Conform datelor obținute, pentru compușii chimici nu a fost identificat un răspuns clar dependent de doză în ceea ce ține inactivarea activității anticomplementare a fungilor, rezultatele variind de la o concentrație la alta fără a respecta un vector vizibil. În cazul preparatelor biologice lucrurile sunt mult mai clare. Aceste preparate s-au dovedit a fi mai active în ce privește neutralizarea activității anticomplementare a fungilor, iar efectele observate pot fi calificate ca dependente de doză.

Astfel, din cele 90 de tulpini tratate cu doza de 75% din CMI a extractului de spirulină ES1 la 15,6% s-a manifestat inhibiția activității anticomplementare în raport cu complementul de 15 UH/50ml, la 66,7% s-a manifestat inhibiția activității anticomplementare în raport cu complementul de 5-15 UH/50ml, iar la 17,8% din tulpini s-a manifestat inhibiția activității anticomplementare în raport cu complementul de 5 UH/50ml.

Concentrația de 75% din CMI a preparatului cu conținut de mixoxantofilă PCM2 a produs inhibiția activității anticomplementare în raport cu complementul de 15 UH/50ml la 28,9% dintre tulpini, inhibiția activității anticomplementare în raport cu complementul de 5-15 UH/50ml la 67,8% dintre tulpinile testate și inhibiția activității anticomplementare în raport cu complementul de 5 UH/50ml la 3,3% dintre cele 90 de tulpini incluse în studiu.

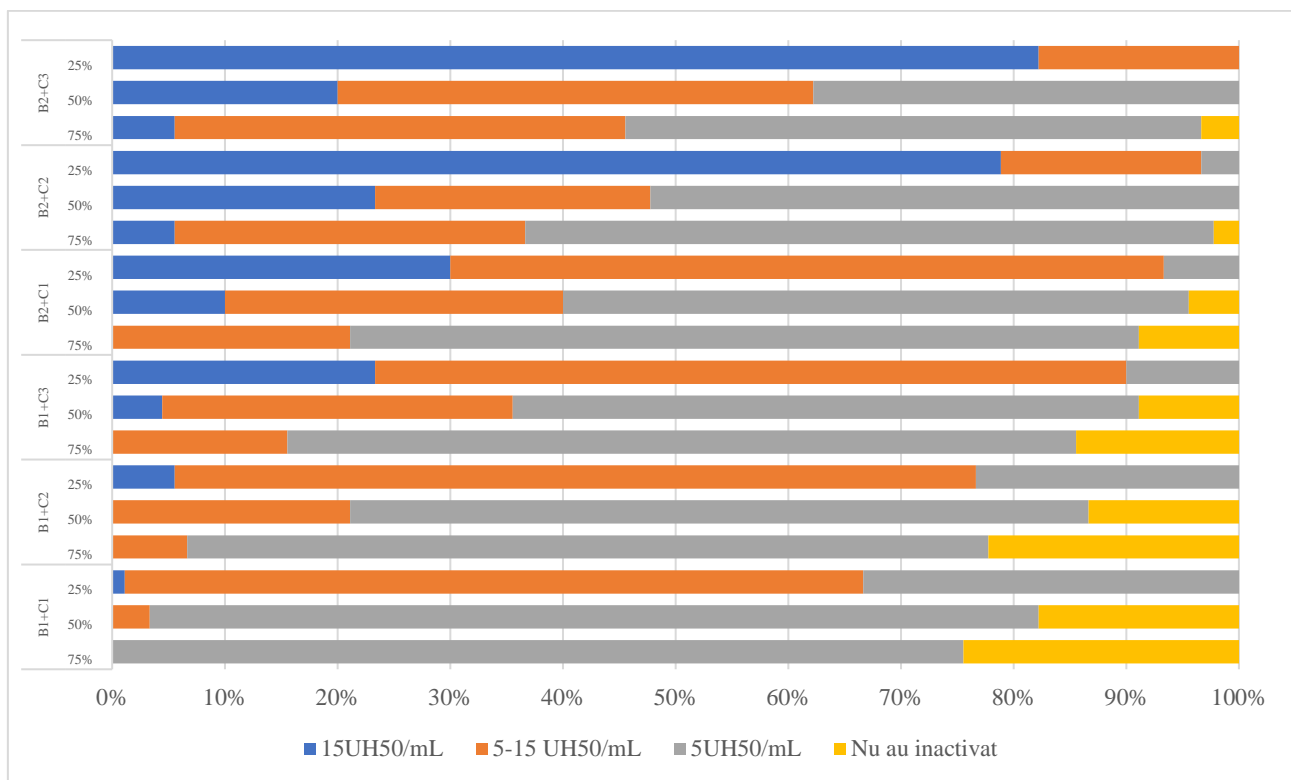
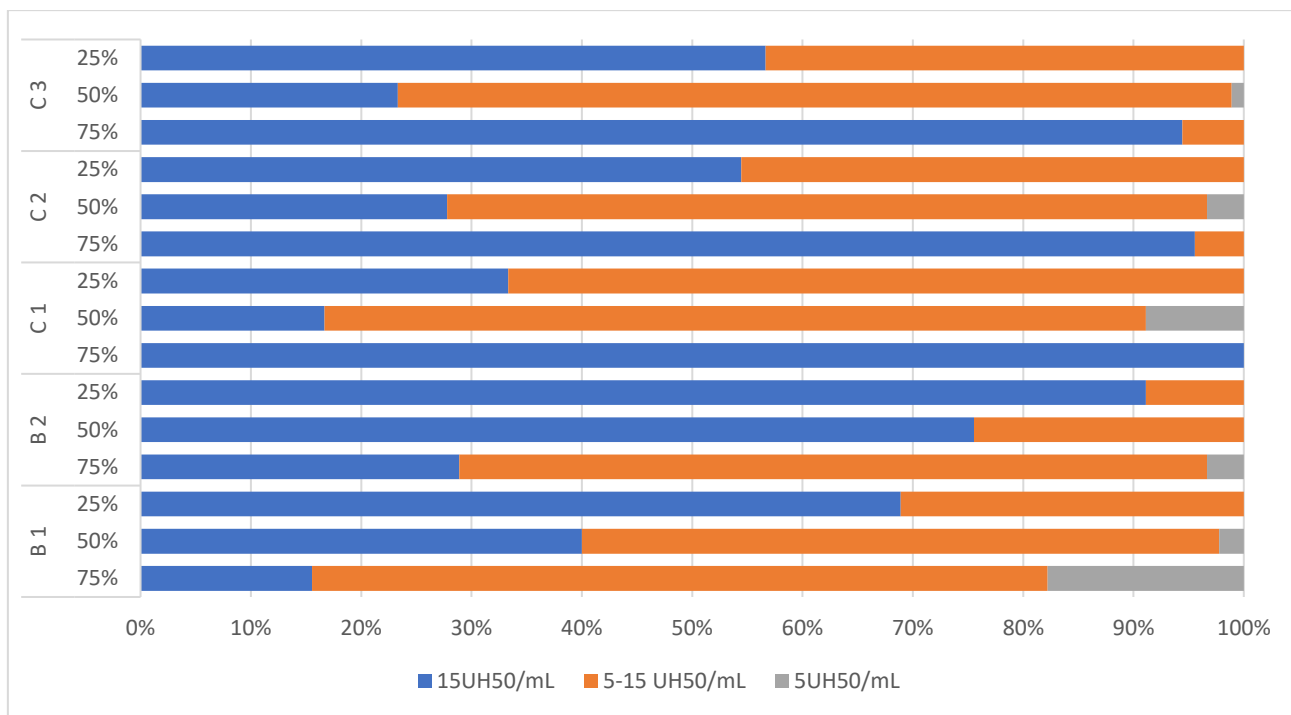


Fig. 4.19. Acțiunea compușilor chimici și biologici, și a combinațiilor lor asupra activității anticomplementare la tulpinile clinice de *Candida albicans* (n=90). C1 - $C_{19}H_{21}BrCuN_4S$; C2 - $C_{17}H_{19}CuN_5O_3S$; C3 - $C_{17}H_{16}N_6OS_2$; B1 - ES; B2 – PCM2

Efectele manifestate de combinațiile dintre preparatele biologice și compușii chimici și în cazul acestui factor de patogenitate au fost mai pronunțate, comparativ cu efectele generate de compușii respectivi aplicați separat.

În toate combinațiile, la concentrația compușilor de 75% din CMI au fost înregistrate tulpini, activitatea anticomplementară a cărora a fost blocată complet. Astfel, în cazul combinației PCM2 și bromo{N-ciclohexil-N'-[fenil(piridin-2-il)metiliden]carbamo-hidrazono-tioat}cupru au fost blocate 8,9% din numărul total de tulpini testate; în cazul combinației PCM2 și nitrato{N-tert-butil-N'-[fenil(piridin-2-il)metiliden]carbamo-hidrazono-tioat}cupru – 2,2%, iar în cazul combinației PCM2 și 2-[(2-Hidroxifenil)metiliden]-N-[4-(3-metil-5-sulfanil-4H-1,2,4-triazol-4-il)fenil]hidrazin-1-carbotioamidei – 3,3%. În cazul acestor trei combinații, concentrația de 75% din CMI a compușilor a produs inhibiția activității anticomplementare în raport cu complementul de 1,5-5% și cel de 5 UH/50ml la celelalte 91,1 -97,8% de tulpini analizate.

Cea mai pronunțată activitate de inhibare a activității anticomplementare a fost manifestată de combinațiile care în calitate de produs biologic au conținut extractul de spirulină ES1. Astfel, în cazul combinației ES1 și bromo{N-ciclohexil-N'-[fenil(piridin-2-il)metiliden]carbamo-hidrazono-tioat}cupru tulpinile, activitatea anticomplementară a cărora a fost blocată complet, au constituit 24,4% din numărul total de tulpini testate; în cazul combinației ES1 și nitrato{N-tert-butil-N'-[fenil(piridin-2-il)metiliden]carbamo-hidrazono-tioat}cupru – 22,2%, iar în cazul combinației ES1 și 2-[(2-Hidroxifenil)metiliden]-N-[4-(3-metil-5-sulfanil-4H-1,2,4-triazol-4-il)fenil]hidrazin-1-carbotioamidei – 14,4%. În cazul acestor trei combinații, concentrația de 75% CMI a compușilor a produs inhibiția activității anticomplementare în raport cu complementul de 5 UH/50ml la peste 70% din izolatele studiate.

Astfel, atât compușii chimici și biologici, aplicați fiecare în parte și în combinații, au exercitat efecte performante de inhibare a factorilor de patogenitate manifestați de fungii din speciile *Candida albicans* și *Candida tropicalis*, provocând diminuarea semnificativă a activității exoenzimelor de patogenitate, blocând capacitatea de formare a biofilmelor, inhibând total ori parțial activitatea antilozim și anticomplementară a acestor patogeni fungici. Combinațiile dintre preparatele biologice și compușii chimici sunt mai eficiente în raport cu factorii de patogenitate ai levurilor comparativ cu compușii aplicați individual.

4.6. Concluzii la capitolul 4

1. Cei cinci compuși chimici selectați ai cuprului cu tiosemicarbazone, aldehide și cetone (nitrato{N-ciclohexil-N'-[(1-(piridin-2-il)etiliden]carbamo-hidrazonotioato}cupru; bromo{N-ciclohexil-N'-[fenil(piridin-2-il)metiliden] carbamo-hidrazono-tioat}cupru; nitrato{N-tert-butil-N'-[fenil(piridin-2-il)metiliden] carbamo-hidrazono-tioat}cupru; cloro{N-[4-(etoxycarbonil)fenil]-N'-[(1-(piridin-2-il)etiliden] carbamo-hidrazonotioato}cupru și 2-[(2-hidroxifenil)metiliden]-N-[4-(3-metil-5-sulfanil-4H-1,2,4-triazol-4-il)fenil]hidrazin-1-carbotioamidă.) au manifestat activitate antifungică înaltă față de opt tulpini de fungi

levuriformi din patru genuri, cu valori ale CMI de până la 1 µg/ml și ale CMF de până la 10 µg/ml. Acești compuși chimici prezintă interes în calitate de potențiali candidați pentru dezvoltarea de preparate antifungice cu efecte direcționate asupra fungilor levuriformi.

2. Dintre compușii biologici testați, o activitate antifungică mai pronunțată au manifestat preparatele carotenoide cu conținut de mixoxantofilă, comparabilă cu cea a celor cinci compuși chimici enumerați mai sus. Astfel, CMI pentru PCM1 față de cele cinci tulpini de fungi de referință din genul *Candida* a fost între 7 și 10 µg/ml, iar pentru PCM 2 între 4 și 9 µg/ml. Valorile CMF pentru PCM 1 au fost între 10 și 20 µg/ml, iar pentru PCM 2 între 9 și 20 µg/ml.
3. Sensibilitatea tulpinilor tip de *Candida* este destul de apropiată de cea a tulpinilor clinice în cazul extractelor din biomasa de spirulină ES1, ES2, ES3 și a preparatelor carotenoide cu conținut de mixoxantofilă PCM1 și PCM2.
4. Fenomenul efectelor antifungice performante ale combinațiilor dintre compușii chimici și cei biologici se bazează pe interacțiunea preponderent sinergică dintre acestea, fapt dovedit prin aplicarea modelului indicelui de concentrație al inhibiției factoriale (ICIF). Explorarea acestui fenomen poate asigura reducerea dozei de compus chimic de 4-32 de ori în condițiile aceluiași efect antifungic.
5. Compușii chimici și biologici, aplicați fiecare în parte și în combinații, au exercitat efecte performante de inhibare a factorilor de patogenitate manifestați de fungii din genul *Candida*, provocând diminuarea semnificativă a activității exoenzimelor de patogenitate, blocând capacitatea de formare a biofilmelor, inhibând total ori parțial activitatea antilizozim și anticomplementară a fungilor patogeni. Combinațiile dintre preparatele biologice și compușii chimici sunt mai eficiente în raport cu inhibiția factorilor de patogenitate ai fungilor, comparativ cu compușii aplicați individual, datorită efectului de sinergism.

5. NANOPARTICULE DE ARGINT STABILIZATE CU DIVERȘI DERIVAȚI NATURALI ȘI PROPRIETĂȚILE LOR ANTIFUNGICE

5.1. Caracterizarea noilor nanosisteme antifungice bazate pe nanoparticule de argint generate din pululan, 6-carboxipululan și derivați celulozici

În acest subcapitol sunt prezentate rezultatele caracterizării nanoparticulelor de argint obținute în dezvoltarea de noi nanosisteme antifungice, bazate pe nanoparticule de argint (AgNPs) și stabilizate cu derivați naturali, precum polizaharidele: pululan, 6-carboxipululan (pululan oxidat) și diverși derivați celulozici în scopul utilizării ulterioare în diferite domenii ale medicinei, inclusiv în dezvoltarea de noi formule farmaceutice cu efect antifungic.

Într-o prima parte a acestei direcții de cercetare a fost efectuată oxidarea pululanului la 6-carboxipululan în prezența radicalului 2,2,6,6-tetrametilpiperidină-*N*-oxil (TEMPO), radical nitroxilic extrem de eficient în reacțiile de oxidare selectivă a polizaharidelor. Reacția de oxidare a pululanului a fost realizată în condiții de presiune atmosferică, la temperatura camerei și la pH 10. Reacția de oxidare a pululanului în prezența sistemului TEMPO/NaBr/NaOCl (Figura 5.1) poate fi privită ca un proces în trepte, distingându-se trei etape diferite: I. Formarea hipobromitului de sodiu (NaOBr) în mediul de reacție, în prezența hipocloritului de sodiu (NaOCl) și a bromurii de sodiu (NaBr); II. Formarea ionului de oxoamoniu în mediul de reacție; III. Oxidarea grupelor alcoolice primare la grupe carboxilice, cu formarea intermediară a grupărilor aldehydice.

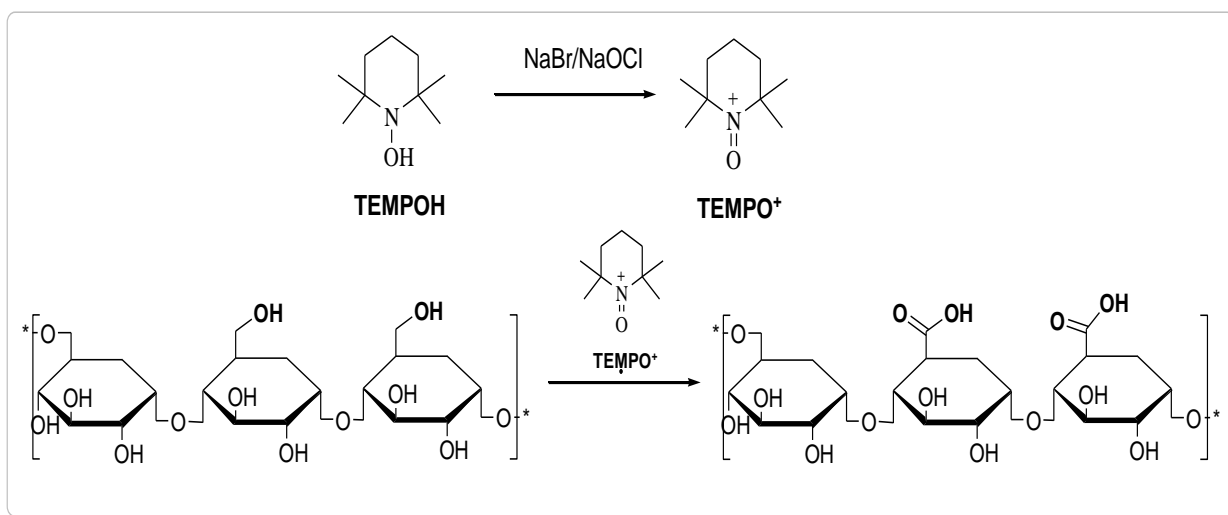


Fig. 5.1. Mecanismul procesului de oxidare a pululanului în prezența sistemului TEMPO/NaBr/NaOCl

Pentru a confirma oxidarea pululanului la 6-carboxipululan s-a utilizat atât spectroscopia în infraroșu cu transformată Fourier (FT-IR), cât și spectroscopia de rezonanță magnetică nucleară (RMN), rezultatele investigației fiind prezentate în continuare.

Oxidarea pululanului poate fi observată cu ușurință cu ajutorul spectroscopiei FTIR. Pe Figura 5.2 sunt prezentate spectrele FTIR ale probei de pululan inițial și ale probei de pululan oxidat. Pentru a se evita interferența benzilor de absorbție ale apei (1647 cm^{-1}) cu banda de absorbție a grupărilor carboxilice, pululanul oxidat a fost acidificat cu o soluție de HCl (0,5M), grupele $-\text{COONa}$, fiind convertite la $-\text{COOH}$, banda de absorbție specifică grupărilor carboxilice apărând la un număr de undă mai mare. Analizând comparativ spectrele, se observă că în cazul pululanului oxidat apare o nouă bandă la 1701 cm^{-1} , specifică grupărilor carboxilice.

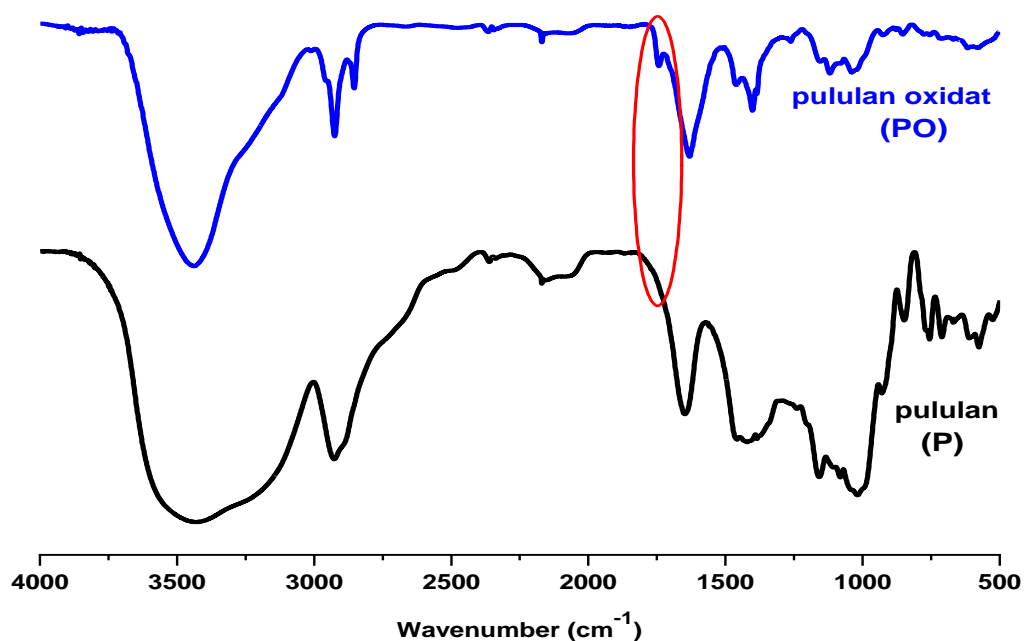


Fig. 5.2. Spectrele FTIR ale pululanului (P - pululan) și ale produsului său de oxidare mediat de radicalul TEMPO (PO – pululan oxidat)

Spectroscopia de rezonanță magnetică nucleară ^{13}C -RMN de asemenea oferă informații valoroase cu privire la numărul și tipul atomilor de carbon din moleculă. Pe Figura 5.3 sunt prezentate spectrele ^{13}C -RMN pentru proba de pululan neoxidat și pentru proba de pululan oxidat în prezența radicalului TEMPO. Din spectrele ^{13}C -RMN ale probelor de pululan și de pululan oxidat se poate observa cu ușurință apariția unui semnal nou, bine definit, în jurul valorii 176 ppm, caracteristic grupărilor carboxilice, indicând clar faptul că reacția de oxidare a decurs cu succes.

Pentru sinteza nanoparticulelor de argint s-a utilizat atât pululanul, cât și pululanul oxidat, acesta din urmă îndeplinind un dublu rol: de agent de reducere al precursorului și de agent de stabilizare a nanoparticulelor de argint formate în mediul de reacție.

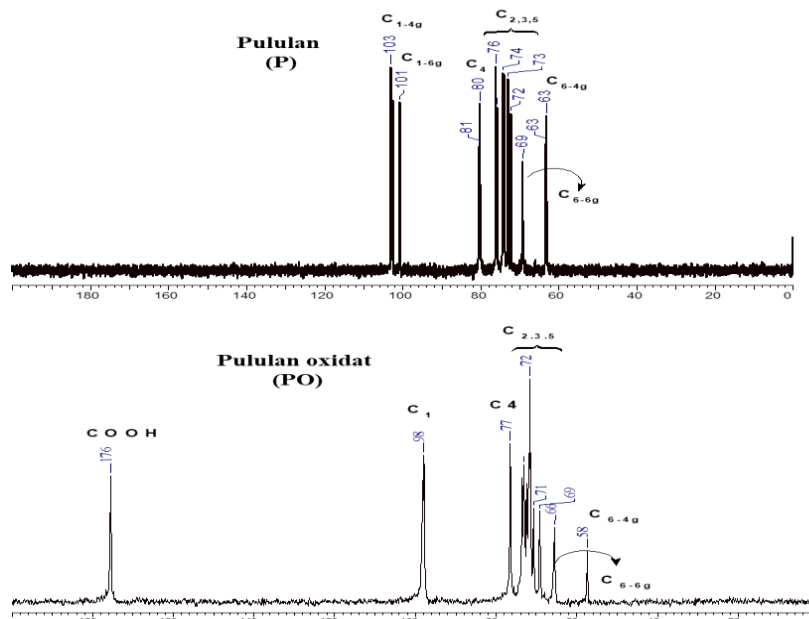


Fig. 5.3. Spectrul ^{13}C -RMN pentru compusul inițial (pululan neoxidat - P) în D_2O și spectrul ^{13}C -RMN pentru compusul oxidat (PO) în D_2O

Pentru sinteza AgNPs s-au utilizat patru concentrații de polimer, pentru pululan: 1% (notat: AgNPs/P-1%), 5% (notat: AgNPs/P-5%) și 7% (notat: AgNPs/P-7%), iar pentru pululan oxidat: 1% (notat: AgNPs/PO-1%). (Tabelul 5.1). O primă indicație a formării nanoparticulelor de argint (AgNPs) a fost modificarea culorii soluției inițiale de la incolor la galben-maroniu (Figura 5.4).

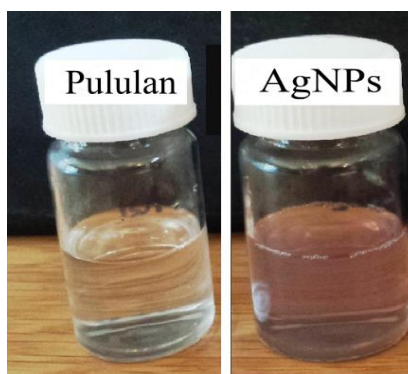


Fig. 5.4. Indicația formării nanoparticulelor de argint (AgNPs)

Atât pululanul, cât și pululanul oxidat conțin grupări hidroxilice abundente și, respectiv, în cazul pululanului oxidat grupări carboxilice, care facilitează reducerea ionilor de argint (Ag^+) la atomi liberi de argint (Ag^0).

Pe figura 5.5 sunt prezentate spectrele FT-IR ale probei de pululan inițial și ale nanoparticulelor de argint pe bază de pululan și pululan oxidat. Analizând comparativ spectrele FT-IR ale nanoparticulelor cu cele ale pululanului inițial, se observă deplasarea benzii spectrale corespunzătoare vibrației de întindere a grupărilor OH de la 3421 cm^{-1} , în cazul pululanului, la

3435 cm^{-1} în cazul nanoparticulelor de argint reduse și stabilizate cu pululan, indicând o implicare a grupărilor hidroxilice în stabilizarea nanoparticulelor.

Tabelul 5.1. Semnificația codurilor utilizate în cazul nanoparticulelor de argint sintetizate în prezența de pululan (P)/pululan oxidat (PO)

Codul probei	Polimer reducător/stabilizator	AgNO ₃ Conc. (%)
AgNPs/P-1%	Pululan 1%	4.45
AgNPs/PO-1%	Pululan oxidat 1%	4.45
AgNPs/P-5%	Pululan 5%	0.64
AgNPs/P-7%	Pululan 7%	1.91

Caracterizarea nanoparticulelor de argint reduse și stabilizate cu pululan și pululan oxidat

Caracterizarea AgNPs prin spectroscopia FT-IR

Banda de la 1647 cm^{-1} este deplasată ușor spre numere de undă mai mici. De asemenea, banda de la 2926 cm^{-1} (corespunzătoare legăturii C-H) este deplasată la 2924 cm^{-1} . Aceste observații arată clar interacțiunea puternică dintre argint și grupările hidroxilice din pululan.

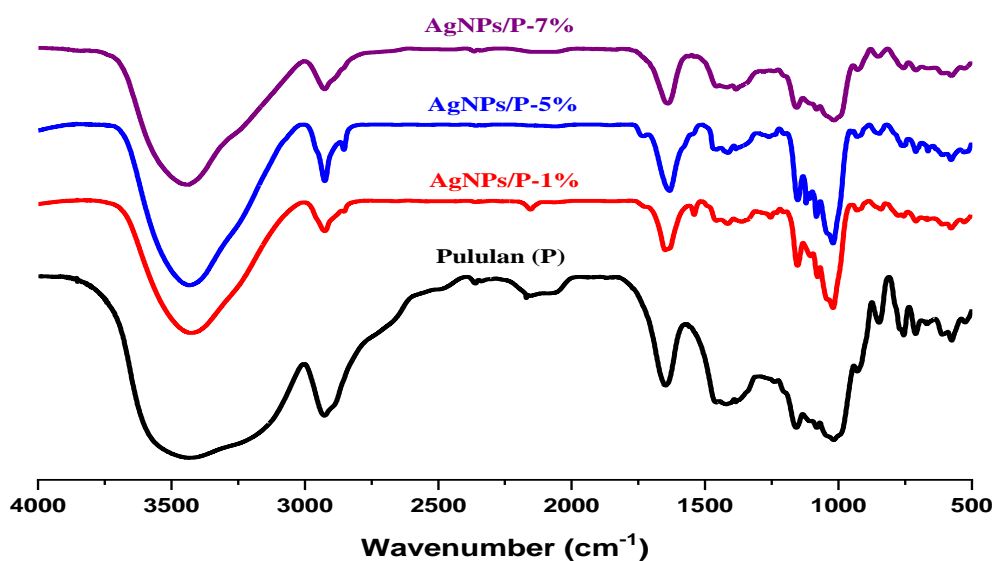


Fig. 5.5. Spectrele FT-IR ale pululanului și ale nanoparticulelor de argint stabilizate cu pululan

Spectrele FT-IR ale nanoparticulelor de argint stabilizate cu pululan oxidat sunt prezentate pe Figura 5.6. Comparând spectrul FT-IR al pululanului oxidat cu spectrul FT-IR al nanoparticulelor de argint mediate de PO (AgNPs/PO-1%) s-a observat o ușoară deplasare a benzilor spectrale corespunzătoare vibrației de întindere simetrică, respectiv asimetrică, de la numerele de undă 1418 cm^{-1} , respectiv 1608 cm^{-1} , specifice grupării C=O a acidului carboxilic deprotonat COO⁻.

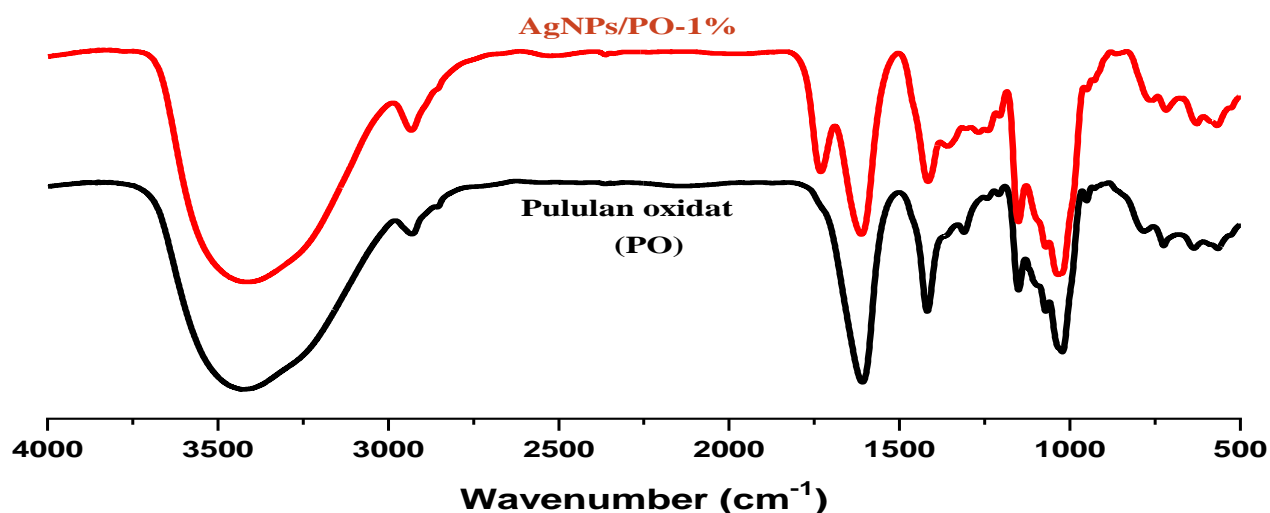


Fig. 5.6. Spectrele FT-IR ale pululanului oxidat și ale nanoparticulelor de argint stabilizate cu pululan oxidat

O observație interesantă în spectrul nanoparticulelor de argint stabilizate cu pululan oxidat o constituie prezența unei noi benzi de absorbție, sub forma unui umăr, în jurul valorii de 1736 cm^{-1} , datorată grupărilor carboxilice atașate de atomii de argint. Aceste observații confirmă implicarea pululanului oxidat în reducerea și în stabilizarea nanoparticulelor de argint.

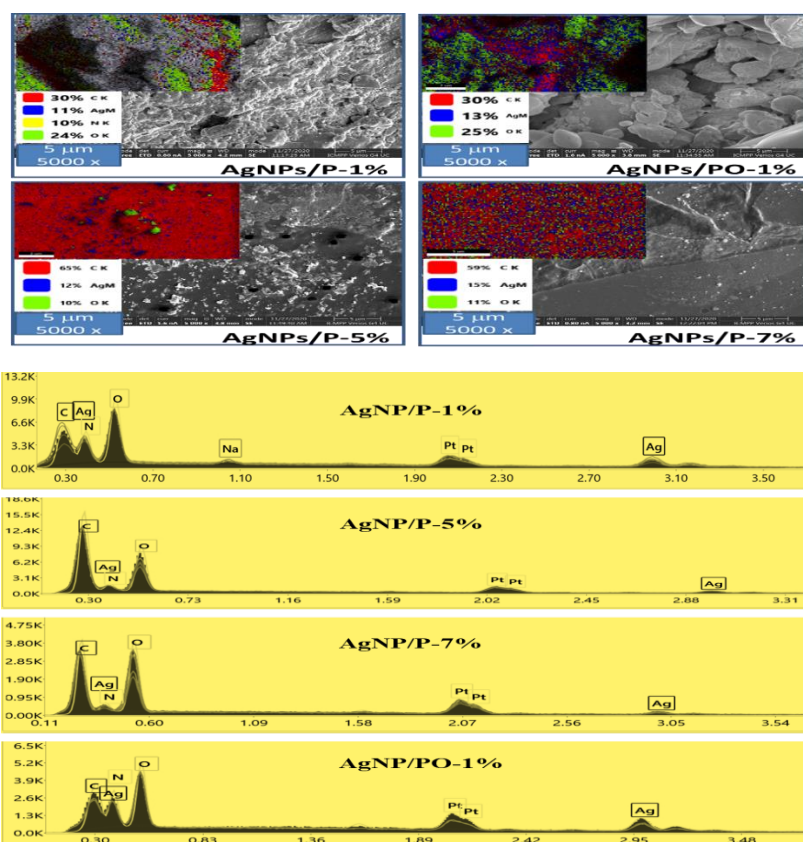


Fig. 5.7. Date SEM-EDAX ale nanoparticulelor de argint și spectrele EDAX corespunzătoare

Microscopia electronică de baleiaj cu sistem de analiză elementală (EDAX) oferă, de asemenea, informații valoroase despre compoziția elementală a probelor investigate.

Pe Figura 5.7 sunt prezentate imaginile și spectrele EDAX obținute în urma analizei AgNPs mediate de pululan și de pululan oxidat. Din imagini este evident că AgNPs au multe forme neregulate, de diferite dimensiuni. În plus, se observă prezența clusterelor AgNPs, care pot fi consecința agregării nanoparticulelor formate în timpul pregătirii probei. Din spectrele EDAX ale probelor se deduce clar, prin apariția semnalelor de la ~3 keV, prezența argintului.

Așadar, pentru prepararea nanoparticulelor de argint s-au utilizat doi biopolimeri (pulan și pululan oxidat) care au îndeplinit un rol dublu: de reducere a ionilor de argint la argint metallic și de stabilizare a nanoparticulelor de argint formate.

Caracterizarea nanoparticulelor de argint reduse și stabilizate cu derivați celulozici (acetat de celuloză, etilceluloză, metilceluloză și hidroxipropilceluloză)

Caracterizarea AgNPs utilizând microscopia electronică de transmisie (TEM) și cea electronică de scanare (SEM) au dat posibilitate de a colecta informații despre dimensiunea, forma și cristalinitatea particulelor, despre straturile de suprafață și prezența detectorului pentru radiația X caracteristică (EDX).

Pe lângă cei doi biopolimeri, pululan și pululan oxidat, pentru generarea nanoparticulelor s-au utilizat patru derivați celulozici, și anume: acetatul de celuloză (CA), etilceluloza (EC), metilceluloza (MC) și hidroxipropilceluloza (HPC). AgNPs obținute în prezența derivaților celulozici au fost caracterizate atât din punct de vedere spectral, cât și morfologic.

În studiu a fost cercetat și modul în care derivații celulozici au influențat asupra eficacității și stabilității nanoparticulelor de Ag, dar și efectele antifungice pentru formarea unei imagini comprehensive a efectului naturii substratului celulozic asupra morfologiei și dimensiunilor nanoparticulelor de Ag.

Evidențierea capacității derivaților celulozici (acetat de celuloză AgNPs-CA, etilceluloză AgNPs-EC, metilceluloză AgNPs-MC, hidroxipropilceluloză AgNPs-HPC) de a sintetiza AgNPs sigure și la preț accesibil a fost realizată prin intermediul spectrelor de absorbție în UV-Vis corelate cu măsurători ale dispersiei dinamice a luminii (DLS).

Dimensiunea, morfologia și potențialul zeta al nanoparticulelor de argint au fost evaluate prin intermediul microscopiei electronice de transmisie (TEM), microscopiei electronice de transmisie cu scanare (STEM) și prin dispersia dinamică a luminii.

Studiul dat a presupus combinarea unei varietăți de derivați celulozici (CA, HPC, MC și EC) cu soluția de AgNO₃ la temperatura camerei. Soluția de polimer și-a schimbat culoarea atunci

când a fost adăugată soluția de azotat de argint, trecând de la incolor la galben-deschis – maro-închis, în funcție de derivatul celulozic utilizat, indicând formarea AgNP-urilor.

În aceste sisteme, derivații celulozici au capacitatea de a reduce ionii de Ag^+ la argint elemental, aparând fenomenul de rezonanță plasmonică de suprafață (SPR) (Figura 5.8). Practic, prin combinarea celor două soluții, ionul de argint a interacționat cu derivatul celulozic și a creat un complex $\text{Ag} [\text{derivat de celuloză}]^+$. Ca precursor intermediar, derivatul celulozic a transformat Ag^+ în $(\text{Ag} [\text{derivat de celuloză}])$. AgNP-urile formate sunt stabilizate coloidal, prin intermediul sarcinilor negative ale derivaților celulozici care acoperă grupările încărcate pozitiv de pe suprafața lor ($\text{Ag} [\text{derivat celulozic}]$).

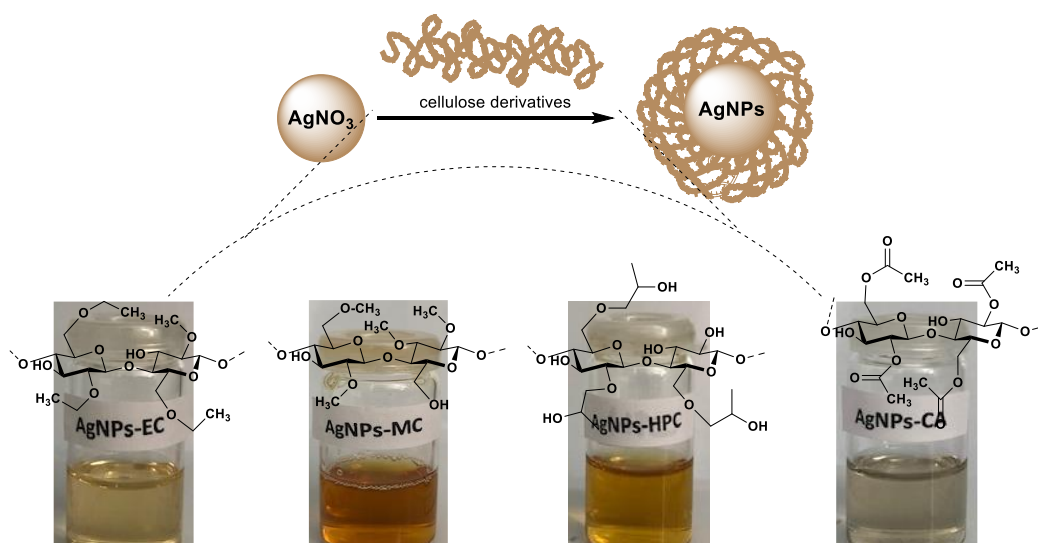


Fig. 5.8. Obținerea nanoparticulelor de argint mediată de derivați celulozici: acetat de celuloză (CA), etilceluloză (EC), metilceluloză (MC) și hidroxipropilceluloză (HPC)

Proprietățile mecanice ale nanocompozitelor pe bază de derivați celulozici au demonstrat că celuloza este un material cu proprietăți mecanice remarcabile, precum rezistența la tracțiune etc. Lipsa precipitațiilor în sistemele de nanoparticule de Ag pe bază de derivați celulozici, produse în aceste circumstanțe, sugerează că acești derivați celulozici pot servi atât ca agenți reducători, cât și ca agenți de stabilizare sau de acoperire pentru a preveni formarea de agregate în AgNP-urile rezultate. Mai mult, introducerea argintului are ca rezultat întărirea matricei celulozice.

Caracterizarea nanoparticulelor de argint prin spectroscopie de absorbție UV-VIS

Spectroscopia UV-Vis este utilizată în vederea identificării și caracterizării nanoparticulelor în suspensie, spectrele fiind corelate cu morfologia și indicele de refracție al mediului din apropierea AgNPs. Rezultatele spectroscopiei în domeniul Ultraviolet și Vizibil (UV-Vis) au permis confirmarea inițială a nanoparticulelor de argint sintetizate. În același timp, o caracteristică esențială a nanoparticulelor de argint este modul în care electronii liberi din banda

de conducție a argintului interacționează cu lumina, fenomen cunoscut sub denumirea de *rezonanță plasmonică de suprafață* (SPR) și care determină apariția unei benzi de absorbție în spectrul UV-Vis. AgNPs au absorbit lumina în regiunea vizibilă a spectrului electromagnetic la lungimi de undă cuprinse între 380 și 450 nm, prezentând culori distincte în funcție de dimensiunea, forma și mediul lor.

Pe Figura 5.9 sunt prezentate spectrele de absorbție UV-Vis pentru nanoparticulele de argint stabilizate cu derivați celulozici, fiecare prezentând valori SPR caracteristice în funcție de derivatul celulozic utilizat: nanoparticule de argint stabilizate cu acetatul de celuloză (AgNPs-CA = 411 nm), nanoparticule de argint stabilizate cu etilceluloză (AgNPs-EC = 382 nm), nanoparticule de argint stabilizate cu metilceluloză (AgNPs-MC = 389 nm) și nanoparticule de argint stabilizate cu hidroxipropilceluloză (AgNPs-HPC = 393 nm), indicând obținerea cu succes a nanoparticulelor de argint.

Spectrele UV-Vis AgNPs, formate folosind cei patru derivați celulozici, sunt reprezentat pe Figura 5.9. În funcție de tipul de polimer utilizat, culorile soluțiilor de polimer au variat.

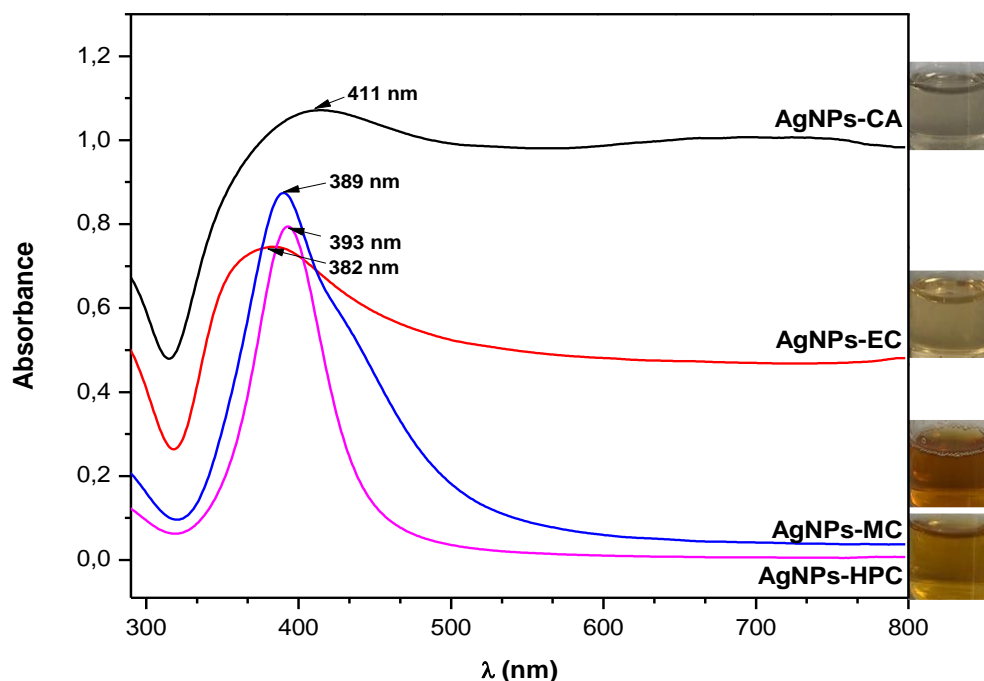


Fig. 5.9. Spectrele de absorbție UV-VIS pentru nanoparticulele de argint stabilizate cu derivați celulozici (nanoparticule de argint stabilizate cu acetat de celuloză AgNPs-CA, nanoparticule de argint stabilizate cu etilceluloză AgNPs-EC, nanoparticule de argint stabilizate cu metilceluloză AgNPs-MC, nanoparticule de argint stabilizate cu hidroxipropilceluloză AgNPs-HPC)

După două ore de la amestecarea celor două soluții, soluția incoloră de MC a devenit maro-închis, cea de EC a devenit galben-deschis, cea de HPC a devenit maro-deschis și cea de CA galben-deschis, demonstrând faptul că argintul ionic a fost transformat în nanoparticule de argint ca urmare a activării fenomenului de *rezonanță plasmonică de suprafață (SPR)*.

Este bine cunoscut faptul că nanoparticulele de argint absorb lumina în regiunea vizibilă a spectrului electromagnetic (380-450 nm) ca rezultat al tranziției SPR. Lungimea de undă absorbantă a AgNP-urilor depinde de dimensiunea particulelor, de mediul dielectric și de mediul chimic înconjurător, precum și de nanostructura polimerului folosit pentru a crea și a menține nanoparticulele. Toate acestea afectează spectrele de absorbție UV-Vis ale nanoparticulelor de argint. SPR-ul AgNP-urilor este între 382 și 411 nm (AgNPs-CA = 411 nm, AgNPs-EC = 382 nm, AgNPs-MC = 389 nm și AgNPs-HPC = 393 nm).

Analiza dimensiunilor nanoparticulelor de Ag. Diametrul hidrodinamic, indicele de polidispersitate (PDI) și potențialul zeta al AgNP-urilor sintetizate au fost determinate utilizând tehnica DLC. Rezultatele obținute sunt prezentate pe Tabelul 5.2. În funcție de derivatul celulozic utilizat, dimensiunile AgNP determinate prin intermediul DLC variază. În urma analizei datelor s-a observat că particulele au un indice de polidispersitate și un diametru mediu al particulelor cuprins între $119,7 \pm 0,2$ și $491,7 \pm 0,09$ nm. Deoarece există întotdeauna o tendință de supraestimare a mărimii reale a nanoparticulelor, ca urmare a interacțiunilor puternice dintre nanoparticule și solvent, dimensiunile determinate nu pot fi considerate ca având o valoare reală. Diametrul hidrodinamic mediu afectează măsurătorile bazate pe DLS. În plus, măsurătorile agregatelor mici în nanosuspensie ar putea modifica distribuția obișnuită a dimensiunilor.

O distribuție îngustă a dimensiunii particulelor este arătată de valorile PDI (0,263 pentru AgNPs-CA, 0,485 pentru AgNPs-EC, 0,302 pentru AgNPs-MC și 0,269 pentru AgNPs-HPC). Este bine cunoscut faptul că PDI estimează omogenitatea distribuției dimensiunilor nanoparticulelor în soluțiile coloidale. Valorile PDI mai mari de 0,7 denotă o distribuție largă a dimensiunilor particulelor, valorile mai mici indicând o omogenitate mai bună.

Potențialul zeta a prezentat în toate cazurile valori negative care au generat o repulsie mare între AgNP și, prin urmare, au crescut stabilitatea particulelor pentru o lungă perioadă de timp. Analiza comparativă a datelor obținute a scos în evidență faptul că nanoparticulele pe bază de CA, HPC (AgNPs-CA ($-24,5 \pm 0,5$), AgNPs-HPC ($-16,2 \pm 0,9$)), având valori negative mai mari, sunt mai stabile decât cele pe bază de EC și de MC care au valori negative mai mici (AgNPs-EC ($-8,24 \pm 0,2$), AgNPs-MC ($-1,93 \pm 0,6$)). Conform datelor din literatură, nanoparticulele de argint cu valori ale potențialului zeta cuprins între +10 mV și -10 mV sunt considerate stabile.

Rezultatele obținute prin intermediul STEM și TEM au permis evidențierea morfologiei, suprafeței și dimensiunii nanoparticulelor de argint sintetizate.

Tabelul 5.2. Valorile medii ale mărimii determinate de DLS, indicii de polidispersitate și valorile potențiale ζ ale AgNP-urilor sintetizate din derivați celulozici

Tipul AgNPs	Z-average (d.nm)	Polydispersity index (PDI)	ζ potential (mV)
AgNPs-CA	432 \pm 0,1	0,263	-24,5 \pm 0,5
AgNPs-EC	491 \pm 0,09	0,485	-8,24 \pm 0,2
AgNPs-MC	348 \pm 0,1	0,302	-1,93 \pm 0,6
AgNPs-HPC	119,7 \pm 0,2	0,269	-16, \pm 0,9

Din imaginile STEM și TEM se observă că dimensiunea nanoparticulelor de argint depinde, în mare măsură, de tipul de derivat celulozic folosit în reacția de reducere a precursorului metalic (AgNO_3). Astfel, în cazul utilizării acetatului de celuloză ca stabilizator se obțin nanoparticule de argint cu dimensiunile cele mai mici (16-19 nm), în timp ce nanoparticulele stabilizate de etilceluloză formează agregate mai mari (80-100 nm).

Analizând comparativ imaginile STEM s-a observat că nanoparticulele de argint par a fi predominant entități sferice, minuscule și discrete. De asemenea, s-a constatat că AgNPs-EC, AgNPs-CA și AgNPs-HPC au format particule mari, uniforme și neagregate, în timp ce AgNPs-MC au generat cele mai mari și cele mai agregate nanoparticule (Figura 5.10).

Interacțiunile dintre Ag^+ și grupările C-O sau OH ale polimerilor utilizați pentru formarea AgNP-urilor

Prin aceste interacțiuni, mobilitatea cationilor metalici este redusă, inhibând formarea particulelor mari și stabilizând AgNP-urile rezultate.

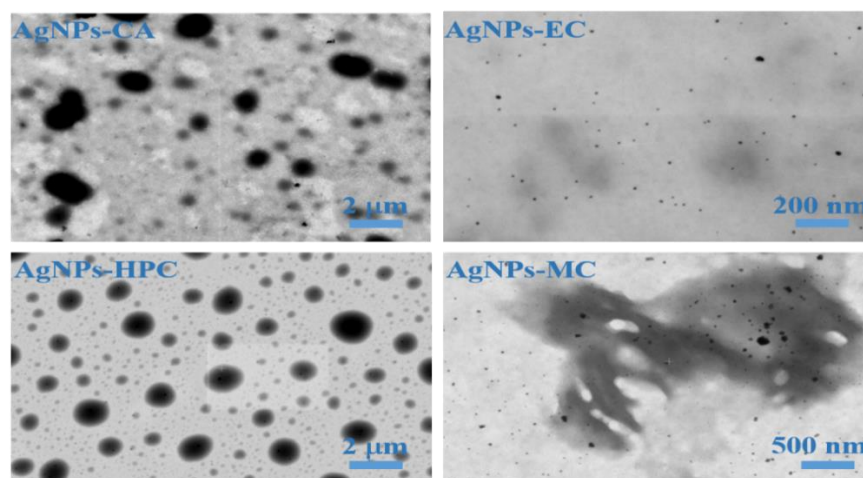


Fig. 5.10. Imagini STEM ale nanoparticulelor de argint stabilizate cu derivați celulozici

AgNP-urile obținute în prezența derivaților celulozici au fost examinate folosind, de asemenea, și microscopia electronică de transmisie. Rezultatele TEM obținute au demonstrat că tipul de derivat celulozic utilizat are un impact asupra dimensiunii medii a AgNP-urilor produse. Imaginile TEM ale nanoparticulelor de argint sunt prezentate pe Figura 5.11, iar dimensiunile nanoparticulelor sunt prezentate pe Tabelul 5.3. AgNPs formează agregate mai mari în cazul AgNPs-EC ($89\pm 1,3$ nm), AgNPs-HPC ($62\pm 3,6$ nm) și AgNPs-MC ($54\pm 11,6$ nm), iar agregate mici în cazul AgNPs-CA ($17\pm 1,8$ nm).

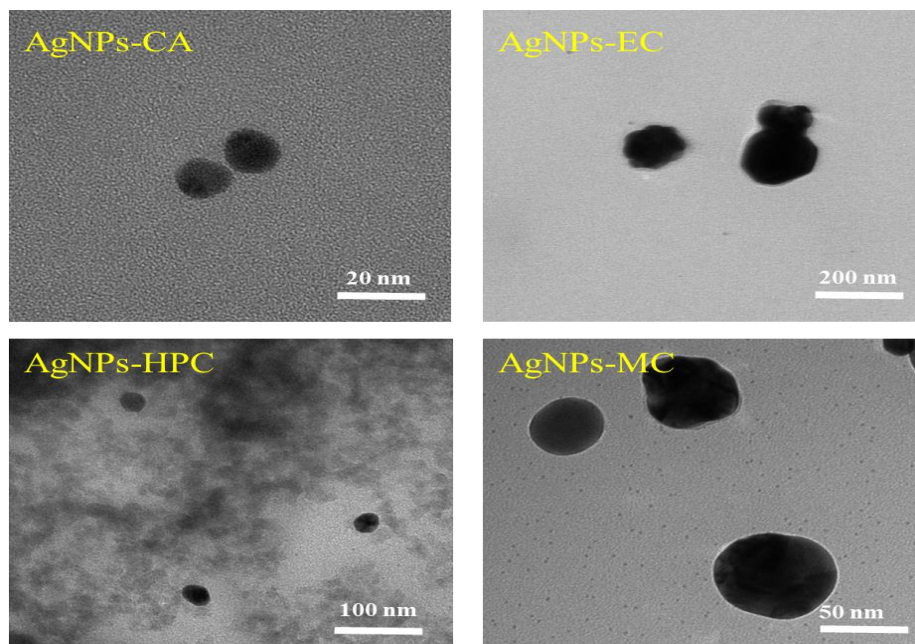


Fig. 5.11. Imagini TEM ale nanoparticulelor de argint stabilizate cu derivați celulozici

Toate AgNP-urile au avut o formă sferică. Deoarece tehnica TEM evidențiază doar centrul AgNP-urilor, respectiv miezul metalic, dimensiunile obținute prin TEM sunt substanțial mai mici decât cele obținute prin tehnica DLC care măsoară și diametrul hidrodinamic.

Tabelul 5.3. Dimensiunile și caracteristicile spectrale ale AgNPs determinate prin TEM

Tipul AgNPs	Dimensiunea medie a particulelor în baza analizei TEM
AgNPs-CA	$17\pm 1,8$ nm
AgNPs-EC	$89\pm 1,3$ nm
AgNPs-MC	$54\pm 11,6$ nm
AgNPs-HPC	$62\pm 3,6$ nm

Diametrul mediu al AgNPs, determinat cu ajutorul spectroscopiei TEM, a fost comparat cu diametrul determinat prin difuziunea dinamică a luminii (DLS). Indicele de polidispersitate (IP),

determinat prin corelarea datelor DLS, prezintă valori rezonabile, variind de la 0,263, în cazul probei AgNPs-CA (nanoparticule de argint stabilizate cu acetat de celuloză), până la 0,485, pentru proba AgNPs-EC (nanoparticule de argint stabilizate cu etilceluloză), și indică o polidispersitate dimensională relativ îngustă. Diametrul mediu obținut în urma analizelor DLS variază, în funcție de tipul de derivat celulozic folosit, de la 119,7 nm, pentru AgNPs-HPC (nanoparticule de argint stabilizate cu hidroxipropilceluloză), până la 491 nm, pentru AgNPs-EC (nanoparticule de argint stabilizate cu etilceluloză).

Rezultatele obținute pentru diametrul mediu prin analiza TEM diferă vizibil de cele obținute prin analiza DLS. Diferențele între valorile obținute prin cele două metode sunt determinate de specificul proceselor implicate în obținerea probelor: tehnica TEM utilizează probe în stare uscată pentru a determina dimensiunea particulelor, în timp ce metoda DLS implică măsurători ale dimensiunii particulelor în starea hidratată a probelor. În aceste condiții, dimensiunea obținută prin analiza TEM este dimensiunea reală a nanoparticulelor, în timp ce diametrul măsurat prin metoda DLS este un diametru hidrodinamic, care pare să fie supraestimat, din cauza interacțiunilor puternice dintre solvent și constituienții nanoparticulelor.

În urma analizei valorilor potențialului zeta (Tabelul 5.4), obținute pentru particulele de argint, se observă că toate probele prezintă valori negative ale potențialului zeta, cea mai bună stabilitate a nanoparticulelor fiind în cazul probei AgNPs-CA (nanoparticule de argint stabilizate cu acetat de celuloză) (-24.5 mV) și cea mai mică în cazul nanoparticulelor de argint stabilizate cu metilceluloză AgNPs-MC (-1.93 mV).

Tabelul 5.4. Diametrul mediu al AgNPs stabilizate cu derivați celulozici determinat prin TEM și DLC, indicele de polidispersitate și valoarea potențialului zeta

Tipul de AgNPs	Diametrul mediu, determinat prin TEM (nm)	Diametrul mediu, determinat prin DLC (d.nm)	Indice de polidispersitate (IP)	ζ potențial (mV)
AgNPs-CA	16-19 nm	432	0,263	-24,5
AgNPs-EC	80-100 nm	491	0,485	-8,24
AgNPs-MC	19-90 nm	348	0,302	-1,93
AgNPs-HPC	25-99 nm	119.7	0,269	-7,12

5.2. Screening-ul calitativ al sensibilității tulpinilor tip și al izolatelor clinice de fungi față de potențiala acțiune antifungică a nanoparticulelor de argint generate din polizaharide

Ultimile cercetări în domeniul nanotehnologiilor au demonstrat că nanoparticulele anorganice oferă posibilități atractive pentru dezvoltarea de preparate destinate terapiei antifungice, datorită proprietăților cum ar fi biocompatibilitatea intrinsecă, efecte toxice minime asupra organismului uman, activitate biologică evidentă împotriva agenților patogeni și modul de

manifestare în legătură cu dimensiunile mici. Astfel, în subcapitolul dat vor fi prezentate rezultatele evaluării acțiunii calitative a AgNPs generate din polizaharide (derivați celulozici, pululan și 6-carboxipululan).

Evaluarea distribuției tulpinilor clinice testate cu referire la potențialul antifungic al nanoparticulelor de argint generate din polizaharide denotă apartenența la cinci genuri de fungi: *Candida* 94,0% (ÎÎ 95% 91,9-96,2), *Cryptococcus* – 1,0% (ÎÎ 95% 1,2-3,2), *Magnusiomyces* – 1,0% (ÎÎ 95% 1,2-3,2), *Saccharomyces* – 3,0% (ÎÎ 95% 0,9-5,2) și *Trichosporon* – 1,0 (ÎÎ 95% 1,2-3,2). Genurile *Magnsiomyces capitatus* și *Trichosporon asahii* au fost reprezentate de o singură specie fiecare cu câte un izolat – 1,0% (ÎÎ 95% 1,2-3,2). Genul *Saccharomyces* a fost reprezentat de o singură specie – *S. cerevisiae* cu trei izolate – 3,0% (ÎÎ 95% 0,9-5,2). Cel mai numeros gen din acest studiu a fost *Candida* spp., cu 15 specii și 94,0% (ÎÎ 95% 91,9-96,2) din izolatele clinice. Cele mai multe izolate au fost reprezentate de specia *Candida glabrata* cu 27,0% (ÎÎ 95% 24,9-29,2) din izolate, urmată de specia *Candida albicans* cu 23,0% (ÎÎ 95% 20,9-25,2) din izolate și *Candida parapsilosis* cu 16,0% (ÎÎ 95% 13,9-18,2). *Candida krusei* a fost reprezentată de 5,0% (ÎÎ 95% 2,9-7,2); *Candida guilliermondii* și *Candida tropicalis* - cu câte 4,0% (ÎÎ 95% 1,9-6,2) fiecare; *Candida lusitaniae* - cu 3,0% (ÎÎ 95% 0,9-5,2); *Candida famata*, *Candida kefyr*, *Candida norvegensis* și *Candida utilis* - câte 2,0% (ÎÎ 95% 0,2-4,2) fiecare; și *Cryptococcus neoformans*, *Candida pulcherrima*, *Candida pelliculosa*, *Candida dubliniensis*, *Candida robusta* – cu câte 1,0% (ÎÎ 95% - 1,2-3,2) fiecare.

Toate tulpinile sunt identificate și incluse în Colecția Română de Culturi Tip (RTCC - Romanian Type Culture Collection).

Sensibilitatea la antifungice a tulpinilor clinice testate

Toate cele 100 de tulpini de fungi au fost testate față de șase compuși activi cu rol antifungic, din două grupe: azoli (fluconazol, voriconazol, posaconazol) și echinocandine (caspofungină, micafungină, anidulafungină). Valorile obținute au fost interpretate conform standardelor pentru testarea sensibilității la antifungice – EUCAST.

Astfel, o situație foarte îngrijorătoare s-a înregistrat la izolatele de *C. glabrata*: din 27 de izolate 44,4% (ÎÎ 95% 42,3-46,6) au fost rezistente (R) la fluconazol (Figura 5.11) și 55,6% (ÎÎ 95% 53,5-57,8) au fost sensibile la doze înalte (SSD). Nici una din tulpini nu a fost sensibilă la acest preparat. Pentru celelalte preparate din această grupă (voriconazol, posaconazol) standardele nu recomandă testarea sensibilității din cauza studiilor insuficiente pentru a stabili și a interpreta breakpoint-urile obținute.

La caspofungină s-au dovedit a fi sensibile doar 25,9% (ÎÎ 95% 23,8-28,1) din izolatele de *C. glabrata* (Figura 5.12), 63,0% (ÎÎ 95% 60,9-65,2) din izolate au fost sensibile la doze înalte, iar

11,1% (Î 95% 9,0-13,3) au fost rezistente (Figura 5.11), comparativ cu micafungina, la care 63,0% (Î 95% 60,9-65,2) din izolate au prezentat rezistență (Figura 5.11) și 37,0% (Î 95% 34,9-39,2) – sensibilitate (Figura 5.12). La anidulafungină cele mai multe tulpini au fost rezistente – 55,6% (Î 95% 53,5-57,8), iar 44,4% (Î 95% 42,3-46,6) au fost sensibile (Figura 5.12).

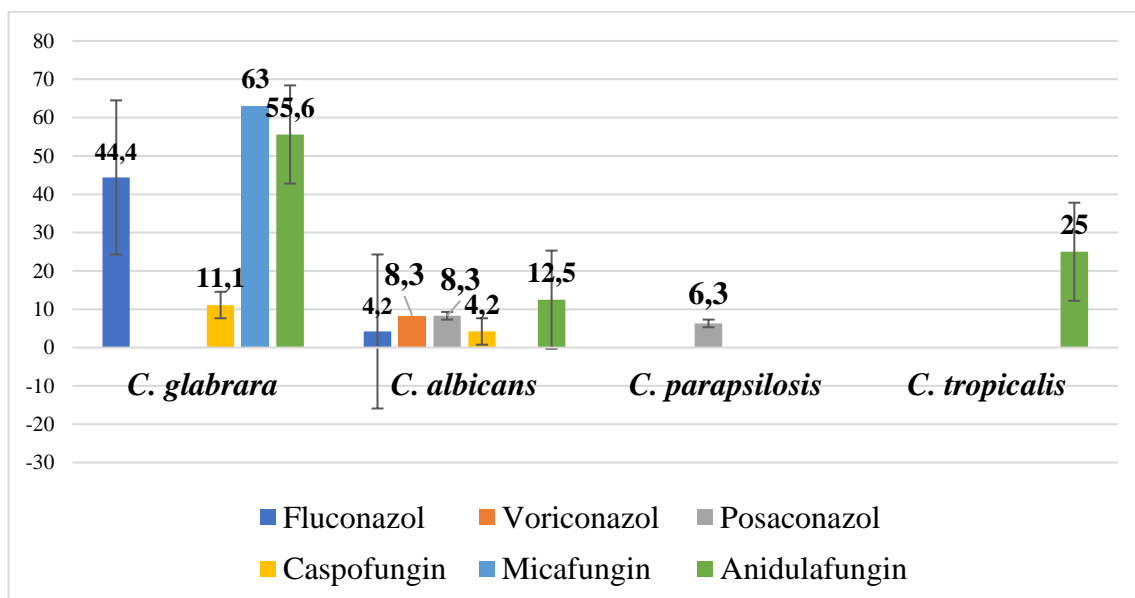


Fig. 5.12. Rezistența la preparatele antifungice a tulpinilor de *Candida* testate

Pentru izolatele de *C. albicans* testate situația a fost ceva mai îmbucurătoare, însă cu unele excepții. Din grupa azolilor, la fluconazol 87,5% (Î 95% 85,4-89,7) din izolate au manifestat sensibilitate (Figura 5.12), 8,3% (Î 95% 6,2-10,5) – sensibilitate dependentă de doză și doar 4,2% (Î 95% 2,1-6,4) din izolate au fost rezistente (Figura 5.11).

Aproximativ același tablou s-a conturat și pentru tulpinile testate la voriconazol: 91,7% (Î 95% 89,6-93,9) din izolate s-au arătat sensibile și 8,3% (Î 95% 6,2-10,5) – rezistente. În cazul posaconazolului, 87,5% (Î 95% 85,4-89,7) din izolate au manifestat sensibilitate (Figura 5.12), 4,2% (Î 95% 2,1-6,4) au fost sensibile în dependență de doză și 8,3% (Î 95% 6,2-10,5) din izolate au dat dovadă de rezistență (Figura 5.12).

Antifungigrama pentru echinocandine a fost diferită de cea a azolilor, cu excepția anidulafunginei, la care la fel 87,5% (Î 95% 85,4-89,7) din izolate au fost sensibile (Figura 5.12) și 12,5% (Î 95% 10,4-14,7) – rezistente (Figura 5.11). 95,8% (Î 95% 93,7-98,0) din tulpinile de *C. albicans* testate au prezentat sensibilitate dependentă de doză la caspofungină și 4,2% (Î 95% 2,1-6,4) – rezistență. La micafungină, 100% (Î 95% 97,9-102,2) din izolate au fost rezistente (Figura 5.11).

Din 16 tulpini de *C. parapsilosis* testate, 100% (Î 95% 97,9-102,2) au fost sensibile la fluconazol, voriconazol, micafungină și anidulafungină (Figura 5.12), 93,8% (Î 95% 91,7-96,0) din

izolate au fost sensibile la posaconazol și 6,3% (IÎ 95% 4,2-8,5) – rezistente (Figura 5.11). Pentru caspofungină nu există studii suficiente pentru a stabili valorile de referință pentru interpretare, respectiv testarea tulpinilor de *C. parapsilosis* nu este recomandată.

Sensibilitatea la antifungice a fost testată și la cinci izolate de *C. krusei*. Conform standardelor de referință, aceasta a fost posibil doar pentru anidulafungină, la care 100% (IÎ 95% 97,9-102,2) din izolate au fost sensibile (Figura 5.13). Pentru celelalte preparate standardele nu recomandă testarea la antifungice.

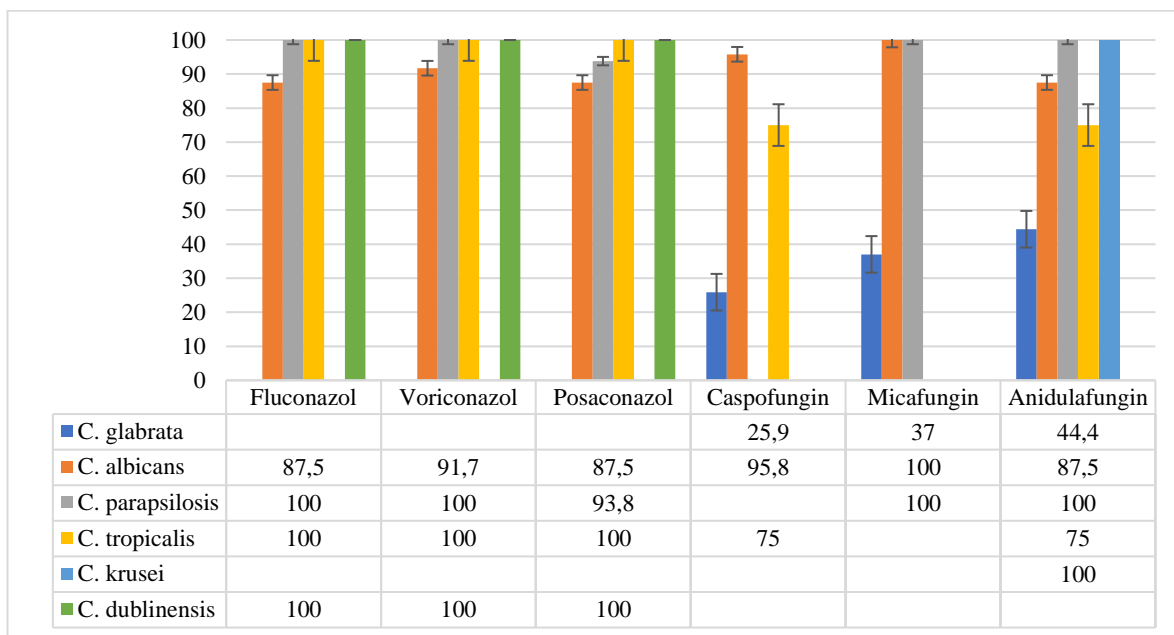


Fig. 5.13. Sensibilitatea la preparatele antifungice a tulpinilor de *Candida* testate

C. tropicalis a fost în 100% (IÎ 95% 97,9-102,2) din cazuri sensibilă la toate preparatele din grupa azolilor (Figura 5.12). La caspofungină și anidulafungină, 75,0% (IÎ 95% 72,9-77,2) din izolate au fost sensibile (Figura 5.12), 25,0% (IÎ 95% 22,9-27,2) au fost sensibile dependent de doză la caspofungină și 25,0% (IÎ 95% 22,9-27,2) au fost rezistente la anidulafungină (Figura 5.11). Testarea sensibilității la micafungină a tulpinilor de *C. tropicalis* nu este recomandată.

C. dublinensis în 100% (IÎ 95% 97,9-102,2) din cazuri a prezentat sensibilitate la toate preparatele din grupa azolilor (Figura 5.12), iar testarea la echinocandine nu este recomandată.

Pentru celelalte 23 de tulpini (*C. guilliermondii* – 4, *C. lusitaniae* – 3, *C. utilis* – 2, *C. norvegensis* – 2, *C. kefyr* – 2, *C. pulcherrima* – 1, *C. pelliculosa* – 1, *C. robusta* – 1, *C. famata* – 1, *C. neoformans* – 1, *S. cerevisiae* – 3, *Magnusiomyces capitatus* – 1, *T. asahii* – 1) din 4 genuri de fungi (*Candida*, *Magnusiomyces*, *Saccharomyces* și *Trichosporon*), testarea susceptibilității la preparatele antifungice nu este recomandată de standardele internaționale, lipsind breakpoint-urile din cauza studiilor insuficiente pe aceste tulpini.

Screening-ul calitativ al activității antifungice a nanoparticulelor de argint (AgNPs) generate din pululan, 6-carboxipululan și derivați celulozici (AgNPs-MC, AgNPs-HPC, AgNPs-CA, AgNPs-EC) pe tulpini tip de *C. albicans* ATCC 10231, *C. auris* CBS 10913, *C. glabrata* ATCC 90030, *C. parapsilosis* ATCC 22019, *C. guilliermondii* IP 1055, *C. krusei* ATCC 6258, *C. lusitaniae* RTCC 1120, *C. pelliculosa* RTCC 1029 și al izolatele clinice de fungi levuriformi a fost realizat prin metoda difuziunii cu agar. Metoda a presupus adăugarea AgNP-urilor testate la mediul de cultură preinoculat cu suspensie microbiană și măsurarea zonei clare cauzate de inhibarea creșterii după 24 de ore de incubare. În linii generale, pentru toate tipurile de AgNP-uri a fost demonstrată eficiența foarte ridicată în cazul majorității tulpinilor testate, efectul nefiind datorat solventului (Figura 5.14).

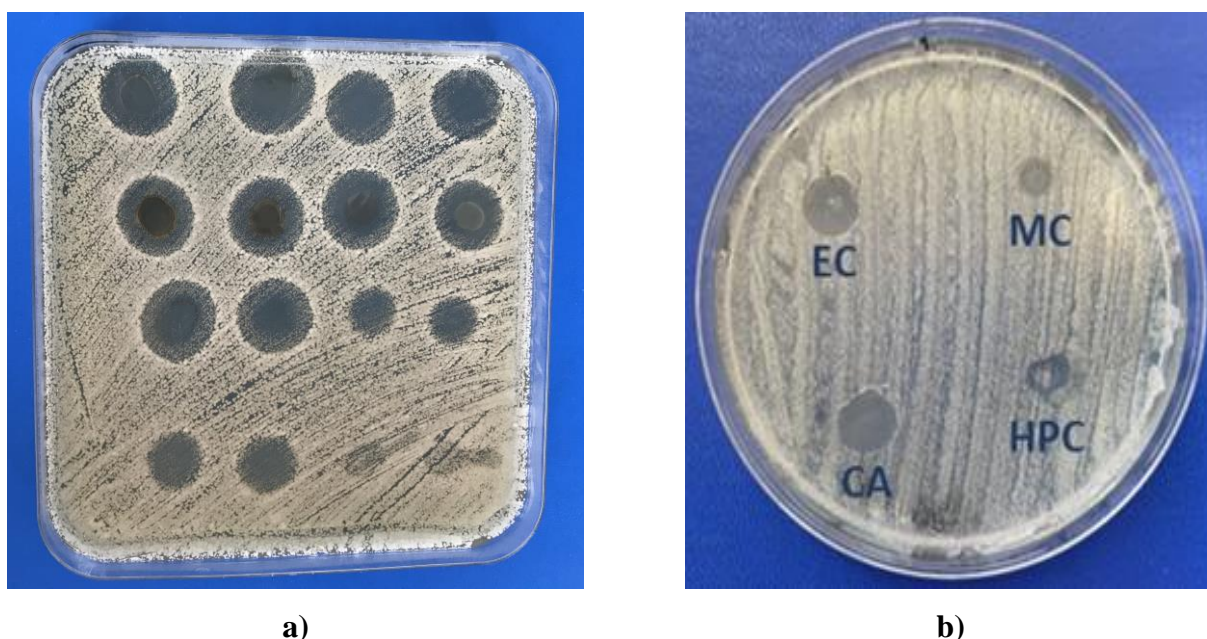


Fig. 5.14. Efectul activității antifungice asupra izolatelor clinice de *Candida albicans* a nanoparticulelor de argint (AgNPs): a) generate din pululan și 6-carboxipululan; b) stabilizate cu derivați celulozici pe tulpini microbiene

Activitatea antifungică a nanoparticulelor de argint (AgNPs) generate din pululan și din 6-carboxipululan asupra unor izolate clinice de fungi

Datele prezentate pe Tabelul 5.5 cu referire la valorile diametrelor medii ale zonelor de inhibiție a creșterii agenților fungici, obținute pentru fiecare tip de nanoparticule generate din derivați celulozici (AgNPs-MC, AgNPs-HPC, AgNPs-CA, AgNPs-EC), notat în milimetri, atestă că toate AgNP-urile sunt capabile să inhibe creșterea fungilor levuriformi puse în contact direct cu acești compuși.

Tabelul 5.5. Activitatea antifungică a nanoparticulelor de argint (AgNPs) generate din pululan și din 6-carboxipululan asupra unor izolate clinice de fungi

Nr. d/o	Denumirea agentului fungic	Diametrul zonelor de inhibiție (mm)			
		Tipul de AgNPs			
		AgNPs-MC	AgNPs-HPC	AgNPs-CA	AgNPs-EC
1.	<i>C. albicans</i>	9	10	8	11
2.	<i>C. auris</i>	10	11	9	10
3.	<i>C. glabrata</i>	8	8	10	9
4.	<i>C. parapsilosis</i>	9	9	11	10
5.	<i>C. guilliermondii</i>	10	10	11	12
6.	<i>C. krusei</i>	11	10	11	11
7.	<i>C. lusitaniae</i>	10	10	12	11
8.	<i>C. pelliculosa</i>	8	9	10	10

5.3. Testarea activității antifungice a AgNPs în vederea determinării unor parametri cantitativi ai acțiunii antifungice (CMI) pe izolate clinice și pe tulpini de referință

Rezultatele activității antifungice a nanoparticulelor de Ag generate din polizaharide (derivați celulozici, pululan și 6-carboxipululan) au demonstrat rezultate promițătoare și asupra fungilor, în special asupra fungilor levuriformi.

Astfel, conform datelor obținute, toate cele patru tipuri de nanoparticule de Ag noi (PAg, POAg, C4, C5), în limitele concentrațiilor testate, au manifestat efect antifungic față de anumite tulpini și la diferite concentrații aplicate.

Astfel, nanoparticulele PAg în concentrație de 28,75 μg/ml au manifestat efect antifungic față de 88,0% (Î 95% 85,9-90,2) din cele 100 de tulpini testate. Pentru celelalte 12,0% (Î 95% 9,9-14,2) de tulpini (două tulpini de *C. albicans*, două tulpini de *C. guilliermondii*, patru tulpini de *C. parapsilosis*, câte o tulpină de *C. krusei*, de *C. pulcherrima*, de *C. famata* și de *C. kefyr*) efectul antifungic al nanoparticulelor s-a manifestat la o concentrație mai mare – 57,5 μg/ml.

Nanoparticulele POAg de asemenea au manifestat acțiune antifungică față de tulpinile clinice testate. Pentru 91,0% (Î 95% 88,9-93,2) dintre acestea efectul minim de inhibiție a fost obținut la concentrația de 26,25 μg/ml, iar pentru celelalte 9,0% (Î 95% 6,9-11,2) de tulpini (cinci tulpini de *C. albicans* și câte o tulpină de *C. glabrata*, de *C. parapsilosis*, de *C. famata* și de *C. pulcherrima*) – la concentrația de 52,5 μg/ml.

În cazul nanoparticulelor C4, efectul antifungic a fost obținut la concentrații puțin mai ridicate. În cazul a 97,0% (Î 95% 94,9-99,2) din tulpinile testate, CMI cu efect antifungic a fost de 35 μg/ml și doar pentru 3,0% (Î 95% 0,9-5,2) dintre aceste tulpini (câte una din speciile *C. albicans*, *C. famata* și *C. parapsilosis*) efectul a fost obținut la concentrația de 70 μg/ml.

Cele mai active substanțe cu efect antifungic au fost nanoparticulele C5. Pentru 25,0% (Î 95% 22,9-27,2) dintre tulpinile testate (16 tulpini *C.glabrata*, trei tulpini de *C.parapsilosis*, două tulpini de *Sacharomyces cerevisiae*, o tulpină de *C.tropicalis* și tulpinile de *C.neoformans*, *C.kefyr* și *C.robusta*) CMI a fost de 18,25 µg/ml, iar pentru restul 75,0% (Î 95% 72,9-77,2) din tulpini – 36,5 µg/ml.

De asemenea poate fi remarcat și faptul că unele din tipuri de nanoparticule de argint au prezentat activitate antifugică redusă asupra tulpinilor din genurile *Magnusiomyces* și *Trichosporon*.

Cercetarea realizată demonstrează eficiența celor patru tipuri de nanoparticule de argint față de 18 specii de fungi patogeni, inclusiv dermatofiți. Pentru marea majoritate din cele 100 de tulpini testate, concentrațiile de nanoparticule care inhibă 100% creșterea fungilor este de până la 50 µg/ml, ceea ce permite a examina aceste nanomateriale în calitate de remedii alternative (ori adjuvante la terapiile existente) antifungice, în special de perspectivă în cazul tulpinilor rezistente la preparate antifungice.

Activitatea antifungică în vederea determinării parametrilor cantitativi ai acțiunii antifungice a nanoparticulelor de argint stabilizate cu derivați celulozici (AgNPs-MC, AgNPs-HPC, AgNPs-CA și AgNPs-EC), cu stabilirea valorilor CMI și CMF față de speciile de *Candida albican* și de *Candida non-albicans*, a fost evaluate utilizând tehnica microdiluției după standardul EUCAST E.Def. 7.3.2. Valorile CMI și CMF obținute pentru nanoparticulele stabilizate cu derivați celulozici față de speciile din cadrul genului *Candida* sunt prezentate pe Tabelul 5.6.

Toți derivații celulozici au prezentat un potențial antifungic ridicat, comparativ cu nanoparticulele de argint încorporate în matricea pululanului, cu valori ale CMI cuprinse între 0,0625-0,125 mM (concentrația de argint). În linii generale, legat de activitatea antifungică a principalilor derivați celulozici cu AgNO₃, aceștia au acționat similar față de speciile *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. dubliniensis*, *C. parapsilosis* și *C. guilliermondii*, *C. tropicalis*, *C. norvegensis* cu o valoare a CMI de 0,125 mM; în timp ce față de *C. krusei*, *C. robusta*, *C. kefyr*, *C. neoformans*, *C. lusitaniae* și *C. pelliculosa* au prezentat un grad mai mare de inhibare a creșterii levurice cu o valoare a CMI de 0,0626 mM.

Determinarea parametrilor cantitativi ai potențialei activități antifungice pe baza valorilor datele CMF au arătat că toți derivații celulozici au prezentat activitate „cidă” uniformă față de toate speciile levurice luate în studiu.

Microscopia electronică de scanare (SEM) a fost utilizată pentru a pune în evidență modificările ultrastructurale ale celulelor fungice în prezența AgNP-urilor folosind derivați celulozici după 24 de ore de incubare.

Tabel 5.6. Activitatea antifungică (CMI; CMF; mM) a nanoparticulelor de argint stabilizate cu derivați celulozici

Nr. d/o	Denumirea agentului fungic testat	Tipul de AgNPs							
		AgNPs-MC		AgNPs-HPC		AgNPs-CA		AgNPs-EC	
		CMI	CMF	CMI	CMF	CMI	CMF	CMI	CMF
1.	<i>C. albicans</i>	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125
2.	<i>C. glabrata</i>	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125
3.	<i>C. dubliniensis</i>	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125
4.	<i>C. parapsilosis</i>	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125
5.	<i>C. tropicalis</i>	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125
6.	<i>C. guilliermondii</i>	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125
7.	<i>C. norvegensis</i>	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125
8.	<i>C. krusei</i>	0,0625	0,0625	0,0625	0,0625	0,0625	0,0625	0,0625	0,0625
9.	<i>C. robusta</i>	0,0625	0,0625	0,0625	0,0625	0,0625	0,0625	0,0625	0,0625
10.	<i>C. neoformans</i>	0,0625	0,0625	0,0625	0,0625	0,0625	0,0625	0,0625	0,0625
11.	<i>C. kefyr</i>	0,0625	0,0625	0,0625	0,0625	0,0625	0,0625	0,0625	0,0625
12.	<i>C. lusitaniae</i>	0,0625	0,0625	0,0625	0,0625	0,0625	0,0625	0,0625	0,0625
13.	<i>C. pelliculosa</i>	0,0625	0,125	0,0625	0,0625	0,0625	0,125	0,0625	0,125
+cp	<i>Fluconazol</i>								
-cn	AD								

Notă: Nu prezintă zonă de inhibiție (-); control pozitiv (+cp); control negativ (-cn); apă distilată (AD); CMI – concentrația minimă inhibitorie; CMF – concentrația minimă fungicidă

Vizualizarea efectului AgNPs stabilizate cu derivați celulozici asupra speciilor de Candida utilizând microscopia electronică

Evaluarea microscopică a fost realizată pe specia *C. albicans* ca control fără AgNPs unde s-a observat că celulele netratate au fost agregate, bine definite, cu o suprafață netedă a celulei, formă ovală și celule levurice care se multiplică prin burjeonare (Figura 5.13). În schimb, imaginile SEM ale celulelor de *C. albicans* tratate cu nanoparticule de argint testate au indicat denaturarea peretelui celular și eliberarea matricei intracelulare.

Nanoparticulele de argint obținute din derivați celulozici au interacționat cu celula fungică, ajungând să se acumuleze la suprafața acesteia și să producă modificări structurale ale peretelui celular, crescând astfel permeabilitatea acestuia. A fost demonstrat că și dimensiunea AgNp, și forma, și concentrația acestora influențează procesul de aderență la peretele celulei fungice. Nanoparticulele de argint au aderat la suprafața peretelui celular al fungilor, având drept consecințe

modificarea morfologică a celulei fungice și ruperea peretelui celular, urmată de pierderea citoplasmei și apoi de apoptoza celulară.

Pe baza rezultatelor obținute s-a dovedit că nanoparticulele de argint au pătruns în interiorul celulei și al nucleului, dezechilibrând elementele intracelulare și generând disfuncție mitocondrială, denaturarea proteinelor, alterarea ribozomilor, interacțiunea cu ADN-ul. AgNp-urile au manifestat citotoxicitate și stres oxidativ. Producerea de specii reactive de oxigen (SOR) de către AgNp-uri elucidează acțiunea antifungică ale acestora. SOR au oxidat proteinele și lipidele, dar și bazele azotate ale ADN-ului. Astfel, pe imaginile SEM, prezentate pe Figura 5.15, se observă că celulele de *C. albicans* tratate cu AgNP-uri, folosind derivați celulozici, prezintă distorsiuni, rugozitate și defecte ale peretelui celular care au facilitat eliminarea citoplasmei.

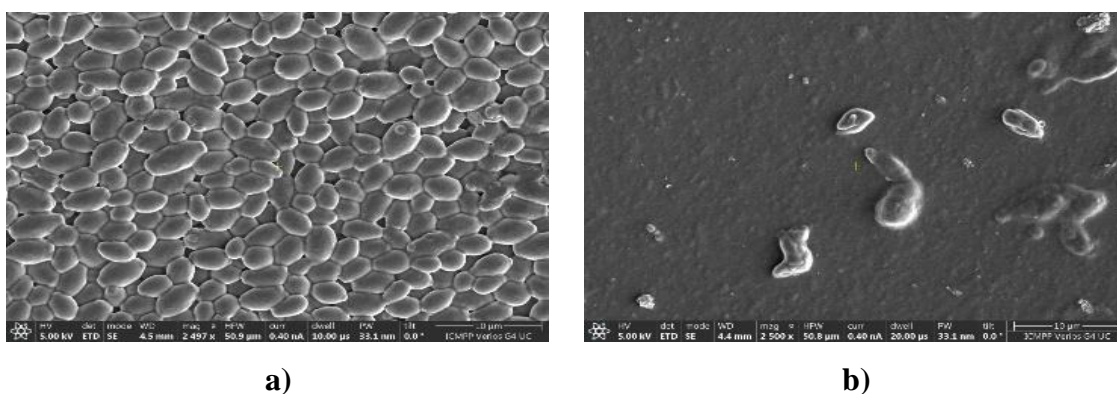


Fig. 5.15. Reprezentarea grafică a efectului AgNPs asupra *C. albicans* utilizând microscopia electronică [SEM]: a) *C. albicans* fără tratament: celulele sunt bine definite, cu suprafața netedă și formă ovală; b) *C. albicans* după tratamentul cu AgNP: se observă reducția și distorsiunea celulelor levurice prin eliberarea conținutului intracitoplasmatic

Evaluarea proprietăților antifungice ale nanoparticulelor de Ag generate din pululan, din 6-carboxipululan comparativ cu cele pe bază de derivați celulozici

În prezentul studiu s-au efectuat testări comparative pentru a evalua impactul nanoparticulelor de Ag stabilizate cu utilizarea polizaharidelor și anume cele generate din pululan cu cele obținute pe bază de derivați celulozici.

Dezavantajul observat în procesul de preparare a materialelor antifungice pe bază de nanoparticule de argint încorporate în matricea pululanului constă în faptul că activitatea antifungică a acestui tip de nanoparticule a prezentat valori ale CMI mai mari comparativ cu alte tipuri de nanoparticule de Ag. Totodată, trebuie menționat faptul că este o polizaharidă destul de costisitoare.

Un avantaj al nanoparticulelor de Ag stabilizate cu derivați celulozici este că metodologia de obținere a acestora este simplă și nu presupune utilizarea de agenți nocivi toxici și de factori fizici externi, precum temperatura, presiunea etc., ci doar a materialelor ieftine și uzuale (celuloza este cel mai răspândit material organic biodegradabil de pe planeta noastră).

Rezultatele testărilor și ale indicilor valorilor concentrației minime fungicidă a activității nanoparticulelor de Ag generate din pululan, comparativ cu cele ale AgNPs stabilizate cu derivați celulozici, au prezentat un efect antifungic ridicat față de toate speciile levurice luate în studiu și valori ale CMI mult mai mici și mai uniforme.

5.4. Concluzii la capitolul 5

1. În experimentele efectuate la acest capitol al cercetării s-au obținut nanoparticule de argint în prezența unor derivați naturali pe bază de polizaharide (pululan, pululan oxidat, derivați celulozici) în scopul dezvoltării de noi sisteme cu eliberare controlată și țintită de preparate antifungice.
2. Metoda de generare a nanoparticulelor de argint s-a dovedit a fi una eficientă, relativ laborioasă și a permis obținerea de AgNPs cu dimensiuni reduse (<20 nm), ceea ce face posibilă internalizarea celulară a acestora.
3. Pentru caracterizarea AgNPs s-au folosit o serie de tehnici, precum analiza morfostructurală și determinarea activității antifungice *in vitro*, iar rezultatele obținute au permis recomandarea materialelor sintetizate drept sisteme cu aplicații biomedicale, inclusiv ca formule farmaceutice noi cu efect antifungic.
4. Nanosistemele obținute prezintă o morfologie sferică cu dimensiuni reduse, cuprinse între 10-100 nm, și un potențial antifungic demonstrat asupra unui spectru larg de fungi, ceea ce creează premisele unor potențiale aplicații ale acestora în realizarea țintită a terapiei micozelor umane.
5. Sensibilitatea variabilă a tulpinilor levurice față de AgNPs stabilizate cu pululan indică la necesitatea continuării testărilor pe AgNPs stabilizate cu alte tipuri de derivați naturali și identificarea macromoleculilor care facilitează expresia maximă a efectului NPs.
6. Nanoparticulele de argint stabilizate cu derivați celulozici, prin acțiunea fungicidă demonstrată, pot fi propuse pentru a fi incluse în arsenalul de remedii antifungice, atât în practica medicală umană, cât și veterinară.
7. Rezultatele prezentului studiu au demonstrat o activitate antifungică înaltă a AgNPs *in vitro*. Pentru a le face aplicabile ca preparate antifungice sunt necesare investigații suplimentare *in vivo*, pentru standardizarea și stabilizarea lor, și cercetări toxicologice corespunzătoare.

6. MODIFICAREA MARKERILOR STRESULUI OXIDATIV, SISTEMULUI ANTIOXIDANT ȘI A PATTERNULUI INFLAMATOR SUB INFLUENȚA COMPUȘILOR BIOLOGIC ACTIVI

6.1. Activitatea compușilor biologic activi asupra parametrilor stresului oxidativ și ai sistemului antioxidant

Evaluarea intensității reacțiilor de oxidare cu radicali liberi în materialul biologic s-a realizat prin aprecierea unor indici importanți ai proceselor de peroxidare, cum ar fi nivelul dialdehidei malonice, produselor proteice de oxidare avansată, precum și a sistemului antioxidant: superoxid dismutaza, catalaza, activitatea antioxidantă totală, glutatation S-transferaza, glutatation peroxidaza, glutatation reductaza. Stresul oxidativ este un dezechilibru dintre speciile reactive de oxigen, numite și oxidanți (ex., radicali liberi, metaboliți reactivi ș.a.) și antioxidanți, în avantajul oxidanților manifestat prin procese distructive ale celulelor și impact semnificativ asupra întregului organism.

DAM este un produs secundar al peroxidării, utilizat ca marker biologic al stresului oxidativ al lezării membranei celulare, un indicator al leziunii oxidative a celulelor ce ne oferă informații utile privind starea de sănătate sau boală a unui pacient cu infecție fungică. Analiza măsurărilor efectuate pentru dialdehida malonică (DAM, $\mu\text{M/L}$) a arătat valoarea absolută maximală în lotul C1 (Mediana = 7,55, IQR = 0,725), valoarea minimă în lotul N2 (Mediana = 3,1, IQR = 0,725). Valorile absolute ale DAM, nM/s.L din lotul Martor (Mediana = 5,1, IQR = 0,675) au fost reduse comparativ cu valorile din lotul C1, comparabil cu lotul C2 (Mediana = 5,55, IQR = 0,825), cu lotul C1+N1 (Mediana = 4,85, IQR = 0,725) și crescut comparativ cu valorile DAM, $\mu\text{M/L}$ din lotul N1 (Mediana = 4,25, IQR = 0,45), lotul N2, lotul C1+B2 (Mediana = 4, IQR = 0,325), lotul C2+B1 (Mediana = 4,4, IQR = 0,525), lotul C2+B2 (Mediana = 3,35, IQR = 0,5) (Tabelul 6.13, Figura 6.1).

Este bine cunoscută proprietatea stresului oxidativ de a determina efecte nocive oxidative asupra proteinelor, finalizate cu formarea produselor proteice de oxidare avansată. Aceste produse prezintă diverse efecte nocive, cum ar fi stimularea secreției de citokine, eliberarea moleculelor de adeziune și a factorilor de creștere, intensificarea proliferării, migrarea și invazia celulelor tumorale ș.a.

Analiza măsurărilor efectuate pentru produsele proteice de oxidare avansată (PPOA, $\mu\text{M/L}$) a arătat valoarea absolută maximală în lotul C1 (Mediana = 47,7, IQR = 2,65), valoarea minimă în lotul N2 (Mediana = 32,8, IQR = 4,73).

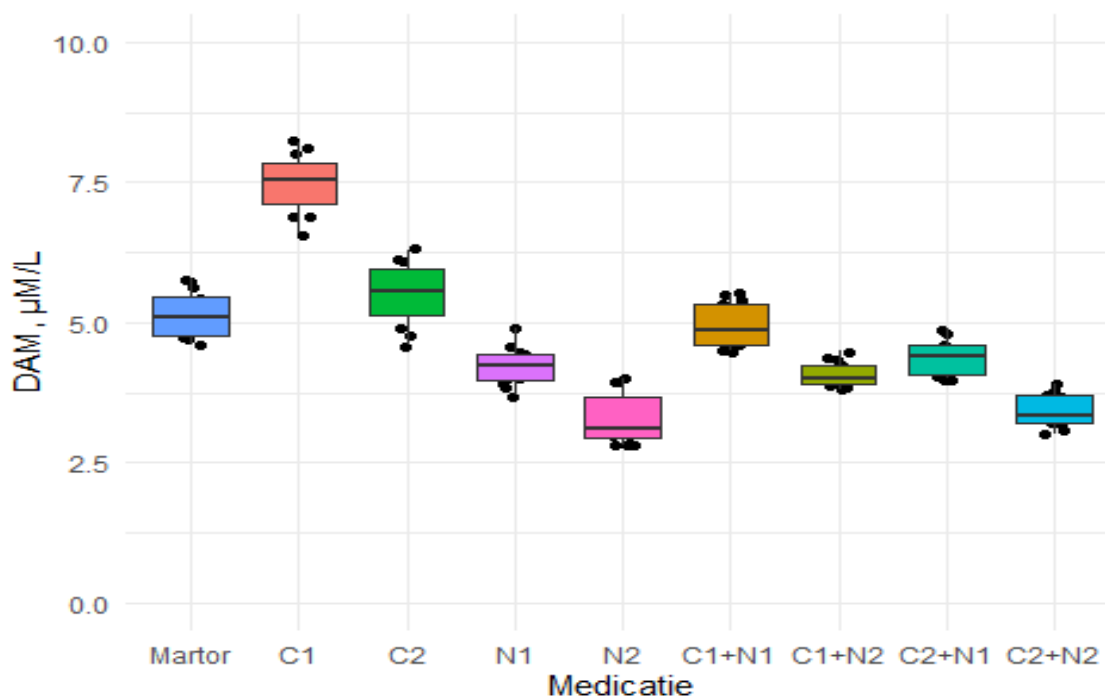


Fig. 6.1. Tendințele distribuirii valorilor DAM, nM/s.L în loturile cercetate

Notă: DAM – dialdehida malonică, N1 – extract de *S. platensis* (ES); N2 – extract carotenoid cu conținut de mixoxantofilă; C1 - compusul chimic $C_{19}H_{21}BrCuN_4S$; C2 - compusul chimic $C_{17}H_{19}CuN_5O_3S$; C1+N1 compusul chimic $C_{19}H_{21}BrCuN_4S$ + extract de *S. platensis*, C2+N2 compus chimic+ extrac carotenoid cu conținut de mixoxantofilă

Valorile absolute ale PPOA, $\mu M/L$ din lotul Martor (Mediana = 35,3, IQR = 4,45) au fost reduse comparativ cu valorile din lotul C1, lotul C2 (Mediana = 37,9, IQR = 3,6), și crescut comparativ cu valorile PPOA, $\mu M/L$ din loturile N1 (Mediana = 34,6, IQR = 14,68), N2, C1+N1 (Mediana = 34,6, IQR = 4,48), C1+B2 (Mediana = 33,4, IQR = 4,3), lotului C2+N1 (Mediana = 34,6, IQR = 4,43) și C2+B2 (Mediana = 33,6, IQR = 1,68) (Tabelul 6,13, Figura 6.2).

Enzimele antioxidante, precum superoxid dismutaza, catalaza, glutatión S transferaza, glutatión peroxidaza și glutatión reductaza, reprezintă mecanisme de protecție a celulelor de acțiunea nocivă a radicalilor liberi demonstrat prin reducerea stresului oxidativ și împiedicarea avansării acestuia. Totodată, sistemul antioxidant este constituit din substanțe antioxidante cu proprietăți hidrofile, parte a citoplasmei celulelor și a serului sangvin, precum și din compuși hidrofobi, prezenți în membranele celulelor fungice.

Superoxid dismutaza, fiind considerată cea mai importantă enzimă a sistemului primar intern de apărare antioxidantă, joacă un rol semnificativ în diminuarea stresului oxidativ, care poate determina multiple afecțiuni, cu impact negativ asupra sănătății.

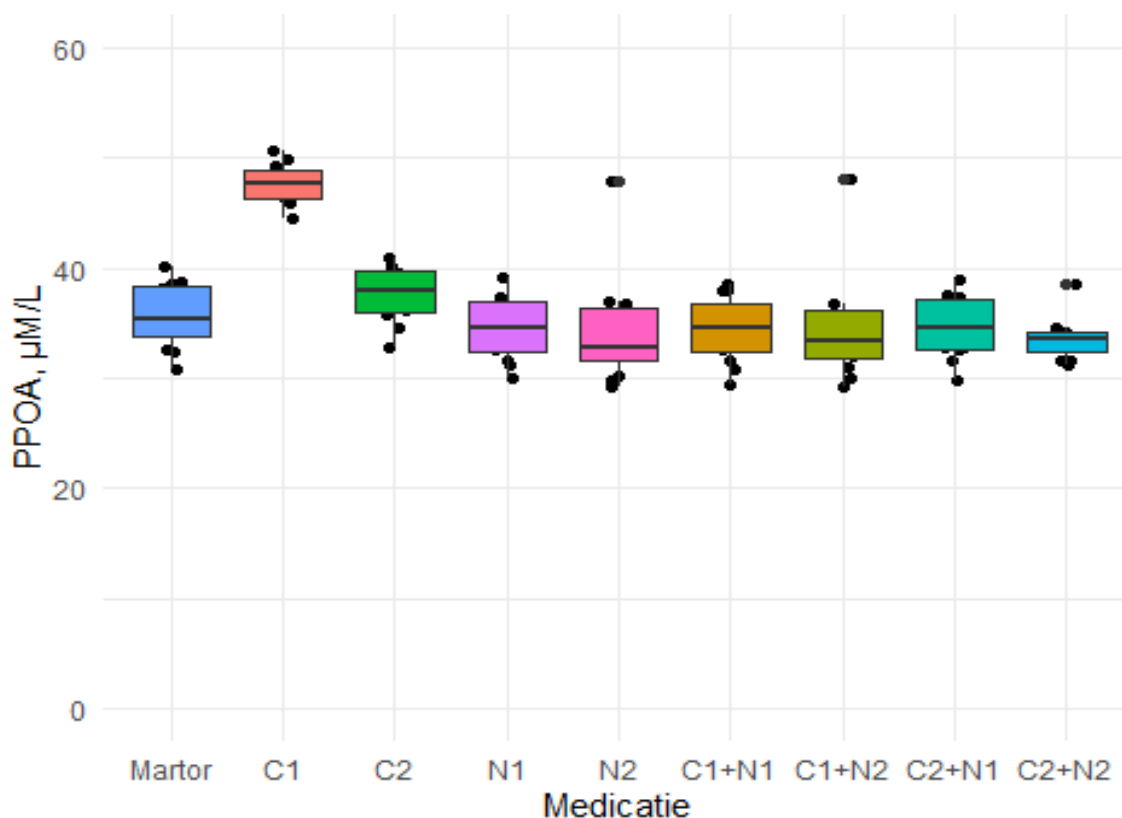


Fig. 6.2. Tendințele distribuirii valorilor PPOA, µM/L în loturile cercetate

Notă: PPOA – produse proteice de oxidare avansată, N1 – extract de *S. platensis* (ES); N2 – extract carotenoid cu conținut de mixoxantofilă; C1 - compusul chimic $C_{19}H_{21}BrCuN_4S$; C2 - compusul chimic $C_{17}H_{19}CuN_5O_3S$; C1+N1 compusul chimic $C_{19}H_{21}BrCuN_4S$ + extract de *S. platensis*, C2+N2 compus chimic+ extract carotenoid cu conținut de mixoxantofilă

Analiza măsurărilor efectuate pentru superoxid dismutază (SOD, u/c) a arătat valoarea maximală în lotul N2 (Mediana = 1040, IQR = 7,05) și valoarea minimă în lotul C1 (Mediana = 819, IQR = 12,1). Valorile absolute ale SOD, u/c din lotul Martor (Mediana = 851, IQR = 7,53) au fost reduse comparativ cu valorile indicatorului studiat din toate loturile - N1 (Mediana = 991, IQR = 9,28), N2, lotul C1+N1 (Mediana = 983, IQR = 6,38), lotul C1+N2 (Mediana = 1020, IQR = 4,1), lotul C2+N1 (Mediana = 984, IQR = 8,48) și lotul C2+N2 (Mediana = 1020, IQR = 6,03), cu excepția C1 și C2 (Mediana = 823, IQR = 4,88) (Tabelul 6.13, Figura 6.3).

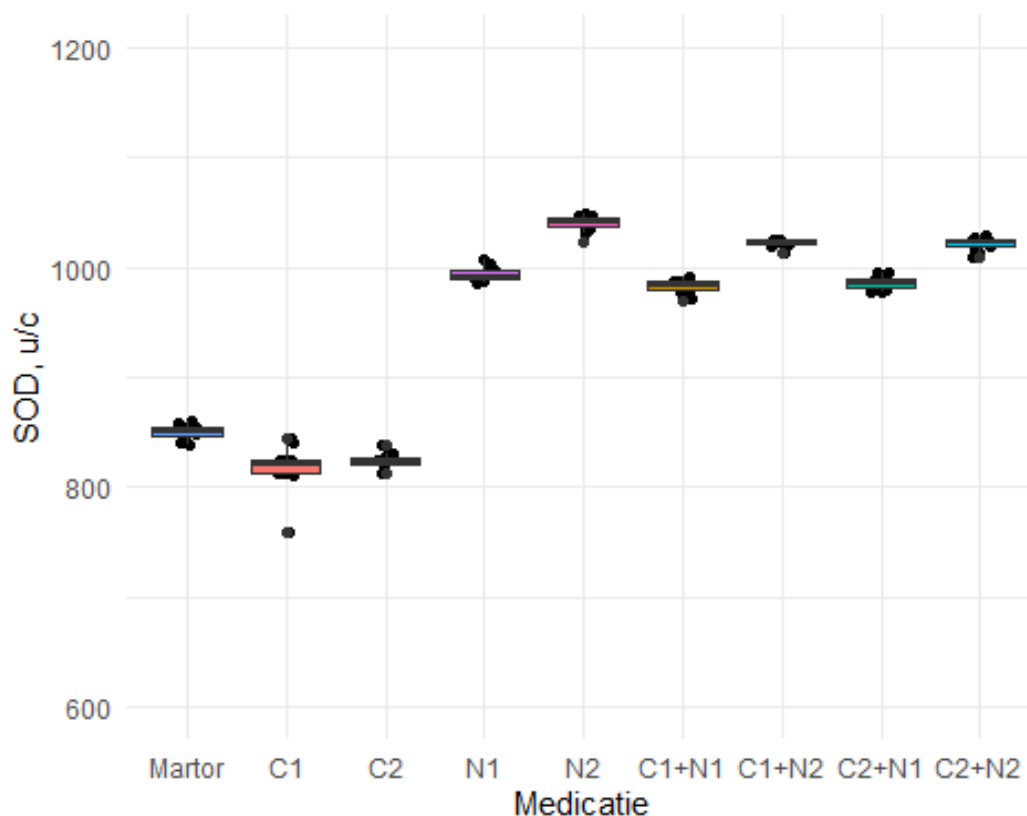


Fig. 6.3. Tendințele distribuiri valorilor SOD, u/c în loturile cercetate

Notă: SOD – superoxid dismutaza, produse proteice de oxidare avansată, N1 – extract de *S. platensis* (ES); N2 – extract carotenoid cu conținut de mixoxantofilă; C1 - compusul chimic $C_{19}H_{21}BrCuN_4S$; C2 - compusul chimic $C_{17}H_{19}CuN_5O_3S$; C1+N1 compusul chimic $C_{19}H_{21}BrCuN_4S$ + extract de *S. platensis*, C2+N2 compus chimic+ extract carotenoid cu conținut de mixoxantofilă

Valorile absolute ale catalazei, $\mu M/s.L$ din lotul Martor (Mediana = 17,8, IQR = 0,6) au fost reduse comparativ cu valorile din lotul C2 (Mediana = 18,3, IQR = 0,750), lotul N1 (Mediana = 37,1, IQR = 2,48), lotul N2, lotul C1+N1 (Mediana = 21,9, IQR = 2,40), lotul C1+N2 (Mediana = 33,7, IQR = 0,725), lotul C2+N1 (Mediana = 37,1, IQR = 2,58), lotul C2+N2 (Mediana = 39,9, IQR = 0,450), fiind însă mai mari versus valorile din lotul C1. Creșterea observată în loturile unde au fost cercetate efectele „combinat” ale compușilor studiați în cadrul studiului de față au fost determinate, incontestabil, de efectele extractelor N1 și N2 (Tabelul 6.13, Figura 6.4).

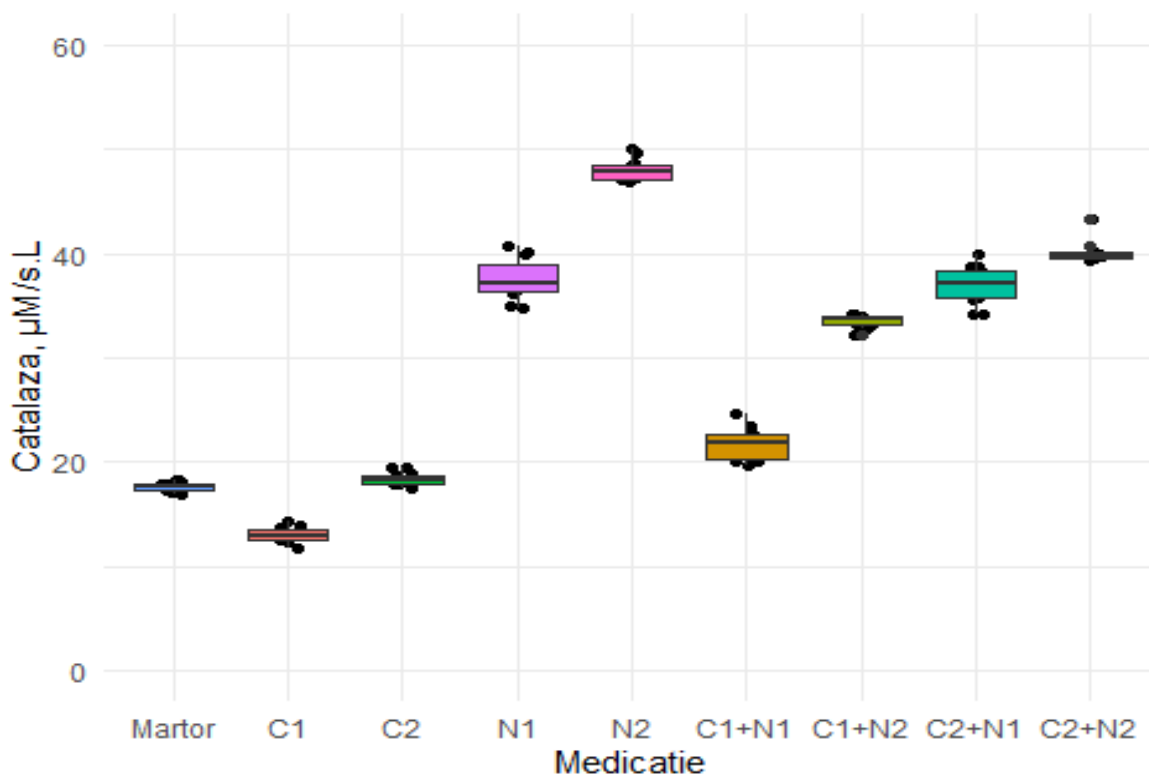


Fig. 6.4. Tendințele distribuției valorilor catalazei, $\mu\text{M/s.L}$ în loturile cercetate

Notă: N1 – extract de *S. platensis* (ES); N2 – extract carotenoid cu conținut de mixoxantofilă; C1 - compusul chimic $\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{BrCuN}_4\text{S}$; C2 - compusul chimic $\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{CuN}_5\text{O}_3\text{S}$; C1+N1 compusul chimic $\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{BrCuN}_4\text{S}$ + extract de *S. platensis*, C2+N2 compus chimic+extract carotenoid cu conținut de mixoxantofilă

Consecințele asupra celulei a excesului de radicali liberi de oxigen, ce includ activitatea componentelor enzimatică și celulare ale sistemului antioxidant, au fost evidențiată prin determinarea activității antioxidante totale. Analiza măsurărilor efectuate pentru activitatea antioxidantă totală (AAT cu ABTS, $\mu\text{M/L}$) a arătat valoarea maximală în lotul C2 (Mediana = 158, IQR = 3,08) și în lotul C2+N2 (Mediana = 160, IQR = 1,88), valoarea minimă în lotul Martor (Mediana = 138, IQR = 5,23), valorile absolute ale AAT cu ABTS, $\mu\text{M/L}$ din lotul Martor au fost reduse, în afară de valorile maxime menționate mai sus, comparativ cu valorile AAT cu ABTS, $\mu\text{M/L}$ din lotul C1 (Mediana = 150, IQR = 3,88), lotul N1 (Mediana = 141, IQR = 5,63), lotul N2 (Mediana = 153, IQR = 6,23), lotul C1+N1 (Mediana = 138, IQR = 6,00), lotul C1+N2 (Mediana = 152, IQR = 1,80) și lotul C2+N1 (Mediana = 139, IQR = 0,800) (Tabelul 6.13, Figura 6.5).

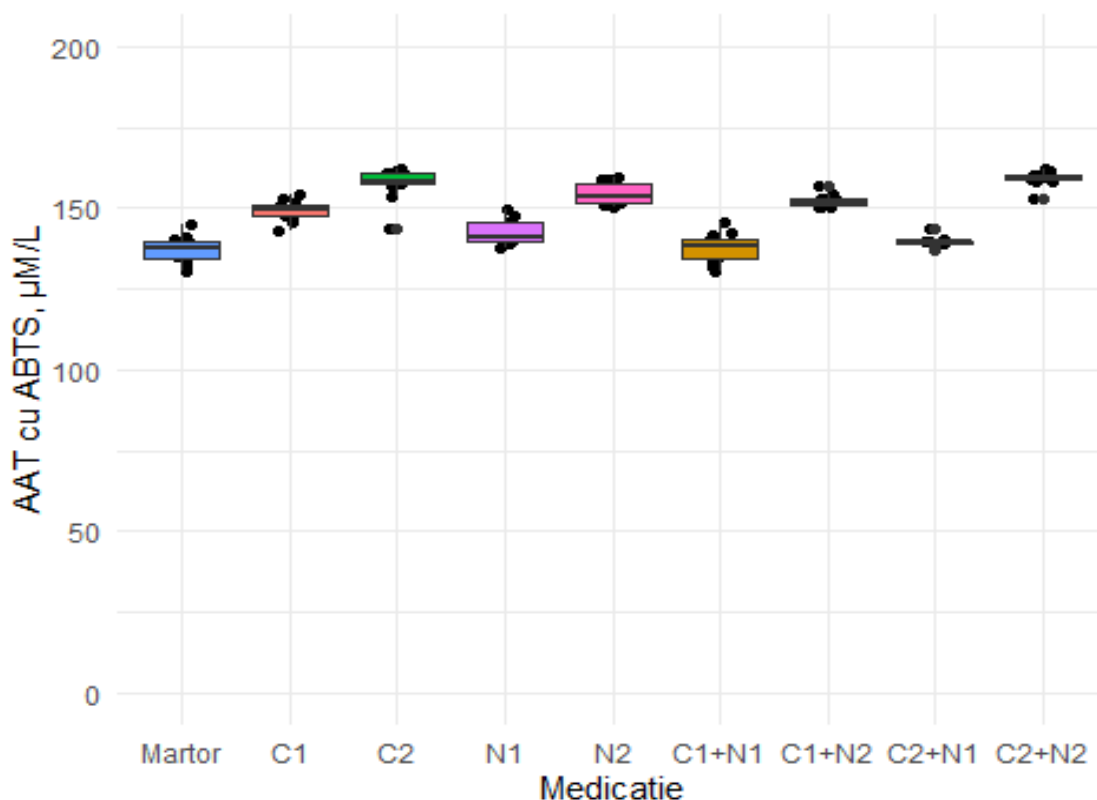


Fig. 6.5. Tendințele distribuirii valorilor AAT cu ABTS, $\mu\text{M/L}$ în loturile cercetate

Notă: AAT – activitatea antioxidantă totală; N1 – extract de *S. platensis* (ES); N2 – extract carotenoid cu conținut de mixoxantofilă; C1 - compusul chimic $\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{BrCuN}_4\text{S}$; C2 - compusul chimic $\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{CuN}_5\text{O}^3\text{S}$; C1+N1 compusul chimic $\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{BrCuN}_4\text{S}$ + extract de *S. platensis*, C2+N2 compus chimic+extract carotenoid cu conținut de mixoxantofilă

Glutadionul este un tripeptid cu grupare sulfhidrică și derivat esențial al aminoacizilor, cu funcții fiziologice importante în protecția antioxidantă, ce inhibă formarea radicalilor liberi. Glutathion S-transferazele, enzime implicate în procesele celulare ale xenobioticelor, cu proprietăți de a cataliza diverse reacții multiple în vederea detoxifierii peroxizilor lipidici. Analiza măsurărilor efectuate pentru glutathion S-transferaza G-S-T, (G-S-T, nM/s.L) a demonstrat valoarea maximală în lotul N2 (Mediana = 46.9, IQR = 3,23), valoarea minimă fiind constatata în lotul C2 (Mediana = 42,3, IQR = 3,60). În lotul Martor (Mediana = 44,7, IQR = 4,80) s-au înregistrat valori identice cu lotul C1 (Mediana = 44,7, IQR = 4,88), crescute față de C2 și C2+N1 (Mediana = 44,4, IQR = 1,73) și în scădere comparativ cu lotul N1 (Mediana = 45,8, IQR = 4,15), lotul N2, lotul C1+N1 (Mediana = 45,2, IQR = 4,33), lotul C1+N2 (Mediana = 46,6, IQR = 3,18) și lotul C2+N2 (Mediana = 46,2, IQR = 3,60) (Tabelul 6.13, Figura 6.6).

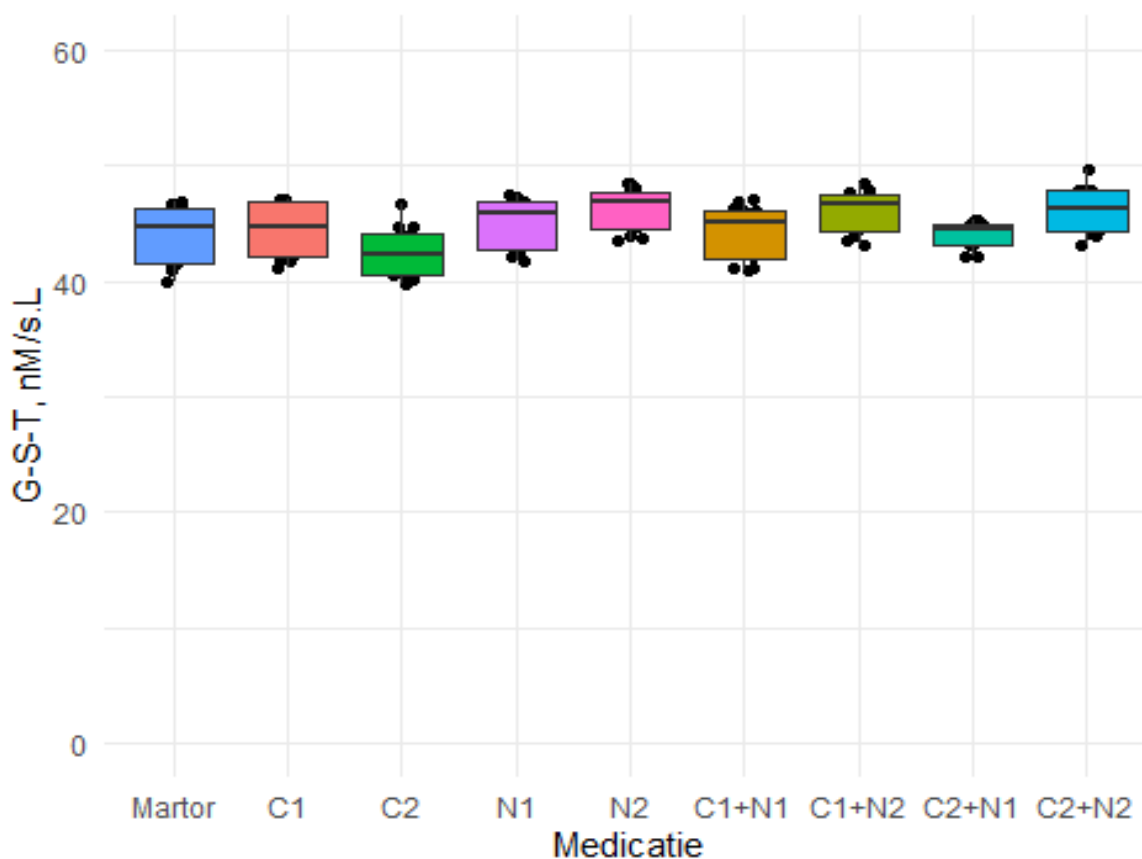


Fig. 6.6. Tendințele distribuirii valorilor G-S-T, nM/s.L din loturile cercetate

Notă: GST – glutation S-transferaza, produse proteice de oxidare avansată; N1 – extract de *S. platensis* (ES); N2 – extract carotenoid cu conținut de mixoxantofilă; C1 – compusul chimic $C_{19}H_{21}BrCuN_4S$; C2 – compusul chimic $C_{17}H_{19}CuN_5O_3S$; C1+N1 compusul chimic $C_{19}H_{21}BrCuN_4S$ + extract de *S. platensis*, C2+N2 compus chimic+ extract carotenoid cu conținut de mixoxantofilă

Glutation peroxidaza, antioxidant enzimatic din ser și din citoplasma celulară responsabil de detoxifierea peroxidului de hidrogen și a peroxizilor organici, reprezintă un factor important de protecție a lipidelor membranare și a hemoglobinei de oxidare. GPO, de comun cu catalaza și cu SOD, participă activ la neutralizarea xenobioticelor, constituind un sistem eficient de protecție celulară. Reducerea activității GPO poate determina majorarea nivelului de peroxizi, amplificarea producerii de radicali liberi și evidențierea stresului, care duce la lezarea oxidativă a țesuturilor. Analiza măsurărilor efectuate pentru glutacion peroxidaza (GPO, nM/s.L) a arătat valoarea maximală în lotul N2 (Mediana = 470, IQR = 3,43) și valoarea minimă în lotul C1 (Mediana = 319, IQR = 13,6). În lotul Martor (Mediana = 337, IQR = 6,75) s-au înregistrat valori reduse ale GPO, nM/s.L, comparativ cu lotul C1, C2 (Mediana = 339, IQR = 4,53). Valori crescute față de lotul Martor au fost determinate în lotul N1 (Mediana = 452, IQR = 8,45), lotul N2, lotul C1+N1

(Mediana = 399, IQR = 4,75), lotul C1+N2 (Mediana = 462, IQR = 30,0), lotul C2+N1 (Mediana = 449, IQR = 1,38) și lotul C2+N2 (Mediana = 437, IQR = 2,03) (Tabelul 6.13, Figura 6.7).

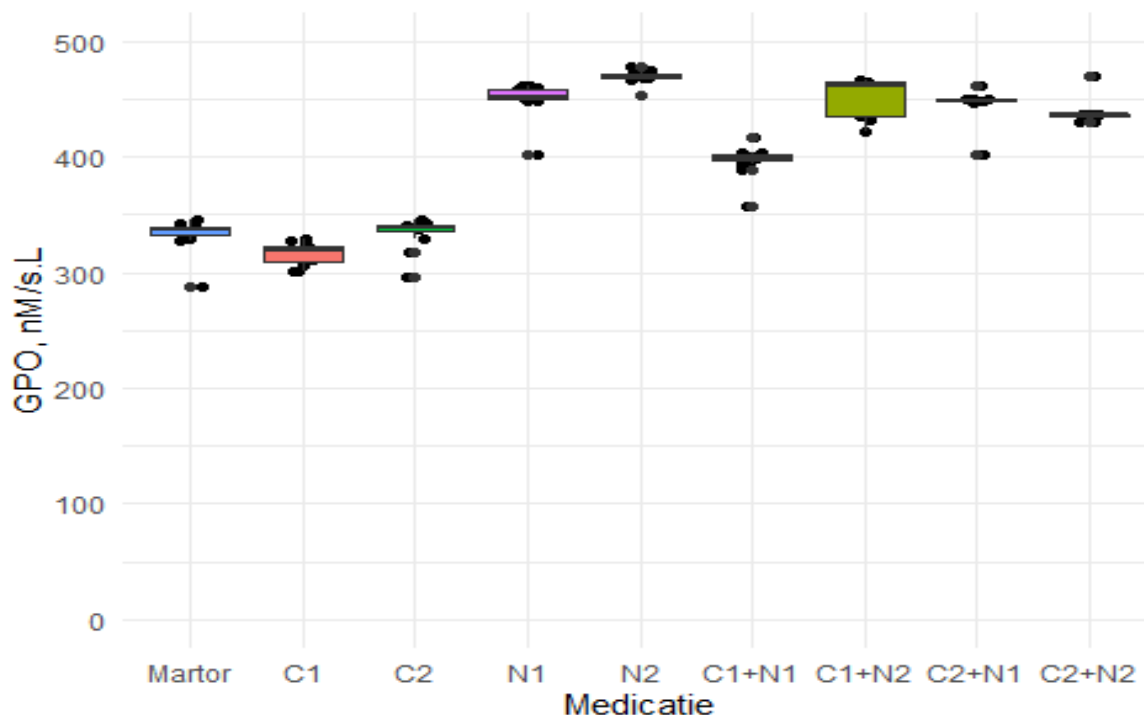


Fig. 6.7. Tendințele distribuirii valorilor GPO, nM/s.L în loturile cercetate

Notă: GPO – glutation peroxidaza, produse proteice de oxidare avansată; N1 – extract de *S.platensis*; N2 – extract carotenoid cu conținut de mixoxantofilă; C1 – compusul chimic $C_{19}H_{21}BrCuN_4S$; C2 – compusul chimic $C_{17}H_{19}CuN_5O_3S$; C1+N1 compusul chimic $C_{19}H_{21}BrCuN_4S$ + extract de *S. platensis*; C2+N2 compus chimic + extract carotenoidic conținut de mixoxantofilă

Glutation reductaza, responsabilă de reglarea, modularea, menținerea homeostazei celulare și a aportului de glutacion redus, constituie unul dintre cei mai importanți compuși reducători (tioli) din majoritatea celulelor. În forma sa redusă, glutacionul joacă un rol cheie în controlul celular al speciilor reactive de oxigen, care acționează ca molecule de semnalizare intracelulare și extracelulare, în interacțiunea complexă dintre nivelurile speciilor reactive de oxigen, nivelurile de glutacion oxidat și redus, și alți tioli. GR determină condițiile cele mai potrivite pentru controlul redox în interiorul celulei sau pentru activarea și moartea programată a celulelor. Analiza măsurărilor efectuate pentru glutacion reductaza (GR, nM/s.L) a arătat valoarea maximală în lotul N2 (Mediana = 169, IQR = 4,85), valoarea minimă, ca și în cazul GPO, nM/s.L, fiind constatată în lotul C1 (Mediana = 29,8, IQR = 9.23). Valorile parametrului studiat din lotul Martor (Mediana = 47,8, IQR = 5,83) au fost reduse comparativ cu valorile absolute din lotul C2 (Mediana = 50,4,

IQR = 5,45), lotul N1 (Mediana = 97,4, IQR = 11,8), lotul N2, lotul C1+N1 (Mediana = 59,3, IQR = 3,33), lotul C1+N2 (Mediana = 117, IQR = 2,25), lotul C2+N1 (Mediana = 91,5, IQR = 2,70) și lotul C2+N2 (Mediana = 149, IQR = 4,00) (Tabelul 6.13, Figura 6.8).

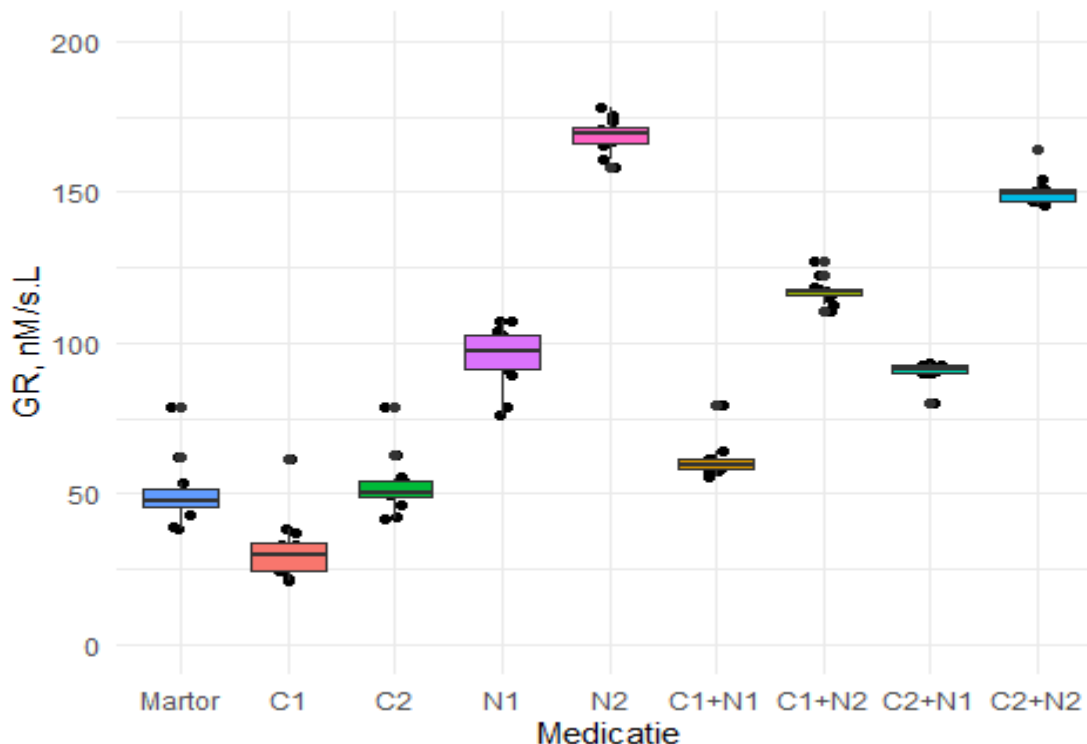


Fig. 6.8. Tendințele distribuirii valorilor GR, nM/s.L în loturile cercetate

Notă: GR – glutation reductaza; N1 – extract de *S. platensis* (ES); N2 – extract carotenoid cu conținut de mixoxantofilă; C1 – compusul chimic $C_{19}H_{21}BrCuN_4S$; C2 – compusul chimic $C_{17}H_{19}CuN_5O_3S$; C1+N1 compusul chimic $C_{19}H_{21}BrCuN_4S$ + extract de *S. platensis*, C2+N2 compus chimic+extract carotenoid cu conținut de mixoxantofilă

6.2. Modificarea nivelului parametrilor citokinelor proinflamatoare și antiinflamatoare

Interacțiunea fungilor levuriformi cu citokinele proinflamatoare declanșează un răspuns inflamator. În prezenta cercetare a fost evaluată expresia unor citokine pro- (IL-6, IL-1 β și TNF- α) și antiinflamatoare (IL-10) sub influența compușilor chimici și biologici testați, separat și în combinație. Analiza măsurărilor efectuate pentru interleukinele de tip 1, (IL-1, pg/ml) a arătat valoarea maximală în lotul C1 (Mediana = 51,0, IQR = 1,35), valoarea minimă în lotul N2 (Mediana = 47,5, IQR = 1,58). Valorile absolute ale IL-1, pg/ml, din lotul Martor (Mediana = 48,6, IQR = 2,20) au fost reduse, în afară de valoarea maximală din lotul C1, comparativ cu valorile IL-1, pg/ml din lotul C1+N1 (Mediana = 50,1, IQR = 2,33), fiind în creștere față de lotul C2 (Mediana

= 48,1, IQR = 2,23), lotul N1 (Mediana = 47,6, IQR = 1,40), lotul N2, lotul C1+N2 (Mediana = 47,8, IQR = 1,38), lotul C2+N1 (Mediana = 47,6, IQR = 1,40) și lotul C2+N2 (Mediana = 46,9, IQR = 0,425) (Tabelul 6.13, Figura 6.9).

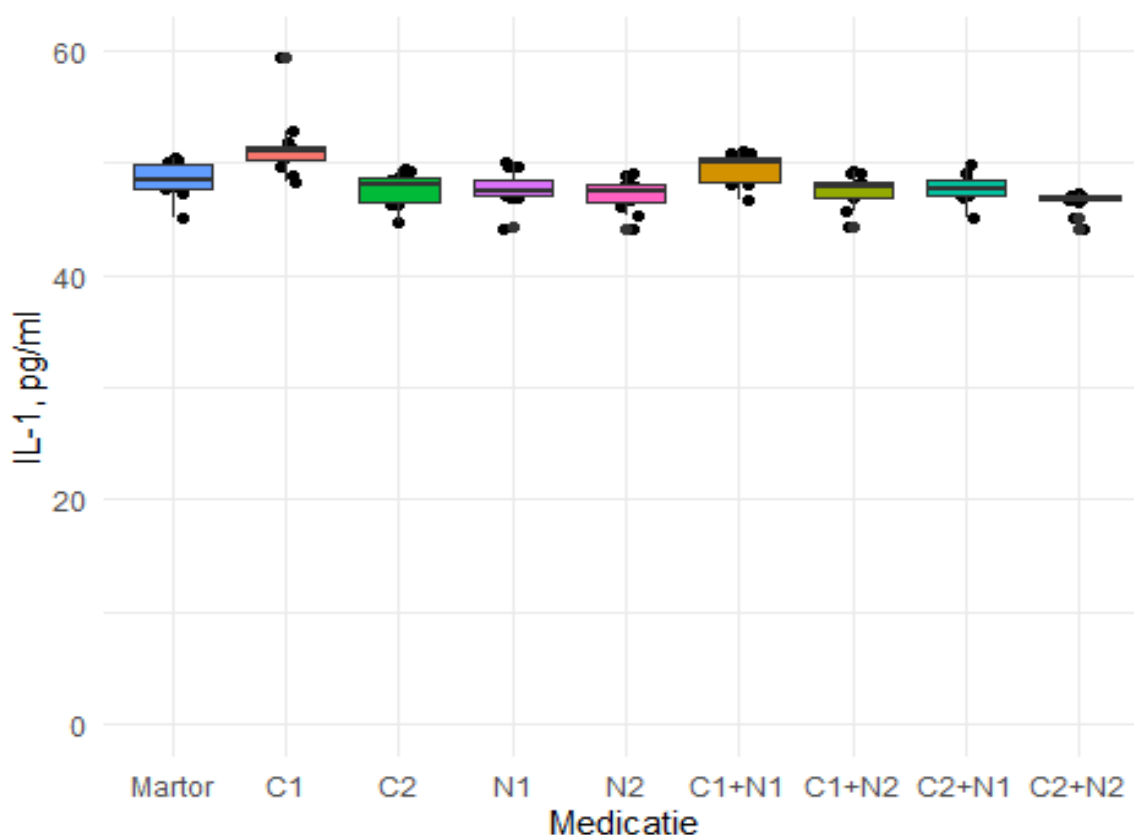


Fig. 6.9. Tendințele distribuției valorilor IL-1, pg/ml în loturile cercetate

Notă: IL-1- interleukine de tip 1; N1 – extract de *S. platensis* (ES); N2 – extract carotenoid cu conținut de mixoxantofilă; C1 – compusul chimic $C_{19}H_{21}BrCuN_4S$; C2 – compusul chimic $C_{17}H_{19}CuN_5O_3S$; C1+N1 compusul chimic $C_{19}H_{21}BrCuN_4S$ + extract de *S. platensis*, C2+N2 compusul chimic+extract carotenoid cu conținut de mixoxantofilă

Analiza măsurărilor efectuate pentru factorul de necroză tumorală (TNF- α , pg/ml) a arătat valoarea maximală în lotul C1 (Mediana = 102, IQR = 6,08), valoarea minimă în lotul N2 (Mediana = 78,6, IQR = 2,28). Valorile absolute ale TNF- α , pg/ml din lotul Martor (Mediana = 99,1, IQR = 6,28) au fost reduse comparativ cu valoarea TNF- α , pg/ml din lotul C1 și în creștere față de lotul C2 (Mediana = 97,1, IQR = 5,70), lotul N1 (Mediana = 79,2, IQR = 4,33), lotul N2 (Mediana = 78,6, IQR = 2,28), lotul C1+N1 (Mediana = 97,6, IQR = 8,58), lotul C1+N2 (Mediana = 81,3, IQR = 2,35), lotul C2+N1 (Mediana = 80,2, IQR = 4,5), lotul C2+N2 (Mediana = 81,6, IQR = 1,43) (Tabelul 6,13, Figura 6.10).

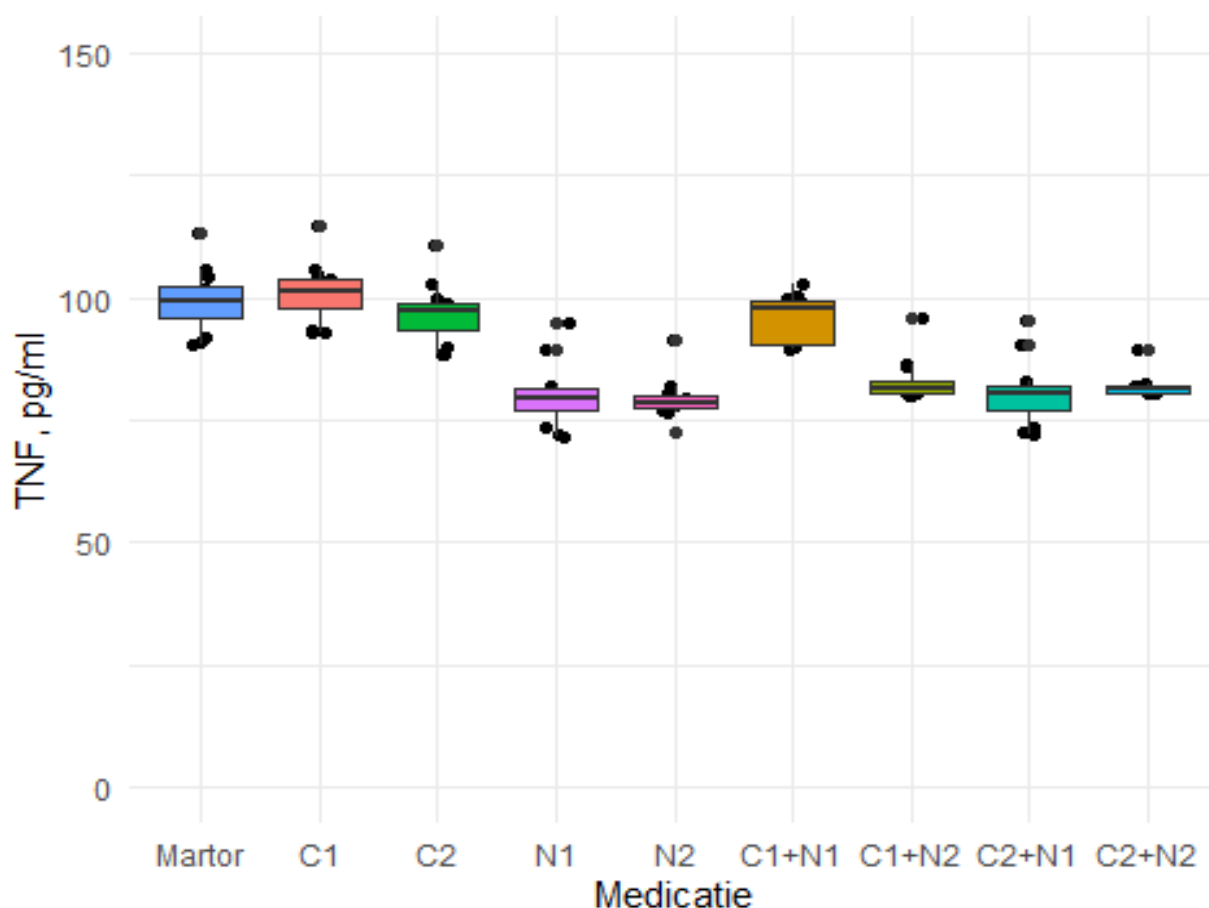


Fig. 6.10. Tendințele distribuției valorilor TNF- α , pg/ml în loturile cercetate

Notă: TNF- α -factorul de necroză tumorală; N1 – extract de *S. platensis* (ES); N2 – extract carotenoid cu conținut de mixoxantofilă; C1 – compusul chimic $C_{19}H_{21}BrCuN_4S$; C2 – compusul chimic $C_{17}H_{19}CuN_5O_3S$; C1+N1 compusul chimic $C_{19}H_{21}BrCuN_4S$ + extract de *S. platensis*, C2+N2 compus chimic+extract carotenoid cu conținut de mixoxantofilă

Analiza măsurărilor efectuate pentru interleukinele de tip 6, (IL-6, pg/ml) a arătat valoarea maximală în lotul C1 (Mediana = 150, IQR = 3,70), valoarea minimă în lotul N2 (Mediana = 106, IQR = 3,80). Valorile absolute ale IL-6, pg/ml din lotul Martor (Mediana = 132, IQR = 5,85) au fost reduse după indicatorul studiat față de lotul C1 (valoarea maximală), fiind în creștere comparativ cu lotul C2 (Mediana = 130, IQR = 4,95), lotul N1 (Mediana = 111, IQR = 5,28), lotul N2 (Mediana = 106, IQR = 3,80), lotul C1+N1 (Mediana = 133, IQR = 6,48), lotul C1+N2 (Mediana = 121, IQR = 3,28), lotul C2+N1 (Mediana = 112, IQR = 3,28), lotul C2+N2 (Mediana = 108, IQR = 4,30) (Tabelul 6.13, Figura 6.11).

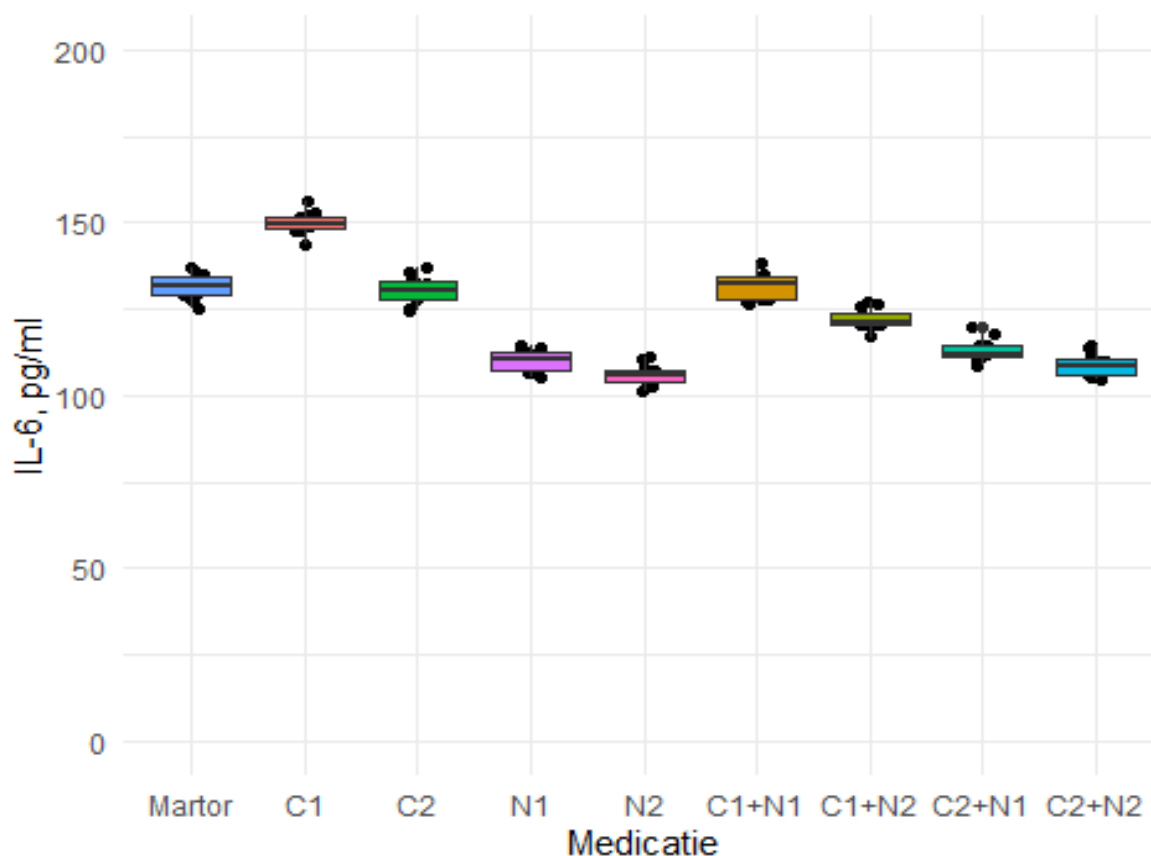


Fig. 6.11. Tendințele distribuirii valorilor IL-6, pg/ml în loturile cercetate

Notă: IL-6-interleukine de tip 6, glutation reductaza; N1 – extract de *S. platensis* (ES); N2 – extract carotenoid cu conținut de mixoxantofilă; C1 – compusul chimic $C_{19}H_{21}BrCuN_4S$; C2 – compusul chimic $C_{17}H_{19}CuN_5O_3S$; C1+N1 compusul chimic $C_{19}H_{21}BrCuN_4S$ + extract de *S. platensis*, C2+N2 compus chimic + extract carotenoid cu conținut de mixoxantofilă

Analiza măsurărilor efectuate pentru interleukinele de tip 10 (IL-10, pg/ml) a arătat valoarea maximală în lotul N2 (Mediana = 106, IQR = 5,13), valoarea minimă în lotul C1 (Mediana = 58,4, IQR = 2,73) și lotul Martor (Mediana = 58,9, IQR = 2,45). Valorile absolute ale IL-10, pg/ml din lotul Martor au fost reduse, în afară de lotul N2, comparativ cu valorile din lotul C2 (Mediana = 60,5, IQR = 1,58), lotul N1 (Mediana = 89,0, IQR = 2,043), lotul C1+N1 (Mediana = 69,8, IQR = 2,03), lotul C1+N2 (Mediana = 83,8, IQR = 0,750), lotul C2+N1 (Mediana = 74,9, IQR = 0,600) și lotul C2+N2 (Mediana = 102, IQR = 3,10) (Tabelul 6.13, Figura 6.12).

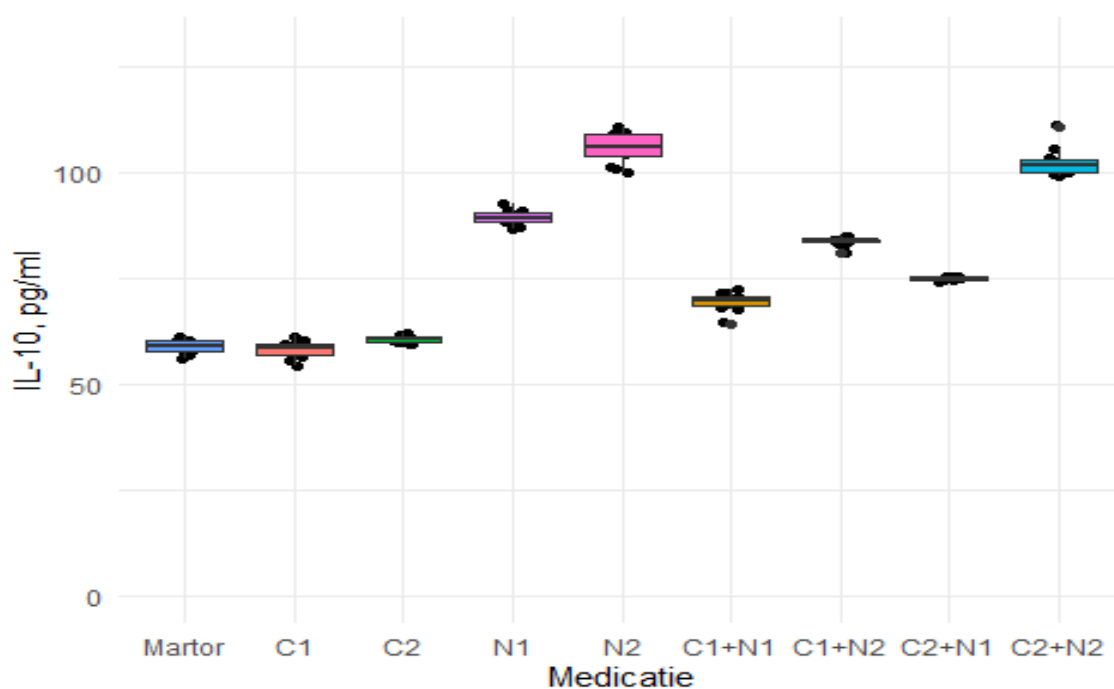


Fig. 6.12. Tendințele distribuirii valorilor IL-10, pg/ml în loturile cercetate

Notă: IL-6-interleukine de tip 10; glutation reductaza; N1 – extract de *S. platensis* (ES); N2 – extract carotenoid cu mixoxantofila (MX); C1 – compusul chimic $C_{19}H_{21}BrCuN_4S$; C2 – compusul chimic $C_{17}H_{19}CuN_5O_3S$; C1+N1 compusul chimic $C_{19}H_{21}BrCuN_4S$ + extract de *S. platensis*, C2+N2 compus chimic+ extract carotenoid cu conținut de mixoxantofilă

6.3. Analiza comparativă a parametrilor din loturile cercetate

Analiza descriptivă din subcapitolul anterior permite formularea unui șir de ipoteze științifice privind efectele compușilor studiați asupra indicatorilor fiziologici măsurați. După cum a fost argumentat în Capitolul 2, pentru a efectua evaluarea comparativă a loturilor cercetate este recomandată folosirea testului Friedman, analiza post-hoc fiind efectuată cu utilizarea corecției Benjamini Hochberg.

Evaluarea comparativă a datelor pentru DAM, $\mu M/L$ din loturile cercetate a prezentat semnificație statistică (Friedman chi-square = 92,703, df = 8, p-value = 2.2e-16), ceea ce permite de a considera ipoteza alternativă (cel puțin două loturi din cele studiate diferă după valoarea DAM, $\mu M/L$). Mărimea efectului medicației a fost estimată ca una crescută (Kendall W = 0,966). Analiza post-hoc a evidențiat diferențe statistic semnificative între lotul Martor și toate loturile cercetate, datele fiind prezentate în Tabelul 6.1. Evaluarea comparativă a datelor pentru PPOA, $\mu M/L$ din loturile cercetate a prezentat semnificație statistică (Friedman chi-square = 71,057, df = 8, p-value = 3,027e-12), ceea ce permite de a considera ipoteza alternativă (cel puțin două loturi din cele studiate diferă după PPOA, $\mu M/L$).

Tabelul 6.1. Analiza post-hoc. Valorile p ajustate prin metoda Benjamini Hochberg pentru evaluarea comparativă a valorilor DAM, $\mu\text{M/L}$ între loturile cercetate

Loturile	C1	C1+N1	C1+N2	C2	C2+N1	C2+N2	Martor	N1
C1+N1	0,0031	-	-	-	-	-	-	-
C1+N2	0,0031	0,0031	-	-	-	-	-	-
C2	0,0031	0,0039	0,0031	-	-	-	-	-
C2+N1	0,0031	0,0031	0,0198	0,0031	-	-	-	-
C2+N2	0,0031	0,0031	0,0031	0,0031	0,0031	-	-	-
Martor	0,0031	0,0064	0,0031	0,0054	0,0031	0,0031	-	-
N1	0,0031	0,0031	0,1260	0,0031	0,0417	0,0031	0,0031	-
N2	0,0031	0,0031	0,0031	0,0031	0,0031	0,0342	0,0031	0,0031

Notă: N1 – extract de *S. platensis* (ES); N2 – extract carotenoid cu conținut de mixoxantofilă; C1 – compusul chimic $\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{BrCuN}_4\text{S}$; C2 – compusul chimic $\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{CuN}_5\text{O}_3\text{S}$; C1+N1 compusul chimic $\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{BrCuN}_4\text{S}$ + extract de *S. platensis*, C2+N2 compus chimic+extract carotenoidic cu conținut de mixoxantofilă

Mărimea efectului medicației a fost estimat ca una crescută (Kendall $W = 0,740$). Analiza post-hoc a evidențiat diferențe statistic semnificative între lotul Martor și o parte din loturile cercetate, în afară de lotul C1+N2 ($p = 0,0615$) și lotul N2 ($p = 0,0615$), datele fiind prezentate în Tabelul 6.2.

Tabelul 6.2. Analiza post-hoc. Valorile p ajustate prin metoda Benjamini Hochberg pentru evaluarea comparativă a valorilor PPOA, $\mu\text{M/L}$ între loturile cercetate

Loturile	C1	C1+N1	C1+N2	C2	C2+N1	C2+N2	Martor	N1
C1+N1	0,0018	-	-	-	-	-	-	-
C1+N2	0,0018	0,1022	-	-	-	-	-	-
C2	0,0057	0,0018	0,0615	-	-	-	-	-
C2+N1	0,0018	0,4363	0,0681	0,0057	-	-	-	-
C2+N2	0,0057	0,1278	0,7030	0,0057	0,0586	-	-	-
Martor	0,0018	0,0057	0,0615	0,0018	0,0018	0,0069	-	-
N1	0,0018	0,6456	0,0996	0,0018	0,5809	0,0681	0,0057	-
N2	0,0018	0,1579	0,0774	0,0615	0,0774	0,9063	0,0615	0,0853

Notă: N1 – extract de *S. platensis* (ES); N2 – extract carotenoid cu conținut de mixoxantofilă; C1 – compusul chimic $\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{BrCuN}_4\text{S}$; C2 – compusul chimic $\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{CuN}_5\text{O}_3\text{S}$; C1+N1 compusul chimic $\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{BrCuN}_4\text{S}$ + extract de *S. platensis*, C2+N2 compus chimic + extract carotenoid cu conținut de mixoxantofilă

Evaluarea comparativă a datelor pentru SOD, u/c din loturile cercetate a prezentat semnificație statistică (Friedman chi-square = 93,511, df = 8, p-value = 2.2e-16), ceea ce permite de a considera ipoteza alternativă (cel puțin două loturi din cele studiate diferă după SOD, u/c).

Tabelul 6.3. Analiza post-hoc. Valorile p ajustate prin metoda Benjamini Hochberg pentru evaluarea comparativă a valorilor SOD, u/c între loturile cercetate

Loturile	C1	C1+N1	C1+N2	C2	C2+N1	C2+N2	Martor	N1
C1+N1	0,00063	-	-	-	-	-	-	-
C1+N2	0,00275	0,00275	-	-	-	-	-	-
C2	0,39124	0,00063	0,00063	-	-	-	-	-
C2+N1	0,00063	0,02420	0,00063	0,00063	-	-	-	-
C2+N2	0,00063	0,00063	0,48001	0,00063	0,00063	-	-	-
Martor	0,00121	0,00063	0,00063	0,00063	0,00063	0,00063	-	-
N1	0,00063	0,00275	0,00063	0,00063	0,00063	0,00063	0,00063	-
N2	0,00063	0,00063	0,00063	0,00063	0,00063	0,00063	0,00275	0,00063

Notă: N1 – extract de *S. platensis* (ES); N2 – extract carotenoidic cu conținut de mixoxantofilă; C1 – compusul chimic C₁₉H₂₁BrCuN₄S; C2 – compusul chimic C₁₇H₁₉CuN₅O₃S; C1+N1 compusul chimic C₁₉H₂₁BrCuN₄S + extract de *S. platensis*, C2+N2 compus chimic + extract carotenoid cu conținut de mixoxantofilă

Mărimea efectului medicației a fost estimată ca una crescută (Kendall W = 0,974). Mărimea efectului medicației a fost estimată ca una crescută (Kendall W = 0,974). Analiza post-hoc a evidențiat diferențe statistic semnificative între lotul Martor și toate loturile cercetate fără excepții, datele fiind prezentate pe Tabelul 6.3.

Evaluarea comparativă a datelor pentru catalază, μM/L din loturile cercetate a prezentat semnificație statistică (Friedman chi-square = 95,338, df = 8, p-value = 2.2e-16), ceea ce permite de a considera ipoteza alternativă (cel puțin două loturi din cele studiate diferă după Catalaza, μM/L). Mărimea efectului medicației a fost estimată ca una crescută (Kendall W = 0,993).

Analiza post-hoc a evidențiat diferențe statistic semnificative între lotul Martor și toate loturile cercetate, fără excepții, datele fiind prezentate pe Tabelul 6.4.

Evaluarea comparativă a datelor pentru AAT cu ABTS, μM/L din loturile cercetate a arătat semnificație statistică (Friedman chi-square = 90,16, df = 8, p-value = 4,315e-16), ceea ce permite de a considera ipoteza alternativă (cel puțin două loturi din cele studiate diferă după AAT cu ABTS, μM/L).

Tabelul 6.4. Analiza post-hoc. Valorile p ajustate prin metoda Benjamini Hochberg pentru evaluarea comparativă a valorilor catalazei, $\mu\text{M/L}$ între loturile cercetate

Loturile	C1	C1+N1	C1+N2	C2	C2+N1	C2+N2	Martor	N1
C1+N1	0,0010	-	-	-	-	-	-	-
C1+N2	0,0027	0,0010	-	-	-	-	-	-
C2	0,0010	0,0027	0,0010	-	-	-	-	-
C2+N1	0,0010	0,0027	0,0027	0,0010	-	-	-	-
C2+N2	0,0010	0,0027	0,0027	0,0027	0,0010	-	-	-
Martor	0,0027	0,0010	0,0027	0,0041	0,0010	0,0010	-	-
N1	0,0027	0,0027	0,0010	0,0010	0,0279	0,0061	0,0010	-
N2	0,0010	0,0027	0,0027	0,0010	0,0027	0,0027	0,0027	0,0010

Notă: N1 – extract de *S. platensis* (ES); N2 – extract carotenoid cu conținut de mixoxantofilă; C1 – compusul chimic $\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{BrCuN}_4\text{S}$; C2 – compusul chimic $\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{CuN}_5\text{O}_3\text{S}$; C1+N1 compusul chimic $\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{BrCuN}_4\text{S}$ + extract de *S. platensis*, C2+N2 compus chimic + extract carotenoid cu conținut de mixoxantofilă

Mărimea efectului medicației a fost estimată ca una crescută (Kendall $W = 0,939$). Analiza post-hoc a evidențiat diferențe statistic semnificative între lotul Martor și toate loturile cercetate, cu excepția lotului C2+N1 ($p = 0,05948$), datele fiind prezentate pe Tabelul 6.5.

Tabelul 6.5. Analiza post hoc. Valorile p ajustate prin metoda Benjamini Hochberg pentru evaluarea comparativă a valorilor AAT cu ABTS, $\mu\text{M/L}$ între loturile cercetate

Loturile	C1	C1+N1	C1+N2	C2	C2+N1	C2+N2	Martor	N1
C1+N1	0,00093	-	-	-	-	-	-	-
C1+N2	0,03845	0,00093	-	-	-	-	-	-
C2	0,00176	0,00093	0,01938	-	-	-	-	-
C2+N1	0,00093	0,11954	0,00336	0,00093	-	-	-	-
C2+N2	0,00093	0,00093	0,00093	0,11954	0,00093	-	-	-
Martor	0,00093	0,01293	0,00093	0,00093	0,05948	0,00336	-	-
N1	0,00093	0,00336	0,00093	0,00336	0,00517	0,00093	0,00093	-
N2	0,00439	0,00336	0,00336	0,06773	0,00336	0,00093	0,00093	0,00093

Notă: N1 – extract de *S. platensis* (ES); N2 – extract carotenoid cu conținut de mixoxantofilă; C1 – compusul chimic $\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{BrCuN}_4\text{S}$; C2 – compusul chimic $\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{CuN}_5\text{O}_3\text{S}$; C1+N1 compusul chimic $\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{BrCuN}_4\text{S}$ + extract de *S. platensis*, C2+N2 compus chimic + extract carotenoid cu conținut de mixoxantofilă

Evaluarea comparativă a datelor pentru G-S-T, nM/s.L din loturile cercetate a arătat semnificație statistică (Friedman chi-square = 79,474, df = 8, p-value = 6.237e-14) ceea ce permite de a considera ipoteza alternativă (cel puțin două loturi din cele studiate diferă după G-S-T, nM/s.L). De asemenea, mărimea efectului medicației a fost estimată ca una crescută (Kendall W = 0,828). Analiza post hoc a evidențiat diferențe statistic semnificative între lotul Martor și toate loturile cercetate, cu excepția lotului C1+N1 (p = 0,0922) și lotului C2+N1 (p = 0,8501), datele sunt prezentate pe Tabelul 6.6.

Tabelul 6.6. Analiza post-hoc. Valorile p ajustate prin metoda Benjamini Hochberg pentru evaluarea comparativă a valorilor G-S-T, nM/s.L între loturile cercetate

Loturile	C1	C1+N1	C1+N2	C2	C2+N1	C2+N2	Martor	N1
C1+N1	0,6749	-	-	-	-	-	-	-
C1+N2	0,0045	0,0045	-	-	-	-	-	-
C2	0,0045	0,0065	0,0045	-	-	-	-	-
C2+N1	0,3943	0,4225	0,0063	0,0215	-	-	-	-
C2+N2	0,0045	0,0045	0,6086	0,0045	0,0063	-	-	-
Martor	0,0236	0,0922	0,0045	0,0045	0,8501	0,0045	-	-
N1	0,0207	0,0045	0,0045	0,0045	0,0465	0,0109	0,0045	-
N2	0,0045	0,0045	0,0086	0,0045	0,0045	0,3941	0,0045	0,0045

Notă: N1 – extract de *S. platensis* (ES); N2 – extract carotenoid cu conținut de mixoxantofilă; C1 – compusul chimic C₁₉H₂₁BrCuN₄S; C2 – compusul chimic C₁₇H₁₉CuN₅O₃S; C1+N1 compusul chimic C₁₉H₂₁BrCuN₄S + extract de *S. platensis*, C2+N2 compus chimic + extract carotenoidic conținut de mixoxantofilă

Evaluarea comparativă a datelor pentru GPO, nM/s.L din loturile cercetate a arătat semnificație statistică (Friedman chi-square = 88,812, df = 8, p-value = 8,102e-16) ceea ce permite de a considera ipoteza alternativă (cel puțin două loturi din cele studiate diferă după GPO, nM/s.L). De asemenea mărimea efectului medicației a fost estimată ca una crescută (Kendall W = 0.925). Analiza post hoc a evidențiat diferențe statistic semnificative între lotul Martor și o parte din loturile cercetate, cu excepția lotului C2 (p = 0,09599), datele analizei prezentate pe Tabelul 6.7.

Evaluarea comparativă a datelor pentru GR, nM/s.L din loturile cercetate a arătat semnificație statistică (Friedman chi-square = 94,667, df = 8, p-value = 2.2e-16) ceea ce permite de a considera ipoteza alternativă (cel puțin 2 loturi din cele studiate diferă după GR, nM/s.L).

Tabelul 6.7. Analiza post-hoc. Valorile p ajustate prin metoda Benjamini Hochberg pentru evaluarea comparativă a valorilor GPO, nM/s.L între loturile cercetate

Loturile	C1	C1+N1	C1+N2	C2	C2+N1	C2+N2	Martor	N1
C1+N1	0,00076	-	-	-	-	-	-	-
C1+N2	0,00076	0,00076	-	-	-	-	-	-
C2	0,00424	0,00076	0,00076	-	-	-	-	-
C2+N1	0,00076	0,00076	0,21523	0,00076	-	-	-	-
C2+N2	0,00076	0,00076	0,10067	0,00076	0,17963	-	-	-
Martor	0,00814	0,00076	0,00076	0,09599	0,00076	0,00324	-	-
N1	0,00076	0,00324	0,79102	0,00076	0,00076	0,10067	0,00324	-
N2	0,00076	0,00076	0,00076	0,00076	0,00076	0,00324	0,00076	0,00324

Notă: N1 – extract de *S. platensis* (ES); N2 – extract carotenoid cu conținut de mixoxantofilă; C1 – compusul chimic C₁₉H₂₁BrCuN₄S; C2 – compusul chimic C₁₇H₁₉CuN₅O₃S; C1+N1 compusul chimic C₁₉H₂₁BrCuN₄S + extract de *S. platensis*, C2+N2 compus chimic + extract carotenoidic conținut de mixoxantofilă

Mărimea efectului medicației a fost estimată ca una crescută (Kendall W = 0,986). Analiza post hoc a evidențiat diferențe statistic semnificative între lotul Martor și toate loturile de cercetare, fără excepții, datele sunt prezentate pe Tabelul 6.8.

Tabelul 6.8. Analiza post-hoc. Valorile p ajustate prin metoda Benjamini Hochberg pentru evaluarea comparativă a valorilor GR, nM/s.L între loturile cercetate

Loturile	C1	C1+N1	C1+N2	C2	C2+N1	C2+N2	Martor	N1
C1+N1	0,00063	-	-	-	-	-	-	-
C1+N2	0,00063	0,00063	-	-	-	-	-	-
C2	0,00063	0,00430	0,00266	-	-	-	-	-
C2+N1	0,00063	0,00063	0,00266	0,00063	-	-	-	-
C2+N2	0,00063	0,00063	0,00063	0,00266	0,00063	-	-	-
Martor	0,00063	0,00182	0,00063	0,00266	0,00063	0,00266	-	-
N1	0,00063	0,00063	0,00063	0,00063	0,03418	0,00063	0,00063	-
N2	0,00063	0,00063	0,00063	0,00063	0,00063	0,00063	0,00063	0,00063

Notă: N1 – extract de *S. platensis* (ES); N2 – extract carotenoid cu conținut de mixoxantofilă; C1 – compusul chimic C₁₉H₂₁BrCuN₄S; C2 – compusul chimic C₁₇H₁₉CuN₅O₃S; C1+N1 compusul chimic C₁₉H₂₁BrCuN₄S + extract de *S. platensis*, C2+N2 compus chimic+ extract carotenoidic conținut de mixoxantofilă

Evaluarea comparativă a datelor pentru IL-1, pg/ml din loturile cercetate a arătat semnificație statistică (Friedman chi-square = 80,717, df = 8, p-value = 3.506e-14) ceea ce permite de a considera ipoteza alternativă (cel puțin două loturi din cele studiate diferă după IL-1, pg/ml). Mărimea efectului medicației a fost estimată ca una crescută (Kendall W = 0,841). Analiza post-hoc a evidențiat diferențe statistic semnificative între lotul Martor și o parte din loturile cercetate, fără excepții, datele sunt prezentate pe Tabelul 6.9.

Tabelul 6.9. Analiza post-hoc. Valorile p ajustate prin metoda Benjamini Hochberg pentru evaluarea comparativă a valorilor IL-1, pg/ml între loturile cercetate

Loturile	C1	C1+N1	C1+N2	C2	C2+N1	C2+N2	Martor	N1
C1+N1	0,0045	-	-	-	-	-	-	-
C1+N2	0,0045	0,0045	-	-	-	-	-	-
C2	0,0045	0,0045	0,3436	-	-	-	-	-
C2+N1	0,0045	0,0045	0,4834	0,9063	-	-	-	-
C2+N2	0,0045	0,0045	0,0045	0,0077	0,0045	-	-	-
Martor	0,0045	0,0058	0,0045	0,0058	0,0058	0,0045	-	-
N1	0,0045	0,0045	0,3300	0,8615	0,8615	0,0058	0,0045	-
N2	0,0045	0,0045	0,0080	0,0381	0,0381	0,0336	0,0045	0,0336

Notă: N1 – extract de *S. platensis* (ES); N2 – extract carotenoid cu conținut de mixoxantofilă; C1 – compusul chimic $C_{19}H_{21}BrCuN_4S$; C2 – compusul chimic $C_{17}H_{19}CuN_5O_3S$; C1+N1 compusul chimic $C_{19}H_{21}BrCuN_4S$ + extract de *S. platensis*, C2+N2 compus chimic + extract carotenoidic conținut de mixoxantofilă

Evaluarea comparativă a datelor pentru TNF- α , pg/ml din loturile cercetate a arătat semnificație statistică (Friedman chi-square = 85,951, df = 8, p-value = 3,077e-15) ceea ce permite de a considera ipoteza alternativă (cel puțin două loturi din cele studiate diferă după TNF- α , pg/ml). De asemenea, mărimea efectului medicației a fost estimată ca una crescută (Kendall W = 0,895). Analiza post-hoc a evidențiat diferențe statistic semnificative între lotul Martor și toate loturile, fără excepții, datele sunt prezentate pe Tabelul 6.10.

Evaluarea comparativă a datelor pentru IL-6, pg/ml din loturile cercetate a arătat semnificație statistică (Friedman chi-square = 90,578, df = 8, p-value = 3.55e-16) ceea ce permite de a considera ipoteza alternativă (cel puțin două loturi din cele studiate diferă după IL-6, pg/ml).

Tabelul 6.10. Analiza post- hoc. Valorile p ajustate prin metoda Benjamini Hochberg pentru evaluarea comparativă a valorilor TNF- α , pg/ml între loturile cercetate

Loturile	C1	C1+N1	C1+N2	C2	C2+N1	C2+N2	Martor	N1
C1+N1	0,0035	-	-	-	-	-	-	-
C1+N2	0,0035	0,0035	-	-	-	-	-	-
C2	0,0035	0,9697	0,0014	-	-	-	-	-
C2+N1	0,0035	0,0014	0,0410	0,0014	-	-	-	-
C2+N2	0,0014	0,0014	0,7544	0,0035	0,5124	-	-	-
Martor	0,0035	0,0035	0,0014	0,0014	0,0014	0,0014	-	-
N1	0,0035	0,0014	0,0384	0,0014	0,0051	0,2269	0,0035	-
N2	0,0035	0,0035	0,0014	0,0014	0,2626	0,0144	0,0035	0,5649

Notă: N1 – extract de *S. platensis* (ES); N2 – extract carotenoid cu conținut de mixoxantofilă; C1 – compusul chimic C₁₉H₂₁BrCuN₄S; C2 – compusul chimic C₁₇H₁₉CuN₅O₃S; C1+N1 compusul chimic C₁₉H₂₁BrCuN₄S + extract de *S. platensis*, C2+N2 compus chimic + extract carotenoidic conținut de mixoxantofilă

Mărimea efectului medicației a fost estimată ca una crescută (Kendall W = 0,944). Analiza post-hoc nu a evidențiat diferențe statistice semnificative între lotul Martor, pe o parte, și lotul C1+N1 (p = 0,6221), pe de altă parte, alte loturi de cercetare fiind statistice semnificative, datele obținute sunt prezentate pe Tabelul 6.11.

Tabelul 6.11. Analiza post-hoc. Valorile p ajustate prin metoda Benjamini Hochberg pentru evaluarea comparativă a valorilor IL-6, pg/ml între loturile cercetate

Loturile	C1	C1+N1	C1+N2	C2	C2+N1	C2+N2	Martor	N1
C1+N1	0,0031	-	-	-	-	-	-	-
C1+N2	0,0008	0,0008	-	-	-	-	-	-
C2	0,0008	0,0751	0,0031	-	-	-	-	-
C2+N1	0,0031	0,0008	0,0015	0,0008	-	-	-	-
C2+N2	0,0008	0,0008	0,0031	0,0008	0,0077	-	-	-
Martor	0,0008	0,6221	0,0008	0,0031	0,0008	0,0008	-	-
N1	0,0008	0,0008	0,0008	0,0008	0,0031	0,1557	0,0008	-
N2	0,0008	0,0008	0,0008	0,0008	0,0039	0,0131	0,0008	0,0077

Notă: N1 – extract de *S. platensis* (ES); N2 – extract carotenoid cu conținut de mixoxantofilă; C1 – compusul chimic C₁₉H₂₁BrCuN₄S; C2 – compusul chimic C₁₇H₁₉CuN₅O₃S; C1+N1 compusul

chimic $C_{19}H_{21}BrCuN_4S$ + extract de *S. platensis*, C2+N2 compus chimic + extract carotenoidic conținut de mixoxantofilă

Evaluarea comparativă a datelor pentru IL-10, pg/ml din loturile cercetate a arătat semnificație statistică (Friedman chi-square = 94,711, df = 8, p-value = 2,2e-16) ceea ce permite de a considera ipoteza alternativă (cel puțin două loturi din cele studiate diferă după IL-10, pg/ml). Mărimea efectului medicației a fost estimată ca una crescută (Kendall W = 0,987). Analiza post-hoc a evidențiat diferențe statistic semnificative între lotul Martor, pe de o parte, și loturile de cercetare, pe de alta parte, în toate loturile, cu excepția lotului C1 (p = 0,05443), datele prezentate pe Tabelul 6.12.

Tabelul 6.12. Analiza post-hoc. Valorile p ajustate prin metoda Benjamini Hochberg pentru evaluarea comparativă a valorilor IL-10, pg/ml între loturile cercetate

Loturile	C1	C1+N1	C1+N2	C2	C2+N1	C2+N2	Martor	N1
C1+N1	0,00073	-	-	-	-	-	-	-
C1+N2	0,00073	0,00073	-	-	-	-	-	-
C2	0,00344	0,00073	0,00275	-	-	-	-	-
C2+N1	0,00073	0,00275	0,00073	0,00073	-	-	-	-
C2+N2	0,00073	0,00073	0,00073	0,00275	0,00073	-	-	-
Martor	0,05443	0,00073	0,00073	0,00275	0,00073	0,00073	-	-
N1	0,00275	0,00275	0,00073	0,00073	0,00275	0,00073	0,00073	-
N2	0,00073	0,00073	0,00275	0,00275	0,00073	0,02120	0,00073	0,00073

Notă: N1 – extract de *S. platensis* (ES); N2 – extract carotenoid cu conținut de mixoxantofilă; C1 – compusul chimic $C_{19}H_{21}BrCuN_4S$; C2 – compusul chimic $C_{17}H_{19}CuN_5O_3S$; C1+N1 compusul chimic $C_{19}H_{21}BrCuN_4S$ + extract de *S. platensis*, C2+N2 compus chimic + extract carotenoidic conținut de mixoxantofilă

Pentru a evalua influența extractului de *S. platensis* (ES), extractului carotenoidic conținut de mixoxantofilă și compușii chimici C1 ($C_{19}H_{21}BrCuN_4S$) și C2 ($C_{17}H_{19}CuN_5O_3S$), precum și combinarea acestora asupra markerilor stresului oxidativ, sistemului antioxidant și pattern-ului inflamator, a fost utilizată analiza heatmap. Aceasta metodă a permis reprezentarea grafică a datelor obținute în care valorile au fost redactate cromatic, astfel facilitând prezentarea simplificată a datelor complexe și, în final, înțelegerea acestora dintr-o sigură privire.

Tabelul 6.13. Heatmap pentru sinteza evaluării comparative a parametrilor cercetați cu lotul martor pentru compuși și combinațiile acestora

Loturile	C1	C1+N1	C1+N2	C2	C2+N1	C2+N2	N1	N2
Martor, DAM, $\mu\text{M/L}$	0,0031	0,0064	0,0031	0,0054	0,0031	0,0031	0,0031	0,0031
Martor, PPOA, $\mu\text{M/L}$	0,0018	0,0057	0,0615	0,0018	0,0018	0,0069	0,0057	0,0615
Martor, SOD, u/c	0,00121	0,00063	0,00063	0,00063	0,00063	0,00063	0,00063	0,00275
Martor, Catalaza, $\mu\text{M/L}$	0,0027	0,0010	0,0027	0,0041	0,0010	0,0010	0,0010	0,0027
Martor, AAT cu ABTS, $\mu\text{M/L}$	0,00093	0,01293	0,00093	0,00093	0,05948	0,00336	0,00093	0,00093
Martor, G-S-T, nM/s.L	0,0236	0,0922	0,0045	0,0045	0,8501	0,0045	0,0045	0,0045
Martor, GPO, nM/s.L	0,00814	0,00076	0,00076	0,09599	0,00076	0,00324	0,00324	0,00076
Martor, GR, nM/s.L	0,00063	0,00182	0,00063	0,00266	0,00063	0,00266	0,00063	0,00063
Martor, IL-1 β , pg/ml	0,0045	0,0058	0,0045	0,0058	0,0058	0,0045	0,0045	0,0045
Martor, TNF- α , pg/ml	0,0035	0,0035	0,0014	0,0014	0,0014	0,0014	0,0035	0,0035
Martor, IL-6, pg/ml	0,0008	0,6221	0,0008	0,0031	0,0008	0,0008	0,0008	0,0008
Martor, IL-10, pg/ml	0,05443	0,00073	0,00073	0,00275	0,00073	0,00073	0,00073	0,00073
	diferența statistic semnificativă, valoarea din lotul martor fiind mai mică							
	diferența statistic semnificativă, valoarea din lotul martor fiind mai mare							
	diferența statistic ne semnificativă							

Notă: N1 – extract de *S. platensis* (ES); N2 – extractul carotenoidic cu conținut de mixoxantofilă; C1 - compusul chimic $\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{BrCuN}_4\text{S}$; C2 - compusul chimic $\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{CuN}_5\text{O}_3\text{S}$; DAM – dialdehida malonică, PPOA – produse proteice de oxidare avansată, SOD – superoxid dismutaza, AAT – activitatea antioxidantă totală, GST – glutation S-transferaza, GPO – glutation peroxidaza, GR – glutation reductaza, IL – interleukina, TNF – factorul de necroză tumorală

6.4. Analiza corelațională în cadrul loturilor cercetate

În cadrul loturilor cercetate a fost utilizat coeficientul de corelație al ordinului (testul p Spearman) pentru a putea observa dacă există sau nu o corelație între parametrii incluși în

cercetare. Astfel, în baza efectuării acestei analize s-a demonstrat că unii parametri au corelat pozitiv, iar între alți parametri nu s-a determinat nici o corelație.

Analiza corelationala în lotul Martor

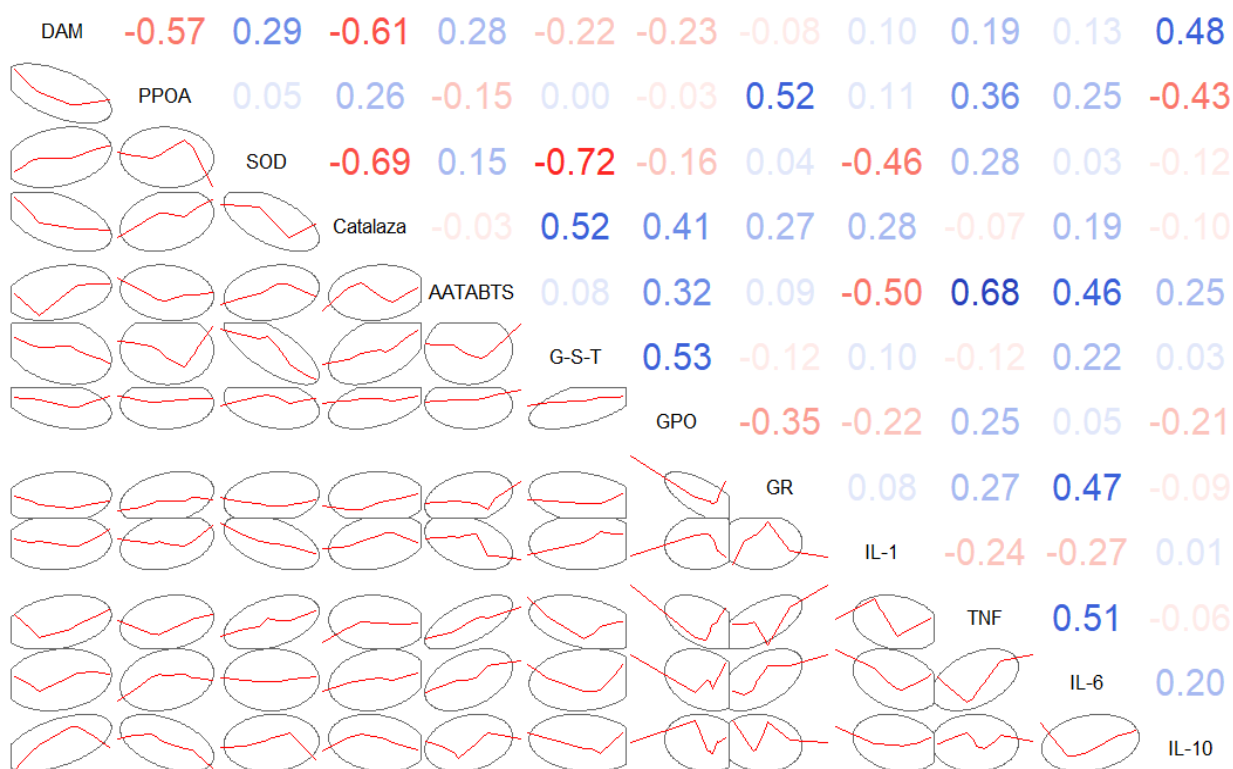


Fig. 6.13. Analiza corelațională în lotul Martor

Notă: DAM-DAM, $\mu\text{M/L}$; PPOA-PPOA, $\mu\text{M/L}$; SOD-SOD, u/c; Catalaza-Catalaza $\mu\text{M/s.L}$; AATABTS-AATcuABTS, $\mu\text{M/L}$; G-S-T-G-S-T, nM/s.; GPO-GPO, nM/s.L; GR-GR, nM/s.L; IL-1-IL-1, pg/ml; TNF-TNF, pg/ml; IL-6-IL-6, pg/ml; IL-10-IL-10, pg/ml.

Analiza corelațională (testul ρ Spearman) în lotul Martor pentru variabilele cercetate a evidențiat următoarele rezultate. Valoarea absolută maximală a coeficientului a fost determinată între SOD și G-S-T (-0,72), ceea ce demonstrează o asociere negativă între acești parametri. Această valoare a fost urmată de asocierea între SOD și valoarea catalazei (-0,69), TNF și AATABTS (0,68), catalaza și DAM (-0,61), DAM și PPOA (-0,57), G-S_T și GPO (0,53), PPOA și GR 0,52), Catalaza și G-S-T (0,52), TNF și IL-6 (0,51), ceilalți coeficienți fiind mai mici de 0,5, totalitatea indicatorilor având și bază logică, în afară de legătură matematică (Figura 6.13).

Analiza corelatională în lotul C1

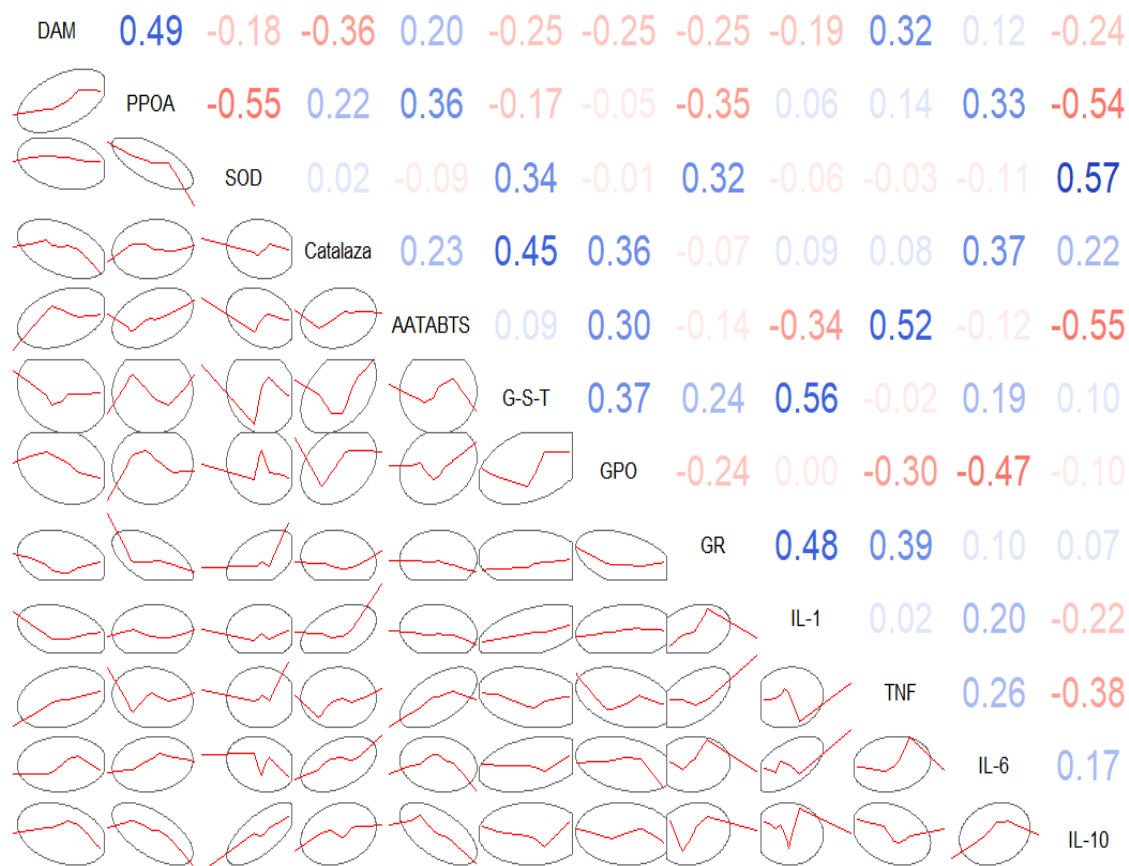


Fig. 6.14. Analiza corelațională în lotul de studiu C1

Notă: DAM-DAM, $\mu\text{M/L}$; PPOA-PPOA, $\mu\text{M/L}$; SOD-SOD, u/c; Catalaza-Catalaza, $\mu\text{M/s.L}$; AATABTS-AATABTS, $\mu\text{M/L}$; G-S-T-G-S-T, nM/s.; GPO-GPO, nM/s.L; GR-GR, nM/s.L; IL-1-IL-1, pg/ml; TNF-TNF, pg/ml; IL-6-IL-6, pg/ml; IL-10-IL-10, pg/ml

Analiza corelațională (testul ρ Spearman) în lotul de studiu C1 pentru variabilele cercetate a evidențiat următoarele rezultate. Valoarea absolută maximală a coeficientului a fost determinată între SOD și IL-10 (0,57), ceea ce demonstrează o asociere pozitivă între acești parametri. Această valoare a fost urmată de asocierea între G-S-T și IL-1 (0,56), SOD și valoarea PPOA (-0,55), AATABTS și valoarea PPOA (-0,55), TNF și AATABTS (0,52), ceilalți coeficienți fiind mai mici de 0,5, totalitatea indicatorilor având și bază logică, în afară de legătură matematică (Figura 6.14).

Analiza corelatională în lotul C2



Fig. 6.15. Analiza corelațională în lotul de studiu C 2

Notă: DAM-DAM, $\mu\text{M/L}$; PPOA-PPOA, $\mu\text{M/L}$; SOD-SOD, u/c ; Catalaza-Catalaza, $\mu\text{M/s.L}$; AATABTS-AATcuABTS, $\mu\text{M/L}$; G-S-T-G-S-T, nM/s. ; GPO-GPO, nM/s.L ; GR-GR, nM/s.L ; IL-1-IL-1, pg/ml ; TNF-TNF, pg/ml ; IL-6-IL-6, pg/ml ; IL-10-IL-10, pg/ml

Analiza corelațională (testul ρ Spearman) în lotul de studiu C2 pentru variabilele cercetate a evidențiat următoarele rezultate. Valoarea absolută maximală a coeficientului a fost determinată între SOD și catalaza (-0,68), ceea ce demonstrează o asociere negativă între acești parametri. Această valoare a fost urmată de asocierea între DAM și PPOA (-0,62), SOD și G-S-T (-0,61), TNF și IL-6 (0,61), GR și IL-6 (0,57), SOD și valoarea DAM (0,56), AATABTS și IL-6 (-0,5), ceilalți coeficienți fiind mai mici de 0,5, totalitatea indicatorilor având și bază logică, în afară de legătură matematică (Figura 6.15).

Analiza corelatională în lotul N1

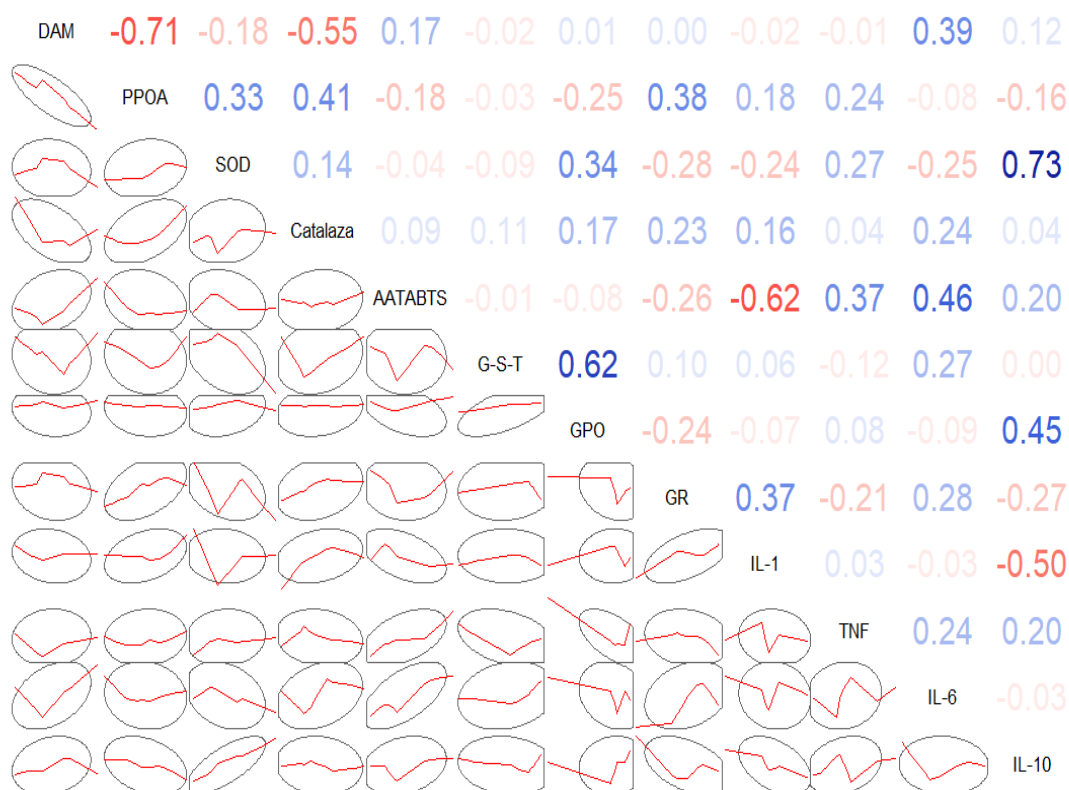


Fig. 6.16. Analiza corelațională în lotul de studiu N1

Notă: DAM-DAM, $\mu\text{M/L}$; PPOA-PPOA, $\mu\text{M/L}$; SOD-SOD, u/c ; Catalaza-Catalaza, $\mu\text{M/s.L}$; AATABTS-AATcuABTS, $\mu\text{M/L}$; G-S-T-G-S-T, nM/s. ; GPO-GPO, nM/s.L ; GR-GR, nM/s.L ; IL-1-IL-1, pg/ml ; TNF-TNF, pg/ml ; IL-6-IL-6, pg/ml ; IL-10-IL-10, pg/ml

Analiza corelațională (testul ρ Spearman) în lotul de studiu N1 pentru variabilele cercetate a evidențiat următoarele rezultate. Valoarea absolută maximală a coeficientului a fost determinată între SOD și IL-10 (0,73), ceea ce demonstrează o asociere pozitivă între acești parametri. Această valoare a fost urmată de asocierea între DAM și PPOA (-0,71), GPO și G-S-T (0,62), AATABTS și IL-6 (-0,62), catalaza și valoarea DAM (-0,55), IL-1 și IL-10 (-0,5), ceilalți coeficienți fiind mai mici de 0,5, totalitatea indicatorilor având și bază logică, în afară de legătură matematică (Figura 6.16).

Analiza corelatională în lotul N2

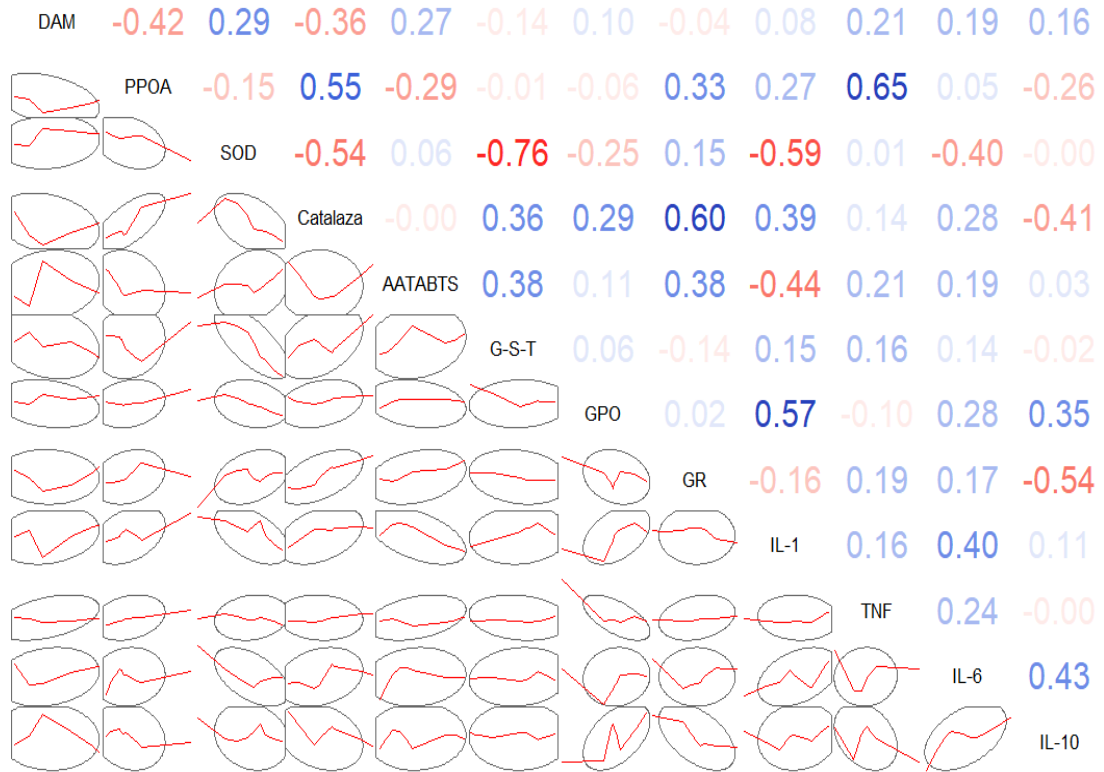


Fig. 6.17. Analiza corelațională în lotul de studiu N2

Notă: DAM-DAM, $\mu\text{M/L}$; PPOA-PPOA, $\mu\text{M/L}$; SOD-SOD, u/c; Catalaza-Catalaza, $\mu\text{M/s.L}$; AATABTS-AATcuABTS, $\mu\text{M/L}$; G-S-T-G-S-T, nM/s.; GPO-GPO, nM/s.L; GR-GR, nM/s.L; IL-1-IL-1, pg/ml; TNF-TNF, pg/ml; IL-6-IL-6, pg/ml; IL-10-IL-10, pg/ml

Analiza corelațională (testul ρ Spearman) în lotul de studiu N2 pentru variabilele cercetate a evidențiat următoarele rezultate. Valoarea absolută maximală a coeficientului a fost determinată între SOD și G-S-T (-0,76), ceea ce demonstrează o asociere negativă între acești parametri. Această valoare a fost urmată de asocierea între TNF și PPOA (0,65), catalaza și GR (0,6), SOD și IL-1 (-0,59), GPO și IL-1 (0,57), valoarea catalazei și PPOA (0,55), valorile SOD și catalaza precum și GR și IL-10 fiind asociate la fel (-0,54), ceilalți coeficienți fiind mai mici de 0,5, totalitatea indicatorilor având și bază logică, în afară de legătură matematică (Figura 6.17).

Analiza corelatională în lotul C1+N1



Fig. 6.18. Analiza corelațională în lotul de studiu C1+N1

Notă: DAM-DAM, $\mu\text{M/L}$; PPOA-PPOA, $\mu\text{M/L}$; SOD-SOD, u/c; Catalaza-Catalaza, $\mu\text{M/s.L}$; AATABTS-AATABTS, $\mu\text{M/L}$; G-S-T-G-S-T, nM/s.; GPO-GPO, nM/s.L; GR-GR, nM/s.L; IL-1-IL-1, pg/ml; TNF-TNF, pg/ml; IL-6-IL-6, pg/ml; IL-10-IL-10, pg/ml

Analiza corelațională (testul ρ Spearman) în lotul de studiu C1+N1 pentru variabilele cercetate a evidențiat următoarele rezultate. Valoarea absolută maximală a coeficientului a fost determinată între DAM/GPO și GPO-GR (-0,59), ceea ce demonstrează o asociere negativă între parametrii în ambele cazuri. Aceste valori au fost urmate de asocierea între TNF și AATABTS (0,58), SOD și IL-10 (0,57), GPO și IL-10 (0,55), GR-PPOA și GR-IL-6 (0,54), GR și PPOA (-0,53), PPOA și IL-1 (0,51), ceilalți coeficienți fiind mai mici de 0,5, totalitatea indicatorilor având și bază logică, în afară de legătură matematică (Figura 6.18).

Analiza corelatională în lotul C1+N2

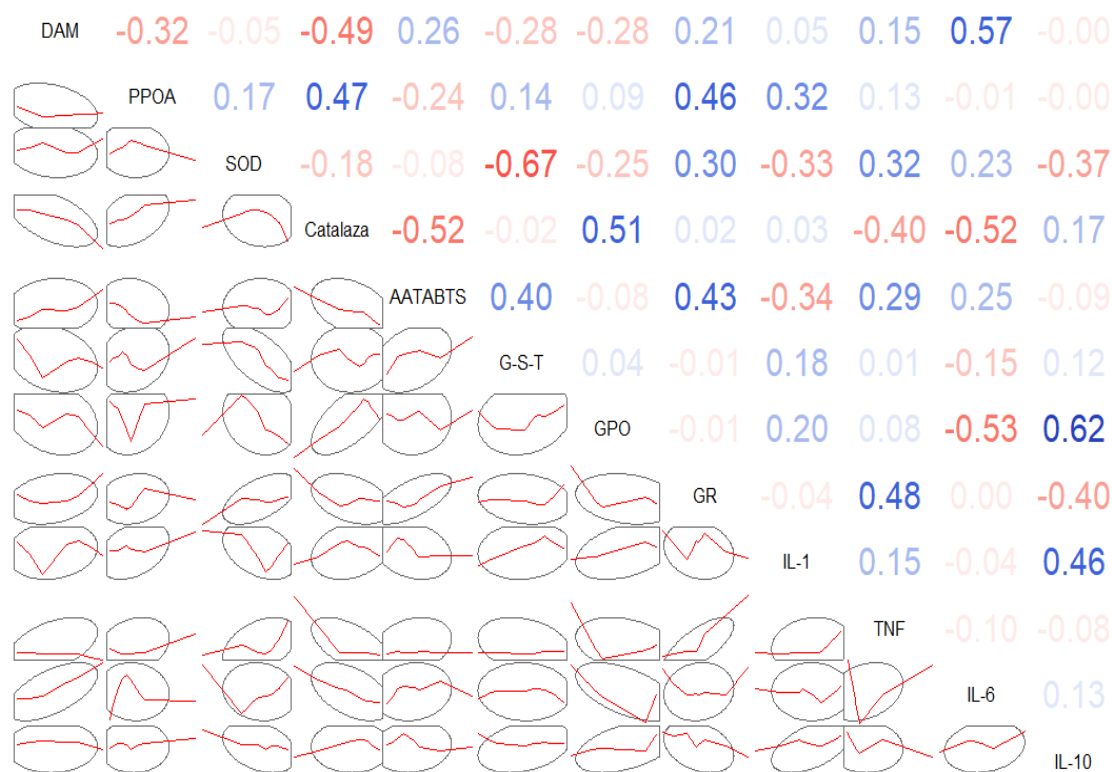


Fig. 6.19. Analiza corelațională în lotul de studiu C1+N2

Notă: DAM-DAM, $\mu\text{M/L}$; PPOA-PPOA, $\mu\text{M/L}$; SOD-SOD, u/c; Catalaza-Catalaza, $\mu\text{M/s.L}$; AATABTS-AATABTS, $\mu\text{M/L}$; G-S-T-G-S-T, nM/s.; GPO-GPO, nM/s.L; GR-GR, nM/s.L; IL-1-IL-1, pg/ml; TNF-TNF, pg/ml; IL-6-IL-6, pg/ml; IL-10-IL-10, pg/ml

Analiza corelațională (testul ρ Spearman) în lotul de studiu C1+N2 pentru variabilele cercetate a evidențiat următoarele rezultate. Valoarea absolută maximală a coeficientului a fost determinată între SOD și G-S-T (-0,67), ceea ce demonstrează o asocieră negativă între parametrii prezentați. Aceste valori au fost urmate de asocieră între GPO și IL-10 (0,62), DAM și IL-6 (0,57), GPO și IL-6 (-0,53), valoarea catalazei cu AATABTS și valoarea catalazei cu IL-6 (-0,52), GPO și catalaza (0,51), ceilalți coeficienți fiind mai mici de 0,5, totalitatea indicatorilor având și bază logică, în afară de legătură matematică (Figura 6.19).

Analiza corelatională în lotul C2+N1

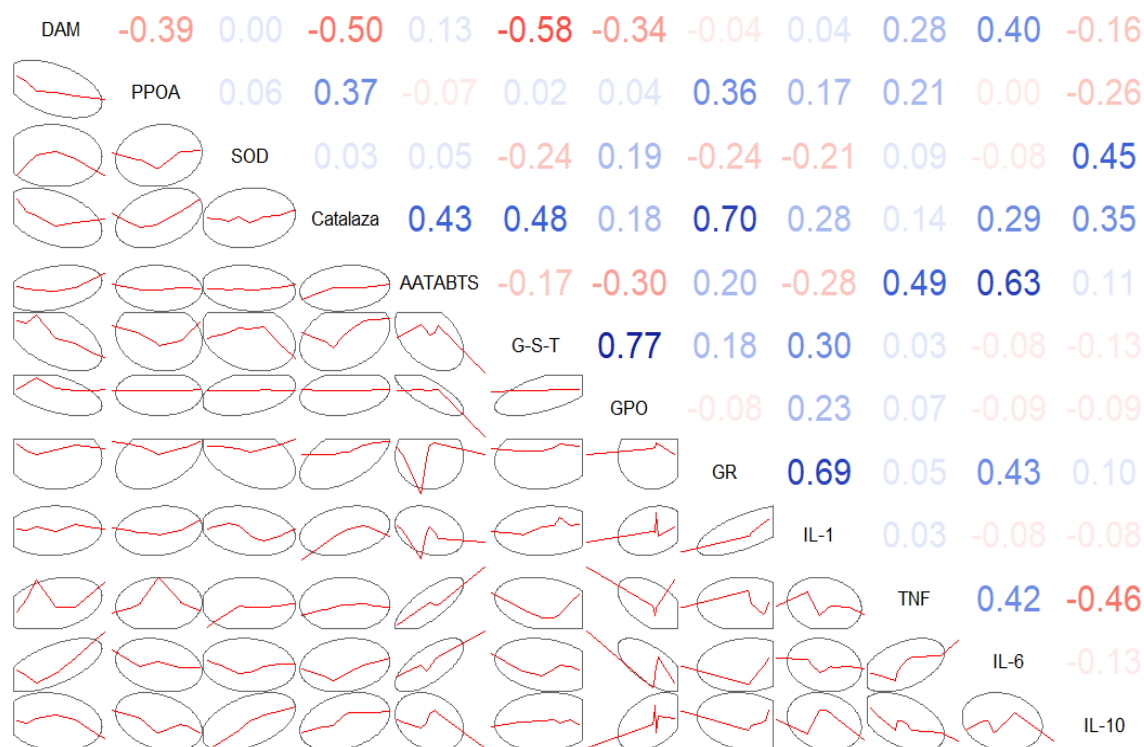


Fig. 6.20. Analiza corelațională în lotul de studiu C2+N1

Notă: DAM-DAM, $\mu\text{M/L}$; PPOA-PPOA, $\mu\text{M/L}$; SOD-SOD, u/c; Catalaza-Catalaza $\mu\text{M/s.L}$; AATABTS-AATABTS, $\mu\text{M/L}$; G-S-T-G-S-T, nM/s.; GPO-GPO, nM/s.L; GR-GR, nM/s.L; IL-1-IL-1, pg/ml; TNF-TNF, pg/ml; IL-6-IL-6, pg/ml; IL-10-IL-10, pg/ml

Analiza corelațională (testul ρ Spearman) în lotul de studiu C2+N1 pentru variabilele cercetate a evidențiat următoarele rezultate. Valoarea absolută maximală a coeficientului a fost determinată între GPO și G-S-T (0,77), ceea ce demonstrează o asociere pozitivă între parametrii prezentați. Aceste valori au fost urmate de asocierea între catalază și GR (0,70), GR și IL-1 (0,69), IL-6 și AATABTS (0,63), DAM și GST (-0,58), DAM și valoarea catalazei (-0,5), ceilalți coeficienți fiind mai mici de 0,5, totalitatea indicatorilor având și bază logică, în afară de legătură matematică (Figura 6.20).

Analiza corelatională în lotul C2+N2

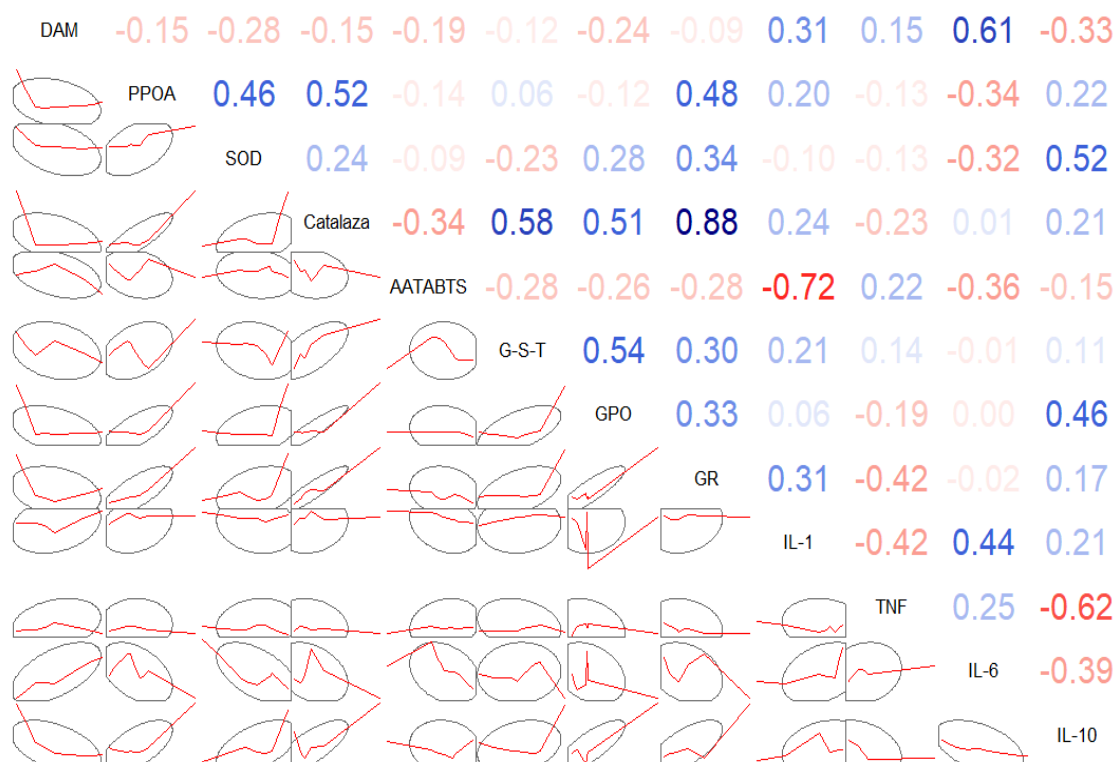


Fig. 6.21. Analiza corelațională în lotul de studiu C2+N2

Notă: DAM-DAM, $\mu\text{M/L}$; PPOA-PPOA, $\mu\text{M/L}$; SOD-SOD, u/c; Catalaza-Catalaza, $\mu\text{M/s.L}$; AATABTS-AATABTS, $\mu\text{M/L}$; G-S-T-G-S-T, nM/s.; GPO-GPO, nM/s.L; GR-GR, nM/s.L; IL-1-IL-1, pg/ml; TNF-TNF, pg/ml; IL-6-IL-6, pg/ml; IL-10-IL-10, pg/ml

Analiza corelațională (testul ρ Spearman) în lotul de studiu C2+N2 pentru variabilele cercetate a evidențiat următoarele rezultate. Valoarea absolută maximală a coeficientului a fost determinată între catalaza și GR (0,88), ceea ce demonstrează o asociere pozitivă între parametrii prezentați. Aceste valori au fost urmate de asocierea între IL-1 și AATABTS (-0,72), TNF și IL-10 (-0,62), DAM și IL-6 (0,61), catalaza și G-S-T (0,58), G-S-T și GPO (0,54), PPOA și catalaza precum și SOD și IL-10 având asociație pozitivă (0,52 în ambele cazuri), catalaza și GPO (0,51), ceilalți coeficienți fiind mai mici de 0,5, totalitatea indicatorilor având și bază logică, în afară de legătură matematică (Figura 6.21).

6.5. Concluzii la capitolul 6

Evaluarea rezultatelor obținute prin studiul comparativ al loturilor și efectuarea testelor post-hoc au permis formularea concluziilor ce țin de efectele asupra parametrilor fiziologici *in vitro* ai compușilor cercetați după cum urmează:

1. Compusul bromo{N-ciclohexil-N'-[fenil(piridin-2-il)metiliden]carbamohiprazono-tioat} cupru (C1) prezintă efecte negative prin creșterea DAM, $\mu\text{M/L}$ ($p = 0,0031$), PPOA, $\mu\text{M/L}$ ($p = 0,0018$), reducerea potențialului antioxidant (SOD, u/c ($0,00121$), catalazei, $\mu\text{M/L}$ ($p = 0,0027$), G-S-T, nM/s.L ($p = 0,0236$), GPO, nM/s.L ($p = 0,00814$), GR, nM/s.L ($p = 0,00063$)), creșterea răspunsului proinflamator (IL-1 β , pg/ml ($p = 0,0045$), TNF- α , pg/ml ($p = 0,0035$), IL-6, pg/ml ($p = 0,008$)).
2. Compusul nitrato{N-tert-butil-N'-[fenil(piridin-2-il)metiliden]carbamohiprazono-tioat} cupru (C2) prezintă efecte negative prin creșterea DAM, $\mu\text{M/L}$ ($p = 0,0054$), PPOA, $\mu\text{M/L}$ ($p = 0,0018$) și, totodată, efecte pozitive prin creșterea potențialului antioxidant (catalaza, $\mu\text{M/L}$ ($p = 0,0041$), AAT cu ABTS, $\mu\text{M/L}$ ($p = 0,00093$), GR, nM/s.L ($p = 0,00266$)), reducerea potențialului antiinflamator (IL-1 β , pg/ml ($p = 0,0058$), TNF- α , pg/ml ($p = 0,0014$), IL-6, pg/ml ($p = 0,0031$)) și creșterea potențialului antiinflamator (IL-10, pg/ml ($p = 0,00275$)).
3. Extractul de *S. platensis* (N1) prezintă, incontestabil, efecte pozitive prin reducerea DAM, $\mu\text{M/L}$ ($p = 0,0031$), PPOA, $\mu\text{M/L}$ ($p = 0,0057$), creșterea potențialului antioxidant (SOD, u/c ($p = 0,00063$), catalazei, $\mu\text{M/L}$ ($p = 0,0010$), AAT cu ABTS, $\mu\text{M/L}$ ($p = 0,00093$), G-S-T, nM/s.L ($p = 0,0045$), GPO, nM/s.L ($p = 0,00324$), GR, nM/s.L ($p = 0,00063$)), reducerea potențialului antiinflamator (IL-1 β , pg/ml ($p = 0,0045$), TNF- α , pg/ml ($p = 0,0035$), IL-6, pg/ml ($p = 0,0008$)) și creșterea potențialului antiinflamator (IL-10, pg/ml ($p = 0,00073$)).
4. Extractul carotenoid cu conținut de mixoxantofilă (N2) a demonstrat efecte similare cu extractul de *S. platensis* (N1), cu excepția modificărilor ne semnificative pentru PPOA, $\mu\text{M/L}$ ($p = 0,0615$), având efecte pozitive prin reducerea DAM, $\mu\text{M/L}$ ($p = 0,0031$), creșterea potențialului antioxidant (SOD, u/c ($p = 0,00275$), catalazei, $\mu\text{M/L}$ ($p = 0,0027$), AAT cu ABTS, $\mu\text{M/L}$ ($p = 0,00093$), G-S-T, nM/s.L ($p = 0,0045$), GPO, nM/s.L ($p = 0,00076$), GR, nM/s.L ($p = 0,00063$)), reducerea potențialului antiinflamator (IL-1 β , pg/ml ($p = 0,0045$), TNF- α , pg/ml ($p = 0,0035$), IL-6, pg/ml ($p = 0,0008$)) și creșterea potențialului antiinflamator (IL-10, pg/ml ($p = 0,00073$)).
5. Efectele pozitive ale combinațiilor, mai ales asupra sistemului antiinflamator și a sistemului DAM – PPOA, sunt determinate de extractul de *S. platensis* (N1) și de extractul carotenoid cu conținut de mixoxantofilă, caracteristici optime înregistrând combinația nitrato{N-tert-butil-N'-[fenil(piridin-2-il)metiliden]carbamohiprazono-tioat} cupru (C2) + extractul carotenoidic cu conținut de mixoxantofilă. Pe de alta parte, efectul așteptat de potențare nu a fost constatat.

Acest fapt poate fi evidențiat prin analiza evoluției indicatorilor studiați în lotul cu extract carotenoid cu conținut de mixoxantofilă (N2) și în lotul cu compusul bromo{N-ciclohexil-N'-[fenil(piridin-2-il)metiliden]carbamoimidrazono-tioat}cupru (C1) + extract carotenoid cu conținut de mixoxantofilă (N2) (complet din punct de vedere al efectelor așteptate).

6. Reieșind din rezultatele cercetării din cadrul acestui studiu, extractul de *S. platensis* (N1) și extractul carotenoid cu conținut de mixoxantofilă, având caracteristici optime privind efectele asupra sistemelor cercetate, prezintă un potențial efect antifungic fapt ce argumentează necesitatea continuării cercetărilor *in vivo* în vederea confirmării acestor date.
7. Rezultatele obținute oferă noi perspective de cercetare a acțiunii compușilor studiați în diverse afecțiuni caracterizate prin perturbarea funcțiilor sistemului de protecție antioxidantă și impun confirmarea acestora *in vivo* fără de care nu pot fi formulate concluziile definitive privind efectul cantitativ al compușilor studiați, ceea ce prezintă una dintre limitările cercetării efectuate.

CONCLUZII GENERALE

1. *Candida albicans* a fost cel mai frecvent agent fungic izolat din biosubstraturile umane în cadrul acestui studiu (61,5%), iar dintre speciile de *Candida non-albicans* (NAC), care au constituit o parte substanțială din tulpinile clinice izolate (38,5%), a prevalat *Candida glabrata* (56,8%), urmată de *Candida krusei* (31,8%), *Candida parapsilosis* (5,3%) și *Candida tropicalis* (2,4%). Repartizarea speciilor de *Candida* în funcție de speciile biologice este neuniformă. Astfel, unele specii au fost recuperate din toate speciile clinice (*C. albicans* și *C. glabrata*), în timp ce altele doar în unele (ex., *C. dublinensis*, *C. norvegensis* în prelevatele din căile respiratorii). Distribuția speciilor de *Candida non-albicans* în raport cu proba clinică nu a variat semnificativ, acestea prevalând în probele de urină (20,8%), urmate de cele de spută/aspirat bronșic (14,7%). Îmbucurător este faptul că izolatele clinice nu atestă indici majorați de rezistență la preparatele antifungice.
2. Rezultatele cercetărilor factorilor de patogenitate ai tulpinilor de levuri nu a arătat diferențe evidente a expresiei acestora în funcție de biosubstrat și de specia testată. Totodată, s-a atestat o exprimare puțin mai înaltă a enzimelor la *C. albicans*, comparativ cu *Candida non-albicans*, ceea ce permite supraviețuirea și implicarea acestor specii în invazie, evitarea răspunsului imun al gazdei și dezvoltarea formelor mai severe de IFI, drept consecință persistența și dificultăți de eradicare a infecției. La speciile de *Candida non-albicans* s-au observat unele diferențe în gradul de expresie a factorilor de patogenitate. Astfel, *C. tropicalis* a prezentat cel mai frecvent activitate esterazică, *C. glabrata* și *C. krusei* – activitate hemolizică și capacitate de inactivare a activității lizozimului.
3. Activitate antifungică înaltă față de fungii levuriformi cercetați au prezentat cinci compuși chimici noi ai cuprului cu tiosemicarbazone, cu aldehide și cu cetone. Acești compuși prezintă interes în calitate de potențiali candidați pentru dezvoltarea de preparate antifungice cu efecte direcționate asupra fungilor levuriformi. Preparatele carotenoide cu conținut de mixoxantofilă au prezentat activitate antifungică mai pronunțată, comparabilă cu cea a celor cinci compuși chimici enumerați mai sus. Întrucât susceptibilitatea tulpinilor de referință s-a dovedit a fi apropiată de cea a tulpinilor clinice, rezultatele obținute în cadrul testelor primare pe culturi de referință, prin care se studiază compușii chimici tiosemicarbazonați cu conținut de cupru, pot fi extrapolate, cu un nivel foarte înalt de probabilitate, și asupra tulpinilor clinice.
4. Activitatea antifungică a combinațiilor dintre compușii chimici și cei biologici se bazează pe interacțiunea preponderent sinergică dintre acestea, dovedită prin aplicarea modelului indicelui de concentrație al inhibiției factoriale. Compușii chimici și biologici aplicați fiecare în parte,

cât și combinație, au avut efecte performante de inhibare a factorilor de patogenitate manifestați de speciile *C. albicans* și *C. tropicalis*, provocând diminuarea semnificativă a activității exoenzimelor de patogenitate, blocând capacitatea de formare a biofilmelor, inhibând total ori parțial activitatea antilozim și anticomplementară a fungilor patogeni. Combinațiile dintre preparatele biologice și compușii chimici sunt mai eficiente în raport cu factorii de patogenitate decât compușii aplicați individual. Efectele sinergice, generate între principiile active constituente, au determinat creșterea capacității de inhibare a dezvoltării agenților fungici.

5. Nanoparticulele de argint stabilizate cu derivați naturali, precum pululanul și derivații celulozici, au demonstrat acțiune inhibitorie atât asupra tulpinilor de referință, cât și asupra fungilor izolați din biosubstraturile clinice. Activitatea antifungică s-a dovedit a fi relativ uniformă împotriva tuturor tulpinilor testate la un nivel relativ de concentrații apropiate. Sistemele pe bază de derivați naturali de noua generație au ca scop depășirea inconvenientelor anterioare legate de încorporarea și toxicitatea AgNPs, iar activitatea antifungică înaltă a AgNPs *in vitro*, demonstrată în prezentul studiu, necesită investigații suplimentare *in vivo*, precum standardizarea și stabilizarea, și cercetări toxicologice corespunzătoare pentru a le face aplicabile ca preparate antifungice.
6. Efectele pozitive în cadrul combinațiilor, mai ales asupra sistemului antiinflamator și a sistemului DAM – PPOA, sunt determinate de extractele N1 și N2, caracteristici optime având combinația C2+N2. Pe de altă parte, efectul așteptat de potențare a fost slab exprimat. Acest fapt poate fi observat prin analiza evoluției indicatorilor studiați în lotul N2 și lotul C2+N2 (complet din punct de vedere al efectelor așteptate). Conform rezultatelor cercetărilor efectuate în acest studiu, compușii N1 și N2 prezintă caracteristici optime privind efectele asupra sistemelor cercetate, potențial efect antifungic, ceea ce argumentează necesitatea continuării cercetărilor *in vivo* în vederea confirmării acestor date. Fără aceste cercetări nu se pot trage concluzii definitive privind efectul cantitativ al compușilor studiați, ceea ce constituie una dintre limitările cercetării efectuate.

Totodată, rezultatele obținute oferă noi perspective de cercetare a acțiunii compușilor studiați în diverse afecțiuni caracterizate prin perturbarea funcțiilor sistemului de protecție antioxidantă.

7. În raport cu obiectivul privind evaluarea modificărilor unor parametri biochimici ai izolatelor fungice sub influența compușilor monocompenți și în combinație se poate menționa că extractele de spirulină nu au efect toxic direct asupra microorganismelor studiate, iar compușii chimici studiați și aplicați în concentrații minim inhibitorii produc efecte toxice pronunțate asupra izolatelor fungice analizate. Acțiunea combinată a compușilor asupra parametrilor investigați demonstrează eficacitatea lor în calitate de potențiali agenți antifungici, în condițiile

în care concentrațiile compușilor chimici sunt de 2-4 ori mai mici comparativ cu cele aplicate în cazul utilizării lor separate. Compușii chimici și cei naturali acționează sinergist, prin mecanisme neevidențiate în cadrul acestui studiu, dar care le oferă perspective mari în calitate de agenți antifungice cu grad redus de toxicitate și potențial scăzut de formare a rezistenței.

8. În contextul influenței compușilor biologic activi asupra parametrilor fiziologici *in vitro* se atestă efecte pozitive ale acestora asupra tuturor parametrilor studiați, manifestate prin micșorarea valorii indicilor stresului oxidativ, sistemului proinflamator și creșterea potențialului antioxidant și antiinflamator, în timp ce compușii chimici au prezentat efecte negative, determinând valori crescute pentru indicii stresului oxidativ și componentele sistemului proinflamator, favorizând sistemele antioxidant și antiinflamator. În cazul compușilor combinați s-au observat efecte pozitive, în special asupra sistemului antiinflamator și a indicilor stresului oxidativ.

RECOMANDĂRI PRACTICE

Pe baza rezultatelor obținute în cadrul acestui studiu au fost elaborate unele recomandări pentru aplicare în practică:

1. Crearea unui sistem național de supraveghere și control a infecțiilor fungice și consolidarea capacităților de diagnostic de laborator în domeniul micologiei medicale.
2. Implementarea în practica laboratoarelor medicale a testelor rapide de identificare cu specificitate, sensibilitate înaltă de evidențiere a expresiei factorilor de patogenitate ai fungilor, determinarea susceptibilității la antifungice și a mecanismelor de rezistență.
3. Elaborarea ghidurilor, procedurilor, protocoalelor clinice naționale și organizarea instruirii specialiștilor implicați în supravegherea și controlul infecțiilor fungice.
4. Propunerea spre utilizare a tehnologiilor de combinare a preparatelor biologice, compușilor chimici și a nanoparticulelor de Ag stabilizate cu derivați naturali în vederea elaborării a medicamentelor policomponente eficiente în terapia infecțiilor fungice.

Direcții și sugestii de cercetare de perspectivă

Rezultatele studiului realizat pot fi utilizate pentru continuarea cercetărilor direcționate spre dezvoltarea unor metodologii de diagnostic rapid al infecțiilor fungice, al preparatelor farmaceutice originale eficiente asupra fungilor filamentoși în calitate de terapii alternative cu toxicitate redusă asupra organismului uman.

BIBLIOGRAFIA

1. ACHKAR, J.M., FRIES, B.C. *Candida* infections of the genitourinary tract. In: *Clinical Microbiology Reviews*. 2010, nr. 23, pp. 253–273. ISSN 1098-6618.
2. AHMAD KHAN, M.S., ALSHEHREI, F., AL-GHAMDI, S.B., BAMAGA, M.A., AL-THUBIANI, A.S., ALAM, M.Z. Virulence and biofilms as promising targets in developing antipathogenic drugs against candidiasis. In: *Future Science OA*. 2020, nr. 6(2). ISSN 2056-5623.
3. AHMAD, S., ALFOUZAN, W. *Candida auris*: Epidemiology, diagnosis, pathogenesis, antifungal susceptibility, and infection control measures to combat the spread of infections in healthcare facilities. In: *Microorganisms*. 2021, nr. 9, pp. 807. ISSN 2076-2607.
4. AKPINAR, I., UNAL, M., SAR, T. Potential antifungal effects of silver nanoparticles (AgNPs) of different sizes against phytopathogenic *Fusarium oxysporum f. sp. radicis-lycopersici* (FORL) strains. In: *SN Applied Sciences*. 2021, nr. 3, pp. 506. ISSN 2523-3971.
5. ALI, I., WANI, W.A., KHAN, A., HAQUE, A., AHMAD, A., SALEEM, K., & MANZOOR, N. (2012). Synthesis and synergistic antifungal activities of a pyrazoline based ligand and its copper(II) and nickel(II) complexes with conventional antifungals. In: *Microbial Pathogenesis*. 2012, nr. 53(2), pp. 66–73. ISSN 0882-4010.
6. ALTINTOP, M.D., ATLI, Ö., ILGIN, S., DEMIREL, R., ÖZDEMİR, A., & KAPLANCIKLI, Z. A. Synthesis and biological evaluation of new naphthalene substituted thiosemicarbazone derivatives as potent antifungal and anticancer agents. In: *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2016, nr. 108, pp. 406–414. ISSN 0223-5234.
7. ALVARADO-SOCARRAS, J.L., VARGAS-SOLER, J.A., FRANCO-PAREDES, C., et al. A cluster of neonatal infections caused by *Candida auris* at a large referral center in Colombia. In: *Journal of Pediatric Infectious Diseases*. 2021, nr. 10, pp. 549–55. ISSN 0891-3668.
8. ÁLVAREZ-PÉREZ, S., GARCÍA, M.E., CUTULI, M.T., FERMÍN, M.L., DAZA, M.A., PELÁEZ, T., BLANCO, J.L. Acquired multi-azole resistance in *Candida tropicalis* during persistent urinary tract infection in a dog. In: *Medical Mycology Case Reports*. 2016, nr. 11, pp. 9–12. ISSN 2211-7539.
9. 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.

10. ANG, X.Y., MAGESWARAN, U.M., CHUNG, Y.L.F., LEE, B.K., AZHAR, S.N.A., ROSLAN, N.S., SAUFIAN, I.F.B., MUSTAFFA, N.S., KALAM, E.M., IBRAHIM, A.F., et al. Probiotics Reduce Vaginal Candidiasis in Pregnant Women via Modulating Abundance of *Candida* and *Lactobacillus* in Vaginal and Cervicovaginal Regions. In: *Microorganisms*. 2022, nr. 10, pp. 285. ISSN 2076-2607.
11. ANIEBUE, U.U., NWANKWO, T.O., NWAFOR, M.I. Vulvovaginal candidiasis in reproductive age women in Enugu Nigeria, clinical versus laboratory-assisted diagnosis. In: *Nigerian Journal of Clinical Practice*. 2018, nr. 21, pp. 1017–1022. ISSN 1119-3077.
12. ARASTEHFAR, A., DANESHNIA, F., HILMIOĞLU-POLAT, S., et al. First report of candidemia clonal outbreak caused by emerging fluconazole-resistant *Candida parapsilosis* isolates harboring Y132F and/or Y132F+K143R in Turkey. In: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2020, nr. 64(10), pp. e01001–20. ISSN 1098-6596.
13. ARASTEHFAR, A., GABALDÓN, T., GARCIA-RUBIO, R., et al. Drug-resistant fungi: an emerging challenge threatening our limited antifungal armamentarium. In: *Antibiotics*. 2020, nr. 9, pp. 877. ISSN 2079-6382.
14. ARENDRUP, M. C., JØRGENSEN, K. M., GUINEA, J., et al. Multicenter validation of a EUCAST method for the antifungal susceptibility testing of microconidia-forming dermatophytes. In: *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2020, nr. 75, pp. 1807–1819. ISSN 1460-2091.
15. ARENDRUP, M.C., MELETIADIS, J., MOUTON, J.W., LAGROU, K., HAMAL, P., GUINEA, J. EUCAST definitive document E.DEF 7.3.2.: Method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for yeasts. In: *EUCAST Antifungal MIC method for Yeasts*. 2020.
16. ARENDRUP, M.C., PATTERSON, T.F. Multidrug-Resistant *Candida*: Epidemiology, Molecular Mechanisms, and Treatment. In: *The Journal of Infectious Diseases*. 2017, 216(suppl_3), pp. S445–S451. ISSN 1537-6613
17. ARSENAULT, A.B., BLISS, J.M. Neonatal Candidiasis: New Insights into an Old Problem at a Unique Host-Pathogen Interface. In: *Current Fungal Infection Reports*. 2015, nr. 9, pp. 246–252. ISSN 1936-377X.
18. 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.

19. ASHBEE, H. R., BARNES, R. A., JOHNSON, E. M., et al. Therapeutic drug monitoring (TDM) of antifungal agents: guidelines from the British Society for Medical Mycology. In: *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2014, nr. 69, pp. 1162–1176. ISSN 1460-2091.
20. ASTM E2315-16 Standard Guide for Assessment of Antimicrobial Activity Using a Time-Kill Procedure. ASTM International, West Conshohocken, PA, 2016. [citat 18.03.2020]. Disponibil: www.astm.org.
21. AULER, M.E., MORREIRA, D., RODRIGUES, F.F.O., ABRÃO, M.S., MARGARIDO, P.F.R., MATSUMOTO, F.E., SILVA, E.G., SILVA, B.C.M., SCHNEIDER, R.P., PAULA, C.R. Biofilm formation on intrauterine devices in patients with recurrent vulvovaginal candidiasis Biofilm formation on IUDs in patients with vulvovaginal candidiasis. In: *Medical Mycology*. 2010, nr. 48, pp. 211–216. ISSN 1460-2709.
22. AURIEMMA, R.S., SCAIRATI, R., DEL VECCHIO, G., LICCARDI, A., VERDE, N., PIRCHIO, R., PIVONELLO, R., ERCOLINI, D., COLAO, A. The Vaginal Microbiome: A Long Urogenital Colonization Throughout Woman Life. In: *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2021, nr. 11, pp. 613. ISSN 2235-2988.
23. AYDEMIR, Ö., DEMIRAY, T., KÖROĞLU, M., AYDEMIR, Y., ALTINDIŞ, M. Emerge of non-albicans *Candida* species, evaluation of *Candida* species and antifungal susceptibilities according to years. In: *BioMed Research International*. 2017, nr. 28, pp. 2820–2825. ISSN 2314-6141.
24. BACIU, E., NASTAS, I. Procedeu de determinare a activității catalazei. *Certificat de inovator nr. 3122 din 09.11.1996.*, n.d.
25. BAHJOB NORUZI, E., SHAABANI, B., GEREMIA, S., HICKEY, N., NITTI, P., & KAFIL, H. S. (2020). Synthesis, Crystal Structure, and Biological Activity of a Multidentate Calix[4]arene Ligand Doubly Functionalized by 2-Hydroxybenzeledene-Thiosemicarbazone. In: *Molecules*. 2020, nr. 25(2), pp. 370. ISSN 1420-3049.
26. BAJAJ, K., BUCHANAN, R.M., & GRAPPERHAUS, C.A. (2021). Antifungal activity of thiosemicarbazones, bis(thiosemicarbazones), and their metal complexes. In: *Journal of Inorganic Biochemistry*. 2021, nr. 225, pp. 111620. ISSN 0162-0134.
27. 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.
28. 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.

29. 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).
30. 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. ISSN 1679-8902.
31. BEHTA, E., **BURDUNIUC, O.**, BUCOVA, V., CRACIUN, O., BIVOL, M, BURDUNIUC, A., BRÎNZĂ, O. GRUMEZA, M., BALAN, G. Antimicrobial discovery – impact of the natural sources. În: *Studia Universitatis Moldaviae. Chișinău*. 2020, nr. 6(136) Seria “Științe Reale și ale Naturii”, p. 39-48. ISSN 1814-3237.
32. BENOIST, H., RODIER, S., DE LA BLANCHARDIÈRE, A., et al. Appropriate use of antifungals: impact of an antifungal stewardship program on the clinical outcome of candidaemia in a French university hospital. In: *Infection*. 2019, nr. 47(3), pp. 435-440. ISSN 1439-0973.
33. BERMAN, J., KRYSAN, D. J. (2020). Drug resistance and tolerance in fungi. In: *Nature Reviews Microbiology*. 2020, nr. 18(6), pp. 319–331. ISSN 1740-1534.
34. BERNAL-MARTINEZ, L., GIL, H., RIVERO-MENENDEZ, O., GAGO, S., CUENCA-ESTRELLA, M., MELLADO, E., et al. Development and validation of a high-resolution melting assay to detect azole resistance in *Aspergillus fumigatus*. In: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2017, nr. 61(12). ISSN 1098-6596.
35. BHATTACHARYA, S., SAE-TIA, S., FRIES, B.C. Candidiasis and mechanisms of antifungal resistance. In: *Antibiotics*. 2020, nr. 9, pp. 312. ISSN 2079-6382.
36. BILIUȚA, G., BOSTĂNARU-ILIESCU, A.C., MAREȘ M, PAVLOV-ENESCU, C., NĂSTASĂ, V., **BURDUNIUC, O**, COSERI, S. Antibacterial and Antifungal Silver Nanoparticles with Tunable Size Embedded in Various Cellulose-Based Matrices. In: *Molecules*. 2022, nr. 27(19), pp. 6680. ISSN 1420-3049.
37. BONACCORSO, C., MARZO, T., LA MENDOLA, D. (2019). Biological Applications of Thiocarbohydrazones and Their Metal Complexes: A Perspective Review. In: *Pharmaceuticals*. 2019, nr. 13(1), pp. 4. ISSN 1424-8247.

38. BONGOMIN, F., GAGO, S., OLADELE, R.O., DENNING, D.W. Global and Multi-National Prevalence of Fungal Diseases-Estimate Precision. In: *Journal of Fungi*. 2017, nr. 3, pp. 57. ISSN 2309-608X.
39. BONGOMIN, F., OLUM, R., NSENGA, L., et al. Burden of tinea capitis among children in Africa: protocol for a systematic review and meta-analysis of observational studies, 1990-2020. In: *BMJ Open*. 2020, nr. 10, pp. e041230. ISSN 2044-6055.
40. BOWYER, P., BROMLEY, M.J., DENNING, D.W. Linking calcium signaling and mitochondrial function in fungal drug resistance. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2020, nr. 117, pp. 1254–1256. ISSN 1091-6490.
41. BRITTO, F.P., DMELLO, A.X.P., SHETTY, A.S., THAKKILIPATI, H.C., UDUPA, R., VARSHA, R., SHETTY, J. Microbial Investigations of Fungal Infections: an overview. In: *International Journal of Oral Care and Research*. 2019, nr. 7(2), pp. 56-60. ISSN 2049-3169.
42. BROWN, G.D., DENNING, D.W., GOW, N.A.R., LEVITZ, S.M., NETEA, M.G., WHITE, T.C. Hidden killers: Human fungal infections. In: *Science Translational Medicine*. 2012, nr. 4, pp. 165. ISSN 1946-6242.
43. BROWN, G.D., DENNING, D.W., LEVITZ, S.M. Tackling human fungal infections. In: *Science*. 2012, nr. 336, pp. 647. ISSN 1095-9203.
44. BRUNO, V.M., SHETTY, A.C., YANO, J., FIDEL, P.L., NOVERR, M.C., PETERS, B.M. Transcriptomic Analysis of Vulvovaginal Candidiasis Identifies a Role for the NLRP3 Inflammasome. In: *MBio*. 2015, nr. 6, pp. e00182-15. ISSN 2150-7511.
45. BUIL, J.B., MEIJER, E.F.J., DENNING, D.W., VERWEIJ, P.E., MEIS, J.F. Burden of serious fungal infections in the Netherlands. In: *Mycoses*. 2020, nr. 63, pp. 625–631. ISSN 1439-0507.
46. BUIUC, D. NEGUȚ, M. *Tratat de microbiologie clinică*. București: Ed. Medicală, 2017. 1250 p. ISBN 978-973-39-0593-6.
47. BUKHARIN, O., VALYSHEV, A., ELAGINA, N., IVANOV, I., CHERKASOV, S. Fotometricheeskoe 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.
48. 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.

49. 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.
50. BURDUNIUC O. Antifungal susceptibility patterns and virulence factors of clinical *Candida spp.* isolates. In: *Arta Medica*. 2021, nr. 2 (79), pp. 4-9. ISSN 1810-1879.
51. BURDUNIUC, O. Actualități în diagnosticul infecțiilor fungice invazive. In: *Sănătate Publică, Economie și Management în Medicină*. 2019, nr. 2(80), pp. 54-60. ISSN 1729-8687.
52. BURDUNIUC, O. Biofilmele fungice – provocare actuală la nivel mondial. In: *Studia Universitatis Moldaviae, Seria “Științe Reale și ale Naturii”*. 2020, nr. 1(131), pp. 100-110. ISSN 1814-3237.
53. BURDUNIUC, O. Factorii de virulență a fungilor patogeni: semnificația clinică și detectarea fenotipică. In: *Studia Universitatis, Seria Științe Reale și ale Naturii*. 2018, nr. 6(116), pp. 3-13. ISSN 1814-3237.
54. BURDUNIUC, O. *Fungii patogeni și rezistența la antimicotice*. Chișinău: „Print-Caro”, 2018, 274 p., ISBN 978-9975-56-538-7.
55. BURDUNIUC, O., BĂLAN, G., GRAUR, V., DIURICI, E., ȚAPCOV, V., RUDIC, V., GULEA, A. Antifungal activity of some 3d metal coordination compounds with 2-[2-(prop-2-en-1-ylcarbamothioy)-hydrazinylidene]-propanoic acid. In: *Revista Română de Medicină de Laborator*. 2018, nr. 26(3), pp. 52. ISSN 1841-6624.
56. BURDUNIUC, O., BĂLAN, G., GRAUR, V., ȚAPCOV, V., GULEA, A. *Compuși ai cuprului (II) cu 4-iltiosemicarbazona 2-acetilpiridinei în calitate de inhibitori ai proliferării fungilor din specia Cryptococcus neoformans*. Brevet de invenție: MD 4621 C1 2019.09.30. BOPI nr. 2/2019 din 28.02.2019.
57. BURDUNIUC, O., BĂLAN, G., SOFRONIE, O., BUCOV, V., HOLBAN, T., BIVOL, M. *Principii și proceduri în testarea microbiologică a hemoculturilor (Ghid)*. Chișinău: Tipografia Î.S. F.E.-P. „Tipografia Centrală”. 2020. p. 56 p. ISBN 978-9975-151-43-6.
58. BURDUNIUC, O., BĂLAN, G., SPÎNU, C., SOFRONIE, O., ANTON, M. *Diagnosticul microbiologic al infecțiilor tractului respirator (Ghid)*. Tipografia Î.S. F.E.P. „Tipografia Centrală”. 2021. 81 p. CZU 616.2-002-078(036).
59. BURDUNIUC, O., BÎRCĂ, E., BURDUNIUC, A., GRUMEZA, M., BIVOL, M. Distribuția speciilor clinice de candida și sensibilitatea acestora la antifungice. In: *Sănătate Publică, Economie și Management în Medicină*. 2020, nr. 5(87), pp. 31-36. ISSN 1729-8687.

60. BURDUNIUC, O., BOSTANARU, AC, MARES, M, BILIUTA, G, COSERI, S. Synthesis, Characterization, and Antifungal Activity of Silver Nanoparticles Embedded in Pullulan Matrices. In: *Materials. (Basel)*. 2021, nr. 14(22), pp. 7041. ISSN 1996-1944.
61. BURDUNIUC, O., BUNESCU, I., SOFRONIE, O., BIVOL, M., CRACIUN, O., BURDUNIUC, A., BALAN, G. The importance of blood cultures in the effective management of bloodstream infections. In: *Moldovan Medical Journal*. 2019, nr. 3(62), pp. 28-37. ISSN 2537-6373.
62. BURDUNIUC, O., CEBAN, E., BĂLAN, G., PLĂCINTĂ, Gh., VIȘNEVSCHI, A., SOFRONIE, O. BIVOL, M. *Asigurarea calității în diagnosticul microbiologic al infecțiilor tractului urinar (Ghid)*. Chișinău: Tipografia Î.S. F.E.P. „Tipografia Centrală”. 2021, 64p. ISBN 978-9975-3415-9-2.
63. 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, nr. 3, pp. 118-123. ISSN 2306-2436.
64. CABRAL, D.J., PENUMUTCHU, S., NORRIS, C., MORONES-RAMIREZ, J.R., BELENKY, P. Microbial competition between *Escherichia coli* and *Candida albicans* reveals a soluble fungicidal factor. In: *Microbial Cell*. 2018, nr. 5(5), pp. 249–255. ISSN 2311-2638.
65. CALANDRA, T., ROBERTS, J.A., ANTONELLI, M., BASSETTI, M., VINCENT, J.L. Diagnosis and management of invasive candidiasis in the ICU: An updated approach to an old enemy. In: *Critical Care*. 2016, nr. 20, pp. 125. ISSN 1364-8535.
66. CALDARA, M., MARMIROLI, N. Known Antimicrobials Versus Nortriptyline in *Candida albicans*: Repositioning an Old Drug for New Targets. In: *Microorganisms*. 2020, nr. 8, pp. 742. ISSN 2076-2607.
67. CALDARA, M., MARMIROLI, N. Tricyclic antidepressants inhibit *Candida albicans* growth and biofilm formation. In: *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2018, nr. 52, pp. 500–505. ISSN 1872-7913.
68. CALDERONE, R.A., FONZI, W.A. Virulence factors in *Candida albicans*. In: *Trends in Microbiology*. 2001, nr. 9, pp. 327–335. ISSN 1878-4380.
69. CALENDRA, O., GHINDA, S., LESNIC, E. Reacțiile de adaptare și indicatorii reactivității imune în tuberculoza pulmonară sub influența adaptogenului BioR. In: *Sănătatea Publică, Economie și Management în Medicină*. 2015, nr. 2(59), pp. 60-64. ISSN 1729-8687.
70. CAMPOY, S., ADRIO, J.L. Antifungals. In: *Biochemical Pharmacology*. 2017, nr. 133, pp. 86–96. ISSN 1873-2968.

71. CASSONE, A. Vulvovaginal *Candida albicans* infections: Pathogenesis, immunity and vaccine prospects. In: *International Journal of Obstetrics & Gynaecology*. 2015, nr. 122, pp. 785–794. ISSN 1471-0528.
72. CAVALHEIRO, M., TEIXEIRA, M.C. *Candida* Biofilms: Threats, Challenges, and Promising Strategies. In: *Frontiers in medicine (Lausanne)*. 2018, nr. 13(5), pp. 28. ISSN 2296-858X.
73. CDC. Antibiotic Resistance Threats in the United States 2019. 2019 Available at <https://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/threats-report/2019-ar-threats-report-508.pdf>. [Accesat 15.01.2022]
74. CECCARANI, C., FOSCHI, C., PAROLIN, C., D'ANTUONO, A., GASPARI, V., CONSOLANDI, C., LAGHI, L., CAMBONI, T., VITALI, B., SEVERGNINI, M., et al. Diversity of vaginal microbiome and metabolome during genital infections. In: *Scientific Reports*. 2019, nr. 9, pp. 14095. ISSN 2045-2322.
75. 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, nr.1(1), pp. 64-71. ISSN 2587-3458.
76. CHAKRABARTI, A., SOOD, P., RUDRAMURTHY, S.M., et al. Incidence, characteristics and outcome of ICU-acquired candidemia in India. In: *Intensive Care Medicine*. 2015, nr. 41, pp. 285–295. ISSN 1432-1238.
77. CHONG, G.L., VAN DE SANDE, W.W., DINGEMANS, G.J., GAAJETAAN, G.R., VONK, A.G., HAYETTE, M.P., et al. Validation of a new *Aspergillus* real-time PCR assay for direct detection of *Aspergillus* and azole resistance of *Aspergillus fumigatus* on bronchoalveolar lavage fluid. In: *Journal of Clinical Microbiology*. 2015, nr. 53(3), pp. 868–874. ISSN 1098-660X.
78. CHONG, G.M., VAN DER BEEK, M.T., VON DEM BORNE, P.A., BOELEN, J., STEEL, E., KAMPINGA, G.A., et al. PCR-based detection of *Aspergillus fumigatus* Cyp51A mutations on bronchoalveolar lavage: a multicentre validation of the AsperGenius assay(R) in 201 patients with haematological disease suspected for invasive aspergillosis. In: *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2016, nr. 71(12), pp. 3528–3535. ISSN 1460-2091.
79. CHOWDHARY, A., TARAI, B., SINGH, A., et al. Multidrug-resistant *Candida auris* infections in critically ill coronavirus disease patients, India, April-July 2020. In: *Emerging Infectious Diseases*. 2020, nr. 26, pp. 2694–2696. ISSN 1080-6059.

80. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Epidemiological Cutoff Values for Antifungal Susceptibility Testing, 3th ed.; CLSI Supplement M59; Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne, PA, USA, 2020.
81. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts, 2nd ed.; CLSI Supplement M60; Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne, PA, USA, 2020.
82. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Principles and Procedures for the Development of Epidemiological Cutoff Values for Antifungal Susceptibility Testing, 1st ed.; CLSI Document M57; Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne, PA, USA, 2016.
83. CLSI. Epidemiological cutoff values for antiufngal susceptibility testing, second edition. Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne, PA; 2018.
84. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 29th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute. 2019.
85. CONSOLARO, M.E.L., ALBERTONI, T.A., SVIDZINSKI, A.E., PERALTA, R.M., SVIDZINSKI, T.I.E. Vulvovaginal candidiasis is associated with the production of germ tubes by *Candida albicans*. In: *Mycopathologia*. 2005, nr. 159, pp. 501–507. ISSN 1573-0832.
86. CORZO-LEON, D.E., PEACOCK, M., RODRIGUEZ-ZULUETA, P., et al. General hospital outbreak of invasive candidiasis due to azole-resistant *Candida parapsilosis* associated with an Erg11 Y132F mutation. In: *Medical Mycology*. 2021, nr. 59, pp. 664–671. ISSN 1460-2709.
87. COWEN, L.E., SANGLARD, D., HOWARD, S.J., ROGERS, P.D., PERLIN, D.S. Mechanisms of antifungal drug resistance. In: Cold Spring Harbor perspectives in medicine. 2015, nr. 5. ISSN 2157-1422.
88. DANNAOUI, E., ESPINEL-INGROFF, A. Antifungal Susceptibly Testing by Concentration Gradient Strip Etest Method for Fungal Isolates: A Review. In: *Journal of Fungi*. 2019, nr. 5, pp. 108. ISSN 2309-608X.
89. DAS, K.H., MANGAYARKARASI, V., SEN, M. Antifungal resistant in non-albicans candida species are emerging as a threat to antenatal women with vulvovaginal candidiasis. In: *Biomedical and Pharmacology Journal*. 2019, nr. 12, pp. 1369–1378. ISSN 2456–2610.
90. DE ARAÚJO NETO, L.N., DO CARMO ALVES DE LIMA, M., DE OLIVEIRA, J.F., DE SOUZA, E.R., BUONAFINA, M.D.S., VITOR ANJOS, M.N., BRAYNER, F.A., ALVES,

- L.C., NEVES, R.P., MENDONÇA-JUNIOR, F.J.B. (2017). Synthesis, cytotoxicity and antifungal activity of 5-nitro-thiophene-thiosemicarbazones derivatives. In: *Chemico-Biological Interactions*. 2017, nr. 272, pp. 172–181. ISSN 0009-2797.
91. DEKKERS, B.G.J., VERINGA, A., MARRIOTT, D.J.E., BOONSTRA, J.M., VAN DER ELST, K.C.M., DOUKAS, F.F., MCLACHLAN, A.J., ALFFENAAR, J.W.C. Invasive Candidiasis in the Elderly: Considerations for Drug Therapy. In: *Drugs Aging*. 2018, nr. 35, pp. 781–789. ISSN 1179-1969.
92. DENNING, D.W., KNEALE, M., SOBEL, J.D., et al. Global burden of recurrent vulvovaginal candidiasis: a systematic review. In: *The Lancet Infectious Diseases*. 2018, nr. 18, pp. e339–347. ISSN 1473-3099.
93. DENNING, D.W., PERLIN, D.S., MULDOON, E.G., et al. Delivering on antimicrobial resistance agenda not possible without improving fungal diagnostic capabilities. In: *Emerging Infectious Diseases*. 2017, nr. 23, pp. 177–183. ISSN 1080-6059.
94. DENNING, D.W., VENKATESWARLU, K., OAKLEY, K.L., ANDERSON, M.J., MANNING, N.J., STEVENS, D.A., et al. Itraconazole resistance in *Aspergillus fumigatus*. In: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1997, nr. 41(6), pp. 1364–1368. ISSN 1098-6596.
95. DESAI, J.V., MITCHELL, A.P. *Candida albicans* biofilm development and its genetic controls. In: *Microbiology Spectrum*. 2015, nr. 3, pp. 139–148. ISSN 2165-0497.
96. 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.
97. DRAGOS, V., LUNDER, M. Lack of efficacy of 6-week treatment with oral terbinafine for tinea capitis due to *Microsporum canis* in children. In: *Pediatric Dermatology*. 1997, nr. 14, pp. 46–48. ISSN 1525-1470.
98. DUAN, X., XIE, Z., MA, L., JIN, X., ZHANG, M., XU, Y., LIU, Y., LOU, H., CHANG, W. (2022). Selective Metal Chelation by a Thiosemicarbazone Derivative Interferes with Mitochondrial Respiration and Ribosome Biogenesis in *Candida albicans*. In: *Microbiology Spectrum*. 2022, nr. 10(3), pp. e0195121. ISSN 2165-0497.
99. DUDAKOVA, A., SPIESS, B., TANGWATTANACHULEEPORN, M., SASSE, C., BUCHHEIDT, D., WEIG, M., et al. Molecular tools for the detection and deduction of azole antifungal drug resistance phenotypes in *Aspergillus* species. In: *Clinical Microbiology Reviews*. 2017, nr. 30(4), pp. 1065–1091. ISSN 1098-6618.
100. DUDIUK, C., GAMARRA, S., LEONARDELI, F., JIMENEZ-ORTIGOSA, C., VITALE, R.G., AFELTRA, J., et al. Set of classical PCRs for detection of mutations in *Candida*

- glabrata* FKS genes linked with echinocandin resistance. In: *Journal of Clinical Microbiology*. 2014, nr. 52(7), pp. 2609–2614. ISSN 1098-660X.
101. DUONG, T.M.N., LE, T.V., TRAN, K.L.H., et al. Azole-resistant *Aspergillus fumigatus* is highly prevalent in the environment of Vietnam, with marked variability by land use type. In: *Environmental Microbiology*. 2021, nr. 23(12), pp. 7632-7642. ISSN 1462-2920.
102. DUONG, T.M.N., NGUYEN, P.T., LE, T.V., et al. Drug-resistant *Aspergillus flavus* is highly prevalent in the environment of Vietnam: a new challenge for the management of aspergillosis? In: *Journal of Fungi*. 2020, nr. 6, pp. 296. ISSN 2309-608X.
103. EDOUARZIN, E., HORN, C., PAUDYAL, A., ZHANG, C., LU, J., TONG, Z., GIAEVER, G., NISLOW, C., VEERAPANDIAN, R., HUA, D.H., VEDIYAPPAN, G. Broad-spectrum antifungal activities and mechanism of drimane sesquiterpenoids. In: *Microbial Cell*. 2020, nr. 7(6), pp. 146–159. ISSN 2311-2638.
104. EL-BAZ, A.M., MOSBAH, R.A., GODA, R.M., MANSOUR, B., SULTANA, T., DAHMS, T.E.S., EL-GANINY, A.M. (2021). Back to Nature: Combating *Candida albicans* Biofilm, Phospholipase and Hemolysin Using Plant Essential Oils. In: *Antibiotics*. 2021, nr. 10(1), pp. 81. ISSN 2079-6382.
105. ENOCH, D.A., YANG, H., ALIYU, S.H., MICALLEF, C. The Changing Epidemiology of Invasive Fungal Infections. In: *Methods in Molecular Biology*. 2017, nr. 1508, pp. 17–65. ISSN 1064-3745.
106. ESCHENAUER, G.A., CARVER, P.L., PATEL, T.S., LIN, S.W., KLINKER, K.P., PAI, M.P., et al. Survival in patients with *Candida glabrata* bloodstream infection is associated with fluconazole dose. In: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2018, nr. 62(6). ISSN 1098-6596.
107. ESPINEL-INGROFF, A., ALVAREZ-FERNANDEZ, M., CANTÓN, E., CARVER, P.L., CHEN, S.C.A., ESCHENAUER, G., GETSINGER, D.L., GONZALEZ, G.M., GOVENDER, N.P., GRANCINI, A., et al. Multicenter study of epidemiological cutoff values and detection of resistance in *Candida spp.* to anidulafungin, caspofungin, and micafungin using the Sensititre YeastOne colorimetric method. In: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2015, nr. 59, pp. 6725–6732. ISSN 1098-6596.
108. ESPINEL-INGROFF, A., ARENDRUP, M., CANTON, E., CORDOBA, S., DANNAOUI, E., GARCIA-RODRIGUEZ, J., et al. Multicenter study of method-dependent epidemiological cutoff values for detection of resistance in *Candida spp.* and *Aspergillus spp.* to amphotericin B and echinocandins for the Etest Agar Diffusion Method. In: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2017, nr. 61(1). ISSN 1098-6596.

109. ESPINEL-INGROFF, A., COLOMBO, A.L., CORDOBA, S., DUFRESNE, P.J., FULLER, J., GHANNOUM, M., et al. International evaluation of MIC distributions and epidemiological cutoff value (ECV) definitions for *Fusarium* species identified by molecular methods for the CLSI broth microdilution method. In: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2016, nr. 60(2), pp. 1079–1084. ISSN 1098-6596.
110. ESPINEL-INGROFF, A., DANNAOUI, E. Should Etest MICs for Yeasts Be Categorized by Reference (BPs/ECVs) or by Etest (ECVs) Cutoffs as Determinants of Emerging Resistance? In: *Current Fungal Infection Reports*. 2020, nr. 14, pp. 120–129. ISSN 1936-377X.
111. ESPINEL-INGROFF, A., SASSO, M., TURNIDGE, J., ARENDRUP, M., BOTTEREL, F., BOURGEOIS, N., BOUTEILLE, B., CANTON, E., CASSAING, S., DANNAOUI, E., et al. Etest ECVs/ECOFFs for detection of resistance in prevalent and three non-prevalent *Candida spp.* to triazoles and amphotericin B and *Aspergillus spp.* to caspofungin: Further assessment of modal variability. In: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2021, nr. 65, pp. e01093-21. ISSN 1098-6596.
112. ESPINEL-INGROFF, A., TURNIDGE, J., ALASTRUEY-IZQUIERDO, A., BOTTEREL, F., CANTON, E., CASTRO, C., CHEN, Y.C., CHEN, Y., CHRYSANTHOU, E., DANNAOUI, E., et al. Method-dependent epidemiological cutoff values for detection of triazole resistance in *Candida* and *Aspergillus* species for the Sensititre YeastOne colorimetric broth and Etest agar diffusion methods. In: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2019, nr. 63, pp. e01651-18. ISSN 1098-6596.
113. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Overview of Antifungal ECOFFs and Clinical Breakpoints for Yeasts, Moulds and Dermatophytes Using the EUCAST E.Def 7.3, E.Def 9.3 and E.Def 11.0 Procedures, Version 2.0. Available online: [Accessed 2022].
114. FERNANDEZ-RUIZ, M., GUINEA, J., LORA-PABLOS, D., ZARAGOZA, O., PUIG-ASENSIO, M., ALMIRANTE, B., et al. Impact of fluconazole susceptibility on the outcome of patients with candidaemia: data from a population-based surveillance. In: *Clinical Microbiology and Infection*. 2017, nr. 23(9), pp. 672e1-672e11. ISSN 1469-0691.
115. FLEVARI, A., THEODORAKOPOULOU, M., VELEGRAKI, A., ARMAGANIDIS, A., DIMOPOULOS, G. Treatment of invasive candidiasis in the elderly: A review. In: *Clinical Interventions in Aging*. 2013, nr. 8, pp. 1199–1208. ISSN 1178-1998.
116. FLOWERS, S.A., COLON, B., WHALEY, S.G., SCHULER, M.A., ROGERS, P.D. Contribution of clinically derived mutations in ERG11 to azole resistance in *Candida*

- albicans. In: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2015, nr. 59, pp. 450–460. ISSN 1098-6596.
117. FORASTIERO, A., GARCIA-GIL, V., RIVERO-MENENDEZ, O., GARCIA-RUBIO, R., MONTEIRO, M.C., ALASTRUEY-IZQUIERDO, A., JORDAN, R., AGORIO, I., MELLADO, E. Rapid development of *Candida krusei* echinocandin resistance during caspofungin therapy. In: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2015, nr. 59, pp. 6975–6982. ISSN 1098-6596.
118. 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.
119. FRIEDMAN, D.Z.P., SCHWARTZ, I.S. Emerging Fungal Infections: New Patients, New Patterns, and New Pathogens. In: *Journal of Fungi*. 2019, nr. 5(3), pp. 67. ISSN 2309-608X.
120. GARCIA-BUSTOS, V., RUIZ-SAURÍ, A., RUIZ-GAITÁN, A., SIGONA-GIANGRECO, I.A., CABAÑERO-NAVALON, M.D., SABALZA-BAZTÁN, O., SALAVERT-LLETÍ, M., TORMO, M.Á., PEMÁN, J. Characterization of the Differential Pathogenicity of *Candida auris* in a *Galleria mellonella* Infection Model. In: *Microbiology spectrum*. 2021, nr. 9, pp. e0001321. ISSN 2165-0497.
121. GARCIA-EFFRON, G. Rezafungin-mechanisms of action, susceptibility and resistance: similarities and differences with the other echinocandins. In: *Journal of Fungi*. 2020, nr. 6, pp. 262. ISSN 2309-608X.
122. GHENDOV-MOȘANU, A., COJOCARI, D., BALAN, G., STURZA, R. Antimicrobial activity of rose hip and hawthorn powders on pathogenic bacteria. In: *Journal of Engineering Science*. 2018, nr. 3, pp. 100-107. ISSN 2587-3474.
123. 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, nr. 56(3), pp. 127-130. ISSN 2537-6373.
124. GOMES DA SILVA DANTAS, F., ARAÚJO DE ALMEIDA-APOLONIO, A., PIRES DE ARAÚJO, R., REGIANE VIZOLLI FAVARIN, L., FUKUDA DE CASTILHO, P., DE OLIVEIRA GALVÃO, F., INEZ ESTIVALET SVIDZINSKI, T., ANTÔNIO CASAGRANDE, G., MARI PIRES DE OLIVEIRA, K. A Promising Copper(II) Complex as Antifungal and Antibiofilm Drug against Yeast Infection. In: *Molecules*. 2018, nr. 23(8), pp. 1856. ISSN 1420-3049.

125. GONÇALVES, B., FERREIRA, C., ALVES, C.T., HENRIQUES, M., AZEREDO, J., SILVA, S. Vulvovaginal candidiasis: Epidemiology, microbiology and risk factors. In: *Critical Reviews in Microbiology*. 2016, nr. 42, pp. 905–927. ISSN 1549-7828.
126. GORINCIOI, V., LOZAN, V., **BURDUNIUC, O.**, BĂLAN G. *Utilizarea tetrasalicilatului de bariu-cupru în calitate de inhibitor al proliferării fungilor Cryptococcus neoformans*. Brevet de invenție MD 4712 B1 2020.09.30. BOPI nr. 9/2020 din 30.09.2020.
127. GOVENDER, N.P., PATEL, J., MAGOBO, R.E., et al. Emergence of azole-resistant *Candida parapsilosis* causing bloodstream infection: results from laboratory-based sentinel surveillance in South Africa. In: *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2016, nr. 71, pp. 1994–2004. ISSN 1460-2091.
128. GOW, N.A., VAN DE VEERDONK, F.L., BROWN, A.J., NETEA, M.G. *Candida albicans* morphogenesis and host defence: Discriminating invasion from colonization. In: *Nature Review Microbiology*. 2011, nr. 10, pp. 112–122. ISSN 1740-1534.
129. GRONDALSKA, D., KMIĘCIAK, W. *Candida auris*—Nowy patogen grzybiczy. *Postępy Mikrobiologii - Advancements of Microbiology*. 2019, nr. 191, pp. E865. ISSN 2545-3149.
130. 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*.
131. GUDUMAC, V., TAGADIUC, O., RÎVNEAC, V., SARDARI, V., PANTEA, V. Investigații biochimice. In: *Volumul II. Micrometode. Elaborare metodică*. Chișinău. 2010.
132. 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*.
133. 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, nr. 330(3), pp. 65-72. ISSN 1857-0011.
134. 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)]}. *Brevet de invenție: MD 4675 CI., 11 30, 2020*.
135. 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. BOPI nr. 9/2019 din 30.09.2019.

136. GULEA, A., FUIOR, A., FLOQUET, S., **BURDUNIUC, O.**, ȚAPCOV, V., TODERAȘ, I. Bis(μ 2-sulfido)-bis{[N-ciclohexil-N'-(1-piridin-2-il)-etiliden]carbamohidrazontioato-(N,N,S)-oxomolibden} sescvihadrat care manifestă proprietăți de inhibitor al proliferării fungilor levuriformi. Brevet de invenție MD nr. 4708. 2020. Publicat în BOPI nr. 8/2020. p. 53-54.
137. 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, nr. 89(7), pp. 1415-1423. ISSN 1608-3350.
138. 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.
139. GULEA, A., ȚAPCOV, V., CEBOTARI, D., BĂLAN, G., **BURDUNIUC, O.**, RUDIC, V. *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*. // Brevet de invenție MD 4675 C1 2020.11.30. BOPI nr. 2/2020 din 29.02.2020.
140. GULEA, A., ȚAPCOV, V., CEBOTARI, D., GARBUZ, O. Sinteza, structura și proprietățile compușilor coordinativi ai unor metale 3d cu 4-(dimetilfenil)-tiosemicarbazone ale 2-hidroxi-3-metoxibenzalhidei. In: *Studia Universitatis Moldaviae. Seria "Științe reale și ale naturii"*. 2020, nr. 1(131), pp. 3-15. ISSN 1814-3237.
141. 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.
142. 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-

- ylcarbamoimidaz. In: *Russian Journal of Chemistry*. 2020, nr. 90(4), pp. 630-639. ISSN 1070-3632.
143. 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: *Russian Journal of General Chemistry*. 2020, nr. 90(11), pp. 2120-2127. ISSN 1608-3350.
144. 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.
145. HACIOGLU, M., GUZEL, C.B., SAVAGE, P.B., SEHER BIRTEKSOZ TAN, A. Antifungal susceptibilities, in vitro production of virulence factors and activities of ceragenins against *Candida spp.* Isolated from vulvovaginal candidiasis. In: *Medical Mycology*. 2019, nr. 57, pp. 291–299. ISSN 1460-2709.
146. HART, E., NGUYEN, M., ALLEN, M., et al. A systematic review of the impact of antifungal stewardship interventions in the United States. In: *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. 2019, nr. 18, pp. 24. ISSN 1476-0711.
147. HAWKSWORTH, D. L., LÜCKING, R. Fungal Diversity Revisited: 2.2 to 3.8 Million Species. In: *Microbiology Spectrum*. 2017, nr. 5(4), pp. 5.4.10. ISSN 2165-0497.
148. HEKMATPANAHI, A., SHARIFZADEH, A., SHOKRI, H., ABBASZADEH, S., NIKAEIN, D. Efficacy of *Syzygium aromaticum* Essential Oil on the Growth and Enzymatic Activity of Pathogenic *Candida albicans* Strains. In: *Current Medical Mycology*. 2022, nr. 8 (1), pp. 12-19. ISSN 2423-3420.
149. HOENIGL, M., SALMANTON-GARCÍA, J., WALSH, T.J., et al. Global guideline for the diagnosis and management of rare mould infections: an initiative of the European Confederation of Medical Mycology in cooperation with the International Society for Human and Animal Mycology and the American Society for Microbiology. In: *The Lancet Infectious Diseases*. 2021, nr. 21, pp. e246–257. ISSN 1473-3099.
150. HOUŠŤ, J., SPÍŽEK, J., HAVLÍČEK, V. Antifungal drugs. In: *Metabolites*. 2020, nr. 10(3), pp. E106. ISSN 2218-1989.
151. HOWARD, S.J., CERAR, D., ANDERSON, M.J., et al. Frequency and evolution of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* associated with treatment failure. In: *Emerging Infectious Diseases*. 2009, nr. 15, pp. 1068–1076. ISSN 1080-6059.

152. HUANG, X., YI, Y., YONG, J., SUN, J., SONG, Z., LI, D., LI, Y. Inhibitory effect of berberine hydrochloride against *Candida albicans* and the role of the HOG-MAPK pathway. In: *Journal of Antibiotics*. 2021, nr. 74, pp. 807–816. ISSN 1881-1469.
153. IELASI, F.S., DECANNIERE, K., WILLAERT, R.G. The epithelial adhesin 1 (Epa1p) from the human-pathogenic yeast *Candida glabrata*: Structural and functional study of the carbohydrate-binding domain. In: *Acta Crystallographica Section D*. 2012, nr. 68, pp. 210–217. ISSN 2059-7983.
154. JAFARI, M., SALARI, S., PAKSHIR, K., ZOMORODIAN, K. Exoenzyme activity and possibility identification of *Candida dubliniensis* among *Candida albicans* species isolated from vaginal candidiasis. In: *Microbial Pathogenesis*. 2017, nr. 110, pp. 73–77. ISSN 0882-4010.
155. JALLOW, S., GOVENDER, N.P. Ibrexafungerp: a first-in-class oral triterpenoid glucan synthase inhibitor. In: *Journal of Fungi*. 2021, nr. 7, pp. 163. ISSN 2309-608X.
156. JENSEN, R.H., JOHANSEN, H.K., SØES, L.M., et al. Posttreatment antifungal resistance among colonizing *Candida* isolates in candidemia patients: results from a systematic multicenter study. In: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2015, nr. 60, pp. 1500–1508. ISSN 1098-6596.
157. JOVMIR, T., BURDUNIUC, O., POPA, T. Compus hidrosolubil 2,6-bis(S-metiloziosemicarbazidometiliden)-4-metilfenolato-tricloro-dicupru-hidratat pentru utilizare în calitate de remediu antimicotic. Brevet de invenție MD 4696 C1 2021.02.28. BOPI nr. 5/2020 din 31.05.2020.
158. KANO, R., KIMURA, U., KAKURAI, M., ET, A.L. *Trichophyton indotineae* sp. nov.: a new highly terbinafine-resistant anthropophilic dermatophyte species. In: *Mycopathologia*. 2020, nr. 185, pp. 947–958. ISSN 1573-0832.
159. KAWAGUCHI, H., YAMADA, K., IMOTO, W., et al. The effects of antifungal stewardship programs at a tertiary-care teaching hospital in Japan. In: *Journal of Infection and Chemotherapy*. 2019, nr. 25, pp. 458–462. ISSN 2092-6448.
160. KEIGHLEY, C., GARNHAM, K., HARCH, S.A.J., ROBERTSON, M., CHAW, K., TENG, J.C., CHEN, S.C.A. *Candida auris*: Diagnostic Challenges and Emerging Opportunities for the Clinical Microbiology Laboratory. In: *Current Fungal Infection Reports*. 2021, nr. 15, pp. 116–126. ISSN 1936-377X.
161. KHAN, F., BAMUNUARACHCHI, N.I., PHAM, D.T.N., TABASSUM, N., KHAN, M.S.A., KIM, Y.M. Mixed biofilms of pathogenic *Candida*-bacteria: Regulation

- mechanisms and treatment strategies. In: *Critical Reviews in Microbiology*. 2021, nr. 45, pp. 699–727. ISSN 1549-7828.
- 162.KHANNA, D., BHARTI, S. Luliconazole for the treatment of fungal infections: an evidence-based review. In: *Core evidence*. 2014, nr. 9, pp. 113–124. ISSN 1555-1741.
- 163.KHURANA, A., MASIH, A., CHOWDHARY, A., et al. Correlation of in vitro susceptibility based on MICs and squalene epoxidase mutations with clinical response to terbinafine in patients with tinea corporis/cruris. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2018, nr. 62, pp. e01038–18. ISSN 1098-6596.
- 164.KIM, J.Y. Human fungal pathogens: Why should we learn? In: *Journal of Microbiology*. 2016, nr. 54(3), pp. 145–148. ISSN 1976-3794.
- 165.KIRAZ, N. Molecular techniques for clinical diagnostic mycology. In: *Turk Hij Den Biol Derg*, 2015, nr. 72(3), pp. 263-272. ISSN 1308-2523.
- 166.KONADU, D.G., OWUSU-OFORI, A., YIDANA, Z., BOADU, F., IDDRISU, L.F., ADUGYASI, D., DOSOO, D., AWULEY, R.L., OWUSU-AGYEI, S., ASANTE, K.P. Prevalence of vulvovaginal candidiasis, bacterial vaginosis and trichomoniasis in pregnant women attending antenatal clinic in the middle belt of Ghana. In: *BMC Pregnancy Childbirth*. 2019, nr. 19, pp. 1–10. ISSN 1471-2393.
- 167.KOZEL, T.R., WICKES, B. Fungal Diagnostics. In: *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2014, nr. 4, pp. 1-14. ISSN 2157-1422.
- 168.KULLBERG, B.J., ARENDRUP, M.C. Invasive Candidiasis. In: *New England Journal of Medicine*. 2015, nr. 373, pp. 1445–1456. ISSN 1533-4406.
- 169.LASS – FLORL, C. Current Challenges in the Diagnosis of Fungal Infections. In: *Methods in Molecular Biology*. 2017, nr. 1508, pp. 3-15. ISSN 1064-3745.
- 170.LASTAUSKIENĖ, E., ČEPUTYTĖ, J., GIRKONTAITĖ, I., ZINKEVIČIENĖ, A. Phenotypic Switching of *Candida guilliermondii* is Associated with Pseudohyphae Formation and Antifungal Resistance. In: *Mycopathologia*. 2015, nr. 179, pp. 205–211. ISSN 1573-0832.
- 171.LAU, A., CHEN, S., SLEIMAN, S., SORRELL, T. Current status and future perspectives on molecular and serological methods in diagnostic mycology. In: *Future Microbiology*. 2009, nr. 4, pp. 1185-1222. ISSN 1746-0921.
- 172.LEE, J.H., KIM, Y.G., KHADKE, S.K., YAMANO, A., WATANABE, A., LEE, J. Inhibition of Biofilm Formation by *Candida albicans* and Polymicrobial Microorganisms by Nepodin via Hyphal-Growth Suppression. In: *ACS Infectious Diseases*. 2019, nr. 5, pp. 1177–1187. ISSN 2373-8227.

- 173.LEMA, V.M. Recurrent Vulvo-Vaginal Candidiasis: Diagnostic and Management Challenges in a Developing Country Context. In: *Obstetrics & Gynecology International Journal*. 2017, nr. 7, pp. 00260. ISSN 1879-3479.
- 174.LESTRADE, P.P.A., BUIL, J.B., VAN DER BEEK, M.T., et al . Paradoxal trends in azole-resistant *Aspergillus fumigatus* in a national multicenter surveillance program, the Netherlands, 2013-2018. In: *Emerging Infectious Diseases*. 2020, nr. 26, pp. 1447–1455. ISSN 1080-6059.
- 175.LEWIS, J.S. 2ND, WIEDERHOLD, N.P., WICKES, B.L., PATTERSON, T.F., JORGENSEN, J.H. Rapid emergence of echinocandin resistance in *Candida glabrata* resulting in clinical and microbiologic failure. In: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2013, nr. 57(9), pp. 4559–4561. ISSN 1098-6596.
- 176.LI, W.S., CHEN, Y.C., KUO, S.F., CHEN, F.J., LEE, C.H. The Impact of Biofilm Formation on the Persistence of Candidemia. In: *Frontiers in microbiology*. 2018, nr. 9, pp. 1196. ISSN 1664-302X.
- 177.LINDBERG, E., HAMMARSTRÖM, H., ATAOLLAHY, N., KONDORI, N. Species distribution and antifungal drug susceptibilities of yeasts isolated from the blood samples of patients with candidemia. In: *Scientific Reports*. 2019, nr. 9(1), pp. 3838. ISSN 2045-2322.
- 178.LIU, F., ZHONG, L., ZHOU, F., ZHENG, C., ZHANG, K., CAI, J., ZHOU, H., TANG, K., DONG, Z., CUI, W., et al. Clinical features, strain distribution, antifungal resistance and prognosis of patients with non-albicans candidemia: A retrospective observational study. In: *Infection and Drug Resistance*. 2021, nr. 14, pp. 3233–3246. ISSN 1178-6973.
- 179.LIU, W., LI, L.P., ZHANG, J.D., LI, Q., SHEN, H., CHEN, S.M., HE, L.J., YAN, L., XU, G.T., AN, M.M., JIANG, Y.Y. (2014). Synergistic Antifungal Effect of Glabridin and Fluconazole. In: *PLOS One*. 2014, nr. 9(7), pp. e103442. ISSN 1932-6203.
- 180.LIU, X., LI, T., WANG, D., YANG, Y., SUN, W., LIU, J., SUN, S. Synergistic Antifungal Effect of Fluconazole Combined with Licofelone against Resistant *Candida albicans*. In: *Frontiers in Microbiology*. 2017, nr. 8, pp. 2101. ISSN 1664-302X.
- 181.LOCKHART, S.R., ETIENNE, K.A., VALLABHANENI, S., FAROOQI, J., CHOWDHARY, A., GOVENDER, N.P., et al. Simultaneous emergence of multidrug-resistant *Candida auris* on 3 continents confirmed by whole-genome sequencing and epidemiological analyses. In: *Clinical Infectious Diseases*. 2017, nr. 64(2), pp. 134–140. ISSN 1537-6591.
- 182.LOCKHART, S.R., GUARNER, J. Emerging and reemerging fungal infections. In: *Seminars in Diagnostic Pathology*. 2019, nr. 36(3), pp. 177–181. ISSN 0740-2570.

- 183.LOHSE, M.B., GULATI, M., JOHNSON, A.D., NOBILE, C.J. Development and regulation of single-and multi-species *Candida albicans* biofilms. In: *Nature Review Microbiology*. 2018, nr. 16, pp. 19–31. ISSN 1740-1534.
- 184.LOPES, J.P., LIONAKIS, M.S. Pathogenesis and virulence of *Candida albicans*. In: *Virulence*. 2022, nr. 13, pp. 89–121. ISSN 2150-5608.
- 185.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.
- 186.LOZAN-TÎRȘU, C. *Efecte antimicrobiene ale unor substanțe chimice din produse autohtone: tz. de doct. în medicină*. Chișinău, 2016. 167p.
- 187.LYU, X., ZHAO, C., YAN, Z.M., HUA, H. Efficacy of nystatin for the treatment of oral candidiasis: A systematic review and meta-analysis. In: *Drug Design, Development and Therapy*. 2016, nr. 10, pp. 1161–1171. ISSN 1177-8881.
- 188.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.
- 189.MACHADO, M., CHAMORRO DE VEGA, E., MARTÍNEZ-JIMÉNEZ MDEL, C., et al. Utility of 1,3 β -D-glucan assay for guidance in antifungal stewardship programs for oncologic patients and solid organ transplant recipients. In: *Journal of Fungi*. 2021, nr. 7, pp. 59. ISSN 2309-608X.
- 190.MAHOUDI, S., BADALI, H., REZAIE, S., AZARNEZHAD, A., BARAC, A., KORD, M., et al. A simple and low-cost tetra-primer ARMS-PCR method for detection triazole-resistant *Aspergillus fumigatus*. In: *Molecular Biology Reports*. 2019, nr. 46(4), pp. 4537–4543. ISSN 1573-4978.
- 191.MALCOK, H.K., AKTAS, E., AYYILDIZ, A., YIGIT, N., YAZGI, H. Hemolytic activities of the *Candida* species in liquid medium. In: *The Eurasian Journal of Medicine*. 2009, nr. 41(2), pp. 95–98. ISSN 1308-8742.
- 192.MALHOTRA, S., SHARMA, S., BHATIA, N.J., KUMAR, P., BHATIA, N.K., PATIL, V., HANS, C. Recent diagnostic techniques in mycology. In: *Journal of Medical Microbiology & Diagnosis*. 2014, nr. 3, pp. 146-148. ISSN 2161-0703.
- 193.MAPHANGA, T.G., NAICKER, S.D., KWENDA, S., MUÑOZ, J.F., SCHALKWYK, E., WADULA, J., NANA, T., ISMAIL, A., COETZEE, J., GOVIND, C., et al. In-vitro antifungal resistance of *Candida auris* isolates from bloodstream infections, South Africa. In: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2021, nr. 65, pp. e0051721. ISSN 1098-6596.

194. MARTÍN-GUTIÉRREZ, G., PEÑALVA, G., RUIZ-PÉREZ DE PIPAÓN, M., et al. Efficacy and safety of a comprehensive educational antimicrobial stewardship program focused on antifungal use. In: *Journal of Infection*. 2020, nr. 80, pp. 342–349. ISSN 0163-4453
195. MAYER, F.L., WILSON, D., HUBE, B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. In: *Virulence*. 2013, nr. 4, pp. 119–128. ISSN 2150-5608.
196. MCKLOUD, E., DELANEY, C., SHERRY, L., KEAN, R., WILLIAMS, S., METCALFE, R., THOMAS, R., RICHARDSON, R., GERASIMIDIS, K., NILE, C.J., et al. Recurrent Vulvovaginal Candidiasis: A Dynamic Interkingdom Biofilm Disease of *Candida* and *Lactobacillus*. In: *mSystems*. 2021, nr. 6, pp. e00622-21. ISSN 2379-5077.
197. MELHA, K.S.A. (2008). *In-vitro* antibacterial, antifungal activity of some transition metal complexes of thiosemicarbazone Schiff base (HL) derived from N⁴-(7'-chloroquinolin-4'-ylamino) thiosemicarbazide. In: *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. 2008, nr. 23(4), pp. 493–503. ISSN 1475-6366.
198. MIHALCIUC, O., PROCOPIȘIN, L., RUDIC, V. Influența polizaharidelor sulfatate din *Spirulina platensis* asupra profilului citokinic sanguin în normă și astmul bronșic asociat. In: *Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științe Medicale*. 2016, 1(50), pp. 220-224. ISSN 1857-0011.
199. 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. In: *Buletinul Academiei de Științe a Moldovei: Științe Medicale*. 2017, nr. 2 (54), pp. 91-97. ISSN 1857-0011.
200. MULLA, A.F., AMISHA, A., AJIT, V.K., MAYANK, M. Laboratory Diagnosis of Fungal Infection. In: *Universal Research Journal of Dentistry*. 2015, nr. 5(2), pp. 49-53. ISSN 2249-9725.
201. MUNK, P., BRINCH, C., MØLLER, F. D., **BURDUNIUC, O.** et al. Genomic analysis of sewage from 101 countries reveals global landscape of antimicrobial resistance. In: *Nature Communications*. 2022, nr. 13, pp. 7251. ISSN 2041-1723.
202. MUZNY, C.A., SCHWEBKE, J.R. Biofilms: An underappreciated mechanism of treatment failure and recurrence in vaginal infections. In: *Clinical Infectious Diseases*. 2015, nr. 61, pp. 601–606. ISSN 1537-6591.

- 203.MYERS, L.C. Mediator tail module is required for Tac1-activated CDR1 expression and azole resistance in *Candida albicans*. In: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2017, nr. 61, pp. e01342-17. ISSN 1098-6596.
- 204.NAGLIK, J.R., RODGERS, C.A., SHIRLAW, P.J., DOBBIE, J.L., FERNANDES-NAGLIK, L.L., GREENSPAN, D., AGABIAN, N., CHALLACOMBE, S.J. Differential Expression of *Candida albicans* Secreted Aspartyl Proteinase and Phospholipase B Genes in Humans Correlates with Active Oral and Vaginal Infections. In: *The Journal of Infectious Diseases*. 2003, nr. 188, pp. 469–479. ISSN 1537-6613.
- 205.NAICKER, S.D., GOVENDER, N., PATEL, J., ZIETSMAN, I.L., WADULA, J., COOVADIA, Y., KULARATNE, R., SEETHARAM, S., GOVENDER, N.P. Comparison of species-level identification and antifungal susceptibility results from diagnostic and reference laboratories for bloodstream *Candida* surveillance isolates, South Africa, 2009–2010. In: *Medical Mycology*. 2016, nr. 54, pp. 816–824. ISSN 1460-2709.
- 206.NAICKER, S.D., MPEMBE, R.S., MAPHANGA, T.G., et al. Decreasing fluconazole susceptibility of clinical South African *Cryptococcus neoformans* isolates over a decade. In: *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 2020, nr. 14, pp. e0008137. ISSN 1935-2735.
- 207.NEWTON, P.J., HARRIS, C., DENNING, D.W. Impact of AmBisome therapy on chronic pulmonary aspergillosis. In: *Journal of Infection*. 2016, nr. 73, pp. 485–495. ISSN 0163-4453.
- 208.NGOC TOAN, V., DINH THANH, N., MINH TRI, N., THI THU HUONG, N. (2020). Synthesis and biological screening of thiosemicarbazones of substituted 3-acetylcoumarins having d-glucose moiety. In: *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2020, nr. 30(24), pp. 127664. ISSN 0960-894X.
- 209.NOBILE, C.J., JOHNSON, A.D. *Candida albicans* Biofilms and Human Disease. In: *Annual Review of Microbiology*. 2015, nr. 69, pp. 71–92. ISSN 1545-3251.
- 210.NOORI, M., DAKHILI, M., SEPAHVAND, A., DAVARI, N. Evaluation of esterase and hemolysin activities of different *Candida* species isolated from vulvovaginitis cases in Lorestan Province, Iran. In: *Current Medical Mycology*. 2017, nr. 3(4), pp. 1–5. ISSN 2423-3420.
- 211.NOURAEI, H., PAKSHIR, K., ZARESHAHRABADI, Z., ZOMORODIAN, K. High detection of virulence factors by *Candida* species isolated from bloodstream of patients with candidemia. In: *Microbial Pathogenesis*. 2020, nr. 149, pp. 104574. ISSN 0882-4010.

212. NOVAK-FRAZER, L., ANEES-HILL, S.P., HASSAN, D. Deciphering *Aspergillus fumigatus* triazole resistance in situ in respiratory specimens via pyrosequencing of cyp51A. In: *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2020, nr. 75, pp. 3501–3509. ISSN 1460-2091.
213. NYWENING, A.V., RYBAK, J.M., ROGERS, P.D., et al. Mechanisms of triazole resistance in *Aspergillus fumigatus*. In: *Environmental Microbiology*. 2020, nr. 22, pp. 4934–4952. ISSN 1462-2920.
214. 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.
215. Oltu, I.U. *Acțiunea antifungică in vitro a remediilor de origine biologică și chimică asupra unor agenți cauzali ai micozelor: tz. de doct. în științe medicale*. Chișinău, 2018. 161 p.
216. OUT, A.A., BONGOMIN, F., BAZAZ, R., et al. Micafungin may be safely administered as outpatient parenteral antimicrobial therapy for chronic pulmonary aspergillosis. In: *Mycoses*. 2019, nr. 2, pp. 152–156. ISSN 1439-0507.
217. 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, 18(8), pp. 8812-8836. ISSN 1420-3049.
218. 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.
219. 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, nr. 69(11), pp. 2959-2963. ISSN 0034-7752.
220. PAIS, P., GALOCHA, M., VIANA, M., CAVALHEIRO, M., PEREIRA, D., TEIXEIRA, M.C. Microevolution of the pathogenic yeasts *Candida albicans* and *Candida glabrata* during antifungal therapy and host infection. In: *Microbial Cell*. 2019, nr. 6(3), pp. 142–159. ISSN 2311-2638.
221. PAKSHIR, K., ZOMORODIAN, K., KARAMITALAB, M., JAFARI, M., TARAZ, H., EBRAHIMI, H. (2013). Phospholipase, esterase and hemolytic activities of *Candida spp.* Isolated from onychomycosis and oral lichen planus lesions. In: *Journal De Mycologie Medicale*. 2013, nr. 3(2), pp. 113–118. ISSN 1773- 0449.

- 222.PANDEY, N., GUPTA, M.K., TILAK, R. Extracellular hydrolytic enzyme activities of the different *Candida* spp. isolated from the blood of the Intensive Care Unit-admitted patients. In: *Journal of Laboratory Physicians*. 2018, nr. 10(4), pp. 392-396. ISSN 0974-2727.
- 223.PARII, S. *Eficientizarea diagnosticului și farmacoterapiei afecțiunilor analizatorului auditiv: tz. de doct. habilitat în științe medicale*. Chișinău, 2021. 305 p.
- 224.PATEL, T.S., CARVER, P.L., ESCHENAUER, G.A. Are in vitro susceptibilities to azole antifungals predictive of clinical outcome in the treatment of candidemia? In: *Journal of Clinical Microbiology*. 2018, nr. 56(12). ISSN 1098-660X.
- 225.PATHAKUMARI, B., LIANG, G., LIU, W. Immune defence to invasive fungal infections: A comprehensive review. In: *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2020, nr. 130, pp. 110550. ISSN 0753-3322.
- 226.PATTERSON, T.F., THOMPSON, G.R., DENNING, D.W., FISHMAN, J.A., HADLEY, S., HERBRECHT, R., et al. Practice guidelines for the diagnosis and management of aspergillosis: 2016 update by the infectious diseases society of America. In: *Clinical Infectious Diseases*. 2016, nr. 63(4), pp. e1–e60. ISSN 1537-6591.
- 227.PELZER, B.W., SEUFERT, R., KOLDEHOFF, M., et al. Performance of the AsperGenius® PCR assay for detecting azole resistant *Aspergillus fumigatus* in BAL fluids from allogeneic HSCT recipients: a prospective cohort study from Essen, West Germany. In: *Medical Mycology*. 2020, nr. 58, pp. 268–271. ISSN 1369-3786.
- 228.PENG, Z., TANG, J. Intestinal Infection of *Candida albicans*: Preventing the Formation of Biofilm by *C. albicans* and Protecting the Intestinal Epithelial Barrier. In: *Frontiers in microbiology*. 2022, nr. 12, pp. 783010. ISSN 1664-302X.
- 229.PEREIRA, R., DOS SANTOS FONTENELLE, R.O., DE BRITO, E.H.S., DE MORAIS, S.M. Biofilm of *Candida albicans*: Formation, regulation and resistance. In: *Journal of Applied Microbiology*. 2021, nr. 131, pp. 11–22. ISSN 1365-2672.
- 230.PERFECT, J.R. The antifungal pipeline: A reality check. In: *Nature Reviews Drug Discovery*. 2017, nr. 16, pp. 603–616. ISSN 1474-1776.
- 231.PERLIN, D.S. Echinocandin resistance in *Candida*. In: *Clinical Infectious Diseases*. 2015, nr. 61(Suppl 6), pp. S612–S617. ISSN 1537-6591.
- 232.PERLIN, D.S., RAUTEMAA-RICHARDSON, R., ALASTRUEY-IZQUIERDO, A. The global problem of antifungal resistance: prevalence, mechanisms, and management. In: *The Lancet Infectious Diseases*. 2017, nr. 17(12), pp. e383–e392. ISSN 1473-3099.

233. PERLIN, D.S., WIEDERHOLD, N.P. Culture-independent molecular methods for detection of antifungal resistance mechanisms and fungal identification. In: *The Journal of Infectious Diseases*. 2017, nr. 216(suppl_3), pp. S458–S465. ISSN 1537-6613.
234. PIERCE, C.G., SRINIVASAN, A., RAMASUBRAMANIAN, A.K., LÓPEZ-RIBOT, J.L. From Biology to Drug Development: New Approaches to Combat the Threat of Fungal Biofilms. In: *Microbiology spectrum*. 2015, nr. 3(3). ISSN 2165-0497.
235. 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.
236. PRINGENT, G., AIT-AMMAR, N., LEVESQUE, E., FEKKAR, A., COSTA, J.M., EL ANBASSI, S., FOULET, F., DUVOUX, C., MERLE, J.C., DANNAOUI, E., et al. Echinocandin resistance in *Candida* species isolates from liver transplant recipients. In: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2017, nr. 61, pp. e01229-16. ISSN 1098-6596.
237. PRISACARI, V., BERDEU, I., SPATARU, D., NASTAS, A. Rezultatele studiului de evaluare a antibioticorezistenței microbiene în condițiile Republicii Moldova. In: *Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științe Medicale*. 2016, nr. 2(51), pp. 53-68. ISSN 1857-0011.
238. RAMAGE, G., MARTÍNEZ, J.P., LÓPEZ-RIBOT, J.L. *Candida* biofilms on implanted biomaterials: A clinically significant problem. In: *FEMS Yeast Research*. 2006, nr. 6, pp. 979–986. ISSN 1567-1364.
239. RASHEED, T., BILAL, M., IQBAL, H.M.N., LI, C. Green biosynthesis of silver nanoparticles using leaves extract of *Artemisia vulgaris* and their potential biomedical applications. In: *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2017, nr. 158, pp. 408–415. ISSN 0927-7765.
240. RAUTEMAA-RICHARDSON, R., RAUTEMAA, V., AL-WATHIQI, F., et al. Impact of a diagnostics-driven antifungal stewardship programme in a UK tertiary referral teaching hospital. In: *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2018, nr. 73, pp. 3488–3495. ISSN 1460-2091.
241. 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>.

242. REVIE, N.M., IYER, K.R., ROBBINS, N., COWEN, L.E. Antifungal drug resistance: Evolution, mechanisms and impact. In: *Current Opinion in Microbiology*. 2018, nr. 45, pp. 70–76. ISSN 1369-5274.
243. RICHARDSON, J.P., WILLEMS, H.M.E., MOYES, D.L., SHOAIE, S., BARKER, K.S., TAN, L., PALMER, G.E., HUBE, B., NAGLIK, J.R., PETERS, M. Candidalysin Drives Epithelial Signaling, Neutrophil Recruitment, and Immunopathology at the Vaginal Mucosa. In: *Infection and immunity*. 2018, nr. 86, pp. e00645-17. ISSN 1098-5522.
244. RODRIGUES, C.F., RODRIGUES, M.E., HENRIQUES, M. *Candida sp.* infections in patients with diabetes mellitus. In: *Journal of Clinical Medicine*. 2019, nr. 8, pp. 76. ISSN 2077-0383.
245. RODRIGUES, M.E., GOMES, F., RODRIGUES, C.F. *Candida spp./bacteria* mixed biofilms. In: *Journal of Fungi*. 2020, nr. 6, pp. 5. ISSN 2309-608X.
246. RODRÍGUEZ-CERDEIRA, C., GREGORIO, M.C., MOLARES-VILA, A., LÓPEZ-BARCENAS, A., FABBROCINI, G., BARDHI, B., SINANI, A., SÁNCHEZ-BLANCO, E., ARENAS-GUZMÁN, R., HERNANDEZ-CASTRO, R. Biofilms and vulvovaginal candidiasis. In: *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2019, nr. 174, pp. 110–125. ISSN 1873-4367.
247. ROSELLETTI, E., PERITO, S., GABRIELLI, E., MENCACCI, A., PERICOLINI, E., SABBATINI, S., CASSONE, A., VECCHIARELLI, A. NLRP3 inflammasome is a key player in human vulvovaginal disease caused by *Candida albicans*. In: *Scientific Reports*. 2017, nr. 7, pp. 17877. ISSN 2045-2322.
248. ROSELLETTI, E., PERITO, S., SABBATINI, S., MONARI, C., VECCHIARELLI, A. Vaginal Epithelial Cells discriminate between yeast and hyphae of *C. albicans* in women who are colonized with or have vaginal candidiasis. In: *The Journal of Infectious Diseases*. 2018, nr. 10, pp. 1645–1654. ISSN 1537-6613.
249. ROSSONI, R.D., BARBOSA, J.O., VILELA, S.F.G., JORGE, A.O.C., JUNQUEIRA, J.C. Comparison of the hemolytic activity between *C. albicans* and non-albicans *Candida* species. In: *Brazilian Oral Research*. 2013, nr. 27(6), pp. 484–489. ISSN 1807-3107.
250. 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.
251. 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. In: *Studia*

- Universitatis Moldaviae. Seria "Științe Reale și ale Naturii"*. Chișinău, 2020, nr. 1(131), pp. 32-37. ISSN 1814-3237.
- 252.RYBAK, J.M., GE, W., WIEDERHOLD, N.P., PARKER, J.E., KELLY, S.L., ROGERS, P.D., et al. Mutations in *hmg1*, challenging the paradigm of clinical triazole resistance in *Aspergillus fumigatus*. In: *MBio*. 2019, nr. 10(2), pp. e00437-19. ISSN 2150-7511.
- 253.RYBAK, J.M., MUÑOZ, J.F., BARKER, K.S., et al. Mutations in TAC1B: a novel genetic determinant of clinical fluconazole resistance in *Candida auris*. In: *MBio*. 2020, nr. 11, pp. e00365–20. ISSN 2150-7511.
- 254.SALSE, M., GANGNEUX, J.P., CASSAING, S., DELHAES, L., FEKKAR, A., DUPONT, D., BOTTEREL, F., COSTA, D., BOURGEOIS, N., BOUTEILLE, B., et al. Multicentre study to determine the Etest epidemiological cut-off values of antifungal drugs in *Candida spp.* and *Aspergillus fumigatus* species complex. In: *Clinical Microbiology and Infection*. 2019, nr. 25, pp. 1546–1552. ISSN 1198-743X.
- 255.SANGUINETTI, M., POSTERARO, B., FIORI, B., RANNO, S., TORELLI, R., FADDA, G. Mechanisms of azole resistance in clinical isolates of *Candida glabrata* collected during a hospital survey of antifungal resistance. In: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2005, nr. 49, pp. 668–679. ISSN 1098-6596.
- 256.SAV, H., RAFATI, H., ÖZ, Y., DALYAN-CILO, B., ENER, B., MOHAMMADI, F., ILKIT, M., VAN DIEPENINGEN, A.D., SEYEDMOUSAVI, S. Biofilm Formation and Resistance to Fungicides in Clinically Relevant Members of the Fungal Genus *Fusarium*. In: *Journal of Fungi*. 2018, nr. 4(1), pp. 16. ISSN 2309-608X.
- 257.SCHELENZ, S., BARNES, R.A., BARTON, R.C. British Society for Medical Mycology: diagnostic standards for the management of serious fungal diseases. In: *The Lancet Infectious Diseases*. 2015, nr. 15, pp. 461–474. ISSN 1473-3099.
- 258.SEYEDMOUSAVI, S., BRUGGEMANN, R.J., MEIS, J.F., MELCHERS, W.J., VERWEIJ, P.E., MOUTON, J.W. Pharmacodynamics of isavuconazole in an *Aspergillus fumigatus* mouse infection model. In: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2015, nr. 59(5), pp. 2855–2866. ISSN 0066-4804.
- 259.SHAW, K.J., IBRAHIM, A.S. Fosmanogepix: a review of the first-in-class broad spectrum agent for the treatment of invasive fungal infections. In: *Journal of Fungi*. 2020, nr. 6, pp. 239. ISSN 2309-608X.
- 260.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.

261. SHERRY, L., KEAN, R., MCKLOUD, E., DONNELL, L.E.O., METCALFE, R., JONES, B.L. Biofilms formed by isolates from patients are heterogeneous and insensitive to fluconazole. In: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2017, nr. 61, pp. e01065-17. ISSN 1098-6596.
262. SINGH, D.K., TÓTH, R., GÁCSEK, A. Mechanisms of Pathogenic *Candida* Species to Evade the Host Complement Attack. In: *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2020, nr. 10, pp. 94. ISSN 2235-2988.
263. SINGH, S., FATIMA, Z., HAMEED, S. Predisposing factors endorsing *Candida* infections. In: *Infezioni in Medicina*. 2015, nr. 23, pp. 211–223. ISSN 2532-8689.
264. SINH, C.T., LOI, C.B., MINH, N.T.N. et al. Species Distribution and Antifungal Susceptibility Pattern of *Candida* Recovered from Intensive Care Unit Patients, Vietnam National Hospital of Burn (2017–2019). In: *Mycopathologia*. 2021, nr. 186, pp. 543–551. ISSN 1573-0832.
265. 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.
266. SMIRNOV, O., KALYNOVSKIY, V., YUMYNA, Y. et al. Potency of phytosynthesized silver nanoparticles from *Lathraea squamaria* as anticandidal agent and wheat seeds germination enhancer. In: *Biologia*. 2022, nr. 77, pp. 2715–2724. ISSN 1336-9563.
267. SOBEL, J.D. Editorial Commentary: Vaginal Biofilm: Much Ado about Nothing, or a New Therapeutic Challenge? In: *Clinical Infectious Diseases*. 2015, nr. 61, pp. 607–608. ISSN 1537-6591
268. SOBEL, J.D., SOBEL, R. Current treatment options for vulvovaginal candidiasis caused byazole-resistant *Candida* species. In: *Expert Opinion on Pharmacotherapy*. 2018, nr. 19, pp. 971–977. ISSN 1744-7666.
269. SOLIMAN, A.A. et al. Comparison of estimates using record statistics from Weibull model: Bayesian and non-Bayesian approaches. In: *Computational Statistics and Data Analysis*. 2012, nr. 56(8), pp. 2471–2485. ISSN 0167-9473.
270. SOUZA, R. A. C., CUNHA, V. L., DE SOUZA, J. H., MARTINS, C. H. G., FRANCA, E. DE F., PIVATTO, M., ELLENA, J. A., FAUSTINO, L. A., PATROCINIO, A. O. DE T., DEFLON, V. M., MAIA, P. I. DA S., & OLIVEIRA, C. G. (2022). Zinc(II) complexes bearing N,N,S ligands: Synthesis, crystal structure, spectroscopic analysis, molecular docking and biological investigations about its antifungal activity. In: *Journal of Inorganic Biochemistry*. 2022, nr. 237, pp. 111995. ISSN 0162-0134.

271. STANISZEWSKA, M., BONDARYK, M., KOWALSKA, M., MAGDA, U., ŁUKA, M., OCHAL, Z., KURZAŃKOWSKI, W. Pathogenesis and treatment of fungal infections by *Candida spp.* In: *Postępy Mikrobiologii - Advancements of Microbiology*. 2014, nr. 53, pp. 229–240. ISSN 0079-4252.
272. STEINMANN, J., HAMPRECHT, A., VEHRESCHILD, M. J., CORNELLY, O. A., BUCHHEIDT, D., SPIESS, B., et al. Emergence of azole-resistant invasive aspergillosis in HSCT recipients in Germany. In: *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2015, nr. 70(5), pp. 1522–1526. ISSN 1460-2091.
273. STONE, N. R., RHODES, J., FISHER, M. C., et al. Dynamic ploidy changes drive fluconazole resistance in human cryptococcal meningitis. In: *Journal of Clinical Investigation*. 2019, nr. 129, pp. 999–1014. ISSN 1558-8238.
274. SUE, M. J., YEAP, S. K., OMAR, A. R., TAN, S. W. Application of PCR -ELISA in Molecular Diagnosis. In: *Bio Med Research International*. 2014, 4, pp. 1-6. ISSN 2314-6141.
275. 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.
276. SWIDSINSKI, A., GUSCHIN, A., TANG, Q., DÖRFFEL, Y., VERSTRAELEN, H., TERTYCHNYI, A., KHAYRULLINA, G., LUO, X., SOBEL, J.D., JIANG, X. Vulvovaginal candidiasis: Histologic lesions are primarily polymicrobial and invasive and do not contain biofilms. In: *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2019, nr. 220, pp. e1–e91. ISSN 1097-6868.
277. TAEI, M., CHADEGANIPOUR, M., MOHAMMADI, R. An alarming rise of non-albicans *Candida* species and uncommon yeasts in the clinical samples; a combination of various molecular techniques for identification of etiologic agents. In: *BMC Research Notes*. 2019, nr. 12, pp. 779. ISSN 1756-0500.
278. TAGADIUC, O., ANDRONACHE, L., ȘTÎRBA O., SARDARI, V., PANTEA, V. Determinarea glutation peroxidazei. *Certificat de inovator nr. 5161 din 26.10.2012.*
279. TAGADIUC, O., GUDUMAC, V., PANTEA, V. Procedeu de dozare a activității superoxid dismutazei. *Certificat de inovator nr. 4891 din 15.07.2010.*
280. TAGADIUC, O., SARDARI, V., ANDRONACHE, L., ȘTÎRBA, O., PANTEA, V. Determinarea glutation-Stransferazei (GST). *Certificat de inovator nr. 5163 din 29.10.2012.*
281. TAJ-ALDEEN, S.J., SALAH, H., PEREZ, W.B., ALMASLAMANI, M., MOTYL, M., ABDUL-WAHAB, A., HEALEY, K.R., PERLIN, D.S. Molecular analysis of resistance and detection of non-wild-type strains using Etest epidemiological cutoff values for

- amphotericin B and echinocandins for bloodstream *Candida* infections from a tertiary hospital in Qatar. In: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2018, nr. 62, pp. e00214-18. ISSN 1098-6596.
282. TALAPKO, J., JUZBAŠIĆ, M., MATIJEVIĆ, T., PUSTIJANAC, E., BEKIĆ, S., KOTRIS, I., ŠKRLEC, I. *Candida albicans* - the virulence factors and clinical manifestations of infection. In: *Journal of Fungi*. 2021, nr. 7, pp. 79. ISSN 2309-608X.
283. TAN, B. H., CHAKRABARTI, A., LI, R., et al. Incidence and species distribution of candidaemia in Asia: a laboratory-based surveillance study. In: *Clinical Microbiology and Infection*. 2015, 21, pp. 946–953. ISSN 1198-743X.
284. TANG, Y., YU, F., HUANG, L., HU, Z. The changes of antifungal susceptibilities caused by the phenotypic switching of *Candida* species in 229 patients with vulvovaginal candidiasis. In: *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. 2019, nr. 33, pp. e22644. ISSN 1098-2825.
285. 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.
286. TODA, M., WILLIAMS, S.R., BERKOW, E.L., FARLEY, M.M., HARRISON, L.H., BONNER, L., et al. Population-based active surveillance for culture-confirmed candidemia — four sites, United States, 2012–2016. In: *MMWR Surveillance Summaries*. 2019, nr. 68, pp. 1–15. ISSN 1546-0738.
287. TRUONG, T., SURIYANARAYANAN, T., ZENG, G., LE, T.D., LIU, L., LI, J., TONG, C., WANG, Y., SENEVIRATNE, C.J. Use of Haploid Model of *Candida albicans* to Uncover Mechanism of Action of a Novel Antifungal Agent. In: *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2018, nr. 8, pp. 164. ISSN 2235-2988.
288. 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.
289. TULASIDAS, S., RAO, P., BHAT, S., MANIPURA, R. A study on biofilm production and antifungal drug resistance among *Candida* species from vulvovaginal and bloodstream infections. In: *Infection and Drug Resistance*. 2018, nr. 11, pp. 2443–2448. ISSN 1178-6973.
290. TULLIO, V., ROANA, J., SCALAS, D., & MANDRAS, N. Evaluation of the Antifungal Activity of *Mentha x piperita* (Lamiaceae) of Pancalieri (Turin, Italy) Essential Oil and Its

- Synergistic Interaction with Azoles. In: *Molecules*. 2019, nr. 24(17), pp. 3148. ISSN 1420-3049.
291. TURECKA, K., CHYLEWSKA, A., KAWIAK, A., WALERON, K. F. Antifungal Activity and Mechanism of Action of the Co(III) Coordination Complexes With Diamine Chelate Ligands Against Reference and Clinical Strains of *Candida spp.* In: *Frontiers in Microbiology*. 2018, nr. 9, pp. 1594. ISSN 1664-302X.
292. UPPULURI, P., PIERCE, C. G., LÓPEZ-RIBOT, J. L. *Candida albicans* biofilm formation and its clinical consequences. In: *Future Microbiology*. 2009, nr. 4(10), pp. 1235–1237. ISSN 1746-0921.
293. 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. In: *Studia Universitatis Moldaviae Seria "Științe reale și ale naturii"*. 2018, nr. 6(11), pp. 89-96. ISSN 1814-3237.
294. VALONES, M. A. A., GUIMARAES, R. L., BRANDAO, L. A. C., SOUZA, P. R.E., CARVALHO, A. T., CROVELA, S. Principles and applications of Polymerase chain reaction in medical diagnostic fields: a review. In: *Brazilian Journal of Microbiology*. 2009, nr. 40, pp. 1-11. ISSN 1678-4405.
295. VAN DAELE, R., SPRIET, I., WAUTERS, J., MAERTENS, J., MERCIER, T., VAN HECKE, S., BRÜGGEMANN, R. Antifungal drugs: What brings the future? In: *Medical Mycology*. 2019, nr. 57, pp. S328–S343. ISSN 1460-2709.
296. VAN DIJCK, P., JSJOLLEMA, J., CAMMUE, B. P., LAGROU, K., et al. Methodologies for *in vitro* and *in vivo* evaluation of efficacy of antifungal and antibiofilm agents and surface coatings against fungal biofilms. In: *Microbial Cell*. 2018, nr. 5(7), pp. 300–326. ISSN 2311-2638.
297. VAN SCHALKWYK, E., MPEMBE, R. S., THOMAS, J., et al. Epidemiologic shift in candidemia driven by *Candida auris*, South Africa, 2016-2017. In: *Emerging Infectious Diseases*. 2019, nr. 25, pp. 1698–1707. ISSN 1080-6059.
298. VENA, A., BOUZA, E., CORISCO, R., et al. Efficacy of a "checklist" intervention bundle on the clinical outcome of patients with candida bloodstream infections: a quasi-experimental pre-post study. In: *Infectious Diseases and Therapy*. 2020, nr. 9, pp. 119–135. ISSN 2193-6382.

299. VENA, A., MUNOZ, P., GUINEA, J., ESCRIBANO, P., PELAEZ, T., VALERIO, M., et al. Fluconazole resistance is not a predictor of poor outcome in patients with cryptococcosis. In: *Mycoses*. 2019, nr. 62(5), pp. 441–449. ISSN 1439-0507.
300. VERA-GONZÁLEZ, N., SHUKLA, A. Advances in Biomaterials for the Prevention and Disruption of *Candida* Biofilms. In: *Frontiers in microbiology*. 2020, nr. 11, pp. 2251. ISSN 1664-302X.
301. VERMA, S.B. Topical corticosteroid misuse in India is harmful and out of control. In: *BMJ*. 2015, nr. 351, pp. h6079. ISSN 1756-1833.
302. VERWEIJ, P. E., LUCAS, J. A., ARENDRUP, M. C., et al. The one health problem of azole resistance in *Aspergillus fumigatus*: current insights and future research agenda. In: *Fungal Biology Reviews*. 2020, nr. 34, pp. 202–214. ISSN 1749-4613.
303. VERWEIJ, P.E., HOWARD, S.J., MELCHERS, W.J.G., et al. Azole-resistance in *Aspergillus*: proposed nomenclature and breakpoints. In: *Drug Resistance Updates*. 2009, nr. 12, pp. 141–147. ISSN 1368-7646.
304. VIJAYAN, S., KOILPARAMBIL, D., VARGHESE, S., SHANAVAS, J. Antifungal efficacy of chitosan-stabilized biogenic silver nanoparticles against pathogenic *Candida spp.* isolated from human. In: *BioNanoScience*. 2020, 10, pp. 974–982. ISSN 2191-1630.
305. VILA, T., ROMO, J.A., PIERCE, C.G., MCHARDY, S.F., SAVILLE, S.P., LOPEZ-RIBOT, J.L. Targeting *Candida albicans* filamentation for antifungal drug development. In: *Virulence*. 2017, nr. 8, pp. 150–158. ISSN 2150-5608.
306. VILA, T., SULTAN, A.S., MONTELONGO-JAUREGUI, D., JABRA-RIZK, M.A. Oral candidiasis: A disease of opportunity. In: *Journal of Fungi*. 2020, nr. 6, pp. 15. ISSN 2309-608X.
307. WALL, G., LOPEZ-RIBOT, J. L. Current antimycotics, new prospects, and future approaches to antifungal therapy. In: *Antibiotics*. 2020, nr. 9(8), pp. 445. ISSN 2079-6382.
308. WANG, J., ZHANG, X., GAO, L., WANG, L., SONG, F., ZHANG, L., WAN, Y. The synergistic antifungal activity of resveratrol with azoles against *Candida albicans*. In: *Letters in Applied Microbiology*. 2021, nr. 72(6), pp. 688–697. ISSN 1472-765X.
309. WANG, Q., KONTOYIANNIS, D. P., LI, R., et al. A novel broad allele-specific TaqMan real-time PCR method to detect triazole-resistant strains of *Aspergillus fumigatus*, even with a very low percentage of triazole-resistant cells mixed with triazole-susceptible cells. In: *Journal of Clinical Microbiology*. 2019, nr. 57, pp. e00604–19. ISSN 0095-1137.
310. WANG, Y. Looking into *Candida albicans* infection, host response, and antifungal strategies. In: *Virulence*. 2015, nr. 6, pp. 307–308. ISSN 2150-5608.

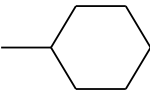
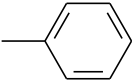
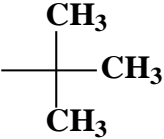
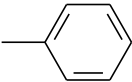
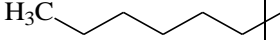
311. WHO. The top 10 causes of death. 2018. Available at <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>. [Accesat 15.05.2020]
312. WIEDERHOLD, N. P. Review of the novel investigational antifungal Olorofim. In: *Journal of Fungi*. 2020, nr. 6, pp. 122. ISSN 2309-608X.
313. WIEDERHOLD, N.P. Antifungal resistance: current trends and future strategies to combat. In: *Infection and Drug Resistance*. 2017, nr. 10, pp. 249-259. ISSN 1178-6973.
314. WILLEMS, H.M.E., AHMED, S.S., LIU, J., XU, Z., PETERS, B.M. Vulvovaginal candidiasis: A current understanding and burning questions. In: *Journal of Fungi*. 2020, nr. 6, pp. 27. ISSN 2309-608X.
315. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global antimicrobial resistance surveillance system (GLASS). Available: <https://www.who.int/glass/en/> [Accesat 22.05.2021]
316. WORLD HEALTH ORGANIZATION. The selection and use of essential *in vitro* diagnostics - TRS 1031. In: *WHO Technical Report Series*. 2021, nr. 1031. Available: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240019102> [Accesat 08.05.2021].
317. WRÓBLEWSKA, M., SULIK-TYSZKA, B. *Candida auris* - Epidemiology and laboratory diagnostics of infections. In: *Diagnostyka Laboratoryjna*. 2017, nr. 3, pp. 235–240. ISSN 0867-4043.
318. XU, H., SU, X., LIU, X. Q., ZHANG, K.P., HOU, Z., GUO, C. (2019). Design, synthesis and biological evaluation of novel semicarbazone-selenochroman-4-ones hybrids as potent antifungal agents. In: *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2019, nr. 29(23), pp. 126726. ISSN 0960-894X.
319. YANG, B., RAO, R. Emerging Pathogens of the *Candida* Species. In: *Intech Open*. 2012, nr. 1, pp. 3–18. ISSN 2754-6314.
320. YANO, J., PETERS, B.M., NOVERR, M.C., FIDEL, P.L. Novel Mechanism behind the Immunopathogenesis of Vulvovaginal Candidiasis: “Neutrophil Anergy.” In: *Infection and immunity*. 2018, nr. 86, pp. e00684-17. ISSN 1098-5522.
321. YAPAR, N. Epidemiology and risk factors for invasive candidiasis. In: *Therapeutics and Clinical Risk Management*. 2014, nr. 10, pp. 95–105. ISSN 1178-203X.
322. YONG, J., ZU, R., HUANG, X., GE, Y., LI, Y. Synergistic Effect of Berberine Hydrochloride and Fluconazole Against *Candida albicans* Resistant Isolates. In: *Frontiers in Microbiology*. 2020, nr. 11, pp. 1498. ISSN 1664-302X.
323. ZANGL, I., PAP, I. J., ASPÖCK, C., SCHÜLLER, C. The role of *Lactobacillus* species in the control of *Candida* via biotrophic interactions. In: *Microbial Cell*. 2020, nr. 7(1), pp. 1–14. ISSN 2311-2638.

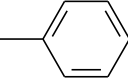
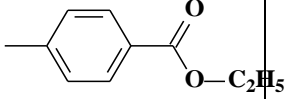
324. ZARICIUC, E. Activitatea antimicrobiană *in vitro* a unor compuși autohtoni noi. In: *Buletinul AȘM. Științele vieții*. 2017, nr. 2(332), pp. 146-153. ISSN 1857-064X.
325. ZENG, X., ZHANG, Y., ZHANG, T., XUE, Y., XU, H., AN, R. Risk Factors of Vulvovaginal Candidiasis among Women of Reproductive Age in Xi'an: A Cross-Sectional Study. In: *BioMed Research International*. 2018, nr. 2018, pp. 9703754. ISSN 2314-6141.
326. ZHAO, Y., NAGASAKI, Y., KORDALEWSKA, M., PRESS, E. G., SHIELDS, R. K., NGUYEN, M. H., et al. Rapid detection of FKS-associated echinocandin resistance in *Candida glabrata*. In: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2016, nr. 60(11), pp. 6573-7. ISSN 1098-6596.
327. ZHOU, D., KORFANTY, G.A., MO, M., et al. Extensive genetic diversity and widespread azole resistance in greenhouse populations of *Aspergillus fumigatus* in Yunnan, China. In: *mSphere*. 2021, nr. 6, pp. e00066-21. ISSN 2379-5042.
328. ZHU, Y., O'BRIEN, B., LEACH, L., et al. Laboratory analysis of an outbreak of *Candida auris* in New York from 2016 to 2018: impact and lessons learned. In: *Journal of Clinical Microbiology*. 2020, nr. 58, pp. e01503-19. ISSN 0095-1137.
329. ŻYREK, D., WAJDA, A., CZECHOWICZ, P., NOWICKA, J., JAŚKIEWICZ, M., NEUBAUER, D., KAMYSZ, W. The antimicrobial activity of omiganan alone and in combination against candida isolated from vulvovaginal candidiasis and bloodstream infections. In: *Antibiotics*. 2021, nr. 10, pp. 1001. ISSN 2079-6382.
330. 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.
331. 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.
332. 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.
333. 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.
334. 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

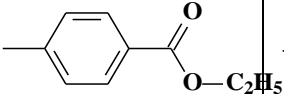
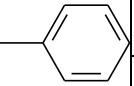
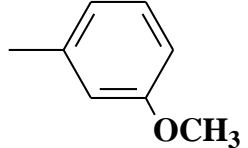
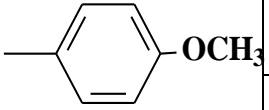
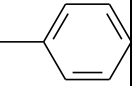
ANEXE

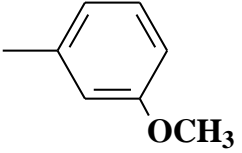
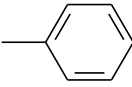


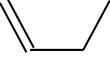
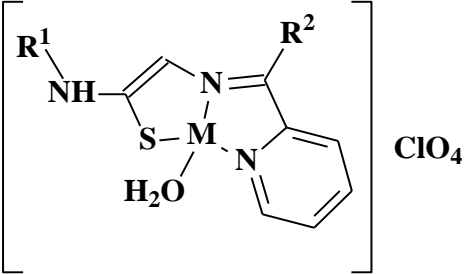
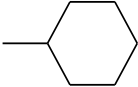
Anexa 1. Designul și compoziția chimică a compușilor sintetici luați în studiu

Codul preparatului	M	R ¹	R ²	X	A	Compoziția chimică	Denumirea chimică
A. Compușii coordinativi ai metalelor 3d cu tiosemicarbazone, aldehydelor și cetonelor							
I. Compușii coordinativi ai cuprului și nichelului cu tiosemicarbazone N(4)substituite cu formula generală							
A. I (1.1)	Cu		H	Cl ⁻	-	C ₁₃ H ₁₇ ClCuN ₄ S	Cloro-[N-ciclohexil-2-(piridin-2-il-metiliden)hidrazincarbotoamido]cupru
A. I (1.2)	Cu			CH ₃ COO ⁻	-	C ₁₅ H ₂₀ CuN ₄ O ₂ S	Acetato-[N-ciclohexil-2-(piridin-2-il-metiliden)hidrazincarboto-amido]cupru
A. I (1.3)	Cu			NO ₃ ⁻	-	C ₁₃ H ₁₇ CuN ₅ O ₃ S	Nitrato{N-ciclohexil-N'-[(piridin-2-il)metiliden]carbamo-hidrazonotioato}cupru
A. I (1.4)	Cu			Br	-	C ₁₄ H ₁₉ BrCuN ₄ S	Bromo{N-ciclohexil-N'-[(1-(piridin-2-il)etiliden]carbamo-hidrazonotio-ato}cupru
A. I (1.5)				CH ₃ COO ⁻	-	C ₁₆ H ₂₂ CuN ₄ O ₂ S	Acetato{N-ciclohexil-N'-[(1-(piridin-2-il)etiliden]carbamo-hidrazonotio-ato}cupru

A. I (1.6)	Cu		CH ₃	NO ₃ ⁻	-	C ₁₄ H ₁₉ CuN ₅ O ₃ S	Nitrato{ <i>N</i> -ciclohexil- <i>N'</i> -[(1-(piridin-2-il)etiliden]carbamo-hidrazonotio-ato}cupru	
A. I (1.7)	Cu			Br ⁻	-	C ₁₉ H ₂₁ BrCuN ₄ S	Bromo{ <i>N</i> -ciclohexil- <i>N'</i> -[fenil(piridin-2-il)metiliden]carbamo-hidrazono-tioat}cupru	
A. I (1.8)	Cu		H	NO ₃ ⁻	-	C ₁₁ H ₁₅ CuN ₅ O ₃ S	Nitrato{ <i>N</i> - <i>tert</i> -butil- <i>N'</i> -[(piridin-2-il)-metiliden]carbamo-hidrazonotioat}-cupru	
A. I (1.9)	Cu		H	Cl ⁻	-	C ₁₁ H ₁₅ ClCuN ₄ S	Cloro{ <i>N</i> - <i>tert</i> -butil- <i>N'</i> -[(piridin-2-il)-metiliden]carbamo-hidrazonotioat}-cupru	
A. I (1.10)	Cu		H	Br ⁻	-	C ₁₁ H ₁₅ BrCuN ₄ S	Bromo{ <i>N</i> - <i>tert</i> -butil- <i>N'</i> -[(piridin-2-il)-metiliden]carbamo-hidrazonotioat}-cupru	
A. I (1.11)	Cu		CH ₃ COO ⁻	-	C ₁₉ H ₂₂ CuN ₄ O ₂ S	Acetato{ <i>N</i> - <i>tert</i> -butil- <i>N'</i> -[fenil(piridin-2-il)metiliden]carbamo-hidrazono-tioat}cupru		
A. I (1.12)	Cu			Br	-	C ₁₇ H ₁₉ BrCuN ₄ S	Bromo{ <i>N</i> - <i>tert</i> -butil- <i>N'</i> -[fenil(piridin-2-il)metiliden]carbamo-hidrazono-tioat}cupru	
A. I (1.13)	Cu			NO ₃ ⁻	-	C ₁₇ H ₁₉ CuN ₅ O ₃ S	Nitrato{ <i>N</i> - <i>tert</i> -butil- <i>N'</i> -[fenil(piridin-2-il)metiliden]carbamo-hidrazono-tioat}cupru	
A. I (1.14)	Cu		CH ₃	Br ⁻	-	C ₁₂ H ₁₇ BrCuN ₄ S	Bromo{ <i>N</i> - <i>tert</i> -butil- <i>N'</i> -[1-(piridin-2-il)etiliden]carbamo-hidrazonotioat}-cupru	
A. I (1.15)	Cu			Cl ⁻	-	C ₁₂ H ₁₇ ClCuN ₄ S	Cloro{ <i>N</i> - <i>tert</i> -butil- <i>N'</i> -[1-(piridin-2-il)etiliden]carbamo-hidrazonotioat}cupru	
A. I (1.16)	Cu			H	NO ₃ ⁻	-	C ₁₃ H ₁₉ CuN ₅ O ₃ S	Nitrato{ <i>N</i> -hexil- <i>N'</i> -[(piridin-2-il)-metiliden]carbamo-hidrazonotioat}-cupru

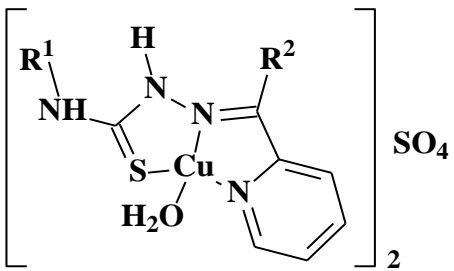
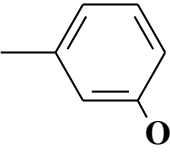
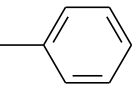
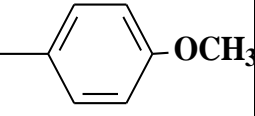
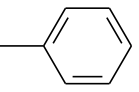
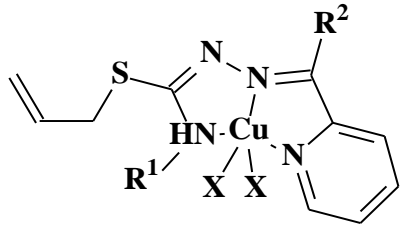
A. I (1.17)	Cu		CH ₃	NO ₃ ⁻	-	C ₁₄ H ₂₁ CuN ₅ O ₃ S	Nitrato/ <i>N</i> -hexil- <i>N'</i> -[1-(piridin-2-il)-etiliden]carbamo hidrazonotioat } cupru
A. I (1.18)	Cu			NO ₃ ⁻	-	C ₁₉ H ₂₃ CuN ₅ O ₃ S	Nitrato/ <i>N</i> -hexil- <i>N'</i> -[fenil(piridin-2-il)-metiliden]carbamo hidrazonotioat }-cupru
A. I (1.19)	Cu		H	CH ₃ COO ⁻	-	C ₁₅ H ₂₂ CuN ₄ O ₂ S	Acetato/ <i>N</i> -hexil- <i>N'</i> -[(piridin-2-il)-metiliden]carbamo hidrazonotioat }-cupru
A. I (1.20)	Cu		H	Cl	-	C ₁₆ H ₁₅ ClCuN ₄ O ₂ S	Cloro/ <i>N</i> -[4-(etoxicarbonil)fenil]- <i>N'</i> -[(piridin-2-il)metiliden]carbamo hidrazonotioato } cupru
A. I (1.21)	Cu			Br	-	C ₁₆ H ₁₅ BrCuN ₄ O ₂ S	Bromo { <i>N</i> -[4-(etoxicarbonil)fenil]- <i>N'</i> -[(piridin-2-il)metiliden]carbamo hidrazonotioato } cupru
A. I (1.22)	Cu			NO ₃ ⁻	-	C ₁₆ H ₁₅ CuN ₅ O ₅ S	Nitrato/ <i>N</i> -[4-(etoxicarbonil)fenil]- <i>N'</i> -[(piridin-2-il)metiliden]carbamo hidrazonotioato } cupru
A. I (1.23)	Cu			CH ₃ COO ⁻	-	C ₁₈ H ₁₈ CuN ₄ O ₄ S	Acetato/ <i>N</i> -[4-(etoxicarbonil)fenil]- <i>N'</i> -[(piridin-2-il)metiliden]carbamo hidrazonotioato } cupru
A. I (1.24)	Cu			CH ₃	Cl	-	C ₁₇ H ₁₇ ClCuN ₄ O ₂ S
A. I (1.25)	Cu		CH ₃	Br	-	C ₁₇ H ₁₇ BrCuN ₄ O ₂ S	Bromo-{ etil-4-[2-(1-piridin-2-il)etiliden-hidrazinil]carbonotioil-amino-benzoato } cupru

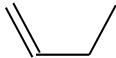
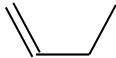
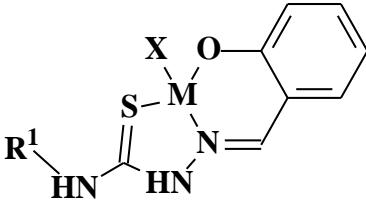
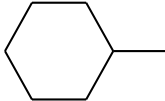
A. I (1.26)	Cu			CH ₃ COO ⁻	-	C ₁₉ H ₂₀ CuN ₄ O ₄ S	Acetato-{etil-4-[2-(1-piridin-2-il)-etiliden-hidrazinil]carbonotioil-amino-benzoato} cupru
A. I (1.27)	Cu			Cl	-	C ₂₂ H ₁₉ ClCuN ₄ O ₂ S	Cloro{N-[4-(etoxicarbonil)fenil]-N'-[fenil(piridin-2-il)metiliden]carbamohidrazonotioato} cupru
A. I (1.28)	Cu			NO ₃ ⁻	-	C ₂₂ H ₁₉ ClCuN ₄ O ₂ S	Nitrato{N-[4-(etoxicarbonil)fenil]-N'-[fenil(piridin-2-il)metiliden]carbamohidrazonotioato} cupru
A. I (1.29)	Cu			NO ₃ ⁻	-	C ₂₁ H ₂₀ N ₅ O ₄ SCu	Nitrato-{N-(2-metoxifenil)-2-[fenil(piridin-2-il)metiliden]-hidrazincarbotoamido} cupru
A. I (1.30)	Ni			Cl	-	C ₂₀ H ₁₇ ClOSN ₄ Ni	Cloro-{N-(2-metoxifenil)-2-[fenil(piridin-2-il)metiliden]-hidrazincarbotoamido} nichel
A. I (1.31)	Cu			Br		C ₂₀ H ₁₇ CuBrON ₄ S	Bromo-{N-(2-metoxifenil)-2-[fenil(piridin-2-il)metiliden]-hidrazincarbotoamido} cupru
A. I (1.32)	Cu		H	NO ₃ ⁻		C ₁₄ H ₁₃ CuN ₅ O ₄ S	Nitrato--[N-(2-metoxifenil)--2-(piridin-2-ilmetiliden)-hidrazincarbotoamido]cupru
A. I (1.33)	Cu			NO ₃ ⁻	-	C ₂₁ H ₂₀ CuN ₅ O ₄ S	Nitrato-{N-(3-metoxifenil)-2-[fenil(piridin-2-il)metiliden]-hidrazincarbotoamido} cupru
A. I (1.34)	Cu		H			-	C ₁₄ H ₁₃ CuN ₅ O ₄ S

A. I (1.35)	Cu		CH ₃	Cl ⁻	-	C ₁₅ H ₁₅ ClCuN ₄ OS	Cloro--[N-(4-metoxifenil)--2-(piridin-2-iletiden)hidrazin-carbotioamido]cupru
A. I (1.36)	Cu		CH ₃	NO ₃ ⁻	-	C ₁₅ H ₁₅ CuN ₅ O ₄ S	Nitrato--[N-(4-metoxifenil)--2-(piridin-2-iletiden)hidrazin-carbotioamido]cupru
A. I (1.37)	Cu			Br	-	C ₂₀ H ₁₇ CuBrON ₄ S	Bromo-{N-(3-metoxifenil)-2-[fenil(piridin-2-il)metiliden]-hidrazincarbotioamido} cupru
A. I (1.38)	Cu		CH ₃	NO ₃ ⁻	-	C ₁₁ H ₁₃ CuN ₅ O ₃ S	Nitrato-{N-(prop-2-en-1-il)-N'-[1-(piridin-2-il)etiliden]carbamo-hidrazonotioato} cupru
A. I (1.39)	Cu		CH ₃	Cl	-	C ₁₁ H ₁₃ ClCuN ₄ S	Cloro-{N-(prop-2-en-1-il)-N'-[1-(piridin-2-il)etiliden]carbamo-hidrazonotioato} cupru
A. I (1.40)	Cu		CH ₃	Br	-	C ₁₁ H ₁₃ BrCuN ₄ S	Bromo-{N-(prop-2-en-1-il)-N'-[1-(piridin-2-il)etiliden]-carbamo-hidrazontioato} cupru
							
A. I (1.41)	Cu		H	-	-	C ₁₃ H ₁₉ ClCuN ₄ O ₅ S	Perclorat de {N-ciclohexil-N'-[(piridin-2-il)metiliden]carbamo-hidrazonotioato} aquacupru

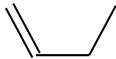
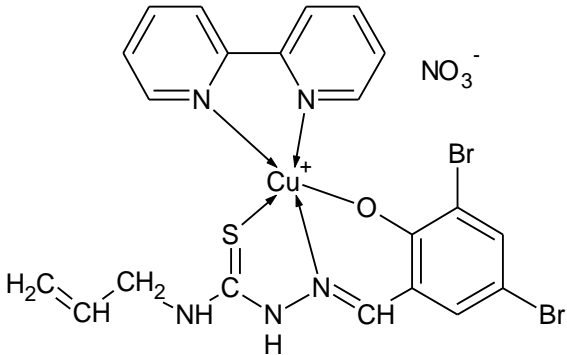
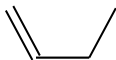
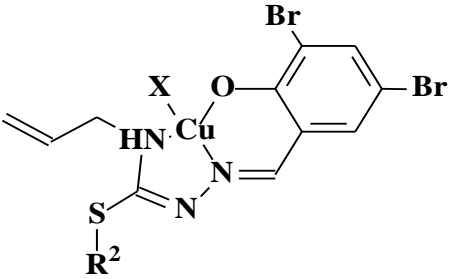

A. I (1.42)	Cu		H	-	-	C ₁₆ H ₁₇ ClCuN ₄ O ₇ S	Perclorat de { <i>N</i> -[4-(etoxicarbonil)-fenil]- <i>N'</i> -[(piridin-2-il)metiliden]-carbamohidrazonotioato}aquacupru
A. I (1.43)	Cu		H	-	-	C ₁₁ H ₁₇ ClCuN ₄ O ₅ S	Perclorat de { <i>N</i> - <i>tert</i> -butil- <i>N'</i> -[(piridin-2-il)metiliden]-carbamohidrazonotioat}aquacupru
A. I (1.44)	Cu			-	-	C ₁₇ H ₂₁ ClCuN ₄ O ₅ S	Perclorat de { <i>N</i> - <i>tert</i> -butil- <i>N'</i> -[fenil(piridin-2-il)metiliden]carbamohidrazonotioat}-aquacupru
A. I (1.45)	Cu		H	-	-	C ₁₃ H ₂₁ ClCuN ₄ O ₅ S	Perclorat de { <i>N</i> -hexil- <i>N'</i> -[(piridin-2-il)metiliden]carbamohidrazonotioat}cupru
A. I (1.46)	Cu		CH ₃	-	-	C ₁₄ H ₂₃ ClCuN ₄ O ₅ S	Perclorat de { <i>N</i> -hexil- <i>N'</i> -[1-(piridin-2-il)etiliden]carbamohidrazonotioat}-aquacupru
A. I (1.47)	Cu			-	-	C ₁₉ H ₂₅ ClCuN ₄ O ₅ S	Perclorat de { <i>N</i> -hexil- <i>N'</i> -[fenil-(piridin-2-il)metiliden]carbamohidrazonotioat}-aquacupru

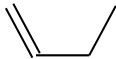
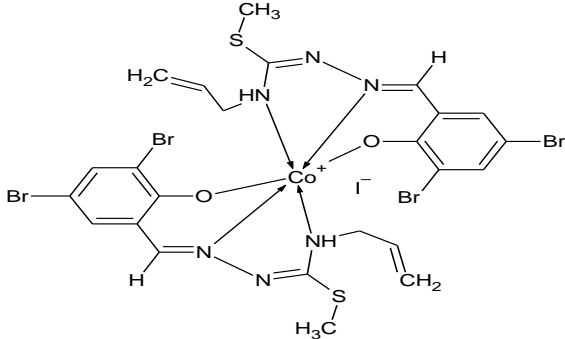
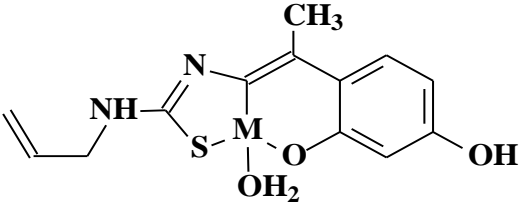
A. I (1.48)	Cu	-	-	-	-	$C_{11}H_{14}CuN_6O_6S$	Nitrat de catenă-(μ -nitrato- O,O')-{ N -(prop-2-en-1-il)-2-[(piridin-2-il)-etiliden]hidrazin-1-carbotioamid}-cupru(II)
A. I (1.49)	Cu		CH ₃	NO ₃ ⁻		$C_{14}H_{17}CuN_7O_3S$	Nitrato-{ N -(prop-2-en-1-il)- N' -[1-(piridin-2-il)etiliden]-carbamo-hidrazonotioato}-(imidazol)cupru
A. I (1.50)	Cu		CH ₃	NO ₃ ⁻		$C_{18}H_{22}CuN_6O_3S$	Nitrato-{ N -(prop-2-en-1-il)- N' -[1-(piridin-2-il)etiliden]-carbamo-hidrazonotioato}-(3,4-dimetil-piridin)cupru

A. I (1.51)	Cu	-	-	-	-	$C_{24}H_{36}Cu_2N_8O_8S_2$	Bis(μ_2 -acetato- <i>O</i>)-bis{[<i>N</i> -prop-2-en-1-il- <i>N'</i> -(piridin-2-ilmetiliden)carbamohidrazonotioato]cupru} tetrahidrat
II. Compuși coordinativi ai sulfatului de cupru (II) cu metoxifeniltiosemicarbazone 2-benzoilpiridinei cu formula generală							
							
A. II (2.52)	Cu			-	-	$C_{40}H_{38}CuO_8S_3N_4S_3$	Sulfat de aqua-{ <i>N</i> -(2-metoxifenil)-2-[fenil(piridin-2-il)metiliden]-hidrazincarbotoamido}cupru(II)
A. II (2.53)						$C_{40}H_{38}CuO_8S_3N_4S$	Sulfat de aqua-{ <i>N</i> -(4-metoxifenil)-2-[fenil(piridin-2-il)metiliden]-hidrazincarbotoamido}cupru(II)
III Compuși coordinativi ai cuprului cu 4-alil-S-alilizotiosemicarbazona 2-formilpiridinei cu formula generală							
							

A. III (3.54)	Cu		H	Br	-	$C_{13}H_{16}Br_2CuN_4S$	Dibromo{(prop-2-en-1-il)- <i>N</i> -(prop-2-en-1-il)- <i>N'</i> -[(piridin-2-il)metiliden]carbomohidrazonotioat}cupru
A. III (3.55)	Cu		H	Cl	-	$C_{13}H_{16}Cl_2CuN_4S$	Dicloro{(prop-2-en-1-il)- <i>N</i> -(prop-2-en-1-il)- <i>N'</i> -[(piridin-2-il)metiliden]carbomohidrazonotioat}cupru
IV Compușii coordinativi ai cuprului (II) cu N(4)-ciclohexiltiosemicarbazona aldehidei salicilice cu formula generală							
							
A. IV (4.56)	Cu		H	Cl	-	$C_{14}H_{18}ClCuN_3OS$	Cloro{2-{{2-(ciclohexilcarbamo- tioil)hidraziniliden]metil}fenolato}- cupru
A. IV (4.57)	Cu			CH_3COO^-	-	$C_{16}H_{21}CuN_3O_3S$	Acetato{2-{{2-(ciclohexilcarbamo- tioil)hidraziniliden]metil}fenolato}- cupru
A. IV (4.58)	Cu			NO_3^-	-	$C_{14}H_{18}CuN_4O_4S$	Nitrato{2-{{2-(ciclohexilcarbamo- tioil)hidraziniliden]metil}fenolato}- cupru
V Compușii coordinativi ai cuprului (II) cu 4-aliltiosemicarbazona aldehidelor 3,5-dibromosalicilice cu formula							

A. V (5.59)	Cu		-	NO ₃ ⁻	-	C ₁₁ H ₁₂ Br ₂ CuN ₄ O ₅ S	Nitrato-[2,4-dibromo-6-({2-[(prop-2-en-1-il)carbamotioil]hidraziniliden}metil)fenolato]-aquacupru
A. V (5.60)	-	-	-	-	-	C ₁₇ H ₁₆ N ₆ OS ₂	2-[(2-Hidroxifenil)metiliden]-N-[4-(3-metil-5-sulfanil-4H-1,2,4-triazol-4-il)fenil]hidrazin-1-carbotioamidă

A. V (5.61)	Cu		-	-	-	$C_{23}H_{18}Br_2CuN_6O_4S$	Nitrat de [2,4-dibromo-6-({2-[(prop-2-en-1-il)carbamtioil]-hidraziniliden}metil)fenolato]-(1,10-fenantrolin)cupru
							
A. V (5.62)	Cu		-	-	-	$C_{21}H_{18}Br_2CuN_6O_4S$	Nitrat de [2,4-dibromo-6-({2-[(prop-2-en-1-il)carbamtioil]hidraziniliden}metil)fenolato]-(2,2'-bipiridin)cupru
VI Compuși coordinativi ai unor metale 3d cu 4-alil-S-alchiltiosemicarbazone aldehydelor salicilice substituie cu formula generală							
							
A. IV (6.63)	Cu		CH_3	Cl	-	$C_{12}H_{12}Br_2ClCuN_3OS$	Cloro -(2,4-dibromo-6-[(metal-sulfanil)[(prop-2-en-1-yl)amino]-

							metiliden }hidraziniliden)metil]feno- lato)cupru
A. IV (6.64)	Cu		CH ₃	CH ₃ COO ⁻		C ₁₄ H ₁₅ Br ₂ CuN ₃ O ₃ S	Acetato-(2,4-dibromo-6-[(metil- sulfanil)[(prop-2-en-1-yl)amino]- metiliden }hidraziniliden)metil]feno- lato)cupru
							
A. VI (6.65)	Co	-	-	-	-	C ₂₄ H ₂₄ Br ₄ CoIN ₆ O ₂ S ₂	Iodura de bis(2,4-dibromo-6- [(metilsulfanil)[(prop-2-en-1- yl)amino]metiliden }hidraziniliden)metil] fenolato)cobalt
VII Compușii coordinativi ai unor metale 3d cu 4-aliltiosemicarbazona 2,4-dihidroxiacetofenonei cu formula generală							
							

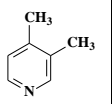
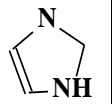
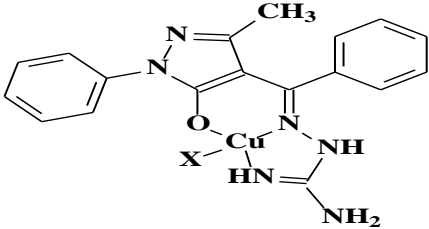
A. VII (7.66)	Cu	-	--	-	-	$C_{12}H_{15}CuN_3O_3S$	{ <i>N'</i> -[1-(4-hidroxi-2-oxidofenil)-etiliden]- <i>N</i> -(prop-2-en-1-il)carbamo- hidrazonotioato}-aquacupru
A. VII (7.67)	Zn	-	-	-	-	$C_{12}H_{15}N_3O_3SZn$	{ <i>N'</i> -[1-(4-hidroxi-2-oxidofenil)-etiliden]- <i>N</i> -(prop-2-en-1-il)carbamo- hidrazonotioato}-aquazinc
A. VII (7.68)	Fe	-	-	-	-	$C_{24}H_{29}FeN_7O_7S_2$	Nitrat de bis-{5-hidroxi-2-(1-{2-[(prop-2- en-1-il)carbamo]tioil]- hidraziniliden}etil)fenolato}fier(III)
A. VII (7.69)	Ni	-	--	-	-	$C_{12}H_{20}N_4NiO_8S$	Nitrat de {5-hidroxi-2-(1-{2-[(prop-2- en-1-il)carbamo]tioil]- hidrazin- iliden}etil)fenolato}-triaqua-nichel(II)

A. VII (7.70)	Ni	-	-	-	-	$C_{12}H_{18}ClN_3NiO_4S$	Cloro-{5-hidroxi-2-(1-{2-[(prop-2-en-1-il)carbamotioil]hidraziniliden}-etil)fenolato}-diaquanichel
A. VII (7.71)	Cu		-	-		$C_{18}H_{20}CuN_4O_2S$	{N'-[(4-hidroxi-2-oxidofenil)metiliden]-N-prop-2-en-1-ilcarbamohidrazonotioato}(3,4-dimetilpiridin)cupru

A. VII (7.72)	Cu		-	-		$C_{25}H_{29}CuN_5O_2S$	{ <i>N'</i> -[(4-hidroxi-2-oxidofenil)-metiliden]- <i>N</i> -prop-2-en-1-ilcarbamohidrazonotioato}-bis(3,4-dimetilpiridin)cupru
A. VII (7.73)	Cu		-	NO_3^-	Fenantrolina	$C_{24}H_{23}CuN_7O_7S$	Nitratul de {2-[1-(2-hidroxifenil)etiliden]- <i>N</i> -(prop-2-en-1-il)hidrazin-1-carbotioamid}(1,10-fenantrolina)cupru(II)

A. VII (7.74)	-		-	-	-	C ₁₂ H ₁₅ N ₃ OS	2-[1-(2-hidroxiifenil)etiliden]-N-(prop-2-en-1-il)hidrazine-1-carbotioamid
VIII Compușii coordinativi ai unor metale 3d cu 4-iltiosemicarbazona acidului piruvic cu formula generală							
A. VIII (8.75)	Cu	-	-	Cl	-	C ₇ H ₁₀ ClCuN ₃ O ₂ S	Cloro-(2-{2-[(prop-2-en-1-il)carbamotioil]hidraziniliden}propanoato)-cupru
A. VIII (8.76)	Cu	-	-	Br	-	C ₇ H ₁₀ BrCuN ₃ O ₂ S	Bromo-(2-{2-[(prop-2-en-1-il)carbamotioil]hidraziniliden}propanoato)-cupru

A. VIII (8.77)	Fe	-	-	NO ₃ ⁻	-	C ₁₄ H ₂₀ FeN ₇ O ₇ S ₂	Nitrat de bis-(2-{2-[(prop-2-en-1-il)-carbamotioil]hidraziniliden}propanoato)fier(III)
A. VIII (8.78)	Fe	-	-	Br ⁻	-	C ₁₄ H ₂₀ BrFeN ₆ O ₄ S ₂	Bromura de bis-(2-{2-[(prop-2-en-1-il)-carbamotioil]hidraziniliden}propanoato)fier(III)
A. VIII (8.79)	Co	-	-	Cl ⁻	-	C ₁₄ H ₂₀ ClCoN ₆ O ₄ S ₂	Clorura de bis-(2-{2-[(prop-2-en-1-il)-carbamotioil]hidraziniliden}propanoato)cobalt(III)
A. VIII (8.80)	Co	-	-	Br ⁻	-	C ₁₄ H ₂₀ BrCoN ₆ O ₄ S ₂	Bromura de bis-(2-{2-[(prop-2-en-1-il)-carbamotioil]hidraziniliden}propanoato)cobalt(III)

A. VIII (8.81)	Cu	-	-	-		C ₁₄ H ₁₈ CuN ₄ O ₂ S	[2-({[(prop-2-en-1-il)amino]- (sulfido)metiliden}hidraziniliden)- propanoato]-(3,4-dimetilpiridin)cupru
A. VIII (8.82)	Cu	-	-	-		C ₁₀ H ₁₃ CuN ₅ O ₂ S	[2-({[(prop-2-en-1-il)amino]- sulfido)metiliden}hidraziniliden)- propanoato]-(imidazol)cupru
B. Compușii coordinativi ai metalelor 3d cu aminoguanizonă, aldehydelor și cetonelor							
I. Compușii coordinativi ai cuprului (II) cu aminoguanizonă pirazolonei cu formula generală							
							
B. I (1.83)	Cu	-	-	Cl	-	C ₁₈ H ₁₇ ClCuN ₆ O	Cloro-{2-[(3-methyl-5-oxo-1-phenyl- 4,5-dihydro-1 <i>h</i> -pyrazol-4-yl)- (phenyl)methylidene]-hydra-zin- carboximidamido}cupru
B. I (1.84)	Cu	-	-	NO ₃ ⁻	-	C ₁₈ H ₁₇ CuN ₇ O ₄	Nitrato-{2-[(3-methyl-5-oxo-1-phenyl- 4,5-dihydro-1 <i>h</i> -pyrazol-4-yl)- (phenyl)methylidene]-hidrazin- carboximidamid}cupru

Anexa 2. Sensibilitatea la preparatele antifungice testate a celor patru specii de *Candida* cel mai frecvent izolate, intervalele MIC și valorile MIC50 și MIC90

Antifungice	Range μg/ml	S		SSD		R		MIC50	MIC90
		n	%	n	%	n	%		
<i>C. albicans</i> (121)									
Amfotericina B	1 - 1	118	97,5			3	2,5	0,25	0,5
Anidulafungină	0,03 - 0,03	106	97,6			15	12,4	0,03	0,03
Micafungină	0,016 - 0,016	114	94,2			7	5,8	0,016	0,016
Fluconazol	2 - 4	110	90,9	1	0,8	10	8,3	0,5	1
Itraconazol	0,06 - 0,06	103	85,1			18	14,9	0,03	0,06
Posaconazol	0,06 - 0,06	116	95,9			5	4,1	0,03	0,06
Voriconazol	0,06 - 0,25	111	91,7	2	1,7	8	6,6	0,06	0,25
5-fuorocitozină	0,06-0,25	113	93,4			8	6,6	0,06	0,25
Casprofungină	0,016-0,25	98	81	10	8,3	13	10,7	0,016	0,25
<i>C. glabrata</i> (52)									
Amfotericina B	1 - 1	43	82,7			9	17,3	0,25	0,5
Anidulafungină	0,06 - 0,06	49	94,2			3	5,8	0,03	0,06
Micafungină	0,03 - 0,03	44	84,6			8	15,4	0,03	0,03
Fluconazol	0,001 - 16	26	50	20	38,5	6	11,5	0,5	1
Itraconazol	ND	-	-	-	-	-	-	-	-
Posaconazol	0,12-8	43	82,7	2	3,8	7	13,5	0,5	1
Voriconazol	0,06-8	48	92,3	2	3,8	2	3,8	1	2
5-fuorocitozină	0,006-0,12	46	88,5			6	11,5	0,006	0,12
Casprofungină	0,03-0,12	44	84,6	3	5,8	5	9,6	0,03	0,06
<i>C. parapsilosis</i> (12)									
Amfotericina B	1 - 1	12	100					0,25	0,5
Anidulafunzină	4 - 4	9	75			3	25	1	2
Micafungină	2 - 2	10	83,3			2	16,7	0,5	1
Fluconazol	2 - 4	12	100					0,5	2
Itraconazol	0,125 - 0,125	12	100					0,125	0,125
Posaconazol	0,06 - 0,06	11	91,7			1	8,3	0,03	0,06
Voriconazol	0,125 - 0,25	12	100					0,125	0,25
5-fuorocitozină	ND							-	-
Casprofungină	2-8	6	50	4	33,3	2	16,7	0,5	1
<i>C. tropicalis</i> (15)									
Amfotericina B	1 - 1	14	93,3			1	6,7	0,25	0,5
Anidulafungină	0,06 - 0,06	13	86,7			2	13,3	0,03	0,06
Micafungină	0,015-0,06	11	73,3			4	26,7	0,03	0,06
Fluconazol	2 - 4	10	66,7			4	26,7	0,5	1
Itraconazol	0,125 - 0,125	10	66,7			5	33,3	0,125	0,125
Posaconazol	0,12-1	11	73,3	2	13,3	2	13,3	0,25	0,5
Voriconazol	0,12 - 8	10	66,7	2	13,3	3	20	1	2
5-fuorocitozină	0,06-0,12	14	93,3			1	6,7	0,06	0,06

Anexa 3. Exprimarea factorilor enzimatici de patogenitate ai tulpinilor clinice de *Candida* spp.

Scorul de activitate al enzimelor	Speciile de <i>Candida</i>			
	<i>C. albicans</i> (n=126)	<i>C. tropicalis</i> (n=65)	<i>C. glabrata</i> (n=32)	<i>C. krusei</i> (n=21)
Fosfolipaza				
1	32 (25,4%; 17,8-33,0)	30 (46,2%; 34,0-58,3)	23 (71,9%; 56,3-87,4)	17 (80,9%; 64,1-97,7)
2	12 (12,8%; 4,4-14,6)	33 (94,3%; 92,5-96,5)	5 (55,6%; 53,5-57,8)	3 (75,0%; 72,9-77,2)
3	82 (87,2%; 85,1-89,4)	2 (5,7%; 3,6-7,9)	4 (44,4%; 42,3-46,6)	1 (25,0%; 22,9-27,2)
Total pozitive	94 (74,6%; 67,0-82,2)	35 (53,8%; 35,5-72,1)	9 (28,1%; 26,0-30,3)	4 (19,1%; 17,0-21,3)
Proteaze				
1	27 (21,4%; 14,3-28,6)	29 (44,6%; 32,5-56,7)	15 (46,9%; 29,6-64,2)	12 (57,1%; 36,0-78,3)
2	59 (59,6%; 57,5-61,8)	19 (52,8%; 50,7-55,0)	14 (82,4%; 80,3-84,6)	8 (88,9%; 86,8-91,1)
3	40 (40,4%; 38,3-42,6)	17 (47,2%; 45,1-49,4)	3 (17,6%; 15,5-19,8)	1 (11,1%; 4,3-18,9)
Total pozitive	99 (78,6% 71,4-85,7)	36 (55,4%; 37,1-73,6)	17 (53,1%; 18,2-88,1)	9 (42,9%; 40,8-45,1)
Hemolizine				
1	12 (9,5%; 4,4-14,6)	28 (43,1%; 31,0-55,1)	1 (3,1%; -2,9-9,1)	1 (4,8%; 2,7-7,0)
2	58 (50,9%; 37,3-54,7)	28 (75,7%; 73,6-77,9)	31 (96,9%; 94,8-99,1)	20 (95,2%; 93,1-97,4)
3	56 (49,1%; 35,8-53,1)	9 (24,3%; 22,2-26,5)	0 (0-0)	0 (0-0)
Total pozitive	114 (90,5% 85,4-95,6)	37 (56,9%; 38,7-75,1)	31 (96,9%; 94,8-99,1)	20 (95,2%; 93,1-97,4)
Esteraze				
1	24 (19,5%; 12,2-25,9)	0 (0-0)	17(53,1%; 51,0-55,3)	1 (4,8%; 4,3-18,9)
2	58 (56,9%; 54,8-59,1)	23 (35,4%; 23,8-47,0)	12 (80,0%; 48,9-92,2)	9 (45,0%; 21,7-64,0)
3	44 (43,1%; 41,0-45,3)	42 (64,6%; 53,0-76,2)	3 (20,0%; 0,5-35,8)	11 (55,0%; 31,0-73,7)
Total pozitive	102 (80,5%; 74,1-87,8)	65 (100%; 97,9-102,2)	15 (46,9%; 11,9-81,8)	20 (95,2%; 93,1-97,4)
DNA-aze				
1	93 (73,8%; 66,1-81,5)	52 (80,0%; 70,3-89,7)	31 (96,9%; 94,8-99,1)	12 (57,1%; 36,0-78,3)
2	19 (57,6%; 55,5-59,8)	9 (69,2%; 67,1-71,4)	1 (100%; 97,9-102,2)	6 (66,7%; 64,6-68,9)
3	14 (42,4%; 40,3-44,6)	4 (30,8%; 28,7-33,0)	0 (0-0)	3 (33,3%; 31,2-35,5)
Total pozitive	33 (26,2%; 18,5-33,9)	13 (20,0%; 5,3-34,7)	1 (3,1%; 1,0-5,3)	9 (42,9%; 40,8-45,1)

Notă: Scorul pentru fosfolipază, protează și activitate hemolitică: 1 - lipsa activității enzimatic; 2- activitate enzimatică moderată; 3- activitate enzimatică înaltă

Anexa 4. Activitatea antifungică a compușilor chimici asupra micetelor levuriforme (µg/ml)

Codul compusului chimic	<i>C. albicans</i> ATCC 90028		<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019		<i>C. krusei</i> ATCC 6258		<i>C. glabrata</i> ATCC 2001		<i>C. lusitaniae</i> ATCC 34449		<i>S. cerevisiae</i> ATCC 4098		<i>M. guilliermondii</i> ATCC 4098		<i>C. neoformans</i> CECT 1043	
	CMI	CMF	CMI	CMF	CMI	CMF	CMI	CMF	CMI	CMF	CMI	CMF	CMI	CMF	CMI	CMF
A. Compușii coordinativi ai metalelor 3d cu tiosemicarbazone, aldehydelor și cetonelor																
I. Compușii coordinativi ai cuprului și nichelului cu tiosemicarbazone N(4) substituie cu formula generală																
A. I (1.1)	1,95	31,25	1,95	7,81	1,95	3,90	3,90	3,90	1,95	1,95	1,95	1,95	3,90	7,81	3,90	3,90
A. I (1.2)	15,62	31,25	15,62	31,25	15,62	31,25	15,62	31,25	7,81	15,62	15,62	15,62	7,81	15,62	7,81	15,62
A. I (1.3)	1,95	7,81	7,81	7,81	1,95	1,95	3,90	7,81	1,95	3,90	7,81	7,81	3,90	3,90	1,95	7,81
A. I (1.4)	1,95	3,91	1,95	3,91	1,95	1,95	1,95	3,91	3,91	3,91	1,95	3,91	0,97	3,91	0,97	1,95
A. I (1.5)	0,97	1,95	0,97	0,97	0,48	0,48	1,95	1,95	0,48	1,95	0,48	0,97	0,48	0,48	0,24	0,48
A. I (1.6)	0,97	1,95	0,97	1,95	0,24	0,48	3,90	3,90	0,97	0,97	0,12	0,24	0,12	0,12	0,12	0,12
A. I (1.7)	0,97	1,95	0,97	1,95	0,97	0,97	0,97	1,95	0,06	0,06	0,06	0,48	0,24	0,97	0,97	0,97
A. I (1.8)	3,90	3,90	3,90	7,81	3,90	1,95	3,90	7,81	3,90	3,90	3,90	7,81	3,90	7,81	31,25	62,50
A. I (1.9)	3,90	3,90	1,95	3,90	1,95	3,90	3,90	7,81	3,90	3,90	3,90	7,81	3,90	7,81	3,90	7,81
A. I (1.10)	7,81	7,81	7,81	15,62	7,81	7,81	15,62	15,62	15,62	15,62	7,81	15,62	7,81	7,81	15,62	31,25
A. I (1.11)	1,95	1,95	1,95	3,90	1,95	1,95	3,90	3,90	1,95	1,95	1,95	3,90	1,95	3,90	15,62	15,62
A. I (1.2)	1,95	3,90	3,90	3,90	1,95	3,90	3,90	3,90	3,90	7,81	3,90	3,90	7,81	7,81	3,90	7,81
A. I (1.13)	0,48	0,97	0,97	0,97	0,48	0,97	1,95	3,90	0,48	0,48	0,97	0,97	0,24	0,48	0,97	1,95
A. I (1.14)	3,90	7,81	7,81	7,81	1,95	3,9	7,81	7,81	7,81	7,81	1,95	3,90	1,95	3,90	3,90	7,81
A. I (1.15)	3,90	3,90	1,95	3,9	1,95	1,95	3,90	3,90	3,90	3,90	1,95	1,95	1,95	3,90	15,62	31,25
A. I (1.16)	3,90	7,81	3,90	3,90	1,95	3,90	3,90	7,81	3,90	3,90	1,95	3,90	3,90	3,90	1,95	3,90
A. I (1.17)	3,90	3,90	1,95	3,90	0,97	1,95	3,90	3,90	1,95	3,90	3,90	3,90	1,95	3,90	0,97	0,97
A. I (1.18)	3,90	3,90	3,90	7,81	1,95	3,90	1,95	3,90	3,90	3,90	3,90	3,90	1,95	1,95	1,95	1,95
A. I (1.19)	7,81	7,81	7,81	7,81	3,90	7,81	3,90	7,81	3,90	7,81	3,90	7,81	3,90	3,90	3,90	3,90
A. I (1.20)	3,90	125,0	31,25	125,0	1,95	31,25	31,25	125,0	31,25	31,25	15,62	31,25	15,62	31,25	1,95	1,95
A. I (1.21)	7,81	15,62	7,81	15,62	7,81	15,62	31,25	62,50	15,62	15,62	15,62	31,25	7,81	15,62	3,90	7,81
A. I (1.22)	0,97	1,95	1,95	3,90	1,95	3,90	3,90	7,81	1,95	1,95	0,48	0,97	0,24	0,97	1,95	1,95
A. I (1.23)	1,95	3,90	3,90	3,90	1,95	1,95	3,90	3,90	3,90	3,90	1,95	3,90	1,95	1,95	1,95	1,95
A. I (1.24)	0,97	1,95	1,95	1,95	1,95	3,90	0,97	1,95	0,97	1,95	1,95	1,95	0,97	1,95	0,97	1,95
A. I (1.25)	1,95	7,81	1,95	1,95	0,97	1,95	3,90	7,81	1,95	3,90	3,90	3,90	3,90	7,81	0,97	1,95
A. I (1.26)	0,97	1,95	7,81	7,81	7,81	15,62	7,81	7,81	3,90	7,81	3,90	7,81	0,97	1,95	1,95	1,95
A. I (1.27)	1,95	3,90	3,90	7,81	3,90	3,90	3,90	7,81	3,90	7,81	3,90	3,90	3,90	3,90	3,90	3,90

A. I (1.28)	3,90	15,62	1,95	1,95	0,97	1,95	1,95	3,90	3,90	3,90	0,97	1,95	1,95	1,95	0,97	0,97
A. I (1.29)	1,95	3,90	3,90	3,90	1,95	3,91	1,95	1,95	3,90	3,90	3,90	3,90	1,95	3,90	1,95	1,95
A. I (1.30)	7,81	31,25	7,81	15,62	7,81	7,81	7,81	15,62	7,81	7,81	15,62	15,62	7,81	7,81	3,90	15,62
A. I (1.31)	3,91	7,81	3,91	3,91	3,91	3,91	3,91	7,81	3,91	3,91	3,91	3,91	3,91	3,91	1,95	3,91
A. I (1.32)	3,91	7,81	3,91	7,81	3,91	3,91	3,91	7,81	3,91	7,81	3,91	7,81	3,91	7,81	7,81	7,81
A. I (1.33)	15,62	125,0	62,50	125,0	15,62	15,62	31,25	125,0	62,50	125,0	62,50	62,50	15,62	31,25	7,81	15,62
A. I (1.34)	7,81	15,62	15,62	15,62	7,81	7,81	7,81	7,81	7,81	15,62	7,81	15,62	15,62	15,62	7,81	7,81
A. I (1.35)	31,25	62,50	31,25	62,50	31,25	31,25	31,25	62,50	31,25	62,50	31,25	62,50	31,25	62,50	15,62	15,62
A. I (1.36)	31,25	62,50	31,25	62,50	15,62	15,62	31,25	62,50	31,25	62,50	31,25	31,25	31,25	62,50	7,81	15,62
A. I (1.37)	125,0	250,0	125,0	250,0	125,0	250,0	125,0	125,0	125,0	125,0	125,0	125,0	250,0	250,0	125,0	125,0
A. I (1.38)	1,95	7,81	0,48	0,97	0,24	0,97	1,95	3,90	3,90	3,90	3,90	7,81	1,95	1,95	1,95	7,81
A. I (1.39)	7,81	15,62	7,81	15,62	7,81	15,62	7,81	15,62	7,81	15,62	7,81	7,81	7,81	7,81	0,97	1,95
A. I (1.40)	7,81	31,25	3,90	7,81	7,81	15,62	7,81	15,62	7,81	7,81	7,81	7,81	3,90	7,81	0,97	1,95
A. I (1.41)	1,95	31,25	3,90	7,81	1,95	7,81	3,90	7,81	3,90	7,81	3,90	7,81	3,90	7,81	3,90	1,95
A. I (1.42)	3,90	7,81	3,90	7,81	3,90	7,81	7,81	7,81	7,81	7,81	3,90	7,81	3,90	3,90	7,81	31,25
A. I (1.43)	3,90	3,90	1,95	3,90	1,95	1,95	7,81	7,81	7,81	15,62	1,95	3,90	1,95	3,90	15,62	31,25
A. I (1.44)	0,48	0,97	0,48	0,48	0,24	0,48	0,48	0,97	0,48	0,48	0,48	0,48	0,24	0,48	3,90	7,81
A. I (1.45)	7,81	7,81	7,81	7,81	3,90	7,81	3,90	7,81	3,90	7,81	7,81	7,81	7,81	7,81	7,81	7,81
A. I (1.46)	3,90	3,90	3,90	3,90	1,95	3,90	3,90	3,90	3,90	3,90	3,90	3,90	1,95	3,90	3,90	3,90
A. I (1.47)	3,90	7,81	7,81	15,62	7,81	7,81	7,81	7,81	7,81	7,81	7,81	7,81	3,90	7,81	3,90	7,81
A. I (1.48)	3,90	7,81	0,97	1,95	7,81	15,62	3,90	7,81	3,90	3,90	1,95	1,95	1,95	1,95	1,95	3,90
A. I (1.49)	1,95	7,81	1,95	7,81	0,97	1,95	1,95	3,90	3,90	7,81	3,90	7,81	3,90	3,90	0,48	0,97
A. I (1.50)	3,90	7,81	1,95	7,81	3,90	7,81	3,90	7,81	3,90	7,81	3,90	3,90	1,95	3,90	0,12	0,24
A. I (1.51)	31,25	62,50	3,90	7,81	15,62	31,25	7,81	15,62	31,25	31,25	15,62	31,25	15,62	31,25	3,90	15,62
II. Compușii coordinativi ai sulfatului de cupru(II) cu metoxifeniltiosemicarbazone 2-benzoilpiridinei cu formula generală																
A. II (2.52)	15,62	31,25	31,25	62,50	15,62	31,25	31,25	62,50	15,62	31,25	31,25	62,50	15,62	15,62	62,50	62,50
A. II (2.53)	62,50	125,0	0,125	0,125	62,50	62,50	125,0	125,0	62,50	62,50	62,50	125,0	62,50	62,50	62,50	125,0
III. Compușii coordinativi ai cuprului cu 4-alil-S-alilzotiosemicarbazona 2-formilpiridinei cu formula generală																
A. III (3.54)	3,90	7,81	3,90	7,81	3,90	7,81	15,62	31,25	31,25	62,50	15,62	31,25	62,50	62,50	1,95	3,90
A. III (3.55)	1,95	3,90	1,95	1,95	1,95	3,90	15,62	15,62	31,25	31,25	1,95	15,62	31,25	62,50	0,97	1,95
IV. Compușii coordinativi ai cuprului(II) cu N(4)-ciclohexiltiosemicarbazona aldehidei salicilice cu formula generală																

A. IV (4.56)	31,25	62,50	125,0	125,0	62,50	62,50	62,50	125,0	31,25	31,25	31,25	31,25	62,50	62,50	15,62	31,25
A. IV (4.57)	31,25	62,50	62,50	125,0	31,25	31,25	62,50	62,50	15,62	31,25	15,62	31,25	7,81	15,62	15,62	15,62
A. I (4.58)	31,25	62,50	62,50	125,0	31,25	62,50	31,25	62,50	31,25	62,50	15,62	31,25	15,62	15,62	15,62	31,25
V. Compușii coordinativi ai cuprului(II) cu 4-alitiosemicarbazona aldehydelor 3,5-dibromosalicilice cu formula																
A. I (5.59)	62,50	125,0	62,50	62,50	62,50	125,0	62,50	62,50	15,62	15,62	15,62	31,25	31,25	31,25	15,62	31,25
A. V (5.60)	0,97	1,95	0,97	0,97	0,48	0,97	1,95	3,90	0,48	0,48	0,48	0,48	0,24	0,48	0,48	0,97
A. I (5.61)	62,50	125,0	125,0	250,0	125,0	250,0	125,0	125,0	62,50	125,0	62,50	125,0	62,50	62,50	125,0	125,0
A. I (5.62)	62,50	125,0	125,0	250,0	62,50	125,0	62,50	62,50	62,50	125,0	125,0	125,0	62,50	125,0	62,50	62,50
VI. Compușii coordinativi ai unor metale 3d cu 4-alil-S-alchitiosemicarbazone aldehydelor salicilice substituie cu formula generală																
A. VI (6.63)	31,25	62,50	31,25	62,50	15,62	15,62	31,25	31,25	31,25	31,25	31,25	62,50	31,25	62,50	15,62	31,25
A. VI (6.64)	15,62	31,25	31,25	31,25	15,62	15,62	31,25	62,50	15,62	15,62	15,62	15,62	7,81	15,62	7,81	15,62
A. VI (6.65)	125,0	250,0	125,0	250,0	125,0	125,0	125,0	125,0	62,50	125,0	62,50	62,50	62,50	125,0	62,50	125,0
VII. Compușii coordinativi ai unor metale 3d cu 4-alitiosemicarbazona 2,4-dihidroxiacetofenonei cu formula generală																
A. VII (7.66)	15,62	31,25	15,62	31,25	15,62	31,25	15,62	31,25	15,62	31,25	31,25	31,25	15,62	62,50	31,25	31,25
A. A. VII (7.67)	125,0	250,0	62,50	125,0	62,50	62,50	62,50	250,0	125,0	125,0	31,25	62,50	62,50	125,0	31,25	31,25
A. VII (7.68)	31,25	62,50	15,62	62,50	15,62	62,50	31,25	31,25	31,25	62,50	15,62	31,25	15,62	31,25	15,62	31,25
A. VII (7.69)	62,50	125,0	62,50	62,50	15,62	62,50	31,25	31,25	15,62	62,50	62,50	62,50	31,25	62,50	62,50	62,50
A. VII (7.70)	62,50	125,0	62,50	125,0	62,50	62,50	62,50	125,0	62,50	125,0	62,50	62,50	31,25	62,50	62,50	62,50
A. VII (7.71)	7,81	15,62	15,62	31,25	3,90	15,62	31,25	62,50	7,81	15,62	3,90	7,81	62,50	125,0	3,90	3,90
A. VII (7.72)	31,25	62,50	62,50	62,50	62,50	125,0	62,50	125,0	31,25	62,50	31,25	62,50	62,50	62,50	7,81	7,81
A. VII (7.73)	15,62	31,25	62,50	62,50	31,25	62,50	15,62	15,62	31,25	31,25	31,25	31,25	31,25	62,50	7,81	31,25

A. VII (7.74)	31,25	62,50	62,50	125,0	62,50	125,0	31,25	31,25	15,62	15,62	15,62	31,25	15,62	15,62	31,25	31,25
VIII. Compușii coordinativi ai unor metale 3d cu 4-alitiosemicarbazona acidului piruvic cu formula generală																
A. VIII (8.75)	125,0	250,0	250,0	250,0	125,0	125,0	125,0	125,0	62,5	125,0	125,0	250,0	62,5	125,0	62,5	250,0
A. VIII (8.76)	31,25	62,50	31,25	62,50	31,25	31,25	62,50	62,50	31,25	62,50	31,25	62,50	31,25	31,25	31,25	31,25
A. VIII (8.77)	62,50	250,0	125,0	250,0	62,50	62,50	62,50	125,0	125,0	125,0	62,50	62,50	62,50	62,50	31,25	62,50
A. VIII (8.78)	125,0	250,0	250,0	250,0	125,0	250,0	250,0	250,0	250,0	250,0	125,0	250,0	125,0	250,0	125,0	125,0
A. VIII (8.79)	62,50	250,0	62,50	250,0	62,50	125,0	62,50	62,50	62,50	125,0	125,0	125,0	125,0	125,0	125,0	125,0
A. VIII (8.80)	125,0	500,0	125,0	250,0	125,0	125,0	125,0	125,0	125,0	500,0	125,0	125,0	125,0	125,0	250,0	250,0
A. VIII (8.81)	125,0	250,0	125,0	250,0	125,0	250,0	125,0	250,0	125,0	125,0	125,0	125,0	250,0	250,0	125,0	125,0
A. VIII (8.82)	31,25	62,50	31,25	31,25	15,62	31,25	31,25	31,25	15,62	31,25	7,81	31,25	31,25	62,5	15,62	15,62
B. Compușii coordinativi ai metalelor 3d cu aminoguanizonă, aldehydelor și cetonelor																
I. Compușii coordinativi ai cuprului (II) cu aminoguanizonă pirazolonei cu formula generală																
B. I (1.83)	125,0	250,0	125,0	250,0	62,5	125,0	125,0	250,0	125,0	250,0	125,0	125,0	>500,0	>500,0	>500,0	>500,0
B. I (1.84)	125,0	250,0	125,0	250,0	125,0	125,0	125,0	250,0	250,0	250,0	125,0	125,0	>500,0	>500,0	>500,0	>500,0

Anexa 5. Activitatea antifunfică a compușilor biologici (mg/mL)

Nr. d/o	Cod	<i>C. albicans</i> ATCC 90028		<i>C. parapsilosis</i>		<i>C. lusitaniae</i>		<i>C. krusei</i>		<i>C. glabrata</i>		<i>C. neoformans</i>		<i>S. cerevisiae</i>		<i>M. guilliermondii</i>	
		CMI	CMF	CMI	CMF	CMI	CMF	CMI	CMF	CMI	CMF	CMI	CMF	CMI	CMF	CMI	CMF
1.	ES1	0,62	1,25	0,62	1,25	0,62	0,62	1,25	2,5	0,62	1,25	0,31	0,62	1,25	1,25	0,07	0,31
2.	ES2	1,25	2,5	1,25	2,5	1,25	1,25	1,25	2,5	2,5	5,0	0,62	1,25	0,15	0,62	2,5	5,0
3.	ES3	1,25	2,5	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	2,5	2,5	2,5	0,62	1,25	0,08	0,15	2,5	2,5
4.	PCM1	0,007	0,01	0,007	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02	0,007	0,01	0,007	0,01	0,003	0,007	0,01	0,02
5.	PCM2	0,004	0,009	0,004	0,009	0,009	0,009	0,009	0,02	0,004	0,009	0,004	0,009	0,002	0,002	0,009	0,02

Notă: *C. albicans* ATCC 90028; *C. parapsilosis* ATCC 22019; *C. lusitaniae* ATCC 34449; *C. krusei* ATCC 6258; *C. glabrata* ATCC 2001; *C. neoformans* CECT 1043; *S. cerevisiae* ATCC 4098; *M. guilliermondii* ATCC 6260; ES1 - extract de *Spirulina platensis* 1; ES2 - extract de *Spirulina platensis* 2; ES3 - extract de *Spirulina platensis* 3; PCM1 - preparat carotenoid cu mixoxantofilă 1; PCM2 - preparat carotenoid cu mixoxantofilă 2.

Anexa 6. Efectul antifungic sinergic al combinațiilor dintre compușii chimici și biologici asupra tulpinilor de referință

Compușii testați		<i>C. albicans</i> ATCC 90028	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	<i>C. glabrata</i> ATCC 2001	<i>S. cerevisiae</i> ATCC 4098	<i>M. guilliermondii</i> ATCC 6260	<i>C. neoformans</i> ATCC 13690
A. I (1.6) C ₁₄ H ₁₉ CuN ₅ O ₃ S M-4	ES1	1/8c+1/4b	1/4c+1/4b	1/4c+1/4b	1/4c+1/4b	1/4c+1/4b	1/16c+1/8b
	ES3	1/4c+1/4b	-	1/4c+1/4b	1/4c+1/4b	1/4c+1/4b	1/8c+1/32b
	PCM2	1/8c+1/8b	1/4c+1/4b	1/8c+1/16b	1/16c+1/16b	1/8c+1/4b	1/16c+1/16b
A. I (1.13) C ₁₇ H ₁₉ CuN ₅ O ₃ S RV-26	ES1	1/8c+1/16b	1/16c+1/8b	1/16c+1/4b	1/4c+1/4b	1/4c+1/4b	1/32c + 1/16b
	ES3	1/32c + 1/16b	1/8c+1/8b	1/4c+1/4b	-	1/4c+1/4b	1/32c + 1/16b
	PCM2	1/16c+1/8b	1/16c+1/8b	1/8c+1/8b	1/4c+1/4b	1/8c+1/8b	1/16c+1/16b
A. I (1.7) C ₁₈ H ₂₀ CuN ₄ O ₂ S RR-36	ES1	1/8c+1/16b	1/32c + 1/16b	1/32c + 1/16b	1/8c+1/4b	1/8c+1/4b	1/8c+1/16b
	ES3	1/8c+1/16b	1/8c+1/16b	1/8c+1/16b	1/8c+1/16b	1/4c+1/8b	1/8c+1/16b
	PCM2	1/32c+1/32b	1/8c+1/16b	1/8c+1/16b	1/8c+1/8b	1/4c+1/4b	1/8c+1/16b
A. I (1.24) C ₁₇ H ₁₇ ClCuN ₄ O ₂ S A-28	ES1	1/8c+1/4b	1/4c+1/4b	1/4c+1/4b	-	-	1/4c+1/4b
	ES3	1/4c+1/4b	1/4c+1/4b	-	-	-	1/4c+1/4b
	PCM2	1/8c+1/8b	1/8c+1/4b	1/4c+1/4b	-	-	1/8c+1/4b
A. I (1.55) C ₁₃ H ₁₆ C ₁₂ CuN ₄ S KSS 12	ES1	1/4c+1/8b	1/16c+1/8b	1/16c+1/8b	1/4c+1/4b	1/4c+1/4b	1/8c+1/4b
	ES3	1/4c+1/8b	1/4c+1/8b	1/4c+1/4b	1/4c+1/8b	1/4c+1/4b	1/16c+1/8b
	PCM2	1/8c+1/8b	1/16c+1/8b	1/16c+1/8b	1/4c+1/8b	1/4c+1/4b	1/16c+1/16b
A. I (1.60) C ₁₇ H ₁₆ N ₆ O ₂ S RG 34	ES1	1/32c + 1/16b	1/4c+1/8b	1/16c+1/8b	1/4c+1/4b	1/8c+1/4b	1/16c+1/8b
	ES3	1/16c + 1/8b	1/4c+1/4b	1/8c+1/8b	1/4c+1/4b	-	1/16c+1/8b
	PCM2	1/8c + 1/16b	1/16c+1/16b	1/16c+1/16b	1/4c+1/4b	1/4c+1/4b	1/16c+1/16b
A. I (1.71) C ₁₈ H ₂₀ CuN ₄ O ₂ S MUI 6	ES1	1/4c+1/8b	1/4c+1/4b	1/4c+1/4b	-	-	1/8c+1/4b
	ES3	1/4c+1/4b	1/4c+1/4b	1/4c+1/4b	-	-	1/4c+1/4b
	PCM2	1/8c+1/8b	1/8c+1/4b	1/4c+1/4b	-	-	

Notă: c – compus chimic; b – compus biologic.

Anexa 7. Activitatea antifungică a nanoparticulelor de argint (AgNPs) generate din pululan și din 6-carboxipululan asupra unor izolate clinice de fungi

Nr. d/o	Denumirea agentului fungic	Diametrul zonelor de inhibiție (mm)															
		Denumirea compuşilor testați															
		Pag, µg/ml				POAg, µg/ml				C4, µg/ml				C5, µg/ml			
1.	<i>C. glabrata</i>	15	13	13	11	17	15	14	12	16	15	13	7	16	16	13	7
2.	<i>C. albicans</i>	15	13	12	5	15	15	12	7	14	11	7	0	13	11	5	0
3.	<i>C. glabrata</i>	15	15	14	12	17	15	15	12	15	15	14	8	14	14	14	8
4.	<i>C. albicans</i>	13	12	11	7	13	12	12	0	12	10	7	0	12	10	5	0
5.	<i>C. albicans</i>	13	11	10	0	13	11	11	0	11	11	0	0	11	11	0	0
6.	<i>C. albicans</i>	11	10	10	6	13	10	11	6	10	10	8	0	10	10	6	0
7.	<i>C. albicans</i>	10	9	7	4	10	9	8	4	9	8	4	0	9	8	4	0
8.	<i>C. guilliermondii</i>	12	11	10	8	12	11	10	8	9	7	7	0	9	6	6	0
9.	<i>C. glabrata</i>	15	14	12	9	15	15	13	11	14	14	9	7	13	12	9	7
10.	<i>C. glabrata</i>	15	15	15	10	16	15	15	10	15	15	9	6	15	14	9	6
11.	<i>C. glabrata</i>	15	14	14	11	16	14	14	14	12	11	11	6	13	12	11	5
12.	<i>C. glabrata</i>	14	13	13	9	14	14	14	9	14	12	9	5	14	12	9	0
13.	<i>C. parapsilosis</i>	10	9	9	6	10	9	9	6	9	8	7	0	9	9	7	0
14.	<i>C. krusei</i>	10	10	8	5	10	9	8	5	9	5	5	0	9	5	5	0
15.	<i>C. parapsilosis</i>	15	14	11	9	15	14	11	9	14	13	9	7	9	9	9	7
16.	<i>C. parapsilosis</i>	13	11	11	7	13	11	11	7	13	10	8	5	10	7	7	5

17.	<i>C. parapsilosis</i>	12	11	10	6	12	11	11	6	11	11	6	4	9	8	5	4
18.	<i>S. cerevisiae</i>	19	17	17	14	19	16	15	13	16	15	13	11	18	15	15	13
19.	<i>S. cerevisiae</i>	13	13	10	7	12	11	9	7	11	7	7	0	10	7	7	0
20.	<i>C. albicans</i>	11	11	10	5	12	12	10	5	13	9	7	0	10	9	7	0
21.	<i>C. utilis</i>	10	10	10	7	11	10	10	7	10	9	7	0	9	7	7	0
22.	<i>C. krusei</i>	10	9	9	7	10	9	8	7	10	6	6	4	9	9	5	4
23.	<i>C. norvegensis</i>	14	13	13	6	14	13	10	7	15	9	8	0	13	9	8	0
24.	<i>C. neoformans</i>	16	15	15	11	16	14	14	11	15	11	9	6	13	11	9	6
25.	<i>C. pulcherrima</i>	15	13	11	0	15	13	11	0	12	10	9	0	12	10	9	0
26.	<i>C. lusitaniae</i>	15	15	13	6	15	15	13	6	16	12	10	0	16	12	10	0
27.	<i>C. pelliculosa</i>	16	14	14	10	14	14	14	10	14	10	10	0	14	10	10	0
28.	<i>C. tropicalis</i>	16	12	10	7	16	12	11	7	11	11	0	0	11	11	0	0
29.	<i>C. dubliniensis</i>	19	14	11	9	14	14	11	9	14	14	11	0	14	14	11	0
30.	<i>C. tropicalis</i>	14	13	12	7	13	12	10	7	12	7	6	0	11	7	6	0
31.	<i>C. kefyri</i>	20	18	15	10	20	18	15	10	18	17	10	0	18	17	10	0
32.	<i>C. norvegensis</i>	19	16	15	6	19	16	15	6	17	16	9	0	17	16	11	0
33.	<i>C. glabrata</i>	16	15	15	10	15	15	15	10	15	14	11	8	15	14	12	6
34.	<i>C. albicans</i>	15	14	10	7	15	14	10	7	13	9	9	0	19	9	9	0
35.	<i>C. glabrata</i>	17	15	15	9	15	15	15	9	15	15	11	7	15	15	11	5
36.	<i>C. glabrata</i>	13	11	7	7	12	11	7	6	12	11	7	6	12	11	7	6
37.	<i>C. albicans</i>	10	9	7	6	10	9	7	6	9	8	6	0	9	8	6	0
38.	<i>C. lusitaniae</i>	14	14	11	6	14	13	11	6	11	7	6	0	11	6	6	0

39.	<i>C. albicans</i>	11	9	7	6	9	8	7	6	8	7	6	0	8	7	6	0
40.	<i>C. glabrata</i>	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	5	0	8	8	5	0
41.	<i>C. glabrata</i>	15	12	9	8	15	12	9	8	12	9	8	0	12	9	8	0
42.	<i>C. glabrata</i>	15	11	7	7	15	11	7	7	12	11	7	0	12	11	7	0
43.	<i>C. tropicalis</i>	11	10	9	6	10	9	9	6	10	8	7	6	10	8	6	6
44.	<i>C. albicans</i>	12	11	9	4	12	9	9	4	11	8	6	0	11	8	6	0
45.	<i>M. capitatus</i>	12	11	10	7	12	11	10	7	11	9	6	0	10	9	6	0
46.	<i>T. asahii</i>	14	12	12	7	14	12	12	7	12	12	7	0	12	12	7	0
47.	<i>C. robusta</i>	18	17	13	9	18	17	13	9	18	13	9	7	18	13	9	7
48.	<i>C. parapsilosis</i>	15	12	9	7	14	12	9	7	12	10	8	0	12	10	8	0
49.	<i>C. tropicalis</i>	12	12	10	8	12	12	10	8	12	8	8	0	12	8	8	0
50.	<i>C. guilliermondii</i>	13	11	10	4	13	11	10	4	11	7	4	0	11	7	4	0
51.	<i>C. albicans</i>	13	8	6	5	13	8	6	5	8	8	4	0	8	8	4	0
52.	<i>C. glabrata</i>	17	12	10	7	16	12	10	7	12	11	7	0	12	11	7	0
53.	<i>C. glabrata</i>	11	10	8	6	9	8	8	6	9	8	6	6	9	8	6	6
54.	<i>C. glabrata</i>	14	13	12	9	14	13	12	9	14	13	9	0	14	12	9	0
55.	<i>C. albicans</i>	10	10	8	6	10	10	8	6	10	10	6	0	10	10	6	0
56.	<i>C. guilliermondii</i>	10	10	8	6	10	10	8	6	10	10	6	0	10	10	6	0
57.	<i>C. parapsilosis</i>	11	10	10	6	11	10	10	6	10	6	5	4	10	6	5	4
58.	<i>C. glabrata</i>	8	8	7	7	8	8	7	7	8	8	7	7	8	8	7	7
59.	<i>C. glabrata</i>	15	13	13	10	15	13	13	10	13	13	11	8	13	13	11	8
60.	<i>C. glabrata</i>	11	10	9	8	11	10	9	8	9	9	8	7	9	9	8	7

61.	<i>C. glabrata</i>	16	15	11	9	16	15	11	9	15	13	11	6	15	11	11	6
62.	<i>C. glabrata</i>	16	15	15	10	15	15	15	10	15	12	10	8	15	12	10	8
63.	<i>C. albicans</i>	9	9	8	6	9	9	8	6	9	6	6	0	9	6	6	0
64.	<i>C. glabrata</i>	15	13	13	10	15	13	13	9	14	13	13	6	14	13	10	6
65.	<i>C. utilis</i>	11	11	10	7	11	10	10	7	10	10	9	0	10	10	9	0
66.	<i>C. parapsilosis</i>	11	11	7	7	11	11	7	7	11	0	0	0	11	0	0	0
67.	<i>S. cerevisiae</i>	14	13	13	9	14	13	13	9	13	13	9	9	13	13	9	9
68.	<i>C. krusei</i>	11	9	6	6	11	9	6	6	11	9	4	0	11	9	4	0
69.	<i>C. albicans</i>	13	11	8	6	13	11	8	6	11	9	8	0	11	9	6	0
70.	<i>C. famata</i>	8	7	6	5	8	7	6	5	7	6	5	4	7	6	5	4
71.	<i>C. glabrata</i>	14	12	11	10	14	13	13	10	11	11	9	8	11	11	9	8
72.	<i>C. glabrata</i>	15	13	13	11	15	13	13	12	15	13	11	0	15	13	11	0
73.	<i>C. krusei</i>	12	9	9	8	12	9	9	8	10	9	9	0	10	9	9	0
74.	<i>C. albicans</i>	16	14	14	7	16	14	14	7	14	10	9	0	14	10	9	0
75.	<i>C. parapsilosis</i>	14	12	11	9	14	12	11	9	14	12	9	6	14	12	9	6
76.	<i>C. albicans</i>	15	15	13	7	15	15	13	7	13	12	10	0	13	12	10	0
77.	<i>C. parapsilosis</i>	13	13	11	8	13	13	11	8	13	13	9	6	13	13	9	6
78.	<i>C. glabrata</i>	16	15	14	9	16	15	14	9	16	15	11	6	16	15	11	6
79.	<i>C. parapsilosis</i>	10	10	9	8	10	10	9	8	10	10	8	5	10	10	8	5
80.	<i>C. lusitaniae</i>	17	16	12	9	17	16	12	9	16	15	9	0	16	15	9	0
81.	<i>C. albicans</i>	13	12	7	2	11	10	7	2	8	7	4	0	8	7	4	0
82.	<i>C. glabrata</i>	15	15	14	10	15	15	14	10	15	15	14	0	15	14	13	0

83.	<i>C. auris</i>	8	7	5	0	8	7	5	0	7	0	0	0	6	0	0	0
84.	<i>C. kefyr</i>	16	14	13	7	16	14	13	7	14	13	9	5	14	13	9	5
85.	<i>C. albicans</i>	20	19	17	9	19	18	16	9	19	18	10	0	19	17	10	0
86.	<i>C. glabrata</i>	18	14	14	11	18	14	14	11	15	14	11	0	15	14	11	0
87.	<i>C. parapsilosis</i>	17	17	14	9	17	17	14	9	17	13	11	3	13	17	11	3
88.	<i>C. parapsilosis</i>	16	15	13	7	16	15	13	7	16	12	9	0	16	12	8	0
89.	<i>C. parapsilosis</i>	16	16	14	7	16	16	14	7	16	13	9	0	16	13	7	0
90.	<i>C. parapsilosis</i>	18	16	15	6	17	16	15	6	16	14	10	2	16	14	10	2
91.	<i>C. parapsilosis</i>	16	16	14	11	16	16	14	11	16	14	10	5	16	14	8	5
92.	<i>C. krusei</i>	15	12	10	4	15	12	10	4	12	10	4	2	12	10	4	2
93.	<i>C. albicans</i>	22	22	19	10	22	20	19	10	22	17	10	0	22	17	10	0
94.	<i>C. guilliermondii</i>	15	15	10	3	15	13	11	5	10	10	0	0	10	10	0	0
95.	<i>C. albicans</i>	21	18	17	13	21	18	17	15	18	18	13	3	18	18	16	3
96.	<i>C. glabrata</i>	19	18	14	8	19	18	16	8	17	14	8	7	20	16	9	8
97.	<i>C. albicans</i>	16	14	9	6	16	15	9	6	12	9	0	0	17	12	0	0
98.	<i>C. parapsilosis</i>	16	14	8	2	16	14	8	2	12	9	0	0	12	8	0	0
99.	<i>C. albicans</i>	20	18	12	8	20	18	15	10	16	13	2	0	21	15	2	0
100.	<i>C. albicans</i>	19	18	9	6	18	16	9	6	13	11	0	0	13	10	0	0

Anexa 8. Statistica descriptivă a markerilor stresului oxidativ, sistemului antioxidant și patternului inflamator din loturile formate (Rstudio output)

	Martor	C1	C2	N1	N2	C1+N1	C1+N2	C2+N1	C2+N2
	(N=12)	(N=12)	(N=12)	(N=12)	(N=12)	(N=12)	(N=12)	(N=12)	(N=12)
DAM, μM/L									
Mean (SD)	5.14 (0.425)	7.49 (0.518)	5.51 (0.560)	4.23 (0.362)	3.27 (0.460)	4.94 (0.403)	4.08 (0.233)	4.37 (0.314)	3.41 (0.297)
Median (IQR)	5.10 (0.675)	7.55 (0.725)	5.55 (0.825)	4.25 (0.450)	3.10 (0.725)	4.85 (0.725)	4.00 (0.325)	4.40 (0.525)	3.35 (0.500)
[Min, Max]	[4.60, 5.80]	[6.60, 8.20]	[4.60, 6.30]	[3.70, 4.90]	[2.80, 4.00]	[4.50, 5.50]	[3.80, 4.50]	[4.00, 4.90]	[3.00, 3.90]
PPOA, μM/L									
Mean (SD)	35.7 (2.91)	47.7 (1.79)	37.5 (2.49)	34.6 (2.86)	34.2 (5.03)	34.5 (3.03)	34.4 (4.93)	34.7 (2.85)	33.5 (1.92)
Median (IQR)	35.3 (4.45)	47.7 (2.65)	37.9 (3.60)	34.6 (4.68)	32.8 (4.73)	34.6 (4.48)	33.4 (4.30)	34.6 (4.43)	33.6 (1.68)
[Min, Max]	[30.8, 40.2]	[44.5, 50.6]	[32.8, 40.9]	[30.0, 39.1]	[29.1, 47.8]	[29.4, 38.6]	[29.2, 48.0]	[29.8, 39.0]	[31.2, 38.5]
SOD, u/c									
Mean (SD)	850 (6.57)	817 (21.3)	823 (7.52)	994 (7.17)	1040 (7.37)	982 (5.83)	1020 (3.57)	985 (6.09)	1020 (5.91)
Median (IQR)	851 (7.53)	819 (12.1)	823 (4.88)	991 (9.28)	1040 (7.05)	983 (6.38)	1020 (4.10)	984 (8.48)	1020 (6.03)
[Min, Max]	[839, 860]	[758, 844]	[812, 839]	[984, 1010]	[1020, 1050]	[970, 992]	[1010, 1030]	[977, 995]	[1010, 1030]
Catalaza, μM/s.L									
Mean (SD)	17.7 (0.481)	13.0 (0.711)	18.4 (0.607)	37.5 (1.96)	48.1 (1.05)	21.6 (1.57)	33.5 (0.619)	37.0 (1.84)	40.1 (1.07)
Median (IQR)	17.8 (0.600)	13.0 (0.875)	18.3 (0.750)	37.1 (2.48)	47.9 (1.38)	21.9 (2.40)	33.7 (0.725)	37.1 (2.58)	39.8 (0.450)
[Min, Max]	[16.8, 18.3]	[11.7, 14.3]	[17.5, 19.4]	[34.8, 40.7]	[46.8, 50.1]	[19.7, 24.7]	[32.1, 34.2]	[34.2, 39.9]	[39.3, 43.3]
AAT cu ABTS, μM/L									
Mean (SD)	137 (4.29)	149 (3.19)	158 (4.98)	142 (3.88)	154 (3.39)	138 (4.61)	152 (1.96)	139 (1.62)	159 (2.32)
Median (IQR)	138 (5.23)	150 (3.88)	158 (3.08)	141 (5.63)	153 (6.23)	138 (6.00)	152 (1.80)	139 (0.800)	160 (1.88)
[Min, Max]	[130, 145]	[143, 154]	[144, 162]	[137, 149]	[150, 160]	[130, 146]	[150, 157]	[137, 144]	[153, 162]
G-S-T, nM/s.L									
Mean (SD)	44.1 (2.53)	44.5 (2.33)	42.5 (2.29)	45.1 (2.19)	46.3 (1.91)	44.4 (2.41)	46.0 (1.85)	44.0 (1.14)	46.2 (2.02)
Median (IQR)	44.7 (4.80)	44.7 (4.88)	42.3 (3.60)	45.8 (4.15)	46.9 (3.23)	45.2 (4.33)	46.6 (3.18)	44.4 (1.73)	46.2 (3.60)
[Min, Max]	[40.0, 46.9]	[41.1, 47.1]	[39.7, 46.6]	[41.7, 47.5]	[43.4, 48.5]	[41.0, 47.1]	[43.1, 48.5]	[42.1, 45.2]	[43.1, 49.7]

	Martor	C1	C2	N1	N2	C1+N1	C1+N2	C2+N1	C2+N2
	(N=12)	(N=12)	(N=12)	(N=12)	(N=12)	(N=12)	(N=12)	(N=12)	(N=12)
GPO, nM/s.L									
Mean (SD)	333 (15.1)	316 (10.0)	334 (14.0)	451 (15.9)	470 (6.06)	397 (14.1)	451 (16.9)	446 (14.5)	438 (10.6)
Median (IQR)	337 (6.75)	319 (13.6)	339 (4.53)	452 (8.45)	470 (3.43)	399 (4.75)	462 (30.0)	449 (1.38)	437 (2.03)
[Min, Max]	[288, 346]	[301, 329]	[296, 346]	[403, 462]	[454, 479]	[357, 416]	[422, 467]	[402, 462]	[430, 471]
GR, nM/s.L									
Mean (SD)	50.4 (10.9)	31.7 (10.8)	52.7 (10.0)	95.5 (10.3)	169 (5.67)	61.0 (6.26)	117 (4.15)	89.8 (4.66)	150 (5.05)
Median (IQR)	47.8 (5.83)	29.8 (9.23)	50.4 (5.45)	97.4 (11.8)	169 (4.85)	59.3 (3.33)	117 (2.25)	91.5 (2.70)	149 (4.00)
[Min, Max]	[38.6, 78.6]	[21.2, 61.3]	[41.7, 78.8]	[75.9, 107]	[158, 178]	[55.8, 79.5]	[111, 127]	[80.1, 93.2]	[146, 164]
IL-1, pg/ml									
Mean (SD)	48.5 (1.53)	51.4 (2.82)	47.7 (1.46)	47.7 (1.60)	47.2 (1.50)	49.6 (1.42)	47.5 (1.47)	47.7 (1.25)	46.6 (0.997)
Median (IQR)	48.6 (2.20)	51.0 (1.35)	48.1 (2.23)	47.6 (1.40)	47.5 (1.58)	50.1 (2.33)	47.8 (1.38)	47.6 (1.40)	46.9 (0.425)
[Min, Max]	[45.1, 50.4]	[48.2, 59.4]	[44.7, 49.5]	[44.2, 50.0]	[44.0, 49.0]	[46.7, 51.1]	[44.2, 49.2]	[45.1, 49.8]	[44.0, 47.3]
TNF, pg/ml									
Mean (SD)	99.3 (6.63)	101 (6.23)	96.8 (6.37)	80.0 (6.73)	79.2 (4.52)	96.1 (4.69)	82.9 (4.50)	80.5 (6.83)	82.0 (2.40)
Median (IQR)	99.1 (6.28)	102 (6.08)	97.1 (5.70)	79.2 (4.33)	78.6 (2.28)	97.6 (8.58)	81.3 (2.35)	80.2 (4.50)	81.6 (1.43)
[Min, Max]	[90.3, 113]	[92.6, 115]	[88.2, 111]	[71.6, 94.7]	[72.3, 91.5]	[89.5, 103]	[79.8, 95.6]	[72.0, 95.2]	[80.4, 89.2]
IL-6, pg/ml									
Mean (SD)	132 (3.84)	150 (3.19)	130 (3.87)	110 (3.25)	106 (3.11)	132 (3.94)	122 (3.00)	113 (3.20)	109 (3.28)
Median (IQR)	132 (5.85)	150 (3.70)	130 (4.95)	111 (5.28)	106 (3.80)	133 (6.48)	121 (3.28)	112 (3.28)	108 (4.30)
[Min, Max]	[125, 137]	[144, 156]	[125, 137]	[105, 115]	[101, 111]	[126, 139]	[117, 127]	[108, 120]	[104, 114]

IL-10, pg/ml									
Mean (SD)	58.8 (1.58)	58.1 (2.05)	60.5 (0.932)	89.1 (1.73)	106 (3.73)	69.4 (2.12)	83.6 (1.02)	74.8 (0.375)	102 (3.36)
Median (IQR)	58.9 (2.45)	58.4 (2.73)	60.5 (1.58)	89.0 (2.43)	106 (5.13)	69.8 (2.03)	83.8 (0.750)	74.9 (0.600)	102 (3.10)
[Min, Max]	[55.8, 61.1]	[54.2, 61.3]	[59.3, 61.9]	[86.5, 92.3]	[99.7, 110]	[64.3, 72.1]	[80.8, 84.7]	[74.2, 75.4]	[98.9, 111]

Notă: Mean – media, median – mediana, SD – abaterea standard, IQR – abaterea intercvartilă, Min – valoarea minimală, Max – valoarea maximală, N1 – extract de S. platensis (ES); N2 – preparat carotenoid cu mixoxantofila (MX); C1 - compusul chimic C₁₉H₂₁BrCuN₄S; C2 - compusul chimic C₁₇H₁₉CuN₅O₃S; 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.

Anexa 9. Brevete de invenție



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

<p>(21) Nr. depozit: a 2018 0021 (22) Data depozit: 2018.03.22</p>	<p>(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2019.09.30, BOPI nr. 9/2019</p>
<p>(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</p>	

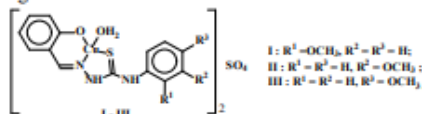
(54) **Complecșii sulfatului de cupru(II) cu 2-(2-hidroxibenziliden)-N-(metoxifenil)hidrazincarbotioamide, care manifestă activitate antimicrobiană față de microorganismele gram-pozitive**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la chimie și medicină, și anume la un șir de compuși coordinați 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 coordinați I-III ai sulfatului de cupru(II) cu 2-(2-hidroxibenziliden)-N-(2-metoxifenil)hidrazincarbotioamida (I), 2-(2-hidroxibenziliden)-N-(3-metoxifenil)

hidrazincarbotioamida (II) și 2-(2-hidroxibenziliden)-N-(4-metoxifenil)hidrazincarbotioamida (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

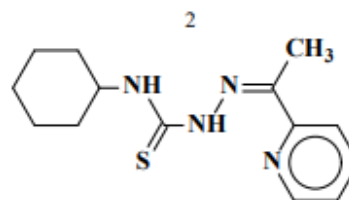
(21) Nr. depozit: a 2018 0079 (22) Data depozit: 2018.09.12	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2019.09.30, BOP1 nr. 9/2019
(71) Solicitant: UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD	
(72) Inventatori: GULEA Aurelian, MD; BURDUNIUC Olga, MD; BĂLAN Greta, MD; RUSNAC Roman, MD; ȚAPCOV Victor, MD; RUDIC Valeriu, MD	
(73) Titular: UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD	

(54) Utilizare a N-ciclohexil-2-[1-(piridin-2-il)etiliden]hidrazincarbotioamidei în calitate de inhibitor al proliferării microorganismelor gram-pozitive și fungilor *Candida albicans*

(57) Rezumat:

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]hidrazincarbotioamidei 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

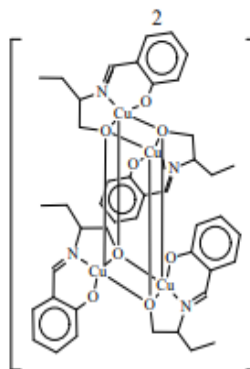
(21) Nr. depozit: a 2018 0048 (22) Data depozit: 2018.06.14	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2019.12.31, BOPI nr. 12/2019
(71) Solicitant: UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD (72) Inventatori: GULEA Aurelian, MD; ȚAPCOV Victor, MD; BĂLAN Greta, MD; BURDUNIUC Olga, MD (73) Titular: 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 antimicrobică**

(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 antimicrobică față de un spectru larg de microorganisme gram-pozitive, gram-negative 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-negative 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-alitiosemicarbazona 2-acetilpiridinei în calitate de inhibitori ai proliferării fungilor din specia *Cryptococcus neoformans***

(57) Rezumat:

¹
Invenția se referă la chimie și medicină, și anume la compuși coordinativi 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-¹{N-(prop-2-en-1-il)-N'-[1-(piridin-2-il)-etiliden]-carbamohidrazontioato}imidazolcupru

²
monohidrat și nitrato-²{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	

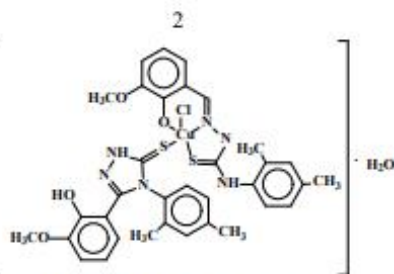
(54) Inhibitor al proliferării fungilor din specia *Cryptococcus neoformans* in baza hidratului de cloro-{{4-(2,4-dimetilfenil)-2-(oxo-3-metoxibenziliden)hidrazincarbotoamido(1-)-O,N,S}-{{4-(2,4-dimetilfenil)-5-(2-hidroxi-3-metoxifenil)-2,4-dihidro-3H-1,2,4-triazol-3-tion]-S} cupru

(57) Rezumat:

1

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 antimicotică față de fungii din specia *Cryptococcus neoformans*.

Revendicări: 2

Figuri: 1

MD 4675 C1 2020.11.30



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	

MD 4712 B1 2020.09.30

(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 4708 B1 2020.08.31

REPUBLICA MOLDOVA

(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală(11) **4708** (13) **B1**
(51) Int.Cl: *C07F 11/00* (2006.01)
C07D 213/53 (2006.01)
C07C 337/08 (2006.01)
A61K 31/175 (2006.01)
A61P 31/10 (2006.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE

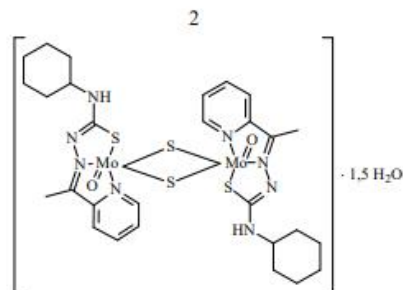
In termen de 6 luni de la data publicării mențiunii privind hotărârea de acordare a brevetului de invenție, orice persoană poate face opoziție la acordarea brevetului	
(21) Nr. depozit: a 2019 0044 (22) Data depozit: 2019.05.30	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2020.08.31, BOPI nr. 8/2020
(71) Solicitant: UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD (72) Inventatori: GULEA Aurelian, MD; FUIOR Arcadie, MD; FLOQUET Sebastien, FR; BURDUNIUC Olga, MD; ȚAPCOV Victor, MD; TODERAȘ Ion, MD (73) Titular: UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD	

(54) Bis(μ_2 -sulfido)-bis{[N-ciclohexil-N'-(1-piridin-2-il)-etiliden]carbamoimidrazontioato-(N,N,S)-oxomolibden} sescvihadrat care manifestă proprietăți de inhibitor al proliferării fungilor levuriformi

(57) Rezumat:

1
Invenția se referă la chimie și medicină, și anume la sinteza unui compus coordinativ al molibdenului(V) biologic activ din clasa tiosemicarbazonaților metalelor de tranziție. Acest complex inhibă proliferarea fungilor levuriformi și datorită acestor proprietăți poate găsi aplicare în medicină și veterinarie în calitate de preparat antifungic.

Conform invenției, se revendică compusul bis(μ_2 -sulfido)-bis{[N-ciclohexil-N'-(1-piridin-2-il)-etiliden]carbamoimidrazontioato-(N,N,S)-oxomolibden} sescvihadrat cu formula:



Compusul menționat manifestă proprietăți de inhibitor al proliferării fungilor levuriformi.

Revendicări: 2

MD 4708 B1 2020.08.31



MD 4696 C1 2021.02.28

REPUBLICA MOLDOVA

(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) 4696 (13) C1

(51) Int.Cl.: A61K 31/175 (2006.01)
A61K 31/155 (2006.01)
A61K 31/30 (2006.01)
A61P 31/10 (2006.01)
C07F 1/08 (2006.01)
C07C 337/08 (2006.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE

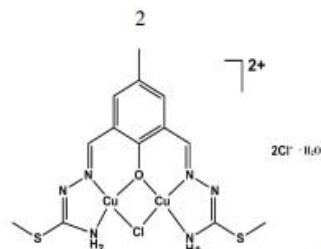
(21) Nr. depozit: a 2019 0027 (22) Data depozit: 2019.04.04	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2020.05.31, BOPI nr. 5/2020
(71) Solicitanți: INSTITUTUL DE CHIMIE, MINISTERUL EDUCAȚIEI, CULTURII ȘI CERCETĂRII, MD; UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD	
(72) Inventori: JOVMIR Tudor, MD; BURDUNIUC Olga, MD; POPA Tatiana, MD; DRUȚĂ Vadim, MD; GULEA Aurelian, MD; LOZAN Vasile, MD	
(73) Titulari: 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
antimicotic

(57) Rezumat:

Invenția se referă la utilizarea unui compus coordinativ binuclear de cupru în bază de izotiosemicarbazone hidroxiaromate în calitate de remediu antimicotic și poate fi aplicată în medicină.

Compusul binuclear de cupru(II) hidrosolubil cu formula $[Cu_2(\mu-H_2DF-T_1)-\mu-Cl]Cl_2 \cdot H_2O$, unde H_3DF-T_1 reprezintă bis(S-metilzotiosemicarbazona) 2,6-diformil-4-metilfenolului:



posedă o activitate antimicotică până la concentrații minime de 2...8 $\mu\text{g/mL}$.

Compusul binuclear de cupru susmenționat poate fi aplicat sub formă de soluții apoase diluate pentru combaterea diferitor micoze.

Revendicări: 1

MD 4696 C1 2021.02.28



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	
(21) Nr. depozit: a 2019 0082 (22) Data depozit: 2019.11.15	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2021.02.28, BOPI nr. 2/2021
(71) Solicitanți: INSTITUTUL DE CHIMIE, Ministerul Educației, Culturii și Cercetării, MD; UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, Ministerul Educației, Culturii și Cercetării, 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, Ministerul Educației, Culturii și Cercetării, MD; UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, Ministerul Educației, Culturii și Cercetării, MD	
(74) Mandatar autorizat: JOVMIR Tudor	

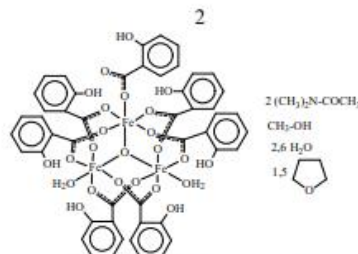
(54) Utilizarea clusterului de oxohepta(salicilat)trifrier(III)-polisolvat in calitate de inhibitor al proliferării fungilor din specia *Cryptococcus neoformans*

(57) Rezumat:

1
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)trifrier(III)-polisolvat cu compoziția

$[\text{Fe}^{\text{III}}\text{O}(\text{SalH})_7(\text{H}_2\text{O})_2]-(\text{DMAA})_2(\text{H}_2\text{O})_{2,6}(\text{CH}_3\text{OH})(\text{THF})_{1,5}$, unde SalH reprezintă acidul salicilic monodeprotonat, DMAA - dimetilacetamida, THF - tetrahidrofuranol, totodată clusterul are următoarea formulă structurală:



Rezultatul tehnic al invenției constă în stabilirea la clusterul de oxohepta(salicilat)trifrier(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

- (11) **1684** (13) Y
 (51) **Int. Cl.:** **A61K 33/38** (2006.01)
B82B 3/00 (2006.01)
C01G 5/00 (2006.01)
A61P 31/10 (2006.01)
- (21) s 2022 0053
 (22) 2022.08.12
 (71)(73) IP UNIVERSITATEA DE STAT DE
 MEDICINĂ ŞI FARMACIE „NICOLAE TESTE-
 MIŢANU” DIN REPUBLICA MOLDOVA, MD;
 AGENŢIA NAŢIONALĂ PENTRU SĂNĂTATE
 PUBLICĂ AL MINISTERULUI SĂNĂTĂŢII AL
 REPUBLICII MOLDOVA, MD
- (72) BURDUNIUC Olga, MD; COŞERI Sergiu, RO;
 MAREŞ Mihai, RO; BILIUŢĂ Gabriela, RO;
 NASTASA Valentin, RO; BOSTĂNARU-
 ILIESCU Andra-Cristina, RO
- (54) **Procedeu de obţinere a materialelor pe
 bază de nanoparticule de argint cu
 activitate antifungică**
- (57) Invenția se referă la nanotehnologie și
 medicină, în special la un procedeu de ob-
 ținare a materialelor pe bază de nanoparticule
 de argint, stabilizate cu derivați celulozici cu
 activitate antifungică.
 Esența invenției constă în aceea că se
 prepară o soluție de azotat de argint cu
 concentrația de 0,01 M prin dizolvarea lui în
 apă bidistilată sau dimetilsulfoxid, de ase-
 menea, se prepară o soluție cu concentrația
 de 1% de un derivat celulozic în apă
 bidistilată sau dimetilsulfoxid, apoi în soluția
 cu derivatul celulozic se adaugă soluție de
 azotat de argint într-un raport volumic de 4:1,
 care se agită continuu, timp de 2 ore, la
 temperatura camerei. În calitate de derivat
 se utilizează hidroxipropilceluloză,
 metilceluloză, etilceluloză sau acetat de
 celuloză.

Revendicări: 2

Figuri: 2

- (54) **Process for producing materials based on
 silver nanoparticles with antifungal activity**
- (57) The invention relates to nanotechnology and
 medicine, in particular to a process for
 producing materials based on silver
 nanoparticles stabilized by cellulose
 derivatives with antifungal activity.
 Summary of the invention consists in that it is
 prepared a silver nitrate solution with a
 concentration of 0.01 M by dissolving it in
 bidistilled water or dimethyl sulfoxide, it is also
 prepared a solution with a concentration of
 1% of a cellulose derivative in bidistilled water
 or dimethyl sulfoxide, then to the solution with
 the cellulose derivative is added silver nitrate

solution in a volume ratio of 4:1, which is
 continuously stirred for 2 hours, at room
 temperature. As cellulose derivative is used
 hydroxypropylcellulose, methylcellulose,
 ethylcellulose or cellulose acetate.

Claims: 2

Fig.: 2

- (54) **Способ получения материалов на
 основе наночастиц серебра с анти-
 грибковой активностью**
- (57) Изобретение относится к нанотехнологии и
 медицине, в частности к способу полу-
 чения материалов на основе наночастиц
 серебра, стабилизированных производ-
 ными целлюлозы с антигрибковой актив-
 ностью.
 Сущность изобретения состоит в том, что
 приготавливают раствор нитрата серебра с
 концентрацией 0,01 М путем его раство-
 рения в бидистиллированной воде или ди-
 метилсульфоксиде, также приготавливают
 раствор с концентрацией 1% производного
 целлюлозы в бидистиллированной воде
 или диметилсульфоксиде, затем в раствор
 с производным целлюлозы добавляют
 раствор нитрата серебра в объемном
 соотношении 4:1, который непрерывно
 перемешивают в течение 2 часов, при ком-
 натной температуре. В качестве произво-
 дного целлюлозы используют гидроксипро-
 пилцеллюлозу, метилцеллюлозу, этилцел-
 лозу или ацетат целлюлозы.

П. формулы: 2

Фиг.: 2

- (11) **1685** (13) Y
 (51) **Int. Cl.:** **A61K 33/38** (2006.01)
B82B 3/00 (2006.01)
C01G 5/00 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)
- (21) s 2022 0054
 (22) 2022.08.12
 (71)(73) IP UNIVERSITATEA DE STAT DE
 MEDICINĂ ŞI FARMACIE „NICOLAE TESTE-
 MIŢANU” DIN REPUBLICA MOLDOVA, MD;
 AGENŢIA NAŢIONALĂ PENTRU SĂNĂTATE
 PUBLICĂ AL MINISTERULUI SĂNĂTĂŢII AL
 REPUBLICII MOLDOVA, MD
- (72) BURDUNIUC Olga, MD; COŞERI Sergiu, RO;
 MAREŞ Mihai, RO; BILIUŢĂ Gabriela, RO;
 NASTASA Valentin, RO; ILIESCU Bogdan-
 Ştefan, RO; BOSTĂNARU-ILIESCU Andra-
 Cristina, RO

Anexa 10. Certificate de inovator





Republica Moldova
Ministerul Sănătății,
Muncii și Protecției Sociale

CERTIFICAT DE INOVATOR

Nr. 5842

Pentru inovația cu titlul
**PROCEDEU DE DETERMINARE A
ACTIVITĂȚII ANTICOMPLEMENTARE A
MICROORGANISMELOR**

Inovația a fost înregistrată pe data de **05 Mai 2021**
la Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie
"Nicolae Testemițanu"

Se recunoaște calitatea de autor(i)

**BĂLAN Greta, BURDUNIUC Olga,
RUDIC Valeriu**



Data eliberării

05 Mai 2021

L.S.

(Semnătura autorizată)



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**



Data eliberării

07 Mai 2021

[Signature]
(Semnătură 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

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
ROMANIA
IIFIA
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

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, Tsapkov 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
ROMANIA
IIFIA
INTERNATIONAL FEDERATION OF INVENTORS' ASSOCIATIONS
wifa

EURO INVENT



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

Radu Munteanu



*The International Student Innovation and Scientific Research Exhibition
- "Cadet INOVA '19" -
The "Nicolae Bălcescu" Land Forces Academy of Sibiu, Romania
11-13 April 2019*

HONORABLE MENTION OF THE "Cadet INOVA '19" EXHIBITION

Is bestowed on the researchers

*Aurelian GULEA, Olga BURDUNTUC, Greta BALAN, Roman RUSNAC, Victor ȚAPCOV,
Valeriu RUDIC*

for the innovation:

*INHIBITOR OF PROLIFERATION OF GRAM-POSITIVE MICROORGANISMS AND CANDIDA
ALBICANS SPECIES*

*President of the Jury,
Dipl. - Eng.
Andrei Victor SANDU PhD*

Andrei Victor Sandu



*President of the Exhibition,
Dipl. - Eng.
Silviu Mihai PETRISOR PhD*

Silviu Mihai Petrisor

IPM-CI-2019





MINISTRY OF RESEARCH AND INNOVATION



DIPLOMA

On behalf of the **Scientific Community of ROMANIA**
this diploma is awarded to

Bălan Greta, Burduniuc Olga, Țapcov Victor, Mitkevici Natalia, Rudic
.....Valeriu, Gulea Aurelian ~ MOLDAVIE.....

for the high scientific and technological level of the invention

*Copper containing agents with antibacterial activity against gram positive
microorganisms*

presented at the 46th edition of the International Exhibition of Inventions GENEVA 2018

Minister,

Nicolae BURNETE



**Inventions
Geneva**

46th International Exhibition
of Inventions Geneva
The world's most important
11 April > 15 April 2018



MINISTRY OF RESEARCH AND INNOVATION



DIPLOMA

On behalf of the **Scientific Community of ROMANIA**
this diploma is awarded to

Bălan Greta, Burduniuc Olga, Țapcov Victor, Mitkevici Natalia, Rudic
.....Valeriu, Gulea Aurelian ~ MOLDAVIE.....

for the high scientific and technological level of the invention

*Copper containing agents with antibacterial activity against gram positive
microorganisms*

presented at the 46th edition of the International Exhibition of Inventions GENEVA 2018

Minister,

Nicolae BURNETE





EUROINVENT
EUROPEAN EXHIBITION OF CREATIVITY AND INNOVATION



DIPLOMA

2023

Procedure for obtaining materials based on silver nanoparticles with antifungal activity
Olga Burduniuc, Sergiu Coşeri, Mihai Mareş, Gabriela Biliuță, Valentin Năstasă, Andra-Cristina Bostănaru-Iliescu

MEDICINE  AWARD

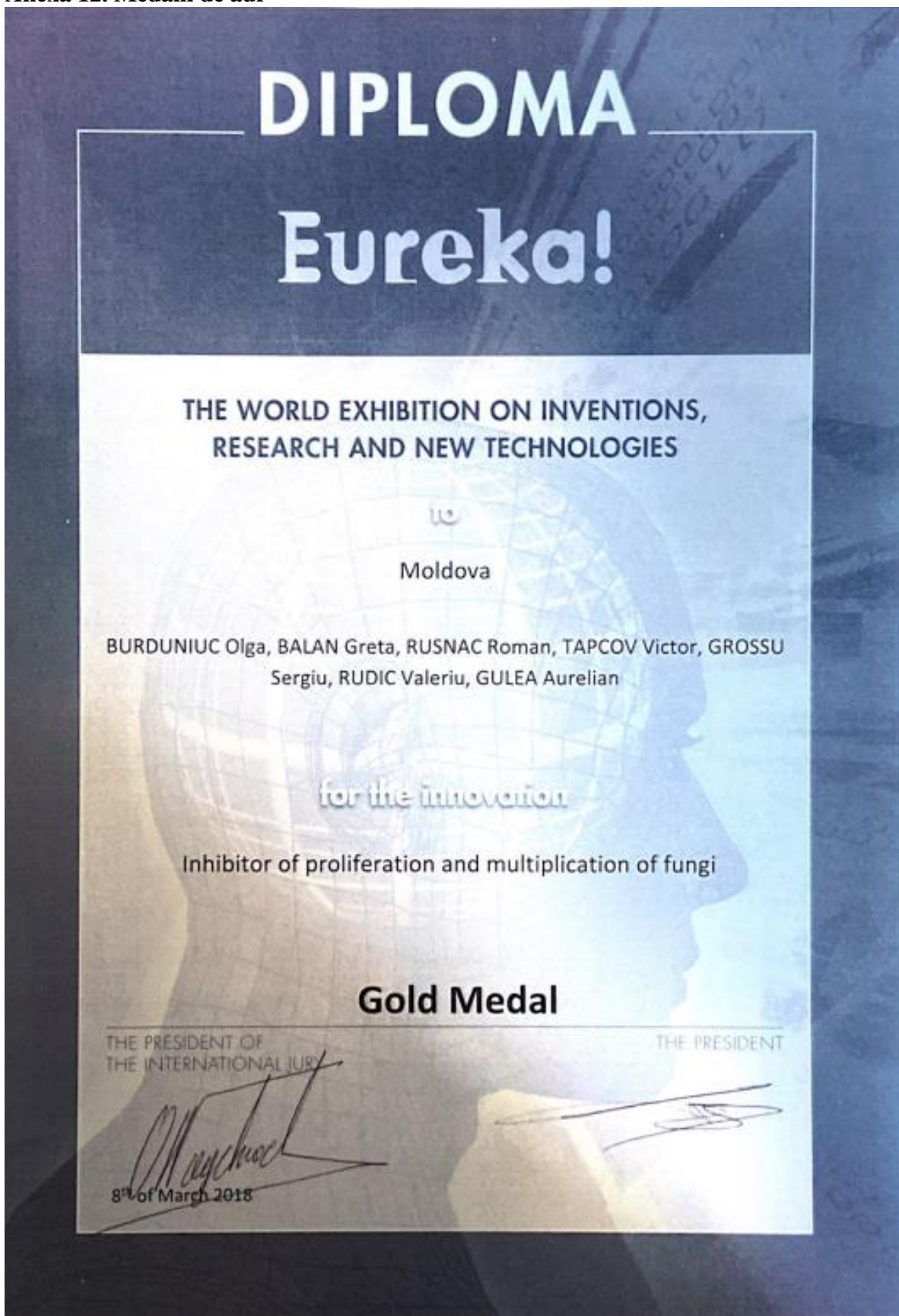
President of International Jury
Prof. Dr. Eng. Mohd Mustafa Al Bakri ABDULLAH

President of Scientific Committee
Prof. Dr. Ion SANDU

May 13, 2023



Anexa 12. Medalii de aur





Universitatea Tehnică
„George 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 SEGHDIN PhD



Universitatea Tehnică
"Gheorghe Asachi" din Iași



Institutul Național
de Inventică, Iași

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 SEGHEDEIN PhD





SALONUL INTERNAȚIONAL DE
**INVENȚII
INOVAȚII**
„TRAIAN VUIA” TIMIȘOARA



Diplomă

SE ACORDĂ



MEDALIA
DE AUR

pentru invenția
INHIBITOR OF INCREASE AND ULTIPLICATION OF THE FUNGI
a u t o r i

Burduniuc Olga, Balan Greta, Rusnac Roman, Tsapkov Victor, Grossu Trofim, Rudic Valeriu, Gulea Aurelian

i n s t i t u Ț i a
UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA
UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE „NICOLAE
TESTEMIȚANU”
NATIONAL PUBLIC HEALTH AGENCY
Republica Moldova

Președinte juriu
Radu Dîmeca

Data 15 iunie 2018



Președinte salon
Remi RĂDULESCU



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 2016



Președinte salon
Remi RĂDULESCU



SALONUL INTERNAȚIONAL DE
**INVENȚII
INOVAȚII**
„TRAIAN VUIA” TIMIȘOARA



Diplomă

SE ACORDĂ



MEDALIA
DE AUR

pentru invenția

**COPPER CONTAINING AGENTS WITH ANTIBACTERIAL
ACTIVITY AGAINST GRAM POSITIVE MICROORGANISMS**

a u t o r i

**Bălan Greta, Burduniuc Olga, Țapcov Victor, Mitkevich Natalia, Rudic Valeriu,
Gulea Aurelian**

i n s t i t u Ț i a

**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 the proliferation of fungi of the species
*Cryptococcus neoformans***

autori
AURELIAN GULEA, VICTOR ȚAPCOV, DIANA CEBOTARI,
GREȚA BĂLAN, OLGA BURDUNIUC, VALERIU RUDIC

instituția
UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA

Președinte juriu
Andrei SON



Președinte salon
Remi RĂDULESCU

Data 14 octombrie 2021

DIPLOMA



International Exhibition INVENTCOR
11nd edition, 16-18.12.2021, Deva, Romania



AWARDED FOR

**NEW MOLYBDENUM COORDINATION COMPOUNDS
WITH IMPORTANT BIOLOGICAL ACTIVITIES**

MD 4708/2020.08.31

TO

**Arcadie FUIOR, Sebastien FLOQUET, Emmanuel CADOT,
Victor TSAPKOV, Olga BURDUNIUC, Ion TODERAS,
Aurelian GULEA**

MOLDOVA STATE UNIVERSITY

Salon president,

Associate Professor Corneliu BIRTOK BĂNEASĂ

Jury president,

Professor Aurel Mihail ȚÎȚU



SALONUL INTERNAȚIONAL DE

INVENȚII
INOVAȚII

„TRAIAN VUIA” TIMIȘOARA



Diplomă

SE ACORDĂ



MEDALIA
DE AUR

pentru invenția

NEW MOLYBDENUM COORDINATION COMPOUNDS
WITH IMPORTANT BIOLOGICAL ACTIVITIES / NOI
COMPUȘI COORDINATIVI A MOLIBDENULUI CU
ACTIVITĂȚI BIOLOGICE IMPORTANTE

autori

Arcadie FUIOR, Sebastien FLOQUET, Emmanuel CADOT, Volga BURDUNIUC,
Victor TSAPKOV, Ion TODERAS, Aurelian GULEA

instituția

UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA

Președinte juriu
Camelia MARINESCU



Președinte salon
Remi RĂDULESCU

Data 15 octombrie 2020 .



Anexa 13. Medalii de argint



DIPLÔME

Ginventions
Geneva

SALON INTERNATIONAL DES INVENTIONS GENÈVE

Après examen, le Jury International a décidé

de remettre à: **Burduniuc Olga, Bălan Greta, Tapcov V., Rusnac R., Gulea A., Rudic V.**

pour l'invention: **Composés qui exercent une activité antimicrobienne sélective contre les bactéries gram-positiv et Candida albicans**



MÉDAILLE D'ARGENT
SILVER MEDAL
SILBERMEDAILLE

Genève, le 12 avril 2019


Le Président du Jury, David Taj



Le Président du Salon, Jean-Luc Vincent

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

Anexa 14. Medalii de bronz

AGEPI AGENTIA DE STAT
PENTRU PROPRIETATEA
INTELECTUALA
A REPUBLICII MOLDOVA

Expoziția Internațională Specializată

„INFOINVENT”

Ediția a XVII-a

DIPLOMĂ

MEDALIA DE BRONZ

se acordă

Aurelian Gulea, Victor Țapcov, Diana Cebotari,
Greta Bălan, Olga Burduniuc, Valeriu Rudic

pentru

Nou agent antifungic sintetic



Eugeniu RUSU,
Președintele
Comitetului organizatoric



Svetlana COJOCARU,
Președintele Juriului

17-20 noiembrie 2021,
Chișinău, Republica Moldova



IAȘI - ROMÂNIA



DIPLOMA OF BRONZE MEDAL

is awarded to:

INHIBITOR OF INCREASE AND MULTIPLICATION OF THE FUNGI

**Burduniuc Olga, Balan Greta, Rusnac Roman,
Tsapkov 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



**Anexa 15. Ordin Dispoziția Ministerului Sănătății al Republicii Moldova nr-1 din 03.01.2022
Cu privire la pilotarea Programului de utilizare rațională a antimicrobienulelor (stewardship antimicrobian)**



**MINISTERUL SĂNĂTĂȚII AL REPUBLICII
MOLDOVA**

ORDIN
mun. Chișinău

„03” ianuarie 2022

nr. 1

**Cu privire la pilotarea Programului
de utilizare rațională a antimicrobienulelor
(stewardship antimicrobian)**

În scopul realizării prevederilor art. 3 și art. 20 din Legea ocrotirii sănătății nr. 411-XIII din 28 martie 1995 cu modificările și completările ulterioare, art. 51 din Legea privind supravegherea de stat a sănătății publice nr. 10/2009, și în temeiul Regulamentului cu privire la organizarea și funcționarea Ministerului Sănătății, aprobat prin Hotărârea Guvernului Republicii Moldova nr. 148/2021,

ORDON:

1. Organizarea și implementarea începând cu 3 ianuarie 2022, pilotarea Programului privind utilizarea rațională a antimicrobienulelor (stewardship antimicrobian) în instituțiile medico-sanitare publice.
2. Aprobarea:
 - 1) Regulamentului de organizare și funcționare a Comitetului național și instituțional pentru pilotarea Programului privind utilizarea rațională a antimicrobienulelor (stewardship antimicrobian), conform anexei nr. 1;
 - 2) Listei membrilor Comitetului național pentru pilotarea stewardship-ului antimicrobian, conform anexei nr. 2;
 - 3) Listei instituțiilor medico-sanitare publice incluse în pilotarea programului de stewardship antimicrobian, conform anexei nr. 3;
 - 4) Listei coordonatorilor Comitetului instituțional de pilotare și membrilor acestuia, conform anexei nr. 4;
 - 5) Sondajului de referință (chestionar de evaluarea a situației actuale) privind stewardship-ului antimicrobian, conform anexei nr. 5.
3. Nominalizarea în calitate de coordonator al Comitetului național pentru pilotarea Programului privind utilizarea rațională a antimicrobienulelor (stewardship antimicrobian) - Agenția Națională pentru Sănătate Publică.

1) elaborarea și aprobarea ordinului intern/instituțional cu privire la organizarea și implementarea Programului de stewardship antimicrobian (documente relevante: lista de administrare a antimicrobienelelor, protocoale operaționale standard (POS), mecanismul de supervizare, programul de instruire în stewardship antimicrobian) și transmiterea acestuia în adresa coordonatorului național;

2) completarea sondajului de referință (anexa nr. 5), transmiterea sondajului completat în adresa coordonatorului național până la 14 ianuarie 2022;

3) desemnarea persoanelor, parte a Comitetului instituțional pentru elaborarea și implementarea Programului de stewardship antimicrobian. Se recomandă desemnarea persoanelor: un microbiolog medical (responsabilitatea pentru realizarea programului), farmacolog clinician (expert responsabil de îmbunătățirea utilizării antimicrobienelelor), adițional specialiști în boli infecțioase și prevenirea și controlul infecțiilor (medic epidemiolog/ asistenți medicali principali/superiori);

4) organizarea și implementarea stewardship-ului antimicrobian se va efectua în baza: Regulamentului (conform anexei nr. 1); Metodologiei studiului de prevalență de moment (PPS) a infecțiilor asociate asistenței medicale și consumul antibioticelor în spitale, aprobată prin Ordinul Ministerului Sănătății nr.1290/2018; a instrumentului Infection Prevention And Control Assessment Framework at the facility level (IPCAF); și componentele de bază ale programelor de prevenire și control a infecțiilor (PCI);

5) asigurarea programului de lucru în cadrul laboratorului microbiologic al spitalului în regim 24/7 pentru facilitarea implementării stewardship-ului antimicrobian.

5. Organizarea și desfășurarea Atelierelor de instruire privind implementarea la nivel instituțional al stewardship-ului antimicrobian în spitalele desemnate.

6. Controlul executării prezentului ordin se atribuie dnei Zinaida Bezverhni, secretar de stat.


Ministru

Ala NEMERENCO

Lista
membrilor Comitetului național și instituțional pentru pilotarea
Programului privind utilizarea rațională a antimicrobienei

Nr. d/o	Membrii Comitetului	Funcția
1.	Nicolae Furtună	Șef Direcție prevenirea și controlul bolilor transmisibile, Agenția Națională pentru Sănătate Publică
2.	Ecaterina Busuioc	Șef secție supravegherea epidemiologică a infecțiilor asociate asistenței medicale și rezistență antimicrobiană, Agenția Națională pentru Sănătate Publică
3.	Olga Burduniuc	Șef Laborator Microbiologic, Agenția Națională pentru Sănătate Publică
4.	Nadejda Morărescu	Medic epidemiolog, secție supravegherea epidemiologică a infecțiilor asociate asistenței medicale și rezistență antimicrobiană, Agenția Națională pentru Sănătate Publică

Anexa 16. Ordin Ministerului Sănătății al Republicii Moldova nr-388 din 27.05.2016 „Cu privire la instituirea Grupului de lucru intersectorial pentru promovarea proiectelor Strategiei naționale pentru supravegherea și combaterea rezistenței antimicrobiene”



MINISTERUL SĂNĂTĂȚII AL REPUBLICII MOLDOVA

ORDIN
mun.Chîșinău

„27” „05” 2016

nr. 388

**Cu privire la instituirea
Grupului de lucru**

Conform prevederilor Planului european strategic de acțiuni în domeniul rezistenței la antibiotice, adoptat la Sesiunea 65 a Biroului regional pentru Europa al Organizației Mondiale a Sănătății (EUR/RC61/14+ EUR/RC61/Conf.Doc.7) din 10 iunie 2011, în contextul necesității implementării standardelor internaționale recomandate de Organizația Mondială a Sănătății Animalelor (OIE), Organizația pentru Alimentație și Agricultură (FAO) și Organizația Mondială a Sănătății (WHO) de control al utilizării prudente a antibioticelor și prevenire a fenomenului de rezistență a microorganismelor la preparate antimicrobiene și în temeiul Regulamentului privind organizarea și funcționarea Ministerului Sănătății, structurii și efectivului-limită ale aparatului central al acestuia, aprobat prin Hotărârea Guvernului al Republicii Moldova nr.397 din 31.05.2011 (Monitorul Oficial Nr. 95 art. nr. 458 din 07.06.2011), cu modificările și completările ulterioare,

ORDON:

1. Se instituie Grupul de lucru intersectorial pentru elaborarea și promovarea proiectelor Strategiei naționale, Planului național de acțiuni de utilizare prudentă a antibioticelor și reținere a fenomenului de rezistență a microorganismelor la preparate antimicrobiene și a Regulamentului Consiliului național de coordonare a activităților de prevenire și control al rezistenței microorganismelor la antibiotice conform anexei.
2. Președintele Grupului de lucru va asigura distribuirea responsabilităților persoanelor nominalizate, cu convocarea la necesitate a ședințelor și cooptarea altor specialiști.
3. Grupul de lucru, în termen până la 31 august 2016, va asigura elaborarea proiectelor actelor naționale prevăzute în pct.1

Controlul executării prezentului ordin se atribuie dnei Aliona Serbulenco, viceministru.

Ministru

Ruxanda Glavan
Ruxanda GLAVAN

SECRETAR GENERAL AL MINISTERULUI SĂNĂTĂȚII

ȘI ÎN CALITATE DE SECRETAR AL CONSILIULUI NAȚIONAL

DE COORDONARE A ACTIVITĂȚILOR DE PREVENIRE ȘI CONTROL AL REZISTENȚEI

LA ANTIBIOTICE

27 05 16

Anexă
la Ordinul MS
nr. 388 din 27.06 2016

**Componenta nominală a grupului de lucru
pentru elaborarea proiectelor actelor naționale privind utilizarea
prudentă a antibioticelor și reținere a fenomenului de rezistență a
microorganismelor la preparate antimicrobiene**

Aliona Serbulenco	Viceministru, Medic șef sanitar de stat al Republicii Moldova, președinte al Grupului de lucru
Daniela Demişcan	Sef adjunct, Direcția Sănătate Publică, vicepreședinte al grupului de lucru
Radu Cojocar	Director adjunct, Centrul Național de Sănătate Publică, punct focal național al OMS în problema antibioticorezistenței
Alexandra Silnic	Sef serviciu juridic, Centrul national de sanatate Publica,
Constantin Spînu	Director adjunct, Centrul Național de Sănătate Publică
Nicolae Furtună	Director adjunct, Centrul Național de Sănătate Publică
Ecaterina Busuioc	Seful secției controlul infecțiilor nosocomiale, rezistenței antimicrobiene și antibiotice, Centrul Național de Sănătate Publică
Olga Burduniuc	Sef laborator de referință națională în monitorizarea rezistenței antimicrobiene, Centrul Național de Sănătate Publică, secretar al grupului de lucru
Constantin Rîmiș	Șef adjunct, Direcția Sănătății a Consiliului Municipal Chișinău
Tatiana Zatic	Șef Direcție asistență medicală primară, urgentă și comunitară, Ministerul Sănătății
Rodica Scutelnic	Șef Direcție Asistență Medicală Spitalicească, Ministerul Sănătății
Maria Lăpteanu	Șef Direcție Medicamente și Dispozitive Medicale, Ministerul Sănătății
Elizaveta Tentiuc	Medic specialist Secția Farmacovigilență și Utilizarea Rațională a Medicamentelor, Agenția Medicamentului și Dispozitivelor Medicale
Nicolai Onilov	Șef Secție medicamente, Compania Națională de Asigurări în Medicină
Mihai Sandu	Medic-expert coordonator Secția Management Metodologia Controlului, Compania Națională de Asigurări în Medicină

**Anexa 17. Ordinul Ministerului Sănătății, Muncii și Protecției Sociale nr.696 din 29.07.2020
Cu privire la aprobarea implementarea Ghidului „Principii și proceduri în testarea
microbiologică a hemoculturilor”**



**MINISTERUL SĂNĂTĂȚII, MUNCII ȘI PROTECȚIEI SOCIALE
AL REPUBLICII MOLDOVA**

ORDIN
mun.Chîșinău

„29” iulie 2020

nr. 696

**Cu privire la aprobarea Ghidului
„Principii și proceduri în testarea microbiologică a hemoculturilor”**

În vederea standardizării și asigurării calității serviciilor medicale de laborator, precum și implementarea reglementărilor internaționale în interesul sănătății publice globale, în temeiul prevederilor Hotărârii Guvernului nr.694/2017 Cu privire la organizarea și funcționarea Ministerului Sănătății, Muncii și Protecției Sociale,

ORDON:

1. Se aprobă Ghidul „Principii și proceduri în testarea microbiologică a hemoculturilor”, conform anexei.

2. Conducătorii prestatorilor de servicii medicale de laborator vor organiza implementarea și monitorizarea eficienței aplicării în activitatea practică a prevederilor Ghidului „Principii și proceduri în testarea microbiologică a hemoculturilor”.

3. Agenția Medicamentului și Dispozitivelor Medicale va întreprinde măsurile necesare în vederea asigurării pieței farmaceutice din Republica Moldova cu medicamentele și dispozitivele medicale incluse în Ghidul „Principii și proceduri în testarea microbiologică a hemoculturilor”.

4. Compania Națională de Asigurări în Medicină:

1) va asigura finanțarea serviciilor incluse în Ghidul „Principii și proceduri în testarea microbiologică a hemoculturilor”;

2) va organiza ghidarea de către angajații din subordine de prevederile Ghidului „Principii și proceduri în testarea microbiologică a hemoculturilor” în procesul de executare a atribuțiilor funcționale, inclusiv în validarea volumului și calității serviciilor acordate de către prestatorii contractați în sistemul asigurării obligatorii de asistență medicală.

5. Agenția Națională pentru Sănătate Publică va organiza:

1) evaluarea instituționalizării Ghidului „Principii și proceduri în testarea microbiologică a hemoculturilor” în cadrul evaluării și acreditării prestatorilor de servicii medicale de laborator;

2) evaluarea respectării prevederilor Ghidului „Principii și proceduri în testarea microbiologică a hemoculturilor” în cadrul controalelor efectuate în instituțiile medico-sanitare;

3) asigurarea accesibilității Ghidului „Principii și proceduri în testarea microbiologică a hemoculturilor” pe pagina web a ANSP și acordarea suportului consultativ-metodic în implementarea acestuia în activitatea prestatorilor de servicii medicale de laborator.

6. Instituțiile de învățământ medical vor organiza implementarea Ghidului „Principii și proceduri în testarea microbiologică a hemoculturilor” în activitatea didactică a catedrelor respective.

7. Ghidul „Principii și proceduri în testarea microbiologică a hemoculturilor” se plasează pe pagina WEB a Ministerului Sănătății, Muncii și Protecției Sociale.

8. Controlul executării prezentului ordin se atribuie dlui Constantin Rîmiș și dlui Alexandru Holostenco, secretari de stat.

Ministru

Viorica DUMBRĂVEANU

Anexa 18. Ordinul Ministerului Sănătății, Muncii și Protecției Sociale nr.651 din 09.07.2021 Cu privire la aprobarea implementarea Ghidului „Asigurarea calității în diagnosticul microbiologic al infecțiilor tractului urinar”



MINISTERUL SĂNĂTĂȚII, MUNCII ȘI PROTECȚIEI SOCIALE
AL REPUBLICII MOLDOVA

ORDIN
mun. Chișinău

09 iulie 2021

nr. 651

Cu privire la aprobarea Ghidului
„Asigurarea calității în diagnosticul microbiologic al infecțiilor tractului urinar”

În vederea standardizării și asigurării calității serviciilor medicale de laborator, în temeiul prevederilor Hotărârii Guvernului nr.694/2017 Cu privire la organizarea și funcționarea Ministerului Sănătății, Muncii și Protecției Sociale,

ORDON:

1. Se aprobă Ghidul „Asigurarea calității în diagnosticul microbiologic al infecțiilor tractului urinar”, conform anexei.
2. Conducătorii prestatorilor de servicii medicale de laborator vor organiza implementarea și monitorizarea eficienței aplicării în activitatea practică a prevederilor Ghidului „Asigurarea calității în diagnosticul microbiologic al infecțiilor tractului urinar”.
3. Agenția Medicamentului și Dispozitivelor Medicale va întreprinde măsurile necesare în vederea asigurării pieței farmaceutice din Republica Moldova cu medicamentele și dispozitivele medicale incluse în Ghidul „Asigurarea calității în diagnosticul microbiologic al infecțiilor tractului urinar”.
4. Compania Națională de Asigurări în Medicină:
 - 1) va asigura finanțarea serviciilor incluse în Ghidul „Asigurarea calității în diagnosticul microbiologic al infecțiilor tractului urinar”;
 - 2) va organiza ghidarea de către angajații din subordine de prevederile Ghidului „Asigurarea calității în diagnosticul microbiologic al infecțiilor tractului urinar” în procesul de executare a atribuțiilor funcționale, inclusiv în validarea volumului și calității serviciilor acordate de către prestatorii contractați în sistemul asigurării obligatorii de asistență medicală.
5. Agenția Națională pentru Sănătate Publică va organiza:
 - 1) evaluarea instituționalizării Ghidului „Asigurarea calității în diagnosticul microbiologic al infecțiilor tractului urinar” în cadrul evaluării și acreditării prestatorilor de servicii medicale de laborator;
 - 2) evaluarea respectării prevederilor Ghidului „Asigurarea calității în diagnosticul microbiologic al infecțiilor tractului urinar” în cadrul controalelor efectuate în instituțiile medico-sanitare;
 - 3) asigurarea accesibilității Ghidului „Asigurarea calității în diagnosticul microbiologic al infecțiilor tractului urinar” pe pagina web a ANSP și acordarea suportului consultativ-metodic în implementarea acestuia în activitatea prestatorilor de servicii medicale de laborator.
6. Instituțiile de învățământ medical vor organiza implementarea Ghidului „Asigurarea calității în diagnosticul microbiologic al infecțiilor tractului urinar” în activitatea didactică a catedrelor respective.
7. Ghidul „Asigurarea calității în diagnosticul microbiologic al infecțiilor tractului urinar” se plasează pe pagina WEB a Ministerului Sănătății, Muncii și Protecției Sociale.
8. Controlul executării prezentului ordin mi-l asum.

Secretar de Stat

T. Zatic

Tatiana ZATIC

Anexa 19. Ordinul Ministerului Sănătății, Muncii și Protecției Sociale nr.26 din 21.01.2021 Cu privire la aprobarea, implementarea Ghidului Diagnosticul microbiologic al infecțiilor tractului respirator”



MINISTERUL SĂNĂTĂȚII, MUNCII ȘI PROTECȚIEI SOCIALE
AL REPUBLICII MOLDOVA

ORDIN
mun.Chîșinău

21 Ianuarie 2021

nr. 26

Cu privire la aprobarea Ghidului
„Diagnosticul microbiologic al infecțiilor tractului respirator”

În vederea standardizării și asigurării calității serviciilor medicale de laborator, în temeiul prevederilor Hotărârii Guvernului nr.694/2017 Cu privire la organizarea și funcționarea Ministerului Sănătății, Muncii și Protecției Sociale,

ORDON:

1. Se aprobă Ghidul „Diagnosticul microbiologic al infecțiilor tractului respirator”, conform anexei.
2. Conducătorii prestatorilor de servicii medicale de laborator vor organiza implementarea și monitorizarea eficienței aplicării în activitatea practică a prevederilor Ghidului „Diagnosticul microbiologic al infecțiilor tractului respirator”.
3. Agenția Medicamentului și Dispozitivelor Medicale va întreprinde măsurile necesare în vederea asigurării pieței farmaceutice din Republica Moldova cu medicamentele și dispozitivele medicale incluse în Ghidul „Diagnosticul microbiologic al infecțiilor tractului respirator”.
4. Compania Națională de Asigurări în Medicină:
 - 1) va asigura finanțarea serviciilor incluse în Ghidul „Diagnosticul microbiologic al infecțiilor tractului respirator”;
 - 2) va organiza ghidarea de către angajații din subordine de prevederile Ghidului „Diagnosticul microbiologic al infecțiilor tractului respirator” în procesul de executare a atribuțiilor funcționale, inclusiv în validarea volumului și calității serviciilor acordate de către prestatorii contractați în sistemul asigurării obligatorii de asistență medicală.
5. Agenția Națională pentru Sănătate Publică va organiza:
 - 1) evaluarea instituționalizării Ghidului „Diagnosticul microbiologic al infecțiilor tractului respirator” în cadrul evaluării și acreditării prestatorilor de servicii medicale de laborator;
 - 2) evaluarea respectării prevederilor Ghidului „Diagnosticul microbiologic al infecțiilor tractului respirator” în cadrul controalelor efectuate în instituțiile medico-sanitare;
 - 3) asigurarea accesibilității Ghidului „Diagnosticul microbiologic al infecțiilor tractului respirator” pe pagina web a ANSP și acordarea suportului consultativ-metodic în implementarea acestuia în activitatea prestatorilor de servicii medicale de laborator.
6. Instituțiile de învățământ medical vor organiza implementarea Ghidului „Diagnosticul microbiologic al infecțiilor tractului respirator” în activitatea didactică a catedrelor respective.
7. Ghidul „Diagnosticul microbiologic al infecțiilor tractului respirator” se plasează pe pagina WEB a Ministerului Sănătății, Muncii și Protecției Sociale.
8. Controlul executării prezentului ordin mi-l asum.

Secretar de Stat

T. Zatic

Tatiana ZATÎC

Anexa 20. Acte de implementare

	<p>INSTITUȚIA PUBLICĂ UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE "NICOLAE TESTEMIȚANU" DIN REPUBLICA MOLDOVA</p>	<p>Pag. 2 / 2</p>
<p>Institutul Național de Cercetare în Medicină și Sănătate</p>		
<p>APROB Proiectul pentru activitate de cercetare, USMF „Nicolae Testemițanu” din RM academicien al ASM, prof. univ. dr. hab. șt. med. Stanislav GROPPA 2022</p>		
<p>ACTUL nr. 89 DE IMPLEMENTARE A INOVAȚIEI (în procesul științifico-practic)</p>		
<p>1. Denumirea ofertei pentru implementare: <i>Metodă de creștere a gradului de conștientizare la copii cu privire la prevenirea rezistenței la antimicrobiene.</i></p> <p>2. Autorii: ANTON Maria, cercet. șt., stagiar, PERJERU Maria, cercet. șt., stagiar, LOZNEANU Irina, cercet. șt., stagiar, ȚAPU Livia, cercet. șt., stagiar, CROITORU Cătălina, dr. șt. med., conf. univ., BALAN Greta, dr. șt. med., conf. univ., BURDUNIUC Olga, dr. șt. med., conf. cercet.</p> <p>3. Numărul inovației Nr. 5966 din 12 decembrie 2022</p> <p>4. Unde și când a fost implementată: Broșura a fost explicată, discutată și repartizată copiilor din 2 grădinițe din mun. Chișinău (grupa pregătitoare) în cadrul evenimentelor de creștere a conștientizării procesului de utilizare a preparatelor antimicrobiene cu suportul și ghidarea membrilor echipei proiectului Programului de Stat 20.80009.8007.09 „Studierea rezistenței bacililor gramnegativi la antimicrobiene în vederea fortificării sistemului național de supraveghere și control al bolilor transmisibile”.</p> <p>5. Rezultatul implementării: Au fost dezvoltate abilități de comunicare coerente cu expunere logică la studenții Centrului de excelență în medicină și farmacie „Raisa Pacalo” privind bunele practici ce țin de măsurile de prevenirea infecțiilor copiilor grupei pregătitoare de la grădinițe. Broșura a trezit curiozitatea copiilor, care s-au arătat interesași și au pus întrebări suplimentare.</p> <p>6. Eficacitatea implementării: Broșura poate fi considerată un instrument util în activități distractiv-didactice cu copiii de 6-8 ani. Inovația va fi aplicată periodic, fără restricții de gen, loc de reședință, stare socială, apartenență etnică în grădinițe și școli de către rezidenții microbiologi din cadrul Agenției Naționale pentru Sănătate Publică, studenții Centrului de excelență în medicină și farmacie „Raisa Pacalo”, membrii grupului de tineri din Asociația de Biosiguranță și Biosecuritate din Republica Moldova.</p> <p>7. Obiecții/proponeri: Valoarea aplicativă a metodei este justificată de provocarea majoră a secolului XXI – rezistența la preparatele antimicrobiene, cu o implicație socio-economică majoră.</p> <p><i>Prezenta inovație este implementată conform descrierii în cerere.</i></p>		
<p>Directoarea Centrului de excelență în medicină și farmacie „Raisa Pacalo”,</p>		<p>Mariana NEGREAN</p>
<p>Vicepreședinte Asociației de Biosiguranță și Biosecuritate din R. Moldova, dr. hab. șt. med., conf. univ.</p>		<p>Cătălina CROITORU</p>
<p>Șef departament, Departamentul Cercetare, USMF „Nicolae Testemițanu” dr. hab. șt. med., conf. univ.</p>		<p>Elena RAEVSCHI</p>



APROB

Prim prorector,

prorector pentru activitate didactică,
USMF „Nicolae Testemițanu” din RM
prof. univ., dr. hab. șt. med.

Olga CERNEȚCHI

2023

ACTUL DE IMPLEMENTARE
(în procesul didactic)

1. **Denumirea ofertei pentru implementare:** „Ghid de bune practici: alimentație rațională, siguranța alimentelor și schimbarea comportamentului alimentar”, 2021.
2. **Autori:** BĂHNĂREL I., dr. hab. șt. med., profesor universitar, BURDUNIUC, O., dr. șt. med., conferențiar cercetător, CAZACU-STRATU A., dr. șt. med., conferențiar universitar, ș.a.
3. **Unde și când a fost implementată:** Departamentul Medicină Preventivă, Disciplina de microbiologie și imunologie a Universității de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”
4. **Eficacitatea implementării:** Aplicarea prezentului ghid recomandă practici generale de alimentație corectă, atât pentru persoanele sănătoase, cât și pentru cele cu devieri ale stării de sănătate și anumite patologii, care pot fi influențate de alimentație. Prin intermediul ghidului se aduc la cunoștința aspecte despre siguranța alimentelor și contaminanții alimentelor inclusiv și cele cu fungii patogeni și toxinele lor.
5. **Rezultatul implementării:** Informația va favoriza formarea specialiștilor în domeniu care ulterior vor utiliza aceste cunoștințe în discuții cu publicul larg pentru schimbarea comportamentului alimentar și menținerea, îmbunătățirea stării de sănătate a acestora. Totodată această informație din ghid va fi utilă profesioniștilor din domeniul nutriției, igienei, microbiologiei, epidemiologiei, medicilor rezidenți și studenți în procesul de autopregătire și în comunicarea cu populația.

Șef Departament Medicină Preventivă
dr. hab. șt. med., conf. univ.

CEBANU Serghei

Șef departament, Departamentul
Didactic și Managementul Academic,
conf. univ., dr. șt. med.

STRATULAT Silvia



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. 26
DE IMPLEMENTARE A INOVAȚIEI
(în procesul științifico-practic)

1. **Denumirea ofertei pentru implementare:** **PROCEDEU DE DETERMINARE A ACTIVITĂȚII ANTICOMPLEMENTARE A MICROORGANISMELOR.**
2. **Autori:** BĂLAN Greta, dr. șt. med., conf. univ., BURDUNIUC Oľga, 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:** Departamentul Medicină Preventivă, Disciplina de microbiologie și imunologie a USMF „Nicolae Testemițanu”, perioada 2018-2021.
5. **Eficiența 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.
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 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.

Prezenta inovație este implementată conform descrierii în cerere.

Șef Departament de Medicină Preventivă
dr. șt. med., conf. univ.

Serghei CEBANU

Șef Departament Cercetare,
dr. hab. șt. med., conf. univ.

Elena RAEVSCHI

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.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

- 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 07 mai 2021.**
- Unde și când a fost implementată:** Laboratorul bacteriologic IMSP SCMC „Valentin Ignatenco”
- 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 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 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@gms.md

Nr. 15/1449 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@ims.md

Nr. 157/1448 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”

SINIȚINA

SINIȚINA Iulia



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: PROCEDUL 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:** 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 diminarea 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.

Șef 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



MINISTERUL SĂNĂTĂȚII
INSTITUȚIA MEDICO-SANITARĂ PUBLICĂ
SPITALUL CLINIC DE BOLI INFECȚIOASE "TOMA CIORBĂ"

Republica Moldova, Chișinău, Ștefan cel Mare și Sfânt, 163, MD-2004
www.tomaciorba.md, tomaciorba@ms.md
+373 (22) 24-22-47, +373 (22) 24-21-77

Nr. 01-4/8 din "18" 01 2023



A P R O B

Director IMSP SCBI „Toma CIORBĂ”

Sergiu 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 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 SCBI „Toma CIORBĂ”.

Prezenta inovație este implementată conform descrierii în cerere.

Medic bacteriolog,
IMSP SCBI „Toma CIORBĂ”

Viorica

Viorica COTOS



MINISTERUL SĂNĂȚII
INSTITUȚIA MEDICO-SANITARĂ PUBLICĂ
SPITALUL CLINIC DE BOLI INFECȚIOASE "TOMA CIORBĂ"

Republica Moldova, Chișinău, Ștefan cel Mare și Sfânt, 163, MD-2004
www.tomaciorba.md, tomaciorba@ms.md
+373 (22) 24-22-47, +373 (22) 24-21-77

Nr. 01-4/9 din "18" 01 2023



A P R O B

Director IMSP SCBI „Toma CIORBĂ”

Sergiu VASILIȚA

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 07 mai 2021.
- Unde și când a fost implementată:** Laboratorul bacteriologic IMSP SCBI „Toma CIORBĂ”.
- 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 SCBI „Toma CIORBĂ”.

Prezenta inovație este implementată conform descrierii în cerere.

Medic bacteriolog,
IMSP SCBI „Toma CIORBĂ”

Viorica COTOS

Viorica COTOS



Ministerul Sănătății al Republicii Moldova
Consiliul municipal Chișinău
Direcția Generală Asistență Medicală și Socială
INSTITUȚIA MEDICO-SANITARĂ PUBLICĂ
SPITALUL CLINIC MUNICIPAL DE BOLI CONTAGIOASE DE COPII

MD-2028, mun. Chișinău, str. M. Lomonosov 49,
tel: 73-70-20; fax 72 31 64; e-mail: smbcc@ms.md
<http://smbcc.md/>

Nr. 1227 din 29.12. 2022

ACTUL DE IMPLEMENTARE

- Denumirea ofertei pentru implementare:** Ghidul „Principii și proceduri în testarea microbiologică a hemoculturilor”, 2020.
- Autori:** BURDUNIUC Olga dr. șt. med., conferențiar cercetător, BĂLAN Greta dr. șt. med., conferențiar universitar, SOFRONIE, Olga cercetător științific, BUCOV Victoria, dr. hab. șt. med., profesor universitar, HOLBAN Tiberiu dr. hab. șt. med., profesor universitar, BIVOL Maria cercetător științific.
- Unde și când a fost implementată:** IMSP Spitalul Clinic Municipal de Boli Contagioase de Copii.
- Eficacitatea implementării:** Problema care o soluționează ghidul constă în stabilirea principiilor și procedurilor în testarea hemoculturilor, recomandărilor specifice aliniate la rigorile europene privind colectarea, transportarea, investigarea microbiologică, interpretarea rezultatelor hemoculturii și indicarea terapiei antimicrobiene justificate.
- Rezultatul implementării:** Ghidul practic este utilizat de medici clinicieni și dispune de informații veridice, indicarea, interpretarea rezultatelor în timp util pentru ghidarea argumentată și optimizarea terapiei empirice antimicrobiene pe modele de susceptibilitate instituțională. Iar datele obținute în baza implementării ghidului servesc ca suport în monitorizarea succesului tratamentului antimicrobian, planificarea și realizarea intervențiilor în vederea prevenirii, controlul infecțiilor de flux sangvin asociate asistenței medicale.

Director IMSP SCMBCC
dr. șt. med., conf. univ.



Ludmila BÎRCA



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. 26
DE IMPLEMENTARE A INOVAȚIEI
(în procesul științifico-practic)

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:** 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 RAM.
6. **Rezultatele:** Procedeul 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.

Șef Departament de Medicină Preventivă
dr. st. med., conf. univ.

Serghei CEBANU

Șef Departament Cercetare,
dr. hab. șt. med., conf. univ.

Elena RAEVSCHI

Elizaveta



Ministerul Sănătății al Republicii Moldova
Consiliul municipal Chișinău
Direcția Generală Asistență Medicală și Socială
INSTITUȚIA MEDICO-SANITARĂ PUBLICĂ
SPITALUL CLINIC MUNICIPAL DE BOLI CONTAGIOASE DE COPII

MD-2028, mun. Chișinău, str. M. Lomonosov 49,
tel: 73-70-20; fax 72 31 64; e-mail: scmbcc@ms.md
<http://scmbcc.md/>

Nr. 1229 din 29.12 2022

ACTUL DE IMPLEMENTARE

1. **Denumirea ofertei pentru implementare:** Ghidul „Diagnosticul Microbiologic al Infecțiilor Tractului Respirator”, 2021.
2. **Autori:** BURDUNIUC Olga dr. șt. med., conferențiar cercetător, BĂLAN Greta dr. șt. med., conferențiar universitar, SPÎNU Constantin dr. hab. șt. med., profesor universitar, SOFRONIE Olga cercetător științific, BIVOL Maria cercetător științific.
7. **Unde și când a fost implementată:** IMSP Spitalul Clinic Municipal de Boli Contagioase de Copii.
3. **Eficacitatea implementării:** Aplicarea ghidului în practică laboratorului Microbiologic al Institutului de Ftiziopneumologie „Chiril Draganiuc” soluționează problema ce ține de principiile, procedurile, tehnicile de recoltare a biosubstratelor de la pacienți cu infecții ale tractului respirator deoarece oferă metodologii standardizate de diagnostic aliniat la rigorile internaționale ce permite indicarea terapiei antimicrobiene justificate și managementul eficient a cazului de infecție al tractului respirator.
4. **Rezultatul implementării:** Ghidul practic este utilizat de medicii clinicieni și dispune de informații veridice, indicarea, interpretarea rezultatelor în timp util pentru ghidarea argumentată și optimizarea terapiei empirice antimicrobiene pe modele de susceptibilitate instituțională. Iar datele obținute în baza implementării ghidului servesc ca suport în monitorizarea succesului tratamentului antimicrobian, planificarea și realizarea intervențiilor în vederea prevenirii, controlul infecțiilor tractului respirator asociate asistenței medicale.

Director IMSP SCMBCC
dr. șt. med., conf. univ.



Ludmila BÎRCA

MINISTERUL SĂNĂTĂȚII
AL REPUBLICII MOLDOVA

INSTITUȚIA MEDICO-SANITARĂ PUBLICĂ

INSTITUTUL
DE FTIZIOPNEUMOLOGIE
"CHIRIL DRAGANIUC"



MINISTRY OF HEALTH OF THE
REPUBLIC OF MOLDOVA

PUBLIC MEDICAL SANITARY
INSTITUTION

INSTITUTE OF
PHTHISIOPNEUMOLOGY
"CHIRIL DRAGANIUC"

MD-2025, Republica Moldova,
municipiul Chișinău str. Constantin Virăv 13
tel +373 22 572 200, fax + 373 22 572 205
e-mail ifp@ms.md.

MD-2025, Republic of Moldova
13, Constantin Virăv, street, Chișinău
tel +373 22 572 200, fax + 373 22 572 205
e-mail ifp@ms.md

29.12.2022 nr. 01-2/2024

ACTUL DE IMPLEMENTARE

1. **Denumirea ofertei pentru implementare:** Ghidul „Principii și proceduri în testarea microbiologică a hemoculturilor”, 2020.
2. **Autori:** BURDUNIUC Olga dr. șt. med., conferențiar cercetător, BĂLAN Greta dr. șt. med., conferențiar universitar, SOFRONIE, Olga cercetător științific, BUCOV Victoria, dr. hab. șt. med., profesor universitar, HOLBAN Tiberiu dr. hab. șt. med., profesor universitar, BIVOL Maria cercetător științific.
3. **Unde și când a fost implementată:** IMSP Institutului de Ftiziopneumologie „Chiril Draganiuc”
4. **Eficacitatea implementării:** Problema care o soluționează ghidul constă în stabilirea principiilor și procedurilor în testarea hemoculturilor, recomandărilor specifice aliniate la rigorile europene privind colectarea, transportarea, investigarea microbiologică, interpretarea rezultatelor hemoculturii și indicarea terapiei antimicrobiene justificate
5. **Rezultatul implementării:** Ghidul practic este utilizat de medici microbiologi, felceri laboranți, în standardizarea metodologiei privind procesarea și investigarea microbiologică a hemoculturilor în infecțiile de flux sangvin. Medicii clinicieni dispun de informații veridice, în timp util pentru ghidarea argumentată și optimizarea terapiei empirice antimicrobiene pe modele de susceptibilitate instituțională. Iar datele obținute în baza implementării ghidului servesc ca suport în monitorizarea succesului tratamentului antimicrobian, planificarea și realizarea intervențiilor în vederea prevenirii, controlul infecțiilor de flux sangvin asociate asistenței medicale.

Director Institutului de Ftiziopneumologie
"Chiril Draganiuc" din Chișinău
dr. șt. med., conf. univ.



RUSU Doina

RUSU Doina

ACTUL DE IMPLEMENTARE

1. **Denumirea ofertei pentru implementare:** Ghidul „Principii și proceduri în testarea microbiologică a hemoculturilor”, 2020.
2. **Autori:** BURDUNIUC Olga dr. șt. med., conferențiar cercetător, BĂLAN Greta dr. șt. med., conferențiar universitar, SOFRONIE, Olga cercetător științific, BUCOV Victoria, dr. hab. șt. med., profesor universitar, HOLBAN Tiberiu dr. hab. șt. med., profesor universitar, BIVOL Maria cercetător științific.
3. **Unde și când a fost implementată:** SC IMUNOTEHNOMED.SRL (Rețeaua Națională de de laboratoare medicale MedExpert).
4. **Eficacitatea implementării:** Problema care o soluționeza ghidul constă în stabilirea principiilor și procedurilor în testarea hemoculturilor, recomandărilor specifice alinate la rigorile europene privind colectarea, transportarea investigarea microbiologică interpretarea rezultatelor hemoculturii și indicarea terapiei antimicrobiene justificate
5. **Rezultatul implementării:** Ghidul practic este utilizat de medici microbiologi, felceri laboranți, în standardizarea metodologiei privind procesarea și investigarea microbiologică a hemoculturilor în infecțiile de flux sangvin Medicii clinicieni dispun de informații veridice, în timp util pentru ghidarea argumentată și optimizarea terapiei empirice antimicrobiene pe modele de susceptibilitate instituțională. Iar datele obținute în baza implementării ghidului servesc ca suport în monitorizarea succesului tratamentului antimicrobian, planificarea și realizarea intervențiilor în vederea prevenirii, controlul infecțiilor de flux sangvin asociate asistenței medicale.

Director general
SC IMUNOTEHNOMED.SRL
(Rețeaua Națională de de laboratoare
medicale MedExpert)


 RATĂ Sergiu

MINISTERUL SĂNĂTĂȚII
AL REPUBLICII MOLDOVA

INSTITUȚIA MEDICO-SANITARĂ PUBLICĂ

INSTITUTUL
DE FTIZIOPNEUMOLOGIE
"CHIRIL DRAGANIUC"



MINISTRY OF HEALTH OF THE
REPUBLIC OF MOLDOVA

PUBLIC MEDICAL SANITARY
INSTITUTION

INSTITUTE OF
PHTHISIOPNEUMOLOGY
"CHIRIL DRAGANIUC"

MD-2025, Republica Moldova,
municipiul Chișinău str. Constantin Virnav 13
tel +373 22 572 200, fax + 373 22 572 205
e-mail ifp@ims.md.

MD-2025, Republic of Moldova
13, Constantin Virnav, street, Chisinau
tel +373 22 572 200, fax + 373 22 572 205
e-mail ifp@ms.md

29.12.2025 nr. 01-a/2025

ACTUL DE IMPLEMENTARE

1. **Denumirea ofertei pentru implementare:** Ghidul „Diagnosticul Microbiologic al Infecțiilor Tractului Respirator”, 2021.
2. **Autori:** BURDUNIUC Olga dr. șt. med., conferențiar cercetător, BĂLAN Greta dr. șt. med., conferențiar universitar, SPÎNU Constantin dr. hab. șt. med., profesor universitar, SOFRONIE, Olga cercetător științific, BIVOL Maria cercetător științific.
3. **Unde și când a fost implementată:** IMSP Institutului de Ftiziopneumologie „Chiril Draganiuc”
4. **Eficacitatea implementării:** Aplicarea ghidului în practică laboratorului Microbiologic al Institutului de Ftiziopneumologie „Chiril Draganiuc” soluționează problema ce ține de principiile, procedurile, tehnicile de recoltare a biosubstratelor de la pacienți cu infecții ale tractului respirator deoarece oferă metodologii standardizate de diagnostic aliniate la rigorile internaționale ce permite indicarea terapiei antimicrobiene justificate și managementul eficient a cazului de infecție al tractului respirator.
5. **Rezultatul implementării:** Ghidul este utilizat de medici microbiologi, felceri laboranți în investigarea microbiologică a biosubstratelor prelevate de la pacienți cu infecții al tractului urinar. Medicii clinicieni vor dispune de informații veridice, în timp util pentru ghidarea argumentată și optimizarea terapiei empirice antimicrobiene pe modele de susceptibilitate instituțională. Iar datele obținute în baza implementării ghidului servesc ca suport în monitorizarea succesului tratamentului antimicrobian, planificarea și realizarea intervențiilor în vederea prevenirii, controlul infecțiilor tractului respirator asociate asistenței medicale.

Director Institutului de Ftiziopneumologie
„Chiril Draganiuc” din Chișinău
dr. șt. med., conf. univ.



Rusu Doina

RUSU Doina

ACTUL DE IMPLEMENTARE

1. **Denumirea ofertei pentru implementare:** Ghidul „Diagnosticul Microbiologic al Infecțiilor Tractului Respirator”, 2021.
2. **Autori:** BURDUNIUC Olga dr. șt. med., conferențiar cercetător, BĂLAN Greta dr. șt. med., conferențiar universitar, SPINU Constantin dr. hab. șt. med., profesor universitar, SOFRONIE, Olga cercetător științific, BIVOL Maria cercetător științific.
7. **Unde și când a fost implementată:** SC IMUNOTEHNOMED.SRL (Rețeaua Națională de de laboratoare medicale MedExpert).
3. **Eficacitatea implementării:** Aplicarea ghidului în practică laboratorului Microbiologic al Institutului de Ftiziopneumologie „Chiril Drăganiuc” soluționează problema ce ține de principiile, procedurile, tehnicile de recoltare a biosubstratelor de la pacienți cu infecții ale tractului respirator deoarece oferă metodologii standardizate de diagnostic aliniate la rigorile internaționale ce permite indicarea terapiei antimicrobiene justificate și managementul eficient a cazului de infecție al tractului respirator.
4. **Rezultatul implementării:** Ghidul este utilizat de medici microbiologi, felceri laboranți în investigarea microbiologică a biosubstratelor prelevate de la pacienți cu infecții al tractului urinar. Medicii clinicieni vor dispune de informații veridice, în timp util pentru ghidarea argumentată și optimizarea terapiei empirice antimicrobiene pe modele de susceptibilitate instituțională. Iar datele obținute în baza implementării ghidului servesc ca suport în monitorizarea succesului tratamentului antimicrobian, planificarea și realizarea intervențiilor în vederea prevenirii, controlul infecțiilor tractului respirator asociate asistenței medicale.

Director general
SC IMUNOTEHNOMED.SRL
(Rețeaua Națională de de laboratoare
medicale MedExpert)


RATA Sergiu



MINISTERUL SĂNĂTĂȚII
AL REPUBLICII MOLDOVA
INSTITUȚIA MEDICO-SANITARĂ PUBLICĂ
INSTITUTUL
DE FTIZIOPNEUMOLOGIE
"CHIRIL DRAGANIUC"



MINISTRY OF HEALTH OF THE
REPUBLIC OF MOLDOVA
PUBLIC MEDICAL SANITARY
INSTITUTION
INSTITUTE OF
PHTHISIOPNEUMOLOGY
"CHIRIL DRAGANIUC"

MD-2025, Republica Moldova,
municipiul Chișinău str. Constantin Virăv 13
tel +373 22 572 200, fax + 373 22 572 205
e-mail ifp@ms.md

MD-2025, Republic of Moldova
13, Constantin Virăv, street, Chisinau
tel +373 22 572 200, fax + 373 22 572 205
e-mail ifp@ms.md

29.12.2025 nr. 01-2/2025

ACTUL DE IMPLEMENTARE

1. **Denumirea ofertei pentru implementare:** Ghidul „Asigurarea calității în diagnosticul microbiologic al infecțiilor tractului urinar”, 2021.
2. **Autori:** BURDUNIUC Olga dr. șt. med., conferențiar cercetător, CEBAN Emil. dr. hab. șt. med., profesor universitar, BĂLAN Greta dr. șt. med., conferențiar universitar, PLĂCINTĂ Gheorghe dr. hab. șt. med., profesor universitar, VIȘNEVSCHI Anatol dr. hab. șt. med., profesor universitar, SOFRONIE, Olga cercetător științific, BIVOL Maria cercetător științific.
3. **Unde și când a fost implementată:** IMSP Institutului de Ftiziopneumologie „Chiril Draganiuc”
4. **Eficacitatea implementării:** Aplicarea ghidului în practică laboratorului Microbiologie al Institutului de Ftiziopneumologie „Chiril Draganiuc” soluționează problema ce ține de principiile, procedurile, tehnicile de recoltare a biosubstratelor de la pacienți cu infecții ale tractului urinar deoarece oferă metodologii standardizate de diagnostic aliniate la rigorile internaționale ce permite indicarea terapiei antimicrobiene justificate și managementul eficient a cazului de infecție al tractului urinar.
5. **Rezultatul implementării:** Ghidul este utilizat de medici microbiologi, felceri laboranți în investigarea microbiologică a biosubstratelor prelevate de la pacienți cu infecții al tractului urinar. Medicii clinicieni vor dispune de informații veridice, în timp util pentru ghidarea argumentată și optimizarea terapiei empirice antimicrobiene pe modele de susceptibilitate instituțională. Iar datele obținute în baza implementării ghidului servesc ca suport în monitorizarea succesului tratamentului antimicrobian, planificarea și realizarea intervențiilor în vederea prevenirii, controlul infecțiilor urinare asociate asistenței medicale.

Director Institutului de Ftiziopneumologie
"Chiril Draganiuc" din Chișinău
dr. șt. med., conf. univ.



RUSU

RUSU Doina

ACTUL DE IMPLEMENTARE

1. **Denumirea ofertei pentru implementare:** Ghidul „Asigurarea calității în diagnosticul microbiologic al infecțiilor tractului urinar”, 2021.
2. **Autori:** BURDUNIUC Olga dr. șt. med., conferențiar cercetător, CEBAN Emil dr. hab. șt. med., profesor universitar, BĂLAN Greta dr. șt. med., conferențiar universitar, PLĂCINTĂ Gheorghe dr. hab. șt. med., profesor universitar, VIȘNEVSCHI Anatol dr. hab. șt. med., profesor universitar, SOFRONIE, Olga cercetător științific, BIVOL Maria cercetător științific.
6. **Unde și când a fost implementată:** SC IMUNOTEHNOMED.SRL (Rețeaua Națională de de laboratoare medicale MedExpert).
3. **Eficacitatea implementării:** Aplicarea ghidului în practică laboratorului Microbiologic al Institutului de Ftizio pneumologie „Chiril Draganiuc” soluționează problema ce ține de principiile, procedurile, tehnicile de recoltare a biosubstratelor de la pacienți cu infecții ale tractului urinar deoarece oferă metodologii standardizate de diagnostic aliniate la rigorile internaționale ce permite indicarea terapiei antimicrobiene justificate și managementul eficient a cazului de infecție al tractului urinar.
4. **Rezultatul implementării:** Ghidul este utilizat de medici microbiologi, felceri laboranți în investigarea microbiologică a biosubstratelor prelevate de la pacienți cu infecții al tractului urinar. Medicii clinicieni vor dispune de informații veridice, în timp util pentru ghidarea argumentată și optimizarea terapiei empirice antimicrobiene pe modele de susceptibilitate instituțională. Iar datele obținute în baza implementării ghidului servesc ca suport în monitorizarea succesului tratamentului antimicrobian, planificarea și realizarea intervențiilor în vederea prevenirii, controlul infecțiilor urinare asociate asistenței medicale.

Director general
SC IMUNOTEHNOMED.SRL
(Rețeaua Națională de de laboratoare
medicale MedExpert)


RATA Sergiu



SC IMUNOTEHNOMED.SRL
REȚEAUA NAȚIONALĂ DE LABORATOARE MEDICALE MED EXPERT
STR. SRII 100B/200/200A
BUCUREȘTI, ROMANIA



2025, mun. Chișinău, str. N. Testemițanu, 28
tel. 72-58-66, fax. 22-66-53
www.ccmf.md
e-mail: cancelarie@ccmf.md

2025, г. Кишинев, ул. Тестемитану, 28
тел. 72-58-66, факс. 22-66-53
www.ccmf.md
e-mail: cancelarie@ccmf.md

19.01.2023 nr. 00-10/12

INSTITUTULUI NAȚIONAL DE
CERCETARE ÎN MEDICINĂ ȘI
SĂNĂTATE
USMF „N. TESTEMIȚANU”

Prin prezenta, Centrul de excelență în medicină și farmacie „Raisa Pacalo”, în contextul implementării inovației Nr. 5966 din 12 decembrie 2022 „*Metodă de creștere a gradului de conștientizare la copii cu privire la prevenirea rezistenței la antimicrobiene*”, elaborată de autorii: ANTON Maria, cercet. șt., stagiar, PERJERU Maria, cercet. șt., stagiar, LOZNEANU Irina, cercet. șt., stagiar, ȚAPU Livia, cercet. șt., stagiar, CROITORU Cătălina, dr. șt. med., conf. univ, BALAN Greta, dr. șt. med., conf. univ., BURDUNIUC Olga, dr. șt. med., conf. cercet., confirmă realizarea activității de creștere a gradului de conștientizare privind prevenirea rezistenței la antimicrobiene pentru copiii grupei pregătitoare. Totodată, activitățile realizate au favorizat dezvoltarea abilităților de comunicare coerente la elevii Centrului de excelență în medicină și farmacie „Raisa Pacalo” privind bunele practici ce țin de măsurile de prevenirea infecțiilor și a rezistenței microorganismelor la antimicrobiene (ex.: respectarea igienei mâinilor, evitarea locurilor aglomerate, aeresirea încăperilor, vaccinarea ș.a).

Valoarea aplicativă a inovației este justificată de provocarea majoră a secolului XXI – rezistența microorganismelor la preparatele antimicrobiene, cu o impact socio-economic major, condiționată de dezvoltarea bunelor practici prevenirea infecțiilor, consumul rațional de antimicrobiene și măsurile de prevenire a rezistenței la antimicrobiene.

Considerăm, că rezultatele implementării acestei inovații au trezit motivația copiilor, care s-au arătat interesați, emoționați și curioși prin punerea întrebărilor suplimentare.

Broșura elaborată pe marginea inovației „*Metodă de creștere a gradului de conștientizare la copii cu privire la prevenirea rezistenței la antimicrobiene*” poate fi considerată un instrument util în dezvoltarea competențelor profesionale vizând prevenirea rezistenței la antimicrobiene la viitorii specialiști cu studii postsecundare și postsecundare nonterțiare.



Directoare

Mariana NEGRĂAN



APROB
Prim prorector,
prorector pentru activitate didactică,
USMF „Nicolae Testemițanu” din RM
prof. univ., dr. hab. șt. med.

Olga CERNEȚCHI
„28 Decembrie” 2022

ACTUL DE IMPLEMENTARE
(în procesul didactic)

- 1. Denumirea ofertei pentru implementare:** Ghidul „Diagnosticul Microbiologic al Infecțiilor Tractului Respirator”, 2021.
- 2. Autori:** BURDUNIUC Olga dr. șt. med., conferențiar cercetător, BĂLAN Greta dr. șt. med., conferențiar universitar, SPÎNU Constantin dr. hab. șt. med., profesor universitar, SOFRONIE, Olga cercetător științific, BIVOL Maria cercetător științific.
- 3. Unde și când a fost implementată:** Catedra de Boli infecțioase a Universității de Stat de medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”
- 4. Eficacitatea implementării:** Aplicarea ghidului ca material didactic pentru instruirea universitară, precum și în educația medicală continuă a medicilor specialitatea boli infecțioase, medicina de familie va permite formarea specialiștilor, dezvoltarea competențelor privind principiile, procedurile, tehnicile de recoltarea a biosubstratelor, metodologiile de diagnostic în timp util și managementul eficient a cazului de infecție de tract respirator.
- 5. Rezultatul implementării:** Este indiscutabil impactul și contribuția implementării ghidului în formarea studenților, medicilor rezidenți și în educația medicală continuă a medicilor ceea va permite standardizarea, actualizarea continuă a metodelor utilizate, stabilirea diagnosticului veridic, luarea deciziilor privind indicarea terapiei antimicrobiene justificate în infecțiile tractului respirator în vederea combaterii dezvoltării rezistenței microorganismelor la antimicrobiene.

Șef Catedra de Boli infecțioase,
dr. hab. șt. med., conf univ.



PLĂCINTĂ Gheorghe

Șef departament, Departamentul
Didactic și Managementul Academic,
conf. univ., dr. șt. med.



STRATULAT Silvia



APROB

Prim prorector,
prorector pentru activitate didactică,
USMF „Nicolae Testemițanu” din RM
prof. univ. dr. hab. șt. med.

Olga CERNEȚCHI

„28” decembrie 2022

ACTUL DE IMPLEMENTARE
(în procesul didactic)

1. **Denumirea ofertei pentru implementare:** Ghidul „Diagnosticul Microbiologic al Infecțiilor Tractului Respirator”, 2021.
2. **Autori:** BURDUNIUC Olga dr. șt. med., conferențiar cercetător, BĂLAN Greta dr. șt. med., conferențiar universitar, SPÎNU Constantin dr. hab. șt. med., profesor universitar, SOFRONIE, Olga cercetător științific, BIVOL Maria cercetător științific.
3. **Unde și când a fost implementată:** Catedra de boli infecțioase, tropicale și parazitologie medicală a Universității de Stat de medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”
4. **Eficacitatea implementării:** Aplicarea ghidului ca material didactic pentru instruirea universitară, precum și în educația medicală continuă a medicilor specialitatea boli infecțioase, tropicale și parazitologie medicală va permite formarea specialiștilor dezvoltarea competențelor privind principiile, procedurile, tehnicile de recoltarea a biosubstratelor, metodologiile de diagnostic în timp util și managementul eficient a cazului de infecție de tract respirator.
5. **Rezultatul implementării:** Este indiscutabil impactul și contribuția implementării ghidului în formarea studenților, medicilor rezidenți și în educația medicală continuă a medicilor ceea va permite standardizarea, actualizarea continuă a metodelor utilizate, stabilirea diagnosticului veridic, luarea deciziilor privind indicarea terapiei antimicrobiene justificate în infecțiile tractului respirator în vederea combaterii dezvoltării rezistenței microorganismelor la antimicrobiene.

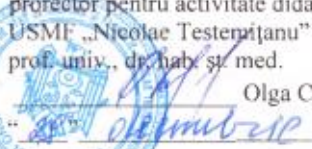
Șef Catedra de boli infecțioase,
tropicale și parazitologie medicală
dr. hab. șt. med., profesor univ.

HOLBAN Tiberiu

Șef departament, Departamentul
Didactic și Managementul Academic,
conf. univ., dr. șt. med.

STRATULAT Silvia



APROB
Prim prorector,
prorector pentru activitate didactică,
USMF „Nicolae Testemițanu” din RM
prof. univ., dr. hab. și med.

Olga CERNEȚCHI
2022



ACTUL DE IMPLEMENTARE
(în procesul didactic)

- Denumirea ofertei pentru implementare:** Ghidul „*Diagnosticul microbiologic al infecțiilor tractului respirator*”, 2021.
- Autori:** BURDUNIUC Olga dr. șt. med., conferențiar cercetător, BĂLAN Greta dr. șt. med., conferențiar universitar, SPÎNU Constantin dr. hab. șt. med., profesor universitar, SOFRONIE Olga cercetător științific, BIVOL Maria cercetător științific.
- Unde și când a fost implementată:** Departamentul Medicină Preventivă, Disciplina de microbiologie și imunologie a Universității de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”
- Eficacitatea implementării:** Aplicarea ghidului ca material didactic pentru instruirea universitară, precum și în educația medicală continuă a medicilor specialitatea Microbiologie și imunologie va permite dezvoltarea competențelor privind principiile, procedurile, tehnicile de recoltarea a biosubstratelor, metodologiile de diagnostic în timp util și managementul eficient a cazului de infecție de tract respirator.
- Rezultatul implementării:** Este indiscutabil impactul și contribuția implimentării ghidului în formarea studenților, medicilor rezidenți și în educația medicală continuă a medicilor ceea va permite standardizarea, actualizarea continuă a metodelor utilizate, stabilirea diagnosticului veridic, luarea deciziilor privind indicarea terapiei antimicrobiene justificate în infecțiile tractului respirator în vederea combaterii dezvoltării rezistenței microorganismelor la antimicrobiene.

Șef Departamentul Medicină Preventivă
dr. hab. șt. med., conf. univ.

CEBANU Serghei

Șef departament, Departamentul
Didactic și Managementul Academic,
conf. univ., dr. șt. med.

STRATULAT Silvia



APROB

Prim prorector,
prorector pentru activitate didactică,
USMF „Nicolae Testemițanu” din RM
prof. univ., dr. hab. șt. med.

Olga CERNEȚCHI



2022

ACTUL DE IMPLEMENTARE
(în procesul didactic)

1. **Denumirea ofertei pentru implementare:** Ghidul „Asigurarea calității în diagnosticul microbiologic al infecțiilor tractului urinar”, 2021.
2. **Autori:** BURDUNIUC Olga dr. șt. med., conferențiar cercetător, CEBAN Emil. dr. hab. șt. med., profesor universitar, BĂLAN Greta dr. șt. med., conferențiar universitar, PLĂCINTĂ Gheorghe dr. hab. șt. med., profesor universitar, VIȘNEVSCHI Anatol dr. hab. șt. med., profesor universitar, SOFRONIE, Olga cercetător științific, BIVOL Maria cercetător științific.
3. **Unde și când a fost implementată:** Catedra de boli infecțioase, tropicale și parazitologie medicală, USMF „Nicolae Testemițanu”.
4. **Eficacitatea implementării:** Aplicarea ghidului ca material didactic pentru instruirea universitară, precum și în educația medicală continuă specialitatea boli infecțioase, tropicale și parazitologie medicală va permite formarea specialiștilor dezvoltarea competențelor privind principiile, procedurile, tehnicile de recoltarea a biosubstratelor, metodologiile de diagnostic în timp util și managementul eficient a cazului de infecție de tract urinar.
5. **Rezultatul implementării:** Este indiscutabil impactul și contribuția implementării ghidului în formarea studenților, medicilor rezidenți și în educația medicală continuă a medicilor ceea va permite standardizarea, actualizarea continuă a metodelor utilizate, stabilirea diagnosticului veridic, luarea deciziilor privind indicarea terapiei antimicrobiene justificate în infecțiile tractului urinar în vederea combaterii dezvoltării rezistenței microorganismelor la antimicrobiene.

Șef Catedra de boli infecțioase,
tropicale și parazitologie medicală
dr. hab. șt. med., profesor univ.

HOLBAN Tiberiu

Șef departament, Departamentul
Didactic și Managementul Academic,
conf. univ., dr. șt. med.

STRATULAT Silvia



APROB

Prin prorector,

prorector pentru activitate didactică,
USMF „Nicolae Testemițanu” din RM
prof. univ., dr. hab. șt. med.

Olga CERNEȚCHI



28 decembrie 2022

ACTUL DE IMPLEMENTARE

(în procesul didactic)

- Denumirea ofertei pentru implementare:** Ghidul „Asigurarea calității în diagnosticul microbiologic al infecțiilor tractului urinar”. 2021.
- Autori:** BURDUNIUC Olga dr. șt. med., conferențiar cercetător, CEBAN Emil. dr. hab. șt. med., profesor universitar, BĂLAN Greta dr. șt. med., conferențiar universitar, PLĂCINTĂ Gheorghe dr. hab. șt. med., profesor universitar, VIȘNEVSCHI Anatolie, dr. hab. șt. med., profesor universitar, SOFRONIE, Olga cercetător științific, BIVOL Maria cercetător științific.
- Unde și când a fost implementată:** Catedra de Medicină de laborator, USMF „Nicolae Testemițanu”
- Eficacitatea implementării:** Aplicarea ghidului ca material didactic pentru instruirea universitară, precum și în educația medicală continuă a medicilor specialitatea Medicina de laborator va permite formarea specialiștilor dezvoltarea competențelor privind principiile, procedurile, tehnicile de recoltarea a biosubstratelor, metodologiile de diagnostic în timp util și managementul eficient a cazului de infecții de tract urinar.
- Rezultatul implementării:** Este indiscutabil impactul și contribuția implementării ghidului în formarea studenților, medicilor rezidenți și în educația medicală continuă a medicilor ceea va permite standardizarea, actualizarea continuă a metodelor utilizate, stabilirea diagnosticului veridic, luarea deciziilor privind indicarea terapiei antimicrobiene justificate în infecțiile tractului urinar în vederea combaterii dezvoltării rezistenței microorganismelor la antimicrobiene.

Șef Catedra de Medicină de laborator,
USMF „Nicolae Testemițanu”
dr. hab. șt. med., profesor universitar,

VIȘNEVSCHI Anatolie

Șef departament, Departamentul
Didactic și Managementul Academic,
conf. univ., dr. șt. med.

STRATULAT Silvia



APROB

Prim prorector,

prorector pentru activitate didactică,

USMF „Nicolae Testemițanu” din RM

prof. univ., dr. hab. șt. med.

Olga CERNEȚCHI

23 decembrie 2022

ACTUL DE IMPLEMENTARE

(în procesul didactic)

- Denumirea ofertei pentru implementare:** Ghidul „Asigurarea calității în diagnosticul microbiologic al infecțiilor tractului urinar”, 2021.
- Autori:** BURDUNIUC Olga dr. șt. med., conferențiar cercetător, CEBAN Emil. dr. hab. șt. med., profesor universitar, BĂLAN Greta dr. șt. med., conferențiar universitar, PLĂCINTĂ Gheorghe dr. hab. șt. med., profesor universitar, VIȘNEVSCHI Anatol dr. hab. șt. med., profesor universitar, SOFRONIE, Olga cercetător științific, BIVOL Maria cercetător științific.
- Unde și când a fost implementată:** Departamentul Medicină Preventivă, Disciplina de microbiologie și imunologie a Universității de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”
- Eficacitatea implementării:** Aplicarea ghidului ca material didactic pentru instruirea universitară, precum și în educația medicală continuă a medicilor, specialitatea Microbiologie și imunologie, va permite formarea la specialiști a competențelor privind principiile, procedurile, tehnicile de recoltarea a biosubstratelor, metodologiile de diagnostic în timp util și managementul cazului de infecție de tract urinar.
- Rezultatul implementării:** Este indiscutabil impactul și contribuția implementării ghidului în formarea studenților, medicilor rezidenți și în educația medicală continuă a medicilor ceea va permite standardizarea, actualizarea continuă a metodelor utilizate, stabilirea diagnosticului veridic, luarea deciziilor privind indicarea terapiei antimicrobiene justificate în infecțiile tractului urinar în vederea combaterii dezvoltării rezistenței microorganismelor la antimicrobiene.

Șef Departamentul Medicină Preventivă
dr. hab. șt. med., conf. univ.

CEBANU Serghei

Șef Departamentul
Didactic și Management Academic,
conf. univ., dr. șt. med.

STRATULAT Silvia



APROB
Prin proiecteur,
proector pentru activitate didactică,
USMF „Nicolae Testemițanu” din RM
prof. univ., dr. hab. șt. med.
Olga CERNEȚCHI
25 Decembrie 2022

ACTUL DE IMPLEMENTARE
(în procesul didactic)

- 1. Denumirea ofertei pentru implementare:** Ghidul „Asigurarea calității în diagnosticul microbiologic al infecțiilor tractului urinar”, 2021.
- 2. Autori:** BURDUNIUC Olga dr. șt. med., conferențiar cercetător, CEBAN Emil, dr. hab. șt. med., profesor universitar, BĂLAN Greta dr. șt. med., conferențiar universitar, PLĂCINTĂ Gheorghe dr. hab. șt. med., profesor universitar, VIȘNEVSCHI Anatol dr. hab. șt. med., profesor universitar, SOFRONIE, Olga cercetător științific, BIVOL Maria cercetător științific.
- 3. Unde și când a fost implementată:** Catedra de urologie și nefrologie chirurgicală, USMF „Nicolae Testemițanu”
- 4. Eficacitatea implementării:** Aplicarea ghidului ca material didactic pentru instruirea universitară, precum și în educația medicală continuă a medicilor la specialitatea Urologie, Andrologie și Nefrologie va permite formarea specialiștilor, dezvoltarea competențelor privind principiile, procedurile, tehnicile de recoltarea a biosubstratelor, metodologiile de diagnostic în timp util și managementul eficient a cazului de infecții de tract urinar.
- 5. Rezultatul implementării:** Este indiscutabil impactul și contribuția implementării ghidului în formarea studenților, medicilor rezidenți și în educația medicală continuă a medicilor ceea va permite standardizarea, actualizarea continuă a metodelor utilizate, stabilirea diagnosticului veridic, luarea deciziilor privind indicarea terapiei antimicrobiene justificate în infecțiile tractului urinar în vederea combaterii dezvoltării rezistenței microorganismelor la antimicrobiene.

Șef Catedra de urologie și
nefrologie chirurgicală,
dr. hab. șt. med., profesor univ.

TĂNASE Adrian

Șef departament, Departamentul
Didactic și Managementul Academic,
conf. univ., dr. șt. med.

STRATULAT Silvia



Ministerul Sănătății al Republicii Moldova
Consiliul municipal Chișinău
Direcția Generală Asistență Medicală și Socială
INSTITUȚIA MEDICO-SANITARĂ PUBLICĂ
SPITALUL CLINIC MUNICIPAL DE BOLI CONTAGIOASE DE COPII

MD-2028, mun. Chișinău, str. M. Lomonosov 49,
tel: 73-70-20; fax 72 31 64; e-mail: smbcc@ms.md
<http://smbcc.md/>

Nr. 1228 din 29.12. 2022

ACTUL DE IMPLEMENTARE

1. **Denumirea ofertei pentru implementare:** Ghidul „Asigurarea calității în diagnosticul microbiologic al infecțiilor tractului urinar”, 2021.
2. **Autori:** BURDUNIUC Olga dr. șt. med., conferențiar cercetător, CEBAN Emil. dr. hab. șt. med., profesor universitar, BĂLAN Greta dr. șt. med., conferențiar universitar, PLĂCINTĂ Gheorghe dr. hab. șt. med., profesor universitar, VIȘNEVSCHI Anatol dr. hab. șt. med., profesor universitar, SOFRONIE, Olga cercetător științific, BIVOL Maria cercetător științific.
6. **Unde și când a fost implementată:** IMSP Spitalul Clinic Municipal de Boli Contagioase de Copii.
3. **Eficacitatea implementării:** Aplicarea ghidului în practică laboratorului Microbiologic al Institutului de Ftiziopneumologie „Chiril Draganiuc” soluționează problema ce ține de principiile. procedurile, tehnicile de recoltare a biosubstratelor de la pacienți cu infecții ale tractului urinar deoarece oferă metodologii standardizate de diagnostic aliniate la rigorile internaționale ce permite indicarea terapiei antimicrobiene justificate și managementul eficient a cazului de infecție al tractului urinar.
4. **Rezultatul implementării:** Ghidul practic este utilizat de medici clinicieni și dispune de informații veridice, indicarea, interpretarea rezultatelor în timp util pentru ghidarea argumentată și optimizarea terapiei empirice antimicrobiene pe modele de susceptibilitate instituțională. Iar datele obținute în baza implementării ghidului servesc ca suport în monitorizarea succesului tratamentului antimicrobian, planificarea și realizarea intervențiilor în vederea prevenirii, controlul infecțiilor urinare asociate asistenței medicale.

Director IMSP SCMBCC
dr. șt. med., conf. univ.



Ludmila BÎRCA



APROB

Prim prorector

prorector pentru activitate didactică,
USMF „Nicolae Testemițanu” din RM
prof. univ., dr. hab. șt. med.

Olga CERNEȚCHI

„25” 2023

ACTUL DE IMPLEMENTARE
(în procesul didactic)

1. **Denumirea ofertei pentru implementare:** „Ghid de bune practici: alimentație rațională, siguranța alimentelor și schimbarea comportamentului alimentar”, 2021.
2. **Autori:** BĂHNĂREL I., dr. hab. șt. med., profesor universitar, BURDUNIUC, O., dr. șt. med., conferențiar cercetător, CAZACU-STRATU A., dr. șt. med., conferențiar universitar, ș.a.
3. **Unde și când a fost implementată:** Departamentul Medicină Preventivă, Disciplina de microbiologie și imunologie a Universității de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”
4. **Eficacitatea implementării:** Aplicarea prezentului ghid recomandă practici generale de alimentație corectă, atât pentru persoanele sănătoase, cât și pentru cele cu devieri ale stării de sănătate și anumite patologii, care pot fi influențate de alimentație. Prin intermediul ghidului se aduc la cunoștința aspecte despre siguranța alimentelor și contaminanții alimentelor inclusiv și cele cu funcții patogeni și toxinele lor.
5. **Rezultatul implementării:** Informația va favoriza formarea specialiștilor în domeniu care ulterior vor utiliza aceste cunoștințe în discuții cu publicul larg pentru schimbarea comportamentului alimentar și menținerea, îmbunătățirea stării de sănătate a acestora. Totodată această informația din ghid va fi utilă profesioniștilor din domeniul nutriției, igienei, microbiologiei, epidemiologiei, medicilor rezidenți și studenți în procesul de autopregătire și în comunicarea cu populația.

Șef Departament Medicină Preventivă
dr. hab. șt. med., conf. univ.

CEBANU Serghei

Șef departament, Departamentul
Didactic și Managementul Academic,
conf. univ., dr. șt. med.

STRATULAT Silvia

DECLARAȚIA PRIVIND ASUMAREA RĂSPUNDERII







Subsemnata, Burduniuc Olga, declar pe propria răspundere că materialele prezentate în teza de doctor habilitat sunt rezultatele propriilor cercetări și realizări științifice. Conștientizez că, în caz contrar, urmează să suport consecințele în conformitate cu legislația în vigoare.

Burduniuc Olga

Semnătura

Data:

CURRICULUM VITAE

	
INFORMAȚII PERSONALE	
Nume / Prenume	Olga Burduniuc
 Adresă(e)	Str. Cozmescu 5, bl. C, ap. 2P, Chișinău, R. Moldova, cod MD2028
 Telefon(oane)	(+373 22) 574 629 (serviciu)  Mobil: (+373 68) 144477
 E-mail(uri)	olga.burduniuc@ansp.gov.md ; olgaburduniuc3@gmail.com
Naționalitate	Republica Moldova
Data nașterii	09 decembrie 1972
Sex	Feminin
<i>Titlul științific</i>	Doctor în științe medicale, diploma seria DR nr. 1864, eliberată la 17 martie 2014
<i>Titlul științifico-didactic</i>	Conferențiar cercetător, diploma seria diploma seria CC nr. 0427 eliberată la 24 august 2015
Abilitare	Certificat de abilitare 2626 din 31.05.2017, specialitatea 313.02 – Microbiologie, virusologie medicală;
EXPERIENȚA PROFESIONALĂ	
<i>Perioada</i>	2022- prezent
Funcția sau postul	Șef Direcție Diagnostic de Laborator în Sănătate Publică

Numele și adresa angajatorului	Agenția Națională pentru Sănătate Publică, Republica Moldova
Tipul activității sau sectorul de activitate	Organizarea și asigurarea funcționalității laboratoarelor din cadrul ANSP.
Perioada	2019- prezent
Funcția sau postul ocupat	Fondator și Redactor-șef al revistei științifice <i>One Health & Risk Management</i>
Numele și adresa angajatorului	Asociația de Biosiguranță și Biosecuritate din Republica Moldova
Tipul activității sau sectorul de activitate	Recepționarea, consultarea și aprobarea articolelor pentru publicare în revistă
Perioada	2017-prezent
Funcția sau postul ocupat	Fondator și Președintele Asociației Obștești „Asociația de Biosiguranță și Biosecuritate din Republica Moldova”
Numele și adresa angajatorului	Asociația de Biosiguranță și Biosecuritate din Republica Moldova
Tipul activității sau sectorul de activitate	Organizarea instruirilor personalului medical (medicilor, laboranților, studenților și rezidenților) despre conceptele de biosecuritate. Elaborarea materialelor didactice.
Perioada	2016-2022
Funcția sau postul ocupat	Șef laborator Microbiologic
Numele și adresa angajatorului	Agenția Națională pentru Sănătate Publică, Republica Moldova
Tipul activității sau sectorul de activitate	Diagnosticul microbiologic al infecțiilor respiratorii, intestinale și zooantroponozelor
Perioada	2014-2016
Funcția sau postul ocupat	Șef laborator microbiologic Bolile extrem de contagioase, diareice acute și zooantroponoze
Numele și adresa angajatorului	Centrul Național de Sănătate Publică, Republica Moldova

Tipul activității sau sectorul de activitate	Diagnosticul bolilor diareice acute si zooantroponoze
Perioada	2013-2014
Funcția sau postul ocupat	Cercetător științific coordonator, Laboratorul epidemiologia infecțiilor respiratorii virale
Numele și adresa angajatorului	Centrul Național de Sănătate Publică, Republica Moldova
Tipul activității sau sectorul de activitate	Optimizarea supravegherii epidemiologice la unele maladii zooantroponoze cu elaborarea măsurilor de control și răspuns.
Perioada	2010- 2013
Funcția sau postul ocupat	Șef laborator științific Centrul Epidemiologia bolilor extrem de contagioase și combaterea bioterorismului
Numele și adresa angajatorului	Centrul Național de Sănătate Publică, Republica Moldova
Tipul activității sau sectorul de activitate	Monitorizarea Rezistenței antimicrobiene la agenții cauzali boli diareice acute
Perioada	2006-prezent
Funcția sau postul ocupat	Conferențiar universitar prin ordinul nr 65-C/17 din 20.02.2017, Catedra de Microbiologie, Virusologie și Imunologie
Numele și adresa angajatorului	USMF „Nicolae Testemițanu”, mun.Chișinău
Tipul activității sau sectorul de activitate	Activitatea didactică (lecții practice studenților facultăților Medicină 1, Medicină 2, Stomatologie, Farmacie și medici rezidenți specialitatea Microbiologie, Epidemiologie și Igienă.)
EDUCAȚIE ȘI FORMARE	
Perioada	2014 - 2016
Calificarea / diploma obținută	Diplomă de Master în managementul Sănătății Publice SP Nr. 000261

Disciplinele principale studiate / competențe profesionale dobândite	Teza „Biosiguranța și biosecuritatea în laboratoarele microbiologice din cadrul serviciului de supraveghere de stat a sănătății publice”.
Numele și tipul instituției de învățământ / furnizorului de formare	Școala de Management în Sănătate Publică, Republica Moldova
Perioada	2010-2013
Calificarea / diploma obținută	Diplomă de doctor în științe medicale, Seria: DR Nr. 1864
Disciplinele principale studiate / competențe profesionale dobândite	Teza „Perfecționarea diagnosticului microbiologic pentru detectarea unor markeri ai rezistenței enterobacteriilor la antibiotice”
Numele și tipul instituției de învățământ / furnizorului de formare	Centrul Național Științifico-Practic de Medicină Preventivă
Perioada	2003-2005
Calificarea / diploma obținută	Studii prin rezidențiat, specialitatea Microbiologie, Diplomă de licență AL nr. 001467
Disciplinele principale studiate / competențe profesionale dobândite	Microbiologie/Medic microbiolog
Numele și tipul instituției de învățământ / furnizorului de formare	Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”, mun.Chișinău Republica Moldova
Perioada	1997-2003
Calificarea / diploma obținută	Specialitatea Medicină generală, calificarea medic igienist-epidemiolog, Diplomă AS nr. 0015826
Disciplinele principale studiate / competențe profesionale dobândite	Microbiologie/Medic microbiolog
Numele și tipul instituției de învățământ / furnizorului de formare	Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”, Republica Moldova

Perioada	1989-1993
Calificarea / diploma obținută	Specialitatea – moașă (Diplomă D nr. 8069)
Disciplinele principale studiate dobândite	Obstetrică, Ginecologie, Pediatrie,. Nursing
Numele și tipul instituției de învățământ/furnizorului de formare	Școala medicală din orașul Orhei, Republica Moldova
Perioada	2014
Disciplinele principale studiate / competențe profesionale dobândite	Microbiolog clinicist, Curs practic intensiv de instruire " <i>World Health Organization - Multi-country Seminar, Laboratory Workshop on Antimicrobial Resistance.</i>
Numele și tipul instituției de învățământ / furnizorului de formare	Central Public Health Reference Laboratory (CPHRL) Tbilisi, Georgia, 29.06 - 04.07 2014; OMS
Perioada	2014
Calificarea / diploma obținută	Formator în domeniul instruirii specialiștilor în probleme de siguranță și securitate Biologică, certificat nr. 9 din 02.03.14
Disciplinele principale studiate / competențe profesionale dobândite	Cursul intensiv de instruire "Dezvoltarea cunoștințelor și bunelor practici în domeniul biosecurității, biosiguranței și managementul riscului biologic, dubla utilizare."
Numele și tipul instituției de învățământ / furnizorului de formare	Como, Italia 23.02 - 01.03.2014; Universitatea din Insubria; Centrul de excelență în CBRN pentru regiunea Europeana și Asia
Perioada	2013
Calificarea / diploma obținută	Perfecționarea profesională, ordinul nr. 254- SP din 12.06.13
Disciplinele principale studiate / competențe profesionale dobândite	Ciclul de perfecționare „ <i>Metode imunologice și molecular genetice în diagnosticul microbiologic</i> ”

Numele și tipul instituției de învățământ / furnizorului de formare	USMF „ <i>Nicolae Testemițanu</i> ”, Chișinău, Republica Moldova
Perioada	2013-2014
Calificarea / diploma obținută	Formator în domeniul instruirii specialiștilor în probleme de siguranță și securitate, certificat nr. 7 din 22.02.2014
Disciplinele principale studiate / competențe profesionale dobândite	Cursul de instruire la distanță în cadrul proiectului "Knowledge development and transfer of best practice on biosafety, biosecurity, biorisk".
Numele și tipul instituției de învățământ / furnizorului de formare	Centrul de excelență în CBRN pentru regiunea Europeana și Asia (Italia, Roma)
Perioada	2010
Calificarea / diploma obținută	Perfecționarea profesională, ordinul nr. 495- SP din 21.10.10
Disciplinele principale studiate / competențe profesionale dobândite	USMF „ <i>Nicolae Testemițanu</i> ” ciclul de perfecționare „ <i>Bacteriologie medicală</i> ”
Numele și tipul instituției de învățământ / furnizorului de formare	Chișinău, Republica Moldova
Perioada	2009
Calificarea / diploma obținută	Perfecționarea profesională, ordinul nr. 259-SP din 19.05.09
Disciplinele principale studiate / competențe profesionale dobândite	Ciclul de perfecționare „Metode de cercetări în domeniul imunologie”
Numele și tipul instituției de învățământ / furnizorului de formare	USMF „ <i>Nicolae Testemițanu</i> ”
Perioada	2009
Calificarea / diploma obținută	Perfecționarea profesională, ordinul. nr 05-82 E din 23.05.09

Disciplinele principale studiate / competențe profesionale dobândite	Psihopedagogie, Metode interactive de predare studenților elevilor din cadrul instituțiilor medicale
Numele și tipul instituției de învățământ / furnizorului de formare	Institutul de Științe ale Educației cursurile de formare continuă la specialitatea ” Psihopedagogie” Chișinău, Republica Moldova
Perioada	2008
Calificarea / diploma obținută	Perfecționarea profesională primară ordinal nr. 1-765 din 19.11.08
Disciplinele principale studiate / competențe profesionale dobândite	Ciclul de perfecționare primară “Microbiologia maladiilor extrem de contagioase”
Numele și tipul instituției de învățământ / furnizorului de formare	Institutul „ Microb” or. Saratov, Federația Rusă,
Perioada	2008
Calificarea / diploma obținută	Perfecționarea profesională certificat nr.13 din 09.12.08
Disciplinele principale studiate / competențe profesionale dobândite	” Diagnosticul molecular al gripei aviare”
Numele și tipul instituției de învățământ / furnizorului de formare	Institutul Național de Cercetare și Dezvoltare pentru Microbiologie și Imunologie or. București, România
	Domeniul de activitate științifică
Specialitatea de bază	313.02 Microbiologie, virusologie medicală
Domenii de cercetare	Microbiologie, epidemiologie, micologie, biotehnologie
Tema tezei de doctor habilitat	Produse inovative cu acțiune antifungică asupra unor agenți cauzali ai micozelor umane
Tema tezei de doctorat	Perfecționarea diagnosticului microbiologic pentru detectarea unor markeri ai rezistenței enterobacteriilor la antibiotice

INFORMAȚII SUPLIMENTARE	
<i>Participarea la proiecte/ Research Grants</i>	<i>Participări în proiecte internaționale</i>
<i>2021-prezent</i>	Membru și executor în echipa de cercetare:
<i>2021-prezent</i>	Food- and Waterborne Diseases Antimicrobial Resistance - Reference Laboratory Capacity
<i>2015</i>	EURGen-RefLabCap was initiated as a four-year project on the “provision of EU networking and support for public health reference laboratory functions for antimicrobial resistance in priority healthcare-associated infections
<i>2014</i>	Proiectul GEOHEALTH „Assesment of water quality and health state of the population from rural areas of the Republic of Moldova”, finanțat de Centrul de Politici în Sănătate și Sănătatea Publică, Universitatea Babeș-Bolyai, România, National Institutes of Health (SUA) nr.R24TW009568
<i>2013-2014</i>	EU CBRN CoE Project 18 "International Network of Universities and Institutes for Raising Awareness on Dual-Use Concerns in Bio-technology"
<i>2020-prezent</i>	EU CBRN CoE Project3 “Knowledge development and transfer of best practices on bio-safety/bio-security/bio-risk management”
<i>2022-prezent</i>	<i>Participări în proiecte naționale</i> Studiarea rezistenței bacililor gramnegativi la antimicrobiene în vederea fortificării sistemului național de supraveghere și control al bolilor transmisibile
<i>2015-2018</i>	Phage treatment and wetland technology as intervention strategy to prevent dissemination of antibiotic resistance in surface waters (PhageLand)/Utilizarea fagilor și tehnologiei zonelor umede ca strategie de intervenție pentru a preveni diseminarea rezistenței la antibiotice în apele de suprafață (PhageLand)
<i>2011-2014</i>	Studiarea particularităților clinico-epidemiologice ale infecțiilor respiratorii virale acute cu optimizarea măsurilor de control și răspuns.
<i>2010-2014</i>	Optimizarea supravegherii epidemiologice la unele maladii zooantroponoze cu elaborarea măsurilor de control și răspuns. (Subtema: Studiul particularităților circulației salmonelelor cu optimizarea supravegherii epidemiologice.

<p>2007-2009</p> <p>2004-2006</p>	<p>Studiul mecanismelor de transmitere a rezistenței E.coli implicată în patologia umană)</p> <p>Studiul privind monitorizarea rezistenței agenților microbieni la antibiotice</p>
<p>Recunoașterea profesională</p>	<p>Premii, mențiuni, distincții:</p> <p>Medalie de aur și diplomă Medicine Award: „, Procedure for obtaining materials based on silver nanoparticles with antifungal activity”, Euroinvent 2023, Iași, România 13 mai 2023.</p> <p>Expert național în instruirea cadrelor privind domeniul biosecurității, biosiguranței și managementul riscului biologic</p> <p>Medalia „Nicolae Milescu Spătaru” (2022).</p> <p>Diplomă de onoare a Ministerului Educației, Culturii și Cercetării (2021)</p> <p>Medalie de argint. Innovation and Creative Education Fair for Youth ICE-USV – Vth Edition. Suceava, Romania, mai 2021.</p> <p>Medalie de argint. Inventica 2021, Iasi, Romania, 23-25 iunie 2021.</p> <p>Medalie de aur. Salonul Internațional al Cercetării Științifice, Inovării și Inventicii PRO INVENT, ediția a XIX-a. 20-22 octombrie 2021, Cluj-Napoca.</p> <p>Medalie de aur. Salonul Internațional de Invenții și Inovații „Traian VUIA `21”, 06-08 octombrie 2021, Timișoara.</p> <p>Medalie de bronz. Expozitia Internationala Specializata „INFOINVENT 2021” ediția a XVII-a, 17-20 noiembrie 2021, Chisinau, Moldova.</p> <p>Medalie de aur. Euroinvent 2021, Iasi, Romania, 22 mai 2021</p> <p>Medalie de aur. International Exhibition INVENTCOR IInd edition, 16-18.12.2021, Deva, Romania.</p> <p>Diplomă de performanță. Inventica 2020, Iasi, Romania 29-31 iunie 2020.</p> <p>Medalie de aur. Salonul Internațional de Invenții și Inovații „Traian Vuia”, ed. a VI-a, 13-15 Octombrie 2020. Romania, Timișoara.</p> <p>Medalie de aur. Euroinvent 2020, Iasi, Romania, 23 mai 2020.</p> <p>Medalie de aur și Diplomă de performanță. The 24th International Exhibition of Inventions Inventica 2020, 29-31 iulie 2020. Iași, România.</p>

	<p>IFBA's 2019 Biosafety Hero, International Federation of Biosafety Associations.</p> <p>Diplomă de excelență. PRO INVENT Ediția XVII. Cluj-Napoca, Romania, 20-22 martie 2019.</p> <p>Diploma Biosafety Heroes, International Federation of Biosafety Associations (IFBA), 2019.</p> <p>Silver Medal. 47E Salon International des Inventions de Genève. Genève, 12 Avril, 2019.</p> <p>Diploma on behalf of the Scientific Community of Romania. 47th International Exhibition of Inventions Geneva. Genva, 12 April, 2019.</p> <p>Diplomă de excelență. PRO INVENT Ediția XVII. Cluj-Napoca, Romania 20-22 martie, 2019.</p> <p>Medalie de aur. Euroinvent 2019. Iasi, Romania 18 mai 2019.</p> <p>Medalie de aur. Salonul Internațional de Invenții Inovații „Traian Vuia”. Timișoara, România 14 iunie 2019.</p> <p>Medalie de aur. Inventica 2019. Iasi, Romania 26-28 iunie 2019.</p> <p>Diplomă de performanță. Inventica 2019, Iasi, Romania, 26-28 iunie 2019.</p> <p>Medalie de argint. Infoinvent Ediția a XVI-a, Chișinău, Republica Moldova, 20-23 noiembrie 2019.</p> <p>Diploma de onoare a Salonului. Salonul Internațional al Inovării și Cercetării Științifice Studentești –” Cadet INOVA ’19”. Academia Forțelor Terestre” Nicolae Bălcescu”, Sibiu, România, 11-13 aprilie 2019.</p> <p>Gold Medal. The World Exhibition on Inventions, Research and New Technologies. Valencia, Spain 8th of March 2018.</p> <p>Gold Medal. 46E Salon International des Inventions de Genève. Genève, Avril, 2018.</p> <p>Medalie de aur. Salonul Internațional de Invenții și Inovații „Traian Vuia”. Timișoara, România, 15 iunie 2018.</p> <p>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.</p> <p>Medalie de aur. Euroinvent 2018. Iasi, Romania 19 mai 2018.</p> <p>Medalie de bronz. Euroinvent 2018, Iasi, Romania 19 mai 2018.</p>
--	--

	<p>Medalie de aur. Inventica 2018, Iasi, Romania 27-29 iunie 2018.</p> <p>2 medalii de aur. Salonul Internațional de Invenții Inovații „Traian Vuia”. Timișoara, România 15 iunie 2018.</p> <p>Medalia de aur. Inventica 2018. Iasi, Romania 27-29 iunie 2018.</p> <p>Diplome al Ministerului Sănătății (anul 2013, 2014)</p> <p>Diploma Ministerului Sănătății (2018, 2020, 2022),</p> <p>Medalie de bronz, Euroinvent Iași 2013,</p> <p>Medalie de aur. Inventica, Iași 2013;</p> <p>Medalie de aur. PRO INVENT, Cluj-Napoca 2013;</p> <p>Medalie de aur Medalie de aur. Salonul Internaționale de invenții Inventica, Iași 2012.</p>
ALTE ACTIVITĂȚI	
Autor și coautor	219 publicații științifice (din ele 22 fără coautori), inclusiv: 72 articole în reviste științifice recenzate naționale, 16 articole în reviste editate în străinătate (din ele 7 cu impact factor), 1 monografie monoautor, 2 monografii colective, coautor a două manuale, 10 indicații/recomandări metodice și 14 ghiduri practice, autor a 5 certificate de inovator și 14 brevete de invenție. A participat la peste 100 de manifestări științifice în țară și peste hotare.
Comunicări la foruri	
2022	2nd Balkan Conference of Medical Mycology and Mycotoxicology „Balkan Fungus 2022”. Thessaloniki, Greece, 2022.
2022	Conferința Națională cu participare Internațională „Stopați pneumonia: investiți în sănătatea copiilor” dedicată Zilei Mondiale a Pneumoniei celebrată în 12 noiembrie. Chișinău.
2021	Conferința Internațională „Pandemia COVID-19 - atitudini, contraverse și provocări în asistența perinatală”. Chișinău.
2021	Conferința științifică națională cu participare Internațională „Materiale avansate în biofarmaceutică și tehnică”. Chișinău.
2021	The 1st edition of the National Conference with International participation „One Health Approach in a Changing World”. Chișinău.
2020	Congresul consacrat aniversării a 75-a de la formarea USMF „Nicolae Testemițanu”. Chișinău.

2019	International Conference “ACHIEVEMENTS AND PERSPECTIVES OF MODERN CHEMISTRY” dedicated to the 60th anniversary from the foundation of the Institute of Chemistry. Chişinău
2019	Al VIII-lea Congres Național în Sănătate Publică și Management cu participare internațională. Chişinău;
2019	Conferința Științifică Internațională, Sănătatea, medicina și bioetica în societatea contemporană: studii inter și pluridisciplinare = Health, Medicine and Bioethics in Contemporary Society: Inter-and Pluridisciplinary Studies: ed. a 2-a. Chişinău.
2018	XXXV-a Conferință Națională "Romanian Chemistry Conference". Călimănești-Căciulata, Vâlcea, România.
2018	20th Congress of the International Society for Human and Animal Mycology. Amsterdam, Netherlands, 2018:
2018	VII Ежегодная Международная Научно-Практическая Конференция „Актуальные вопросы медицины”. Баку, Азербайджан.
2018	International Scientific Conference on Microbial Biotechnology (4nd 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;
2017	Conferința științifică Națională cu Participare Internațională Optimizarea supravegherii epidemiologice în infecțiile nosocomiale. Chişinău
2016	Научно-практическая конференция с международным участием, посвященная 60-летию кафедры эпидемиологии Львовского национального медицинского университета имени Данила Галицкого, «Актуальные проблемы эпидемиологии инфекционных, паразитарных и неинфекционных заболеваний» Львов, Украина 12-13 мая;
2016	Conferința - International Scientific Conference on Microbial Biotechnology (3rd edition). (Chişinău, Republica Moldova)
2016	Conferința națională cu participare internațională Promovarea sănătății – o prioritate a sănătății publice”. Orhei, Republica Moldova;
2016	Conferința științifico-practică națională de la Cernauți: Горбуновські читання. м.Чернівці 5-6 травня; Conferința națională cu participare internațională ”Sănătatea ocupațională: probleme și realizări”. Chişinău, Republica Moldova;

2016	International conference titled “Socio-psycho-medical changes in the lifestyles of the contemporary family”, Antropological Research and Studies. București, România 7-8 octombrie;
2015	Conferința națională cu participare internațională intitulată "Individ, familie, societate & provocări contemporane", (București, România);
2014	Congresul specialiștilor în domeniul sănătății publice și managementului sanitar (Chișinău, Republica Moldova);
2013	Conferința științifică Națională cu participare Internațională."Optimizarea supravegherii epidemiologice în infecțiile nosocomiale" (Chișinău, Republica Moldova) .
2012	Conferința științifico – practică Națională cu participare Internațională. Sănătatea copiilor și factorii exogeni de risc.(Chișinău, Republica Moldova);
2012	Conferința internațională ”Экология. Здоровье. Спорт”. (Cita, Federația Rusă)
ALTE ACTIVITĂȚI	
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	Membru al Seminarului Științific de Profil la specialitățile 163. Biologie celulară. Specialitatea: 163.04 Microbiologie (Decizia Consiliului de Conducere ANACEC nr. 13 din 30 octombrie 2020).
2017-prezent	Președintele Asociației de Biosiguranță și Biosecuritate din Republica Moldova (ABBRM).
2017-prezent	Membru al Federației Internaționale al Asociațiilor de Biosiguranță (IBFA).
2017-prezent	Membru al Asociației Europene de Biosecuritate (EBSA)
2016-prezent	Membru al Consiliului științific al ANSP .
2017-prezent	Membru al Asociației Interregionale pentru Microbiologie Clinică și Chimioterapie Antimicrobiană (Межрегиональная Ассоциация по Клинической Микробиологии и Антимикробной Химиотерапии (МАКМАХ).
2016-prezent	Membru al Societății Microbiologilor și Epidemiologilor din RM.

2016-prezent	Membru al Societății Europene de Microbiologie Clinică și Boli Infecțioase (ESCMID).
	Aptituduni și competențe personale
Limba maternă	Română
Limbi străine cunoscute	Rusa(C2), engleza (B2), franceza (B1),
COMPETENȚE ȘI APTITUDINI ORGANIZATORICE/ MANAGERIALE	Capacitate de analiză și sinteză. Responsabilitate Lucru în echipă Punctualitate Colaborare națională și internațională
Competențe și aptitudini PC	Windows, MS Office applications: Word, Excel, Power Point
Informații suplimentare	Căsătorită, 2 copii Permis de conducere - Categoria B
Persoane de referință	Spînu Constantin, dr. hab.șt. med., prof. univ., acad., Om Emerit al RM, constantin.spinu@ansp.gov.md , tel. mob.: 069667138 Rudic Valeriu, dr. hab. șt. biol., prof. univ., acad., Om Emerit al RM, acad.rudic@mail.md , tel. mob.: 069406368