

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
„CAROL DAVILA”, BUCUREȘTI
ȘCOALA DOCTORALĂ
DOMENIUL FARMACIE**

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

**Conducător de doctorat:
PROF. UNIV. DR. MARGINĂ DENISA**

**Student-doctorand:
NEDELCU (căs. NIȚULESCU) GEORGIANA**

**BUCUREȘTI
2018**

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
„CAROL DAVILA”, BUCUREȘTI
ȘCOALA DOCTORALĂ
DOMENIUL FARMACIE

*Dezvoltarea de noi agenți antimicrobieni.
Studii privind mecanismele biochimice implicate în
efectele biologice*

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Conducător de doctorat:
PROF. UNIV. DR. MARGINĂ DENISA

Student-doctorand:
NEDELICU (căs. NIȚULESCU) GEORGIANA

2018

Cuprinsul tezei

Introducere	8
I. Partea generală.....	10
1. Factorii de virulență bacteriană – ținte pentru terapia antimicrobiană	10
1.1. Factorii de virulență ofensivi	11
1.1.1. Factorii de aderență.....	11
1.1.2. Factorii de invazie a celulelor gazdă și a țesuturilor	12
1.1.3. Toxinele	12
1.1.4. Sistemele de secreție bacteriană	15
1.2. Factorii de virulență defensivi.....	16
1.2.1. Factorii antifagocitari	16
1.2.2. Variația fazelor.....	17
1.2.3. Factorii de rezistență la acțiunea imunoglobulinelor.....	18
1.2.4. Factorii de rezistență la acțiunea complementului	18
1.2.5. Proteinele de stres	20
1.3. Factorii de virulență nespecifici	21
1.3.1. Sistemul de absorbție al fierului.....	21
1.3.2. Sistemul de absorbție al magneziului.....	21
1.3.3. Exoenzimele	22
1.3.4. Patogenitatea intracelulară	22
1.3.5. Biofilmul bacterian.....	23
1.4. Factorii genetici asociați reglării virulenței.....	23
2. Sortazele-enzime din clasa transpeptidazelor.....	25
2.1. Variațiile structurale specifice fiecărei clase.....	30
2.1.1. Sortazele de Clasă A	31
2.1.2. Sortazele de Clasă B.....	32
2.1.3. Sortazele de Clasă C.....	33
2.1.4. Sortazele de Clasă D	33
2.1.5. Sortazele de Clasă E și F	34
2.2. Metode de analiză pentru activitatea sortazei	34
3. Inhibitori de sortază.....	37
3.1. Inhibitori de sinteză.....	37
3.2. Inhibitori naturali	42
II. Contribuții personale.....	48
4. Analiza structurală a inhibitorilor de sortază A.....	48
4.1. Introducere	48
4.2. Materiale și metode.....	48
4.3. Rezultate	50
4.3.1. Descrierea datelor.....	50
4.3.2. Analiza scheletelor Bemis-Murcko	51
4.3.3. Analiza clusterului structural	55
4.3.4. Inhibitori puternici versus inhibitori slabi	56

4.3.5. Studii de tip <i>repurposing</i>	62
4.4. Concluzii	63
5. Determinarea activității inhibitorii asupra sortazei A a unor compuși naturali și de sinteză.....	65
5.1. Introducere	65
5.2. Selecția compușilor	65
5.3. Materiale și metode.....	68
5.4. Rezultate	69
5.4.1. Studii cinetice	69
5.4.2. Testarea preliminară a activității inhibitorii a compușilor naturali asupra sortazei A	72
5.4.3. Determinarea concentrației inhibitorii 50% a compușilor naturali.....	75
5.4.4. Testarea preliminară a activității inhibitorii a compușilor de sinteză asupra sortazei A	85
5.4.5. Determinarea concentrației inhibitorii 50% a compușilor de sinteză	88
5.5. Concluzii	89
6. Determinarea activității inhibitorii asupra sortazei A a unor extracte naturale	92
6.1. Introducere	92
6.2. Selecția extractelor	92
6.3. Materiale și metode.....	93
6.4. Rezultate	94
6.4.1. Testarea preliminară a activității inhibitorii a extractelor vegetale asupra sortazei A	94
6.4.2. Determinarea concentrației inhibitorii 50% a extractelor vegetale asupra sortazei A	97
6.5. Concluzii	104
7. Analiza de docking molecular.....	105
7.1. Introducere	105
7.2. Materiale și metode.....	105
7.3. Rezultate	106
7.4. Concluzii	125
8. Determinarea activității antioxidante a potențialilor inhibitori de sortază A.....	126
8.1. Introducere	126
8.2. Materiale și metode.....	126
8.2.1. Determinarea capacității antioxidante	126
8.2.2. Determinarea conținutului de hidroxiperoxi prin metoda FOX.....	127
8.3. Rezultate	128
8.3.1. Determinarea capacității antioxidante a compușilor	128
8.3.2. Determinarea conținutului de hidroxiperoxi prin metoda FOX.....	137
8.4. Concluzii	140
9. Evaluarea toxicității compușilor naturali și de sinteză și a extractelor vegetale prin modelul <i>Daphnia</i> 141	
9.1. Introducere	141
9.2. Materiale și metode.....	142
9.3. Rezultate	143
9.3.1. Toxicitatea compușilor naturali și de sinteză determinată prin modelul <i>Daphnia</i>	143
9.3.2. Toxicitatea extractelor naturale determinată prin modelul <i>Daphnia</i>	160
9.4. Concluzii	165

10. Evaluarea activității antimicrobiene a potențialilor inhibitori de sortază A	167
10.1. Introducere	167
10.2. Materiale și metode	168
10.2.1. Metoda difuzimetrică	169
10.2.2. Metoda microdiluțiilor	170
10.3. Rezultate	170
10.3.1. Metoda difuzimetrică	170
10.3.2. Metoda microdiluțiilor	172
10.4. Concluzii	173
Concluzii generale	174
Bibliografie	180
Anexe	191

Introducere

La nivel global rezistența antimicrobiană a devenit o problemă critică de sănătate publică. Creșterea dramatică a incidenței infecțiilor cu bacterii rezistente la antibiotice conduce cercetările în domeniu spre dezvoltarea de noi agenți terapeutici, dar acestea necesită resurse materiale, umane, cât și timp.

Organizația Mondială a Sănătății a identificat *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) și *Streptococcus pneumoniae* ca fiind cele mai frecvente bacterii cu rezistență multiplă [1].

În prezent cele mai des întâlnite mecanisme de acțiune ale agenților antibacterieni sunt bacteriostatic și bactericid, dezavantajul acestora fiind reprezentat de riscul major de selecție de populații rezistente. Astfel, se impune găsirea de noi terapii în infecțiile bacteriene, una dintre acestea fiind cea care se axează pe scăderea factorilor de virulență [2]. Aceștia reprezintă multiple ținte farmacologice, fapt ce constituie un avantaj considerabil. De asemenea, mecanismele de acțiune ale compușilor dezvoltați ca agenți antivirulență sunt diferite, obiectivul acestora fiind de a scădea dezvoltarea rezistenței bacteriene, un alt avantaj al acestor terapii.

Dezvoltarea de numeroși factori de virulență face din *S. aureus* un instrument indispensabil în studierea de noi terapii antivirulență [2].

Sortazele, enzime din clasa transpeptidazelor reprezintă unii dintre factorii de virulență intens discutați în literatura de specialitate. Datorită rolurilor pe care le au, aceste enzime sunt ținte importante asupra cărora pot acționa noi agenți, rezultatul urmărit fiind cel de a bloca patogeneza bacteriilor Gram-pozitive, cum ar fi stafilococi, streptococi sau enterococi [3]. Patogenitatea, virulența și un nivel ridicat de rezistență la medicamente, au făcut ca sortaza A (SrtA) a bacteriei *S. aureus* să fie cea mai intens studiată sortază și este privită ca un model funcțional pentru dezvoltarea inhibitorilor împotriva bacteriilor Gram-pozitive [4].

Obiectivul principal al acestei cercetări este descoperirea de noi inhibitori ai sortazei provenită de la *S. aureus*.

În acest scop **obiectivele secundare** stabilite au fost:

- realizarea unei baze de date cu inhibitorii de SrtA cunoscuți și analiza lor din punct de vedere structural în vederea obținerii unui profil de inhibitor potent al SrtA;
- selectarea unui set de compuși naturali și de sinteză care să corespundă cerințelor identificate, păstrând totodată și un grad ridicat de diversitate structurală;

- evaluarea experimentală a activității inhibitorii a compușilor pe SrtA folosind un kit ce are la baza o metodă de analiză FRET;
- identificarea unor posibile relații structură-acțiune cu ajutorul metodelor de *docking* molecular;
- extinderea studiului asupra unor extracte vegetale cu principii active cu posibilă acțiune inhibitorie asupra SrtA;
- testarea toxicității acute a compușilor și extractelor cu ajutorul testului *Daphnia*;
- testarea activității antimicrobiene utilizând testul de difuzie și determinarea concentrației minime inhibitorii (CMI) pentru compușii de interes.

Stadiul actual al cunoașterii

Partea generală a tezei sumarizează cercetările efectuate până în prezent în domeniul dezvoltării agenților antivirulență.

În primul capitol, intitulat **Factorii de virulență bacteriană – ținte pentru terapia antimicrobiană**, sunt clasificați principalii factori de virulență dezvoltați de bacterii cu implicațiile lor în patogenitatea și rezistența microorganismelor [5–9]. Virulența reprezintă capacitatea microorganismelor de a pătrunde, a se adapta, a se înmulți și a invada țesuturile și umorile organismului. Această proprietate a bacteriilor este facilitată de factorii de virulență.

Din acest motiv mecanismele implicate în dezvoltarea factorilor de virulență reprezintă un domeniu extrem de studiat pentru dezvoltarea de soluții terapeutice antimicrobiene, în acest capitol fiind prezentate succint terapiile [10–13] ce au ca țintă de acțiune factorii de virulență.

În cel de-al doilea capitol sunt analizate caracteristicile structurale [14–18], mecanismul de acțiune [19–23], precum și metodele de analiză [25–29] a **Sortazelor-enzime din clasa transpeptidazelor**. Dintre multitudinea de factori de virulență, moleculele secretate de bacterii reprezintă un domeniu aparte de cercetare datorită diversității acestora. Numeroasele tipuri de proteine de pe suprafața bacteriilor contribuie la interacțiunea cu mediul exterior. Pentru sinteza peretelui bacterian, implicit atașarea proteinelor la suprafața acestuia sunt necesare mai multe tipuri de reacții, dintre acestea cele de transpeptidare au o pondere însemnată. Astfel, enzimele ce catalizează aceste reacții, sortazele, reprezintă ținte

intens studiate în ultimele decenii în vederea dezvoltării de medicamente care inhibă virulența.

Cel de-al treilea capitol din partea generală cuprinde o scurtă analiză a **Inhibitorilor de sortază** identificați până în prezent; criteriile de clasificare alese fiind proveniența, respectiv structura chimică a acestora. Studiul asupra inhibitorilor sortazelor bacteriene a început cu observația că procesul de ancorare a factorilor de virulență la nivelul peretelui celular este blocat de substanțe reactive, capabile să interacționeze cu o grupă tiol activă. Prezența acestei grupe funcționale în structura sortazelor a fost demonstrată ulterior [14,29]. Identificarea restului de cisteină în centrul catalitic al SrtA a permis descoperirea primilor inhibitori ai enzimei: clorura de (2-(trimetilamoniu)etil)metan [30], acidul 4-hidroxicuribenzoic (4-HMB) [29,31], derivații vinilcetonici [32,33] etc.

Cercetările efectuate până în prezent pentru identificarea efectului inhibitor asupra SrtA al extractelor din plante medicinale au raportat evaluarea atât a extractelor totale, cât și a compușilor izolați din acestea. Exemple de compuși naturali ce au prezentat activitate inhibitoare asupra SrtA sunt derivații flavonici [34–36], o altă sursă importantă de inhibitori de SrtA fiind organismele marine [37–41].

Contribuții personale

Partea de contribuții personale are ca prim capitol **Analiza structurală a inhibitorilor de sortază A**. Pentru acest studiu am folosit baza de date PubChem a Centrului Național de Biotehnologie Informațională, ce reprezintă un repertoriu public de molecule din care au fost selectate toate substanțele pentru care a fost raportată activitate asupra SrtA. Setul astfel obținut a fost analizat din punct de vedere al descriptorilor structurali: masă moleculară (M), coeficient logaritm de partiție octanol/apă calculat folosind metoda XlogP (LogP), numărul donatorilor de legături de hidrogen (HD), numărul acceptorilor de legături de hidrogen (HA), suprafață polară (SP), numărul de legături rotative (RB), gradul de complexitate structurală (CPL), gradul de nesaturare (NES), numărul de atomi de carbon, hidrogen, oxigen, azot, sulf și halogeni (nC, nH, nO, nN, nS și nX), numărul de atomi grei (HVA), prezența izomeriei E/Z (EZ) și numărul de cicluri (NR). Astfel, portretul structural al unui bun inhibitor de SrtA ce s-a conturat este reprezentat de o moleculă mică, cu M între 180 și 600 g/mol, cu 1 până la 4 atomi de azot, până la 3 atomi de oxigen și mai puțin de 18 atomi de hidrogen. Numerele atomilor de oxigen și de azot trebuie să fie corelate, astfel încât valoarea HA să fie mai mare sau egală cu 2, dar nu mai mare de 7. În grupul de predicție

99,4% dintre compuși au o valoare HA egală sau mai mare de 2, indicând importanța deosebită a acestui descriptor, dar pentru o inhibiție puternică valoarea HA nu trebuie să depășească 5. De asemenea, valoarea HD trebuie să fie maxim 5.

Moleculele candidat trebuie să aibă o flexibilitate moleculară scăzută, cu o valoare RB mai mică sau egală cu 4, valoarea RB [42] fiind cel mai relevant descriptor pentru afinitatea pentru SrtA.

Gruparea moleculelor cu ajutorul scheletului molecular Bemis-Murcko [43] (Fig. 1) a relevat structuri favorabile și structuri ce trebuie evitate. Toate scheletele preferate conțin cel puțin două nuclee legate direct sau fuzionate într-un ciclu condensat.

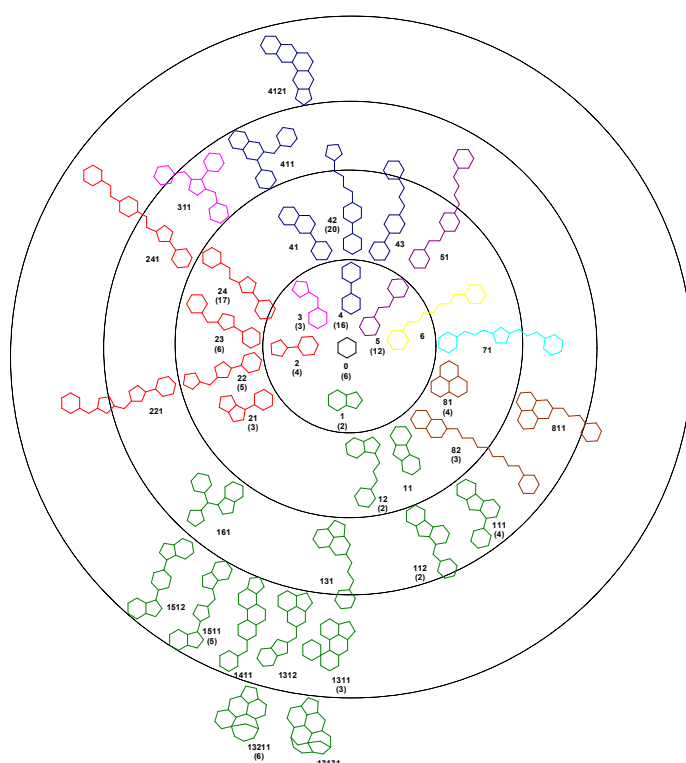


Fig. 1 Schelete Bemis-Murcko care au fost grupate pentru inhibitorii SrtA

Dezavantajul acestei abordări rămâne variația limitată a catenelor laterale atașate. Există posibilitatea ca substituția corespunzătoare a nucleului de bază să îmbunătățească în mod semnificativ efectul inhibitor SrtA. În ciuda neajunsurilor sale, caracterizarea arhitecturii chimice a inhibitorilor SrtA oferă o metodă simplă pentru proiectarea de noi candidați, un avantaj major față de metodele de tip QSAR.

Acești algoritmi furnizează un instrument valoros pentru a căuta noi inhibitori potenți SrtA ca potențiali agenți antivirulență orientați împotriva *S. aureus*, precum și o creștere a randamentelor de screening.

Cel de-al doilea capitol al părții practice conține rezultatele obținute în **Determinarea activității inhibitorii asupra sortazei A a unor compuși naturali și de sinteză.**

Setul de 102 compuși selectați pentru testarea capacității de inhibiție a SrtA a fost alcătuit pe baza criteriilor identificate și prezentate în capitolul anterior, asigurând în același timp și un grad ridicat de diversitate structurală. Pentru simplificarea testărilor, precum și a prezentării datelor, grupul de 102 compuși a fost împărțit în două subgrupuri: grup A – compuși de origine naturală (64 compuși) și grup B (38 compuși) – compuși de sinteză.

Activitatea inhibitorie a tuturor compușilor a fost determinată prin cuantificarea creșterii intensității fluorescenței utilizând kitul de analiză SensoLyte® 520 Sortase A. Conform protocolului kitului, fiecare godeu conține 10 μ L soluție de compus de testat, 40 μ L soluție de enzimă și 50 μ L soluție de substrat. Soluția fiecărui compus diluat în tampon la concentrația testată a reprezentat proba martor pentru verificarea fluorescenței intrinseci. De asemenea au fost preparate și probele martor: (a) enzimă + substrat și (b) inhibitorul kitului (4-HMB) + enzimă + substrat, precum și o probă ce conține 50 μ L tampon și 50 μ L soluție de substrat pentru a observa funcționalitatea substratului. Analiza fluorimetrică a fost efectuată cu ajutorul aparatului FlexStation 3, la Ex/Em = 490 nm/520 nm după o incubare la temperatura camerei timp de 30, 45, respectiv 60 de minute.

În urma prelucrării datelor obținute prin analiza fluorimetrică am obținut un procent de inhibiție pentru fiecare compus raportat la martor. Concentrația finală a compușilor pentru această testare preliminară a fost de 10 μ M. Analiza datelor a indicat o variație mare a procentelor de inhibiție, acestea fiind direct dependente de structura compușilor testați și de timpul de expunere al enzimei. Cu puține excepții, procentul de inhibiție scade în timp.

În urma acestei determinări 25 compuși (Fig. 2) au arătat efect inhibitor semnificativ, dintre aceștia remarcându-se 10 compuși din clase chimice diferite.

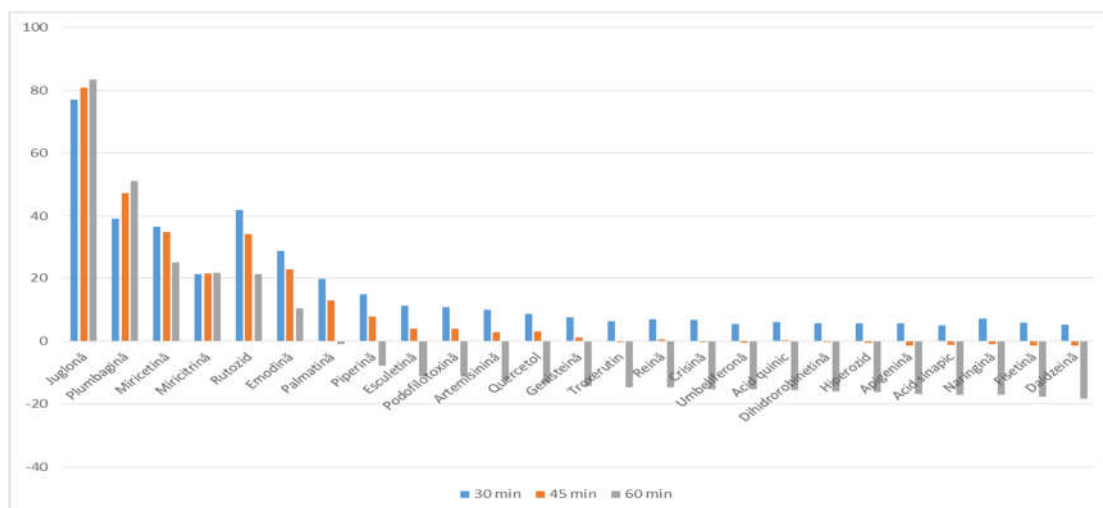


Fig. 2 Sortarea compușilor în funcție de menținerea inhibiției în timp

Următoarea etapă în studiul inhibitorilor de SrtA a fost determinarea CI_{50} , respectiv concentrația la care compusul produce o scădere a activității SrtA de 50% raportat la matorul ce conține enzimă fără inhibitor. Alegerea compușilor ce au fost testați la diverse concentrații în vederea obținerii CI_{50} a fost în funcție de menținerea inhibiției pe parcursul celor 60 de minute. Au fost selectați primii 18 compuși, dintre aceștia testarea putând fi realizată numai pentru 14 dintre aceștia deoarece quercetolul, reina, crisina și piperina au prezentat probleme de solubilitate și nu au putut fi obținute concentrații mai mari față de cele folosite pentru testarea preliminară.

Utilizarea metodei celor mai mici pătrate a permis trasarea curbelor de inhibiție și calcularea, prin interpolare, a valorilor CI_{50} pentru juglonă, plumbagină, miricetină, esculetină, clorhidrat de palmatină și miricitrină, rezultatele fiind prezentate în Tabel 1.

Tabel 1 Valorile CI_{50} ale substanțelor testate

Compus	Concentrație (μM)	Inhibiție (%)	CI_{50} (μM)	95% ÎÎ al CI_{50} (μM)
juglonă	100	102,72	1,64	-
plumbagină	200	93,47	15,25	-20,45–65,0
miricetină	100	91,96	4,63	0,19–111,0
esculetină	250	83,57	36,16	3,18–410,4
clorhidrat de palmatină	500	85,29	52,84	3,46–805,7
miricitrină	200	61,55	50,32	-
4-HMB	10	96,20	0,114	0,02–0,50

Studiile asupra setului de compuși de sinteză au urmat aceleași etape ca în cazul celor de origine naturală. Compușii de sinteză testați au influențat în mai mică măsură activitatea SrtA comparativ cu cei naturali. Doar în cazul acidului α -oxo-2-furanacetic (Fig. 3) procentul de inhibiție a depășit pragul de 50%, necesar calcului valorii CI_{50} . Aceasta a fost estimată și prin metoda cinetică, pe baza valorii K_i , calculată ca fiind 329,7 μM , corespunzător unei valori CI_{50} de 504,4 μM .

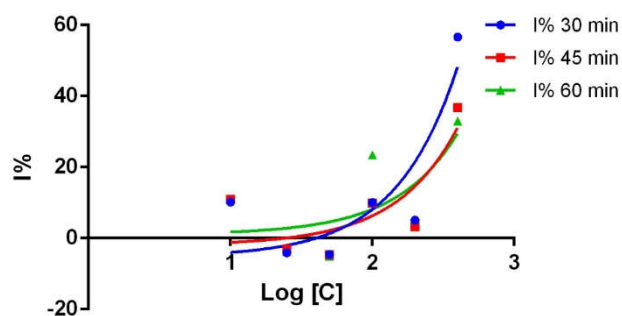


Fig. 3 Efectul inhibitor al acidului α -oxo-2-furanacetic asupra SrtA după 30, 45 și 60 min

Cei doi derivați naftochinonici, juglona și plumbagina, au prezentat valori relativ mici ale CI_{50} (1,64, respectiv 15,65 μM), cel mai bun efect inhibitor asupra SrtA având juglona (Fig. 4). Analiza grafică a variației unităților de fluorimetrie înregistrate la intervale de 5 minute pentru acești doi compuși a indicat un profil de inhibiție ireversibilă.

Din punctul de vedere al valorii CI_{50} , miricetina (Fig. 5) este un inhibitor SrtA mai eficient decât plumbagina și mai slab decât juglona. Studiul cinetic al curbelor de variație în timp a intensității activității fluorimetrice reprezintă o cinetică de tip liniar, ce se corelează mai bine cu modelul de inhibiție competitiv.

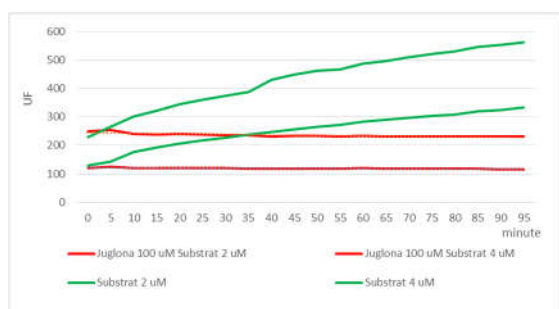


Fig. 4 Profilul cinetic al juglonei

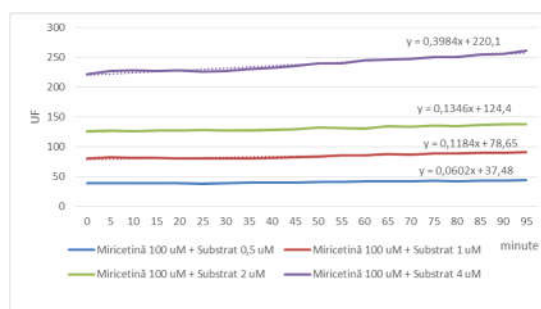


Fig. 5 Profilul cinetic a miricetinei

Miricitrina este 3-O- α -L-ramnopiranozida miricetinei. Pentru acesta a fost calculată o valoare a CI_{50} de 50,32 μM , aproximativ de 10 ori mai mare decât a agliconului. În cazul esculetinei analiza cinetică a efectului inhibitor la concentrații mari, de 250 μM , respectiv 100 μM , indică un mecanism de inhibiție ireversibilă, caracterizat prin oprirea totală a reacției. Efectul inhibitor scade la concentrații mai mici și pe baza relației între procentul de inhibiție și logaritmul concentrației a fost calculată valoarea CI_{50} ca fiind 36,16 μM . Pentru palmatină valoarea CI_{50} a putut fi calculată pe baza metodei diluțiilor succesive, acesta fiind de 52,84 μM . În urma analizei matematice a cineticii reacției enzimatică s-a configurat un profil de inhibiție non-competitiv pentru acest alcaloid.

Deoarece pentru ceilalți 8 compuși nu a fost obținută o inhibiție de 50% nu au putut fi calculate valorile CI_{50} . Totuși, pentru rutozid, valoarea CI_{50} a fost estimată prin metoda cinetică, aceasta fiind 279,3 μM . Cercetarea efectului inhibitor al emodinei a fost limitată de solubilitatea redusă. Din acest motiv pentru metoda diluțiilor s-au preparat concentrații mai mici față de cele folosite pentru ceilalți compuși. Studiul cinetic a permis totuși determinarea CI_{50} de 788,7 μM și a indicat un model de inhibiție competitivă.

Compușii de sinteză au prezentat un efect inhibitor modest asupra SrtA cu un procent maxim de inhibiție de 24,87% în testarea efectuată la concentrații de 10 μM . Dintre cei 37 de compuși testați inițial au fost selectați 7 compuși pentru determinarea CI_{50} . Testarea a fost

realizată doar pentru 6 dintre aceștia: benzoat de propargil, benzoat de vinil, acidul 1,2,3,4-tetrahidro- β -carbolin-1-carboxilic, acid α -oxo-2-furanacetic, acid 3-indolglioxilic și 1,2,3,4-tetrahidro-9H-pirido[3,4-b]indol. Din cauza solubilității scăzute 3-(bromoacetil)-cumarina nu a putut fi testată. Determinarea valorii CI_{50} a fost posibilă doar în cazul acidului α -oxo-2-furanacetic, aceasta fiind de 504,4 μ M, de aproximativ 10 ori mai mare față de cea determinată pentru clorhidratul de palmatină și de aproximativ 110 ori mai mare comparativ cu miricetina.

În cel de-al treilea capitol al părții practice, **Determinarea activității inhibitorii asupra sortazei A a unor extracte naturale**, sunt prezentate rezultatele obținute în urma testării activității inhibitorii asupra SrtA a 47 de extracte vegetale dintre care 31 extracte din specii de *Anemone*, *Aesculus*, *Rhamnus*, *Senna*, preparate în acest scop, precum și 16 extracte din specii de *Fallopia*, *Curcuma*, *Berberis* și *Aesculus* obținute în cadrul unor cercetări anterioare [44].

Cele mai bune valori ale CI_{50} , sub 100 μ g/mL, au avut extractele din *Fallopia aubertii* și *Rhamnus frangula*, de asemenea, extractele obținute din speciile genului *Aesculus* au prezentat efecte promițătoare în dezvoltarea de inhibitori ai SrtA, dintre acestea remarcându-se *A. octandra* și *A. pavia*. Valorile pentru CI_{50} determinate în acest studiu sunt prezentate în Tabel 2.

Tabel 2 Valorile CI_{50} ale extractelor testate

Extractul			CI_{50} (μ g/mL)		$\hat{I} 95\%$ al CI_{50} (μ g/mL)	
Specia	Tip produs vegetal	Solventul	30 min	60 min	30 min	60 min
<i>Fallopia aubertii</i>	herba	etanol 50	59,98	68,71	- 246,42	- 199,67
<i>Fallopia aubertii</i>	flori	apă	45,76	<50	NC	NC
<i>Aesculus pavia</i>	frunze	apă	82,70	90,89	NC	-233,60
<i>Aesculus pavia</i>	frunze	etanol 50	286,42	407,36	222,88-345,19	-341,78
<i>Aesculus pavia</i>	frunze	etanol 96	315,11	441,93	220,23-412,65	258,56-
<i>Aesculus parviflora</i>	frunze	apă	224,47	399,34	NC	NC
<i>Aesculus hippocastanum</i>	frunze	etanol 96	304,31	426,95	-168,70	-188,19
<i>Aesculus x carnea</i>	frunze	etanol 50	296,80	379,65	198,92-395,02	-290,03
<i>Anemone nemorosa</i>	rizom	apă	478,82	717,79	NC	-265,43
<i>Anemone nemorosa</i>	herba	etanol 50	416,62	585,70	119,52-	NC

Extractul			CI ₅₀ (μg/mL)		Î 95% al CI ₅₀ (μg/mL)	
Specia	Tip produs vegetal	Solventul	30 min	60 min	30 min	60 min
<i>Berberis vulgaris</i>	frunze	apă	334,00	423,17	246,91-423,21	345,11-
<i>Berberis vulgaris</i>	frunze	etanol 50	384,00	527,51	260,33-	NC
<i>Berberis vulgaris</i>	frunze	etanol 96	272,76	758,64	-87,30	NC
<i>Curcuma longa</i>	rizom	apă	437,50	560,09	NC	NC
<i>Rhamnus frangula</i>	scoartă	etanol 96	59,84	71,24	-70,15	NC
<i>Senna obtusifolia</i>	frunze	apă	518,63	787,78	NC	NC
4-HMB			0,114	-	0,02–0,50	-

Studierea moleculelor cu potențial efect inhibitor asupra SrtA a fost aprofundată prin analiza de *docking* molecular asupra celor 102 structuri, în vederea identificării unei corelații între activitatea inhibitoare și mecanismul de acțiune. Datele obținute sunt prezentate în cel de-al patrulea capitol al părții practice, **Analiza de docking molecular**.

Țintele folosite în această analiză au fost SrtA din *S. aureus*, dar și SrtA din *E. faecalis*. Procesul de *docking* molecular a fost efectuat cu ajutorul software-ului AutoDock Vina 1.1.2. Pentru vizualizarea tridimensională și generarea de parcele bidimensionale ale interacțiunilor *protein-ligand* a fost utilizat programul Discovery Studio® Visualizer 2016, iar numărul de reziduuri care au participat la interacțiuni hidrofobe a fost prezis utilizând programul LigPlot Plus v.1.4. Compuși cu similarități structurale mari au prezentat diferențe semnificative ale afinității pentru enzimă, aceste rezultatele evidențiind importanța grupelor funcționale pentru o compatibilitate spațială cu situsul enzimatic, precum și importanța formării de legături de hidrogen cu anumiți aminoacizi esențiali. Analiza oferă astfel posibilități de optimizare structurală în vederea obținerii de inhibitori cu potență ridicată.

Astfel, studiile de *docking* ale juglonei (5-hidroxi-1,4-naftochinona) și ale derivatului său 2-metilat, plumbagina explică mecanismul de acțiune al acestora, precum lipsa de efect a izomerului de poziție, lausona (2-hidroxi-1,4-naftochinona). Juglona și plumbagina se leagă de Asn¹¹⁴ și Arg¹⁹⁷. Restul de guadinidă din structura Arg¹⁹⁷ este implicat direct în activitatea catalitică a enzimei [31], iar rolul Asn¹¹⁴ a fost demonstrat de datele acestui studiu. Deși lausona formează două legături de hidrogen cu acești doi aminoacizi, în cadrul complexului proteină-ligand se observă o interacțiune nefavorabilă de tip acceptor-acceptor (Fig. 6).

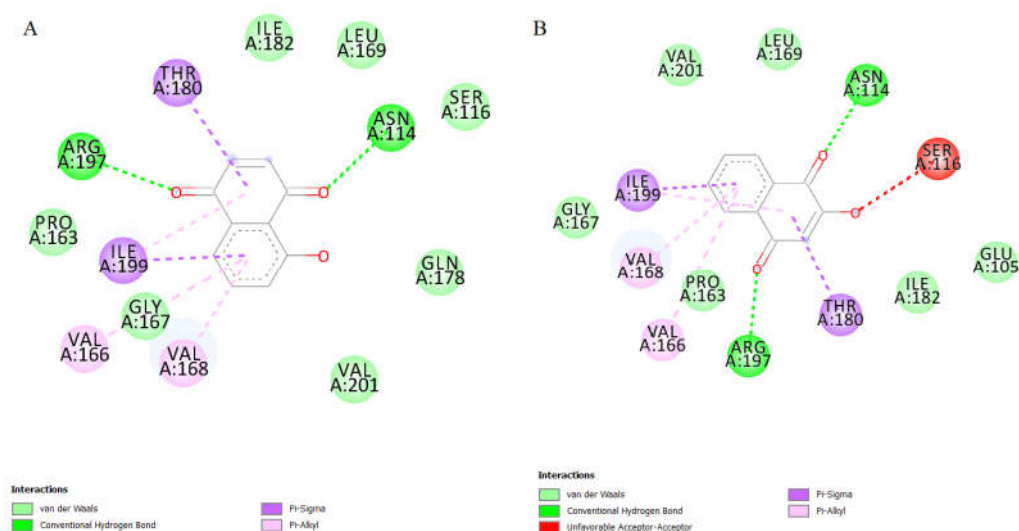


Fig. 6 Diagrama 2D a interacțiunii cu SrtA în modelul de docare moleculară; (A) juglonă (B) lauronică

Prezența radicalului hidroxil în poziția 2 a nucleului naftochinonic împiedică formarea unui complex stabil cu ținta proteică, prin intermediul fenomenelor de repulsie. Acest tip de interacțiune nu este întâlnit și în cazul plumbaginei, întrucât nucleul naftochinonic nu este substituit de un radical hidroxil în poziția 2, ci cu o grupă metil.

În capitolul 8 al tezei, **Determinarea activității antioxidante a potențialilor inhibitori de sortază A**, sunt analizate rezultatele obținute în urma testării capacității antioxidante a compușilor ce au prezentat acțiune promițătoare de inhibiție a SrtA. Acest studiu a fost realizat folosind două metode: una folosind radicalul 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) și cea de-a doua metodă fiind cea cu Xylenol Orange. Analiza comparativă a datelor obținute prin cele două metode permite o mai bună evaluare calitativă a proprietăților antioxidante ale compușilor. Rezultatele obținute pentru compușii studiați, utilizând metoda cu radicalul DPPH sunt prezentate în Tabel 3.

Tabel 3 Scăderea densității optice la timpul t; valori procentuale (%)

Compus	Concentrație	0 min	30 min	60 min	90 min
miricitrină	1 mM	49,75	59,47	65,76	70,86
esculetină	1 mM	31,52	60,92	68,08	70,33
miricetină	1 mM	26,07	52,23	68,29	69,24
rutozid	1 mM	19,42	52,06	65,39	67,85
juglonă	0,5 mM	19,15	27,94	38,82	59,72
piperină	1 mM	23,65	30,11	39,79	57,58
quercetol	1 mM	16,01	44,62	51,65	55,99
miricitrină	0,5 mM	38,57	43,10	49,03	54,96
esculetină	0,5 mM	18,36	42,07	45,86	54,73
acid 3-indolacetic	1 mM	20,75	30,18	40,91	53,28

miricetină	0,5 mM	8,80	31,61	41,49	51,77
quercetol	0,5 mM	11,78	37,97	43,28	51,52
rutozid	0,5 mM	11,63	37,49	45,71	50,14
acid 3-indolacetic	0,5 mM	19,52	27,83	37,26	48,67
juglonă	1 mM	22,54	27,81	35,75	47,82
acid ascorbic	2,8 mM	11,32	20,09	33,67	47,16
lausonă	1 mM	20,82	28,66	37,84	46,31
acid ascorbic	1,4 mM	8,73	17,78	31,96	46,05
troxerutin	1 mM	10,32	25,70	36,11	45,40
acid ascorbic	0,7 mM	4,26	15,62	30,63	45,08
troxerutin	0,5 mM	2,24	16,48	29,53	43,81
crisină	1 mM	18,16	23,39	33,35	43,26
lausonă	0,5 mM	19,85	26,69	34,96	43,10
acid 4-oxo-2-tioxo-3-tiazolidinilacetic	0,5 mM	16,75	21,92	32,84	43,02
acid ascorbic	0,35 mM	2,35	14,16	28,88	42,67
acid ascorbic	175 μM	1,56	13,41	28,41	42,27
3-(bromoacetil)-cumarină	0,5 mM	19,52	21,30	31,00	42,26
miricitrină	0,1 mM	23,54	27,24	33,11	42,24
miricetină	0,1 mM	2,84	21,43	28,80	42,24
plumbagină	1 mM	18,74	23,71	31,63	42,12
reină	1 mM	7,57	22,66	32,79	42,12
3-(bromoacetil)-cumarină	1 mM	22,49	25,67	32,47	42,11
plumbagină	0,1 mM	18,02	21,89	31,04	42,01
acid 4-oxo-2-tioxo-3-tiazolidinilacetic	1 mM	16,91	22,30	29,84	41,29
plumbagină	0,5 mM	17,57	22,22	31,44	40,34
piperină	0,5 mM	18,34	21,66	29,08	39,91
acid ascorbic	87,5 μM	1,39	13,52	26,93	38,99

Cele mai ridicate potențiale antioxidante se pot observa la compușii din clasa flavonelor: miricitrină, miricetină, rutozid, quercetol cu valori de inhibiție a radicalului DPPH mai mari decât ale acidului ascorbic 2,8 mM, atât pentru concentrațiile de 1 mM cât și pentru cele de 0,5 mM. Proprietăți antioxidante considerabile se pot observa și pentru derivatul cumarinic esculetină și derivatul 1,4 naftochinonic juglonă, concentrațiile de 1 mM, respectiv 0,5 mM ale acestora depășind potențialul antioxidant al probei de acid ascorbic 2,8 mM. Dintre compușii de sinteză studiați, capacitate antioxidantă promițătoare a arătat doar acidul 3-indolacetic.

Pentru determinarea conținutului de hidroxiperoxizi din probele analizate a fost construită o curbă etalon de peroxid de cumen (CumOOH). Absorbanța probelor a fost interpolată pe această curbă, rezultatele fiind exprimate în μM CumOOH. Clasificarea compușilor în ordine descrescătoare a încărcăturii în μM CumOOH echivalenți este prezentată în Fig. 7.

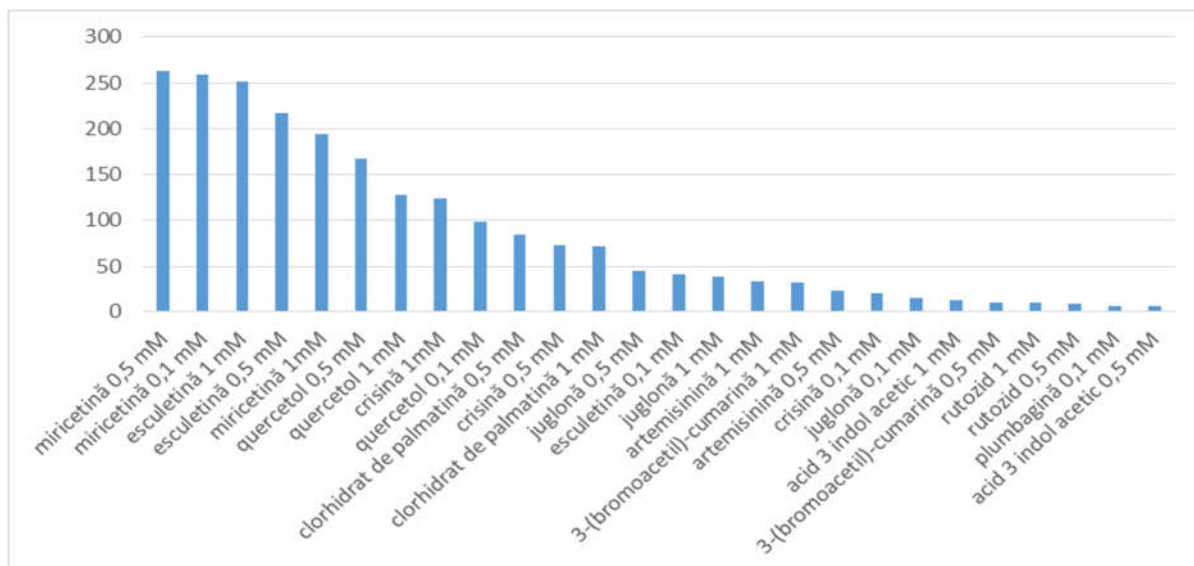


Fig. 7 Concentrația exprimată în μM CumOOH a probelor

Analiza comparativă a rezultatelor obținute prin cele două metode a permis identificarea substanțelor cu potențial antioxidant. Dintre cele două categorii de substanțe, activitate antioxidantă pronunțată au prezentat cei naturali. Astfel, compușii din clasa flavonelor (miricitrină, miricetrină, rutozid, quercetol) au arătat cel mai intens efect de neutralizare al radicalului DPPH, dintre aceștia remarcându-se miricitrina și rutozidul cu o încărcătură în hidroperoxizi mai scăzută, față de miricetrină și quercetol pentru care gradul de oxidare intrinsec este mai crescut.

În urma acestor studii preliminare se poate observa că derivații flavonici cu efect de inhibiție bun asupra SrtA au avut și efect antioxidant promițător. Se conturează astfel necesitatea continuării cercetării pentru stabilirea unei legături între cele două tipuri de efecte ale compușilor.

Pentru a evalua profilul toxicologic al substanțelor precum și al extractelor, testate pe SrtA în cercetarea de față am apelat la un test *in vitro*: testarea pe organisme nevertebrate de tip crustaceu - *Daphnia magna*. Rezultatele sunt prezentate în capitolul 9 al tezei, **Evaluarea toxicității compușilor naturali și de sinteză și a extractelor vegetale prin modelul *Daphnia*.**

Majoritatea compușilor nu au determinat o toxicitate semnificativă asupra *Daphnia magna*. În urma testării preliminare dintre cei 102 compuși, doar 36 au fost selectați pentru următorul experiment în vederea determinării concentrației care produce o letalitate de 50% (CL_{50}). Distribuția compușilor în ordine crescătoare a valorilor CL_{50} este prezentată în Fig. 8.

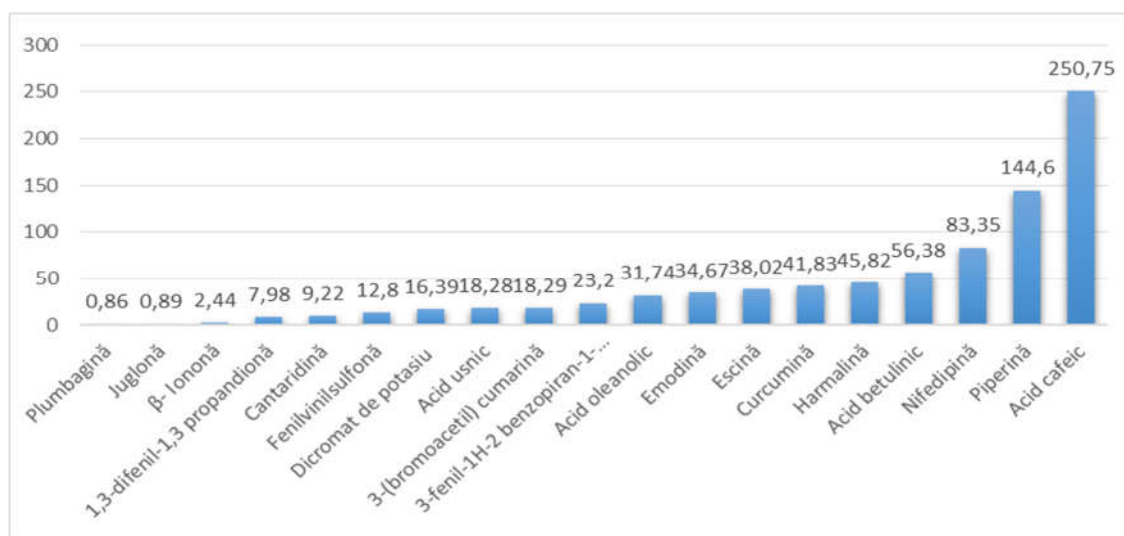


Fig. 8 Prezentarea grafică a distribuției valorilor CL₅₀ calculate pentru compușii testați la 24 ore

Conform *Guilhermino și colab.* toxicitatea asupra crustaceului *Daphnia magna* poate fi corelată cu toxicitatea evaluată prin modele animale (șobolani). Aceștia au stabilit că o substanță poate fi declarată toxică dacă valoarea CL₅₀ se situează sub cea de 0,22 mg/L [45].

Pentru a putea stabili o posibilă toxicitate a substanțelor testate, valorile CL₅₀ au fost transformate din μM în unități mg/L, rezultatele variind de la 0,15 mg/L pentru juglonă până la 45,18 mg/L pentru acidul cafeic în cazul determinării la 24 de ore, iar pentru CL₅₀ calculate la 48 de ore, valorile obținute au variat între 0,02 mg/L pentru cantaridină și 22,20 mg/L pentru zingeronă. Astfel, dintre substanțele testate plumbagina și juglona pot fi declarate cu potențial toxic, atât la 24 de ore cât și la 48 de ore, cantaridina prezentând o valoare a CL₅₀ sub limită doar în cazul determinării la 48 de ore.

Toate extractele testate prin modelul *Daphnia magna* nu au prezentat toxicitate semnificativă asupra crustaceului. Extractele preparate în etanol 50 din herba și în apă din florile de *Fallopia aubertii* au avut asupra SrtA cel mai bun efect de inhibiție, cu o valoare a CI₅₀ de 59,98 μg/mL, respectiv 45,76 μg/mL. Determinarea toxicității acestor extracte prin modelul *Daphnia* a fost realizată într-un studiu anterior, valorile obținute pentru CL₅₀ fiind de cel puțin 1000 de ori mai mari decât cele obținute pentru martorul pozitiv, concluzia fiind că aceste extracte nu au potențial toxic [46]. Efect inhibitor promițător asupra SrtA au avut și extractele obținute din specii ale genului *Aesculus*, testarea toxicității acestora fiind efectuată în studiul de față. Valorile calculate sunt prezentate în Tabel 4.

Tabel 4 Valorile CL₅₀ obținute cu testul *Daphnia magna* pentru extractele naturale

Extract	CL ₅₀ (μg/mL)			În 95% al CL ₅₀ (μg/mL)		
	Apă	HA	EtOH	Apă	HA	EtOH
<i>A.hippocastanum</i>	2623,45	453,40	131,15	NC	- 965,87	NC
<i>A. x carnea</i>	784,44	190,26	116,48	552,72- 1040,44	- 488,23	NC
<i>A.octandra</i>	477,68	139,90	75,96	155,91- 919,96	104,53- 208,77	NC
<i>A.pavia</i>	743,29	371,17	569,44	NC*	- 741,78	398,35- 780,00
<i>A.parviflora</i>	1049,81	348,87	395,21	NC	148,94- 666,99	- 789,49
<i>Anemone ranunculoides herba</i>	1035,86	1825,77	484,46	NC	NC	NC
<i>Anemone nemorosa herba</i>	1551,60	> 1000	1769,78	NC	NC	NC
<i>Anemone ranunculoides rhizoma</i>	< 250	704,90	828,25	NC	NC	NC
<i>Anemone nemorosa rhizoma</i>	NC	4230,80	>100	NC	NC	NC
<i>Berberis vulgaris</i>	1472,17	>1000	175,59	NC	NC	132,08- 238,95
<i>Senna obtusifolia</i>	>2000	3810,81	3431,13	NC	NC	NC
<i>Rhamnus frangula</i>	537,81	590,86	1085,31	203,19- 1106,92	224,06- 1209,94	NC

Studiile de toxicitate folosind crustaceul *Daphnia magna* au permis conturarea unui profil de toxicitate acută pentru potențialii inhibitori ai SrtA.

Analiza comparativă a efectului inhibitor asupra SrtA și a profilelor toxicologice obținute a permis identificarea derivaților flavonici miricetină, miricitrină și rutozid, dar și a clorhidratului de palmatină ca inhibitori de SrtA cu toxicitate scăzută.

Compușii juglonă (Fig. 9) și plumbagină (Fig. 10) au avut un efect de inhibiție asupra SrtA mult mai bun față de cel al derivaților flavonici, dar și o toxicitate semnificativă asupra crustaceului *Daphnia magna*.

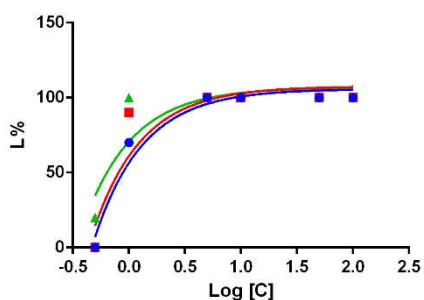


Fig. 9 Letalitatea în testul *Daphnia magna*. Curbele logaritmice ale concentrațiilor la 24, 48 și 72 h pentru juglonă

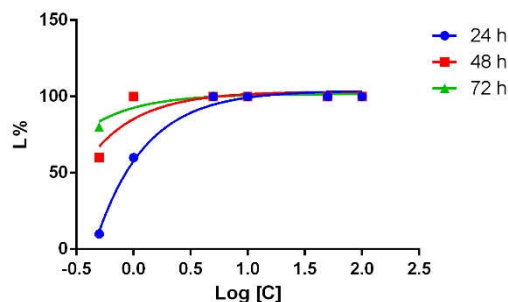


Fig. 10 Letalitatea în testul *Daphnia magna*. Curbele logaritmice ale concentrațiilor la 24, 48 și 72 h pentru plumbagină

Un efect mediu de inhibiție a SrtA a avut emodina, compus care a prezentat și un profil toxicologic intermediar, cu o valoare a CL₅₀ de aproximativ 30 de ori mai mare decât a plumbaginei.

Piperina a fost relativ netoxică pe crustaceul *Daphnia* și în cadrul testării preliminare a avut un efect de inhibiție promițător asupra SrtA, dar din cauza solubilității reduse în apă, nu au putut fi realizate concentrații superioare pentru determinarea CI₅₀.

Dintre derivații de sinteză, acidul α -oxo-2-furanacetic, cel pentru care a fost posibilă determinarea unei CI₅₀ asupra SrtA nu a depășit pragul de 50% letalitate în testarea preliminară a toxicității.

Prezența derivaților flavonici în extractele de *Fallopia* (Polygonaceae), justifică profilurile de toxicitate scăzută, dar și efectul de inhibiție promițător asupra SrtA ale acestora. Datorită valorilor crescute ale CL₅₀ obținute pentru extractele speciilor din genurile *Aesculus*, *Anemone*, *Berberis*, *Senna* și *Rhamnus* putem concluziona că aceste extracte nu prezintă potențial toxic în doze uzuale.

Evaluarea activității antimicrobiene a potențialilor inhibitori de sortază A, prezentată în ultimul capitol al tezei, are ca scop identificarea inhibitorilor SrtA selectivi, fără efect bacteriostatic sau bactericid, pentru dezvoltarea unor noi agenți antivirulență cu risc minim de instalare a rezistenței.

Protocolul de lucru a fost elaborat pornind de la o testare preliminară a compușilor prin metoda difuzimetrică [47], iar pentru stabilirea concentrației minime inhibitorii (CMI) a substanțelor cu activitate antimicrobiană a fost folosită metoda microdiluțiilor [48].

Un număr de 25 de compuși au fost selectați pentru testările microbiologice pe baza efectului asupra SrtA, dar și pe baza diversității chimice.

Tabel 5 Activitatea antibacteriană a compușilor testați prin metoda difuzimetrică

Compus	Gentamicină (10 μ g)	Emodină (13,5 μ g)	Reină (14,2 μ g)	Juglonă (8,7 μ g)	Plumbagină (9,4 μ g)
Tulpină	Diametrului zonei de inhibiție (mm), incluzând diametrul celulei				
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	17	6	6	6	6
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	21	20	12	6	6
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	29	14	30	10	6
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	12	6	6	6	6
<i>B. cereus</i> ATCC 11778	24	12	15	15	17

Compus	Gentamicină (10 µg)	Emodină (13,5 µg)	Reină (14,2 µg)	Juglonă (8,7 µg)	Plumbagină (9,4 µg)
Tulpină	Diametrului zonei de inhibiție (mm), incluzând diametrul celulei				
<i>E. coli</i> ATCC 8739	21	6	6	8	6
<i>E. coli</i> ATCC 35218	20	6	6	9	7
<i>P. mirabilis</i> ATCC 29245	20	6	6	6	6

Dintre aceștia, activitate antimicrobiană au avut doar patru compuși naturali, doi derivați antracenozidici și doi derivați de 1,4-naftochinonă. Juglona și plumbagina au prezentat un puternic efect de inhibiție a SrtA, cu valori CI_{50} de 1,64 µM, respectiv 15,25 µM, și o activitate antimicrobiană medie asupra tulpinii de control *B. cereus* ATCC 11778. Ambele substanțe nu inhibă proliferarea speciilor țintă *S. aureus* și *S. epidermidis*, devenind candidați importanți pentru dezvoltarea de noi terapii antivirulență.

În testarea activității enzimactice procentele de inhibiție ale emodinei asupra SrtA au fost de 28,86% după o incubare de 30 de minute, în schimb cele ale reinei au fost modeste. Efectul antimicrobian al celor doi derivați asupra germenilor Gram-pozitivi *S. aureus* ATCC 25923, *S. epidermidis* ATCC 12228 și *B. cereus* ATCC 11778, reduce potențialul de dezvoltare ca agenți antivirulență.

Derivații flavonici, miricetină, miricitrină, derivatul cumarinic esculetină, precum și alcaloidul palmatină s-au dovedit în mod similar buni inhibitori ai SrtA, iar în urma testărilor antibacteriene aceștia nu au influențat creșterea tulpinilor testate fiind candidați potriviți pentru soluții antivirulență.

O ipoteză similară se poate emite și în cazul celor două extracte etanolicе, din *Fallopia aubertii* și frunzele de *Aesculus pavia*, cu activitate moderată asupra *B. cereus* ATCC 11778, dar care s-au remarcat ca inhibitori ai SrtA.

Concluzii generale

Obiectivul acestui studiu a fost identificarea de noi inhibitori ai sortazei, cu toxicitate redusă și fără efecte antiproliferative asupra celulei bacteriene ca posibile medicamente antivirulență.

Analiza structurală a inhibitorilor de SrtA a permis evidențierea parametrilor structurali relevanți pentru un inhibitor potent de SrtA, creând astfel un instrument util pentru a căuta noi inhibitori potenți SrtA ca potențiali agenți antivirulență orientați împotriva *S. aureus*, precum și o creștere a randamentelor de screening.

Pentru identificarea de noi inhibitori ai SrtA, o etapă următoare în acest studiu a fost determinarea activității inhibitorii a mai multor compuși utilizând kitul de analiză SensoLyte® 520 Sortase. Astfel, dintre cei 102 compuși selectați în studiu, au fost identificați 6 posibili inhibitori naturali ai enzimei, precum și un compus de sinteză.

Extinderea studiului asupra celor 47 de extracte naturale a permis identificarea ca potențiale soluții naturale antivirulență extractele etanolice din *Fallopia aubertii*, cele din frunzele de *Aesculus pavia* și cele din scoarța *Rhamnus frangula*.

Folosirea analizei de *docking* molecular a relevat potențiale mecanisme de acțiune pentru substanțele testate, permițând înțelegerea diferențelor semnificative ale afinității pentru enzimă pentru compuși cu similarități structurale crescute.

Corelații între activitatea inhibitorie asupra SrtA și efectul antioxidant au putut fi făcute în urma analizei capacității antioxidante a compușilor de interes cu ajutorul unor metode moderne și sensibile.

Testarea toxicității acute folosind o metodă alternativă, testul *Daphnia magna*, a identificat compușii miricetină, miricitrină, rutozid și palmatină ca inhibitori de SrtA cu toxicitate scăzută.

Determinarea activității antimicrobiene asupra a opt tulpini bacteriene, 5 Gram-pozitive și 3 Gram-negative, a compușilor și extractelor cu efect inhibitor asupra SrtA definește studiul evidențiind derivații flavonici, miricetină, miricitrină, derivatul cumarinic esculetină, alcaloidul palmatină, precum și extractele etanolice din *Fallopia aubertii*, cele din frunzele de *Aesculus pavia* și cele din scoarța *Rhamnus frangula* ca posibile soluții antivirulență.

Lucrări științifice publicate

Rezultatele obținute în cadrul cercetării doctorale au fost diseminate sub forma a două articole în reviste indexate ISI și 20 de lucrări prezentate sub formă de poster la conferințe naționale și internaționale de specialitate.

I. Articole publicate în reviste de specialitate

1. **Nițulescu, G.**; Nicorescu, M. I.; Olaru, T. O.; Ungurianu, A.; Mihai, D.P.; Zănfirescu, A.; Nițulescu G. M., Margina, D. Molecular Docking and Screening Studies of New Natural Sortase A Inhibitors. *Int. J. Mol. Sci.* 2017, 18, FI: 3,226. <https://www.mdpi.com/1422-0067/18/10/2217>
2. **Nițulescu, G.**; Zănfirescu, A.; Olaru, T. O.; Nicorescu, M. I.; Nitulescu G. M., Margina, D. Structural Analysis of Sortase A Inhibitors. *Molecules* 2016, 21, pii: E1591. IF: 2,46. <https://www.mdpi.com/1420-3049/21/11/1591>

II. Rezumate ale lucrărilor prezentate la conferințe internaționale și naționale de specialitate, sub formă de poster

1. Ivopol, M.; Olaru, O.; Nitulescu, G. M.; Dune, A.; Popescu, M.; Spinu, C.; **Nițulescu, G.**; Calinescu, I. Zingiberaceae extracts and essential oils with potential sortase inhibitory effects. Preparation, characterization and toxicity evaluation. 52st Congress of the European-Societies-of-Toxicology (EUROTOX), 4-7 septembrie 2016, Sevilla, Spania, Toxicology Letters, 258(2), S69. ISSN: 0378-4274.
2. **Nițulescu, G.**; Olaru, O.; Nitulescu, G. M.; Ungurianu, A.; Margina, D. Toxicity assessment of sortases inhibitors. 52st Congress of the European-Societies-of-Toxicology (EUROTOX), 4-7 septembrie 2016, Sevilla, Spania, Toxicology Letters, 258(2), S75. ISSN: 0378-4274.
3. Nițulescu, G. M.; **Nițulescu, G.**; Olaru, O.; Margina, D. Structure-based prediction of side effects of sortase A inhibitors. 52st Congress of the European-Societies-of-Toxicology (EUROTOX), 4-7 septembrie 2016, Sevilla, Spania, Toxicology Letters, 258(2), S121. ISSN: 0378-4274.
4. Olaru, O.; Ivopol, M.; **Nițulescu, G.**; Dune, A.; Calinescu, I.; Ivopol, G.; Popescu, M.; Nitulescu, G. M. Toxicity of various antimicrobial essential oils assessed using *Artemia salina* and *Daphnia magna*. 52st Congress of the European-Societies-of-Toxicology (EUROTOX), 4-7 septembrie 2016, Sevilla, Spania, Toxicology Letters, 258(2), S68. ISSN: 0378-4274.
5. Ivopol, M.; Nițulescu, G. M.; Calinescu, I.; Dune, A.; Popescu, M.; Ivopol, G.; **Nițulescu, G.**; Olaru, O. GC/MS analysis and toxicity assessment of essential oils and extracts with antimicrobial activity obtained from plants belonging to Pinaceae and Cupressaceae. 52st Congress of the European-Societies-of-Toxicology (EUROTOX), 4-7 septembrie 2016, Sevilla, Spania, Toxicology Letters, 258(2), S68. ISSN: 0378-4274.
6. Olaru, O.; **Nițulescu, G.**; Nițulescu, G. M.; Nagoda, E.; Comanescu, P.; Potolea, I.; Pirvu, O.; Margina, D.; Babeanu, N. Acute toxicity evaluation of five species from *Aesculus* genus using *Daphnia magna* bioassay. 52st Congress of the European-Societies-of-Toxicology (EUROTOX), 4-7 septembrie 2016, Sevilla, Spania, Toxicology Letters, 258(2), S67-68. ISSN: 0378-4274.
7. **Nedelcu, G.**; Olaru, O. T.; Nițulescu, G. M.; Margina, D. *Daphnia magna* as a predictive method for the mitochondrial toxicity assessment of a new pyrazole derivative, 51st Congress of the European-Societies-of-Toxicology (EUROTOX), 13-16 Septembrie 2015, Porto, Portugalia, Toxicology Letters, 238(2), S331. ISSN: 0378-4274.
8. **Nițulescu, G.**; Olaru, O. T.; Nițulescu, G. M. Evaluarea toxicității acute a unor compuși naturali. Congresul National de Toxicologie, 03-04 octombrie 2017, București, p. 74, ISSN 2601-1077.

9. Olaru, O. T.; Guțu, C. M.; Pîrvu, O. M.; **Nițulescu, G.**; Spînu, C. E.; Nițulescu, G. M.; Potolea, I. M. Evaluarea toxicității acute a unor extracte din specii de ranunculaceae. Congresul National de Toxicologie, 03-04 octombrie 2017, București, p. 80, ISSN 2601-1077.
10. **Nițulescu, G.**; Ungurianu, A.; Nițulescu, G. M.; Nicorescu, I. M.; Olaru, O. T.; Margină, D. Screening natural scaffolds as antivirulence agents, Prioritățile Chimiei pentru o Dezvoltare Durabila - PRIOCHEM XIII – 2017, 25-27 octombrie 2017, București, Volume of summaries, p. 73, ISSN 2285-8334.
11. Olaru, O. T.; Nicorescu, I. M.; **Nițulescu, G.**; Seremet, O. C.; Nițulescu, G. M. Antimicrobial screening of some extracts from Fallopia Adans. species (Polygonaceae), Congresul UMF Carol Davila, ediția a 5-a, 29-31 mai 2017, București, Maedica a Journal of Clinical Medicine, 12 (Supp. 2017), p. 42. ISSN: 2501-6903.
12. **Nițulescu, G.**; Nițulescu, G. M.; Olaru, O. T.; Ungurianu, A.; Margină, D. Prediction of oxidative stress risks associated with sortase A inhibitors. Congresul anual al Asociației Medicale Romane, ediția a XI-a, 20-22 aprilie 2017, București, Revista Medicală Română, Suppl 2017, p. 106. ISSN 1220-5478
13. Nițulescu, G. M.; Drăghici, C.; **Nițulescu, G.**; Olaru, O. T. Design and synthesis of new pyrazole derivatives as sortases inhibitors. Congresul Național de Farmacie din România, 28 sept. - 1 oct. 2016, București, România, Volum de rezumate, p. 55, ISBN 2537-2823.
14. **Nedelcu, G.**; Olaru, I. I.; Olaru, O. T.; Nițulescu, G. M.; Margină, D. Acute toxicity test on Daphnia magna as an alternative in the prescreening of anti-inflammatory drugs, From Science to Guidance and Practice - International Conference. 19-21 Octombrie 2015, Volum de rezumate, p. 175-176, ISBN: 978-973-708-854-3.
15. **Nedelcu, G.**; Olaru, I. I.; Nițulescu, G. M.; Olaru, O. T.; Margină, D. Toxicity assessment of some nonsteroidal anti-inflammatory drugs using Lactuca sativa bioassay, First Romanian National Congress of Toxicology with international attendance, 16-18 Octombrie 2015, Abstract book p. 89; ISSN: 2457-8789.
16. Olaru, O. T.; Nițulescu, G. M.; Pîrvu O. M.; Rusinac, A.M.; Spînu C.E.; Potolea, I. M.; **Nedelcu, G.** Daphnia magna as toxicity screening tool in plants containing nortriterpene lactones. International Symposium: Priorities of Chemistry for a Suitable Development - PRIOCHEM, 29-30 oct. 2015, București, Volum de rezumate, p. 40, ISSN: 2285-8334.
17. **Nițulescu, G.**; Olaru, O. T.; Nițulescu, G. M., Synthesis and acute toxicity assesment of new pyrazolinone derivatives as antivirulence agents, 6th FIP Pharmaceutical Sciences World Congress 2017, 21-24 mai 2017, Stockholm, Suedia, Book of Abstracts.
18. Olaru, O. T.; Spînu, C. E.; **Nițulescu, G.**; Pîrvu, O. M.; Potolea, I. M.; Nițulescu, G. M., Cytotoxicity screening of several species from Ranunculaceae family, 6th FIP Pharmaceutical Sciences World Congress 2017, 21-24 mai 2017, Stockholm, Suedia, Book of Abstracts.
19. Nițulescu, G. M., Olaru, O. T., **Nițulescu, G.**, Margina, D. Synthesis of new 1,5-dimethyl-2-phenylpyrazol-3-one derivatives targeted towards bacterial sortase A, 15th Belgian Organic Synthesis Symposium, 10-16 iulie 2016, Antwerp, Belgia, Book of Abstracts, p. 279.
20. Barbuceanu, S. F., Nitulescu, G. M., Socea L. I., Barbuceanu, F., **Nițulescu, G.**, Saramet, G., Draghici, C. Synthesis and characterization of some 1,3,4-thiadiazoles derivatives as potential biological agents, 15th Belgian Organic Synthesis Symposium, 10-16 iulie 2016, Antwerp, Belgia, Book of Abstracts, p. 281.

Bibliografie

1. Tornimbene, B.; Eremin, S.; Escher, M.; Griskeviciene, J.; Manglani, S.; Pessoa-Silva, C. L. WHO Global Antimicrobial Resistance Surveillance System early implementation 2016-17. *Lancet Infect. Dis.* 2018.
2. Dickey, S. W.; Cheung, G. Y. C.; Otto, M. Different drugs for bad bugs: antivirulence strategies in the age of antibiotic resistance. *Nat Rev Drug Discov* **2017**, *16*, 457–471.
3. Scott, J. R.; Zähler, D. Pili with strong attachments: Gram-positive bacteria do it differently. *Mol. Microbiol.* 2006.
4. Cascioferro, S.; Totsika, M.; Schillaci, D. Sortase A: An ideal target for anti-virulence drug development. *Microb. Pathog.* 2014, *77*, 105–112.
5. Mühlen, S.; Dersch, P. Anti-virulence strategies to target bacterial infections. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **2016**.
6. Horn, J.; Stelzner, K.; Rudel, T.; Fraunholz, M. Inside job: Staphylococcus aureus host-pathogen interactions. *Int. J. Med. Microbiol.* 2018.
7. Jawetz, Melnick, & A. *Medical Microbiology*; 2013.
8. Brossier, F.; Mock, M. Toxins of Bacillus anthracis. *Toxicon* 2001.
9. Raetz, C. R. H.; Whitfield, C. Lipopolysaccharide Endotoxins. *Annu. Rev. Biochem.* **2002**.
10. Opal, S. M.; Glück, T. Endotoxin as a drug target. *Crit. Care Med.* **2003**.
11. Services, U. S. D. of H. and H. Vaccines.gov.
12. Gu, L.; Zhou, S.; Zhu, L.; Liang, C.; Chen, X. Small-Molecule Inhibitors of the Type III Secretion System. *Mol.* 2015, *20*.
13. Mäkelä, P. H. Capsular polysaccharide vaccines today. *Infection* **1984**.
14. Ton-That, H.; Liu, G.; Mazmanian, S. K.; Faull, K. F.; Schneewind, O. Purification and characterization of sortase, the transpeptidase that cleaves surface proteins of Staphylococcus aureus at the LPXTG motif. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1999**, *96*, 12424–12429.
15. Jacobitz, A. W.; Kattke, M. D.; Wereszczynski, J.; Clubb, R. T. Sortase Transpeptidases: Structural Biology and Catalytic Mechanism. In; 2017; pp. 223–264.
16. Suree, N.; Liew, C. K.; Villareal, V. A.; Thieu, W.; Fadeev, E. A.; Clemens, J. J.; Jung, M. E.; Clubb, R. T. The structure of the Staphylococcus aureus sortase-substrate complex reveals how the universally conserved LPXTG sorting signal is recognized. *J. Biol. Chem.* **2009**.
17. Chan, A. H.; Yi, S. W.; Terwilliger, A. L.; Maresso, A. W.; Jung, M. E.; Clubb, R. T. Structure of the bacillus anthracis Sortase a enzyme bound to its sorting signal: A flexible amino-terminal appendage modulates substrate access. *J. Biol. Chem.* **2015**.
18. Jacobitz, A. W.; Wereszczynski, J.; Yi, S. W.; Amer, B. R.; Huang, G. L.; Nguyen, A. V.; Sawaya, M. R.; Jung, M. E.; McCammon, J. A.; Clubb, R. T. Structural and computational studies of the Staphylococcus aureus sortase B-substrate complex reveal a substrate-stabilized oxyanion hole. *J. Biol. Chem.* **2014**.
19. Manzano, C.; Contreras-Martel, C.; El Mortaji, L.; Izoré, T.; Fenel, D.; Vernet, T.; Schoehn, G.; Di Guilmi, A. M.; Dessen, A. Sortase-Mediated Pilus Fiber Biogenesis in Streptococcus pneumoniae. *Structure* **2008**.
20. Mandlik, A.; Swierczynski, A.; Das, A.; Ton-That, H. Pili in Gram-positive bacteria: assembly, involvement in colonization and biofilm development. *Trends Microbiol.* 2008.
21. Manzano, C.; Izoré, T.; Job, V.; Di Guilmi, A. M.; Dessen, A. Sortase activity is controlled by a flexible lid in the pilus biogenesis mechanism of Gram-positive pathogens. *Biochemistry* **2009**.
22. Maresso, A. W.; Chapa, T. J.; Schneewind, O. Surface protein IsdC and sortase B are required for heme-iron scavenging of Bacillus anthracis. *J. Bacteriol.* **2006**.

23. Race, P. R.; Bentley, M. L.; Melvin, J. A.; Crow, A.; Hughes, R. K.; Smith, W. D.; Sessions, R. B.; Kehoe, M. A.; McCafferty, D. G.; Banfield, M. J. Crystal Structure of streptococcus pyogenes Sortase A: Implications for sortase mechanism. *J. Biol. Chem.* **2009**.
24. Maresso, A. W.; Wu, R.; Kern, J. W.; Zhang, R.; Janik, D.; Missiakas, D. M.; Duban, M. E.; Joachimiak, A.; Schneewind, O. Activation of inhibitors by sortase triggers irreversible modification of the active site. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 23129–23139.
25. Liu, B.; Chen, F.; Bi, C.; Wang, L.; Zhong, X.; Cai, H.; Deng, X.; Niu, X.; Wang, D. Quercitrin, an Inhibitor of Sortase A, Interferes with the Adhesion of Staphylococcus aureus. *Mol.* **2015**, *20*.
26. Zhulenkova, D.; Rudevica, Z.; Jaudzems, K.; Turks, M.; Leonchiks, A. Discovery and structure–activity relationship studies of irreversible benzisothiazolinone-based inhibitors against Staphylococcus aureus sortase A transpeptidase. *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, *22*, 5988–6003.
27. Hu, P.; Huang, P.; Chen, M. W. Curcumin reduces Streptococcus mutans biofilm formation by inhibiting sortase A activity. *Arch. Oral Biol.* **2013**, *58*, 1343–1348.
28. Kruger, R. G.; Dostal, P.; McCafferty, D. G. Development of a high-performance liquid chromatography assay and revision of kinetic parameters for the Staphylococcus aureus sortase transpeptidase SrtA. *Anal. Biochem.* **2004**, *326*, 42–48.
29. Ton-That, H.; Schneewind, O. Anchor Structure of Staphylococcal Surface Proteins: IV. INHIBITORS OF THE CELL WALL SORTING REACTION. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 24316–24320.
30. Ilangoan, U.; Ton-That, H.; Iwahara, J.; Schneewind, O.; Clubb, R. T. Structure of sortase, the transpeptidase that anchors proteins to the cell wall of Staphylococcus aureus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2001**, *98*, 6056–61.
31. Zong, Y.; Bice, T. W.; Ton-That, H.; Schneewind, O.; Narayana, S. V. L. Crystal structures of Staphylococcus aureus Sortase A and its substrate complex. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 31383–31389.
32. Palmer, J. T.; Rasnick, D.; Klaus, J. L.; Brömme, D. Vinyl Sulfones as Mechanism-Based Cysteine Protease Inhibitors. *J. Med. Chem.* **1995**.
33. Frankel, B. A.; Bentley, M.; Kruger, R. G.; McCafferty, D. G. Vinyl Sulfones: Inhibitors of SrtA, a Transpeptidase Required for Cell Wall Protein Anchoring and Virulence in Staphylococcus aureus. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 3404–3405.
34. Oh, I.; Yang, W.-Y.; Chung, S.-C.; Kim, T.-Y.; Oh, K.-B.; Shin, J. In vitro sortase a inhibitory and antimicrobial activity of flavonoids isolated from the roots of Sophora flavescens. *Arch. Pharm. Res.* **2011**, *34*, 217–222.
35. Bi, C.; Dong, X.; Zhong, X.; Cai, H.; Wang, D.; Wang, L. Acacetin Protects Mice from Staphylococcus aureus Bloodstream Infection by Inhibiting the Activity of Sortase A. *Mol.* **2016**, *21*.
36. Kim, S.-W.; Chang, I.-M.; Oh, K.-B. Inhibition of the bacterial surface protein anchoring transpeptidase sortase by medicinal plants. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2002**, *66*, 2751–4.
37. Lee, Y.-J.; Han, Y.-R.; Park, W.; Nam, S.-H.; Oh, K.-B.; Lee, H.-S. Synthetic analogs of indole-containing natural products as inhibitors of sortase A and isocitrate lyase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 6882–5.
38. Oh, K.-B.; Mar, W.; Kim, S.; Kim, J.-Y.; Oh, M.-N.; Kim, J.-G.; Shin, D.; Sim, C. J.; Shin, J. Bis(indole) alkaloids as sortase A inhibitors from the sponge Spongosorites sp. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 4927–4931.
39. Jang, K. H.; Chung, S. C.; Shin, J.; Lee, S. H.; Kim, T. I.; Lee, H. S.; Oh, K. B. Aaptamines as sortase A inhibitors from the tropical sponge Aaptos aaptos. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2007**.
40. Jeon, J. E.; Na, Z.; Jung, M.; Lee, H. S.; Sim, C. J.; Nahm, K.; Oh, K. B.; Shin, J.

- Discorhabdins from the Korean Marine Sponge *Sceptrella* sp. *J. Nat. Prod.* **2010**.
41. Bae, J.; Jeon, J. E.; Lee, Y. J.; Lee, H. S.; Sim, C. J.; Oh, K. B.; Shin, J. Sesterterpenes from the tropical sponge *Coscinoderma* sp. *J. Nat. Prod.* **2011**.
42. Veber, D. F.; Johnson, S. R.; Cheng, H.; Smith, B. R.; Ward, K. W.; Kopple, K. D. Molecular Properties That Influence the Oral Bioavailability of Drug Candidates. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 2615–2623.
43. Bemis, G. W.; Murcko, M. A. The properties of known drugs. 1. Molecular frameworks. *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 2887–2893.
44. Margină, D.; Olaru, O. T.; Ilie, M.; Grădinaru, D.; Guțu, C.; Voicu, S.; Dinischiotu, A.; Spandidos, D. A.; Tsatsakis, A. M. Assessment of the potential health benefits of certain total extracts from *Vitis vinifera*, *Aesculus hyppocastanum* and *Curcuma longa*. *Exp. Ther. Med.* **2015**.
45. Guilhermino, L.; Diamantino, T.; Carolina Silva, M.; Soares, A. M. V. M. Acute toxicity test with *Daphnia magna*: An alternative to mammals in the prescreening of chemical toxicity? *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2000**.
46. Olaru, O. T.; Venables, L.; Van De Venter, M.; Nitulescu, G. M.; Margina, D.; Spndidos, D. A.; Tsatsakis, A. M. Anticancer potential of selected *Fallopia Adans* species. *Oncol. Lett.* **2015**.
47. Singh, J. P.; Kaur, A.; Singh, N.; Nim, L.; Shevkani, K.; Kaur, H.; Arora, D. S. In vitro antioxidant and antimicrobial properties of jambolan (*Syzygium cumini*) fruit polyphenols. *LWT - Food Sci. Technol.* **2016**, *65*, 1025–1030.
48. Institute., C. and L. S. *Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically ; Approved Standard — Ninth Edition*; 2012; Vol. 32.