

UNIVERSITATEA „ALEXANDRU IOAN CUZA” DIN IAȘI
FACULTATEA DE BIOLOGIE
ȘCOALA DOCTORALĂ DE BIOLOGIE

ACTIVITATEA ANTIMICROBIANĂ ȘI MECANISMELE DE
ACȚIUNE ALE UNEI NOI CLASE DE FLAVONOIDE
SINTETICE TRICICLICE CU SULF

Rezumat teza de doctorat

Conducător științific:

Prof. univ. dr. habil. Marius ȘTEFAN

Student doctorand:

Mihaela SAVU

Iași, 2023

Cuprins

LISTĂ DE ABREVIERI	6
INTRODUCERE	8
OBIECTIVELE PRINCIPALE ALE STUDIULUI	9
PARTEA I – STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	11
CAPITOLUL 1 – CLASIFICAREA, STRUCTURA ȘI PROPRIETĂȚILE BIOLOGICE ALE FLAVONOIDELOR	11
CAPITOLUL 2 – FACTORI IMPLICAȚI ÎN VIRULENȚA ȘI REZISTENȚA MICROORGANISMELOR LA SUBSTANȚELE ANTIMICROBIENE	12
2.1. FACTORI IMPLICAȚI ÎN VIRULENȚA BACTERIILOR.....	13
2.1.1. „Quorum sensing” (QS)	13
2.1.2. Secreția de toxine	13
2.1.3. Secreția pigmentilor	13
2.1.4. Motilitatea bacteriilor.....	13
2.2. MECANISME DE REZISTENȚĂ LA ANTIBIOTICE	14
2.2.1. Modificarea țintei	14
2.2.2. Inactivarea antibioticelor	15
2.2.3. Pompele de eflux.....	15
2.3. FACTORI DE VIRULENȚĂ PREZENȚI LA FUNGI.....	15
2.3.1. Molecule lipidice de semnalizare	15
2.3.2. Dimorfismul celulelor	15
2.3.3. Secreția enzimelor hidrolitice.....	16
2.4. MECANISME DE REZISTENȚĂ LA SUBSTANȚELE ANTIFUNGICE	16
2.4.1. Modificarea țintei de acțiune	16
2.4.2. Formarea biofilmelor.....	16
PARTEA II-A – CONTRIBUȚII PERSONALE	18
CAPITOLUL 1 – SELECȚIA UNOR FLAVONOIDE SINTETICE TRICICLICE CU ACTIVITATE ANTIMICROBIANĂ	18
1.1. MATERIALE, ECHIPAMENTE ȘI METODE DE LUCRU	18
1.1.1. Sinteza flavonoidelor sintetice triciclice cu sulf	18
1.1.2. Determinarea concentrației minime inhibitorii și a concentrației minime bactericide/fungicide.....	19
1.1.3. Evoluția unei populații bacteriene/fungice într-o cultură discontinuă asincronă	19
1.1.4. Aprecierea viabilității celulelor microbiene după expunerea la flavonoide prin metoda numărării coloniilor dezvoltate pe medii solide.....	19
1.2. REZULTATE ȘI DISCUȚII.....	20
1.2.1. Activitatea antibacteriană și antifungică a unor flavonoide sintetice triciclice cu sulf	20
1.2.2. Efectul flavonoidelor asupra creșterii unor populații microbiene	21
1.2.3. Aprecierea efectului flavonoidelor triciclice cu sulf asupra viabilității celulelor bacteriene și fungice	25
CAPITOLUL 2 – MECANISME DE ACȚIUNE ALE FLAVONOIDEI BrCl	28
2.2. MATERIALE, ECHIPAMENTE ȘI METODE DE LUCRU	28
2.2.1. Evaluarea efectului flavonoidei BrCl asupra integrității membranare a celulelor de <i>C. albicans</i>	28

2.2.2. Optimizarea metodei de deshidratare a celulelor de <i>C. albicans</i> în vederea examinării la microscopul electronic cu baleiaj (SEM).....	28
2.2.3. Evaluarea morfologiei celulelor de <i>C. albicans</i> Prx în prezența flavonoidei BrCl folosind microscopia electronică cu baleiaj (SEM).....	28
2.2.4. Aprecierea legării sorbitolului în prezența flavonoidei BrCl.....	28
2.3. REZULTATE ȘI DISCUȚII.....	29
2.3.1. Evaluarea efectului flavonoidei BrCl asupra integrității membranare.....	29
2.3.2. Selectarea unor metode de deshidratare a celulelor de <i>Candida</i> în vederea utilizării SEM	30
2.3.3. Flavonoida BrCl induce modificări semnificative ale morfologiei celulelor de <i>C. albicans</i> Prx	31
2.3.4. Aprecierea legării sorbitolului	31
CAPITOLUL 3 – FACTORI IMPLICAȚI ÎN VIRULENȚA ȘI REZISTENȚA BACTERIILOR.	32
3.1. MATERIALE, ECHIPAMENTE ȘI METODE DE LUCRU	32
3.1.1. Evaluarea motilității de tip <i>swimming</i> , <i>swarming</i> și <i>twitching</i>	32
3.1.2. Determinarea activității flavonoidei BrCl asupra motilității de tip <i>swimming</i> , <i>swarming</i> și <i>twitching</i>	32
3.1.3. Aprecierea efectului flavonoidei BrCl asupra pompelor de eflux	32
3.2. REZULTATE ȘI DISCUȚII.....	33
3.2.1. Selectarea tulpinii ce prezintă motilitate de tip <i>swimming</i> , <i>swarming</i> și <i>twitching</i>	33
3.2.2. Flavonoida BrCl inhibă motilitatea de tip <i>swimming</i> , <i>swarming</i> și <i>twitching</i> la <i>P. aeruginosa</i> 124.....	34
3.2.3. Efectul flavonoidei BrCl asupra pompelor de eflux	37
CAPITOLUL 4 – EFECTUL FLAVONOIDEI BrCl ASUPRA UNOR FACTORI DE VIRULENȚĂ IMPLICAȚI ÎN INFECȚIILE CU <i>CANDIDA</i> SPP.	38
4.1. MATERIALE, ECHIPAMENTE ȘI METODE DE LUCRU	38
4.1.1. Evaluarea formării hifelor folosind tehnici de microscopie optică și electronică.....	38
4.1.2. Cuantificarea expresiei unor gene implicate în formarea hifelor prin Real-Time PCR.....	38
4.1.3. Determinarea activității fosfolipazice.....	39
4.1.4. Determinarea activității esterazice.....	39
4.1.5. Determinarea activității proteazice	39
4.1.6. Identificarea activității catalazelor.....	39
4.1.7. Evaluarea efectului flavonoidei BrCl asupra activității fosfolipazice, esterazice, proteazice și catalazice	39
4.2. REZULTATE ȘI DISCUȚII.....	40
4.2.1. Flavonoida BrCl inhibă formarea hifelor de către tulpina <i>C. albicans</i> Prx	40
4.2.2. Expresia genelor implicate în formarea hifelor de <i>C. albicans</i> este inhibată de flavonoida BrCl.....	40
4.2.3. Flavonoida BrCl nu inhibă activitatea enzimelor implicate în virulența tulpinilor de <i>Candida</i> spp.....	41
CAPITOLUL 5 – ACTIVITATEA FLAVONOIDEI BrCl ASUPRA BIOFILMELOR PRODUSE DE TULPINI APARTINÂND GENULUI <i>CANDIDA</i>	43
5.1. MATERIALE, ECHIPAMENTE ȘI METODE DE LUCRU	43
5.1.1. Aprecierea activității flavonoidei BrCl asupra aderării celulelor din biofilm.....	43
5.1.2. Determinarea efectului flavonoidei BrCl asupra preformării biofilmului	43
5.1.3. Cuantificarea cantității de biofilm format în prezența flavonoidei BrCl	43
5.1.4. Determinarea activității metabolice a celulelor din biofilm	43
5.1.5. Aprecierea viabilității celulelor din biofilme.....	44
5.1.6. Aprecierea efectului flavonoidei BrCl asupra biofilmului matur	44

5.1.7. Efectul flavonoidei BrCl asupra hidrofobicității celulelor de <i>C. krusei</i>	44
5.1.8. Efectul flavonoidei BrCl asupra producerii de EPS	44
5.3. REZULTATE ȘI DISCUȚII.....	44
5.2.1. Aderarea celulelor fungice este influențată de flavonoida BrCl	44
5.2.2. Flavonoida BrCl inhibă dezvoltarea biofilmului preformat	45
5.2.3. Flavonoida BrCl inhibă formarea biofilmului de către tulpina <i>C. krusei</i> Prx.....	46
5.2.4. Flavonoida BrCl poate reduce activitatea metabolică a celulelor din biofilmul produs de <i>C. krusei</i> Prx.	46
5.2.5. Flavonoida BrCl reduce viabilitatea celulelor din biofilmul format de <i>C. krusei</i> Prx	47
5.2.6. Biofilmul matur produs de <i>C. krusei</i> Prx este distrus în prezența flavonoidei BrCl.....	48
5.2.7. Activitatea flavonoidei BrCl asupra hidrofobicității suprafeței celulelor de <i>C. krusei</i> Prx.....	49
5.2.8. Activitatea flavonoidei BrCl asupra conținutului total de carbohidrați	50
CAPITOLUL 6 – EFECTUL SINERGIC AL COMBINAȚIILOR FLAVONOIDE SINTETICE TRICICLICE CU SULF – SUBSTANȚE ANTIMICROBIENE	50
6.1. MATERIALE, ECHIPAMENTE ȘI METODE DE LUCRU	50
6.1.1. Stabilirea efectului sinergic al unor compuși prin metoda „checkerboard”	50
6.2. REZULTATE ȘI DISCUȚII.....	51
6.2.1. Interacțiunea sinergică a flavonoidelor testate cu penicilina și fluconazolul.....	51
CAPITOLUL 7 – PROPRIETĂȚILE FARMACOLOGICE ALE FLAVONOIDEI BrCl.	55
7.1. MATERIALE ȘI ECHIPAMENTE NECESARE.....	55
7.1.1. Aprecierea <i>in silico</i> a proprietăților ADMET	55
7.1.2. Determinarea citotoxicității flavonoidei BrCl	55
7.2. REZULTATE ȘI DISCUȚII.....	56
7.2.1. Predicția <i>in silico</i> a proprietăților farmacologice ale flavonoidei BrCl	56
7.2.2. Evaluarea citotoxicității flavonoidei BrCl asupra celulelor umane	57
CONCLUZII.....	58
PERSPECTIVE DE CONTINUARE A STUDIILOR.....	60
DISEMINAREA REZULTATELOR OBTINUTE ÎN CADRUL TEZEI DE DOCTORAT	61
BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ	63

Mulțumiri

În primul rând, doresc să adresez distinse mulțumiri, gânduri de apreciere și recunoștință conducătorului de doctorat domnului Prof. univ. dr. habil. Marius Ștefan pentru încrederea, sprijinul acordat, răbdarea și riguroasa îndrumare, atât pentru realizarea tezei de doctorat, cât și pentru realizarea tezei de disertație și licență.

În egală măsură, mulțumiri deosebite doresc să adresez fiecărui membru din comisia de îndrumare: doamnei Prof. univ. dr. Zenovia Olteanu, domnului Prof. univ. dr. habil. Marius Mihășan și domnului Șef lucr. dr. Tiberius Balaeș pentru colaborarea, sugestiile oferite și amabilitatea de a analiza prezenta lucrare.

Alese mulțumiri doresc să adresez referenților științifici pentru bunăvoința de a analiza această lucrare.

Mulțumiri doresc să aduc și grupului de cercetare condus de către domnul Prof. dr. habil. Lucian Bîrsa din cadrul Facultății de Chimie a Universității „Alexandru Ioan Cuza” din Iași pentru amabilitatea de a ne oferi flavonoidele sintetice triciclice cu sulf testate în cadrul prezentei teze de doctorat, precum și colaborării deosebite.

Sincere mulțumiri se îndreaptă către colectivul condus de către domnul Biol. princ. dr. Iuliu Ivanov din cadrul Institutului Regional de Oncologie pentru amabilitatea și disponibilitatea de a mă primi în laboratoarele lor în scopul desfășurării unor experimente.

De asemenea, adresez mulțumiri colegului doctorand Ștefan Olaru pentru că a făcut posibilă realizarea fotografiilor la microscopul electronic cu baleiaj.

În egală măsură, adresez mulțumiri kolegei Loredana Mantea pentru sprijinul acordat în realizarea unor experimente.

Totodată, adresez mulțumiri domnului Prof. dr. Benoit Cudennec de la Universitatea Lille din Franța pentru că a făcut posibilă realizarea testelor de citotoxicitate.

De asemenea, doresc să adresez mulțumiri doamnei CS III dr. Corina Ciobănașu din cadrul Institutului de Cercetări Interdisciplinare a Universității „Alexandru Ioan Cuza” din Iași pentru că a făcut posibilă realizarea fotografiilor la microscopul confocal cu scanare laser.

Mulțumesc colegilor din grupul de cercetare BioActive pentru sprijinul și momentele frumoase pe care mi le-au oferit pe parcursul anilor de doctorat.

Pentru disponibilitatea și amabilitatea de care a dat dovadă pe tot parcursul realizării tezei de doctorat, mulțumesc doamnei Mihaela Mișenschi.

Nu în ultimul rând, doresc să îmi exprim recunoștința și să adresez mulțumiri familiei mele pentru înțelegerea și susținerea acordată în perioadele dificile de pe parcursul elaborării tezei de doctorat.

LISTĂ DE ABREVIERI

ABC = engl. ATP-binding cassette superfamily
ADMET = absorbție, distribuție, metabolism, excreție și toxicitate
ADN = acid dezoxiribonucleic
ARN = acid ribonucleic
ARNt = acid ribonucleic de transport
ASFV = virusul peștei porcine africane
ATCC = American Type Culture Collection
ATP = adenzin trifosfat
CLSM = microscopie confocală cu scanare laser
CMB = concentrația minimă bactericidă
CMF = concentrația minimă fungicidă
CMI = concentrația minimă inhibitoare
CNS = sistemul nervos central
COX = ciclooxigenază
CSH = hidrofobicitatea suprafeței celulare
CVB3 = Coxsackievirus B3
DMEM = engl. Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO = dimetilsulfoxid
DPPH = 2,2-difenil-1-picrilhidrazil
EC = epicatechină
ECG = epicatechin-3-galat
EGC = epigallocatechină
EGCG = epigallocatechin-galatul
EPS = substanțe polimerice extracelulare
ESM = eroarea standard a mediei
Ez = activitate esterazică
FIC = concentrația inhibitoare fracționară
FICI = indice de concentrație inhibitoare fracționară
GTC = catechina
HMDS = hexametildisilazan
Hz = activitatea hemolizinei
IR = Spectroscopia în infraroșu
LB = Luria-Bertani
LDL = lipoproteine de densitate scăzută
MATE = engl. multidrug and toxin extrusion superfamily
MDR = engl. multiple drug resistange
MFS = engl. major facilitator superfamily

MHA = agar Mueller Hinton
MHB = bulion Mueller Hinton
MRSA = Staphylococcus aureus rezistent la meticilină
MTD = doza maximă tolerată
MTT = (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide)
NADPH = nicotinamid adenin dinucleotid redus
NB = bulion nutritiv
PBS = tampon fosfat salin
Pz = activitate fosfolipazică
QS = engl. Quorum sensing
RMN = rezonanță magnetică nucleară
RND = engl. resistance nodulation cell division family
ROS = specii reactive de oxigen
rpm = rotații pe minut
RPMI = Roswell Park Memorial Institute
sarA = engl. staphylococcal accessory regulator A
SDA = Agar Sabouraud dextroză
SDB = bulion Sabouraud dextroză
SDR = engl. Single-drug resistance
SEM = microscopie electronică cu baleiaj
SM = spectrometrie de masă
SMR = engl. small multidrug resistance family
SOD = superoxid dismutaza
TMMC = 5,6,8-trihidroxi-7,4' dimetoxi flavona (5,6,8-trihidroxi-7-metoxi-2-(4-metoxifenil)-2H-cromen-4-ona)
UFC = unități formatoare de colonii
UV = ultraviolete
UVB = ultraviolete B
VDss = volumul de distribuție la starea de echilibru
YNB = engl. yeast nitrogen base
YPD = engl. yeast peptone dextrose

INTRODUCERE

Rezistența la antibiotice este descrisă ca fiind una dintre cele mai mari amenințări globale ale secolului XXI în ceea ce privește sănătatea umană (Sabtu *et al.*, 2015). Prin urmare, descoperirea de noi agenți antimicrobieni cu eficacitate ridicată și toxicitate scăzută este o prioritate pentru comunitatea științifică. Din acest motiv, pentru a descoperi medicamente noi, eficiente, care să funcționeze asemenea „gloanțelor magice” (Aslam *et al.*, 2018), cercetătorii ar trebui să-și îndrepte atenția spre identificarea substanțelor ce aparțin unor noi clase de compuși la care microorganismele nu au dezvoltat rezistență.

O posibilă strategie pentru a combate rezistența microbiană ar putea fi utilizarea flavonoidelor naturale extrase din plante, dar și a celor sintetice și semisintetice (Cushnie *et al.*, 2008) datorită proprietăților importante pe care le prezintă.

Timp de secole, cataplasme, infuzii, balsamuri și condimente ce conțin flavonoide ca principali constituenți fiziologic activi au fost folosite de medici și de vindecători în încercarea de a trata bolile umane (Havsteen, 1983; Cushnie și Lamb, 2011). Printre utilizările tradiționale ale flavonoidelor se numără tratamentul și prevenirea unor boli infecțioase, răni, infecții ale rănilor, acnee, infecții respiratorii, boli gastrointestinale și infecții ale tractului urinar (Cushnie și Lamb, 2011).

Pe lângă utilizările în medicina tradițională, flavonoidelor li s-au atribuit diverse efecte pozitive asupra sănătății umane și animale, cum ar fi proprietățile antioxidante, antiinflamatorii, antimicrobiene, antitumorale sau cardioprotectoare (Stefan și Birsa, 2019). Datorită efectelor pozitive asupra sănătății umane atribuite flavonoidelor, interesul actual în ceea ce privește rezistența la antibiotice se îndreaptă către testarea activității antimicrobiene atât a flavonoidelor naturale, cât și a celor sintetice (Khajuria *et al.*, 2019).

De-a lungul timpului, cercetătorii au observat că proprietățile flavonoidelor naturale pot fi îmbunătățite prin modificarea structurii acestora, obținându-se astfel flavonoide sintetice sau semisintetice cu activitate antimicrobiană mult mai intensă (Stefan și Birsa, 2019). În consecință, studiile noastre s-au centrat pe testarea activității antimicrobiene și stabilirea mecanismelor de acțiune ale unei noi clase de flavonoide sintetice tricyclice cu sulf. Motivația studiului nostru este legată atât de proprietățile antibacteriene și antifungice promițătoare ale acestor flavonoide, cât și de potențialul lor ridicat în dezvoltarea de medicamente antimicrobiene noi, ce pot fi utilizate în contextul fenomenului alarmant al rezistenței la antibiotice.

OBIECTIVELE PRINCIPALE ALE STUDIULUI

Obiectivul principal al acestui studiu este reprezentat de identificarea proprietăților antimicrobiene și ale mecanismelor de acțiune a unor flavonoide sintetice triciclice cu sulf. Pentru îndeplinirea acestui obiectiv s-au stabilit 8 obiective secundare, fiecare dintre acestea având la rândul lor o serie de activități asociate.

Selecția unor flavonoide sintetice cu activitate antimicrobiană

Activități asociate:

O.1.1. Determinarea concentrației minime inhibitorii și a concentrației minime bactericide/fungicide.

O.1.2. Stabilirea influenței flavonoidelor asupra creșterii unor culturi bacteriene și fungice.

O.1.3. Evidențierea efectelor flavonoidelor asupra viabilității celulare.

Investigarea mecanismelor de acțiune ale flavonoidei BrCl.

Activități asociate:

O.2.1. Aprecierea integrității membranare utilizând microscopia cu fluorescență.

O.2.2. Evaluarea morfologiei celulelor de *Candida* în prezența flavonoidei BrCl utilizând microscopia electronică cu baleiaj.

Stabilirea activității flavonoidei BrCl asupra factorilor implicați în virulența și rezistența bacteriilor.

Activități asociate:

O.3.1. Determinarea activității flavonoidei BrCl asupra motilității unor tulpini aparținând genului *Pseudomonas*.

O.3.2. Aprecierea efectului flavonoidei testate asupra pompelor de eflux.

Analiza efectului flavonoidei BrCl asupra unor factori implicați în virulența unor tulpini aparținând genului *Candida*.

Activități asociate:

O.4.1. Evaluarea efectului flavonoidei BrCl asupra formării hifelor.

O.4.2. Aprecierea activității compusului testat asupra unor enzime implicate în virulență.

Evidențierea activității flavonoidei BrCl asupra factorilor implicați în rezistența fungilor patogeni.

Activități asociate:

O.5.1. Aprecierea activității anti-biofilm a flavonoidei BrCl în diferite etape (aderare, preformare, formare și biofilm matur).

O.5.2. Aprecierea efectului flavonoidei asupra hidrofobicității suprafeței celulare.

O.5.3. Stabilirea efectului compusului testat asupra conținutului total de carbohidrați.

Studiul efectului sinergic al flavonoidelor cu diferite antibiotice și antimicotice.

Activități asociate:

O.6.1. Testarea efectului unor combinații ale flavonoidelor sintetice cu diferite substanțe antimicrobiene.

Investigarea *in vitro* și *in silico* a toxicității și proprietăților farmacologice ale flavonoidei BrCl.

Activități asociate:

O.7.1. Identificarea *in silico* a proprietăților farmacologice ale flavonoidei BrCl.

O.7.2. Evidențierea efectului flavonoidei BrCl asupra viabilității unor linii celulare umane.

Analiza și interpretarea datelor. Diseminarea rezultatelor.

Activități asociate:

O.8.1. Analiza statistică a rezultatelor.

O.8.2. Redactarea rapoartelor științifice.

O.8.3. Redactarea manuscriselor în vederea publicării.

O.8.4. Participarea la conferințe și manifestări științifice.

Structura tezei

Teza de doctorat este alcătuită din două părți:

Partea I – Stadiul actual al cunoașterii, structurată în două capitole ce prezintă o sinteză a literaturii de specialitate.

Partea a II-a – Contribuții personale, formată din șapte capitole, împărțite la rândul lor în **Generalități, Materiale și echipamente necesare și Rezultate și discuții**.

Teza se finalizează cu **Concluzii, Lista lucrărilor publicate, Lista abstractelor publicate, Participări la conferințe internaționale, Participări la conferințe naționale, Burse internaționale câștigate, Proiecte de cercetare, Propunere brevet și Bibliografie**.

PARTEA I – STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

CAPITOLUL 1 – CLASIFICAREA, STRUCTURA ȘI PROPRIETĂȚILE BIOLOGICE ALE FLAVONOIDELOR

Compușii bioactivi din plante pot oferi beneficii suplimentare pentru sănătatea umană, dincolo de nevoile nutriționale fundamentale (Wang et al., 2021). Printre acești constituenți bioactivi identificați, polifenolii de origine vegetală sunt intens studiați, existând tot mai multe dovezi asupra potențialului acestora în ceea ce privește rolul lor în plante, dar și în organismele umane și animale (Górniak et al., 2019; Wang et al., 2021).

Flavonoidele sunt compuși naturali ce prezintă structuri fenolice variabile și se întâlnesc pe scară largă în regnul vegetal (Tsao și McCallum, 2009; Kumar și Pandey, 2013). La nivelul plantelor, flavonoidele sunt implicate și în dezvoltarea normală a acestora, având roluri de protecție împotriva condițiilor de stres cum ar fi expunerea la radiații UV, secetă, frig, salinitate, dar pot acționa și ca agenți de eliminare a speciilor reactive de oxigen (ROS), fitoalexine și compuși alelopatici (Panche et al., 2016; Ferreyra et al., 2021).

Timp de secole, compușii de origine vegetală ce conțin flavonoide au fost utilizați de medici și de vindecători în medicina tradițională pentru tratamentul bolilor umane (Cushnie și Lamb, 2005). De exemplu, utilizarea flavonoidelor ce intră în alcătuirea propolisului este menționată în Vechiul Testament și, de asemenea, în scrierile lui Hipocrate din Grecia Antică pentru tratamentul rănilor și ulcerului (Stefan și Birsa, 2019). Totodată, în medicina populară argentiniană a fost utilizată planta *Tagetes minuta* pentru tratarea bolilor infecțioase, această plantă fiind bogată în quercetagenin-7-arabinosil-galactozidă (Cushnie și Lamb, 2005). *Scutellaria baicalensis* este un alt exemplu de plantă medicinală ce a fost utilizată mii de ani în China pentru tratamentul abceselor parodontale și al rănilor orale infectate datorită conținutului de baicaleină (Tsao et al., 1982). În medicina populară din Iran, planta *Tripleurospermum disciforme* ce conține din abundență flavonoide, inclusiv apigenină, kaempferol, luteolină și quercetină este utilizată în tratamentul unor boli, dar și ca dezinfectant (Górniak et al., 2019).

Structura chimică de bază a flavonoidelor este alcătuită dintr-un schelet de difenil propan, ce conține 15 atomi de carbon în nucleul primar: două inele cu 6 atomi de carbon legate cu o unitate de 3 atomi de carbon care poate sau nu să facă parte dintr-un al treilea inel (Figura 1.1). În principal, cele două inele benzenice (inelul A și B) sunt legate între ele prin intermediul celui de-al treilea inel heterociclic de piren care conține oxigen, această structură fiind notată C6-C3-C6 (Karak, 2019).

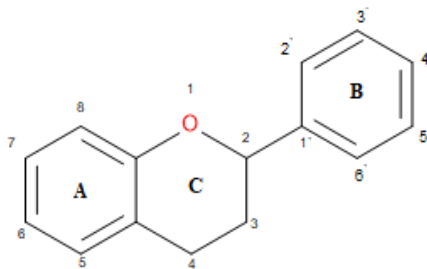


Figura 1.1. Structura de bază a flavonoidelor (după Karak, 2019)

În funcție de carbonul inelului C de care se află legat inelul B și de gradul de nesaturare și oxigenare al inelului C, flavonoidele sunt subclasificate în mai multe categorii (Bose *et al.*, 2018). Astfel, flavonoidele în care inelul B este legat în poziția 3 a inelului C se numesc izoflavone, cele în care inelul B este legat în poziția 4 se numesc neoflavone, iar cele în care inelul B este legat în poziția 2 pot fi subdivizate în mai multe subgrupuri, pe baza caracteristicilor structurale ale inelului C (Cushnie și Lamb, 2005; Bose *et al.*, 2018). Aceste subgrupuri sunt reprezentate de flavone, flavonoli, flavanone și catechine, iar flavonoidele cu inelul C deschis sunt denumite calcone (Bose *et al.*, 2018).

Flavonoidele prezintă un interes practic deosebit datorită interacțiunilor variate cu organismul uman puse pe seama proprietăților biologice antioxidante, antitumorale, anti-inflamatorii, antivirale, antibacteriene și antifungice.

CAPITOLUL 2 – FACTORI IMPLICAȚI ÎN VIRULENȚA ȘI REZISTENȚA MICROORGANISMELOR LA SUBSTANȚELE ANTIMICROBIENE

Mecanismele responsabile de virulență sunt utilizate de microorganisme pentru a depăși sistemele de apărare ale organismului țintă (Beceiro *et al.*, 2013) și sunt adesea implicate în interacțiunea directă cu țesuturile gazdei (Wu *et al.*, 2008). Mecanismele de rezistență la substanțele antimicrobiene sunt esențiale pentru a permite microorganismelor să supraviețuiască terapiilor antimicrobiene, să se adapteze și să supraviețuiască în mediile competitive și nefavorabile (Beceiro *et al.*, 2013).

Pentru ca microorganismele să poată produce infecții organismelor gazdă este nevoie de o serie de factori care să favorizeze declanșarea acestora. Printre cei mai comuni factori se numără secreția diferitelor enzime hidrolitice, formarea biofilmelor, activarea pompelor de eflux, „*quorum sensing*”, capacitatea de a-și schimba morfologia și adaptabilitatea metabolică (Leitão, 2020).

2.1. FACTORI IMPLICAȚI ÎN VIRULENȚA BACTERIILOR

Virulența reprezintă capacitatea unui agent patogen de a se multiplica și de a provoca daune gazdei sale (Poulin și Combes, 1999), în procesul de virulență bacteriană fiind implicați o serie de factori precum *quorum sensing*, capacitatea de a forma biofilme, motilitatea, producerea de toxine bacteriene, pigmenți și enzime (Silva *et al.*, 2016).

2.1.1. „Quorum sensing” (QS)

Quorum sensing se referă la un tip de „circuit molecular”, pe care multe bacterii patogene îl folosesc pentru a comunica astfel între ele prin semnale intercelulare (Dow, 2021, Banerji *et al.*, 2020). Această comunicare chimică presupune eliberarea, detectarea și răspunsul la acumularea moleculelor mici de semnalizare într-un mod dependent de densitatea celulară, reglând expresia unui set de gene țintă (Dong și Zhang, 2005).

2.1.2. Secreția de toxine

Toxinele bacteriene secretate sunt substanțe solubile care modifică metabolismul normal al celulelor gazdă, provocând efecte dăunătoare asupra gazdei (Schmitt *et al.*, 1999).

2.1.3. Secreția pigmentilor

Pigmenții sunt factori de virulență produși de bacteriile patogene, fiind necesari pentru invazia și supraviețuirea acestora. Printre cei mai cunoscuți pigmenți se numără stafiloxantina la *S. aureus*, violaceina la *Chromobacterium violaceum* (Ni *et al.*, 2020), piocianina și pioverdina la *P. aeruginosa* (Celedón și Díaz, 2021).

2.1.4. Motilitatea bacteriilor

Capacitatea unui organism de a se deplasa este definită ca motilitate (Aygan și Arıkan, 2007). Ea poate fi un factor determinant pentru supraviețuirea speciilor conferindu-le capacitatea de a se deplasa spre medii favorabile, de a scăpa de toxine, de a evita condițiile dăunătoare, permițând astfel o competiție de succes cu alte microorganisme (Duan *et al.*, 2013; Miyata *et al.*, 2020).

Motilitatea de tip swimming („de înot”)

Motilitatea de tip *swimming* este una dintre abilitățile de bază în ciclul de viață al bacteriilor, oferindu-le un avantaj în supraviețuirea în condiții de mediu nefavorabile (Zegadło *et al.*, 2023). Acest tip de motilitate este o mișcare celulară individuală care utilizează rotația unui singur flagel polar funcțional pentru a se deplasa prin mediile lichide (Ha *et al.*, 2014).

Motilitatea de tip swarming („de roire”)

Motilitatea de tip *swarming* reprezintă un mod colectiv de mișcare în care bacteriile flagelate migrează rapid pe suprafețe semi-solide (Lai *et al.*, 2009; Ariel *et al.*, 2015). Această motilitate este un fenomen intrinsec legat de suprafață și dependent de densitatea celulară, care implică diferențierea celulară, contactul între bacteriile vecine și în special migrația coordonată a celulelor (Sharma și Anand, 2002).

Motilitatea de tip twitching („de contracție”)

Motilitatea de tip *twitching* este un mod de translocare pe suprafețe, care apare în condiții de umiditate pe suprafețe semisolide sau solide, depinde de prezența pililor retractili de tip IV și este independentă de prezența unui flagel (Turnbull și Whitchurch, 2014). Mișcarea este alimentată de extensia și retracția pililor ce se poate manifesta ca un comportament colectiv multicelular complex care mediază expansiunea activă a coloniilor (Harshey, 2003; Turnbull și Whitchurch, 2014).

2.2. MECANISME DE REZISTENȚĂ LA ANTIBIOTICE

Rezistența antimicrobiană este reprezentată de capacitatea bacteriilor de a supraviețui atunci când sunt expuse la substanțele antimicrobiene (Acar și Rosel, 2001). Aceasta se poate manifesta prin diferite mecanisme de acțiune cum ar fi limitarea absorbției unui medicament, modificarea unei ținte a medicamentului, inactivarea unui medicament, efluxul activ al acestuia (Reygaert, 2018).

2.2.1. Modificarea țintei

Bacteriile pot modifica numeroase ținte pentru a dezvolta rezistența la diferite antibiotice. De exemplu, unul dintre mecanismele de rezistență la medicamentele β -lactamice este

reprezentat de modificarea structurii proteinelor de legare ale penicilinei (PBP – transpeptidaze implicate în construcția peptidoglicanului din peretele celular) (Reygaert, 2018).

2.2.2. Inactivarea antibioticelor

Bacteriile inactivează medicamentele prin două mecanisme principale: degradarea efectivă a medicamentului sau transferul unei grupe chimice către medicament (Reygaert, 2016).

Printre exemplele de inactivare ale antibioticelor se numără hidroliza antibioticelor β -lactamice (peniciline, cefalosporine, monobactamele și carbapamele) de către β -lactamaze (Kapoor *et al.*, 2017).

2.2.3. Pompele de eflux

Pompele de eflux sunt proteine membranare prezente în aproape toate organismele vii, având funcția principală de a transporta substanțele nedorite din interiorul celulei bacteriene în mediul extern (Alav *et al.*, 2018; Garcia *et al.*, 2022).

2.3. FACTORI DE VIRULENȚĂ PREZENȚI LA FUNGI

Există o serie de factori de virulență care ajută fungii să colonizeze și să infecteze organismele umane și animale (Stehr *et al.*, 2003). Printre acești factori de virulență se numără secreția unor enzime hidrolitice (Silva *et al.*, 2012), a unor molecule de semnalizare lipidică (Gauwerky *et al.*, 2009) și dimorfismul celulelor (trecerea de la forma de dermatoplast la cea de hifă) (Yang, 2003).

2.3.1. Molecule lipidice de semnalizare

Moleculele lipidice de semnalizare sunt implicate în virulența mai multor microorganisme de importanță clinică, făcând ca fungii să devină hipervirulenți (Singh și Del Poeta, 2011). La fungii patogeni, moleculele de semnalizare lipidică sunt reprezentate de sfingolipide, farnesol și oxilipide (Singh și Del Poeta, 2011).

2.3.2. Dimorfismul celulelor

Capacitatea tulpinilor de *C. albicans* de a suferi o tranziție morfologică reversibilă de la dermatoplaști (formă ovală) la filamente (pseudohife și hife) este atribuită răspunsului la o

varietate de condiții de mediu ale gazdei și este asociată cu virulența, rezistența și patogeneza acestora (Kadosh, 2019; Chen et al., 2020). Extinderea filamentelor hifelor de *C. albicans* este importantă pentru o serie de proprietăți legate de virulență, inclusiv de formarea biofilmului, liza macrofagelor, străpungerea celulelor endoteliale, invazia straturilor de celule epiteliale și a tigmotropismului (Kadosh, 2016).

2.3.3. Secreția enzimelor hidrolitice

Agenții patogeni microbieni folosesc o serie de strategii pentru a invada organismul gazdă, pentru a provoca infecții (Ghannoum, 2000) și pentru a opune rezistență la substanțele cu acțiune antimicrobiană (Schroeder *et al.*, 2017). Enzimele ce prezintă un rol important în virulența microorganismelor sunt reprezentate de fosfolipaze, esteraze, proteaze, catalaze și hemolozine.

2.4. MECANISME DE REZISTENȚĂ LA SUBSTANȚELE ANTIFUNGICE

Printre cei mai comuni factori implicați în rezistența fungilor se numără supra-exprimarea pompelor de eflux (de Waard *et al.*, 2006; Coleman și Mylonakis, 2009), modificarea țintei medicamentelor (Lee *et al.*, 2021) și formarea biofilmelor (Del Pozo, 2018).

2.4.1. Modificarea țintei de acțiune

Modificarea genetică a țintei medicamentului este un mecanism de rezistență foarte important întâlnit la fungi și are ca rezultat reducerea afinității pentru antimicotice (Perlin *et al.*, 2015). Până în prezent au fost caracterizate mai multe modificări ale țintelor care au ca rezultat rezistența la substanțele antifungice (McKeegan *et al.*, 2002).

2.4.2. Formarea biofilmelor

Biofilmele microbiene sunt comunități de celule sesile (Sharma *et al.*, 2019) înglobate în substanțe polimerice extracelulare (EPS) (Wolfmeier *et al.*, 2018), fiind considerate cea mai comună stare de creștere pentru multe microorganisme (Nobile și Johnson, 2015; Lohse *et al.*, 2018).

Celulele din biofilme prezintă proprietăți care sunt distincte de cele planctonice (celulele ce plutesc liber) (Pierce *et al.*, 2009), cum ar fi expresia genelor, rata de creștere mai scăzută și

rezistența mai mare la substanțele antimicrobiene (Cavalheiro și Teixeira, 2018; Sharma *et al.*, 2019).

Datorită acestor caracteristici generale, biofilmele sunt foarte dificil de eradicat (Del Pozo, 2018) și potențează apariția infecțiilor în organismul gazdă (Cavalheiro și Teixeira, 2018). Mai mult, celulele din biofilme sunt în mod inerent insensibile la substanțele antimicrobiene, fiind considerate de aproximativ 1000 de ori mai rezistente decât celulele planctonice (Del Pozo, 2018; Rumbaugh și Sauer, 2020).

PARTEA A-II-A – CONTRIBUȚII PERSONALE

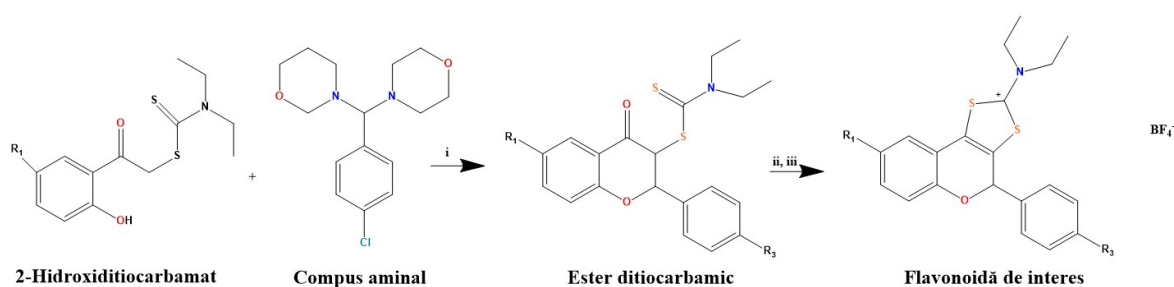
CAPITOLUL 1 – SELECȚIA UNOR FLAVONOIDE SINTETICE TRICICLICE CU ACTIVITATE ANTIMICROBIANĂ

1.1. MATERIALE, ECHIPAMENTE ȘI METODE DE LUCRU

1.1.1. Sinteza flavonoidelor sintetice triciclice cu sulf

Flavonoidele testate în acest studiu au fost sintetizate în cadrul Facultății de Chimie a Universității „Alexandru Ioan Cuza” din Iași de către grupul de cercetare coordonat de Prof. dr. habil. Lucian Bîrsă. S-au sintetizat două serii de flavonoide triciclice cu sulf având ca derivați halogenați Br și Cl. Flavonoidele din seria cu brom conțin Br în poziția R₁, iar în poziția R₂ conțin F, Br, Cl sau I, în timp ce flavonoidele din seria cu clor au Cl în poziția R₂, iar în poziția R₁ conțin F, Br, Cl sau I – Figura 1.1.

Sinteza celor două serii de flavonoide a avut loc în două etape, iar structura și puritatea lor au fost analizate prin RMN (rezonanță magnetică nucleară), SM (spectrometrie de masă) și IR (spectrometrie de infraroșu) (Bahrin *et al.*, 2014). În Figura 1.1 este prezentată schema generală de obținere a flavonoidelor sintetice triciclice cu sulf:



i) EtOH, reflux 2 ore; ii) H₂SO₄/AcOH=1/3 (v/v), 80 °C 10 minute; iii) KBF₄

	R1	R3
Seria 1 - Br	Br	F
		Br
		Cl
		I
Seria 2 - Cl	Cl	F
		Br
		Cl
		I

Figura 1.1. Schema generală de obținere a celor două serii de flavonoide sintetice triciclice cu sulf (Bahrin *et al.*, 2014)

1.1.2. Determinarea concentrației minime inhibitorii și a concentrației minime bactericide/fungicide

Metoda diluțiilor seriate este frecvent utilizată pentru testarea sensibilității microorganismelor atât în laboratoarele de cercetare, cât și în cele clinice (Reimer *et al.*, 1981). Determinarea concentrației minime inhibitorii (CMI) se realizează în plăci cu 96 godeuri prin stabilirea celei mai mici concentrații de substanță antimicrobiană necesară pentru a inhiba dezvoltarea microorganismelor (Lambert și Pearson, 2000; Wiegand *et al.*, 2008).

1.1.3. Evoluția unei populații bacteriene/fungice într-o cultură discontinuă asincronă

Evidențierea efectului antimicrobian al flavonoidelor sintetice triciclice cu sulf se apreciază urmărind dinamica creșterii bacteriilor/funghiilor într-o cultură discontinuă asincronă.

1.1.4. Aprecierea viabilității celulelor microbiene după expunerea la flavonoide prin metoda numărării coloniilor dezvoltate pe medii solide

Testul de viabilitate celulară se realizează pentru a evalua eficiența flavonoidelor sintetice triciclice cu sulf asupra tulpinilor bacteriene și fungice. Acesta se bazează pe faptul că fiecare celulă rămasă viabilă în urma expunerii la agentul antimicrobian determină formarea unei colonii vizibile cu ochiul liber pe suprafața mediului de cultură.

1.2. REZULTATE ȘI DISCUȚII

1.2.1. Activitatea antibacteriană și antifungică a unor flavonoide sintetice triciclice cu sulf

Activitatea antimicrobiană a flavonoidelor a variat în funcție de agentul patogen studiat și de flavonoida testată. Astfel, după cum se poate observa în Tabelul 1.1, bacteriile Gram-pozitive au fost mai sensibile la flavonoidele testate, cele mai mici valori ale CMI fiind de 0,12 $\mu\text{g/ml}$ (înregistrate pentru o tulpină de *B. subtilis*), în timp ce bacteriile Gram-negative au prezentat valori minime ale CMI de 3,9 $\mu\text{g/ml}$ (pentru o tulpină de *E. coli*). În plus, trebuie să subliniem faptul că în cazul flavonoidei BrCl au fost înregistrate cele mai mici valori CMI asupra bacteriilor. Totodată, flavonoidele au înregistrat valori ale CMI cuprinse între 3,9 $\mu\text{g/ml}$ și 62,5 $\mu\text{g/ml}$ împotriva tulpinilor fungice testate - Tabel 1.1. Cele mai mici valori ale CMI au fost obținute în cazul flavonoidelor BrCl, BrBr și BrI asupra tulpinii *C. albicans* P37037.

Tabel 1.1. Valorile concentrațiilor minime inhibitorii determinate în prezența flavonoidelor testate

Tulpini testate	CMI flavonoide ($\mu\text{g/ml}$)						
	FCI	CICI	BrCl	ICI	BrF	BrBr	BrI
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	3,9	0,48	0,24*	0,48	3,9	0,24	0,48
<i>B. subtilis</i> ssp. <i>spizizenii</i> ATCC 6633	0,24	0,12	0,24*	0,24	-	-	-
<i>E. coli</i> ATCC 25922	125	125	3,95*	3,95	125	15,62	15,62
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	125	125	-	62,5	-	-	-
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 13883	125	31,25	7,81*	62,5	125	250	125
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	31,25	15,62	15,62	7,81	31,25	15,62	7,81
<i>C. albicans</i> P37037	15,62	7,81	3,9	7,81	31,25	3,9	3,9
<i>C. albicans</i> Prx	31,25	15,62	7,81	7,81	31,25	15,62	7,81
<i>C. krusei</i> Prx	31,25	7,81	15,62	7,81	62,5	7,81	7,81
<i>C. parapsilosis</i> Prx	31,25	15,62	15,62	-	31,25	7,81	3,9
<i>C. glabrata</i> Cam	31,25	15,62	15,62	-	62,5	15,62	7,81

CMI = concentrația minimă inhibitorie

* valori obținute de Babii (2019)

După confirmarea faptului că flavonoidele sintetice triciclice cu sulf posedă o activitate antibacteriană și antifungică împotriva tuturor tulpinilor testate, am evaluat în continuare efectul bactericid sau fungicid al acestora. În urma rezultatelor obținute am observat că flavonoidele au prezentat valori ale CMB cuprinse între 0,24 $\mu\text{g/ml}$ și 7,8 $\mu\text{g/ml}$ pentru bacteriile Gram-pozitive, respectiv între 15,62 – 250 $\mu\text{g/ml}$ pentru bacteriile Gram-negative testate. În cazul tulpinilor de *Candida* investigate, valorile CMF au variat între 31,25 $\mu\text{g/ml}$ și 125 $\mu\text{g/ml}$ - Tabelul 1.2.

Tabel 1.2. Valorile concentrațiilor minime bactericide și fungicide determinate în prezența flavonoidelor testate

Tulpini testate	CMB/CMF flavonoide (µg/ml)						
	FCl	CICl	BrCl	ICl	BrF	BrBr	BrI
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	7,8	0,95	0,48*	1,95	3,9	0,48	0,48
<i>B. subtilis</i> ssp. <i>spizizenii</i> ATCC 6633	0,48	0,24	0,48*	0,97	-	-	-
<i>E. coli</i> ATCC 25922	250	31,25	31,25*	15,62	250	31,25	31,25
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	250	250	-	-	-	-	-
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 13883	250	31,25	125*	-	250	250	125
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	31,25	31,25	-	-	125	31,25	7,8
<i>C. albicans</i> P37037	62,5	15,62	62,5	-	125	125	125
<i>C. albicans</i> Prx	62,5	15,62	-	-	125	15,62	15,62
<i>C. krusei</i> Prx	62,5	15,62	-	-	125	15,62	15,62
<i>C. parapsilosis</i> Prx	125	31,25	-	-	125	15,62	15,62
<i>C. glabrata</i> Cam	62,5	15,62	-	-	250	31,25	15,62

CMB = concentrația minimă bactericidă

CMF = concentrația minimă fungicidă

* valori obținute de Babii (2019)

1.2.2. Efectul flavonoidelor asupra creșterii unor populații microbiene

Flavonoidele ce fac parte din seria cu clor ca substituent halogenat au determinat un efect bacteriostatic semnificativ ($p < 0,05$) asupra tulpinii *S. aureus* ATCC 25923 de până la 11-12 ore la o concentrație echivalentă cu CMI și $2 \times$ CMI. În ceea ce privește concentrația echivalentă cu $\frac{1}{2}$ CMI, flavonoida FCl a prezentat o întârziere a creșterii de cel puțin 9 ore (Figura 1.2-A), în timp ce flavonoida ICl a inhibat creșterea celulelor de *S. aureus* timp de doar 3 ore (Figura 1.2-B) în comparație cu controlul.

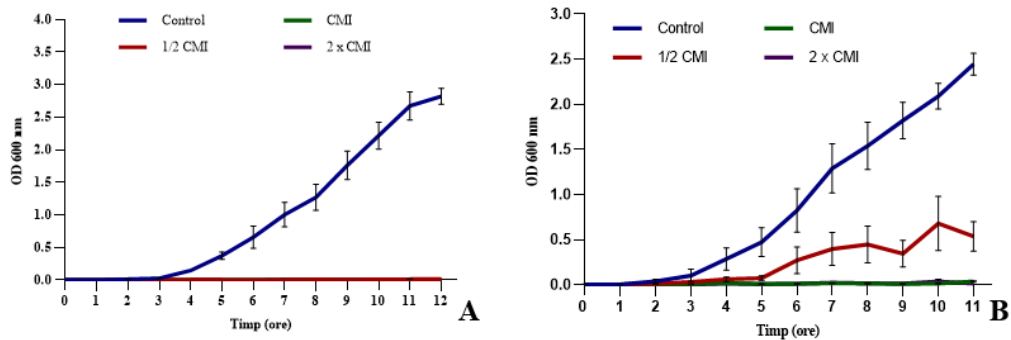


Figura 1.2. Dinamica creşterii tulpinii *S. aureus* ATCC 25923 în prezenţa flavonoidelor: A – FCI (CMI = 3,9 µg/ml) şi B – ICI (CMI = 0,48 µg/ml).

Flavonoidele din seria cu brom ca substituent halogenat au determinat un însemnat efect bacteriostatic asupra tulpinii *S. aureus* ATCC 25923. Astfel, la o concentraţie egală cu ½ CMI, flavonoida BrF a inhibat creşterea celulelor timp de aproximativ 2 ore (Figura 1.3-A), flavonoida BrBr a determinat o inhibare de 8 ore (Figura 1.3-B), iar flavonoida BrI a prezentat un efect bacteriostatic de cel puţin 5 ore (Figura 1.3-C) în comparaţie cu controlul.

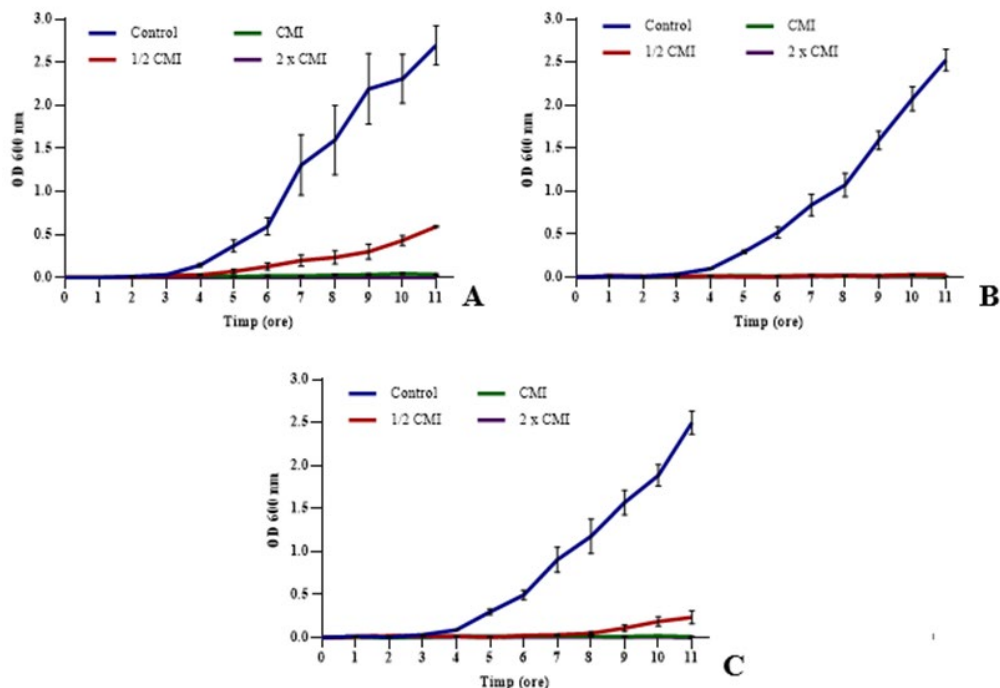


Figura 1.3. Dinamica creşterii tulpinii *S. aureus* ATCC 25923 în prezenţa flavonoidelor: A – BrF (CMI = 3,9 µg/ml), B – BrBr (CMI = 0,24 µg/ml) şi C – BrI (CMI = 0,48 µg/ml).

Flavonoidele FCI şi ICI au determinat un efect bacteriostatic semnificativ asupra tulpinii testate. Astfel, la o concentraţie echivalentă cu CMI şi 2 x CMI ambele flavonoide au manifestat efect bacteriostatic pe toată durata experimentului. La concentraţia egală cu ½ CMI, flavonoida

FCl a inhibat creșterea celulelor timp de cel puțin 12 ore (Figura 1.4-A), iar flavonoida IC1 a determinat o prelungire a fazei de lag de doar 4 ore în comparație cu controlul (Figura 1.4-B).

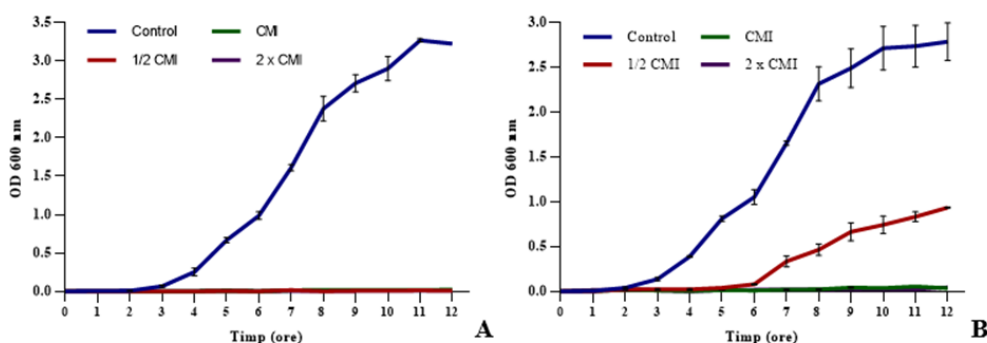


Figura 1.4. Dinamica creșterii tulpinii *E. coli* ATCC 25922 în prezența flavonoidelor: A – FCl (CMI = 125 µg/ml) și B – IC1 (CMI = 1,95 µg/ml).

Utilizate într-o concentrație echivalentă cu CMI și $2 \times$ CMI, flavonoidele BrBr și BrI au prezentat un efect bacteriostatic pe toată durata experimentelor (24 ore). În ceea ce privește concentrațiile echivalente cu $\frac{1}{2}$ CMI, flavonoida BrBr a determinat o inhibare a creșterii celulelor de *E. coli* timp de aproximativ 4 ore (Figura 1.5-A). La concentrații echivalente cu $\frac{1}{2}$ CMI, flavonoida BrI a o inhibat creșterea bacteriană pentru aproximativ 4 ore, în timp ce concentrațiile echivalente cu CMI au avut un efect bacteriostatic similar cu $2 \times$ CMI - Figura 1.5-B.

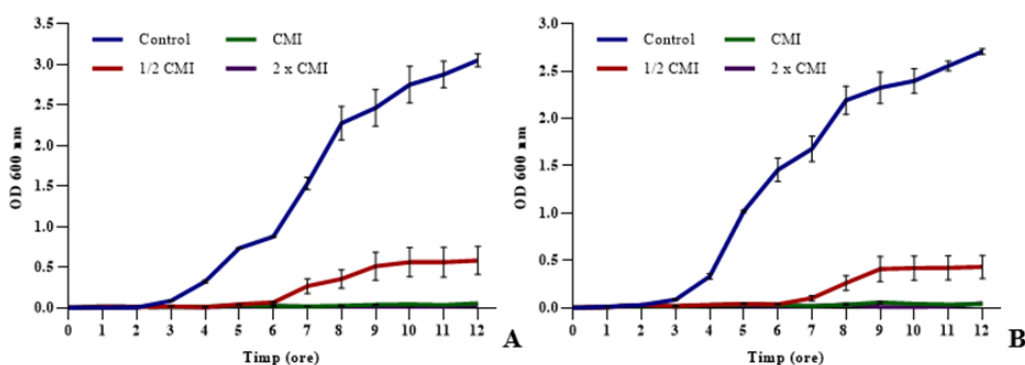


Figura 1.5. Dinamica creșterii tulpinii *E. coli* ATCC 25922 în prezența flavonoidelor: A – BrBr (CMI = 15,62 µg/ml) și B – BrI (CMI = 15,62 µg/ml).

Pentru a mări spectrul microorganismelor analizate, flavonoidele sintetice triciclice cu sulf au fost testate și împotriva fungilor de tipul *C. albicans*. Utilizate într-o concentrație echivalentă cu $2 \times$ CMI, flavonoidele FCl, ClCl și IC1 au prezentat efect fungistatic de cel puțin

22 ore în comparație cu controlul. La o concentrație echivalentă cu CMI, flavonoidele FCl și ICl au determinat un efect fungistatic de aproximativ 19 ore (Figura 1.6-A), respectiv 14 ore (Figura 1.6-C), în timp ce flavonoida ClCl a determinat un efect fungistatic de aproximativ 24 ore (Figura 1.6-B). În ceea ce privește concentrația echivalentă cu $\frac{1}{2}$ CMI, flavonoidele au inhibat dezvoltarea celulelor fungice timp de 14, 10, respectiv 20 ore.

După expunerea la flavonoida BrF timp de 34 ore, nu s-au observat modificări semnificative ale densității celulare la concentrația echivalentă cu $2 \times$ CMI în comparație cu controlul, în timp ce la concentrațiile egale cu $\frac{1}{2}$ CMI și CMI nu au existat diferențe față de control (Figura 1.7-A). În ceea ce privește flavonoida BrBr, aceasta a inhibat creșterea celulelor de *C. albicans* aproximativ 14 ore la o concentrație echivalentă cu CMI, iar la o concentrație de $2 \times$ CMI flavonoida a manifestat un efect fungistatic mai mult de 24 ore (Figura 1.7-B). Un efect fungistatic important îl prezintă și flavonoida BrI, aceasta inhibând creșterea celulelor aproximativ 18 ore la toate concentrațiile utilizate (Figura 1.7-C).

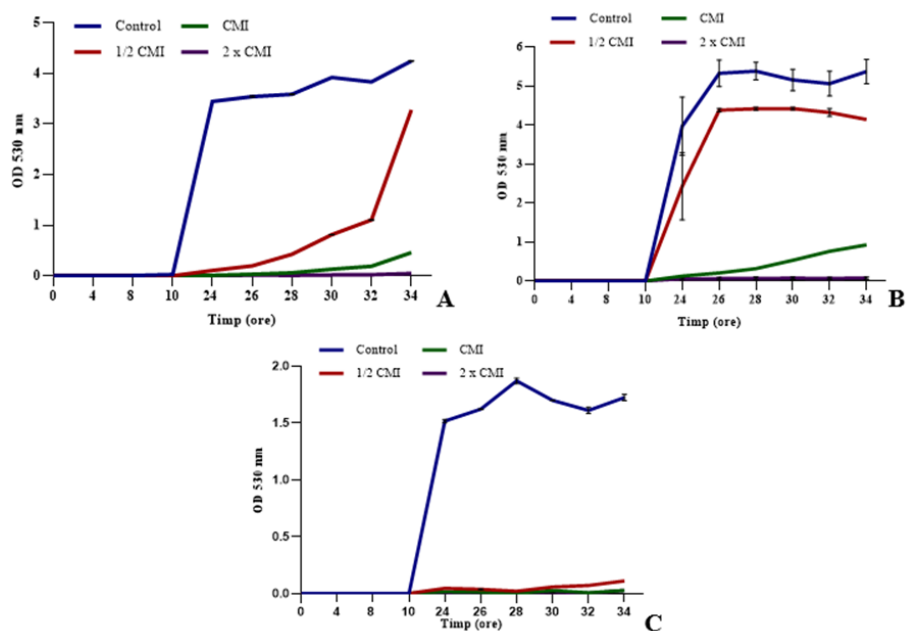


Figura 1.6. Dinamica creșterii tulpinii *C. albicans* P37037 în prezența flavonoidelor: A – FCl (CMI = 15,62 $\mu\text{g/ml}$), B – ClCl (CMI = 7,8 $\mu\text{g/ml}$) și C – ICl (CMI = 15,62 $\mu\text{g/ml}$).

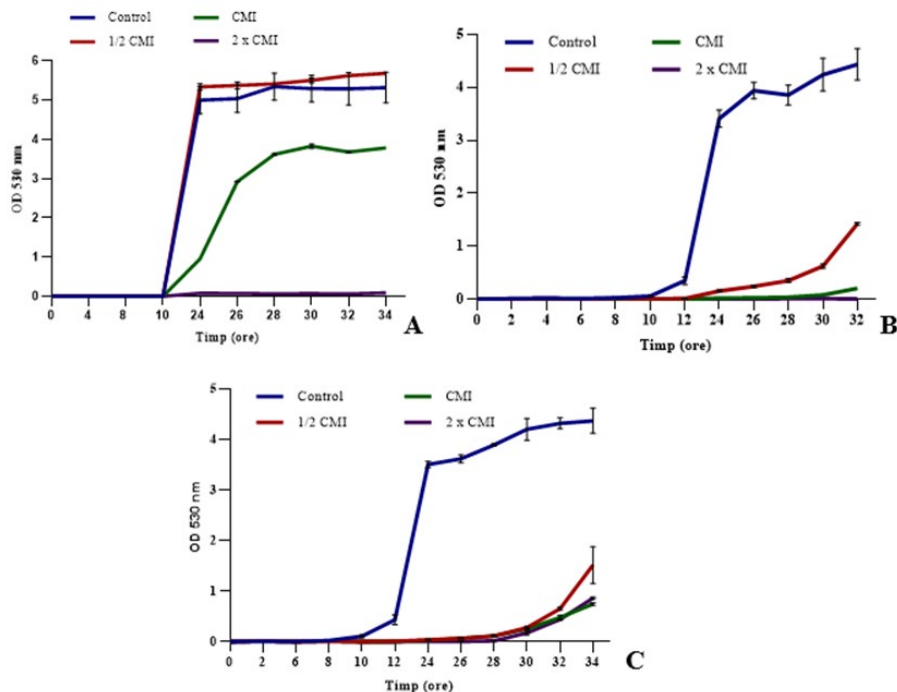


Figura 1.7. Dinamica creșterii tulpinii *C. albicans* P37037 în prezența flavonoidelor: A – BrF (CMI = 15,62 $\mu\text{g/ml}$), B – BrBr (CMI = 3,9 $\mu\text{g/ml}$) și C – BrI (CMI = 3,9 $\mu\text{g/ml}$).

1.2.3. Aprecierea efectului flavonoidelor triciclice cu sulf asupra viabilității celulelor bacteriene și fungice

În Figura 1.8 este reprezentată activitatea flavonoidelor FCl și ICl asupra viabilității tulpinii *S. aureus* ATCC 25923. Flavonoida FCl utilizată într-o concentrație echivalentă cu $2 \times \text{CMI}$ a dus la pierderea totală a viabilității celulelor de *S. aureus* după doar 2 ore de expunere (Figura 1.8-A). De remarcat este faptul că flavonoida ICl (Figura 1.8-B) utilizată într-o concentrație de 3,9 $\mu\text{g/ml}$ a manifestat același efect de tip *total kill* ca și flavonoida FCl utilizată într-o concentrație egală cu 7,8 $\mu\text{g/ml}$.

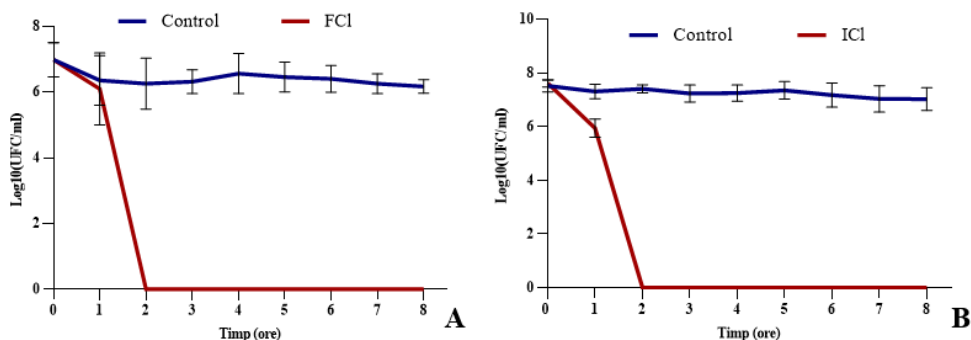


Figura 1.8. Aprecierea viabilității celulelor de *S. aureus* ATCC 25923 în prezența flavonoidelor: A – FCl ($2 \times$ CMI = 7,8 µg/ml) și B – ICl ($2 \times$ CMI = 3,9 µg/ml).

Expunerea celulelor de *S. aureus* la flavonoidele seriei Br a condus de asemenea la reducerea semnificativă a viabilității, față de celule din control care au rămas viabile pe toată durata experimentului. La o concentrație echivalentă cu $2 \times$ CMI flavonoida BrF a determinat reducerea totală a viabilității celulelor după 4 ore (Figura 1.9-A). O reducere a viabilității celulare cu mai mult de $8 \log_{10}$ a fost înregistrată și în cazul flavonoidelor BrBr (Figura 1.9-B) și BrI (Figura 1.9-C), după doar două ore de la expunere.

În ceea ce privește celulele de *E. coli*, acestea și-au pierdut viabilitatea după doar 2 ore în prezența flavonoidei ICl la o concentrație echivalentă cu $2 \times$ CMI (7,81 µg/ml) - Figura 1.10.

O reducere a viabilității celulare cu aproximativ $8 \log_{10}$ a fost înregistrată și în cazul flavonoidelor BrBr (Figura 1.11-A) și BrI (Figura 1.11-B). Acestea, utilizate într-o concentrație echivalentă cu $2 \times$ CMI au dus la pierderea totală a viabilității celulelor de *E. coli* tot după cel mult o oră de la expunere.

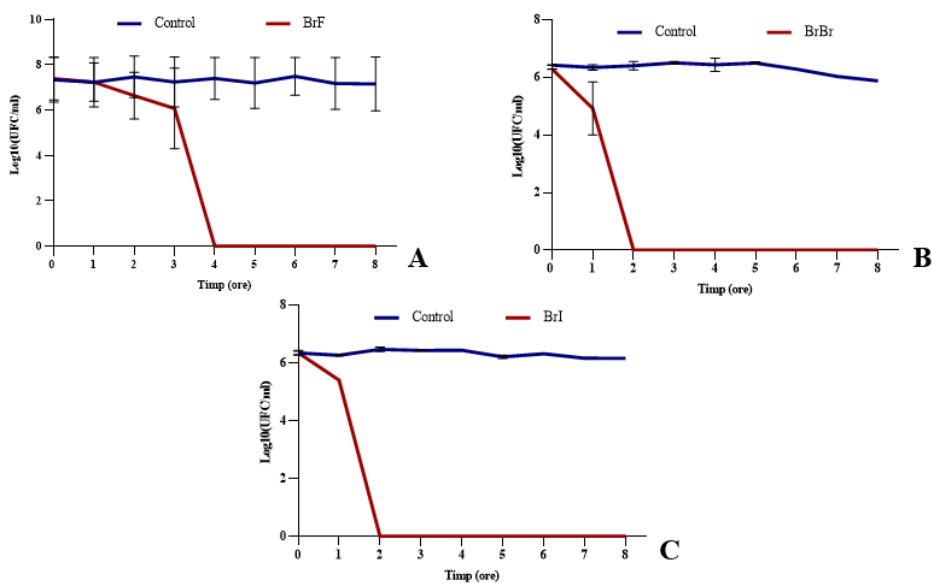


Figura 1.9. Aprecierea viabilității celulelor de *S. aureus* ATCC 25923 în prezența flavonoidelor: A – BrF ($2 \times$ CMI = 0,95 µg/ml), B – BrBr ($2 \times$ CMI = 0,95 µg/ml) și C – BrI ($2 \times$ CMI = 0,95 µg/ml).

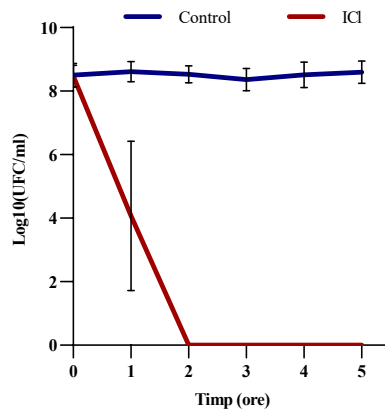


Figura 1.10. Aprecierea viabilității celulelor de *E. coli* ATCC 25922 în prezența flavonoidei ICI ($2 \times \text{CMI} = 7,81 \mu\text{g/ml}$).

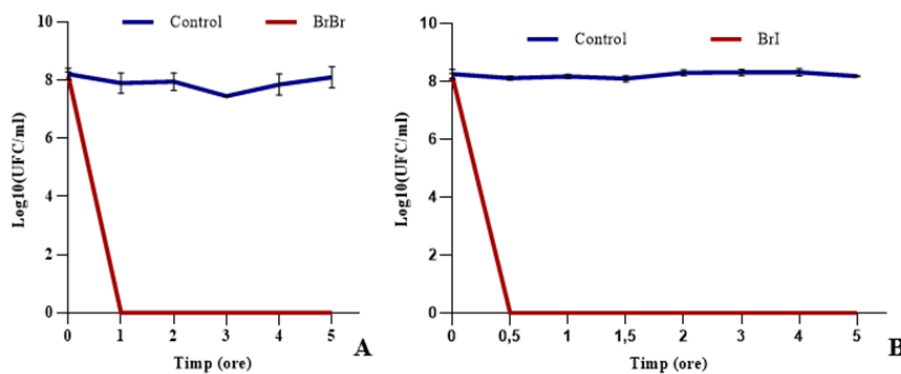


Figura 1.11. Aprecierea viabilității celulelor de *E. coli* ATCC 25922 în prezența flavonoidelor: A – BrBr ($2 \times \text{CMI} = 31,25 \mu\text{g/ml}$) și B – BrI ($2 \times \text{CMI} = 31,25 \mu\text{g/ml}$).

Ținând cont de activitatea antimicrobiană promițătoare a flavonoidei BrCl precum și de rezultatele obținute anterior în cadrul grupului de cercetare de către Cornelia Babii asupra unor tulpini bacteriene, am hotărât să extindem studiile privind spectrul antimicrobian al flavonoidei BrCl și asupra unor tulpini fungice. Prin urmare, studiul nostru s-a axat în continuare pe stabilirea mecanismelor de acțiune ale flavonoidei BrCl asupra unor tulpini patogene de *Candida*, precum și pe activitatea acesteia asupra unor factori implicați în virulența și rezistența bacteriilor și fungilor.

CAPITOLUL 2 – MECANISME DE ACȚIUNE ALE FLAVONOIDEI BrCl

2.2. MATERIALE, ECHIPAMENTE ȘI METODE DE LUCRU

2.2.1. Evaluarea efectului flavonoidei BrCl asupra integrității membranare a celulelor de *C. albicans*

Membranele celulare intacte sunt în condiții anatomo-fiziologice normale impermeabile pentru fluorocromi (ex. iodură de propidiu). Acestea devin permeabile pentru fluorocromi doar atunci când sunt lezate sau distruse. Pentru a evalua efectul flavonoidei BrCl asupra integrității membranare se utilizează microscopia cu fluorescență.

2.2.2. Optimizarea metodei de deshidratare a celulelor de *C. albicans* în vederea examinării la microscopul electronic cu baleiaj (SEM)

Pentru ca morfologia celulelor bacteriene și fungice să poată fi observată la microscopul electronic cu baleiaj este necesară identificarea unei metode de deshidratare a celulelor, astfel încât deshidratarea să nu determine apariția unor lezări/modificări ale acestora.

2.2.3. Evaluarea morfologiei celulelor de *C. albicans* Prx în prezența flavonoidei BrCl folosind microscopia electronică cu baleiaj (SEM)

Identificarea eventualelor modificări ale morfologiei celulelor fungice în prezența flavonoidei BrCl s-a realizat utilizând microscopia electronică cu baleiaj (SEM).

2.2.4. Aprecierea legării sorbitolului în prezența flavonoidei BrCl

Investigarea activității unei substanțe cu acțiune antifungică asupra peretelui celulelor de *Candida* se realizează utilizând testul de legare al sorbitolului (determinarea CMI în prezența și absența sorbitolului 0,8 M).

2.3. REZULTATE ȘI DISCUȚII

2.3.1. Evaluarea efectului flavonoidei BrCl asupra integrității membranare

Analiza fotografiilor obținute la microscopul cu fluorescență demonstrează că după doar 4 ore de la expunerea la ambele concentrații de flavonoidă testate apar primele celule fluorescente. Celulele control au rămas nefluorescente, semn că membrana lor rămâne intactă (impermeabilă pentru iodura de propidiu) pe toată durata experimentului - Figura 2.1.

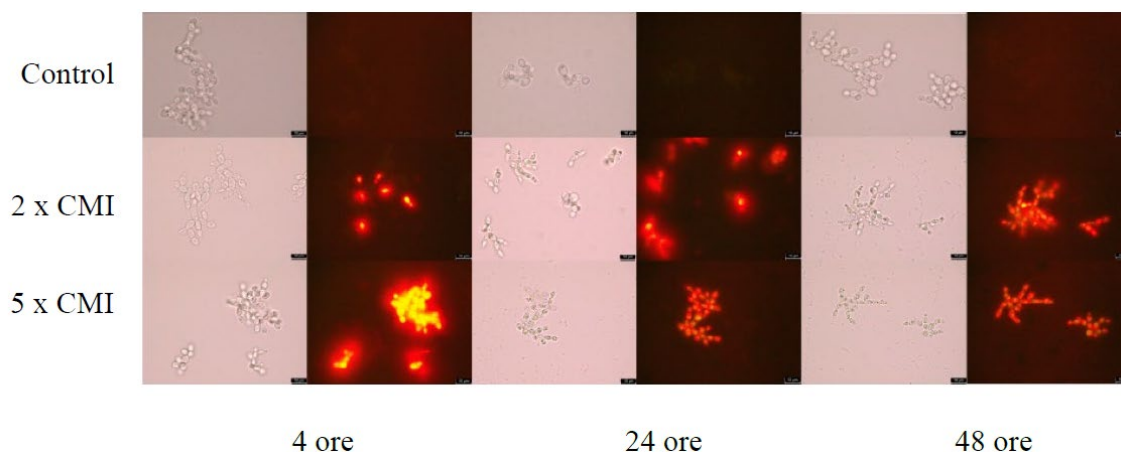


Figura 2.1. Evaluarea efectului flavonoidei BrCl asupra permeabilizării membranei celulelor de *C. albicans* Prx folosind microscopia cu fluorescență. Celulele fluorescente au fost observate în probe după 4, 24 și 48 ore de la expunerea la flavonoida BrCl.

După doar o oră de incubare, membrana celulelor a fost lezată sau distrusă într-o proporție de 75%, iar după 24 ore procentajul celulelor fluorescente a ajuns la 100% (Figura 2.2). De remarcă este faptul că efectul flavonoidei BrCl asupra permeabilizării membranei celulelor de *C. albicans* este dependent de doza utilizată. Creșterea concentrației flavonoidei BrCl duce la creșterea numărului de celule fluorescente concomitent cu diminuarea timpului de expunere.

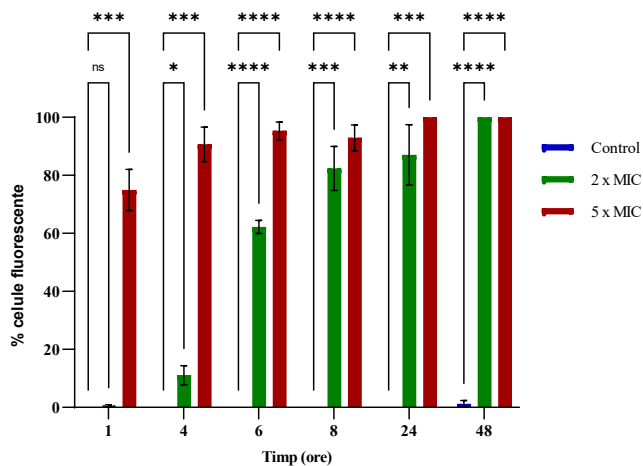


Figura 2.2. Efectul flavonoidei BrCl asupra permeabilității membranelor a celulelor de *C. albicans* Prx. Celulele au fost expuse la flavonoida BrCl într-o concentrație echivalentă cu $2 \times$ CMI (31,25 $\mu\text{g/ml}$) și $5 \times$ CMI (78,1 $\mu\text{g/ml}$) ($p < 0,05$).

2.3.2. Selectarea unor metode de deshidratare a celulelor de *Candida* în vederea utilizării SEM

În urma testării celor 7 variante de deshidratare (Figura 2.3), s-a observat că metodele care nu provoacă modificări ale peretelui celulelor de *C. albicans* sunt cele notate cu A, C și G. Selectarea variantelor de deshidratare a fost realizată pe baza imaginilor obținute la microscopul electronic cu baleiaj în literatura de specialitate (Staniszewska *et al.*, 2013).

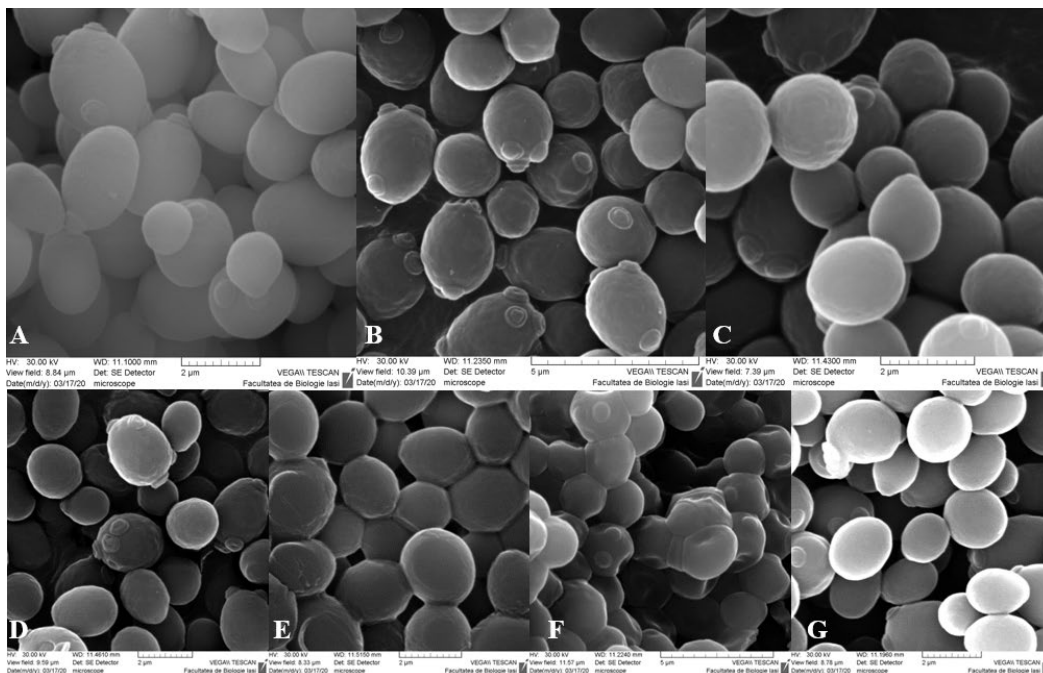


Figura 2.3. Imagini electronomicroscopice ale celulelor de *C. albicans* P37037 supuse unor metode diferite de deshidratare. A-G: variante utilizate pentru deshidratare.

2.3.3. Flavonoida BrCl induce modificări semnificative ale morfologiei celulelor de *C. albicans* Prx

Efectul flavonoidei BrCl asupra morfologiei celulelor de *C. albicans* Prx a fost pus în evidență cu ajutorul microscopiei electronice cu baleiaj. După cum se poate observa în Figura 2.4-A, celulele din control prezintă o formă regulată, sunt intacte și au suprafața celulară netedă. În schimb, celulele expuse la flavonoida BrCl într-o concentrație echivalentă cu $5 \times$ CMI prezintă deteriorări morfologice ireversibile, acestea având un aspect neregulat, fiind deteriorate, contractate sau zbârcite (Figura 2.4-B). Deformarea peretelui celular poate duce la pierderea integrității funcționale atât a peretelui cât și a membranei ceea ce ar putea cauza moartea celulei.

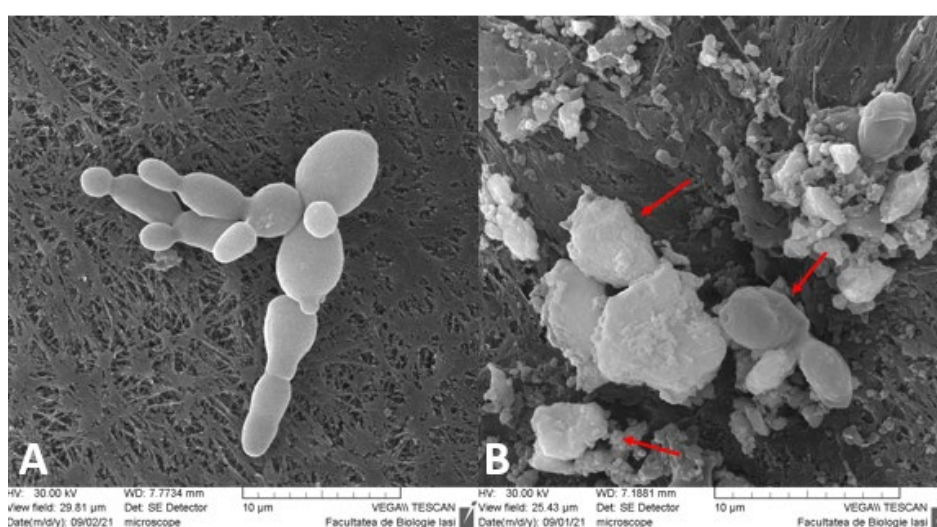


Figura 2.4. Efectul flavonoidei BrCl asupra morfologiei celulelor de *C. albicans*. A – control, B – celule expuse timp de 6 ore la flavonoida BrCl. Săgețile indică modificări morfologice ireversibile ale celulelor tratate cu flavonoida BrCl ($5 \times$ CMI).

2.3.4. Aprecierea legării sorbitolului

Rezultatele obținute de noi arată că în momentul în care celulele de *Candida* au fost expuse la flavonoida BrCl în prezența sorbitolului, valoarea concentrației minime inhibitorii ($7,8 \mu\text{g/ml}$ și $15,62 \mu\text{g/ml}$) nu s-a modificat semnificativ în comparație cu valoarea concentrației minime inhibitorii ($15,62 \mu\text{g/ml}$) obținute în absența sorbitolului. Acest comportament sugerează că flavonoida BrCl nu acționează prin afectarea integrității peretelui celular al tulpinilor de *Candida* testate (Tabel 2.1).

Tabel 2.1. Valorile concentrațiilor minime inhibitorii ale flavonoidei BrCl determinate în absența sau prezența sorbitolului (0,8 M) împotriva unor tulpini de *Candida*

Tulpina testată	CMI (μg/ml)	
	BrCl	BrCl + sorbitol (0,8 M)
<i>C. albicans</i> Prx	15,62	7,8
<i>C. parapsilosis</i>	15,62	7,8
<i>C. krusei</i> Prx	15,62	15,62
<i>C. glabrata</i> Cam	15,62	7,8

CAPITOLUL 3 – FACTORI IMPLICAȚI ÎN VIRULENȚA ȘI REZISTENȚA BACTERIILOR

3.1. MATERIALE, ECHIPAMENTE ȘI METODE DE LUCRU

3.1.1. Evaluarea motilității de tip *swimming*, *swarming* și *twitching*

Evidențierea motilității bacteriilor se realizează prin cultivarea acestora pe suprafața mediilor semisolide, sau la interfața netedă formată între mediile de creștere semisolide și suprafețele din plastic sau sticlă. Bacteriile ce prezintă motilitate se dezvoltă într-un mod caracteristic pe suprafața plăcilor în care sunt cultivate. Diametrul suprafeței colonizate poate fi măsurat și utilizat pentru aprecierea motilității.

3.1.2. Determinarea activității flavonoidei BrCl asupra motilității de tip *swimming*, *swarming* și *twitching*

Efectul flavonoidei BrCl asupra motilității de tip *swimming*, *swarming* și *twitching* se apreciază macroscopic prin măsurarea diametrului zonei de colonizare și compararea acestuia cu diametrul zonei colonizate al plăcilor suplimentate cu DMSO (control).

3.1.3. Aprecierea efectului flavonoidei BrCl asupra pompelor de eflux

Stabilirea efectului flavonoidei BrCl asupra pompelor de eflux s-a determinat în prezența bromurii de etidiu.

3.2. REZULTATE ȘI DISCUȚII

3.2.1. Selectarea tulpinii ce prezintă motilitate de tip *swimming*, *swarming* și *twitching*

Motilitatea de tip swimming

După 48 ore de incubare am constatat că tulpina *P. aeruginosa* 124 prezintă o motilitate mai mare în comparație cu controlul pozitiv (*P. aeruginosa* PAO1), aceasta colonizând toată suprafața mediului de cultură (Figura 3.1). Diametrul zonei de colonizare de *P. aeruginosa* ATCC 27853 a fost de 25 mm în comparație cu tulpina control care a prezentat un diametru de 30 mm.

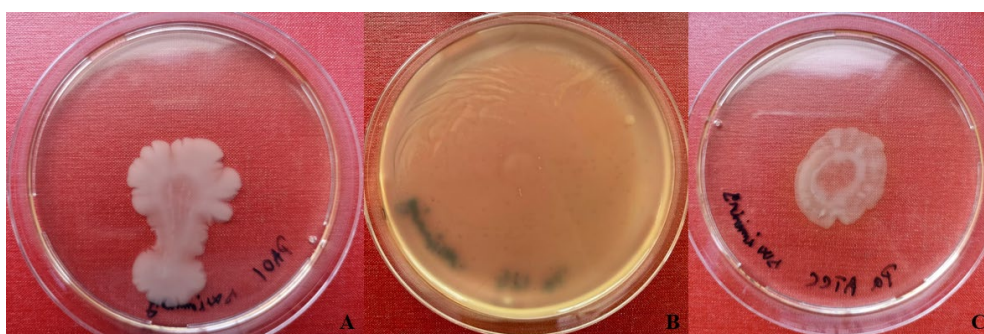


Figura 3.1. Evidențierea motilității de tip *swimming* la tulpini aparținând genului *Pseudomonas*: A – *P. aeruginosa* PAO1 (control), B – *P. aeruginosa* 124 și C – *P. aeruginosa* ATCC 27853.

Motilitatea de tip swarming

După 48 ore de incubare, am observat că o motilitate comparabilă cu cea a tulpinii control utilizate (*P. aeruginosa* PAO1) o prezintă *P. aeruginosa* ATCC 27853, pentru ambele tulpini înregistrându-se un diametru al zonei de colonizare egal cu 31 mm. Ca și în cazul motilității de tip *swimming*, cea mai crescută motilitate de tip *swarming* a fost înregistrată în cazul tulpinii *P. aeruginosa* 124, care a colonizat toată suprafața plăcii (85 mm) – Figura 3.2.



Figura 3.2. Evidențierea motilității de tip *swarming* la tulpini aparținând genului *Pseudomonas*: A – *P. aeruginosa* PAO1 (control), B – *P. aeruginosa* 124 și C – *P. aeruginosa* ATCC 27853.

Motilitatea de tip twitching

Cele două tulpini de *Pseudomonas* (*P. aeruginosa* 124 și *P. aeruginosa* ATCC 27853) au fost evaluate și în ceea ce privește motilitatea de tip *twitching*. Astfel, s-a observat că ambele tulpini testate au prezentat o motilitate mai crescută în comparație cu controlul pozitiv utilizat (*P. aeruginosa* PAO1) - Figura 3.3. Diametrul zonei de colonizare al tulpinii *P. aeruginosa* 124 a fost de 16 mm, cel colonizat de *P. aeruginosa* ATCC 27853 a fost de 25 mm, în timp ce diametrul zonei de colonizare al tulpinii control utilizată a fost de 10 mm.

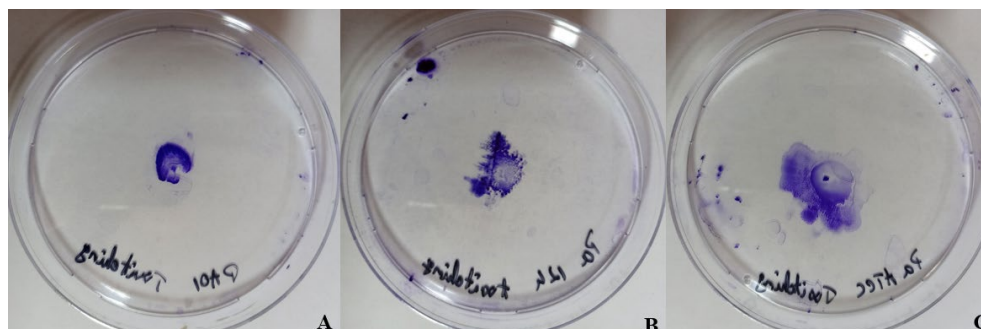


Figura 3.3. Evidențierea motilității de tip *twitching* la tulpini aparținând genului *Pseudomonas*: A – *P. aeruginosa* PAO1 (control), B – *P. aeruginosa* 124 și C – *P. aeruginosa* ATCC 27853.

3.2.2. Flavonoida BrCl inhibă motilitatea de tip *swimming*, *swarming* și *twitching* la *P. aeruginosa* 124

Motilitatea de tip swimming

Impactul flavonoidei BrCl asupra motilității de tip *swimming* a fost investigat utilizând tulpina *P. aeruginosa* 124 pe parcursul a 72 ore. S-a observat că prezența flavonoidei BrCl în concentrații echivalente cu $\frac{1}{8}$ CMI (0,48 $\mu\text{g/ml}$), $\frac{1}{4}$ CMI (0,9 $\mu\text{g/ml}$) și $\frac{1}{2}$ CMI (1,9 $\mu\text{g/ml}$) a inhibat semnificativ motilitatea de tip *swimming* în comparație cu controlul pe tot parcursul desfășurării experimentului (Figura 3.4).

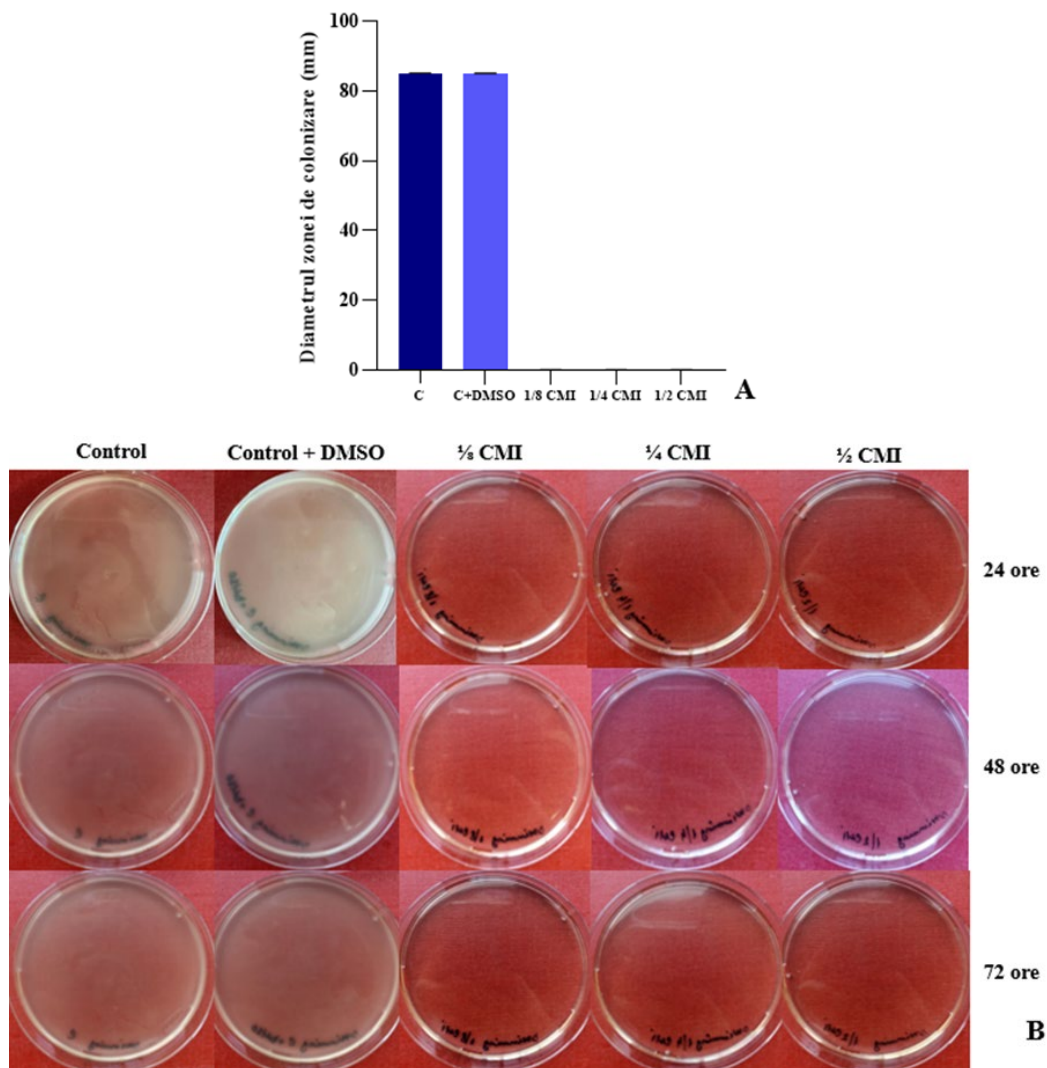


Figura 3.4. Efectul concentrațiilor subinhibitorii ale flavonoidei BrCl asupra motilității de tip *swimming* la tulpina *P. aeruginosa* 124: *A* – valorile diametrului zonelor de colonizare la 24 ore; *B* – motilitatea de tip *swimming* determinată în prezența și absența flavonoidei BrCl la concentrații echivalente cu 1/8, 1/4 și 1/2 CMI. Barele reprezintă eroarea standard a mediei.

Motilitatea de tip swarming

Flavonoida BrCl a fost testată și în ceea ce privește activitatea sa asupra motilității de tip *swarming* a tulpinii *P. aeruginosa* 124. Flavonoida testată a împiedicat motilitatea timp de 72 ore la o concentrație echivalentă cu 1/2 CMI (1,9 μg/ml) și a inhibat semnificativ (29,11%) motilitatea la o concentrație egală cu 1/4 CMI (0,9 μg/ml) timp de 72 ore (Figura 3.5-A, 3.5-B și 3.5-C). La o concentrație echivalentă cu 1/8 CMI (0,48 μg/ml), flavonoida a inhibat semnificativ (66,76%) motilitatea timp de 24 ore în comparație cu controlul. Acest efect nu a mai fost înregistrat la 48 și 72 ore, când diametrul înregistrat a avut aceeași dimensiune cu cel măsurat în cazul controlului (Figura 3.5-B și 3.5-C).

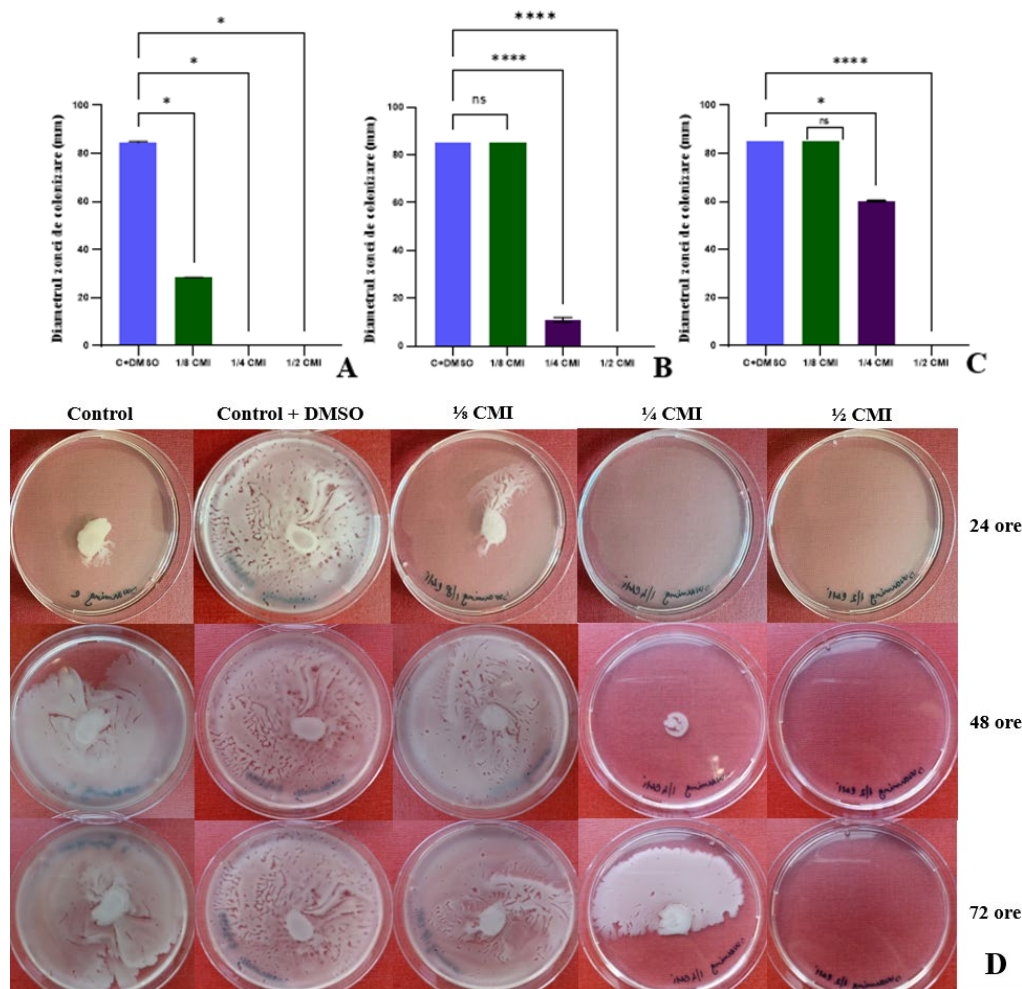


Figura 3.5. Efectul concentrațiilor subinhibitorii ale flavonoidei BrCl asupra motilității de tip *swarming* la tulpina *P. aeruginosa* 124: valorile diametrului zonelor de colonizare la 24 ore (A), 48 ore (B), și 72 ore (C); D – motilitatea de tip *swarming* determinată în prezența flavonoidei BrCl la concentrații echivalente cu 1/8, 1/4 și 1/2 CMI. Barele reprezintă eroarea standard a mediei.

Motilitatea de tip twitching

Flavonoida BrCl la o concentrație egală cu 1/2 CMI (1,9 μg/ml) a inhibat semnificativ (100%) motilitatea de tip *twitching* a tulpinii *P. aeruginosa* 124 timp de 48 ore (Figura 3.6-A). La concentrațiile 1/8 CMI (0,48 μg/ml) și 1/4 CMI (0,9 μg/ml) nu s-au înregistrat diferențe semnificative ale diametrului motilității în comparație cu controlul (Figura 3.6-B), acest lucru sugerând că inhibarea motilității de tip *twitching* este dependentă de concentrația de flavonoidă BrCl utilizată.

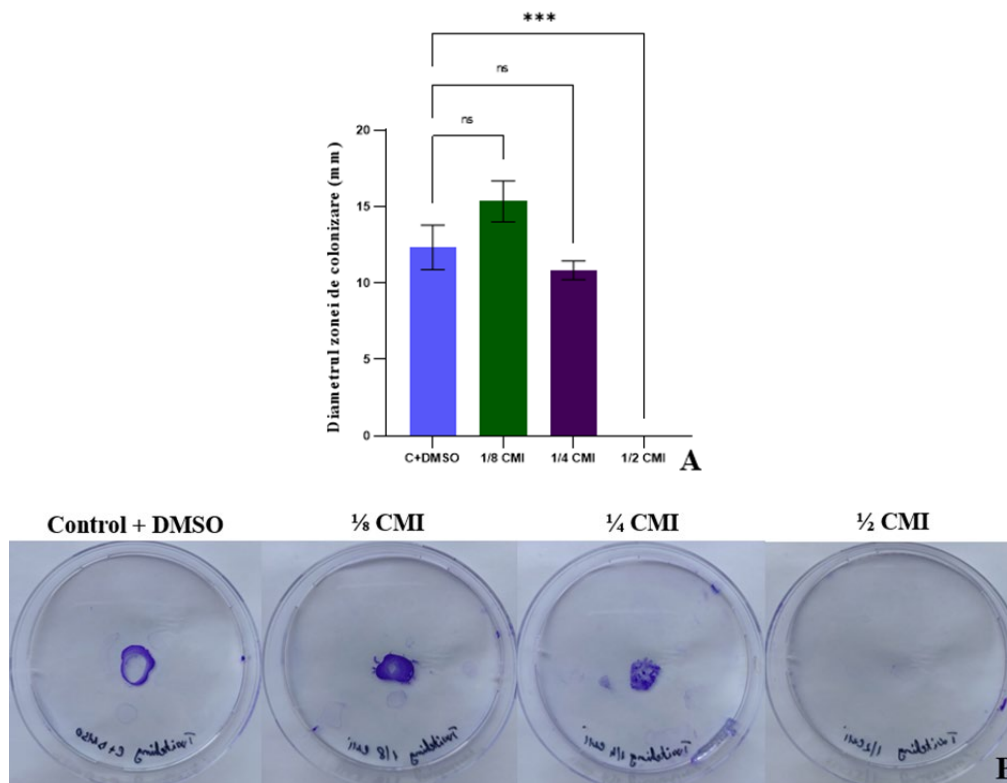


Figura 3.6. Efectul concentrațiilor subinhibitorii ale flavonoidei BrCl asupra motilității de tip twitching la tulpina *P. aeruginosa* 124: *A* – valorile diametrului zonelor de colonizare la 48 ore; *B* – motilitatea de tip twitching determinată în prezența flavonoidei BrCl la concentrații echivalente cu 1/8, 1/4 și 1/2 CMI. Barele reprezintă eroarea standard a mediei.

3.2.3. Efectul flavonoidei BrCl asupra pompelor de eflux

După cum se poate observa în Figura 3.7, celulele dezvoltate în prezența bromurii de etidiu (1 mg/L) și a flavonoidei BrCl prezintă aceeași fluorescență cu cea a celulelor cultivate în absența flavonoidei, ceea ce demonstrează că flavonoida BrCl nu a inhibat activitatea pompelor de eflux. Acest lucru ne permite să afirmăm că flavonoida BrCl utilizată într-o concentrație echivalentă cu 1/2 CMI nu a determinat inactivarea pompelor de eflux.

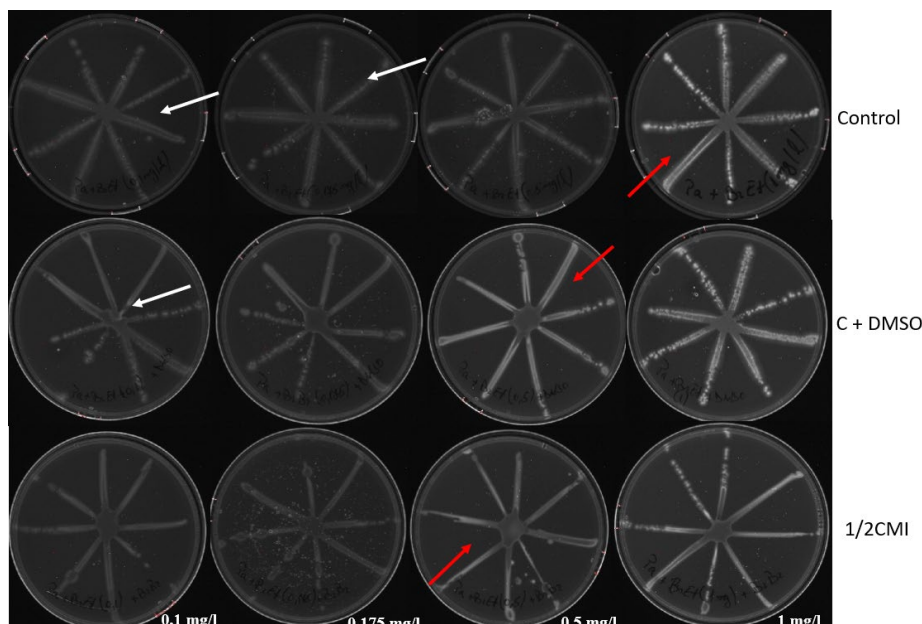


Figura 3.7. Activitatea flavonoidei BrCl (½ CMI) asupra pompelor de eflux. Pentru a evidenția pompele de eflux s-au utilizat concentrații diferite de bromură de etidiu (0,1 mg/l, 0,175 mg/l, 0,5 mg/l și 1 mg/l). Săgețile albe indică pompe de eflux active, iar cele cu roșu evidențiază pompe de eflux inactive.

CAPITOLUL 4 – EFECTUL FLAVONOIDEI BrCl ASUPRA UNOR FACTORI DE VIRULENȚĂ IMPLICAȚI ÎN INFECȚIILE CU *CANDIDA* SPP.

4.1. MATERIALE, ECHIPAMENTE ȘI METODE DE LUCRU

4.1.1. Evaluarea formării hifelor folosind tehnici de microscopie optică și electronică

Determinarea activității flavonoidei BrCl asupra formării hifelor se realizează utilizând mediu RPMI.

4.1.2. Cuantificarea expresiei unor gene implicate în formarea hifelor prin Real-Time PCR

În procesul de formare al hifelor sunt implicate o serie de gene importante, printre care se numără *hwp1*, *als3* și *ece1*. Pentru a investiga modul în care flavonoidele sintetice cu sulf interferează cu formarea hifelor, ne-am propus aprecierea expresiei relative a genelor implicate în acest proces folosind tehnica Real-Time PCR.

4.1.3. Determinarea activității fosfolipazice

Pentru a determina activitatea fosfolipazică a tulpinilor de *Candida* spp. se utilizează gălbenușul de ou ce conține o cantitate mare de fosfolipide. Fosfolipazele produse de *Candida* spp. degradează fosfolipidele prezente în gălbenușul de ou, având ca rezultat formarea unui complex de calciu cu acizii grași eliberați și apariția unei zone precipitate în jurul coloniei (Pakshir *et al.*, 2013).

4.1.4. Determinarea activității esterazice

Activitatea esterazică se evaluează utilizând testul de opacitate cu Tween 80. Esterazele hidrolizează Tween 80 și eliberează acizii grași care apoi se leagă de calciu, formând un complex vizibil sub forma unor cristale insolubile în jurul coloniei (Pakshir *et al.*, 2013).

4.1.5. Determinarea activității proteazice

Pentru evaluarea activității proteazice a tulpinilor de *Candida* se utilizează metoda cu ser fetal bovin (albumină serică) (Kumar *et al.*, 2006). Ca urmare a activității proteazice, în jurul coloniei apare o zonă clară care corespunde hidrolizei serului fetal bovin prezent în mediu.

4.1.6. Identificarea activității catalazelor

Producerea de catalaze se apreciază folosind difuzia peroxidului de hidrogen de pe un disc de hârtie în mediul de cultura. Catalazele produse de celulele de *Candida* degradează peroxidul de hidrogen, permițând acestora să se dezvolte până în apropierea discului impregnat cu peroxid de hidrogen.

4.1.7. Evaluarea efectului flavonoidei BrCl asupra activității fosfolipazice, esterazice, proteazice și catalazice

Identificarea efectului flavonoidei BrCl asupra activității enzimatică se determină utilizând medii specifice pentru fosfolipaze, esteraze, proteaze și catalaze.

4.2. REZULTATE ȘI DISCUȚII

4.2.1. Flavonoida BrCl inhibă formarea hifelor de către tulpina *C. albicans* Prx

Rezultatele au arătat că flavonoida BrCl la o concentrație echivalentă cu $2 \times$ CMI (31,25 $\mu\text{g/ml}$) și $5 \times$ CMI (78,1 $\mu\text{g/ml}$) a inhibat tranziția celulelor de *C. albicans* Prx de la forma de dermatoplast la cea de hifă timp de 48 ore, acest lucru fiind remarcat atât cu ajutorul microscopiei optice, cât și cu ajutorul microscopiei electronice cu baleiaj. Imaginile obținute cu ajutorul microscopului optic și electronic au arătat că celulele control au format hife după aproximativ 6 ore (Figura 4.1-A și 4.1-B).

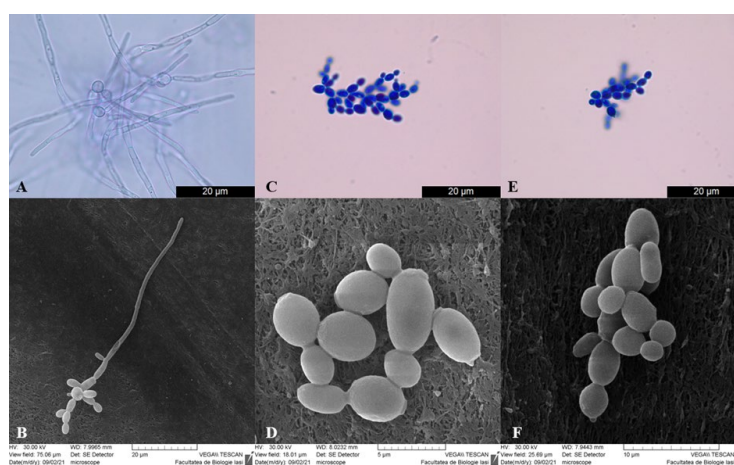


Figura 4.1. Activitatea inhibitorie a flavonoidei BrCl asupra formării hifelor de *C. albicans*. A, B – control; C, D – celule expuse la concentrații echivalente cu $2 \times$ CMI; E, F – celule expuse la concentrații echivalente $5 \times$ CMI. Celulele colorate cu albastru de metilen pentru a distinge celulele vii (A) de cele moarte (C, E). A, B, E – fotografiile realizate la microscopul optic, B, D, F – fotografiile realizate la microscopul electronic cu baleiaj (SEM).

4.2.2. Expresia genelor implicate în formarea hifelor de *C. albicans* este inhibată de flavonoida BrCl

Rezultatele obținute au arătat că expresia genelor *hwpl* (codifică o proteină prezentă în peretele celular al hifelor) și *als3* (codifică o proteină specifică hifelor implicată în procesul de aderare) a fost redusă de tratamentul flavonoidei BrCl ($\frac{1}{2}$ CMI) în comparație cu controlul – Figura 4.2. Totodată, este important de subliniat faptul că în prezența flavonoidei BrCl a existat o scădere semnificativă ($p < 0,05$) și a expresiei genei *ece1* (proteină strâns legată de extinderea hifelor).

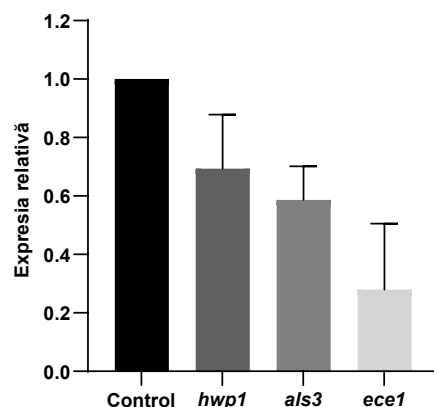


Figura 4.2. Analiza qRT-PCR a expresiei genelor implicate în formarea hifelor de *C. albicans* Prx. Hifele de *C. albicans* Prx au fost expuse la flavonoida BrCl ($\frac{1}{2}$ CMI = 7,8 $\mu\text{g/ml}$), iar expresia genelor de interes a fost determinată prin qRT-PCR în prezența unei gene de referință *act1* și a fost exprimată relativ la gena de interes din control.

4.2.3. Flavonoida BrCl nu inhibă activitatea enzimelor implicate în virulența tulpinilor de *Candida* spp.

Capacitatea tulpinii *C. albicans* Prx de a produce fosfolipaze a fost estimată în absența și în prezența flavonoidei BrCl, la concentrații subinhibitorii, echivalente cu $\frac{1}{4}$ CMI = 3,9 $\mu\text{g/ml}$, $\frac{1}{2}$ CMI = 7,8 $\mu\text{g/ml}$ și CMI = 15,62 $\mu\text{g/ml}$. În Figura 4.3 se poate observa că flavonoida BrCl, indiferent de concentrația utilizată, nu a dus la reducerea zonei de precipitare din jurul coloniei în comparație cu controlul. Prin urmare, putem afirma că flavonoida BrCl nu inhibă activitatea fosfolipazelor produse de *C. albicans* Prx.

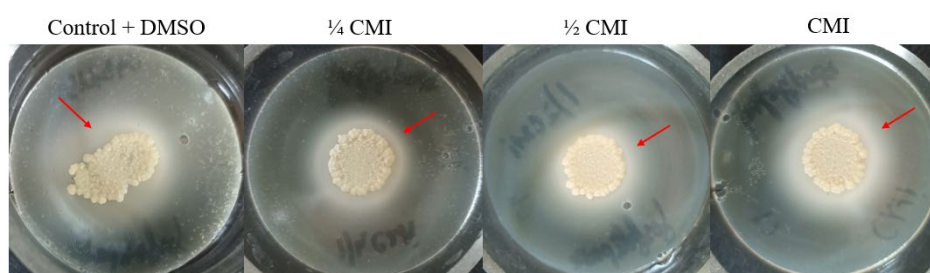


Figura 4.3. Screening-ul privind activitatea fosfolipazică a tulpinii *C. albicans* Prx în prezența flavonoidei BrCl. Mediul de cultură a fost suplimentat cu flavonoidă BrCl în concentrații de 3,9 $\mu\text{g/ml}$, 7,8 $\mu\text{g/ml}$ și 15,62 $\mu\text{g/ml}$ (echivalente cu $\frac{1}{4}$ CMI, $\frac{1}{2}$ CMI și CMI).

Efectul expunerii la flavonoida BrCl asupra activității esterazelor produse de *C. albicans* Prx a fost evaluat utilizând un mediu de cultură suplimentat cu Tween 80. Rezultatele obținute

ilustrează faptul că flavonoida BrCl nu a inhibat activitatea enzimei comparativ cu controlul – Figura 4.4.

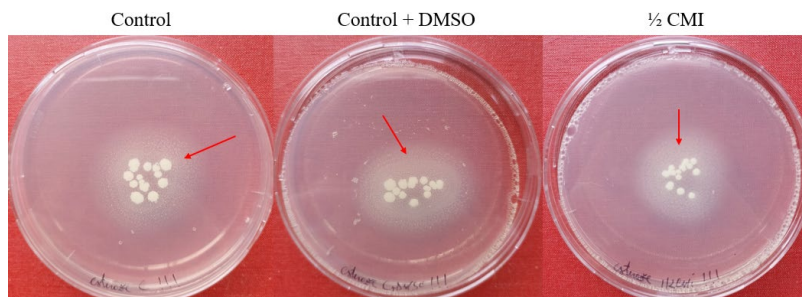


Figura 4.4. Screeningul privind activitatea esterazică a tulpinii *C. albicans* Prx în prezența flavonoidei BrCl.

Mediul de cultură a fost suplimentat cu flavonoidă BrCl în concentrații de 7,8 $\mu\text{g/ml}$ (echivalent cu $\frac{1}{2}$ CMI).

Suplimentarea mediului de cultură cu flavonoida BrCl la concentrații echivalente cu CMI (3,9 $\mu\text{g/ml}$) și $\frac{1}{4}$ CMI (15,62 $\mu\text{g/ml}$) nu a permis evidențierea inhibării proteazelor produse de celulele de *C. parapsilosis* – Figura 4.5.

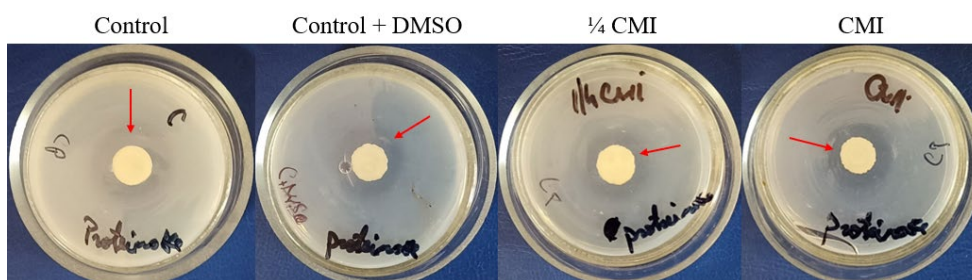


Figura 4.5. Screening-ul privind activitatea proteazică a tulpinii *C. parapsilosis* Prx în prezența flavonoidei

BrCl. Mediul de cultură a fost suplimentat cu flavonoidă BrCl în concentrații de 3,9 $\mu\text{g/ml}$ și 15,62 $\mu\text{g/ml}$ (echivalente cu $\frac{1}{4}$ CMI și CMI).

Efectul flavonoidei BrCl asupra producerii catalazelor a fost investigat asupra tulpinii *C. albicans* P37037 pe parcursul a 16 ore. S-a constatat că flavonoida BrCl, indiferent de concentrația utilizată (CMI sau $\frac{1}{2}$ CMI) nu duce la inhibarea activității catalazelor produse de către tulpina *C. albicans* P37037. Diametrul haloului din jurul discului cu apă oxigenată al probelor prezintă aceeași dimensiune cu cel al controlului (Figura 4.6).

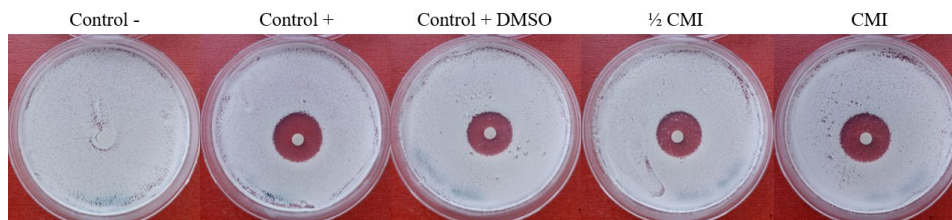


Figura 4.6. Screeningul privind activitatea catalazică a tulpinii *C. albicans* P37037 în prezența flavonoidei BrCl. Mediul de cultură a fost suplimentat cu flavonoidă BrCl în concentrații de 7,8 $\mu\text{g/ml}$ și 15,62 $\mu\text{g/ml}$ (echivalente cu $\frac{1}{2}$ CMI și CMI).

CAPITOLUL 5 – ACTIVITATEA FLAVONOIDEI BrCl ASUPRA BIOFILMELOR PRODUSE DE TULPINI APARTINÂND GENULUI *CANDIDA*

5.1. MATERIALE, ECHIPAMENTE ȘI METODE DE LUCRU

5.1.1. Aprecierea activității flavonoidei BrCl asupra aderării celulelor din biofilm

Biomasa biofilmului format de speciile de *Candida* poate fi cuantificată prin colorarea celulelor cu cristal violet, urmată de extragerea colorantului cu acid acetic și cuantificarea spectrofotometrică a acestuia. Absorbanța determinată este direct proporțională cu biomasa biofilmului format.

5.1.2. Determinarea efectului flavonoidei BrCl asupra preformării biofilmului

Metoda presupune aprecierea biomasei biofilmului format în prezența flavonoidei BrCl, folosind colorarea cu cristal violet.

5.1.3. Cuantificarea cantității de biofilm format în prezența flavonoidei BrCl

Metoda presupune aprecierea formării biofilmului în prezența flavonoidei folosind colorarea cu cristal violet.

5.1.4. Determinarea activității metabolice a celulelor din biofilm

Activitatea metabolică a celulelor din biofilmul produs de *C. krusei* în prezența

flavonoidei BrCl se evaluează utilizând MTT.

5.1.5. Aprecierea viabilității celulelor din biofilme

Viabilitatea celulelor din biofilmul produs de *C. krusei* în prezența flavonoidei BrCl se evaluează utilizând metoda numărării coloniilor pe placă. Orice celulă viabilă din biofilm va genera o colonie ce poate fi vizualizată cu ochiul liber și numărată, calculându-se numărul de UFC/ml.

5.1.6. Aprecierea efectului flavonoidei BrCl asupra biofilmului matur

Efectul flavonoidei BrCl asupra biofilmului matur se determină utilizând colorarea cu cristal violet, microscopia optică și microscopia confocală cu scanare laser.

5.1.7. Efectul flavonoidei BrCl asupra hidrofobității celulelor de *C. krusei*

Efectul flavonoidei BrCl asupra hidrofobității suprafeței celulare se realizează utilizând toluenul ca hidrocarbură.

5.1.8. Efectul flavonoidei BrCl asupra producerii de EPS

Determinarea producerii EPS-urilor în prezența flavonoidei BrCl se realizează utilizând metoda cu fenol-acid sulfuric.

5.3. REZULTATE ȘI DISCUȚII

5.2.1. Aderarea celulelor fungice este influențată de flavonoida BrCl

S-a observat o inhibare a aderării de peste 90% la concentrații ale flavonoidei BrCl echivalente cu $2 \times$ CMI (31,25 $\mu\text{g/ml}$), CMI (15,62 $\mu\text{g/ml}$) și $\frac{1}{2}$ CMI (7,8 $\mu\text{g/ml}$). O activitate anti-aderare importantă a fost observată și la concentrațiile subinhibitorii $\frac{1}{4}$ CMI (3,9 $\mu\text{g/ml}$) și $\frac{1}{8}$ CMI (1,9 $\mu\text{g/ml}$), în acest caz procentajul de inhibare al aderării fiind de 64%, respectiv 46% (Figura 5.1-B). Analizând rezultatele obținute, putem afirma că inhibarea aderării celulelor de *C. krusei* Prx este direct proporțională cu doza de flavonoidă testată.

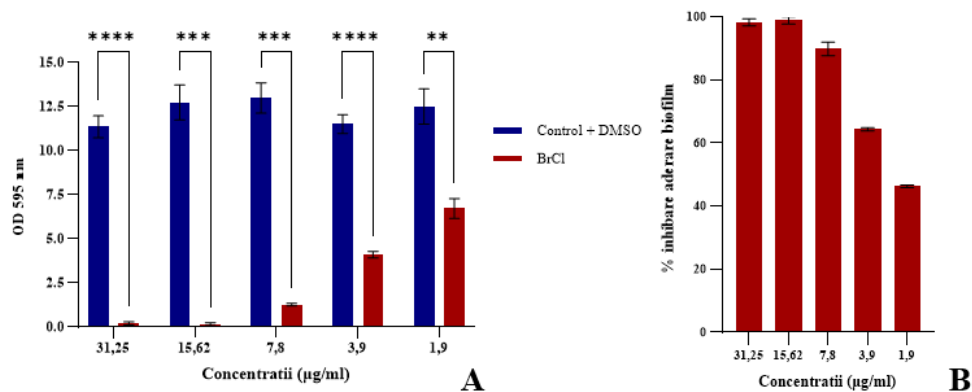


Figura 5.1. Efectul inhibitor al flavonoidei BrCl asupra aderării celulelor de *C. krusei* Prx. A – cuantificarea biomasei biofilmului format folosind colorarea cu cristal violet; B – procentajul de inhibare al aderării. Celulele au fost incubate timp de 8 ore în prezența concentrațiilor diferite de BrCl. Asterixul reprezintă diferențe semnificative față control (** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$, **** = $p < 0,0001$). Barele reprezintă eroarea standard a mediei.

5.2.2. Flavonoida BrCl inhibă dezvoltarea biofilmului preformat

Activitatea flavonoidei BrCl a fost testată și în scopul evidențierii proprietății de a inhiba dezvoltarea biofilmului preformat de *C. krusei* Prx. După cum se poate observa în Figura 5.2-A, dezvoltarea biofilmului preformat a fost inhibată într-un procentaj de peste 95% la concentrații ale flavonoidei BrCl de 31,25 µg/ml și 15,62 µg/ml, echivalente cu $2 \times$ CMI, respectiv CMI. De remarcat este și faptul că la concentrații subinhibitorii ($\frac{1}{2}$ CMI, $\frac{1}{4}$ CMI și $\frac{1}{8}$ CMI), flavonoida BrCl a inhibat semnificativ dezvoltarea biofilmului preformat într-o proporție de peste 56% (Figura 5.2-B).

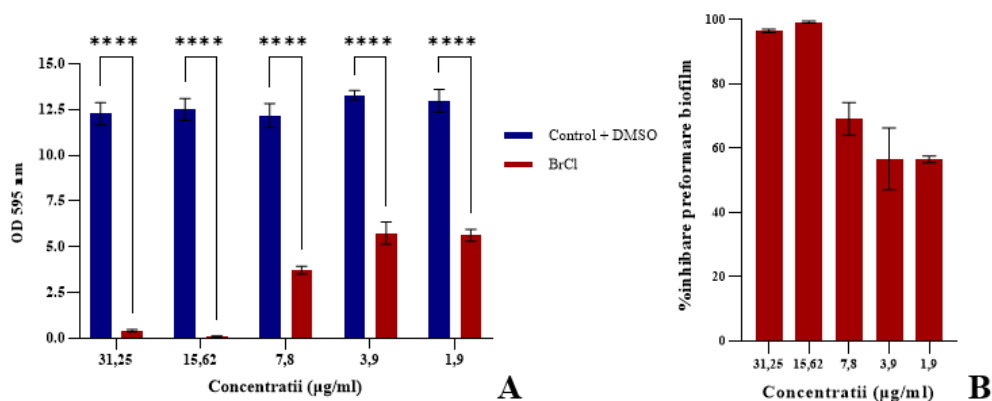


Figura 5.2. Activitatea flavonoidei BrCl asupra biofilmului preformat de *C. krusei* Prx. A – cuantificarea biomasei biofilmului format folosind colorarea cu cristal violet; B – procentajul de inhibare al biofilmului preformat față de control. Biofilmul a fost preformat 8 ore în absența flavonoidei BrCl. Asterixul reprezintă diferențe semnificative față control (**** = $p < 0,0001$). Barele reprezintă eroarea standard a mediei.

5.2.3. Flavonoida BrCl inhibă formarea biofilmului de către tulpina *C. krusei* Prx

Rezultatele noastre au arătat că flavonoida BrCl a avut un efect inhibitor semnificativ asupra formării biofilmului într-o manieră dependentă de doză (Figura 5.3-A). Cel mai promițător efect al flavonoidei BrCl a fost observat la concentrațiile echivalente cu $2 \times$ CMI (31,25 $\mu\text{g/ml}$) și CMI (15,62 $\mu\text{g/ml}$), unde formarea biofilmului a fost inhibată cu peste 88% față de control. De asemenea, trebuie remarcat faptul că s-a înregistrat o activitate antibiofilm importantă și la concentrațiile subinhibitorii $\frac{1}{2}$ CMI (7,8 $\mu\text{g/ml}$) și $\frac{1}{4}$ CMI (3,9 $\mu\text{g/ml}$), în acest caz biofilmul fiind inhibat într-o proporție de 77%, respectiv 66% - Figura 5.3-B.

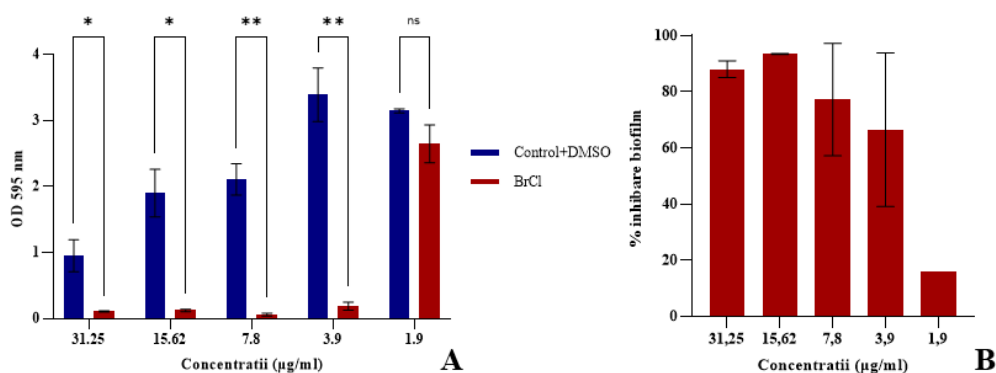


Figura 5.3. Activitatea *in vitro* a flavonoidei BrCl asupra formării biofilmului de *C. krusei* Prx pe parcursul a 24 ore de incubare. A – cuantificarea biomasei biofilmului format folosind colorarea cu cristal violet; B – procentajul de inhibare al formării biofilmului. Asterixul reprezintă diferențe semnificative între probă și control (* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,001$, ns = diferențe ne semnificative). Barele reprezintă eroarea standard a mediei.

5.2.4. Flavonoida BrCl poate reduce activitatea metabolică a celulelor din biofilmul produs de *C. krusei* Prx

Activitatea metabolică a celulelor a fost redusă semnificativ (cu aproximativ 90%) la o concentrație a flavonoidei BrCl egală cu 15,62 $\mu\text{g/ml}$ (CMI). Mai mult, trebuie evidențiat faptul că flavonoida BrCl a indus o inhibare semnificativă ($p < 0,05$) a activității metabolice și la concentrații subinhibitorii – Figura 5.4-A. Astfel, la o concentrație echivalentă cu $\frac{1}{2}$ CMI (7,8 $\mu\text{g/ml}$), activitatea metabolică a celulelor sesile a fost inhibată într-o proporție de 60%, iar la o concentrație echivalentă cu $\frac{1}{4}$ CMI (3,9 $\mu\text{g/ml}$) a dus la o reducere a activității metabolice de aproximativ 26% - Figura 5.4-B.

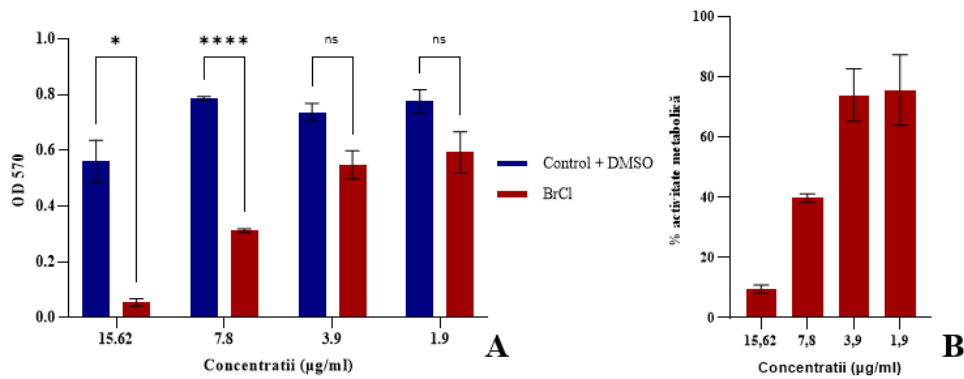


Figura 5.4. Activitatea metabolică a celulelor de *C. krusei* Prx după 48 ore de incubare în prezența flavonoidei BrCl. A – cuantificarea formazanului format; B – procentajul de inhibare al activității metabolice în comparație cu controlul. Asterixul reprezintă diferențe semnificative între probă și control (* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, **** = $p < 0,0001$, ns = diferențe ne semnificative). Barele reprezintă eroarea standard a mediei.

5.2.5. Flavonoida BrCl reduce viabilitatea celulelor din biofilmul format de *C. krusei* Prx

Utilizată într-o concentrație echivalentă cu $2 \times$ CMI ($31,25 \mu\text{g/ml}$) și CMI ($15,62 \mu\text{g/ml}$), flavonoida BrCl a determinat reducerea semnificativă ($p < 0,01$) a numărului de unități formatoare de dezvoltate pe mediu solid după preluarea în suspensie a celulelor din biofilmul format de *C. krusei* Prx. La concentrațiile subinhibitorii ale flavonoidei testate ($7,8 \mu\text{g/ml}$ și $1,9 \mu\text{g/ml}$), reducerea numărului de UFC nu a fost diferită semnificativ față de control – Figura 5.5.

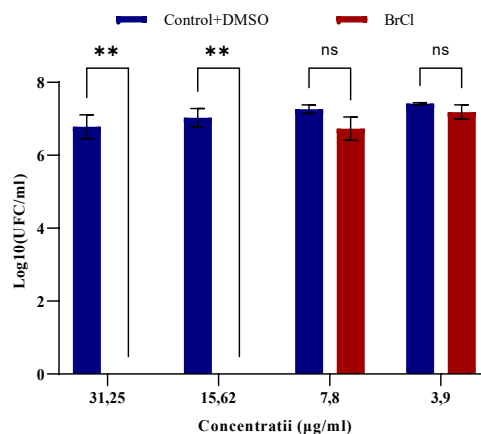


Figura 5.5. Activitatea flavonoidei BrCl asupra viabilității celulelor din biofilmul produs de *C. krusei* Prx. Asterixul reprezintă diferențe semnificative între probă și control (** = $p < 0,01$, ns = diferențe ne semnificative). Barele reprezintă eroarea standard a mediei.

5.2.6. Biofilmul matur produs de *C. krusei* Prx este distrus în prezența flavonoidei BrCl

După incubare am constatat că flavonoida BrCl utilizată într-o concentrație echivalentă cu $4 \times$ CMI ($62,5 \mu\text{g/ml}$) și $2 \times$ CMI ($31,25 \mu\text{g/ml}$) a determinat distrugerea semnificativă a biofilmului matur într-o proporție de 96% și 87% - Figura 5.6-A. La o concentrație echivalentă cu CMI ($15,62 \mu\text{g/ml}$), biofilmul matur a fost distrus în proporție de 78,49%, acest lucru fiind pus în evidență și la microscopul optic prin colorarea cu cristal violet (Figura 5.6-B, C, D și E).

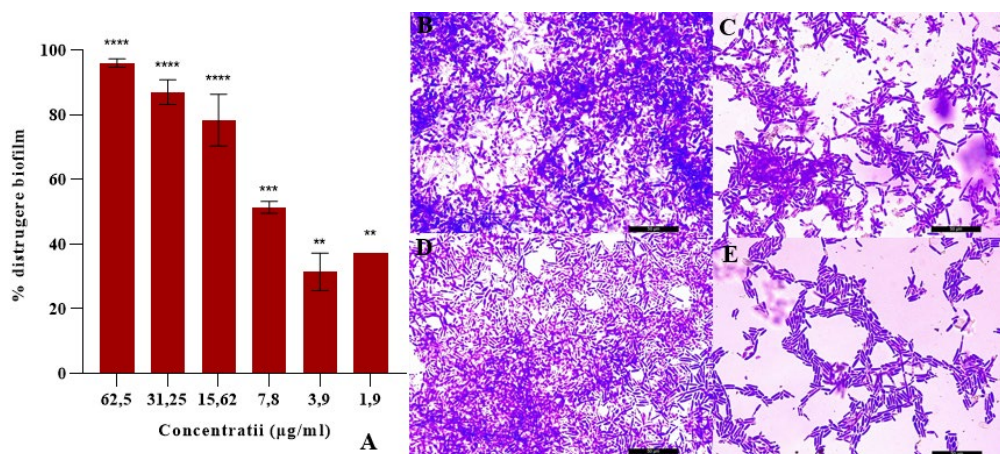


Figura 5.6. Distrugerea biofilmului matur produs de *C. krusei* Prx consecutiv expunerii la flavonoida BrCl. A – procentajele de distrugere a biofilmului la diferite concentrații; Vizualizarea biofilmului la microscopul optic după colorarea cu cristal violet: B – control + DMSO 1,5%, D – control + DMSO 0,78%, C și E – biofilm matur expus la concentrații de flavonoidă echivalente cu $\frac{1}{2}$ CMI și CMI timp de 48 ore. Biofilmul a fost format 48 ore în absența flavonoidei. Asterixul reprezintă diferențe semnificative între probă și control (** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$, **** = $p < 0,0001$). Barele reprezintă eroarea standard a mediei.

Pentru a observa distribuția spațială a celulelor biofilmului și pentru a obține informații despre topografia și organizarea biofilmului în prezența flavonoidei BrCl s-a utilizat microscopia confocală cu scanare laser. După cum se poate observa în Figura 5.7-A și 5.7-B, biofilmul matur produs de *C. krusei* Prx a fost afectat de flavonoida BrCl la concentrațiile echivalente cu $2 \times$ CMI și CMI, acesta prezentând o reducere evidentă a biomasei în comparație cu controlul. Mai mult, în Figura 5.7-C se poate observa o arhitectură compactă a biofilmului în control, în timp ce în prezența flavonoidei BrCl biomasa și densitatea celulelor prezintă o reducere evidentă. În același timp, am observat că intensitatea fluorescenței (Figura 5.7-C) la control a fost mai mare în comparație cu proba, acest lucru indicând faptul că la nivelul biofilmului din control există mai multe straturi de celule.

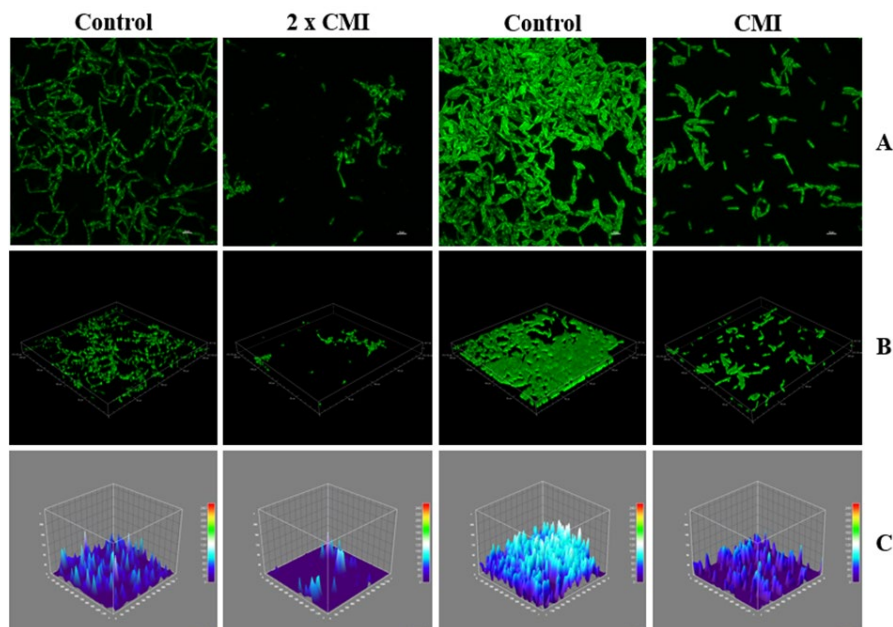


Figura 5.7. Eradicarea biofilmului matur produs de *C. krusei* Prx consecutiv expunerii la flavonoida BrCl. A – imagini 2D ale biofilmului; B – imagini 3D ale biofilmului; C – arhitectura suprafeței biofilmului matur obținută cu ajutorul programului ImageJ. Morfologia biofilmelor a fost vizualizată cu ajutorul microscopului confocal la un obiectiv de 60 x.

5.2.7. Activitatea flavonoidei BrCl asupra hidrofobicității suprafeței celulelor de *C. krusei* Prx

Analizând rezultatele obținute am constatat că flavonoida BrCl nu a indus o scădere a indicelui de hidrofobicitate al suprafeței celulare în comparație cu controlul și controlul cu DMSO. Mai mult, în prezența flavonoidei BrCl la o concentrație egală cu 7,8 μg/ml, indicele CSH a fost mai crescut (73,95%) față de cel înregistrat în cazul controlului cu DMSO (68,55%) – Figura 5.8.

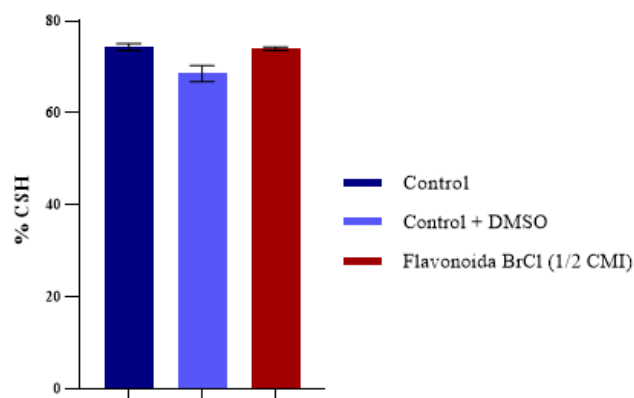


Figura 5.8. Evaluarea hidrofobicității suprafeței celulare (CSH) a tulpinii *C. krusei* Prx în prezența flavonoidei BrCl (7,8 μg/ml). Barele reprezintă eroarea standard a mediei.

5.2.8. Activitatea flavonoidei BrCl asupra conținutului total de carbohidrați

În Figura 5.9 este prezentat conținutul total de carbohidrați înregistrat în absența sau prezența flavonoidei BrCl. Expunerea la flavonoida BrCl (7,8 $\mu\text{g/ml}$) nu a dus la modificarea semnificativă a conținutului total de carbohidrați în comparație cu controlul.

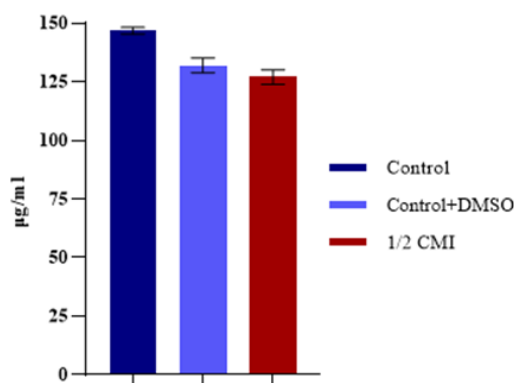


Figura 5.9. Cuantificarea conținutului total de carbohidrați după 48 ore de incubare în prezența flavonoidei BrCl. Barele reprezintă eroarea standard a mediei.

CAPITOLUL 6 – EFECTUL SINERGIC AL COMBINAȚIILOR FLAVONOIDE SINTETICE TRICICLICE CU SULF – SUBSTANȚE ANTIMICROBIENE

6.1. MATERIALE, ECHIPAMENTE ȘI METODE DE LUCRU

6.1.1. Stabilirea efectului sinergic al unor compuși prin metoda „checkerboard”

Această metodă urmărește determinarea interacțiunii dintre două substanțe utilizate în diferite combinații. Cu ajutorul acestei metode sunt testați noi agenți antimicrobieni împreună cu antibiotice sau antimicotice în scopul precizării efectului sinergic, aditiv sau antagonic al celor două substanțe folosite împreună.

6.2. REZULTATE ȘI DISCUȚII

6.2.1. Interacțiunea sinergică a flavonoidelor testate cu penicilina și fluconazolul

Flavonoida ICl și penicilina manifestă un efect sinergic împotriva tulpinii S. aureus MRSA

Combinarea dintre flavonoida ICl (1,95 μg/ml) și penicilină (250 μg/ml) a permis reducerea valorii CMI a flavonoidei ICl de aproximativ 32 ori, iar valoarea CMI a penicilinei a fost redusă de 4 ori. Aceste rezultate demonstrează că împreună, flavonoida ICl și penicilina, au o acțiune mai eficientă împotriva tulpinii *S. aureus* MRSA în comparație cu situația în care cele două substanțe sunt utilizate separat.

Tabel 6.1. Valorile concentrațiilor inhibitorii fracționale și indicelui fracționar al concentrației inhibitorii al flavonoidei ICl și al antibioticului penicilină împotriva unei tulpini de *S. aureus* MRSA

CMI μg/ml				FIC ICl	FIC penicilină	FICI	Efect
ICl	penicilină	ICl combinație	penicilină combinație				
62,5	1000	62,5	1,95	1	0,001	1	Aditiv
		31,25	62,5	0,5	0,06	0,6	Aditiv
		15,62	250	0,24	0,25	0,5	Sinergic
		7,8	250	0,12	0,25	0,4	Sinergic
		3,9	250	0,06	0,25	0,3	Sinergic
		1,95	250	0,03	0,25	0,3	Sinergic
		0,97	500	0,01	0,5	0,5	Sinergic

CMI = concentrația minimă inhibitorie

FIC = concentrație inhibitorie fracționară

FICI = indicele fracționar al concentrației inhibitorii

Flavonoidele sintetice triciclice cu sulf și fluconazolul manifestă un efect sinergic împotriva tulpinii C. albicans Prx

Combinarea dintre flavonoida FCl și fluconazol a determinat o reducere considerabilă a valorii CMI atât pentru flavonoida FCl (de la 31,25 μg/ml la 0,24 μg/ml), cât și pentru fluconazol (de la 1000 μg/ml la 0,48 μg/ml). În urma testelor efectuate au fost evidențiate 7 efecte sinergice și un singur efect aditiv (Tabel 6.2).

Tabel 6.2. Valorile concentrațiilor inhibitorii fracționale și indicelui fracționar al concentrației inhibitorii al flavonoidei FCI și al antimicoticului fluconazol împotriva tulpinii *C. albicans* Prx

CMI $\mu\text{g/ml}$				FIC FCI	FIC fluconazol	FICI	Efect
FCI	fluconazol	FCI combinație	fluconazol combinație				
31,25	1000	31,25	0,48	1	0,0004	1	Aditiv
		15,62	1,95	0,49	0,001	0,5	Sinergic
		7,8	1,95	0,24	0,001	0,3	Sinergic
		3,9	1,95	0,12	0,001	0,1	Sinergic
		1,95	1,95	0,06	0,001	0,1	Sinergic
		0,9	125	0,02	0,06	0,1	Sinergic
		0,48	500	0,01	0,5	0,5	Sinergic
		0,24	500	0,007	0,5	0,5	Sinergic

Valorile concentrațiilor flavonoidei CICI și ale fluconazolului în combinație s-au diminuat foarte mult în comparație cu valorile CMI ale substanței singure. Astfel, valoarea CMI a flavonoidei CICI a scăzut de aproximativ 130 ori (de la 15,62 $\mu\text{g/ml}$ la 0,12 $\mu\text{g/ml}$), iar valoarea CMI a fluconazolului a scăzut de aproximativ 1030 ori (de la 1000 $\mu\text{g/ml}$ la 0,97 $\mu\text{g/ml}$) – Tabel 6.3.

Tabel 6.3. Valorile concentrațiilor inhibitorii fracționale și indicelui fracționar al concentrației inhibitorii al flavonoidei CICI și antimicoticului fluconazol împotriva tulpinii *C. albicans* Prx

CMI $\mu\text{g/ml}$				FIC CICI	FIC fluconazol	FICI	Efect
CICI	fluconazol	CICI combinație	fluconazol combinație				
15,62	1000	15,62	0,48	1	0,0004	1	Aditiv
		7,8	0,97	0,49	0,0009	0,5	Sinergic
		3,9	0,97	0,24	0,0009	0,3	Sinergic
		1,95	1,95	0,1	0,001	0,1	Sinergic
		0,98	1,95	0,06	0,01	0,1	Sinergic
		0,48	15,62	0,03	0,01	0,04	Sinergic
		0,24	500	0,01	0,5	0,5	Sinergic
		0,12	500	0	0,5	0,5	Sinergic

Efectul sinergic dintre flavonoida BrCl și antimicoticul fluconazol a fost testat împotriva celulelor de *C. albicans* Prx, iar rezultatele sunt prezentate în Tabel 6.4. patru combinații diferite ale flavonoidei BrCl cu fluconazolul au prezentat un efect sinergic (FICI este cuprins între 0,12 și 0,5), iar alte patru combinații diferite au prezentat un efect aditiv (FICI este cuprins între 0,51 și 1).

Tabel 6.4. Valorile concentrațiilor inhibitorii fracționale și indicelui fracționar al concentrației inhibitorii al flavonoidei BrCl și antimicoticului fluconazol împotriva tulpinii *C. albicans* Prx

CMI $\mu\text{g/ml}$				FIC BrCl	FIC fluconazol	FICI	Efect
BrCl	fluconazol	BrCl combinație	fluconazol combinație				
7,9	1250	7,9	0,6	1	0,0006	1	Aditiv
		3,95	2,43	0,5	0,002	0,5	Sinergic
		1,97	2,43	0,25	0,002	0,25	Sinergic
		0,98	2,43	0,12	0,002	0,12	Sinergic
		0,49	312	0,06	0,25	0,31	Sinergic
		0,24	625	0,03	0,5	0,53	Aditiv
		0,12	1250	0,02	0,5	0,52	Aditiv
		0,06	1250	0,01	0,5	0,51	Aditiv

A fost testat de asemenea și efectul sinergic al flavonoidei ICl în combinație cu fluconazolul împotriva tulpinii *C. albicans* Prx. În urma rezultatelor obținute, 7 combinații diferite dintre flavonoida ICl și fluconazol au prezentat efect sinergic și o singură combinație a dus la evidențierea unui efect aditiv. Valoarea concentrației minime inhibitorii a flavonoidei ICl a scăzut de la 7,9 $\mu\text{g/ml}$ la 0,06 $\mu\text{g/ml}$, iar valoarea CMI a fluconazolului a scăzut de la 1000 $\mu\text{g/ml}$ la 0,97 $\mu\text{g/ml}$ (Tabel 6.5).

Tabel 6.5. Valorile concentrațiilor inhibitorii fracționale și indicele fracționar al concentrației inhibitorii al flavonoidei ICl și fluconazolului împotriva tulpinii *C. albicans* Prx

CMI $\mu\text{g/ml}$				FIC ICl	FIC fluconazol	FICI	Efect
ICl	fluconazol	ICl combinație	fluconazol combinație				
7,8	1000	7,8	3,9	1	0,003	1	Aditiv
		3,9	0,97	0,5	0,0009	0,5	Sinergic
		1,9	31,25	0,24	0,03	0,3	Sinergic
		0,9	31,25	0,11	0,03	0,1	Sinergic
		0,48	500	0,06	0,5	0,5	Sinergic
		0,24	500	0,03	0,5	0,5	Sinergic
		0,12	500	0,01	0,5	0,5	Sinergic
		0,06	500	0	0,5	0,5	Sinergic

Combinația dintre flavonoida BrF și fluconazol a prezentat o importantă activitate sinergică împotriva tulpinii *C. albicans* Prx. Rezultatele a 6 combinații diferite dintre flavonoida BrF și fluconazol arată un important efect sinergic. Cea mai scăzută valoare FICI (0,1) a fost obținută la o concentrație minimă inhibitorie de 1,95 $\mu\text{g/ml}$ flavonoidă BrF și 0,97 $\mu\text{g/ml}$

fluconazol, respectiv 3,9 µg/ml flavonoidă BrF și 0,97 µg/ml fluconazol (Tabel 6.6), valoarea CMI a flavonoidei BrF scăzând de cel puțin 8 ori.

Tabel 6.6. Valorile concentrațiilor inhibitorii fracționale și indicelui fracționar al concentrației inhibitorii al flavonoidei BrF și antimicoticului fluconazol împotriva tulpinii *C. albicans* Prx

CMI µg/ml				FIC BrF	FIC fluconazol	FICI	Efect
BrF	fluconazol	BrF combinație	fluconazol combinație				
31,25	1000	31,25	0,24	1	0,0002	1	Aditiv
		15,62	0,97	0,49	0,0009	0,5	Sinergic
		7,8	0,97	0,24	0,0009	0,3	Sinergic
		3,9	0,97	0,12	0,0009	0,1	Sinergic
		1,95	0,97	0,06	0,0009	0,1	Sinergic
		0,9	125	0,02	0,12	0,2	Sinergic
		0,48	500	0,01	0,5	0,5	Sinergic

Valoarea concentrației minime inhibitorii a combinației flavonoidă BrBr – fluconazol a scăzut semnificativ pentru ambele substanțe testate împotriva tulpinii *C. albicans* Prx. În combinație cu fluconazolul, valoarea CMI a flavonoidei BrBr a fost redusă de cel puțin 2 ori, cea mai mică valoare FICI fiind obținută la o concentrație de 0,48 µg/ml flavonoidă BrBr și 1,95 µg/ml fluconazol (Tabel 6.7).

Tabel 6.7. Valorile concentrațiilor inhibitorii fracționale și indicelui fracționar al concentrației inhibitorii al flavonoidei BrBr și antimicoticului fluconazol împotriva tulpinii *C. albicans* Prx

CMI µg/ml				FIC BrBr	FIC fluconazol	FICI	Efect
BrBr	fluconazol	BrBr combinație	fluconazol combinație				
15,62	1000	15,62	0,24	1	0,0002	1	Aditiv
		7,8	0,48	0,49	0,0004	0,5	Sinergic
		3,9	0,97	0,24	0,0009	0,3	Sinergic
		1,9	0,97	0,12	0,0009	0,1	Sinergic
		0,97	0,97	0,06	0,0009	0,1	Sinergic
		0,48	1,95	0,03	0,001	0	Sinergic
		0,24	500	0,01	0,5	0,5	Sinergic
		0,12	500	0	0,5	0,5	Sinergic

Cel mai mare efect sinergic (FICI = 0,1) a fost obținut la o concentrație de 0,97 µg/ml flavonoidă BrI și 0,97 µg/ml fluconazol, respectiv 0,48 µg/ml flavonoidă BrI și 15,62 µg/ml fluconazol (Tabel 6.8).

Tabel 6.8. Valorile concentrațiilor inhibitorii fracționale și indicelui fracționar al concentrației inhibitorii al flavonoidei BrI și antimicoticului fluconazol împotriva tulpinii *C. albicans* Prx

CMI $\mu\text{g/ml}$				FIC BrI	FIC fluconazol	FICI	Efect
BrI	fluconazol	BrI combinație	fluconazol combinație				
7,8	1000	7,8	0,48	1	0,0004	1	Aditiv
		3,9	0,97	0,5	0,0009	0,5	Sinergic
		1,9	0,97	0,24	0,0009	0,2	Sinergic
		0,97	0,97	0,11	0,0009	0,1	Sinergic
		0,48	15,62	0,06	0,01	0,1	Sinergic
		0,24	500	0,03	0,5	0,5	Sinergic
		0,12	500	0,01	0,5	0,5	Sinergic
		0,06	500	0	0,5	0,5	Sinergic

CAPITOLUL 7 – PROPRIETĂȚILE FARMACOLOGICE ALE FLAVONOIDEI BrCl

7.1. MATERIALE ȘI ECHIPAMENTE NECESARE

7.1.1. Aprecierea *in silico* a proprietăților ADMET

Proprietățile ADMET ale flavonoidei BrCl au fost apreciate utilizând server-ului web pkCSM. *Formatul SMILES* (notație utilizată pe scară largă pentru reprezentarea compoziției atomice și a structurii chimice) al compusului din PubChem (Tabel 7.1) se încarcă în platforma farmacocinetică pkCSM (<http://biosig.unimelb.edu.au/pkcsm/prediction>) și se alege modul de predicție ADMET.

7.1.2. Determinarea citotoxicității flavonoidei BrCl

Determinarea citotoxicității flavonoidei BrCl s-a realizat utilizând două linii celulare HT29-MTX și HepG2.

7.2. REZULTATE ȘI DISCUȚII

7.2.1. Predicția *in silico* a proprietăților farmacologice ale flavonoidei BrCl

Pentru a determina probabilitatea ca flavonoida BrCl să devină un potențial candidat pentru dezvoltarea de noi medicamente ne-am propus și investigarea *in silico* a parametrilor ADMET – Tabel 7.1.

Tabel 7.1. Proprietățile de absorbție, distribuție, metabolism, excreție și toxicitate (ADMET) ale flavonoidei BrCl și ale antimicoticului fluconazol determinate utilizând programul pkCSM

Proprietate	Model	Valoare prognozată		Unitate
		Fluconazol	Flavonoida BrCl	
Absorbție	Solubilitate în apă	-3,293	-6,587	Numeric (Log mol/L)
Absorbție	Permeabilitatea Caco2	0,905	0,998	Numeric (Log Papp în 10^{-6} cm/s)
Absorbție	Absorbția intestinală (om)	94,964	89,114	Numeric (% absorbție)
Absorbție	Permeabilitatea pielii	-2,8	-2,728	Numeric (Log Kp)
Absorbție	Substrat pentru P-glicoproteina	Nu	Da	Categoric (da/nu)
Absorbție	Inhibitor al P-glicoproteinei I	Nu	Da	Categoric (da/nu)
Absorbție	Inhibitor al P-glicoproteinei II	Nu	Da	Categoric (da/nu)
Distribuție	VDss (om)	-0,441	0,798	Numeric (Log L/kg)
Distribuție	Fracție nelegată (om)	0,381	0,126	Numeric (Fu)
Distribuție	Permeabilitate BBB	-1,067	0,755	Numeric (Log BB)
Distribuție	Permeabilitate SNC	-3,185	-1,179	Numeric (Log PS)
Metabolism	Substrat CYP2D6	Nu	Nu	Categoric (da/nu)
Metabolism	Substrat CYP3A6	Nu	Da	Categoric (da/nu)
Metabolism	Inhibitor CYP1A2	Da	Da	Categoric (da/nu)
Metabolism	Inhibitor CYP2C19	Nu	Da	Categoric (da/nu)
Metabolism	Inhibitor CYP2C9	Nu	Nu	Categoric (da/nu)
Metabolism	Inhibitor CYP2D6	Nu	Da	Categoric (da/nu)
Metabolism	Inhibitor CYP3A4	Nu	Da	Categoric (da/nu)
Excreție	<i>Total Clearance</i>	0,29	-0,088	Numeric (Log ml/min/kg)
Excreție	Substrat renal OCT2	Nu	Nu	Categoric (da/nu)
Toxicitate	Toxicitate AMES	Nu	Da	Categoric (da/nu)
Toxicitate	Doza maximă tolerată	0,114	0,289	Numeric (Log mg/kg/zi)

	(om)			
Toxicitate	Inhibitor hERG I	Nu	Nu	Categoric (da/nu)
Toxicitate	Inhibitor hERG II	Nu	Da	Categoric (da/nu)
Toxicitate	Toxicitate acută orală la șobolan (LD50)	2,328	2,5	Numeric (mol/kg)
Toxicitate	Toxicitate acută orală la șobolan (LOAEL)	1,033	0,417	Numeric (Log mg/kg bw/zi)
Toxicitate	Hepatotoxicitate	Da	Nu	Categoric (da/nu)
Toxicitate	Sensibilizare cutanată	Nu	Nu	Categoric (da/nu)
Toxicitate	Toxicitate <i>Tetrahymena pyriformis</i>	0,312	0,326	Numeric
Toxicitate	Toxicitate pentru Minnow	3,872	-1,801	Numeric

7.2.2. Evaluarea citotoxicității flavonoidei BrCl asupra celulelor umane

Rezultatele obținute în acest studiu au arătat faptul că celulele epiteliale producătoare de mucus prezintă toleranță la flavonoida BrCl, obținându-se o valoare IC_{50} egală cu 31,86 $\mu\text{g/ml}$ (Figura 7.1-A). Totodată, în urma testării flavonoidei BrCl asupra hepatocitelor HepG2 s-a evidențiat că nu prezintă hepatotoxicitate, obținându-se o valoare IC_{50} egală cu 16,16 $\mu\text{g/ml}$ (Figura 7.2-B). Mai mult, rezultatele obținute *in vitro* în ceea ce privește hepatotoxicitatea confirmă datele obținute cu ajutorul platformei pkCSM conform cărora flavonoida sintetică nu prezintă hepatotoxicitate.

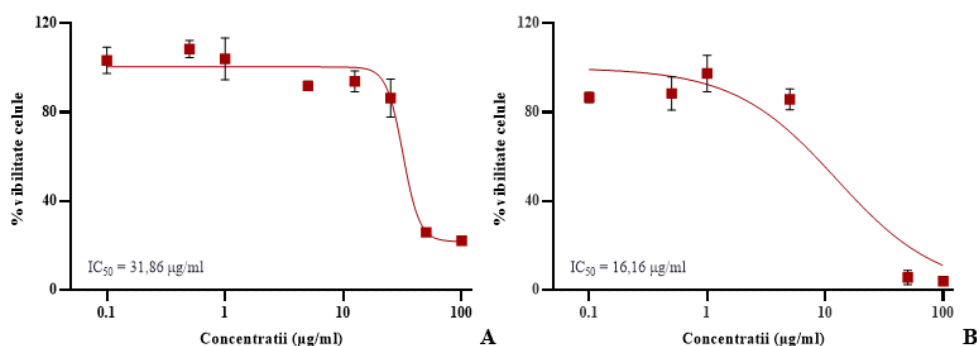


Figura 7.1. Efectul flavonoidei BrCl asupra viabilității liniei celulare A – HT29-MTX și B – HepG2. Celulele au fost incubate 24 ore în prezența flavonoidei BrCl (concentrații cuprinse între 0,1 și 100 $\mu\text{g/ml}$). Viabilitatea celulelor a fost evaluată prin măsurarea activității hidrogenazei mitocondriale utilizând reactivul CCK-8. Mediile sunt prezentate ca \pm SD ($N = 2$, $n = 6$). Concentrația moleculei necesară pentru a provoca o inhibiție de 50% a viabilității celulare (IC_{50}) a fost determinată cu ajutorul funcției de analiză a regresiei neliniare din GraphPad Prism.

CONCLUZII

- Analiza literaturii de specialitate scoate în evidență faptul că rezistența la antibiotice reprezintă una dintre cele mai mari amenințări la nivel global, fiind absolut necesare substanțe antimicrobiene noi care să fie utilizate în terapia bolilor infecțioase.
- Printre compușii ce prezintă o activitate antimicrobiană eficientă se află flavonoidele naturale, dar mai cu seamă cele sintetice. Această activitate se datorează capacității lor de a inhiba creșterea microorganismelor prin diferite mecanisme de acțiune, cum ar fi lezarea membranei celulare, inhibarea formării hifelor, a motilității, a formării biofilmului sau a enzimelor implicate în virulență.
- Testarea activității antimicrobiene a flavonoidelor sintetice triciclice cu sulf s-a realizat atât asupra bacteriilor, cât și asupra fungilor. În urma rezultatelor obținute s-a constatat că flavonoidele sintetice FCl, ClCl, BrCl, ICl, BrF, BrBr și BrI manifestă o importantă activitate antimicrobiană, valorile CMI împotriva bacteriilor Gram-pozitive fiind sub 3,9 μg/ml, cele pentru bacteriile Gram-negative mai mici de 250 μg/ml, iar cele pentru fungi sub 62,5 μg/ml.
- La valori ale CMI cuprinse între 0,12 μg/ml și 3,9 μg/ml, toate flavonoidele determină un efect bacteriostatic de cel puțin 12 ore împotriva tulpinii *S. aureus* ATCC 25923 testate. Efectul bacteriostatic asupra tulpinii *E. coli* ATCC 25922 se menține pentru cel puțin 12 ore la valori ale CMI cuprinse între 1,95 μg/ml și 62,5 μg/ml. În ceea ce privește tulpina *C. albicans* Prx, flavonoidele au prezentat un efect fungistatic de cel puțin 14 ore la concentrații cuprinse între 3,9 μg/ml și 31,25 μg/ml.
- Timpul în care celulele microbiene își pierd viabilitatea variază în funcție de flavonoida testată. La o concentrație echivalentă cu $2 \times$ CMI flavonoida BrF determină un efect bactericid după 4 ore, iar flavonoidele FCl, ICl, BrBr și BrI duc la pierderea viabilității celulelor de *S. aureus* ATCC 25923 după 2 ore. Flavonoidele ICl, BrBr și BrI utilizate într-o concentrație egală cu $2 \times$ CMI duc la pierderea viabilității celulelor de *E. coli* ATCC 25922 după 2 ore, 1 oră, respectiv 30 minute de la expunere.
- Presupunem că diferența în ceea ce privește efectul bactericid dintre bacteriile Gram-pozitive și cele Gram-negative se datorează concentrațiilor de flavonoide utilizate. Astfel, pentru bacteria Gram-negativă a fost obținut un efect bactericid la o concentrație egală cu 7,8 μg/ml, respectiv 31,25 μg/ml, în timp ce pentru bacteria Gram-pozitivă concentrația de flavonoidă necesară a fost de doar 7,8 μg/ml, 3,9 μg/ml și 0,95 μg/ml.
- Analiza microscopică a celulelor de *C. albicans* expuse la flavonoida BrCl ne sugerează că principalul mecanism de acțiune al flavonoidei BrCl este de tip membrantar, aceasta determinând liza celulară prin afectarea permeabilității și integrității membranei celulelor. Totodată, flavonoida BrCl provoacă alterări morfologice severe ale celulelor de *C. albicans* ca o consecință a lizei celulare.
- În ceea ce privește activitatea flavonoidei BrCl asupra unor factori implicați în virulența tulpinii *P. aeruginosa* 124 am remarcat că aceasta inhibă motilitatea de tip *swimming*,

swarming și *twitching* la concentrații echivalente cu $\frac{1}{8}$ CMI (0,48 $\mu\text{g/ml}$), $\frac{1}{4}$ CMI (0,9 $\mu\text{g/ml}$) și $\frac{1}{2}$ CMI (1,9 $\mu\text{g/ml}$).

- Activitatea pompelor de eflux implicate în rezistența tulpinii *P. aeruginosa* 124 nu a fost inhibată de flavonoida BrCl la o concentrație de 1,9 $\mu\text{g/ml}$ ($\frac{1}{2}$ CMI).
- În urma expunerii la flavonoida BrCl a fost inhibată tranziția morfologică de la forma de dermatoplast la cea de hifă a tulpinii *C. albicans* Prx, factor important implicat în virulență.
- Mai mult, s-a observat și o diminuare a expresiei genelor (*hwp1*, *als3* și *ece1*) implicate în formarea hifelor, acest lucru putând fi corelat cu inhibarea formării hifelor, având în vedere că gena *hwp1* codifică o proteină a peretelui hifelor ce este esențială pentru dezvoltarea lor.
- Flavonoida BrCl nu afectează activitatea unor enzime implicate în virulența tulpinilor de *Candida* (fosfolipaze, esteraze, proteaze și catalaze).
- Rezultatele obținute au evidențiat că aderarea celulelor de *C. krusei* Prx este inhibată într-o proporție de peste 90% la concentrații ale flavonoidei BrCl echivalente cu $2 \times$ CMI (31,25 $\mu\text{g/ml}$), CMI (15,62 $\mu\text{g/ml}$) și $\frac{1}{2}$ CMI (7,8 $\mu\text{g/ml}$). Mai mult, dezvoltarea biofilmului preformat este inhibată într-o proporție de peste 56% la concentrații subinhibitorii ($\frac{1}{2}$ CMI, $\frac{1}{4}$ CMI și $\frac{1}{8}$ CMI).
- La concentrații subinhibitorii $\frac{1}{2}$ CMI (7,8 $\mu\text{g/ml}$) și $\frac{1}{4}$ CMI (3,9 $\mu\text{g/ml}$) flavonoida BrCl inhibă formarea biofilmului de *C. krusei* într-o proporție de 77%, respectiv 66%.
- În prezența concentrațiilor egale cu CMI (15,62 $\mu\text{g/ml}$) și $\frac{1}{2}$ CMI (7,8 $\mu\text{g/ml}$) activitatea metabolică a celulelor din biofilm a fost inhibată aproximativ 90%, respectiv 60%.
- Expunerea la concentrații echivalente cu CMI (15,62 $\mu\text{g/ml}$) și $\frac{1}{2}$ CMI (7,8 $\mu\text{g/ml}$) au dus la distrugerea biofilmului matur în proporție de 78,49%, respectiv 51,46%.
- Datorită faptului că flavonoida BrCl nu prezintă activitate asupra hidrofobicității suprafeței celulare (CSH) și substanțelor exopolimerice (EPS) implicate în aderarea și stabilizarea biofilmului, presupunem că modul prin care flavonoida testată duce la inhibarea formării biofilmului este legat de afectarea (liza) celulelor.
- Utilizate în combinație cu penicilina și fluconazolul, flavonoidele au prezentat un important efect sinergic împotriva tulpinilor *S. aureus* MRSA și *C. albicans* (izolat clinic). În combinație cu flavonoidele FCl și BrCl valoarea CMI a fluconazolului a scăzut de cel puțin 500 ori, iar în combinație flavonoidele ClCl, ICl, BrF, BrBr și BrI, valoarea CMI a fluconazolului a scăzut de aproximativ 1030 ori.
- Analiza *in silico* a proprietăților farmacocinetice evidențiază faptul flavonoida BrCl îndeplinește doar 3 din cele 5 reguli propuse de Lipinski. Cu toate acestea, compusul testat prezintă o permeabilitate ridicată pentru linia celulară Caco-2, intestin și piele, este inhibitor pentru glicoproteina P, permeabilitatea BBB este ridicată, iar distribuția la nivelul SNC este favorabilă. Mai mult, în ceea ce privește toxicitatea flavonoidei BrCl s-a dovedit că aceasta nu prezintă hepatotoxicitate și nu duce la sensibilizarea pielii, în schimb prezintă toxicitate AMES, are un efect toxic pentru *T. pyriformis* și prezintă toxicitate Minnow.

- Testarea *in vitro* a efectului citotoxic al flavonoidei BrCl asupra a două linii celulare evidențiază că substanța testată nu prezintă hepatotoxicitate asupra liniei celulare HepG2 ($IC_{50} = 16,16 \mu\text{g/ml}$), iar linia celulară HT29-MTX prezintă toleranță la flavonoida BrCl ($IC_{50} = 31,86 \mu\text{g/ml}$). Rezultatele obținute evidențiază că flavonoida BrCl ar putea fi utilizată ca un agent antimicrobian având în vedere că valoarea concentrațiilor minime inhibitorii ($\leq 15,62 \mu\text{g/ml}$) este mai mică decât valorile IC_{50} .
- Datele obținute până în acest moment ne permit să afirmăm că flavonoida BrCl ar putea fi o alternativă fiabilă pentru a dezvolta medicamente eficiente utilizate pentru combaterea bacteriilor și fungilor.

PERSPECTIVE DE CONTINUARE A STUDIILOR

Rezultatele obținute în cadrul realizării tezei de doctorat legate de activitatea antimicrobiană a flavonoidelor sintetice triciclice cu sulf ne permit extinderea pe viitor a studiilor cu privire la:

1. Investigarea activității flavonoidelor asupra expresiei genelor implicate în formarea biofilmului la specii ale genului *Candida*.
2. Observarea cu ajutorul microscopiei electronice cu baleiaj (SEM) și a microscopiei electronice cu transmisie (TEM) a biofilmului produs de *Candida* spp. în prezența flavonoidelor sintetice triciclice cu sulf.
3. Testarea activității flavonoidelor asupra biofilmului mixt produs de diferite specii bacteriene și fungice.
4. Extinderea investigațiilor privind proprietățile antifungice și la alte specii ale genului *Candida* (eventual alți fungi patogeni).
5. Investigarea altor mecanisme de acțiune ale flavonoidelor triciclice cu sulf (interacțiunea cu receptori membranari folosind investigații *in silico*, aprecierea potențialului de a induce apariția unor specii reactive de oxigen, etc).
6. Aprecierea activității flavonoidelor asupra sistemului *quorum sensing* la *P. aeruginosa* și *Chromobacterium violaceum*.
7. Activitatea flavonoidelor sintetice triciclice cu sulf *in vivo*, folosind modele animale pentru infecții cu *Candida* spp.
8. Evaluarea capacității celulelor de *Candida* spp de a dobândi rezistență la flavonoidele triciclice cu sulf.

DISEMINAREA REZULTATELOR OBTINUTE ÎN CADRUL TEZEI DE DOCTORAT

Lista lucrărilor publicate:

1. **Mihaela Savu**, Marguerite Kandem Simo, Gabriel Xavier Fopokam, Ștefan Mihaiță Oлару, Oana Cioanca, Fabrice Fekam Boyom, Marius Ștefan (2022) – *New insights into the antimicrobial potential of Polyalthia longifolia – antibiofilm activity and synergistic effect in combination with penicillin against Staphylococcus aureus*. Microorganisms, 10(10), 1943 (FI 4,5).
2. Cristina-Veronica Moldovan, **Mihaela Savu**, Elodie Dussert, Hăirati Aboubacar, Laura Gabriela Sarbu, Simona Matiut, Benoit Cudennec, François Krier, Rozenn Ravallec, Lucian Mihail Birsa, Marius Ștefan (2022) – *Synthetic flavonoid BrCl-flav – an alternative solution to combat ESKAPE pathogens*. Antibiotics, 11(10), 1389 (FI 4,8).
3. Babii Cornelia, **Mihaela Savu**, Iuliana Motrescu, Lucian Mihail Birsa, Laura Gabriela Sarbu, Marius Ștefan (2021) – *The antibacterial synthetic flavonoid BrCl-flav exhibits important anti-Candida activity by damaging cell membrane integrity*. Pharmaceuticals, 14(11), 1130-1144 (FI 5,215).

Lista rezumatelor publicate:

Mihaela Savu, Lucian Birsa, Marius Ștefan (2023) – *Antibiofilm activity of a novel synthetic flavonoid against Candida krusei*. FEBS Open Bio 13 (Suppl. S2), pag. 137, DOI: 10.1002/2211-5463.13646 (FI 2,792).

Mihaela Savu, Lucian Birsa, Marius Ștefan (2022) – *Synthetic flavonoid BrCl – a potential solution against fluconazole resistant Candida strains*. FEBS Open Bio 12 (Suppl. S1), pag. 169-170, DOI: 10.1002/2211-5463.13440 (FI 2,792).

Mihaela Savu, Lucian Birsa, Marius Ștefan (2022) – *Activity of BrCl flavonoid on the biofilm formation by Candida krusei*. Journal of experimental and Molecular Biology, pag. 67, DOI: 10.47743/jemb-2022-23-2.

Mihaela Savu, Lucian Birsa, Marius Ștefan (2021) – *Anti-Candida activity of synthetic flavonoid BrCl*. Journal of experimental and Molecular Biology, pag.53, DOI: DOI:10.47743/jemb-2021-58.

Participări la conferințe internaționale:

Mihaela Savu, Lucian Birsa, Marius Ștefan (2023) – *Antibiofilm activity of a novel synthetic flavonoid against Candida krusei*. The 47th FEBS Congress 2023 – Together in bioscience for a better future. 8-12 iulie, Tours, Franța. Poster.

Mihaela Savu, Lucian Birsa, Marius Ștefan (2022) – *Anti-Candida biofilm activity of synthetic flavonoid BrCl*. The International Conference and XXXIX Scientific Session of the Romanian Society for Cell Biology. 21-23 octombrie 2022, Cluj, România. Poster.

Mihaela Savu, Lucian Birsa, Marius Ștefan (2022) – *Synthetic flavonoid BrCl - a potential solution against fluconazole resistant Candida strains*. 25th IUBMB, 46th FEBS, 15th PABMB 2022. 9-14 iulie 2022, Lisabona, Portugalia. Poster.

Mihaela Savu, Lucian Birsa, Marius Ștefan (2021) – *ICl - flav - a new flavonoid with antimicrobial properties*. 45th FEBS Congress 2021. 3-8 iulie, Ljubljana, Slovenia. Poster.

Mihaela Savu, Lucian Birsa, Marius Ștefan (2019) – *Anti-Candida activity of a new synthetic flavonoid with halogenated substituents*. Annual International Conference of the Romanian Society of Biochemistry and Molecular Biology. 25-26 septembrie, Iași, România.

Participări la conferințe naționale:

Mihaela Savu, Lucian Birsa, Marius Ștefan (2022) – *Activitatea flavonoidei BrCl asupra biofilmului produs de Candida krusei*. Sesiunea Științifică Tendințe în Biologie: de la molecule la sisteme complexe. 27-28 octombrie, Iași, România. Comunicare orală.

Mihaela Savu, Lucian Birsa, Marius Ștefan (2022) – *Mecanismul de acțiune al flavonoidei BrCl asupra tulpinilor rezistente de Candida*. Sesiunea Științifică Anuală a Studenților Naturaliști. 21 mai, Iași, România. Comunicare orală.

Mihaela Savu, Lucian Birsa, Marius Ștefan (2021) – *Anti-Candida activity of synthetic flavonoid BrCl*. Sesiunea Științifică Tendințe în Biologie: de la molecule la sisteme complexe. 28-29 octombrie, Iași, România. Comunicare orală.

Mihaela Savu, Lucian Birsa, Marius Ștefan (2021) – *ICl-flav – o nouă flavonoidă cu proprietăți antimicrobiene*. Sesiunea Științifică Anuală a Studenților Naturaliști. 22 mai, Iași, România. Comunicare orală.

Mihaela Savu, Lucian Birsa, Marius Ștefan (2020) – *Activitatea antimicrobiană a unor flavonoide sintetice tricyclice cu sulf*. Sesiunea Științifică Anuală a Studenților Naturaliști. 31 octombrie, Iași, România. Comunicare orală.

Burse internaționale câștigate:

Bursă pentru tineri cercetători la cel de-al 47-lea Congres FEBS, 8-12 iulie 2023, Tours, Franța.

Membru în echipa unor proiecte de cercetare:

Contract numărul: 550PED/2020 – Program 1. Subprogramul 2.1: Proiect experimental - demonstrativ: *Tricyclic 1,3-dithiolium flavonoids – New weapons to combat antibiotic resistance*. Acronim: TrisFlav. Cod proiect: PN-III-P2-2.1-PED-2019-2235 (26.10.2020 – 15.11.2022).

Contract numărul: 394PED/2020 – Programul 2 – Creșterea competitivității economiei românești prin cercetare, dezvoltare și inovare: *Fitoalexine și uleiuri esențiale din Artemisia Spp. Cu potențial în*

agricultura ecologică, ca biopesticide și erbicide. Acronim: BioPest. Cod proiect: PN-III-P2-2.1-PED-2019-0091 (23.10.2020 – 23.10.2022).

Contract numărul: 23BM/2019 – Program 3: Cooperare Europeană și Internațională. Subprogramul 3.1: Bilaterale România - Franța: *New synthetic flavonoids with antimicrobial applications*. Acronim: Microflav. Cod proiect: PNCDI III (26.07.2019 – 29.12.2020).

Propunere brevet:

Titlu brevet: *Procedeu de obținere a unei noi flavonoide sintetice cu proprietăți antibacteriene*. Cererea de brevet a fost înregistrată OSIM, având numărul A/00697 din 31.10.2022.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

Acar, J. și Rosel, B. (2001) Antimicrobial resistance: an overview. *Revue Scientifique et Technique de l'OIE*, 20(3), pag. 797-810.

Alav, I., Sutton, J.M. și Rahman, K.M. (2018) Role of bacterial efflux pumps in biofilm formation. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 73(8), pag. 2003-2020.

Ariel, G., Rabani, A., Benisty, S., Partridge, J.D., Harshey, R.M. și Be'er, A. (2015) Swarming bacteria migrate by Lévy Walk. *Nature Communications*, 6(1), pag. 8396.

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. și Baloch, Z. (2018) Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis. *Infection and Drug Resistance*, (11), pag. 1645-1658.

Aygan, A. și Arikian, B. (2007) Mini Review An Overview on Bacterial Motility Detection. *International Journal of Agriculture & Biology*.

Bahrin, L.G., Apostu, M.O., Birsa, L.M. și Stefan, M. (2014) The antibacterial properties of sulfur containing flavonoids. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 24(10), pag. 2315-2318.

Banerji, R., Kanojiya, P. și Saroj, S.D. (2020) Role of interspecies bacterial communication in the virulence of pathogenic bacteria. *Critical Reviews in Microbiology*, 46(2), pag. 136-146.

Barriuso, J., Vaquero, M.E., Prieto, A. și Martínez, M.J. (2016) Structural traits and catalytic versatility of the lipases from the *Candida rugosa*-like family: A review. *Biotechnology Advances*, 34(5), pag. 874-885.

Beceiro, A., Tomás, M. și Bou, G. (2013) Antimicrobial Resistance and Virulence: a Successful or Deleterious Association in the Bacterial World?. *Clinical Microbiology Reviews*, 26(2), pag. 185-230.

Bose, S., Sarkar, D., Bose, A. și Mandal, Chandra, S. (2018) Natural Flavonoids and Its Pharmaceutical Importance. *The Pharma Review*.

Buvelot, H., Posfay-Barbe, K.M., Linder, P., Schrenzel, J. și Krause, K.-H. (2017) *Staphylococcus aureus*, phagocyte NADPH oxidase and chronic granulomatous disease. *FEMS microbiology reviews*, 41(2), pag. 139-157.

Cavalheiro, M. și Teixeira, M.C. (2018) *Candida Biofilms*: Threats, Challenges, and Promising Strategies. *Frontiers in Medicine*, 5.

Celedón, R.S. și Díaz, L.B. (2021) Natural Pigments of Bacterial Origin and Their Possible Biomedical Applications. *Microorganisms*, 9(4), pag. 739.

- Chen, H., Zhou, X., Ren, B. și Cheng, L. (2020) The regulation of hyphae growth in *Candida albicans*. *Virulence*, 11(1), pag. 337-348.
- Coleman, J.J. și Mylonakis, E. (2009) Efflux in Fungi: La Pièce de Résistance. *PLoS Pathogens*. Ediție de B.B. Finlay, 5(6), pag. 1000486.
- Cushnie, T.P.T. și Lamb, A.J. (2005) Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 26(5), pag. 343-356.
- Cushnie, T.P.T. și Lamb, A.J. (2011) Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 38(2), pag. 99-107.
- Cushnie, T.P.T., Taylor, P.W., Nagaoka, Y., Uesato, S., Hara, Y. și Lamb, A.J. (2008) Investigation of the antibacterial activity of 3- O -octanoyl(-)-epicatechin. *Journal of Applied Microbiology*, 105(5), pag. 1461-1469.
- de Waard, M.A., Andrade, A.C., Hayashi, K., Schoonbeek, H., Stergiopoulos, I. și Zwieters, L.-H. (2006) Impact of fungal drug transporters on fungicide sensitivity, multidrug resistance and virulence. *Pest Management Science*, 62(3), pag. 195-207.
- Del Pozo, J.L. (2018) Biofilm-related disease. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 16(1), pag. 51-65.
- Dong, Y.-H. și Zhang, L.-H. (2005) Quorum sensing and quorum-quenching enzymes. *Journal of microbiology* (Seoul, Korea), 43, pag. 101-9.
- Dow, L. (2021) How Do Quorum-Sensing Signals Mediate Algae–Bacteria Interactions?. *Microorganisms*, 9(7), pag. 1391.
- Duan, Q., Zhou, M., Zhu, L. și Zhu, G. (2013) Flagella and bacterial pathogenicity. *Journal of Basic Microbiology*, 53(1), pag. 1-8. 117.
- Ferreira, M.L.F., Serra, P. și Casati, P. (2021) Recent advances on the roles of flavonoids as plant protective molecules after UV and high light exposure. *Physiologia Plantarum*, 173(3), pag. 736-749.
- Garcia, Í.R., de Oliveira Garcia, F.A., Pereira, P.S., Coutinho, H.D.M., Siyadatpanah, A., Norouzi, R., Wilairatana, P., de Lourdes Pereira, M., Nissapatorn, V., Tintino, S.R. și Rodrigues, F.F.G. (2022) Microbial resistance: The role of efflux pump superfamilies and their respective substrates. *Life Sciences*, 295, pag. 120391.
- Gauwerky, K., Borelli, C. și Korting, H.C. (2009) Targeting virulence: A new paradigm for antifungals. *Drug Discovery Today*, 14(3-4), pag. 214-222.
- Ghannoum, M.A. (2000) Potential Role of Phospholipases in Virulence and Fungal Pathogenesis. *Clinical Microbiology Reviews*, 13(1), pag. 122-143.
- Głowacka, P., Żakowska, D., Naylor, K., Niemcewicz, M. și Bielawska-Drózd, A. (2018) Brucella – Virulence Factors, Pathogenesis and Treatment. *Polish Journal of Microbiology*, 67(2), pag. 151-161.
- Górniak, I., Bartoszewski, R. și Króliczewski, J. (2019) Comprehensive review of antimicrobial activities of plant flavonoids. *Phytochemistry Reviews*, 18(1), pag. 241-272.
- Ha, D.-G., Kuchma, S.L. și O’Toole, G.A. (2014) Plate-Based Assay for Swimming Motility in *Pseudomonas aeruginosa*. *Methods in Molecular Biology*, pag. 59-65.
- Harshey, R.M. (2003) Bacterial Motility on a Surface: Many Ways to a Common Goal. *Annual Review of Microbiology*, 57(1), pag. 249-273.
- Havsteen, B. (1983) Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. *Biochemical Pharmacology*, 32(7), pag. 1141-1148.
- Hynes, W. și Sloan, M. (2016) Secreted Extracellular Virulence Factors, *Streptococcus pyogenes*: Basic Biology to Clinical Manifestations. *National Library of Medicine*.
- Istivan, T.S. și Coloe, P.J. (2006) Phospholipase A in Gram-negative bacteria and its role in pathogenesis. *Microbiology*, 152(5).

- Kadosh, D. (2019) Regulatory mechanisms controlling morphology and pathogenesis in *Candida albicans*. *Current Opinion in Microbiology*, 52, pag. 27-34.
- Kapoor, G., Saigal, S. și Elongavan, A. (2017) Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. *Journal of Anaesthesiology Clinical Pharmacology*, 33(3), pag. 300.
- Karak, P. (2019) Biological Activities of Flavonoids: an Overview. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 10(4), pag. 1567-1574.
- Khajuria, R., Singh, S. și Bahl, A. (2019) General Introduction and Sources of Flavonoids. *Current Aspects of Flavonoids: Their Role in Cancer Treatment*. Singapore: Springer Singapore, pag. 1-7.
- Kumar, C.P.G., Kumar, S.S.J. și Menon, T. (2006) Phospholipase and proteinase activities of clinical isolates of *Candida* from immunocompromised patients. *Mycopathologia*, 161, pag. 213-218.
- Kumar, S. și Pandey, A.K. (2013) Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *The Scientific World Journal*, 2013, pag. 1-16.
- Lai, S., Tremblay, J. și Déziel, E. (2009) Swarming motility: a multicellular behaviour conferring antimicrobial resistance. *Environmental Microbiology*, 11(1), pag. 126-136.
- Lambert, R.J.W. și Pearson, J. (2000) Susceptibility testing: accurate and reproducible minimum inhibitory concentration (MIC) and non-inhibitory concentration (NIC) values. *Journal of Applied Microbiology*, 88(5), pag. 784-790.
- Leitão, J.H. (2020) Microbial Virulence Factors. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(15), pag. 5320.
- Lohse, M.B., Gulati, M., Johnson, A.D. și Nobile, C.J. (2018) Development and regulation of single- and multi-species *Candida albicans* biofilms. *Nature Reviews Microbiology*, 16(1), pag. 19-31.
- Mba, I.E. și Nweze, E.I. (2020) Mechanism of *Candida* pathogenesis: revisiting the vital drivers. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 39(10), pag. 1797-1819.
- McKeegan, K.S., Borges-Walmsley, M.I. și Walmsley, A.R. (2002) Microbial and viral drug resistance mechanisms. *Trends in Microbiology*, 10(10), pag. 8-14.
- Miyata, M., Robinson, R.C., Uyeda, T.Q.P., Fukumori, Y., Fukushima, S., Haruta, S., Homma, M., Inaba, K., Ito, M., Kaito, C., Kato, K., Kenri, T., Kinoshita, Y., Kojima, S., Minamino, T., Mori, H., Nakamura, S., Nakane, D., Nakayama, K., Nishiyama, M., Shibata, S., Shimabukuro, K., Tamakoshi, M., Taoka, A., Tashiro, Y., Tulum, I., Wada, H. și Wakabayashi, K. (2020) Tree of motility – A proposed history of motility systems in the tree of life. *Genes to Cells*, 25(1), pag. 6-21.
- Mroczynska, M. și Brillowska-Dabrowska, A. (2021) Virulence of clinical candida isolates. *Pathogens*, 10(4), pag. 466.
- Ni, S., Li, B., Xu, Y., Mao, F., Li, X., Lan, L., Zhu, J. și Li, J. (2020) Targeting virulence factors as an antimicrobial approach: Pigment inhibitors. *Medicinal Research Reviews*, 40(1), pag. 293-338.
- Nisar, S., Kirkpatrick, L.D. și Shupp, J.W. (2021) Bacterial Virulence Factors and Their Contribution to Pathophysiology after Thermal Injury. *Surgical Infections*, 22(1), pag. 69-76.
- Nobile, C.J. și Johnson, A.D. (2015) *Candida albicans* Biofilms and Human Disease. *Annual Review of Microbiology*, 69(1), pag. 71-92.
- Pakshir, K., Zomorodian, K., Karamitalab, M., Jafari, M., Taraz, H. și Ebrahimi, H. (2013) Phospholipase, esterase and hemolytic activities of *Candida* spp. isolated from onychomycosis and oral lichen planus lesions. *Journal de Mycologie Médicale*, 23(2), pag. 113-118.
- Panche, A.N., Diwan, A.D. și Chandra, S.R. (2016) Flavonoids: an overview. *Journal of Nutritional Science*, 5, pag. 47.

- Perlin, D.S., Shor, E. și Zhao, Y. (2015) Update on Antifungal Drug Resistance. *Current Clinical Microbiology Reports*, 2(2), pag. 84-95.
- Pierce, C.G., Thomas, D.P. și Lopez-Ribot, J.L. (2009) Effect of tunicamycin on *Candida albicans* biofilm formation and maintenance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 63(3), pag. 473-479.
- Poulin, R. și Combes, C. (1999) The Concept of Virulence: Interpretations and Implications. *Parasitology Today*, 15(12), pag. 474-475.
- Reimer, L.G., Stratton, C.W. și Reller, L.B. (1981) Minimum inhibitory and bactericidal concentrations of 44 antimicrobial agents against three standard control strains in broth with and without human serum. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 19(6), pag. 1050-1055.
- Reygaert, W. (2018) An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS Microbiology*, 4(3), pag. 482-501.
- Reygaert, W.C. (2016) Insights on the Antimicrobial Resistance Mechanisms of Bacteria. *Advances in Clinical and Medical Microbiology*, 2(1).
- Rumbaugh, K.P. și Sauer, K. (2020) Biofilm dispersion. *Nature Reviews Microbiology*, 18(10), pag. 571-586.
- Sabtu, N., Enoch, D.A. și Brown, N.M. (2015) Antibiotic resistance: what, why, where, when and how?. *British medical bulletin*, 116, pag. 105-13.
- Schmitt, C.K., Meysick, K.C. și O'Brien, A.D. (1999) Bacterial Toxins: Friends or Foes?. *Emerging Infectious Diseases*, 5(2), pag. 224-234.
- Schroeder, M., Brooks, B. și Brooks, A. (2017) The Complex Relationship between Virulence and Antibiotic Resistance. *Genes*, 8(1), pag. 39.
- Sharma, D., Misba, L. și Khan, A.U. (2019) Antibiotics versus biofilm: an emerging battleground in microbial communities. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*, 8(1), pag. 76.
- Sharma, M. și Anand, S.K. (2002) Swarming: A coordinated bacterial activity. *Current Science*, pag. 707-715.
- Silva, L.N., Zimmer, K.R., Macedo, A.J. și Trentin, D.S. (2016) Plant Natural Products Targeting Bacterial Virulence Factors. *Chemical Reviews*, 116(16), pag. 9162-9236.
- Silva, S., Negri, M., Henriques, M., Oliveira, R., Williams, D.W. și Azeredo, J. (2012) *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis* : biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS Microbiology Reviews*, 36(2), pag. 288-305.
- Singh, A. și Del Poeta, M. (2011) Lipid signalling in pathogenic fungi. *Cellular Microbiology*, 13(2), pag. 177-185.
- Sriphannam, C., Nuanmuang, N., Saengsawang, K., Amornthipayawong, D. și Kummasook, A. (2019) Anti-fungal susceptibility and virulence factors of *Candida* spp. isolated from blood cultures. *Journal de Mycologie Médicale*, 29(4), pag. 325-330.
- Staerck, C., Gastebois, A., Vandeputte, P., Calenda, A., Larcher, G., Gillmann, L., Papon, N., Bouchara, J.-P. și Fleury, M.J.J. (2017) Microbial antioxidant defense enzymes. *Microbial Pathogenesis*, 110, pag. 56-65.
- Stefan, M. și Birsă, M.L. (2019) Flavonoids - An amazing group of compounds with potent antimicrobial properties. *Memoirs of the Scientific Sections of the Romanian Academy*.
- Stehr, F., Kretschmar, M., Kröger, C., Hube, B. și Schäfer, W. (2003) Microbial lipases as virulence factors. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 22(5-6), pag. 347-355.
- Tsao, R. și McCallum, J. (2009) Chemistry of Flavonoids. Fruit and Vegetable Phytochemicals. *Oxford, UK: Wiley-Blackwell*, pag. 131-153.

- Tsao, T.-F., Newman, M.G., Kwok, Y.-Y. și Horikoshi, A.K. (1982) Effect of Chinese and Western Antimicrobial Agents on Selected Oral Bacteria. *Journal of Dental Research*, 61(9), pag. 1103-1106.
- Turnbull, L. și Whitchurch, C.B. (2014) Motility Assay: Twitching Motility. *In Methods in Molecular Biology*, pag. 73-86.
- Wandersman, C. (1989) Secretion, processing and activation of bacterial extracellular proteases. *Molecular Microbiology*, 3(12), pag. 1825-1831.
- Wang, X., Cao, Y., Chen, S., Lin, J., Bian, J. și Huang, D. (2021) Anti-Inflammation Activity of Flavones and Their Structure–Activity Relationship. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 69(26), pag. 7285-7302.
- Wiegand, I., Hilpert, K. și Hancock, R.E.W. (2008) Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature Protocols*, 3(2), pag. 163-175.
- Władyka, B. și Pustelny, K. (2008) Regulation of bacterial protease activity. *Cellular and Molecular Biology Letters*, 13(2).
- Wolfmeier, H., Pletzer, D., Mansour, S.C. și Hancock, R.E.W. (2018) New Perspectives in Biofilm Eradication. *ACS Infectious Diseases*, 4(2), pag. 93-106.
- Wu, H.-J., Wang, A.H.J. și Jennings, M.P. (2008) Discovery of virulence factors of pathogenic bacteria. *Current Opinion in Chemical Biology*, 12(1), pag. 93-101.
- Yang, Y.-L. (2003) Virulence factors of *Candida* species. *Journal of microbiology, immunology, and infection*, 36(4), pag. 223-8.
- Zegadło, K., Gieroń, M., Żarnowiec, P., Durlík-Popińska, K., Kręcisz, B., Kaca, W. și Czerwonka, G. (2023) Bacterial Motility and Its Role in Skin and Wound Infection. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(2:1707).