

2. Haidarlî I., Tudor E., Sain D., et. al., Tuberculoza drept cauză a decesului // Buletinul academiei de științe a Moldovei. Științe medicale, Chișinău, 2006, 2(6):53 – 6.
3. World Health Organization (2011) “WHO Report 2011 - Global Tuberculosis Control”.
4. Кобелева Г.В., Копылова И.Ф., Байбородова Т.И., Летальные исходы больных туберкулезом в условиях его эпидемии // Туберкулез и болезни лёгких N4, 2011, 195 – 196.

STUDIUL ACTIVITĂȚII ANTITUBERCULOASE A UNOR NOI TIOUREIDE DERIVAȚI ALE ACIDULUI 2-(2-FENETIL)-BENZOIC

**Ecaterina Stratan¹, Nadejda Țurcan¹, Valeriu Crudu¹, Laurențiu Morușciag²,
Gheorghe Nițulescu², Ileana Chiriță², Tamara Cotelea³**

¹IMSP Institutul de Ftiziopneumologie „Chiril Draganiuc”, Chișinău

²Universitatea de Medicină și Farmacie „Carol Davila”, București

³Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”, Chișinău

Summary

The studying of antituberculosis activity of new synthesized compounds of Tioureide Acid 2-(2-Phenyletil)-Benzoic

The emergence of drug resistant tuberculosis poses a growing threat to national Public Health Sector. There were studied the minimum inhibitory concentrations (MIC) and minimum bactericidal concentrations (MBC) against *M. tuberculosis* reference strain (H₃₇Rw) of new drugs (compounds synthesized of Tioureide Acid 2-(2-Phenyletil)-Benzoic). It was determined that the minimum inhibitory concentration of the substance synthesized C₂₄H₂₄N₂OS, M = 388,54 N-(2-fenetilbenzoil)-N'-(3-etilfenil)-tioureis 10 μg/ml.

Rezumat

Apariția tuberculozei rezistentă la medicamente reprezintă o amenințare a sectorului de Sănătate Publică. Au fost studiate concentrațiile minime inhibitorii (CMI) și concentrațiile minime bactericide (CMB), față de *M.tuberculosis* tulpina de referință (H37Rw) a unor noi medicamente (compusi sintetizați ai tioureidelor acidului 2-(2'-feniletil)-benzoic). A fost stabilită concentrația minimă inhibitorie a substanței sintetizată C₂₄H₂₄N₂OS, M = 388,54 N-(2-fenetilbenzoil)-N'-(3-etilfenil)-tioureis de 10 μg/ml.

Actualitatea

Deși agentul tuberculozei (*M.tuberculosis*) a fost descoperit cu peste 100 ani în urmă, iar preparatele antituberculoase cu eficacitate mare sunt disponibile de peste jumătate de secol, infecția tuberculoasă rămîne și astăzi pentru cea mai mare parte a populației planetei un pericol de sănătate publică, fiind o boală cu o morbiditate și o letalitate înaltă. Suferințele cauzate populației de către *M.tuberculosis* sunt extrem de mari. Ele depășesc suma daunelor provocate de toate celelalte bacterii, luate împreună. Tratatamentul antituberculos, considerat ca una din metodele principale de prevenire a răspîndirii infecției, tot mai des nu reflectă rezultatele așteptate și una din pricinile de bază a ineficienței terapeutice este rezistența *M.tuberculosis* față de preparatele antituberculoase. Extinderea nivelului rezistenței primare și acumularea unui număr tot mai mare de tulpini de *M. tuberculosis* rezistente la preparatele antituberculoase devine o problemă majoră în controlul acestei infecții la etapa actuală. Urmare a acestui fenomen este creșterea numărului de eșecuri terapeutice și numărului de bolnavi cronici. Este o cauză destul de periculoasă, în viitor pot apărea tot mai frecvent forme de tuberculoză incurabilă, deoarece alte preparate antituberculoase nu se elaborează prea des. Un nivel înalt al rezistenței micobacteriilor tuberculozei față de remediile specifice se observă nu numai în regiunile cu incidență sporită a acestei infecții, dar și în țările unde incidența tuberculozei este joasă.

Organizația Mondială a Sănătății a declarat tuberculoza o urgență globală, iar fenomenul în cauză de o importanță primordială și recomandă ca cercetările efectuate în domeniul elaborării unor remedii noi, mai efective în tratamentul cazurilor de tuberculoză multirezistentă, să fie apreciate ca direcție de studiu prioritar. În Republica Moldova incidența globală a tuberculozei în a. 2010 a constituit 113 pacienți la 100 000 populație, sau de 3 ori mai mare ca în a. 1990. Rezistența medicamentoasă (primară și secundară) față de preparatele antituberculoase strategice, utilizate pe larg la etapa actuală în tratamentul tuberculozei a atins cifre extrem de periculoase - 63,3%.

Studiul preconizat este de o importanță majoră, atât din punct de vedere științific, cât și pentru domeniul sănătății publice.

Obiectivul

Studierea activității antituberculoase a unor substanțe noi sintetizate cu perspectiva elaborării unor noi remedii, care ar putea lărgi arsenalul preparatelor antituberculoase și influența esențială la eficacitatea tratamentului cazurilor de tuberculoză multirezistentă.

Materiale și metode

Pentru atingerea acestui obiectiv au fost utilizați numeroși compuși originali, sintetizați de specialiști în domeniu de la Universitatea de Medicină și Farmacie „Carol Davila” din București, care au fost testați pe tulpina de referință (H37Rw) și tulpini sălbatice de *M. tuberculosis*, izolate de la pacienți cu tuberculoză pulmonară aflați la tratament în clinica IFP „Chiril Draganiuc”.

Scopul de bază a fost stabilirea „in vitro” a prezenței sau absenței la substanțele din clasa tioureidelor acidului 2-(2'-fenetil)-benzoic a activității tuberculostatice sau tuberculocide.

Dizolvare compusilor. Pentru dizolvarea inițială a substanțelor sintetizate în acest studiu a fost utilizat dimetil sulfoxidul (DMSO). Diluțiile ulterioare au fost efectuate pe apă distilată sterilă. Pentru activitatea bactericidă au fost selectate 3 concentrații maxime a substanțelor noi sintetizate: 500 μg/ml, 100 μg/ml și 50 μg/ml.

Pregătirea suspensiei de *M. tuberculosis*. Au fost utilizate tulpinile de referință H₃₇Rw, precum și tulpini de *M. tuberculosis* „sălbatice”, izolate de la pacienți cu tuberculoză pulmonară cu termenul de izolare pînă la 2 săptămîni. Suspensia micobacteriană a fost pregătită după standardul de turbiditate de 5 UFC.

Inocularea. Pentru însămînțare s-au utilizat cîte 0,2 ml suspensie H₃₇Rw și suspensii de tulpini sălbatice de o turbiditate de 5 UFC la fiecare concentrație a substanței.

Expozitia. Au fost stabilite 3 expoziții – 1 oră, 4 ore și 24 ore. După fiecare expoziție se centrifugă 10 min., după care supernatantul se înlătură, iar la sediment se adaugă 1,0 ml apă.

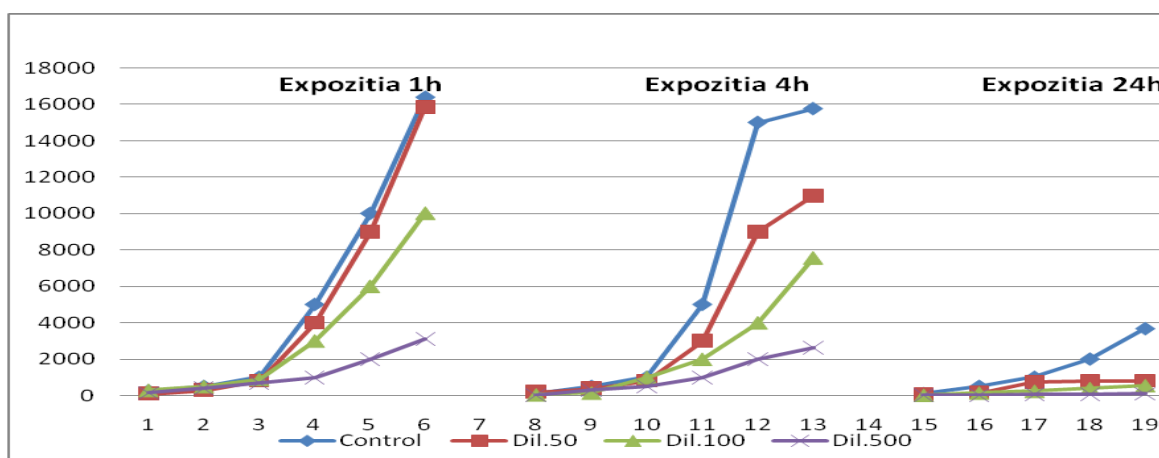


Fig. 1. Concentrațiile și expozițiile utilizate pentru studierea activității antituberculoase a substanțelor sintetizate sunt prezentate (GU și timpul în zile).

Tabelul 1

Studiul activității antituberculoase a compușilor

Tulpina	H ₃₇ Rw*			M. tuberculosis**		
Concentrație	Expoziție			Expoziție		
200 μg/ml	1 ora	4 ore	24 ore	1 ora	4 ore	24 ore
100 μg/ml	1 ora	4 ore	24 ore	1 ora	4 ore	24 ore
50 μg/ml	1 ora	4 ore	24 ore	1 ora	4 ore	24 ore

* Tulpina de referință – H₃₇Rv** Tulpina sălbatică *M. tuberculosis*, izolată de la pacienți bolnavi de tuberculoză.

Tabelul 2

Studiul activității antituberculoase bacteriostatice a tioureidelor

Substanțele sintetizate din clasa tioureidelor	Rezultat			
	H ₃₇ Rv		M. tuberculosis	
	30 μg/ml	10 μg/ml	30 μg/ml	10 μg/ml
C ₂₃ H ₂₂ N ₂ O ₂ N-(2-fenetilbenzoil)-N'-(m-tolil)-tiouree	Pozitiv	Pozitiv	Pozitiv	Pozitiv
C ₂₃ H ₂₂ N ₂ O ₂ , N-(2-fenetilbenzoil)-N'-(p-tolil)-tiouree	Pozitiv	Pozitiv	Pozitiv	Pozitiv
C ₂₄ H ₂₄ N ₂ O ₂ , M = 388,54 N-(2-fenetilbenzoil)-N'-(2,4-xilil)-tiouree	Pozitiv	Pozitiv	Pozitiv	Pozitiv
C ₂₄ H ₂₄ N ₂ O ₂ , M = 388,54 N-(2-fenetilbenzoil)-N'-(2,6-xilil)-tiouree	Pozitiv	Pozitiv	Pozitiv	Pozitiv
C ₂₄ H ₂₄ N ₂ O ₂ , M = 388,54 N-(2-fenetilbenzoil)-N'-(2,3-xilil)-tiouree	Pozitiv	Pozitiv	Pozitiv	Pozitiv
C ₂₄ H ₂₄ N ₂ O ₂ , M = 388,54 N-(2-fenetilbenzoil)-N'-(2,5-xilil)-tiouree	Pozitiv	Pozitiv	Pozitiv	Pozitiv
C ₂₄ H ₂₄ N ₂ O ₂ , M = 388,54 N-(2-fenetilbenzoil)-N'-(3,4-xilil)-tiouree	Pozitiv	Pozitiv	Pozitiv	Pozitiv
C ₂₄ H ₂₄ N ₂ O ₂ , M = 388,54 N-(2-fenetilbenzoil)-N'-(3,5-xilil)-tiouree	Pozitiv	Pozitiv	Pozitiv	Pozitiv
C ₂₄ H ₂₄ N ₂ O ₂ , M = 388,54 N-(2-fenetilbenzoil)-N'-(2-etilfenil)-tiouree	Pozitiv	Pozitiv	Pozitiv	Pozitiv
C ₂₄ H ₂₄ N ₂ O ₂ , M = 388,54 N-(2-fenetilbenzoil)-N'-(3-etilfenil)-tiouree	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ
C ₂₄ H ₂₄ N ₂ O ₂ , M = 388,54 N-(2-fenetilbenzoil)-N'-(3-etilfenil)-tiouree	Pozitiv	Pozitiv	Pozitiv	Pozitiv
Control 1 - Mediu lichid fără substanță	Pozitiv	Pozitiv	Pozitiv	Pozitiv
Control 2 - Mediu lichid+DMSO	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ

Legenda Control 1 – Suspensie H₃₇Rw 0.2ml = 2.0 ml apă sterilă;

Activitatea bactericidă a substanțelor sus-menționate a fost studiată pe medii lichide (metoda BACTEC MGIT 960) și pe medii solide (Lowenstein-Jensen). Pentru studierea activității bacteriostatice a noilor compuși chimici din clasa tioureidelor a fost utilizată metoda concentrațiilor absolute clasică de testare a sensibilității antibacteriene pe medii solide pe baza de ou. În calitate de mediu solid a fost pregătit mediul LJ, cu două concentrații absolute 30 μg/ml și 10 μg/ml. Ca tulpini de referință au fost utilizate H₃₇Rw și tulpini sălbatică *M. tuberculosis*, izolate de la pacienții cu TB. În calitate de control a fost utilizat tubul cu mediu LJ fără substanță și al doilea control – tubul cu mediu LJ cu o concentrație de 40 μg/ml Rifampicina.

Concluzii

Pentru studierea activității bactericide și bacteriostatice au fost efectuate mai multe investigații în dinamică după cum se vede în tabelul 1 și 2. Astfel, au fost montate un șir de experiențe, utilizând în fiecare câte o tulpină de referință H₃₇Rw și de la 2 până la 5 tulpini sălbatice la fiecare testare. Fiecare substanță a fost testată la 3 concentrații și la 3 expoziții diferite. În concluzie putem afirma că substanțele cercetate nu posedă acțiune bactericidă la cele 3 concentrații 200 μg/ml, 100 μg/ml și 50 μg/ml cu expozițiile respective 1 oră, 4 ore și 24 ore, dar substanța C₂₄H₂₄N₂O₅, M = 388,54 N-(2-fenetilbenzoil)-N'-(3-etilfenil)-tiouree posedă acțiune tuberculostatică la concentrațiile studiate de 30 μg/ml și respectiv 10 μg/ml.

Bibliografie

1. Missir A, Morușciag L, Nițulescu G, Ilie C, Căproiu M. Noi tioureide ale acidului 2-fenetilbenzoic cu activitate potențială antimicrobiană. Sinteza și caracterizarea spectrală, Revista de Chimie (București), 2009, 60 (12), 1288-92.
2. Morușciag L., Missir A, Ilie C, Guță R, Nănaș-Andrescu D, Căproiu M. Noi tioureide ale acidului 2-fenetilbenzoic cu activitate potențială antimicrobiană, Revista de Chimie (București), 2009, 60 (8), 806-9.
3. Parsons L. M., Somosko A., Gutierrez C., Lee E., Paramasivan C.N., Spector S., Roscigno G, and Nkengasong J. Laboratory Diagnosis of Tuberculosis in Resource-Poor Countries: Challenges and Opportunities. CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS, Apr. 2011, p. 314–350.
4. Boehme, C. C., et al. 2010. Rapid molecular detection of tuberculosis and rifampin resistance. N. Engl. J. Med. 363:1005–1015.
5. Cain, K. P., et al. 2010. An algorithm for tuberculosis screening and diagnosis in people with HIV. N. Engl. J. Med. 362:707–716.
6. Centers for Disease Control and Prevention. 2009. Updated guidelines for the use of nucleic acid amplification tests in the diagnosis of tuberculosis. MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep. 58:7–10.
7. Interim recommendations for the surveillance of drug resistance in tuberculosis. Geneva, World Health Organization, 2007, (document WHO/HTM/TB/2007.385).
8. Molecular line probe assays for rapid screening of patients at risk of multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB): Policy Statement. Geneva, World Health Organization, 2008; http://www.who.int/tb/dots/laboratory/lpa_policy.pdf, accessed 6, 09.2009.
9. Guidelines for treatment of tuberculosis. Fourth edition. Geneva, World Health Organization, 2009, (document WHO/HTM/TB/2009.420).
10. Guidelines for the programmatic management of drug-resistant tuberculosis. Geneva, World Health Organization, 2008 (document WHO/HTM/TB/2008.402).
11. Crudu V., Moraru N. Organizarea serviciului microbiologic în diagnosticul tuberculozei în cadrul strategiei DOTS. Actualități în fiziopneumologie. Metode de limnologie clinică și reabilitare endoecologică în pneumologie, fiziologie și terapie generală: Conferința științifico-practică a IFP. Chișinău, 2006, vol. 1, p.112-117.