

**MINISTERUL SĂNĂTĂȚII AL REPUBLICII MOLDOVA
IP UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
„NICOLAE TESTEMIȚANU” DIN REPUBLICA MOLDOVA**

Cu titlu de manuscris

CZU: 615.281 : 616.095

ZARICIUC ELENA

**ACȚIUNEA ANTIMICROBIANĂ A UNOR COMPUȘI
COORDINATIVI AI ELEMENTELOR 3D ȘI A PREPARATELOR
POLIFUNCȚIONALE NOI**

313.02 – MICROBIOLOGIE, VIRUSOLOGIE MEDICALĂ

Rezumatul tezei de doctor în științe medicale

CHIȘINĂU, 2023

Teza a fost elaborată la Disciplina de microbiologie și imunologie a Universității de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”

Conducător științific:

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

Consultant științific:

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

Referenți oficiali:

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

Cepoi Liliana dr. șt. biol., conf. cercet.

Consiliul Științific Specializat a fost aprobat de către Consiliul de conducere al ANACEC prin decizia nr. 2 din 29 septembrie 2023, în următoarea componență:

Paraschiv Angela președinte, dr. hab. șt. med., conf. univ.

Lozan-Tîrșu Carolina secretar, dr. șt. med., conf. univ.

Bălan Greta dr. hab. șt. med., conf. univ.

Burduniuc Olga dr. șt. med., conf. cercet.

Vorobjit Valentina dr. șt. med., conf. univ.

Susținerea va avea loc la 13 decembrie 2023, ora 14.00, în ședința Consiliului științific specializat D 316.02-23-57 din cadrul Universității de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu” din Republica Moldova (bl. Ștefan cel Mare și Sfânt nr. 165, biroul 204, Chisinau, MD-2004)

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

Rezumatul a fost expediat la 08 noiembrie 2023.

Secretar științific al Consiliului științific specializat:

Lozan-Tîrșu Carolina, dr. st. med., conf. univ.

Conducător științific:

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

Consultant științific:

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

Autor

ZARICIUC Elena

© Zariciuc Elena 2023

CUPRINS

REPERELE CONCEPTUALE ALE CERCETĂRII		4
CONȚINUTUL TEZEI		7
1	REZISTENȚA MICROORGANISMELOR PATOGENE LA ANTIBIOTICE ȘI ELABORAREA NOILOR REMEDII EFICIENTE	7
2	OBIECTELE ȘI METODELE DE STUDIU	7
3	ACTIVITATEA ANTIMICROBIANĂ A UNOR COMPUȘI NOI	8
4	MECANISMELE POSIBILE DE ACȚIUNE A NOILOR COMPUȘI ASUPRA MICROORGANISMELOR PATOGENE	12
CONCLUZII GENERALE ȘI RECOMANDĂRI		20
BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ		22
LISTA PUBLICAȚIILOR PROPRII LA TEMA TEZEI		23
ADNOTARE (ÎN ROMÂNĂ, RUSĂ ȘI ENGLEZĂ)		28

REPERELE CONCEPTUALE ALE CERCETĂRII

Actualitatea și importanța cercetărilor. Apariția rezistenței multiple la medicamente la multe dintre microorganismele patogene devine o problemă din ce în ce mai proeminentă, care compromite în mod serios terapiile bazate pe antibiotice. Rezistența la antibiotice are ca rezultat reducerea gradului de eficacitate a medicamentelor antibacteriene și antifungice, ceea ce face ca tratamentul bolilor infecțioase să fie complicat, costisitor sau în anumite cazuri, chiar imposibil. Criza rezistenței la antimicrobiene a fost atribuită utilizării greșite și în exces a acestor agenți [1]. Aplicarea antibioticelor în diferite tratamente constituie principala abordare a medicinei moderne în cazul infecțiilor. Din păcate, această abordare este compromisă deoarece cercetătorii nu au reușit să mențină ritmul descoperirii antibioticelor în fața apariției rapide a agenților patogeni rezistenți emergenți. Datorită utilizării aberante a antibioticelor, numeroși agenți patogeni au căpătat rezistență multiplă la aceste medicamente. Cel mai elocvent exemplu în acest sens sunt tulpinile de *Mycobacterium tuberculosis* cu rezistență multiplă. Infecții bacteriene severe sunt de asemenea provocate de reprezentanții genurilor *Acinetobacter*, *Burkholderia*, *Campylobacter*, *Citrobacter*, *Clostridium*, *Enterobacter*., *Enterococcus*, *Escherichia*, *Haemophilus*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Serratia*, *Staphylococcus* [1, 3].

O epocă post-antibiotică, în care infecțiile comune și leziunile minore pot ucide nu mai poate fi luată drept fantezie apocaliptică, fiind de fapt o posibilitate foarte reală a secolului XXI [2, 10-12].

Centrele internaționale și naționale pentru controlul și prevenirea bolilor, precum și alte organizații și experți recomandă aplicarea diferitor măsuri, care pot reduce amploarea fenomenului de antibioticorezistență. Implementarea măsurilor recomandate, cum ar fi: adoptarea programelor de administrare a antibioticelor; îmbunătățirea practicilor de diagnostic, supraveghere și prescriere; optimizarea regimurilor terapeutice; profilaxia infecțiilor, ar trebui să fie eficiente în gestionarea acestei crize [6, 9]. Alături de cele menționate este clar, că una dintre cele mai importante măsuri în acest sens este elaborarea și producerea de noi preparate antibiotice, principiul de acțiune a cărora să minimizeze ori chiar să excludă posibilitatea de dezvoltare a rezistenței la antimicrobiene.

Comunitatea științifică s-a dedicat în mod exhaustiv descoperirii de medicamente noi, mai sigure și eficiente, fie prin sinteza chimică dirijată a noilor compuși, fie prin exploatarea resurselor naturale. Majoritatea agenților chimici noi care trec cu succes cel puțin primele faze ale studiului clinic în ultimii ani sunt elaborați direcționat și acționează pe un spectru restrâns de agenți patogeni, cum ar fi pseudomonadele, stafilococii sau micobacteriile. Succesul acestor substanțe chimice noi se bazează pe faptul, că acestea au ținte noi, asupra cărora nu acționează antibioticele aprobate existente. Descoperirea de noi clase de substanțe chimice care sunt eficiente față de țintele moleculare noi prezintă o oportunitate pentru o dezvoltare extinsă viitoare de agenți antimicrobieni

cu spectru larg de acțiune. Efectele produselor naturale sunt determinate de diferite principii active, metaboliți secundari sau fitochimicale precum alcaloizii, taninurile, terpenoidele, uleiurile esențiale, flavonoidele, lectinele, celulele fagocitare și mulți alți constituenți organici. Activitatea antimicrobiană a complexelor naturale rezultă frecvent din activitatea câtorva componente individuale, care acționează în energie cooperantă, iar impactul clinic este asigurat de efectele directe asupra microorganismelor patogene [8].

Pentru a asigura progrese semnificative în domeniul elaborării substanțelor cu efecte antimicrobiene în condițiile unei rezistențe sporite a patogenilor la antibiotice, este necesar de a realiza cercetări în domeniul sintezei direcționate de noi substanțe chimice, în direcția descoperirii de noi produse naturale cu efecte antimicrobine, dar și în elaborarea de combinații polifuncționale, componentele cărora sunt orientate spre mai multe ținte concomitent, asigurând astfel succesul în combaterea microorganismelor multirezistente.

Scopul lucrării: evaluarea proprietăților antimicrobiene ale compușilor chimici noi ai elementelor 3d și a posibilității de amplificare a efectelor biologice prin obținerea de combinații multifuncționale cu compușii de origine naturală.

Obiectivele lucrării:

1. Identificarea compușilor chimici noi cu activitate antimicrobiană înaltă.
2. Studiul calitativ și cantitativ al activității antimicrobiene a compușilor chimici noi ai 3d elementelor și compușilor naturali față de tulpinile microbiene de referință.
3. Stabilirea unor ținte specifice de acțiune antimicrobiană a compușilor chimici noi și a combinațiilor lor cu compușii naturali.
4. Evaluarea modificărilor unor parametri biochimici ai tulpinilor bacteriene de referință sub influența compușilor monocomponenți și în combinație cu compușii de origine naturală.
5. Influența compușilor antimicrobieni noi asupra unor procese enzimatice.

Ipoteza de cercetare. Compușii chimici noi ai 3d elementelor cu activitate antimicrobiană și compușii de origine naturală, așa ca enotanina și extractele din spirulină pot forma combinații sinergice multifuncționale, componentele cărora sunt orientate spre mai multe ținte concomitent, asigurând astfel amplificarea efectului biologic.

Sinteza metodologiei de cercetare și justificarea metodelor de cercetare alese. Pentru realizarea tezei de doctor în calitate de obiecte de studiu au fost utilizate 5 tulpini de referință de microorganisme (două Gram-, 2 Gram+ și una fungică), ceea ce a permis evidențierea particularităților de acțiune a compușilor chimici noi și a celor de origine naturală. În calitate de substanțe cu efecte antibacteriene și antifungice au fost utilizați compuși noi cu segmentul

tiosemicarbazinic, coordonat cu metale de tranziție - cobalt, nichel și cupru; preparatul BioR, extractul din spirulină și enotanina hidrosolubilă.

În cercetare au fost aplicate metode microbiologice standard, care au permis stabilirea parametrilor calitativi și cantitativi ai acțiunii antibacteriene/antifungice a compușilor chimici, naturali și a combinațiilor acestora. De asemenea, au fost aplicate metode biochimice de evidențiere a unor modificări ale permeabilității membranelor celulare, de apreciere a nivelului de stres oxidativ și de activitate enzimatică la microorganisme patogene sub influența compușilor chimici și naturali. Dintre metodele standard au fost aplicate tehnicile de determinare a concentrației minime de inhibiție și concentrației minime bactericide/fungicide ale compușilor și combinațiilor lor. Aprecierea integrității membranelor celulelor bacteriene s-a realizat prin cuantificarea cantității de acizi nucleici eliberați. Determinarea nivelului de stres oxidativ s-a făcut prin cuantificarea speciilor reactive ale oxigenului în celulele bacteriene. De asemenea, au fost utilizate metode de determinare a activității enzimelor antioxidante (catalaza și superoxiddismutaza), și a lactatdehidrogenazei eliberate de celulele levuriene. Rezultatele experimentale obținute au fost supuse analizei statistice uzuale cu aplicarea instrumentelor statisticii descriptive și analizei corelaționale. Valorile parametrilor evaluați sunt date în teză ca media $\pm$ deviația standard. În calitate de test de semnificație a fost aplicat testul Student.

Obiectele de studiu și metodologia aplicată au fost selectate în vederea realizării scopului și sarcinilor trasate și au permis identificarea compușilor și combinațiilor active și de a evidenția unele ținte de acțiune a compușilor noi.

Noutatea și originalitatea științifică: A fost realizat screeningul și evidențiați noi compuși chimici tiosemicarbazonici cu 3d elemente cu activitate antimicrobiană pronunțată. A fost demonstrată posibilitatea măririi nivelului de manifestare a efectelor biologice ale compușilor testați în combinație cu extractele din spirulină și enotanina solubilă. A fost demonstrat caracterul polifuncțional al combinațiilor obținute prin evidențierea mai multor ținte de acțiune a acestora asupra tulpinilor microbiene testate.

Rezultatele obținute, care contribuie la soluționarea problemei științifice importante: evidențierea de noi substanțe chimice, compuși naturali noi și combinații dintre acestea care prezintă efecte antimicrobiene pronunțate; identificarea posibilelor ținte de acțiune a acestora.

Semnificația teoretică: Au fost acumulate cunoștințe noi despre activitatea antimicrobiană a unor compuși ai 3d elementelor, și combinațiilor acestora cu extracte din spirulina și enotanina hidrosolubilă și demonstrat caracterul polifuncțional al acestor combinații prin evidențierea mai multor ținte de acțiune.

Valoarea aplicativă a lucrării: Au fost evidențiați compuși chimici noi ai 3d elementelor și a combinațiile acestora cu extracte naturale, care posedă activitate antimicrobiană înaltă față de tulpinile de referință de microorganisme patogene, de perspectivă pentru continuarea cercetărilor biomedicale în vederea evidențierii efectelor *in vivo*.

Principalele rezultate științifice înaintate spre susținere

1. Compușii tiosemicarbazonați ai Cu(II), Co(III) și Ni(II) manifestă activitate antimicrobiană față de bacteriile Gram(+), Gram(-) și *Candida albicans*.
2. Compusul metil *N*-[(2-hidroxinaftalen-1-il)metiliden]-*N*-prop-2-en-1-ilcarbamo hidrazonotioat are un efect antifungic performant față de tulpina *Candida albicans* ATCC 10231 cu valori ale CMI și CMF la 0,7μg/ml.
3. Enotanina are un efect sinergic față de compușii chimici în ceea ce privește producerea de SRO în combinaire cu majoritatea compușilor testați și la toate tulpinile microbiene cercetate, cu o amplitudine mult mai înaltă în cazul bacteriilor Gram(-) și a tulpinii fungice *Candida albicans*.
4. Concentrațiile minime de inhibiție ale compușilor chimici noi au efecte inhibitorii pronunțate asupra activității enzimelor antioxidante la tulpinile *Staphylococcus aureus* ATCC 25922 și *Escherichia coli* ATCC 25923.

Aprobarea rezultatelor științifice

Rezultatele obținute pe durata realizării tezei au fost prezentate și aprobate la 9 conferințe internaționale în țară și peste hotare. Medalie de aur Salonul Internațional de Invenții și Inovații „Traian Vuia” Timișoara , ediția a VI -a, perioada 13-15 octombrie 2020 în Timișoara, din partea USMF „Nicolae Testemitanu”, Medalie de argint Salonul Internațional de Invenții și Inovații „Traian Vuia” Timișoara , ediția a VI -a, perioada 13-15 octombrie 2020 în Timișoara, din partea USMF „Nicolae Testemitanu”, Medalie de aur, Salonul Internațional al Cercetării Științifice, Inovării și Inventicii PRO INVENT, ediția a XVII-a, 20-22 martie 2019, Sala Polivalentă, CLUJ-NAPOCA, Al 4-lea colocviu Franco-Român de chimie medicală. Iași, România. 2017 05-07 octombrie, poster Conferința științifică anuală în cadrul Zilelor USMF ”Nicolae Testemitanu”. Chișinău, 15- 18 octombrie 2019.

Rezultatele tezei au fost discutate și aprobate în cadrul ședinței Disciplinei de microbiologie și imunologie al USMF „Nicolae Testemitanu” din 31 martie 2023 și a al ședinței Seminarului științific de profil 313. Imunologie, microbiologie, virusologie, specialitățile 321.09. Boli infecțioase, tropicale și parazitologie medicală, 313.02. Microbiologie, virusologie medicală din 30.05.2023.

Publicațiile la tema tezei. Rezultatele obținute pe durata elaborării acestei teze sunt reflectate în 38 publicații științifice: 1 capitol în monografie colectivă, 10 articole în reviste științifice, din ele 2 în monoautorat; 23 rezumate și 6 brevete de invenție.

Volumul și structura tezei. Teza constă din introducere, patru capitole, concluzii și recomandări, bibliografie cu 225 titluri, 2 anexe, 130 pagini text de bază, 24 figuri, 18 tabele.

CONȚINUTUL TEZEI

1. REZISTENȚA MICROORGANISMELOR PATOGENE LA ANTIBIOTICE ȘI ELABORAREA NOILOR REMEDII EFICIENTE

Capitolul include analiza situației create ca rezultat al răspândirii largi a fenomenului de antibioticorezistență și trece în revistă principalele rezultate obținute în domeniul elaborării de noi preparate cu efecte antimicrobiene performante și cu principii de acțiune originale. Capitolul a fost perfectat în baza analizei a 225 surse bibliografice cu grad înalt de actualitate, publicate în mare măsură în ultimii 10 ani, preponderent, în ultimii 5 ani. În partea introductivă a acestui capitol este descrisă situația cu referire la antibioticorezistență pe plan mondial și succesele modeste în domeniul înregistrării de noi preparate antimicrobiene. În primul subcapitol sunt analizate cauzele și mecanismele apariției și dezvoltării rezistenței la antibiotice la diferite grupuri sistematice de microorganisme patogene. Cel de-al doilea subcapitol este dedicat identificării soluțiilor, pe care le propune știința modernă în vederea soluționării problemei antibioticorezistenței. Sunt discutate mai multe strategii, cum ar fi sinteza direcționată de noi compuși cu proprietăți predeterminate, screening-ul compușilor naturali, utilizarea medicamentelor deja cunoscute în formule hibride ș.a. Cel de-al treilea subcapitol reflectă stadiul actual al cunoașterii cu referire la domeniile de interes direct a prezentei teze de doctorat, și anume: utilizarea de noi compuși coordinativi ce conțin segmentul tiosemicarbazonic și metale de tranziție, utilizarea taninurilor și a extractelor naturale, în special, din cianobacteria *Arthrospira platensis*. Capitolul include, de asemenea concluzii, care reflectă nivelul actual atins de cercetători în domeniul prezentei lucrări, după care este formulată problema de cercetare și direcțiile de rezolvare a acesteia. În finalul capitolului sunt formulate scopul și sarcinile prezentei lucrări.

2. OBIECTELE ȘI METODELE DE STUDIU

Capitolul conține argumentarea și descrierea obiectelor de studiu (tulpinile de microorganisme, compușii chimici și extractele naturale) și a metodelor de cercetare. În calitate de obiecte de studiu „*in vitro*” au fost incluse 7 tulpini de referință, care sunt destinate pentru testarea sensibilității la antibiotice și alte substanțe de sinteză chimică ori naturale: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* ГИСК 8035, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella enterica* ГИСК 03/03y, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Candida albicans* ATCC 10231.

Sunt descrise substanțele chimice cu efecte antimicrobiene, care au fost utilizate - 47 compușii coordinativi (selectați dintr-un număr de 385 compuși incluși în screening) ai Cu (II); Co(III) și Ni (II) sintetizați și caracterizați la catedra Chimie anorganică (Universitatea de Stat din Moldova), Institutul de Chimie și Institutul de Fizică aplicată, și 3 compuși de origine naturală: enotanina hidrosolubilă, extractul hidroetanolic din spirulină și preparatul BioR, de asemenea obținut din spirulină.

Capitolul include de asemenea, descrierea metodelor microbiologice standard aplicate în vederea evaluării eficienței compușilor chimici și naturali și a combinațiilor acestora în raport cu tulpinile de microorganisme patogene: metoda difuziei în geloză, metoda diluțiilor succesive, metoda standardizată EUCAST 7.1. Pentru a identifica țintele de acțiune a compușilor testați și a combinațiilor sinergice ale acestora au fost aplicate un șir de metode de determinare a activității enzimelor (lactatdehidrogenazei eliberate, supeoxidismutazei, catalazei și proteazelor extracelulare). De asemenea este descrisă metoda de apreciere a integrității membranelor celulelor bacteriene în baza cantității de acizi nucleici eliberați. Nivelul stresului oxidativ a fost măsurat aplicând cuantificarea speciilor reactive ale oxigenului în celulele bacteriene. Rezultatele obținute sunt prelucrate statistic aplicând statistica descriptivă și analiza corelațională. Metodele de cercetare au fost selectate astfel, ca să asigure realizarea scopului și obiectivelor de cercetare.

3. ACTIVITATEA ANTIMICROBIANĂ A UNOR COMPUȘI NOI

Una dintre provocările majore care stau în fața științei contemporane este necesitatea de a depăși constrângerea provocată de dezvoltarea rapidă a rezistenței microorganismelor patogene la antibioticele contemporane și clasice. În procesul de elaborare a noilor remedii se implică specialiști din diferite domenii, care încearcă identificarea substanțelor naturale cu efecte antimicrobiene, dar și sinteza de compuși chimici noi. Cu toate acestea, nu putem afirma că există un salt cantitativ sau calitativ în domeniul dat. Numărul de compuși antimicrobieni, care ajung la etapa de studii clinice este foarte mic, comparativ cu medicamentele elaborate pentru alte scopuri terapeutice. De exemplu, în anul 2019 s-au aflat în teste clinice 42 de potențiale antibiotice, în timp ce substanțe anticancer testate au fost peste 1100 [4].

Idei principale noi despre natura noilor substanțe antimicrobiene sunt foarte limitate. Mai mult de $\frac{3}{4}$ din substanțele aflate în proces de testare clinică în calitate de compuși cu efect antimicrobian sunt simpli derivați ai substanțelor binecunoscute și aplicate pe larg, și deci, la care este foarte probabil să se dezvolte rezistență după aceeași schema, ca și față de substanța originală. Dintre puținii compuși originali testați anual pentru aplicare în calitate de antimicrobiene mai puțin de 0,5% sunt eficienți față de tulpinile patogene gram-negative.

Astfel, este absolut clar, că sunt necesare abordări noi, inovative, în procesul de elaborare și punere în aplicare a noilor medicamente cu efecte antimicrobiene. Cercetările realizate în cadrul acestei teze țin de screeningul primar al noilor compuși elaborați conform anumitor supoziții despre o potențială structură chimică, care poate asigura efectele dorite ale substanței. Din cele 5 grupuri de compuși testați au fost selectați compușii cu activitate antimicrobiană față de fiecare dintre tulpinile testate. Rezultatele sunt generalizate în tabelul 1.

**Tabelul 1. Activitatea antimicrobiană a compuşilor tiosemicarbazonici noi
faţă de microorganismele de referinţă, µg/ml**

Nr	Formula compusului	Denumirea compusului	CMI	CMB/ CMF
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923				
1	C ₁₇ H ₁₈ ClN ₃ NiOS	Cloro[N-(3,4-dimetilfenil)-2-[1-(2-etiliden)-hidrazincarbotoamido(1-)]-nichel (II)	1,5	1,5
2	C ₁₁ H ₁₃ CuN ₃ O ₂ S	(2-(2-hidroxi-benziliden)-N-(prop-2-en-1-il)hidrazin-carbotoamido(2-))aquacupru	1,5	7,0
3	C ₁₁ H ₁₂ Br ₂ CuN ₄ O ₅ S	Nitratul de (2-(3,5-dibromo-2-hidroxi-benziliden)-N-(prop-2-en-1-il) hidrazincarbotoamido) aquacupru (II)	1,5	1,5
4	C ₁₁ H ₁₄ ClCuN ₃ O ₂ S	Hidratul de cloro(2-(2-hidroxi-benziliden)-N-(prop-2-en-1-il)hidrazincarbotoamido)cupru	0,7	3,0
5	C ₁₅ H ₁₄ ClCuN ₃ OS	Cloro(2-[(2-hidroxi-naftalen-1-il)metilidene]-N-(prop-2-en-1-il)hidrazincarbotoamido)cupru	0,7	3,0
<i>Bacillus cereus</i> ГИСК 8035				
1	C ₁₁ H ₁₄ ClCuN ₃ O ₂ S	Hidratul de cloro(2-(2-hidroxi-benziliden)-N-(prop-2-en-1-il)hidrazincarbotoamido)cupru	0,7	3,0
2	C ₁₅ H ₁₄ ClCuN ₃ OS	Cloro(2-[(2-hidroxi-naftalen-1-il)metilidene]-N-(prop-2-en-1-il)hidrazincarbotoamido)cupru	0,7	3,0
3	C ₁₁ H ₁₂ Br ₂ CuN ₄ O ₅ S	Nitratul de (2-(3,5-dibromo-2-hidroxi-benziliden)-N-(prop-2-en-1-il)hidrazincarbotoamido) aquacupru(II)	1,5	3,0
4	C ₁₁ H ₁₁ ClCuN ₄ O ₃ S	Cloro(2-(2-hidroxi-3-nitrobenziliden)-N-(prop-2-en-1-il)hidrazincarbotoamido)cupru	1,5	3,0
5	C ₁₂ H ₁₄ ClCuN ₃ O ₂ S	Cloro(2-(2-hidroxi-3-metoxibenziliden)-N-(prop-2-en-1-il)hidrazincarbotoamido)cupru	7,0	30
<i>Escherichia coli</i>, ATCC 25922				
1	C ₁₇ H ₁₈ ClN ₃ NiOS	Cloro[N-(3,4-dimetilfenil)-2-[1-(2-etiliden)-hidrazin carbotoamido(1-)]-nichel (II)	1,5	1,5
2	C ₃₂ H ₃₂ CoClN ₆ O ₂ S ₂	Clorură de bis[N-(2,4-dimetilfenil)-2-(2-oxibenziliden)-hidrazincarbotoamido(1-)]-cobalt(III)	7,0	30
3	C ₁₁ H ₁₃ CuN ₃ O ₂ S	(2-(2-hidroxi-benziliden)-N-(prop-2-en-1-il)hidrazincarbotoamido(2-))aquacupru	15,0	30,0
4	C ₁₁ H ₁₁ ClCuN ₄ O ₃ S	Cloro(2-(2-hidroxi-3-nitrobenziliden)-N-(prop-2-en-1-il)hidrazincarbotoamido)cupru	15,0	120,0
5	C ₁₂ H ₁₄ ClCuN ₃ O ₂ S	Cloro(2-(2-hidroxi-3-metoxibenziliden)-N-(prop-2-en-1-il)hidrazincarbotoamido)cupru	30,0	120,0
<i>Salmonella enterica</i> (S. Abony) ГИСК 03/03)				
1	C ₁₂ H ₁₈ CuN ₄ O ₆ S	Nitratul de (metil-N'-(2-hidroxi-benziliden)-N-prop-2-en-1-ilcarbamohidrazonotioato)-diaquacupru(II)	60,0	500,0
2	C ₁₁ H ₁₄ ClCuN ₃ O ₂ S	Hidratul de cloro(2-(2-hidroxi-benziliden)-N-(prop-2-en-1-il)hidrazincarbotoamido)cupru	30,0	60,0
3	C ₁₁ H ₁₃ CuN ₃ O ₂ S	(2-(2-hidroxi-benziliden)-N-(prop-2-en-1-il)hidrazincarbotoamido(2-))aquacupru	30,0	120,0
4	C ₁₁ H ₁₁ ClCuN ₄ O ₃ S	Cloro(2-(2-hidroxi-3-nitrobenziliden)-N-(prop-2-en-1-il)hidrazincarbotoamido)cupru	15,0	60,0
5	C ₁₂ H ₁₄ ClCuN ₃ O ₂ S	Cloro(2-(2-hidroxi-3-metoxibenziliden)-N-(prop-2-en-1-il)hidrazincarbotoamido)cupru	120,0	120,0
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231				
	C ₁₇ H ₁₈ ClN ₃ NiOS	Cloro[N-(3,4-dimetilfenil)-2-[1-(2-etiliden)-hidrazin carbotoamido(1-)]-nichel (II)	0,7	1,5
	C ₃₂ H ₃₂ CoClN ₆ O ₂ S ₂	Clorură de bis[N-(2,4-dimetilfenil)-2-(2-oxibenziliden)-hidrazincarbotoamido(1-)]-cobalt(III)	0,7	3,0
	C ₁₁ H ₁₂ Br ₂ CuN ₄ O ₅ S	Nitratul de (2-(3,5-dibromo-2-hidroxi-benziliden)-N-(prop-2-en-1-il)hidrazincarbotoamido) aquacupru(II)	1,5	3,0

$C_{22}H_{20}Br_4CoN_7O_5S_2$	Nitratul de bis(2-(3,5-dibromo-2-hidroxibenziliden)- <i>N</i> -(prop-2-en-1-il)hidrazincarbotoamido)cobalt(III)	1,5	3,0
$C_{11}H_{11}ClCuN_4O_3S$	Cloro(2-(2-hidroxi-3-nitrobenziliden)- <i>N</i> -(prop-2-en-1-il)hidrazincarbotoamido)cupru	3,0	15,0

Pentru 4 dintre tulpinile de referință au fost identificați compuși cu activitate antimicrobiană înaltă, cu valoarea CMI mai mică de 10 µg/ml. Doar în cazul *Salmonella enterica* (S. Abony ГИСК 03/03) activitatea antimicrobiană a celor mai activi compuși din seriile testate au fost pentru valorile CMI între 15 și 120 µg /ml.

În prezenta teză au fost studiate trei preparate de origine naturală – produse obținute în rezultatul cercetărilor științifice realizate sub conducerea academicianului Valeriu Rudic (preparatul BioR și extractul hidro-etanolc din *Arthrospira platensis* ES) și sub conducerea academicianului Teodor Lupașcu (enotanina hidrosolubilă obținută din semințe de viță-de-vie).

Rezultatele sunt prezentate în tabelul 2.

Tabelul 2. Activitatea antimicrobiană a compușilor de origine naturală față de microorganismele de referință (mg/ml)

Tulpina	BioR		ES		Enotanina solubilă	
	CMI	CMB/CMF	CMI	CMB/CMF	CMI	CMB/CMF
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	0,625	1,25	2,5	5,0	3,0	6,0
<i>Bacillus cereus</i> ГИСК 8035	0,625	1,25	5,0	5,0	0,7	3,0
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	0,625	1,25	2,5	5,0	3,0	6,0
<i>Salmonella enterica</i> ГИСК 03/03y	1,25	2,50	2,5	5,0	6,0	12,0
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2,5	5,0	5,0	10,0	6,0	25,0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	5,0	5,0	5,0	5,0	3,0	6,0
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	0,625	1,25	1,25	2,5	3,0	6,0

CMI și CMB/CMF obținute sunt mai mari, comparativ cu cele descrise în compartimentele anterioare. Cele mai mici valori ale CMI au fost obținute pentru preparatul BioR față de tulpinile *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* ГИСК 8035, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Candida albicans* ATCC 10231. Cea mai înaltă activitate antimicrobiană compusul ES din spirulină îl manifestă față de tulpina *Candida albicans* ATCC 10231, cu CMI de 1,25 mg/ml și CMF de 2,5 mg/ml. Enotanina hidrosolubilă manifestă cea mai înaltă activitate antibacteriană față de *Bacillus cereus*, CMI fiind de 0,7 mg/ml, iar CMB – de 3,0 mg/ml.

Compușii tiosemicarbazonați ai Cu(II), Co(III) și Ni(II) cercetați în cadrul acestui studiu manifestă activitate antimicrobiană față de bacterii Gram+ , Gram- și față de *Candida albicans*.

În majoritatea cazurilor investigate, activitatea antimicrobiană a liganzilor este semnificativ mai joasă comparativ cu activitatea compușilor coordinativi ai acestora cu metalele Cu(II), Co(III) și Ni(II). Cele mai performante rezultate au fost obținute pentru două tipuri de compuși studiați: compușii ce conțin N-(2,4-dimetilfenil)-2-(2-hidroxibenziliden)-hidrazincarbotoamidă și 2-(2-hidroxi-3-nitrobenziliden)-N-(prop-2-en-1-il)hidrazincarbotoamidă. Activitatea majorității dintre compușii studiați este specifică cu referire la tipul de microorganisme și tulpinile testate. Astfel, majoritatea compușilor au manifestat efecte antimicrobiene de diferită intensitate față de bacteriile Gram+, în lipsa acestora față de bacteriile Gram- și *Candida albicans*. Compusul metil N'-[(2-hidroxi-naftalen-1-il)metiliden]-N-prop-2-en-1-ilcarbamo hidra-zonotioat are un efect antifungic performant față de tulpina *Candida albicans* ATCC 10231 cu valori ale CMI și CMF la 0,7 μg/ml, fiind un candidat excelent pentru testări ulterioare.

Compusul cloro[N-(3,4-dimetilfenil)-2-[1-(2-etiliden)-hidrazincarbotoamido(1-)]-nichel (II) se caracterizează prin activitate antimicrobiană universală în raport cu tulpinile de microorganisme testate în cadrul acestui studiu. Astfel, concentrațiile compusului cu efecte asupra tulpinilor *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* ГИСК 8035, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Candida albicans* ATCC 10231 sunt de până la 1,5 μg/ml.

O activitate antimicrobiană cu caracter universal a manifestat cloro(2-(2-hidroxi-3-nitrobenzyliden)-N-(prop-2-en-1-il)hidrazincarbotoamido)cupru, cu efecte performante față de *Bacillus cereus* ГИСК 8035, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella enterica* ГИСК 03/03y și *Candida albicans* ATCC 10231 la concentrații de până la 15 μg/ml.

Au fost realizate diferite combinații între compușii chimici și cei naturali. Unele cercetări anterioare au demonstrat, că această tactică poate da efecte de amplificare a efectelor antimicrobiene și diminuarea efectelor adverse ale substanțelor chimice. Pornind de la faptul, că preparatele de origine naturală sunt suplimentate la compozițiile antibacteriene în scopul diminuării efectelor toxice asupra celulelor care nu prezintă ținte directe ale substanței de bază, este important, ca acestea să nu diminueze sau să compromită efectul antimicrobian. Iată de ce în continuare am testat efectele antimicrobiene ale combinațiilor dintre compușii chimici evidențiați în etapele de screening și compușii de

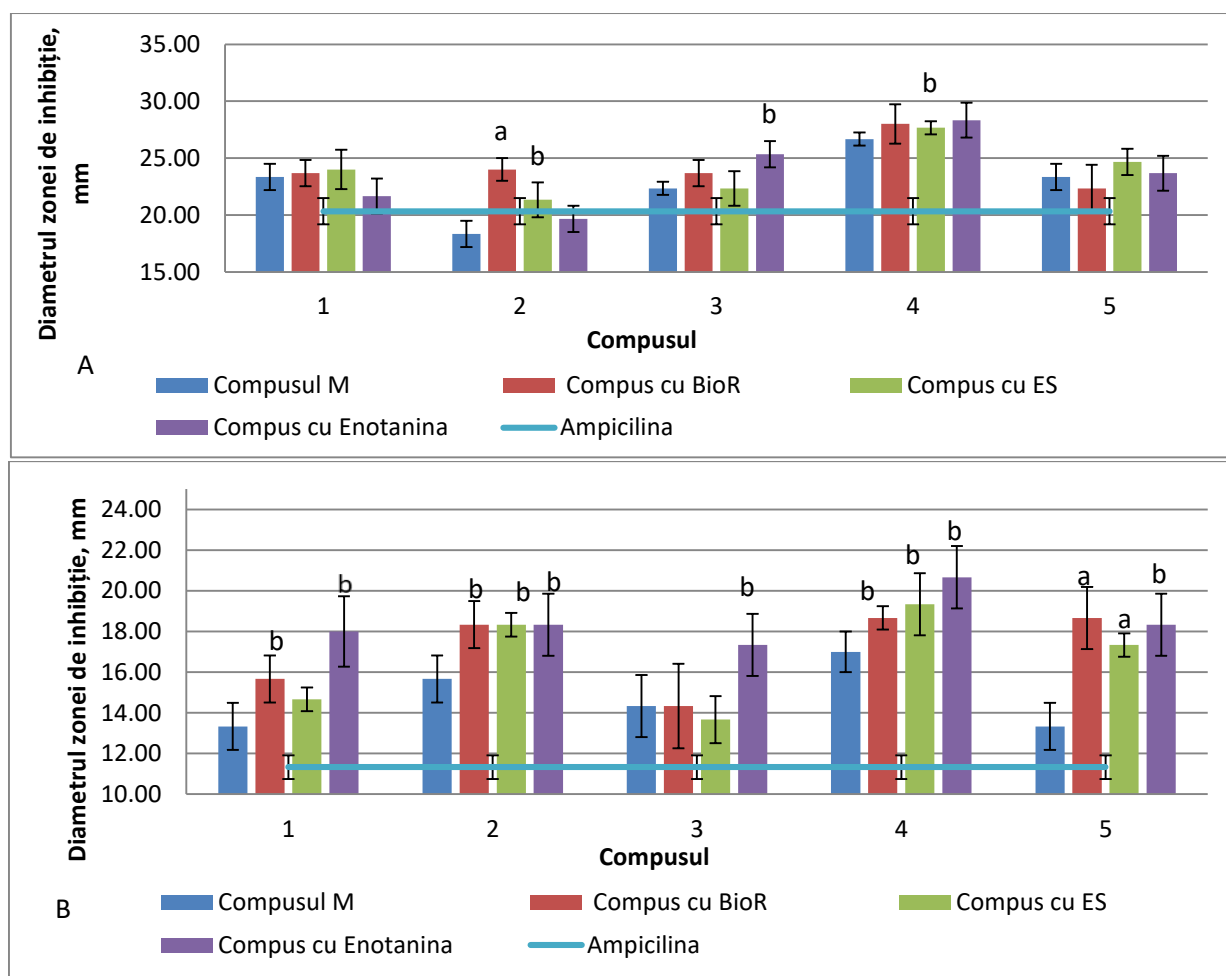


Figura 1. Activitatea antimicrobiană a compușilor activi față de tulpinile *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (A) și *Escherichia coli* ATCC 259223 (B) în combinație cu compușii de origine naturală: 1-5 – compuși conform tabelului 1; (^a- $p < 0,005$ pentru diferență față de Compusul M; ^b- $p < 0,05$ pentru diferență față de Compusul M;)

origine naturală. Pentru fiecare tulpină microbiană s-au aplicat concentrațiile minime de inhibiție, determinate la etapele anterioare, atât pentru compușii chimici, cât și pentru preparatele de origine naturală. Pentru comparare a fost luat antibioticul cu spectru larg de acțiune ampicilina, în concentrație de 15 $\mu\text{g/ml}$. Mai jos sunt rezultatele obținute în cazul *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 și *Escherichia coli* ATCC 259223 (figura 1).

Rezultatele obținute pentru activitatea antifungică a combinațiilor dintre compușii selectați chimic, preparate din spirulină și enotanină solubilă față de tulpina *Candida albicans* ATCC 10231 sunt prezentate în figura 2. În calitate de substanță de referință a fost luată nistatina în cantitate de 30 $\mu\text{g/ml}$. Majoritatea compușilor chimici noi selectați la etapa de screening pentru activitate antimicrobiană pronunțată formează compoziții active cu extracte din spirulină și cu enotanina hidrosolubilă, iar efectul antibacterian și antifungic al amestecurilor este mai pronunțat, comparativ cu cel al compusului respectiv aplicat individual. Ținând cont de faptul, că preparatele de origine naturală au de cele mai multe ori și efecte benefice asupra celulelor, care nu prezintă ținte directe ale compușilor chimici,

efectele *in vivo* ale acestor combinații pot fi mult mai valoroase, decât doar acțiunea antimicrobiană, iar aceasta poate constitui obiectul unor studii de perspectivă.

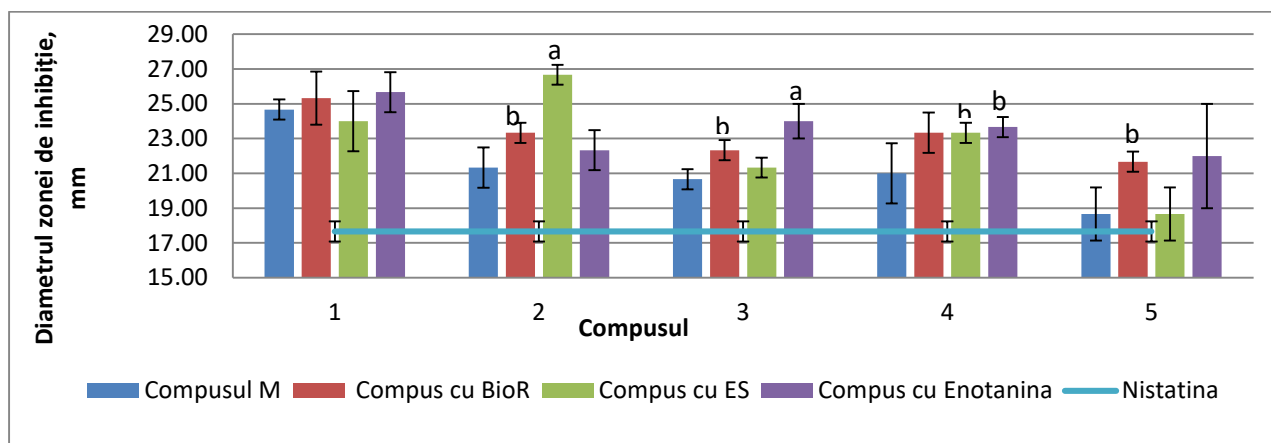


Figura 2. Activitatea antimicrobiană a compușilor activi față de tulpina *Candida albicans* ATCC 10231 în combinație cu compușii de origine naturală: 1-5 – compuși conform tabelului 1; (^a- $p < 0,005$ pentru diferență față de Compusul M; ^b- $p < 0,05$ pentru diferență față de Compusul M)

Activitatea antimicrobiană a compușilor chimici noi poate fi amplificată prin elaborarea de combinații între aceștia și preparatele de origine naturală – extracte din biomasa de spirulină și enotanină hidrosolubilă.

4. MECANISMELE POSIBILE DE ACȚIUNE A NOILOR COMPUȘI ASUPRA MICROORGANISMELOR PATOGENE

Tiosemicarbazonele și complexele lor metalice sunt deja recunoscute pentru diverse activități biologice, fiind considerate în calitate de potențiale remedii în diferite patologii, de la infecții microbiene până la proliferarea celulară anormală. Activitatea antiproliferativă a acestor substanțe este studiată mai intens și se cunosc mai multe despre mecanismele de acțiune în acest sens. Astfel, s-a stabilit că tiosemicarbazonele interacționează cu guanina din componența ADN formând legături de hidrogen, ceea ce determină fragmentarea ADN-ului și în final -apoptoza celulelor canceroase [5]. Se poate presupune că unele dintre mecanismele cunoscute de acțiune ale tiosemicarbazonelor și complexelor lor metalice asupra celulelor tumorale ar putea fi, de asemenea, responsabile pentru eficacitatea antimicrobiană [7]. În același timp pot fi evidențiate și alte mecanisme, ceea ce indică asupra necesității unor studii profunde în acest domeniu.

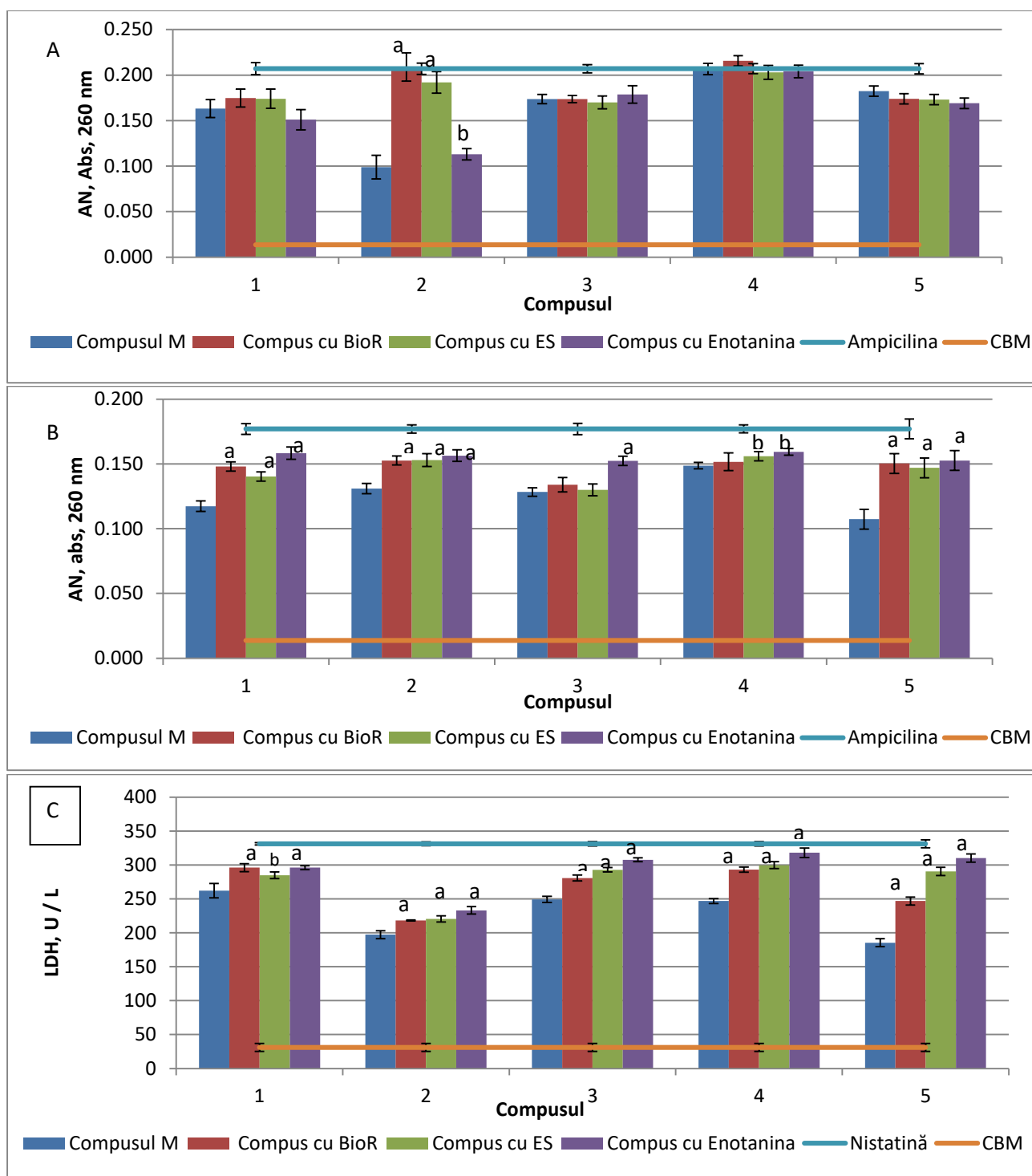


Figura 3. Eliberarea acizilor nucleici (AN) la *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (A), *Escherichia coli* ATCC 259223 (B) și lactatdehidrogenazei (LDH) la *Candida albicans* ATCC 10231 (C) sub influența combinațiilor de compuși: 1-5 – compuși conform tabelului 1; CBM – control biomasă netratată; (^a- $p < 0,0005$ pentru diferență față de Compusul M; ^b- $p < 0,05$ pentru diferență față de Compusul M;)

Învelișurile celulare (membrana citoplasmatică, peretele celular și capsula) prezintă prima barieră de care se lovesc factorii antimicrobieni. Marcheri ai degradării membranelor pot servi substanțele, care de regulă, nu sunt eliberate în mediul ambiant de către celulele vii. În acest studiu a fost cercetat procesul de eliberare a acizilor nucleici de către culturile bacteriene și de eliberare a

lactatdehidrogenazei de către celulele fungice sub acțiunea compușilor chimici noi aplicați individual, dar și în combinație cu substanțele de origine naturală (extractele din spirulină și enotanina hidrosolubilă). Acțiunea compușilor și a combinațiilor a fost comparată cu acțiunea ampicilinei în cazul bacteriilor și a nistatinei în cazul fungilor levuriformi. Mai jos, în figura 3 sunt prezentate rezultatele obținute în cazul tulpinilor *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 259223 și *Candida albicans* ATCC 10231.

Rezultatele obținute arată, că unul dintre mecanismele de acțiune a compușilor chimici testați este dereglarea permeabilității membranelor celulare, care duce la eliberarea conținutului celular în mediul extracelular și ca urmare, moartea celulelor. Compușii naturali nu au efecte foarte pronunțate asupra membranelor, în schimb acestea pot genera un efect mai pronunțat fiind aplicați împreună cu compușii chimici. În cazul bacteriilor Gram- și al tulpinii *Candida albicans* ATCC 10231 cel mai pronunțat efect sinergic se observă în cazul combinării compușilor chimici cu enotanina hidrosolubilă, iar în cazul bacteriilor Gram+ în calitate de potențatori ai efectului de permeabilizare a membranelor pot fi considerate preparatele pe bază de spirulină.

Un alt mecanism de acțiune a compușilor antimicrobieni este generarea speciilor reactive ale oxigenului (SRO) și crearea stării de stres oxidativ. Pentru evaluarea nivelului de stres oxidativ a fost aplicat testul cu tetrazolium nitroblue (NBT). În cazul când în celule este o stare de echilibru între formarea și eliminarea SRO, valorile testului NBT sunt neglijabile, în timp ce în cazul stresului oxidativ aceste valori sunt foarte ridicate. Etapa de cercetare descrisă în continuare constă în monitorizarea eliminării SRO de către culturile microbiene sub influența compușilor chimici aplicați individual și în combinație cu compușii de origine naturală. Rezultatele obținute pentru tulpinile *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 259223 și *Candida albicans* ATCC 10231 sunt prezentate în figura 4.

Efectul antimicrobian al compușilor chimici noi este asociat cu generarea excesivă a speciilor reactive ale oxigenului, care provoacă starea de stres oxidativ. În toate variantele experimentale nivelul SRO depășește semnificativ nivelul lor în cultura netratată, fiind comparabil sau chiar mai mare față de nivelul de SRO indus de substanțele antimicrobiene de referință. Nivelul de SRO este mult mai înalt la tulpinile de bacterii Gram- și la *Candida albicans* comparativ cu bacteriile Gram+. Enotanina solubilă aplicată de una singură are efecte de iducere a procesului de generare excesivă a SRO, în special la bacteriile Gram- și la *Candida albicans*. La fel, *Candida albicans* răspunde prin creșterea semnificativă a SRO în prezența preparatului BioR și a extractului din spirulină. Are un efect sinergic față de compușii chimici în ceea ce privește producerea de SRO în combinație cu majoritatea compușilor testați și la toate tulpinile microbiene cercetate, cu o amplitudine mult mai înaltă în cazul bacteriilor Gram- și a tulpinii fungice *Candida albicans*. Preparatul BioR și extractul din biomasa de spirulină de asemenea au acțiune

sinergică în ceea ce ține de producerea de SRO de către *Candida albicans* ATCC 10231 la combinare cu compușii chimici selectați pentru activitatea lor antifungică.

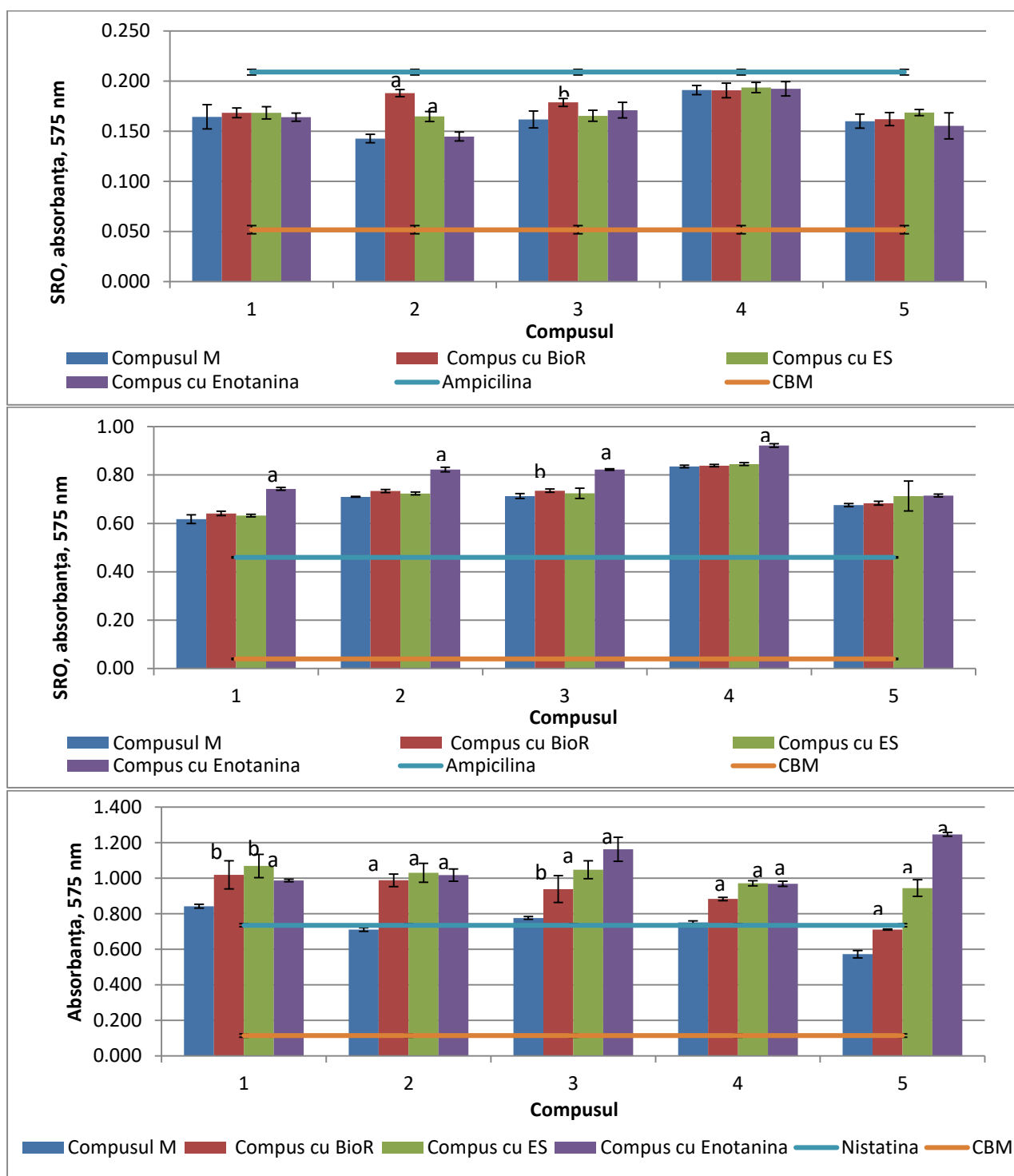


Figura 4. Eliberarea SRO. Efectul compușilor chimici activi asupra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 259223 și *Candida albicans* ATCC 10231 în combinație cu compușii de origine naturală: 1-5 – compuși conform tabelului 1; CBM – control biomasă netratată; (^a- $p < 0,0005$ pentru diferență față de Compusul M; ^b- $p < 0,05$ pentru diferență față de Compusul M)

Stresul oxidativ este cauza degradării oxidative a lipidelor, inclusiv a celor membranare. Ca rezultat, se modifică structura și permeabilitatea acestora, astfel, că scurgerea componentelor celulare în mediul extracelular poate avea la bază formarea excesivă a speciilor reactive ale oxigenului. Analiza corelațională a întregului masiv de date experimentale, care a fost acumulat, pentru toate cele 5 tulpini microbiene au fost identificate corelări puternice și foarte puternice între rezultatele celor două teste analizate, astfel că putem vorbi despre faptul, că producerea excesivă de specii reactive de oxigen într-adevăr una din cauzele determinante ale scurgerilor de conținut intracelular în spațiul extracelular, sau cel puțin, că aceste două evenimente (producerea de SRO și eliberarea de conținut) au paterne foarte asemănătoare de modificare în condițiile acțiunii factorilor cu potențial toxic mai mult sau mai puțin pronunțat. Cel mai semnificativ nivel de corelare între rezultatele testului SRO și de eliberare a conținutului intracelular a fost în cazul tulpinii

Bacillus cereus ГИСК 8035 ($r=0.930$), urmat de *Escherichia coli* ATCC 259223 (0.898), *Candida albicans* ATCC 10231($r=0.883$) și *Salmonella enterica* ГИСК 03/03y ($r=0.878$). În cazul tulpinii *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 valoarea coeficientului Pearson este de 0.727.

În același timp observăm o grupare a rezultatelor pe clustere, ceea ce ne-a determinat să analizăm grupurile de substanțe separat. Astfel, au fost analizate rezultatele obținute pentru cele două teste în cazul aplicării compușilor chimici; compușilor chimici în combinație cu preparatul BioR; compușilor chimici în combinație cu extractul de spirulină; compușilor chimici în combinație cu enotanina hidrosolubilă. Figura 5 demonstrează rezultatele obținute pentru tulpina *Candida albicans* ATCC 10231. Rezultatele obținute arată, că numai în cazul tratării culturii de fungi levuriformi cu compuși chimici aplicați individual, se observă o corelare puternică dintre cantitatea de specii reactive ale oxigenului formate și eliberarea lactatdehidrogenazei intracelulare ($r=0.894$). Astfel, stresul oxidativ generat de substanțele chimice este cauza determinantă a permeabilității anormale a membranei celulare sau chiar a deteriorării fizice a acesteia.

Situația este complet diferită în cazul aplicării compușilor chimici în combinație cu extractele din spirulină și enotanina hidrosolubilă. În cele trei grupuri de date selectate pentru analiză corelarea dintre cantitatea SRO și cantitatea de LDH eliberată nu a fost depistată. În același timp, este evident efectul antimicrobian al acestor combinații, care cel puțin nu este mai mic decât efectul compușilor chimici aplicați individual, iar în multe cazuri – îl depășește semnificativ pe acesta. De asemenea nu a fost identificată o corelare a rezultatelor acestor două teste în cazul aplicării compușilor de origine naturală, în acest caz relația fiind descrisă de formula $y = 488.27x - 71.926$, $R^2 = 0.2063$, iar $r=0.486$. Rezultatele obținute ne conduc spre ideea, că spre deosebire de compuși chimici, substanțele naturale și combinațiile lor cu compuși chimici își realizează efectul antimicrobian prin mai multe mecanisme. Rezultate asemănătoare au fost obținute și în cazul altor două dintre tulpinile studiate: *Escherichia coli* ATCC 259223, și *Staphylococcus aureus* ATCC

25923, în cazul căreia acțiunea compușilor chimici noi este asociată cu o corelare înaltă între producerea de SRO și eliberarea de acizi nucleici în mediul extracelular.

La 4 dintre cele 5 tulpini bacteriene, pierderea conținutului intracelular sub acțiunea compușilor chimici noi cu activitate antimicrobiană, este asociată cu producerea în exces a speciilor reactive ale oxigenului, iar în cazul uneia – sub acțiunea compușilor de origine naturală. În cazul combinațiilor dintre compușii chimici și cei naturali stresul oxidativ nu este unicul mecanism prin care are loc eliberarea conținutului celular în mediul extracelular.

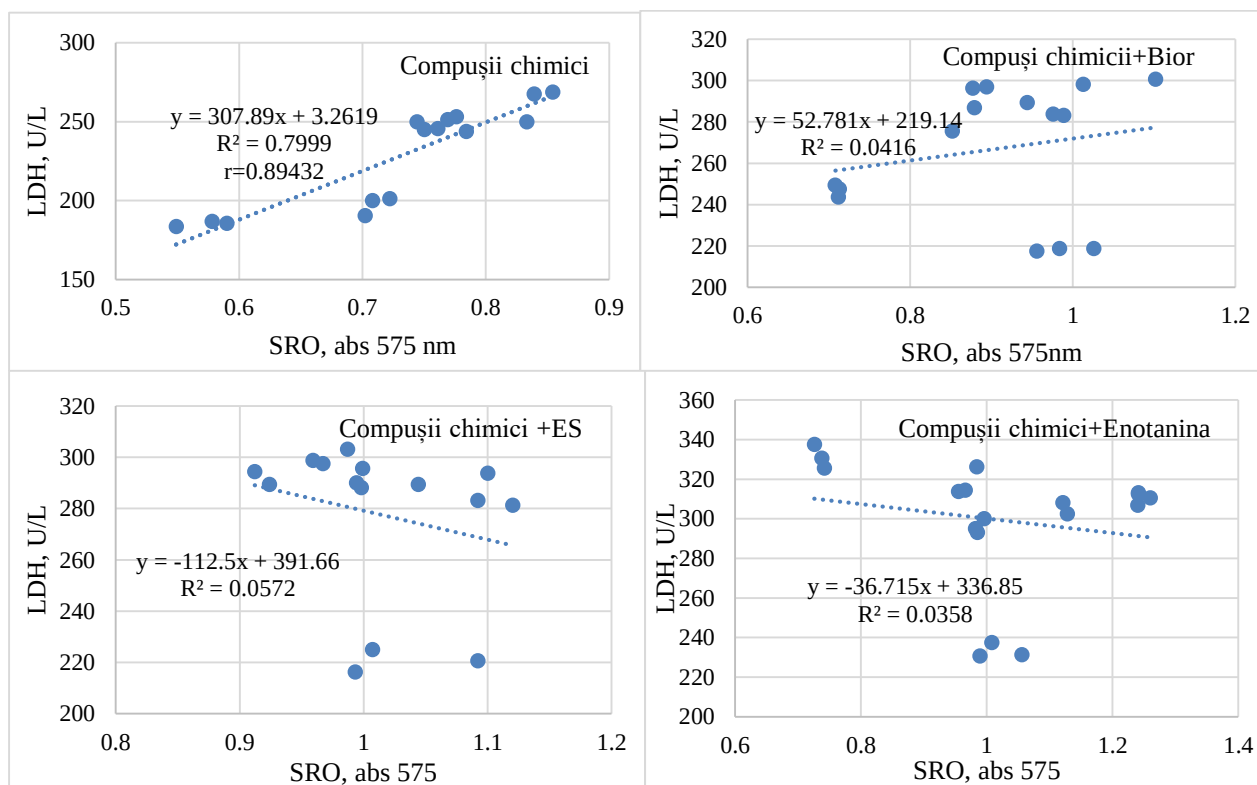


Figura 5. Corelarea dintre nivelul speciilor reactive ale oxigenului și cel de eliberare a lactatdehidrogenazei intracelulare la *Candida albicans* ATCC 10231 sub acțiunea compușilor chimici aplicați individual versus aplicați în combinație cu compușii de origine naturală

Este evident, că speciile reactive ale oxigenului sunt prezente într-o cantitate importantă în biomasa microbiană tratată cu substanțe chimice și cu combinațiile acestora cu substanțele de origine naturală. Pentru anihilarea acestora celulele bacteriene sunt înzestrate cu mecanisme de protecție, prima linie fiind constituită de enzimele antioxidante primare – superoxidismutaza și catalaza [212]. Efectele pozitive ale superoxidismutazei și catalazei în protecția patogenilor contra mecanismelor de protecție ale gazdei au fost observate de mai mulți cercetători [36, 50].

Astfel, în continuarea cercetării a fost studiat efectul compușilor chimici selectați pentru activitatea lor pronunțată asupra celor două tulpini - *Staphylococcus aureus* ATCC 25922 și *Escherichia coli* ATCC 25923, precum și a compușilor de origine naturală și a combinațiilor dintre ei asupra activității a două enzime cheie ale protecției antioxidante – SOD și CAT. Compușii de

origine naturală testați de noi au modificat activitatea acestor enzime în direcția inhibării sau nu au produs modificări semnificative.

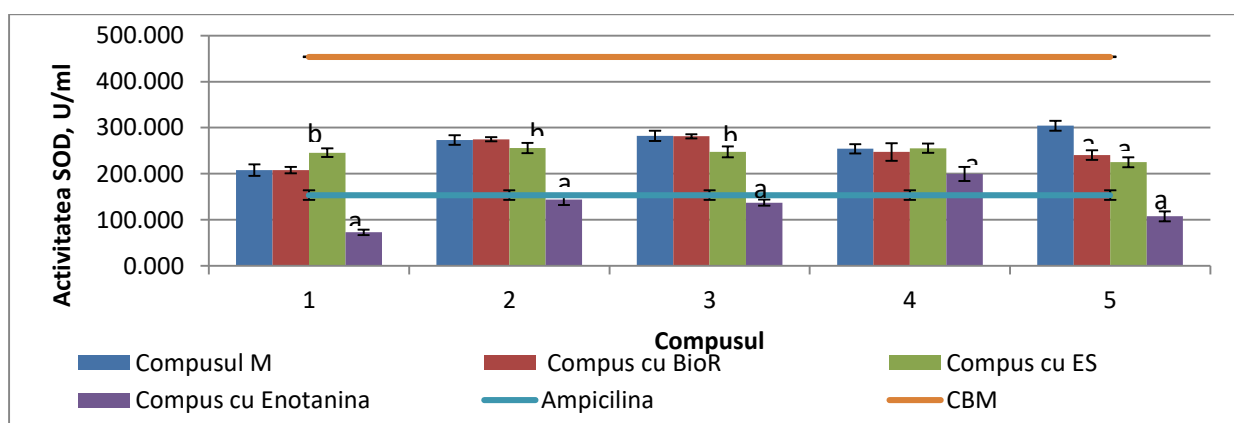
Rezultatele sunt prezentate în tabelul 3.

Efectul compușilor chimici noi aplicați individual și în combinație cu compușii de origine naturală asupra activității superoxidismutazei la *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 și *Escherichia coli* ATCC 259223 este prezentat în figura 6.

Compușii chimici produc o reducere semnificativă, cu 32-54%, la *S.aureus* și cu 27-95% la *E.coli* a activității SOD față de martor. În același timp, efectul realizat de antibioticul de referință a rămas mai pronunțat. În cazul acestuia reducerea activității SOD a fost cu 65% față de martor la *S.aureus* și 96% la *E.coli*. Cel mai pronunțat efect sinergic l-a avut combinația dintre compușii chimici cu enotanina hidrosolubilă.

Tabelul 3. Efectul compușilor de origine naturală asupra activității enzimelor antioxidante la *Staphylococcus aureus* ATCC 25922 și *Escherichia coli* ATCC 25923

Tulpina	Compusul de origine naturală	Concentrația, mg/ml	Activitatea enzimatică, U/ml	
			SOD	CAT
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25922	Preparatul BioR	0,626	428,555±8,712	10,099±0,149
	Extractul din spirulină	2,500	395,539±9,947	10,098±0,108
	Enotanina hidrosolubilă	3,000	303,992±17,358	5,489±0,096
	Martor	-	453,74±6,556	10,466±0,163
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25923	Preparatul BioR	0,626	44,283±1,586	8,295±0,080
	Extractul din spirulină	2,500	47,652±2,656	8,677±0,161
	Enotanina hidrosolubilă	3,000	23,360±2,316	4,924±0,058
	Martor	-	46,675±2,504	8,402±0,184



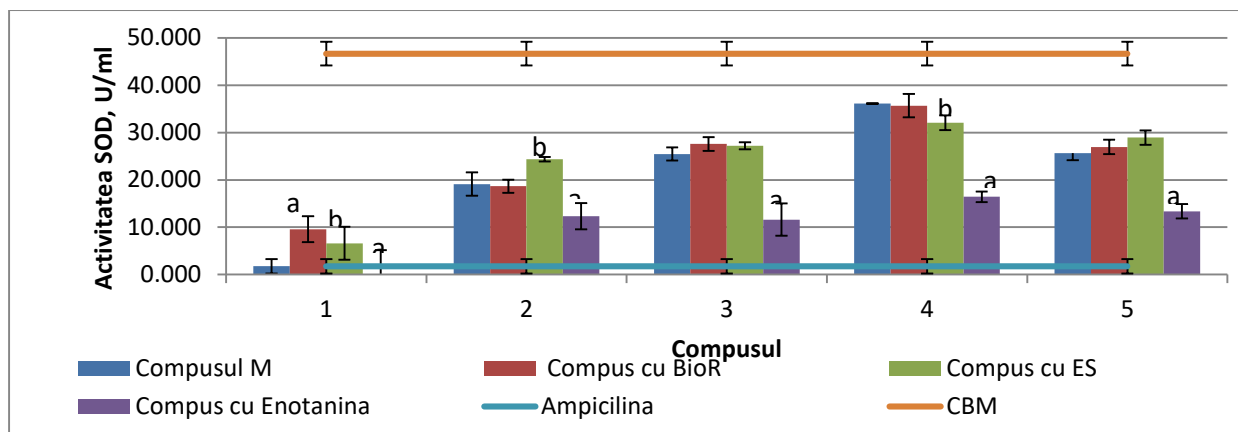


Figura 6. Activitatea supeoxidismutazei la *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 și *Escherichia coli* ATCC 259223 sub influența compușilor noi în combinație cu compușii de origine naturală: 1. 1-5 – compuși conform tabelului 1; CBM – control biomasă netratată; (^a- $p < 0,0005$ pentru diferență față de Compusul M; ^b- $p < 0,05$ pentru diferență față de Compusul M)

Compușii chimici s-au dovedit a fi mult mai eficienți în ceea ce ține de inhibarea activității catalazei. Cu excepția hidratului de cloro(2-(2-hidroxibenzil iden)-*N*-(prop-2-en-1-il)hidrazin-carbotioamido)cupru, toți ceilalți compuși aplicați individual au dus la diminuarea activității CAT până la un nivel mai jos decât cel indus de ampicilină. Combinarea compușilor chimici cu cei naturali duc la manifestarea efectelor diverse – de la diminuarea efectului de inhibiție, până la amplificarea semnificativă a acestuia. Ca și în cazurile analizate anterior, enotanina hidrosolubilă s-a dovedit a fi cel mai eficient compus sinergist pentru compușii chimici în inhibarea activității CAT.

Astfel, în cercetările descrise mai sus a fost evidențiat un compus chimic - cloro[*N*-(3,4-dimetilfenil)-2-[1-(2-etiliden)-hidrazincarbotioamido(1-)]-nichel (II), și unul natural – enotanina hidrosolubilă, care atât individual, cât și în combinație dau efecte performante în ceea ce privește inhibarea activității enzimelor antioxidante la *Staphylococcus aureus* și *Escherichia coli*. În cazul combinației acestor doi compuși se obține o inhibare completă a activității catalazei și o reducere de până la 10 ori a activității SOD. În aceste condiții ne-am fixat drept scop identificarea posibilității de a aplica concentrații mai mici ale compușilor respectivi cu efecte inhibitoare înalte asupra sistemului de protecție antioxidantă a bacteriilor.

Pentru aceasta au fost aplicate concentrații mai mici și egale cu concentrația minimă de inhibiție pentru enotanină: 0,75 mg/ml; 1,50 mg/ml și 3 mg/ml, astfel, ca culturile microbiene să rămână viabile pe durata acțiunii compusului antimicrobian. A fost monitorizată activitatea endoenzimelor și enzimelor extracelulare. Ambele culturi microbiene se caracterizează prin activitate pronunțată a enzimelor antioxidante catalaza și superoxidismutaza în mediul extracelular. La *S.aureus* de asemenea se mai atestă și o activitate proteolitică. Aceasta din urmă scade semnificativ (cu peste 45% față de martor) la toate concentrațiile de enotanină aplicate. Diferență semnificativă între variantele cu diferite concentrații nu au fost depistate. Activitatea exoenzimelor antioxidante (SOD și CAT) scade la *Staphylococcus aureus* ATCC 25922. Această

scădere este doză-dependentă și este mai pronunțată la concentrațiile de 1,5 și 3,0 mg/ml compus antibacterian. În cazul tulpinii *Escherichia coli* ATCC 25923 rezultatele obținute diferă. Astfel, la adăugarea enotaninei se atestă o creștere semnificativă a activității catalazei (la concentrația de 0,75 mg/ml) și a superoxid dismutazei (la concentrația de 1,50 mg/ml). În schimb concentrația de 3 mg/ml, care a fost stabilită ca fiind minim inhibitoare, duce la o scădere pronunțată a activității superoxid dismutazei și de aproape 2 ori a catalazei.

Activitatea enzimelor antioxidante intracelulare de asemenea se modifică la interacțiunea culturilor microbiene cu enotanina hidrosolubilă. Concentrațiile mai joase decât cea minim inhibitoare duc la creștere semnificativă a activității catalazei și superoxid dismutazei intracelulare, în timp ce concentrația înaltă de enotantină (3,0 mg/ml) a provocat o scădere pronunțată a activității enzimelor antioxidante în interiorul celulelor bacteriene.

Cercetările realizate anterior au permis evidențierea unui compus chimic nou - cloro[N-(3,4-dimetilfenil)-2-[1-(2-etiliden)-hidrazincarbotoamido(1-)]-nichel (II) - cu efect antimicrobian pronunțat asupra tulpinilor *Staphylococcus aureus* ATCC®25922 și *Escherichia coli* ATCC®25923™. CMI pentru ambele tulpini a fost de 1,5 μg/ml. În exeperința ulterioară au fost testate concentrațiile mai joase, și anume cele de 0,4; 0,8 și 1,3 μg/ml ale acestui compus asupra celor două tulpini de microorganisme. Rezultatele sunt prezentate în tabelul 4.

Tabelul 4. Activitatea enzimatică la *Staphylococcus aureus* ATCC 25922 și *Escherichia coli* ATCC 25923 la interacțiunea culturii cu concentrații subinhibitorii ale $C_{17}H_{18}ClN_3NiOS$ și enotaninei hidrosolubile

Tulpina	Concen- trația,	Activitatea enzimelor extracelulare, %M		Activitatea enzimelor intracelulare, %M	
		SOD	CAT	SOD	CAT
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25922	$C_{17}H_{18}ClN_3NiOS$ μg/ml				
	0,4	31,4±5,1	7,5±0,9	54,9±5,4	60,5±4,8
	0,8	26,5±0,8	5,8±0,07	39,3±0,8	58,2±3,4
	1,3	3,5±1,7	3,3±1,2	21,5±1,6	45,8±5,3
	Enotantină hidrosolubilă, mg/ml + $C_{17}H_{18}ClN_3NiOS$, μg/ml				
	1,50 + 0,8	0	0	14,7±2,3	13,3±0,7
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25923	$C_{17}H_{18}ClN_3NiOS$ μg/ml				
	0,4	52,6±3,6	0	62,5±2,4	27,3±0,6
	0,8	27,2±3,3	0	44,2±3,2	7,9±1,1
	1,3	0	0	3,3±1,8	3,7±1,7
	Enotantină hidrosolubilă, mg/ml + $C_{17}H_{18}ClN_3NiOS$, μg/ml				
	1,50 + 0,8	0	0	0	0

Efectul compusului testat asupra activității exoenzimelor eliberate și a acelor endocelulare la *Staphylococcus aureus* ATCC®25922™ a fost puternic bactericid în toate variantele experienței și mai pronunțat decât în cazul endoenzimelor. Acelaș patern de acțiune se observă și în cazul tulpinii *Escherichia coli* ATCC 25923. Un efect inhibitor semnificativ asupra enzimelor antioxidante la tulpinile *Staphylococcus aureus* ATCC 25922 și *Escherichia coli* ATCC 25923 poate fi obținut și în

cazul aplicării concentrațiilor $\frac{1}{2}$ CMI de cloro[N-(3,4-dimetilfenil)-2-[1-(2-etiliden)-hidrazin carbotioamido(1-)]-nichel (II) în combinație cu $\frac{1}{2}$ CMI enotanină hidrosolubilă.

CONCLUZII GENERALE ȘI RECOMANDĂRI

Aspectele elucidate pe parcursul realizării tezei de doctorat pot fi exprimate prin următoarele concluzii:

1. Compușii tiosemicarbazonați ai Cu(II), Co(III) și Ni(II) manifestă activitate antimicrobiană specifică cu referire la poziția sistematică a microorganismelor testate. Astfel, majoritatea compușilor au manifestat efecte antimicrobiene de diferită intensitate față de bacteriile Gram(+), Gram(-) și *Candida albicans*.
2. Activitatea antimicrobiană a compușilor chimici noi este amplificată prin elaborarea de combinații între aceștia și preparatele de origine naturală – extracte din biomasa de spirulină și enotanină hidrosolubilă.
3. Unul dintre mecanismele de acțiune a compușilor chimici testați este dereglarea permeabilității membranelor celulare, care duce la eliberarea conținutului celular și ca urmare, moartea celulelor. Compușii naturali generează un efect sinergic pronunțat fiind aplicați împreună cu compușii chimici. În cazul bacteriilor Gram(-) și al tulpinii *Candida albicans* ATCC 10231 cel mai pronunțat efect sinergic se observă în cazul combinării compușilor chimici cu enotanina hidrosolubilă, iar în cazul bacteriilor Gram(+) în calitate de potențatori ai efectului de permeabilizare a membranelor pot fi considerate preparatele pe bază de spirulină.
4. Efectul antimicrobian al compușilor chimici noi este asociat cu generarea excesivă a speciilor reactive ale oxigenului, care provoacă starea de stres oxidativ. Nivelul de SRO este mult mai înalt la tulpinile de bacterii Gram(-) și la *Candida albicans* comparativ cu bacteriile Gram(+).
5. Enotanina are un efect sinergic față de compușii chimici în ceea ce privește producerea de SRO în combinație cu majoritatea compușilor testați și la toate tulpinile microbiene cercetate, cu o amplitudine mult mai înaltă în cazul bacteriilor Gram(-) și a tulpinii fungice *Candida albicans*. Preparatul Bior și extractul din biomasa de spirulină de asemenea au acțiune sinergică în ceea ce ține de producerea de SRO de către *Candida albicans* ATCC 10231 la combinație cu compușii chimici selectați pentru activitatea lor antifungică
6. Concentrațiile minime de inhibiție ale compușilor chimici noi au efecte inhibitorii pronunțate asupra activității enzimelor antioxidante la tulpinile *Staphylococcus aureus* ATCC 25922 și *Escherichia coli* ATCC 25923. Dintre compușii naturali efecte pronunțate asupra activității enzimatică o are enotanina hidrosolubilă, care poate fi considerată un

compus sinergist efficient, care potențează efectul antibacterian al compușilor chimici. În dependență de compușii cu care sunt combinate, preparatele din spirulina (BioR și ES) sunt capabile atât să sporească, cât și să diminueze efectul antibacterian al compușilor chimici.

Problema științifică importantă soluționată în lucrare constă în elucidarea efectelor antimicrobiene a unor noi substanțe chimice, compuși naturali noi și combinații dintre acestea asupra tulpinilor de microorganisme patogene, ceea ce a contribuit la evidențierea țintelor de acțiune a substanțelor și combinațiilor noi, fapt ce a permis confirmarea caracterului polifuncțional al acestora.

Aportul personal. Planificarea experiențelor, selectarea grupurilor de substanțe pentru includerea lor în screening, experiențele au fost realizate de autoare. Analiza rezultatelor, generalizările și concluziile aparțin autoarei. În publicații autoarei îi revine cota-parte în corespundere cu lista autorilor.

Recomandări practice

1. Se recomandă combinația compușilor selectați cu enotanina în scopul obținerii unor efecte antimicrobiene amplificate pentru testări pe tulpini clinice.
2. Se recomandă compuși biologic activi cu activitate antimicrobiană pronunțată în calitate de substanțe cu efecte antibacteriene față de tulpinile de referință și se propune continuarea cercetărilor clinice privind elaborarea produselor antimicrobiene combinate de sinteză și naturiste.
3. Pentru a asigura inofensivitatea compușilor testați sunt necesare studii ca continuitate a prezentei lucrării în vederea determinării proprietăților farmacologice *in vivo* și potențialul acestora de a fi utilizați ca agenți antimicrobieni.
4. Metodele aplicate și rezultatele obținute în prezentul studiu pot fi utilizate în procesul de instruire universitară și postuniversitară la disciplinele microbiologie clinică și laboratorul microbiologic.

Sugestii privind cercetări de perspectivă

1. Realizarea testelor biomedicale în scopul validării efectelor compușilor și combinațiilor identificate *in vivo*.
2. Realizarea cercetărilor genetico-moleculare în vederea evidențierii efectului compușilor și combinațiilor evidențiate asupra expresiei unor gene la tulpinile testate în scopul identificării țintelor noi asupra cărora acționează acestea.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. ASLAM, B., WANG, W., ARSHAD, M. I., KHURSHID, M., MUZAMMIL, S., RASOOL, M. H., NISAR, M. A., ALVI, R. F., ASLAM, M. A., QAMAR, M. U., SALAMAT, M. K. F., & BALOCH, Z. Antibiotic resistance: A rundown of a global crisis. *Infection and Drug Resistance*, 2018, 11, 1645–1658. <https://doi.org/10.2147/IDR.S173867>. ISSN 1178-6973
2. Center for Disease Dynamics Economics & Policy. The State of the world's antibiotics 2015. *Centre for Disease Dynamics, Economics & Policy, CDDEP: Washington, D.C*, 2015, 1–84. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(13\)70318-9](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(13)70318-9)
3. DAVIES, J., & DAVIES, D. Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2010, 74(3), 417–433. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00016-10>. ISSN 1092-2172, 1098-5557
4. FREI, A., ZUEGG, J., ELLIOTT, A. G., BAKER, M., BRAESE, S., BROWN, C., CHEN, F., G. DOWSON, C., DUJARDIN, G., JUNG, N., KING, A. P., MANSOUR, A. M., MASSI, M., MOAT, J., MOHAMED, H. A., RENFREW, A. K., RUTLEDGE, P. J., SADLER, P. J., TODD, M. H., BLASKOVICH, M. A. T.. Metal complexes as a promising source for new antibiotics. *Chemical Science*, 2020, 11(10), 2627–2639. <https://doi.org/10.1039/C9SC06460E>. ISSN 2041-6520, 2041-6539.
5. GARBUZ, O. *New inorganic and organic molecular inhibitors of cancer cells proliferation, the mechanisms of action* [Doctoral]. State University of Moldova. 2021, 175 p.
6. LUYT, C.-E., BRECHOT, N., TROUILLET, J.-L., & CHASTRE, J. Antibiotic stewardship in the intensive care unit. *Critical Care (London, England)*, 2014, 18(5), 480. <https://doi.org/10.1186/s13054-014-0480-6>. ISSN 1364-8535.
7. NAMIECIŃSKA, E., SOBIESIAK, M., MAŁECKA, M., GUGA, P., ROZALSKA, B., & BUDZISZ, E. Antimicrobial and Structural Properties of Metal Ions Complexes with Thiosemicarbazide Motif and Related Heterocyclic Compounds. *Current Medicinal Chemistry*, 2019, 26(4), 664–693. <https://doi.org/10.2174/0929867325666180228164656>. ISSN 0929-8673.
8. RAHMAN, MD. M., RAHAMAN, MD. S., ISLAM, MD. R., HOSSAIN, MD. E., MANNAN MITHI, F., AHMED, M., SALDÍAS, M., AKKOL, E. K., & SOBARZO-SÁNCHEZ, E. Multifunctional Therapeutic Potential of Phytocomplexes and Natural Extracts for Antimicrobial Properties. *Antibiotics*, 2021, 10(9), 1076. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10091076> ISSN 2079-6382
9. ROSSOLINI, G. M., ARENA, F., PECILE, P., & POLLINI, S. Update on the antibiotic resistance crisis. *Current Opinion in Pharmacology*, 2014, 18, 56–60. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2014.09.006> ISSN 14714892
10. VENTOLA, C. L. The antibiotic resistance crisis: Part 1: Causes and threats. *P & T: A Peer-Reviewed Journal for Formulary Management* (2015), 40(4), 277–283. <https://doi.org/Article>. ISSN 1052-1372
11. VENTOLA, C. L. The antibiotic resistance crisis: Part 2: Management strategies and new agents. *P & T: A Peer-Reviewed Journal for Formulary Management*, 2015, 40(5), 344–352. ISSN 1052-1372

12. WINDELS, E. M., MICHELIS, J. E., VAN DEN BERGH, B., FAUVART, M., & MICHELIS, J. Antibiotics: Combatting Tolerance To Stop Resistance. *MBio*, 2019, 10(5), e02095-19. <https://doi.org/10.1128/mBio.02095-19>. ISSN 2150-7511

Publicațiile la tema tezei:

1.1. monografii colective (capitole în monografii)

- 1.1.1. **ZARICIUC, E.** ș.a. Studiul activității antibacteriene și antifungice a Enoxilului. În: *Produse vinicole secundare/In redacția acad. Gheorghe Duca*. Chișinău: *Știința*, 2011, pp. 178-184.

2. Articole în reviste științifice

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

- 2.1.1. GRAUR, V. et al. Synthesis and biological activity of nickel and copper coordination compounds of 5-nitrofuran-2-carbaldehyde n(4)-allyl-3-thiosemicarbazone. În: *Studia Universitatis Moldaviae. Seria "Științe reale și ale naturii"*. 2014, nr.6(76), pp.119-123. ISSN 1814-3237
- 2.1.2. RUDIC, V. ș.a. Inhibitorii proliferării bacteriei *Bacillus cereus* în baza compușilor coordinativi ai cuprului care conțin 4-feniltiosemicarbazona 2-formilpiridinei și sulfanilamide. În: *Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științele Vieții*. 2014, nr. 1(322), pp. 139-146. ISSN 1857-064X.
- 2.1.3. GRAUR, V. et al. Synthesis and biological activity of 2-formylpyridine n(4)-allyl-3-seleno-semicarbazone and its copper coordination compound. În: *Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științele Vieții*. 2015, nr. 3(327), pp. 135-142. ISSN 1857-064X.
- 2.1.4. **ZARICIUC, E.** Activitatea antimicrobiană *in vitro* a unor compuși autohtoni noi. În: *Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științele Vieții*. 2017, nr. 2(332), pp. 146-153. ISSN 1857-064X.
- 2.1.5. USATAIA, I. et al. Synthesis and biological activity of copper(II), nickel(II) and cobalt(III) coordination compounds with 2-benzoylpyridine N(4)-allyl-S-methylisothiosemicarbazone. În: *Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științele Vieții*. 2018, nr. 2(335), pp. 103-112. ISSN 1857-064X.
- 2.1.6. **ZARICIUC, E.** Influența unor compuși chimici noi asupra proceselor enzimactice la *Escherichia coli* și *Staphylococcus aureus*. În: *Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științele Vieții*. 2018, nr. 3(336), pp. 151-159. ISSN 1857-064X.
- 2.1.7. RUDIC, V., **ZARICIUC, E.** Acțiunea sinergică a enotaninului solubil și a compușilor tiosemicarbazonici asupra activității enzimelor antioxidante ale unor microorganisme. În: *Sănătate Publică, Economie și Management în Medicină*. 2019, nr. 2(80), pp. 61-65. ISSN 1729-8687.
- 2.1.8. LOZAN-TÎRȘU, C., **ZARICIUC, E.** Biochemical composition changes of gram-negative microorganisms under the action of new chemical compounds. În: *One Health and Risk Management*. 2021, nr. 2(3), pp. 55-60. ISSN 2587-3458.10/38045/ohrm.2021.3.09

- 2.1.9. LOZAN-TÎRȘU, C., **ZARICIUC, E.** Modification of oxidative stress indices in cultures of pathogenic microorganisms under the influence of novel chemical compounds. În: *One Health and Risk Management*. 2022, nr. 3(2), pp. 24-31. ISSN 2587-3458.

- categoria C

- 2.1.10. LOZAN-TÎRȘU, C., **ZARICIUC, E.** Antimicrobial activity against *Bacillus cereus* of the coordinative compound [(2-carbamatoilhidrazon) propionate(2-)]-(4-aminobenzenesul-famide) copper. În: *Moldovan Journal of Health Sciences*. 2016, vol.9(3), pp.45-50. ISSN 2345-1467

3. Teze în culegeri științifice

3.1. în lucrările conferințelor științifice internaționale (peste hotare)

- 3.1.1. GULEA, A. et al. Synthesis, antitumor, and antimicrobial activity of some 3d-metal complexes with 4-allylthiosemicarbazones of salicylaldehyde and its derivatives. În: *2nd French-Romanian Colloquium on Medicinal Chemistry*, October 03-05, 2012. Iași, Romania, 2012, p. 59.
- 3.1.2. GRAUR, V. et al. Synthesis, structure and antimicrobial activity of cooper salicylidene-4allylthiosemicarbazidtes with someheteromatic amines. În: *Al 4-lea colocviu Franco-Român de chimie medicală*. România, Iași, 2017, p. 72.
- 3.1.3. **ZARICIUC, E.** Action des complexes de coordination de Cu sur les enzymes antioxydants des microbes pathogènes. În: *4nd French-Romanian Colloquium on Medicinal Chemistry*, October 05-07, 2017. Iași, Romania, 2017, p.78.
- 3.1.4. LAZARESCU, A., MELNIC, E., BOUROSH, P., **ZARICIUC, E.** Compuși coordinativi ai cuprului(II) cu smetil- β -n-(2-hidroxi-3-carboxinaftilmetilen) ditiocarbazat care manifestă activitate antimicrobiană. În: *Exhibition of Inventics "Inventica 2020"*. Ediția a 24-a, Iași, România: Technical University "Gheorghe Asachi", 2020, p. 368.
- 3.1.5. LAZARESCU, A., MELNIC, E., BOUROSH, P., **ZARICIUC, E.** Compus hidrazonic al acidului 4-formil-3-hidroxi-2-naftoic care manifestă activitate antimicrobiană. În: *Exhibition of Inventics "Inventica 2020"*. Ediția a 24-a, 29-31 iulie 2020, Iași, România: Technical University "Gheorghe Asachi", 2020, p. 367.

3.2. în lucrările conferințelor internaționale (Republică Moldova)

- 3.2.1. GULEA, A., GRAUR, V., **ZARICIUC, E.**, TSAPKOV, V. Synthesis, structure and biological activity of some 3d-metal complexes of some derivative of salicylaldehyde 4-allylthiosemicarbazones. În: *The XVII-th International Conference Physical methods in coordination and supramolecular chemistry*. Chisinau, 2012, pp. 109-110.
- 3.2.2. CAPATINA, T. et al. Synthesis, structure, antitumor and antimicrobial activity of 3d-metal momplexes with some derivatives of pyridine-2-carbaldehyde 4(pyridine2-yl)thiosemicarbazones. În: *The XVII-th International Conference Physical methods in coordination and supramolecular chemistry*. Chisinau, 2012, pp. 83-84.
- 3.2.3. LAZARESCU, A., **ZARICIUC, E.**, RUDIC, V., TURTA, C. Antimicrobial Activity of Some Thiosemicarbazone Copper (II) Complexes Derived from

- 4-formyl-3-hydroxy-2-naphthoic Acid. În: *International Conference dedicated to the 55-th anniversary from the foundation of the Institute of Chemistry of the Academy of Sciences of Moldova*. Chişinău, 2014, p. 87.
- 3.2.4. RUDIC, V. et al. Use di (m-S)-bis {chloro-[1-pyridine-2-ylethanone- 4-methylthiosemi carbazonato(1-)] cooper}, as Substance with Antimicrobial Activity Against Staphylococcus aureus. În: *International Scientific Conference on Microbial Biotechnology (2nd edition)*. Chişinău, 2014, p. 165.
 - 3.2.5. GULEA, A. et al. The Study of Antimicrobial Activity of Cooper (II) Salicylidene and Naphtalidene4-alkylthiosemicabazidates Containing Sulphanilamides. În: *International Scientific Conference on Microbial Biotechnology (2nd edition)*. Chişinău, 2014, p. 138.
 - 3.2.6. GULEA, A. et al. Bacteriostatic and Bactericidal Activities of 3-d Metal Complexes with Salicylaldehyde 4-allyl-s-methylthiosemicarbazone. În: *International Scientific Conference on Microbial Biotechnology (2nd edition)*. Chişinău, 2014, p. 137.
 - 3.2.7. GULEA, A. et al. Antimicrobial effect of copper and cobalt coordination compounds with salicylidene4-allylthiosemicabazidates containing sulphanilamides. În: *International Scientific Conference on Microbial Biotechnology (2nd edition)*. Chişinău, 2014, p. 136.
 - 3.2.8. GULEA, A., et al. Antimicrobial Effect of Coordinative Compounds of Copper with 4-(dimethylphenyl) – thiosemicarbazones of 2-phormylpyridine. În: *International Scientific Conference on Microbial Biotechnology (2nd edition)*. Chişinău, 2014, p. 135.
 - 3.2.9. GULEA, A. et al. Synthesis, antimicrobial and antitumor activity of copper (II) salicylidene- and naphthalidene-4-alkylthiosemicarbazidates containing sulphanilamides. În: *The International conference dedicated of the 55th anniversary from the foundation of the Institute of Chemistry of the Academy of Sciences of Moldova*. Chişinau, 2014, p. 129.
 - 3.2.10. GULEA, A, et al. Synthesis, structure, antimicrobial and antitumoral activity of 3d-metal complexes with salicylaldehyde 4-allyl-s-methylthiosemi-carbazone. În: *The International conference dedicated of the 55th anniversary from the foundation of the Institute of Chemistry of the Academy of Sciences of Moldova*. Chişinau, 2014, p.128.
 - 3.2.11. GULEA, A. et al. Template synthesis, structure and antimicrobial activity of 3d-metal complexes with acetylacetone bis-(4-allylthiosemicarbazone). În: *The International conference dedicated of the 55th anniversary from the foundation of the Institute of Chemistry of the Academy of Sciences of Moldova*. Chişinau, 2014, p. 78.
 - 3.2.12. GRAUR, V. et al. Synthesis and antimicrobial activity of cobalt, nickel, copper, and zinc coordination compounds with 5-nitro-2-furfurilidene-4-allylthiosemicarbazide. În: *The International conference dedicated of the 55th anniversary from the foundation of the Institute of Chemistry of the Academy of Sciences of Moldova*, Chişinau, 2014, p.141.

- 3.2.13. GRAUR, V. et al. Coordination compounds of some 3d-metals with 4-allylthiosemicarbazones of salicylaldehyde and its derivatives. În: *The International conference dedicated of the 55th anniversary from the foundation of the Institute of Chemistry of the Academy of Sciences of Moldova*. Chişinău, 2014, p. 77.
- 3.2.14. PETRENKO, P. et al. Crystal structure and antimicrobial activity of bis[methyl-N'-(2-hydroxybenzylidene)-N-prop-2-en-1-yl carbamohydrazonothioate] chromium(III) nitrate. În: *The XVIII-th International Conference Physical methods in coordination and supramolecular chemistry*. Chisinau, 2015, p. 121.
- 3.2.15. RUDIC, V. et al. Antibacterian and antifungal properties of algae product BioR. În: *The International Scientific Conference on Microbial Biotechnology, 3rd edition*. Chisinau, 2016, p. 81.
- 3.2.16. GULEA, A. et al. Antimicrobial and antifungal activities of some 3d metal coordination compounds of salicylaldehyde 4-allyl-s-alkylisothiosemicarbazone and its derivatives. În: *The International Scientific Conference on Microbial Biotechnology, 3rd edition*. Chisinau, 2016, pp. 72-73.
- 3.2.17. GULEA, A. et al. Antimicrobial and antifungal effect of some biometal coordination compounds of 5-nitro-2-fural-dehyde 4-(methoxyphenyl) thiosemicarbazones. În: *The International Scientific Conference on Microbial Biotechnology, 3rd edition*. Chisinau, 2016, p.71.
- 3.2.18. GULEA, A. et al. The study of antimicrobial and antitumor activity of biometal coordination compounds of substituted salicylaldehyde 4-allylthiosemicarbazones. În: *The International Scientific Conference on Microbial Biotechnology, 3rd edition*, Chisinau, 2016, pp. 67-68.
- 3.2.19. GULEA, A. et al. Synthesis, structure and antimicrobial activity of salicylaldehyde 4-(dimethylphenyl) thiosemicarbazones and biometal coordination compounds with these ligands. În: *The 6th International Conference Ecological and Environmental Chemistry – 2017*. Chisinau, 2017, p. 215.
- 3.2.20. BALAN, G. et al. Bacterial profile and antibiotic resistance in patients with trophic ulcer. În: *International Scientific Conference on Microbial Biotechnology, 4th edition*. – Chişinău, october, 11-12, 2018, p. 27.

4. Brevete de invenții, și alte obiecte de proprietate intelectuală (OPI)

- 4.1. GONCIAR, V., ZARICIUC, E., BACINSCHI, N., LUPAȘCU, T., PLUGARU, Ș., RUDIC V., CERLAT, S. *Remediu antibacterian*. Brevet de invenție MD 3228. 2007.01.31.
- 4.2. LĂZĂRESCU, A., ZARICIUC, E., COJOCARI, D., GONCIAR, V., BOUROȘ, P., TURTĂ C. *Derivați tiosemicarbazonici ai acidului 4-formil-3-hidroxi-2-naftoic cu proprietăți antibacteriene*. Brevet de invenție MD 4174. 2012.06.30.
- 4.3. GRAUR, V., ZARICIUC, E., USATAIA, I., ȚAPCOV, V., RUDIC, V., GULEA, A. *Metil-N' -[(2-hidroxinaftalen-1-il)metiliden]-N-prop-2-en-1-ilhidrazonotioat, care manifestă activitate antimicrobică față de Candida albicans*. Brevet de invenție MD 4402. 2016.02.29.
- 4.4. ISTRATI, D., GULEA, A., ȚAPCOV, V., ZARICIUC, E., COTOVAIA, A. *Cloro-{N-(3,4-dimetilfenil)-2-[1-(2-hidroxifenil)etiliden]}-*

hidrazincarbonat(1-)}*nicel*, care manifestă activitate antimicrobiană față de bacteriile din speciile *Klebsiella pneumoniae* și *Pseudomonas aeruginosa*. Brevet de invenție MD 4462. 2017.01.31.

- 4.5. LAZARESCU, A., MELNIC, E., BOUROȘ, P., **ZARICIUC, E.** *Compus hidrazonic al acidului 4-formil-3-hidroxi-2-naftoic care manifestă activitate antimicrobiană.* Brevet de invenție MD 4600. C07C 337/04. Publicat 2018.11.30.
- 4.6. LAZARESCU, A., MELNIC, E., BOUROȘ, P., **ZARICIUC, E.** *Compuși coordinativi ai cuprului(II) cu S-metil- b -N- (2- h i drox i -3-carbox i na f t ilmetil en)ditiocarbazat care manifestă activitate antimicrobiană.* Brevet de invenție MD 4611. C07C 337/04. Publicat 2018.11.30.
- 4.7. RUDIC, Valeriu, ZARICIUC, Elena. Metoda de determinare a modificării activității exoenzimelor la *Staphylococcus aureus* ATCC®25922™ și *Escherichia coli* ATCC®25923™ la interacțiunea culturilor cu enotanina hidrosolubilă. Nr. 5963 din 17.11.2022.
- 4.8. ZARICIUC, Elena. Rezultatele studiului privind metoda de determinare a exoenzimelor *Staphylococcus aureus* ATCC®25922™ și *Escherichia coli* ATCC®25923™ la interacțiunea culturilor cu enotanina hidrosolubilă). Act de implementare nr. 86 din 17.11.2022.
- 4.9. ZARICIUC, Elena. Rezultatele studiului privind metoda de evaluare a integrității culturilor bacteriene și fungice după liofilizare în baza cuantificării acizilor nucleici eliberați și a activității lactatdehidrogenazei eliberate. Act de implementare nr. 27A din 14.03.2022.

ADNOTARE

Zariciuc Elena, „Acțiunea antimicrobiană a unor compuși coordinativi ai 3d elementelor 3d și a preparatelor polifuncționale noi”, teză de doctor în științe medicale, specialitatea 313.02 – Microbiologie, virusologie medicală, Chișinău, 2022

Structura tezei: Teza conține introducere, patru capitole, concluzii și recomandări, bibliografie cu 225 titluri, 2 anexe, 130 pagini text de bază, 24 figuri, 18 tabele. Rezultatele sunt reflectate în 38 publicații științifice: 1 capitol în monografie colectivă, 10 articole în reviste științifice, din ele 2 în monoautorat; 23 rezumate și 4 brevete de invenție.

Cuvintele cheie: compuși coordinativi, 3d elemente, extracte din spirulină, enotanınă, activitate antimicrobiană, concentrație minimă de inhibiție, concentrație minimă bactericidă/fungicidă, activitate enzimatică, permeabilitate membranară, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Shigella sonnei*, *Salmonella enterica*, *Candida albicans*.

Scopul lucrării: evaluarea proprietăților antimicrobiene ale compușilor chimici noi ai 3d elementelor și a posibilității de amplificarea a efectelor biologice prin obținerea de combinații polifuncționale cu compuși de origine naturală.

Obiectivele lucrării: identificarea compușilor chimici noi cu activitate antimicrobiană înaltă; evaluarea acțiunii antimicrobiene a compușilor de origine naturală și combinațiilor lor cu compuși chimici noi ai metalelor de tranziție; stabilirea unor ținte specifice de acțiune antimicrobiană a compușilor chimici noi și a combinațiilor lor cu compuși naturali.

Noutatea și originalitatea științifică: A fost realizat screeningul și evidențiat noi compuși chimici tiosemicarbazonici cu 3d elementele cu activitate antimicrobiană pronunțată. A fost demonstrată posibilitatea măririi nivelului de manifestare a efectelor biologice ale compușilor testați în combinație cu extractele din spirulină și enotantina solubilă. A fost demonstrat caracterul polifuncțional al combinațiilor obținute prin evidențierea mai multor ținte de acțiune a acestora asupra tulpinilor microbiene testate.

Rezultatele obținute, care contribuie la soluționarea problemei științifice importante: evidențierea de noi substanțe chimice, compuși naturali noi și combinații dintre acestea care prezintă efecte antimicrobiene pronunțate; identificarea posibilelor ținte de acțiune a acestora.

Semnificația teoretică: Au fost acumulate cunoștințe noi despre activitatea antimicrobiană a unor compuși ai 3d elementelor, și combinațiilor acestora cu extracte din spirulina și enotantina hidrosolubilă și demonstrat caracterul polifuncțional al acestor combinații prin evidențierea mai multor ținte de acțiune.

Valoarea aplicativă a lucrării: Au fost evidențiat compuși chimici noi ai 3d elementelor și a combinațiile acestora cu extracte naturale, care posedă activitate antimicrobiană înaltă față de tulpinile de referință de microorganisme patogene, de perspectivă pentru continuarea cercetărilor biomedicale în vederea evidențierii efectelor *in vivo*.

Implementarea rezultatelor științifice: Rezultatele studiului au fost implementate la catedra de Microbiologie și imunologie a Universității de Stat de Medicină și Farmacie "Nicolae Testemițanu" ca material didactic pentru instruirea universitară.

АННОТАЦИЯ

Заричук Елена “Антимикробное действие некоторых координационных соединений 3d-элементов и новых полифункциональных препаратов”.

**Диссертация кандидата медицинских наук, специальность 313.02 –
Медицинская микробиология, вирусология, Кишинев, 2022.**

Структура диссертации: Диссертация состоит из введения, четырех глав, заключения и рекомендаций, библиографического списка из 225 наименований, 2 приложений, 130 страниц основного текста, содержит 24 рисунков и 18 таблиц. Результаты исследований опубликованы в 38 научных работах: 1 глава в коллективной монографии, 10 статей в научных журналах, из них 2 без соавторов; 23 тезиса и 4 патента.

Ключевые слова: координационные соединения, 3d элементы, экстракты спирулины, энотаннин, антимикробная активность, минимальная ингибирующая концентрация, минимальная бактерицидная/фунгицидная концентрация, энзиматическая активность, проницаемость мембран, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Shigella sonnei*, *Salmonella enterica*, *Candida albicans*.

Цель работы: оценка антимикробных свойств новых химических соединений 3d-элементов и возможности усиления их биологического действия за счет получения полифункциональных комбинаций с соединениями природного происхождения.

Задачи исследований: выявление новых химических соединений с высокой антимикробной активностью; оценка антимикробного действия соединений природного происхождения и их сочетаний с новыми химическими соединениями переходных металлов; установление специфических мишеней антимикробного действия новых химических соединений и их сочетаний с природными соединениями.

Научная новизна и оригинальность. Проведен скрининг и выявлены новые химические соединения тиосемикарбазона с элементами 3d, обладающие выраженной антимикробной активностью. Показана возможность повышения уровня проявления биологических эффектов испытуемых соединений в сочетании с экстрактами спирулины и растворимым энотаннином. Полифункциональный характер полученных комбинаций был продемонстрирован выделением нескольких мишеней их действия на исследуемые микробные штаммы.

Результаты, способствующие решению важной научной проблем: сводятся к выявлению новых химических веществ, новых природных соединений и их сочетаний, обладающих выраженным антимикробным действием, и выявлению возможных мишеней действия соединений и их сочетаний.

Теоретическое значение работы. Были накоплены новые знания об антимикробной активности некоторых соединений 3d-элементов и их комбинаций с экстрактами спирулины и водорастворимым энотаннином; полифункциональный характер этих сочетаний доказан установлением нескольких специфических мишеней на которые действуют соединения.

Практическое значение. Выделены новые химические соединения 3d-элементов и их сочетания с природными экстрактами, обладающие высокой антимикробной активностью в отношении референтных штаммов патогенных микроорганизмов, перспективные для продолжения медико-биологических исследований с целью выявления эффектов *in vivo*.

Внедрение результатов. Результаты исследования внедрены на Кафедре Микробиологии и иммунологии Молдавского Государственного Университета Медицины и Фармации им. “Николае Тестемицану” в качестве дидактического материала.

ANNOTATION

Zariciuc Elena, „The antimicrobial effect of some coordination compounds of 3d elements and new polyfunctional drugs”. PhD thesis in medical sciences, speciality 313.02 – Medical microbiology, virology, Chisinau, 2022

Thesis structure: The thesis consists of an introduction, four chapters, conclusions and recommendations, bibliography list with 225 references. It comprises 130 pages of main content, 24 figures, 18 tables and 2 annexes. The results were published in 38 scientific papers: 1 chapter in collective monograph, 10 articles in scientific journals; 23 abstracts and 4 patents.

Keywords: coordinating compounds, 3d elements, spirulina extracts, enotannin, antimicrobial activity, minimum inhibitory concentration, minimum bactericidal/fungicidal concentration, enzymatic activity, membrane permeability, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Shigella sonnei*, *Salmonella enterica*, *Candida albicans*.

Research goal: evaluation of the antimicrobial properties of new chemical compounds of the 3d elements and the possibility of amplifying their biological effects by obtaining polyfunctional combinations with natural compounds.

Objectives: identification of new chemical compounds with high antimicrobial activity; evaluation of the antimicrobial action of natural compounds and their combinations with new chemical compounds of transition metals; establishing specific targets of antimicrobial action of new chemical compounds and their combinations with natural compounds.

Scientific novelty and originality: Screening was performed and new thiosemicarbazone chemical compounds with 3d elements with pronounced antimicrobial activity were identified. The possibility of increasing the level of manifestation of the biological effects of the tested compounds in combination with spirulina extracts and soluble enotannin was demonstrated. The polyfunctional character of the obtained combinations was demonstrated by highlighting several targets of their action on the tested microbial strains.

The results obtained that contribute to solving an important scientific problem: identification of new chemicals, new natural compounds and combinations thereof that exhibit pronounced antimicrobial effects; identification of their possible targets of action.

Theoretical value: New knowledge was accumulated about the antimicrobial activity of some compounds of the 3d elements, and their combinations with spirulina extracts and water-soluble enotannin, and the polyfunctional nature of these combinations was demonstrated by highlighting several action targets.

Practical value: New chemical compounds of the 3d elements and their combinations with natural extracts, with high antimicrobial activity against the reference strains of pathogenic microorganisms, promising for the continuation of biomedical research in order to highlight the *in vivo* effects were highlighted.

Implementation of scientific results. Results of the study have been implemented at the Department of Microbiology and immunology of the State University of Medicine and Pharmacy "Nicolae Testemitanu" as teaching material for university training.

ZARICIUC ELENA

**ACȚIUNEA ANTIMICROBIANĂ A UNOR COMPUȘI
COORDINATIVI AI ELEMENTELOR 3D ȘI A PREPARATELOR
POLIFUNCȚIONALE NOI**

313.02 – MICROBIOLOGIE, VIRUSOLOGIE MEDICALĂ

Rezumatul tezei de doctor în științe medicale

Aprobat spre tipar: 01.11. 2023

Formatul hîrtiei A4

Hîrtie ofset. Tipar digital

Tiraj 100 ex.

Coli de tipar: 2,0

Comanda nr. 165

**SRL „PRINT-CARO”
Chișinău, str. Astronom N. Donici, 14
tel. 0-22-85-33-86**