

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

***Noi cercetări privind mecanismele rezistenței la  
medicația antimicrobiană***

**REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT**

**Conducător de doctorat:  
PROF. UNIV. DR. ANDREEA  
LETIȚIA ARSENE**

**Student-doctorand:  
EMILIAN IONUȚ  
BLEJAN**

# Cuprins

INTRODUCERE .....	
I. PARTEA GENERALĂ .....	8
1. STATUSUL REZISTENȚEI LA ANTIBIOTICE ÎN UE ȘI SEE. MECANISMELE REZISTENȚEI. ....	2
1.1. Date epidemiologice privind rezistența la antibiotice în uniunea europeană .....	2
1.1.1. Repere cronologice .....	2
1.1.2. Situația rezistenței la antibiotice pentru Escherichia coli .....	4
1.1.3. Situația rezistenței la antibiotice pentru Klebsiella pneumoniae .....	7
1.1.4. Situația rezistenței la antibiotice pentru Pseudomonas aeruginosa .....	10
1.1.5. Situația rezistenței la antibiotice pentru Acinetobacter spp.....	11
1.1.6. Situația rezistenței la antibiotice pentru Mycobacterium tuberculosis .....	13
1.2. Mecanisme implicate în instalarea rezistenței bacteriene la antibiotice.....	15
1.2.1. Mecanisme de acțiune ale antibioticelor .....	15
1.2.1.1. Interferența cu sinteza peretelui celular al bacteriei .....	15
1.2.1.2. Inhibiția sintezei proteice ribozomale .....	16
1.2.1.3. Interferența cu sinteza acizilor nucleici .....	16
1.2.1.4. Inhibiția unei căi metabolice .....	16
1.2.1.5. Dezorganizarea membranei celulare.....	16
1.2.2. Mecanisme implicate în instalarea rezistenței bacteriene la antibiotice .....	17
1.2.2.1. Rezistența bacteriilor la antibiotice.....	17
1.2.2.1.1. Rezistența intrinsecă (naturală) .....	10
1.2.2.1.2. Rezistența bacteriană dobândită.....	11
1.2.2.2. Descrierea mecanismelor biochimice implicate în rezistența la antibiotice.....	18
1.2.2.2.1. Mecanisme biochimice .....	18
1.2.2.2.1.1. Modificări moleculare ale agentului antimicrobian .....	18
1.2.2.2.1.1.1. Modificări chimice ale antibioticului .....	19
1.2.2.2.1.1.2. Distrugerea moleculei antibioticului .....	19
1.2.2.2.1.1.2.1. Inactivarea antibioticului prin hidroliză .....	20
1.2.2.2.1.1.2.2. Inactivarea antibioticului prin reacții redox .....	21
1.2.2.2.1.2. Reducerea penetrării antibioticului și efluxul acestuia din celula bacteriană .....	21

1.2.2.2.1.2.1. Pompele de eflux .....	21
1.2.2.2.1.2.2. Scăderea permeabilității .....	22
1.2.2.2.1.3. Modificări ale situs-urilor țintă .....	23
1.2.2.2.1.3.1 Protejarea țintei .....	23
1.2.2.2.1.3.2 Substituția și bypass-ul situs-ului țintă .....	23
1.2.2.2.1.4 Rezistența datorată proceselor de adaptare ale celulei bacteriene .....	24
1.2.2.3 Descrierea mecanismelor genetice implicate în rezistența la antibiotice .....	25
1.2.2.3.1 Transferul orizontal de gene .....	26
1.2.2.3.2 Mutații ale situs-ului țintă .....	27
1.2.2.3.2.1 Mutații punctuale ale genelor ce codifică situs-ul țintă .....	27
1.2.2.3.2.2. Alterarea enzimatică a situs-ului țintă .....	27
2. NOI METODE DE COMBATERE A REZISTENȚEI LA ANTIBIOTICE .....	12
2.1. Potențialul antimicrobian al uleiurilor esențiale .....	12
2.1.1. Date privind efectele antimicrobiene ale uleiurilor esențiale .....	31
2.1.2. Activitatea anti- Quorum sensing a unor principii active din uleiuri esențiale .....	34
2.1.3 Efectele toxice ale uleiurilor esențiale .....	36
2.2 Nanoparticulele de argint .....	12
2.2.1. Repere cronologice .....	38
2.2.2 Metode de obținere a nanoparticulelor de argint .....	39
2.2.2.1. Metode chimice .....	39
2.2.2.2 Metode biologice .....	40
2.2.2.2.1 Sinteza AgNp folosind ca agenți reducători specii de fungi sau bacterii .....	40
2.2.2.2.2 Sinteza AgNp folosind extracte vegetale .....	40
2.2.2.3 Metode fizice .....	41
2.2.3 Mecanismele activității antibacteriene a AgNp .....	41
2.2.4. Date privind acțiunea antimicrobiene a nanoparticulelor de argint .....	43
2.2.5 Toxicitatea nanoparticulelor de argint .....	45
3. IMPACTUL ANTIBIOTICELOR ASUPRA MICROBIOTEI INTESTINALE .....	13
3.1. Efectele antibioterapiei asupra microbiotei .....	51
3.2 Intervenții asupra compoziției microbiotei: terapia cu microorganisme probiotice, între beneficii și riscuri .....	53
3.3 Implicațiile disbiozei asupra fiziopatologiei axei creier-intestin .....	57
II. CONTRIBUȚII PERSONALE. PARTEA EXPERIMENTALĂ .....	15

4. EVALUAREA PROFILULUI DE REZISTENȚĂ ANTIMICROBIANĂ A UNOR AGENȚI PATOGENI FRECVENT IMPLICAȚI ÎN INFECȚII COMUNITARE .....	64
4.1 Evaluarea profilului de rezistență antimicrobiană a unor agenți patogeni frecvent implicați în infecții comunitare.....	64
4.1.1 Introducere .....	64
4.1.2 Materiale și metode.....	65
4.1.3 Rezultate și discuții .....	66
4.1.3.1 Susceptibilitatea izolatelor bacteriene la diferite clase de antibiotice .....	66
4.1.3.2 Analiza rezistenței la antibiotice la pacienții diagnosticați cu pneumonie comunitară .....	80
4.1.3.3 Analiza comparativă a variației consumului de antibiotice într-un spital de urgență, în cazul pacienților diagnosticați cu pneumonie comunitară .....	87
4.1.3.4 Situația comparativă a rezistenței la antibiotice în perioada 2016-2019 la nivel regional față de media europeană .....	90
4.2. Evaluarea profilului de rezistență la medicația antituberculoasă .....	92
4.2.1. Introducere .....	92
4.2.2 Obiectivul studiului .....	93
4.2.3 Materiale și metode.....	93
4.2.4 Rezultate și discuții .....	93
4.2.4.1 Patologii asociate .....	95
4.2.4.2 Profilul de rezistență al Mycobacterium tuberculosis.....	96
4.3 Concluzii .....	101
5. EVALUAREA PROFILULUI ANTIMICROBIAN AL UNOR ULEIURI ESENȚIALE DIN PLANTE AROMATICE .....	17
5.1. Introducere .....	106
5.2 Materiale si metode.....	107
5.3 Rezultate și discuții .....	110
5.3.1. Variația activității antimicrobiene în grupul celor șase uleiuri esențiale testate.....	111
5.3.2 Susceptibilitatea tulpinilor microbiene testate la acțiunea diferitelor uleiuri esențiale investigate.....	116
5.3.3 Relații compoziție – activitate antimicrobiană.....	119
5.4 Concluzii .....	124
6. DEZVOLTAREA ȘI EVALUAREA EXPERIMENTALĂ A UNOR NANOPARTICULE DE ARGINT CU POTENȚIAL ANTIMICROBIAN .....	18

6.1. Introducere .....	125
6.2. Sinteza și caracterizarea AgNp cu potential antimicrobian.....	126
6.2.1. Sinteza chimică a AgNp cu ajutorul metodei Turkevich .....	126
6.2.2 Analiza spectrometrică UV-Vis a AgNp. Analiza XRD a AgNp. ....	126
6.2.2.1 Materiale și metodă.....	126
6.2.2.2 Rezultate și discuții .....	127
6.3 Studii de toxicitate acută, după administrarea nanoparticulelor de argint în doză unică, p.o., la rozătoare mici .....	128
6.3.1 Introducere .....	128
6.3.2 Materiale și metodă.....	128
6.3.3 Rezultate și discuții .....	130
6.3.3.1 Analiza observațională a animalelor în primele opt ore după administrarea suspensie de nanoparticule de argint .....	130
6.3.3.2 Efectele AgNp asupra dinamicii greutateii corporale.....	131
6.3.3.3 Variația procentuală medie comparativă a greutateii corporale zilnice a animalelor din cele trei loturi .....	135
6.4. Studii privind farmacocinetica AgNp după administrare în doză unică la rozătoare .....	136
6.4.1 Scopul studiului.....	136
6.4.2 Materiale și metode.....	136
6.4.3.Rezultate și discuții .....	137
6.5. Influența tratamentului topic cu suspensie de AgNp asupra evoluției leziunilor de tip arsură la animale de experiență .....	140
6.5.1. Introducere .....	140
6.5.2.Materiale .....	140
6.5.3.Metodă .....	141
6.5.4.Rezultate și discuții .....	142
6.5.4.1. Evoluția procesului de cicatrizare .....	142
6.6. Influența tratamentului topic al leziunilor tip arsură cu suspensie de AgNp asupra parametrilor hematologici .....	146
6.6.1.Materiale și metode .....	146
6.6.2.Rezultate și discuții .....	147
6.6.2.1.Variația parametrilor hematologici .....	147
6.6.2.2.Variația procentuală a parametrilor hematologici efect %.....	151

6.7. Concluzii .....	151
7. IMPACTUL DISBIOZEI ASUPRA FIZIOPATOLOGIEI AXEI CREIER-INTESTIN .....	153
7.1. Evaluarea dinamicii neuro-hormonale după administrarea unor tulpini microbiene probiotice, într-un model murin de inflamație intestinală .....	153
7.1.1. Motivația cercetării.....	153
7.1.2. Obiectivele cercetării.....	154
7.1.3. Materiale și metode.....	154
7.1.4. Rezultate și discuții .....	157
7.1.4.1. Evaluarea efectelor probioticelor asupra parametrilor hematologici .....	157
7.1.4.1.1. Variația parametrilor hematologici .....	157
7.1.4.1.2. Corelații între parametrii hematologici în cadrul loturilor .....	161
7.1.4.1.3. Variația procentuală a parametrilor hematologici, efect % .....	163
7.1.4.2. Evaluarea dinamicii neuro-hormonale după administrarea unor tulpini microbiene probiotice, într-un model murin de inflamație intestinală.....	164
7.1.4.2.1. Variația concentrațiilor markerilor dozați în probe de plasmă, creier, intestin din cadrul loturilor experimentale ale modelului de inflamație intestinală la șoarece .....	164
7.1.4.2.2. Variația procentuală a parametrilor dozați efect % față de lotul animalelor netratate cărora li s-a indus inflamație intestinală cu dextran .....	172
7.2. Evaluarea dinamicii neuro-hormonale după administrarea unor tulpini microbiene probiotice, într-un model murin de hipertiroidism .....	174
7.2.1. Motivația cercetării.....	174
7.2.2. Obiectivele cercetării.....	175
7.2.3. Materiale și metode.....	175
7.2.4. Rezultate și discuții .....	177
7.2.4.1. Variația parametrilor dozați .....	177
7.2.4.2. Variația procentuală a parametrilor dozați efect % față de lotul animalelor netratate cărora li s-a indus hipertiroidism cu levotiroxină .....	183
7.3. Concluzii .....	186
CONCLUZII ȘI CONTRIBUȚII PERSONALE .....	20
BIBLIOGRAFIE .....	24
ANEXE .....	209

## INTRODUCERE

Evaluarea rezistenței la antibiotice și a consecințelor acesteia, identificarea tulpinilor microbiene multi-rezistente, determinarea factorilor de risc pentru dezvoltarea mecanismelor de rezistență microbială, precum și investigarea unor alternative terapeutice antiinfecțioase sunt subiecte de mare actualitate. În prezent, soluționarea acestor aspecte este într-o continuă cercetare, fiind necesare eforturi globale pentru controlul și antagonizarea efectelor rezistenței microorganismelor la terapiile actuale [1].

Cunoașterea detaliată a mecanismelor moleculare de instalare a rezistenței bacteriene la medicația antibiotică permite dezvoltarea de noi molecule pentru eradicarea patogenilor care se adaptează rapid la tratamentele actuale.

**Astfel, studiile realizate în cadrul tezei de doctorat au urmărit evaluarea multidisciplinară a rezistenței la medicamente antimicrobiene a microorganismelor patogene sau oportuniste, investigarea unor mecanisme moleculare induse de dismicrobism și identificarea unor potențiale alternative terapeutice antimicrobiene.**

În acest context au fost stabilite obiectivele cercetării doctorale, cu scopul final de a aduce contribuții originale în resorturile de combatere a rezistenței microorganismelor la antibiotice.

*Obiectivele părții generale* au fost:

- ***Sistematizarea celor mai recente date din literatura de specialitate privind:***
  - *profilul și dinamica rezistenței la antibiotice;*
  - *mecanismele microbiene de rezistență;*
  - *surse alternative de compuși cu potențial antimicrobial;*
  - *dezechilibre metabolice generate de disfuncțiile florei microbiene saprofite.*

*Obiectivele cercetărilor originale* au fost:

- ***Evaluarea rezistenței antimicrobiene în infecții comunitare, în regiunea Sud-Muntenia, România;***
- ***Dezvoltarea și evaluarea experimentală a unor resurse antimicrobiene de origine vegetală și minerală;***
- ***Investigarea disfuncțiilor metabolice și hormonale induse de dismicrobism;***

Teza de doctorat este structurată într-o primă parte generală (I), ce reflectă starea actuală a rezistenței la antibiotice și a progreselor realizate, și bineînțeles partea de contribuții personale (II) care abordează principalele obiective stabilite, pe parcursul a patru capitole, finalizându-se cu sumarizarea concluziilor ce confirmă realizarea obiectivelor propuse.

## I. PARTEA GENERALĂ

### 1. STATUSUL REZISTENȚEI LA ANTIBIOTICE ÎN UE ȘI SEE. MECANISMELE REZISTENȚEI.

În **capitolul 1** sunt prezentate, în prima secțiune, cele mai recente date privind profilurile de rezistență la antibiotice a bacteriilor multirezistente conform raportului EARS-NET (Rețeaua Europeană de Supraveghere a Rezistenței la Antibiotice) din 2016, în cea de-a doua secțiune fiind detaliate mecanismele de acțiune ale antibioticelor și mecanismele rezistenței la antibiotice.

Conform raportului din noiembrie 2017 al Rețelei Europene de Supraveghere a Rezistenței la Antimicrobiene (EARS-Net), cea mai mare pondere a tulpinilor bacteriene rezistente la agenții antibiotici o au țările din sudul și sud-estul Europei, rezistența la antibiotice reprezentând pentru aceste țări un fenomen ce evoluează mult mai rapid decât în țările Europei de Nord. Pentru anul 2016, 30 țări din Europa au raportat date către EARS-Net. Situația rezistenței la antimicrobiene în Europa arată variații largi, dependente de specia bacteriană, clasa de antibiotice și zona geografică. Utilizarea antibioticelor și metodele de prevenție a infecțiilor bacteriene contribuie la gradientul ascendent al ponderei rezistenței la antimicrobiene în Europa, de la Vest la Est și de la Nord la Sud [2].

Printre bacteriile rezistente, *E. coli* este cel mai frecvent agent patogen bacterian Gram-negativ, cauzând o gamă diversă de boli care afectează toate grupele de vârstă. *E.coli* locuiește în principal în tractul intestinal inferior al oamenilor și al altor animale cu sânge cald și este descărcat în mediu prin fecale și stații de epurare a apelor uzate. Reprezintă o colecție diversă de bacterii care sunt de obicei comensale, dar include și agenți patogeni care provoacă o varietate de afecțiuni la om, provocând mai mult de două milioane de decese în fiecare an.

La nivel european, mai mult de jumătate din tulpinile de *E. Coli* izolate, 58.6 %, raportate de EARS-Net în 2016 erau rezistente la cel puțin una dintre clasele de antibiotice



aflăte sub supraveghere; aminopeniciline, fluorochinolone, cefalosporine generația III, aminoglicozide și carbapenemi [3]

*Klebsiella pneumoniae* reprezintă o clasă de bacili Gram-negativi care se găsesc omniprezenți pe suprafața mucoasei la animale sau în mediu. La om, *K. pneumoniae* este concentrat în tractul gastro-intestinal, și în nazofaringe, pe unde bacteriile pot intra în circulația sistemică, ajungând în țesuturi, și provocând infecții. În Era preantibiotică, *K. pneumoniae* a fost un agent patogen vital al pneumoniei comunitare, în special la diabetici și alcoolici. În era antibioticelor, aceasta a devenit o cauză majoră a afecțiunilor medicale în spitale și un factor de risc al infecțiilor severe dobândite în comunitate.

*Pseudomonas aeruginosa* reprezintă și o cauză majoră a infecțiilor nosocomiale precum pneumonii grave, infecții de tract urinar și septicemii. *Pseudomonas aeruginosa* este rezistent în mod natural la majoritatea antibioticelor cu excepția unor fluorochinolone, aminoglicozide, betalactamine și polimixine, la care însă, poate deveni rezistent. În 2016, aproape 40% din tulpinile de *Pseudomonas aeruginosa* raportate către EARS-Net, aveau rezistență la cel puțin unul dintre antibioticele monitorizate: piperacilina + tazobactam, fluorochinolone, ceftazidimă, aminoglicozide și carbapenemi [4]. Multirezistența, definită ca rezistența la cel puțin trei clase de antibiotice, a fost în *trend* descendent din 2013 până în 2016 [2].

Tuberculoza este încă, considerată o boală pandemică. Potrivit Organizației Mondiale a Sănătății (OMS), în 2018 au existat 10 milioane de cazuri, aproximativ 90% implicând pacienți din medii defavorizate, și 1,5 milioane de decese cauzate de tuberculoză la nivel mondial, din care, aproximativ 1,2 milioane de decese cauzate de tuberculoză în rândul persoanelor nepurtătoare de HIV și 251 000 de decese în rândul persoanelor seropozitive. Deși decesele cauzate de tuberculoză au scăzut cu 35 % din 2000 până în 2018 în rândul persoanelor HIV-negativ, și cu 60% în rândul celor seropozitivi, încă este declarată epidemie de tuberculoză de către OMS [5].

### **Mecanisme de acțiune ale antibioticelor**

Cunoașterea mecanismelor de acțiune ale antibioticelor contribuie la înțelegerea mecanismelor rezistenței bacteriene și implicit la modificarea structurală a antibioticelor existente sau la dezvoltarea unor molecule noi, eficiente împotriva tulpinilor bacteriene care au dezvoltat rezistența la unul sau mai multe antibiotice. Pentru ca un antibiotic să fie eficient împotriva unei bacterii, sunt necesare trei condiții:

- în structura bacteriei trebuie să existe un receptor susceptibil la acțiunea antibioticului;
- antibioticul trebuie să ajungă la nivelul receptorului într-o cantitate suficientă (concentrație minimă inhibitorie);
- structura antibioticului nu trebuie să fie modificată de către mecanismele de apărare ale bacteriei [6].

### **Mecanisme implicate în instalarea rezistenței bacteriene la antibiotice**

Conform teoriei evoluționiste a lui Darwin, urmașii unei generații vor tinde să fie mai bine adaptați la mediul lor de viață decât au fost predecesorii acestora.

Microbii sunt considerați ca fiind cea mai răspândită formă de viață de pe Terra. De-a lungul timpului au supraviețuit și evoluat datorită flexibilității și adaptabilității lor. Rezistența bacteriilor la antibiotice este rezultatul luptei pentru supremație purtate în ultimele 3.5 miliarde de ani. Plasticitatea genomică le-a ajutat să supraviețuiască în condiții de viață extreme și să reziste la acțiunea antibioticelor. Utilizarea incorectă și intensivă a antibioticelor, atât la oameni cât și la animale sau în agricultură, nu a făcut decât să determine apariția bacteriilor patogene rezistente [4].

Consumul de antibiotice de către animalele de fermă reprezintă aproape jumătate din producția globală de antibiotice. Bacteriile rezistente create de către administrarea la scară largă a antibioticelor, animalelor de fermă, ajung prin consumul produselor de origine animală în tractul digestiv uman, colonizează flora digestivă normală, transferând astfel gene de rezistență bacteriană microflorei saprofite. Acest fenomen a fost observat la bacteriile lactice de origine animală, care ajung în tractul digestiv uman fie prin consumul alimentelor de origine animală bogate în bacterii lactice, fie prin administrarea de probiotice. Transferul determinantilor rezistenței de la speciile de *Enterococcus*, *Lactococcus* și *Lactobacillus* are loc probabil, prin intermediul transferului orizontal de gene [7].

Dezvoltarea rezistenței bacteriene la antibiotice are două cauze principale: prezența genelor de rezistență și dezvoltarea rezistenței ca urmare a consumului de antibiotice. Astfel, sunt definite rezistența intrinsecă și rezistența dobândită la antibiotice [8].

### **Rezistența intrinsecă (naturală)**

Capacitatea unei specii bacteriene sau a unui gen bacterian de a supraviețui și de a se multiplica în prezența unui agent antimicrobian, datorită caracteristicilor fiziologice ale bacteriei sau a prezenței unei gene structurale. Rezistența intrinsecă nu poate fi transferată prin

transfer orizontal de determinanți ai rezistenței bacteriene și nu reprezintă un risc în cazul bacteriilor non-patogene [2].

Rezistența naturală este datorată fie imposibilității antibioticului de a ajunge la locul de acțiune, fie afinității reduse a antibioticului pentru *target*, fie absenței *target*-ului din structura bacteriei. Prezența unei membrane externe la bacilii Gram-negativi, precum *Escherichia coli*, determina rezistență la mai multe clase de antibiotice datorită impermeabilității membranare [9]. *Escherichia coli* este un bacil natural rezistent la macrolide, glicopeptide și lincosamide, dar sensibil în mod natural la fluorochinolone [10].

### **Rezistența bacteriană dobândită**

Este caracteristică anumitor tulpini bacteriene care în mod normal sunt sensibile la acțiunea antibioticului în cauză. Determinanții genetici ai rezistenței pot fi transferați prin transfer orizontal de gene de la o bacterie la alta. Rezistența bacteriană dobândită la antibiotice poate surveni ca urmare a unor mutații ale genomului bacterian sau prin achiziția genelor care codifică un anumit mecanism de rezistență. Aceste modificări genetice alterează sistemul de apărare al bacteriei prin multiple mecanisme: alterarea permeabilității membranare, inactivări enzimatică ale antibioticului, transportul activ al antibioticului, modificarea *target*-ului molecular. Determinanții genetici ai rezistenței bacteriene la antibiotice pot fi transferați vertical prin multiplicarea tulpinii rezistente sau, prin transfer orizontal de gene astfel: Transformare naturală (recaptarea și încorporarea ADN-ului liber din mediul extracelular); Conjugare; Transducție (transfer mediat de bacteriofagi) [10].

Transferul orizontal al genelor de rezistență prin conjugare se desfășoară între bacterii din specii sau genuri diferite, în timp ce transformarea și transducția sunt procese ce se desfășoară de obicei în cadrul aceleiași specii [11].

Rezistența unei bacterii la un anumit antibiotic include în general și rezistență la alți compuși asemănători structural. Fenomenul de rezistență poate să se dezvolte și încrucișat atunci când antibiotice din clase diferite se leagă la același situs de acțiune, modificat de către o genă de rezistență [2].

## 2. NOI METODE DE COMBATERE A REZISTENȚEI LA ANTIBIOTICE

Cunoașterea aprofundată a mecanismelor de instalare a rezistenței bacteriene la antibiotice permite modificarea structurilor chimice ale medicamentelor antibacteriene existente, astfel încât acestea să își recapete eficiența. Rezistența multimedicațională (*multidrug resistance*) reduce valoarea raportului risc/beneficiu al antibioticelor datorită acumulării efectelor toxice ale medicamentelor asociate. Pentru combaterea rezistenței bacteriene se încearcă introducerea în terapie a altor alternative terapeutice alături de moleculele existente.

**Capitolul 2** este structurat în două secțiuni. Prima parte prezintă informații actuale despre potențialul antimicrobian al uleiurilor esențiale, detaliind metode de obținere, mecanisme de acțiune, dovezi din literatura de specialitate privind efectele antimicrobiene corelate cu principiile active, și date despre toxicitatea uleiurilor esențiale. În partea a doua am revizuit metodele de obținere ale nanoparticulelor de argint, mecanismele activității antimicrobiene, dovezi din literatura de specialitate despre acțiunile antimicrobiene ale nanoparticulelor de argint și date despre potențialul toxic.

### **Potențialul antimicrobian al uleiurilor esențiale**

Plantele aromatice au fost folosite din cele mai vechi timpuri pentru proprietățile lor conservante terapeutice, și pentru a conferi aromă și gust alimentelor. Proprietățile farmaceutice ale plantelor aromatice sunt parțial atribuite uleiurilor esențiale. Până la mijlocul secolului al XX-lea, utilitatea uleiurilor esențiale a fost redusă la crearea parfumurilor, în industria cosmetică și a aromelor alimentare, în timp ce utilizarea lor în preparatele farmaceutice a cunoscut un declin [12].

Acum, uleiurile esențiale revin în centrul atenției, ca urmare a nevoii imperioase de a dezvolta noi medicamente cu acțiune antimicrobiană pentru a depăși criza globală a rezistenței la antibiotice.

### **Nanoparticulele de argint**

Infecția cu o bacterie multirezistentă deschide calea unui tratament de durată, costisitor, cu repercusiuni grave pentru pacient datorită acumulării efectelor toxice ale antibioticelor folosite [13]. Pentru combaterea rezistenței bacteriene se încearcă introducerea în terapie a

altor alternative terapeutice alături de moleculele existente, una dintre acestea fiind nanoparticulele de argint (AgNp).

În prezent, investigațiile legate de dezvoltarea de noi antibiotice sunt procese dificile, costisitoare, în timp ce rata infecțiilor cauzate de microorganisme multi-rezistente continuă să crească și să provoace decese la nivel global. AgNp, împreună cu alte nanomateriale, sunt studiate pentru combaterea microorganismelor patogene. Deoarece infecțiile cauzate de microorganismele rezistente la antibiotice reprezintă o problemă globală, AgNp sunt prezentate ca o alternativă excelentă, deoarece pot fi utilizate pentru a preveni infecții cauzate de aceste microorganisme, pentru decontaminarea consumabilelor medicale și chiar pentru combaterea infecțiilor în curs [14].

Datorită proprietăților lor antivirale și antibacteriene, nanoparticulele de argint sunt cele mai promițătoare nanoantibiotice (nanomateriale cu proprietăți antimicrobiene) din zilele noastre. Avantajele AgNp sunt legate de un mod de acțiune generalizat împotriva diferiților agenți patogeni, cum ar fi virusuri, bacterii și ciuperci, precum și de eficacitatea lor antibacteriană, indiferent de susceptibilitatea microbiană la antibiotice convenționale, de prezența pompelor de eflux și formarea de biofilme, astfel AgNp pot depăși rezistența microorganismelor la antibiotice convenționale. Mai mult, utilizarea AgNp are avantaje diferite dincolo de activitatea lor antivirală și antimicrobiană. AgNp pot fi sintetizate prin metode ușoare, necostisitoare, și ecologice, și, pot fi produse folosind procese chimice sau sinteze biologice [15].

### **3. IMPACTUL ANTIBIOTICELOR ASUPRA MICROBIOTEI INTESTINALE**

În **capitolul 3** am discutat despre efectele antibioterapiei asupra microbiotei, despre intervențiile ce pot fi realizate pentru echilibrarea microbiotei și despre implicațiile disbiozei asupra fiziopatologiei axei creier-intestin, accentuând impactul disbiozei în contextul evoluției rezistenței la antibiotice.

Utilizarea antibioticelor este cea mai frecventă și semnificativă cauză a modificărilor majore ce apar la nivelul microbiotei intestinale. Potențialul unui agent antimicrobian de a influența microflora intestinală este legat de spectrul său de activitate, farmacocinetică, doză, și durata de administrare. În ceea ce privește spectrul de activitate, un agent antimicrobian

activ atât împotriva microorganismelor Gram-pozitive, cât și Gram-negative, va avea un impact mai mare asupra florei intestinale.

Deși studiile clinice, realizate în ultimele decenii au demonstrat beneficiile aduse de administrarea probioticelor în diverse afecțiuni, nu se știu foarte multe lucruri despre reacțiile adverse ale administrării probioticelor.

Complicațiile infecțioase legate de utilizarea probioticelor sunt rareori evaluate și urmărite. Prin urmare, sunt necesare studii intervenționale pentru a evalua siguranța probioticelor .

R.L Costa *et al.* au realizat o revizuire sistematică a articolelor originale publicate între 1976 și 2018. Cercetarea lor a reunit 93 de cazuri de pacienți care au dezvoltat complicații infecțioase corelate cu ingestia probioticelor. Distribuția geografică a cazurilor identificate prin această revizuire acoperă cele 5 continente și include țările dezvoltate, precum și țările în curs de dezvoltare. Cea mai frecventă complicație infecțioasă a fost fungemia, cu 37,6% din cazuri. Microorganismele din genul *Saccharomyces* au fost cel mai frecvent raportate microorganisme probiotice, corelate cu complicațiile infecțioase. 39,3% din cazurile de sepsis au fost cauzate de acești fungi.

Bacteriemia a reprezentat 20,4% din complicațiile infecțioase, iar genul *Lactobacillus* a fost responsabil pentru 42% din acestea. Bacterii din genurile *Bifidobacterium*, *Bacillus*, *Pediococcus* și *Escherichia* sunt implicate, de asemenea, în apariția complicațiilor infecțioase.

Mortalitatea a fost asociată cu vârsta peste 60 de ani, colită pseudomembranoasă, tratament în curs cu antibiotice și infecția cu *Saccharomyces spp* [16].

Deși probioticele au fost adesea folosite în contextul administrării excesive a antibioticelor, o utilizare mai judicioasă a antibioticelor este necesară, deoarece utilizarea probioticelor nu este lipsită de riscuri.

La baza axei creier-intestin se află o rețea bidirecțională de comunicație între sistemul nervos central (SNC-creier, măduva spinării) și complexele nervoase senzoriale și efectoare ale tractului gastro-intestinal. Sistemul nervos enteric (SNE) și SNC sunt conectate, permițând comunicarea directă atât de la SNE la SNC, cât și de la SNC la SNE [17].

Deși căile precise ale axei intestin-creier nu au fost încă descifrate, se crede că efectele sunt realizate prin mai multe mecanisme diferite mediate de hormoni. Efectele microbiotei asupra nivelurilor hormonale ale gazdei pot fi directe, în cazul în care microbiota produce

hormoni, sau indirecte, unde microbii pot modula funcția cortexului suprarenalian (care controlează răspunsul la anxietatea și stres), sau inflamația și răspunsurile imune. Două grupuri majore de hormoni implicați probabil în efectele bacteriene asupra comportamentului gazdei sunt neurohormonii, inclusiv serotonina și catecolaminele dopamină, epinefrină și norepinefrină și hormonii stresului, inclusiv cortizolul, corticosteronul, adrenocorticosteronul și corticotropina. Hormonii din ambele grupuri pot influența modificările fiziologice care pregătesc corpul pentru activitatea fizică (răspuns la luptă sau fugă), cum ar fi creșterea ritmului cardiac și a tensiunii arteriale și încetinirea metabolismului [18].

Endocrinologia microbiană devine un concept important în evoluția stadiului cunoașterii axei microbiotă-intestin-creier. Una dintre fațetele principale ale conceptului de endocrinologie microbiană se bazează pe limbajul neurochimic comun care există între gazdă și microb. De mult s-a înțeles că microbii sunt capabili să producă substanțe neurochimice pe care le asociem de obicei cu organismele mamaliene. Studiile de referință din anii 1990 au fost primele și au demonstrat că bacteriile răspund la moleculele de semnalizare neuroendocrină, inclusiv norepinefrina și epinefrina, și că microbiota poate afecta comportamentul gazdei prin axa intestin-creier. Din acel moment, s-a demonstrat că microbiota sintetizează și răspunde la acțiunea mai multor neuromediatorii cheie care sunt implicați în starea de spirit a gazdei, comportament și cogniție. Multe dintre aceste molecule neuroactive produse de gazdă sau microbi sunt, de asemenea, molecule importante de semnalizare în interacțiunile gazdă-microbiotă la nivelul interfeței intestinale [19].

## **II.CONTRIBUȚII PERSONALE. PARTEA EXPERIMENTALĂ**

### **4. EVALUAREA PROFILULUI DE REZISTENȚĂ ANTIMICROBIANĂ A UNOR AGENȚI PATOGENI FRECVENT IMPLICAȚI ÎN INFECȚII COMUNITARE**

În **capitolul 4**, primul capitol al părții originale, cunoscând în detaliu situația rezistenței la nivel european, am evaluat profilul de rezistență la antibiotice în regiunea Sud-Muntenia din România, pentru unii agenți patogeni frecvent implicați în infecții comunitare. Studiul s-a desfășurat în perioada ianuarie 2016 – 31 decembrie 2019 și a inclus un număr de 563 de

pacienți diagnosticați cu infecții de tract urinar (216), pneumonii comunitare (425), tuberculoză (33), și alte bacteriemii (12), spitalizați în cadrul următoarelor spitale din București și sudul României: Spitalul Clinic de Urgență București, Spitalul Clinic de Nefrologie Dr. Carol Davila București, Institutul Național de Pneumoftiziologie “Profesor Dr. Marius Nasta” București, Spitalul Municipal Turnu Măgurele, județul Teleorman.

Pacienților li s-au prelevat mai multe tipuri de probe biologice, în funcție de diagnosticul stabilit, și anume, spută, sânge, urină. Probele de spută, urină și sânge au fost colectate și analizate prin diagnostic bacteriologic clasic. Pentru evaluarea rezistențelor la antibiotice s-au utilizat mai multe tipuri de metode:

Evaluarea susceptibilității la antibiotice folosind metoda difuzimetrică;

Calculul procentelor de rezistență la principalele clase de antibiotice în intervalul ianuarie 2016 – decembrie 2019, pentru tulpinile studiate;

Indicele MAR (*multiple antibiotic resistance*), indicele de multirezistență calculat ca raportul între numărul de antibiotice la care tulpina respectivă a fost rezistentă față de numărul total de antibiotice testate. Conform datelor retrospective accesate, acest indice a putut fi calculat pentru pacienții diagnosticați cu pneumonie comunitară din cadrul Spitalului de Urgență București în perioada decembrie 2017-decembrie 2018;

Analiza comparativă în doi ani diferiți a fluctuațiilor consumului de antibiotice la pacienții proveniți din Spitalul Clinic de Urgență București;

Analiza comparativă a procentelor de rezistență obținute în studiu față de procentele raportate de EARS-Net în 2019, pentru perioada 2015-2019.

Analiza statistică s-a efectuat folosind programul de statistică R, versiunea R 3.5.3.

### **Evaluarea profilului de rezistență la medicația antituberculoasă**

În a doua parte a capitolului am evaluat profilurile de rezistență la medicamente antituberculoase pentru un grup de pacienți diagnosticați cu TBC. Am obținut ponderi mari pentru tiparele de rezistență MDR, XDR și preXDR.

În cadrul studiului retrospectiv a fost inclus un lot de 33 de pacienți diagnosticați cu tuberculoză MDR, internați în cadrul secției clinice de pneumologie II TBC-MDR a Institutului Național de Pneumoftiziologie “Profesor Dr. Marius Nasta” (IPMN) în perioada 01.04.2019 - 07.11.2019. Dintre datele analizate au făcut parte și factorii de risc precum fumatul și diagnosticul pozitiv pentru HIV, dar și alte patologii asociate. Diagnosticarea



pacienților cu TBC s-a realizat în urma anamnezei, a radiografiei pulmonare, a examenului bacteriologic al sputei și a analizelor de biologie moleculară GeneXpert RIF/TB. Un indicator important pentru aprecierea fenomenului de multi-rezistență este indicatorul IMAR (Multiple antibiotic resistance index), calculat ca raport între numărul de antibiotice la care tulpina de *M. tuberculosis* este rezistentă și numărul total de antibiotice testate. Este o analiză utilă realizării sau completării hărților epidemiologice specifice unității spitalicești [20].

## **5. EVALUAREA PROFILULUI ANTIMICROBIAN AL UNOR ULEIURI ESENȚIALE DIN PLANTE AROMATICE**

În **capitolul 5** am evaluat profilul antimicrobian al unor uleiuri esențiale din plante aromatice asupra unor tulpini de bacterii Gram-negative, Gram-pozitive și fungi. Uleiurile testate au fost: uleiul esențial de oregano, uleiul esențial din frunze de arbore de ceai, uleiul esențial de busuioc, uleiul esențial de piper negru, extractul uleios de Frankincense și un amestec de uleiuri esențiale.

Activitatea antimicrobiană a uleiurilor esențiale analizate a fost determinată utilizând metoda difuzimetrică [21-23], conform recomandărilor [24]. Metoda a implicat folosirea de cutii Petri sterilizate (90 mm Ø), cu agar Muller Hinton însămânțat cu suspensiile microbiene pregătite anterior (100 μl suspensie conținând  $2 \times 10^8$  UFC/ml). Au fost apoi plasate, pe suprafața fiecărui mediu de cultură, discuri din hârtie de filtru (8 mm Ø) ce au fost impregnate cu 50 μl din diluțiile de uleiuri esențiale pregătite (1 mg/mL, 0,5mg/mL, 0,01 mg/mL diluate în DMSO 1%). Pentru probele “control negativ” s-a utilizat doar DMSO 1%. Cutiile Petri au fost incubate la 37<sup>0</sup> C, timp de 24 de ore. Pentru candida mai multe zile? Toate determinările au fost realizate în triplicat. Media diametrelor zonelor de inhibiție a fiecărui disc impregnat cu ulei esențial sau control negativ, a fost măsurată cu ajutorul unui șubler cu rezoluția de 0,01 mm. Eficacitatea a fost clasificată în funcție de diametrul mediu măsurat al zonei de inhibiție astfel: puternic inhibitor (> 20mm), moderat inhibitor (20mm – 12 mm), și fără efect de inhibiție (< 12 mm) [21].

Tehnicile microbiologice au fost realizate aseptice, în condițiile de lucru impuse de normativele în vigoare, utilizând echipamente etalonate și calificate.

În urma studiului am obținut efecte antimicrobiene importante pentru uleiurile esențiale de oregano, arbore de ceai și busuioc, și, am identificat principiile active comune uleiurilor esențiale pentru acțiunea antimicrobiană țintită.

## **6. DEZVOLTAREA ȘI EVALUAREA EXPERIMENTALĂ A UNOR NANOPARTICULE DE ARGINT CU POTENȚIAL ANTIMICROBIAN**

În **capitolul 6** am dezvoltat și evaluat experimental nanoparticule de argint cu dimensiuni sub 10 nm confirmate în urma analizelor fizico-chimice. După caracterizarea nanoparticulelor de argint sintetizate prin metoda Turkevich, am urmărit profilul farmacologic al acestora. Astfel, în urma studiilor de toxicitate acută pe animale de laborator, nu s-a înregistrat niciun efect letal, indiferent de doza administrată. Am realizat și analizat comparativ, pentru prima dată, profilul farmacocinetic al AgNp administrate rozătoarelor din două specii.

Pentru studiile privind farmacocinetica am utilizat două specii de rozătoare: o populație de 6 șoareci masculi, albi, NMRI ( $40,16 \pm 3,31$ g) și 6 șobolani Wistar masculi, adulți ( $374,4 \pm 25,48$ g). Animalele au provenit de la biobaza Institutului Național de Cercetare-Dezvoltare Medico-Militară „Cantacuzino”.

Compuși testați sunt AgNp sintetizate și testate anterior, concentrația de Ag fiind de 0.103mg/mL. Animalele aduse de la biobază au fost lăsate timp de 7 zile cu hrană și apă *ad libitum* pentru acomodare. Temperatura înregistrată a variat între 20°C și 22°C iar umiditatea între 35% și 45%.

Administrarea suspensiei de AgNp s-a realizat *i.p.*, în doză unică, iar prelevarea probelor de sânge s-a efectuat din oră în oră în primele 6 ore, și la 24 de ore. Probele de sânge au fost prelevate pe hârtie Whatman, și supuse apoi unui process de digestie într-un amestec 3:1 HNO<sub>3</sub>:H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, timp de o săptămână, pentru îndepărtarea compușilor organici prezenți în sânge. După centrifugarea probelor astfel obținute, s-au prelevat 0.5 mL din supernatant și a fost diluat cu 4.5 mL apă ultrapură. Soluțiile finale au fost analizate cu ajutorul tehnologiei ICP-MS, concentrațiile de Ag obținute fiind utilizate în realizarea profilurilor farmacocinetice la șoarece și șobolan prin intermediul softului de modelare farmacocinetică Kinetica

(Versiunea 3.1). De asemenea, s-au realizat comparații interspecii ale parametrilor farmacocinetici, aplicând testele T și F în soft-ul de statistică GraphPad Prism versiunea 9.2.0.

În ultima parte a acestui capitol am evaluat efectul cicatrizant al AgNp în urma administrării topice, într-un model experimental de arsură indusă la șobolani. Efectul cicatrizant al suspensiei testate a fost progresiv cu o evoluție descrescătoare a diametrului arsurilor. Determinările parametrilor hematologici au evidențiat o creștere importantă a granulocitelor și leucocitelor în cazul animalelor tratate cu AgNp, comparativ cu animalele tratate cu sulfadiazină argentică.

## **7.IMPACTUL DISBIOZEI ASUPRA FIZIOPATOLOGIEI AXEI CREIER- INTESTIN**

În **capitolul 7**, ultimul capitol al părții originale, am studiat impactul disbiozei asupra fiziopatologiei axei creier-intestin, evaluând în prima dinamica neuro-hormonală după administrarea unor tulpini microbiene probiotice într-un model murin de inflamație intestinală, și în cea de-a doua parte, dinamica neuro-hormonală după administrarea unor tulpini microbiene probiotice într-un model murin de hipertiroidism. Inflamația intestinală a fost indusă cu soluție de Detxran 70, și tratată cu sulfasalazină, *Lactobacillus acidophilus*, *Saccharomyces boulardi*, și amestecul celor două probiotice. Hipertiroidismul a fost indus cu levotiroxină sodică și tratată cu tiamazol, *Lactobacillus acidophilus*, *Saccharomyces boulardi*, și amestecul celor două probiotice. Fiecare experiment a implicat organizarea animalelor în șase loturi, și anume, lot martor sănătos, lot cu inflamație intestinală/hipertiroidism netratat, și câte patru loturi tratate conform schemei de mai sus. La finalul experimentului, în urma sacrificării animalelor, s-au prelevat probe de sânge, studiate pentru evaluarea efectelor tratamentelor administrate asupra parametrilor hematologici, și probe de plasmă, creier, intestin, analizate pentru detecția și dozarea ACTH-ului, cortizolului, serotoninei, adrenalinei, noradrenalinei, dopaminei, histaminei, GABA, utilizând kit-uri ELISA. Rezultatele obținute au permis evaluarea efectelor neuro-hormonale ale tulpinilor microbiene probiotice investigate. Administrarea irațională a antibioticelor poate genera dismicrobism, cu ecouri metabolice profunde și dezechilibre ale fiziopatologiei axei creier-intestin.

## CONCLUZII ȘI CONTRIBUȚII PERSONALE

Studiile realizate în cadrul tezei de doctorat au urmărit evaluarea multidisciplinară a rezistenței la medicamente antimicrobiene a microorganismelor patogene sau oportuniste, investigarea unor mecanisme moleculare induse de dismicrobism și identificarea unor potențiale alternative terapeutice antimicrobiene.

În acest sens, am evaluat:

- rezistența principalelor microorganisme implicate în infecțiile comunitare din regiunea Sud-Muntenia, pe o perioadă de patru ani;
- profilul local al rezistenței la medicația antituberculoasă;
- dezvoltarea și evaluarea experimentală a unor resurse antimicrobiene de origine vegetală și minerală;
- investigarea disfuncțiilor metabolice și hormonale induse de dismicrobism.

*În urma cercetărilor efectuate conform obiectivelor specifice propuse, pot fi formulate următoarele concluzii:*

### **A. Evaluarea profilului de rezistență antimicrobiană a unor agenți patogeni frecvent implicați în infecții comunitare**

În primul capitol al părții originale am realizat profilurile de rezistență la antibiotice pentru cele mai importante bacterii ce produc infecții comunitare. Tulpinile dominante în infecții comunitare în regiunea Sud-Muntenia, România, pentru perioada studiului(2016-2019), în cazul celor 563 de pacienți diagnosticați, au fost *Klebsiella pneumoniae* și *Escherichia coli*. O prevalență mică au avut tulpinile de *Staphylococcus aureus*, *Proteus spp.*, *Enterococcus spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter spp.* și *Providencia spp.*

Tulpinile de *Klebsiella pneumoniae* au demonstrat rezistență la monobactami și carboxipeniciline, și sensibilitate la polimixine și amfenicoli.

Tulpinile de *Escherichia coli* au demonstrat rezistență la tetraciline, aminopeniciline, macrolide și cefalosporine de generația I, și sensibilitate la carbapeneme, amfenicoli, fosfomicină, cefalosporine de generația III și IV, ureidopeniciline, fluorochinolone și tetraciline.

Tulpinile de *Staphylococcus aureus* au demonstrat rezistență la polimixine, chinolone, fluorochinolone, macrolide, și sensibilitate la ureidopeniciline, cefalosporine de generațiile III și IV, carbapeneme, amfenicoli, rifampicină, linezolid.

Tulpinile de *Enterococcus spp.* au demonstrat rezistență la cefalosporine de generația II, chinolone, fluorochinolone și sensibilitate la ureidopeniciline, amfenicoli, glicopeptide, rifampicină, aminoglicozide.

**În doi ani consecutivi, numărul de pacienți tratați cu colistin a crescut de trei ori, iar în cazul meropenemului de treisprezece ori.**

În prima perioadă s-a recurs la monoterapie în 49% din cazuri, în timp ce în următorul an s-a optat pentru un singur antibiotic în 14% din cazuri.

**Rezultatele studiului au relevat o incidență semnificativ mai mare a tulpinilor de *Klebsiella pneumoniae* în România (40%) comparativ cu UE și SEE (11%).**

Tulpinile de *Mycobacterium tuberculosis* au demonstrat rezistențe mari la antibioticele tuberculostatice clasice (rifampicină, izoniazidă, streptomycină, etambutol).

Majoritatea tulpinilor prezintă rezistență tip MDR (55%). Rezistență tip XDR este prezentă la 21% dintre tulpinile analizate iar cea de tip preXDR la 12% dintre tulpini.

18% dintre pacienții diagnosticați cu TBC erau infectați cu HIV.

## **B. Evaluarea profilului antimicrobian al unor uleiuri esențiale din plante aromatice**

Rezultatele obținute au relevat următoarele:

Uleiurile esențiale de *Origanum vulgareae*, *Ocimum basilicum* și *Melaleuca alternifolia* au demonstrat activitate antimicrobiană semnificativă.

Linalolul este activ, în mod țintit, pe bacterii Gram-pozitive.

Fitocomplecșii ce conțin linalol, 1,8-cineol, terpinene-4-ol,  $\alpha$ -pinen, p-cimen,  $\alpha/\gamma$ -terpinen, au acțiune țintită pe bacterii Gram-negative.

Uleiurile esențiale ce conțin 1,8-cineol și terpinene-4-ol au acțiune antimicrobiană asupra *Candida albicans*.

## **C. Dezvoltarea și evaluarea experimentală a unor nanoparticule de argint cu potențial antimicrobian**

Cercetările experimentale au relevat următoarele aspecte:

- am obținut și caracterizat nanoparticule de argint cu dimensiunea de 9.49 nm; suspensia s-a dovedit stabilă iar concentrația Ag a fost de 0.103mg/mL;
- **am analizat pentru prima dată profilul farmacologic al nanoparticulelor de argint administrate masculilor proveniți de la două specii, ambele rozătoare;**
- în studiile de toxicitate acută efectuate pe animale de laborator (șoareci) nu s-a evidențiat niciun eveniment letal, indiferent de doza administrată;
- greutatea animalelor a evoluat constant și liniar, indiferent de doză;
- **nivelul concentrației plasmatice a nanoparticule de argint, eficiența eliminării acestora și distribuția în organism, sunt semnificativ crescute la speciile mari de rozătoare;**
- nanoparticulele de argint au efect cicatrizant;
- **parametrii hematologici au evidențiat o activare intensă a mecanismelor celulare și moleculare de apărare imună locală, care are drept consecință cicatrizarea mult mai rapidă evidențiată în cazul grupului AgNp.**

#### **D. Efectele disbiozei asupra fiziopatologiei axei creier-intestin**

Dismicrobismul, consecință a unor afecțiuni sau a administrării de antibiotice, determină dezechilibre neurohormonale.

Există o interdependență activă între sistemul simpatic, axa HPA, axa HPT și microbiota intestinală.

**În bolile inflamatorii intestinale se reduce activitatea glandelor suprarenale și este stimulat sistemul dopaminergic.**

*Tulpinile microbiene de Lactobacillus acidophilus și Saccharomyces boulardi au efect modulator diferit asupra axelor HPA și HPT.*

*Sistemele catecolaminergic și serotoninergic sunt activate în urma administrării Saccharomyces boulardi.*

*Saccharomyces boulardi sensibilizează celulele enterocromafine cu consecința eliberării de serotonină în exces; putem formula astfel, o opinie de administrare precaută a probioticelor*

cu *Saccharomyces boulardi* la pacienții cu patologii hiperserotoninergice sau care primesc medicamente/suplimente ce pot determina sindrom serotoninergic.

*Saccharomyces boulardi* normalizează homeostazia glandelor suprarenale menținând în valori normale nivelul adrenalinei și corticoizilor.

Administrarea tulpinilor de *Saccharomyces boulardi* în hipertiroidism stimulează activitatea glandelor corticosuprarenale cu consecința inhibării axei HPT.

*Lactobacillus acidophilus* stimulează producția de GABA, deci echilibrează homeostazia hidro-electrolitică locală prin absorbția protonilor locali.

*Lactobacillus acidophilus* stimulează eliberarea histaminei, efect ce se poate concretiza prin favorizarea evenimentelor alergice; putem formula astfel o opinie privind riscurile asocierii probioticelor ce conțin *Lactobacillus acidophilus* cu produsele alimentare cu potențial alergen.

**În cazul pacienților cu teren atopic, evenimentele alergice pot fi evitate prin administrarea tulpinilor de *Saccharomyces boulardi*.**

Administrarea combinației *Lactobacillus acidophilus*+*Saccharomyces boulardi* favorizează reglarea axei HPT la hipertiroidieni.

Combinația celor două tulpini microbiene investigate în formule probiotice, trebuie asociată cu prudență cu medicamente serotoninergice.

Rezultatele obținute evidențiază faptul că se recomandă individualizarea terapiei cu probiotice în funcție de patologii și alte medicamente administrate.

În concluzie, rezultatele cercetărilor originale prezentate confirmă realizarea obiectivelor propuse și se înscriu în efortul general de control și antagonizare a efectelor rezistenței microorganismelor la terapiile antimicrobiene actuale.

## BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. Ferri M, Ranucci E, Romagnoli P, Giaccone V. Antimicrobial resistance: A global emerging threat to public health systems. *Crit Rev Food Sci Nutr.*57(13):2857-76. 2017.
2. Control ECfDPa. Summary of the latest data on antibiotic resistance in the European Union EARS-Net surveillance data November 2017. Stockholm: ECDC.2017.
3. Paitan Y. Current Trends in Antimicrobial Resistance of *Escherichia coli*. Springer International Publishing; p. 181-211. 2018.
4. Control ECfDPa. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2016. Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). In: ECDC, editor. Stockholm.2017.
5. Kanabalan RD, Lee LJ, Lee TY, Chong PP, Hassan L, Ismail R, et al. Human tuberculosis and *Mycobacterium tuberculosis* complex: A review on genetic diversity, pathogenesis and omics approaches in host biomarkers discovery. *Microbiological Research.*246:126674. 2021.
6. Džidić S, Šušković J, Kos B. Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: Biochemical and genetic aspects. *Food Technology and Biotechnology.*46:11-21. 2008.
7. Kapoor G, Saigal S, Elongavan A. Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. *J Anaesthesiol Clin Pharmacol.*33(3):300-5. 2017.
8. Taylor SD, Palmer M. The action mechanism of daptomycin. *Bioorganic & Medicinal Chemistry.*24(24):6253-68. 2016.
9. Theuretzbacher U. Global antibacterial resistance: The never-ending story. *J Glob Antimicrob Resist.*1(2):63-9. 2013.
10. Miller WR, Murray BE, Rice LB, Arias CA. Vancomycin-Resistant Enterococci: Therapeutic Challenges in the 21st Century. *Infect Dis Clin North Am.*30(2):415-39. 2016.
11. Lermينياux NA, Cameron ADS. Horizontal transfer of antibiotic resistance genes in clinical environments. *Can J Microbiol.*65(1):34-44. 2019.
12. A. Shaaban H. Essential Oil as Antimicrobial Agents: Efficacy, Stability, and Safety Issues for Food Application. IntechOpen; p. 2020.
13. Julian Davies, Davies D. Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.*74(3):417-33. 2010.
14. Bruna T, Maldonado-Bravo F, Jara P, Caro N. Silver Nanoparticles and Their Antibacterial Applications. *International Journal of Molecular Sciences.*22(13):7202. 2021.
15. Vazquez-Muñoz R, Meza-Villezcás A, Fournier PGJ, Soria-Castro E, Juárez-Moreno K, Gallego-Hernández AL, et al. Enhancement of antibiotics antimicrobial activity due to the silver nanoparticles impact on the cell membrane. *PLOS ONE.*14(11):e0224904. 2019.
16. Mayer EA, Savidge T, Shulman RJ. Brain–Gut Microbiome Interactions and Functional Bowel Disorders. *Gastroenterology.*146(6):1500-12. 2014.
17. Galland L. The Gut Microbiome and the Brain. *Journal of Medicinal Food.*17(12):1261-72. 2014.
18. Virili C, Stramazzo I, Centanni M. Gut microbiome and thyroid autoimmunity. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism.*35(3):101506. 2021.
19. Talebi Bezmin Abadi A, Rizvanov AA, Haertlé T, Blatt NL. World Health Organization Report: Current Crisis of Antibiotic Resistance. *BioNanoScience.*9(4):778-88. 2019.
20. Ayandele AA, Oladipo EK, Oyebisi O, Kaka MO. Prevalence of Multi-Antibiotic Resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella* species obtained from a Tertiary Medical Institution in Oyo State, Nigeria. *Qatar Med J.*2020(1):9-. 2020.



21. Jovanka L IC, Goran T, Sava P, Slavica S, , Tamara CG LK. In vitro antibacterial activity of essential oils from plant family Lamiaceae. Romanian Biotechnological Letters.16(2):6034-41. 2011.
22. Pierozan MK, Pauletti GF, Rota L, Santos ACAD, Lerin LA, Di Luccio M, et al. Chemical characterization and antimicrobial activity of essential oils of salvia L. species. Ciência e Tecnologia de Alimentos.29(4):764-70. 2009.
23. Carneiro NS, Alves CCF, Alves JM, Egea MB, Martins CHG, Silva TS, et al. Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of essential oils from leaves and flowers of Eugenia klotzschiana Berg (Myrtaceae). Anais da Academia Brasileira de Ciências.89(3):1907-15. 2017.
24. NCLS M100-S12. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing.. , 2002.

## LISTA CU LUCRĂRILE ȘTIINȚIFICE PUBLICATE

### A. Lucrări indexate ISI/BDI

#### Lucrări indexate ISI

**1. Blejan IE**, Popa DE, Costea T, Cioacă A, Olariu L, Ghica M, Georgescu M, Stancov G, Arsene AL. The *in vitro* antimicrobial activity of some essential oils from aromatic plants. Farmacia. 2021; 69(2): 290-298, <https://doi.org/10.31925/farmacia.2021.2.14>, IF=1.35/2021.

**2. Blejan IE**, Diaconu CC, Arsene AL, Udeanu DI, Ghica M, Drăgănescu D, Burcea Dragomiroiu GTA, Rădulescu M, Maltezou HC, Tsatsakis AM, Papasavva M, Drakoulis N, Popa DE. Antibiotic resistance in community acquired pneumonia. A Romanian perspective. Farmacia.2020;68(3):512-520, <https://doi.org/10.31925/farmacia.2020.3.17>, IF= 1.433/2020.

**3.** Arsene AL, Dumitrescu IB, Drăgoi CM, Udeanu DI, Lupuliasa D, Jinga V, Drăgănescu D, Dinu-Pîrvu CE, Burcea Dragomiroiu GTA, **Blejan IE**, Moisi RE, Nicolae AC, Moldovan H, Popa DE, Velescu BS, Ruță S. A new era for the therapeutic management of the ongoing COVID-19 pandemic. Farmacia. 2020; 68(2):185-196, <https://doi.org/10.31925/farmacia.2020.2.1>, IF=1,527/2018.

**4. Blejan IE**, Arsene AL. The Antibacterial Mechanisms of Silver Nanoparticles. Proceedings of the Romanian National Congress of Pharmacy 17th Edition “21<sup>st</sup> Century Pharmacy – Between Intelligent Specialization and Social Responsibility”. Filodirito International: Bologna, 2018; 35-38, [ISBN: 978-88-85813-28-1].

### **Lucrări indexate BDI:**

**5. Blejan IE**, Arsene AL, Drăgănescu D. Profilaxia complicațiilor postantibioterapie. Noi perspective. Farmacist.ro. 2020; An XVII, 196(5), DOI: 10.26416/Farm.196.5.2020.

**6. Blejan IE**, Arsene AL. Efectele antibacteriene ale nanoparticulelor de argint. Mecanisme de acțiune. Farmacist.ro. 2018; An XV, 183(3), DOI: 10.26416/FARM.183.3.2018.1964.

### **B. Lucrări publicate în reviste și volume de conferințe cu referenți (neindexate)**

#### **Reviste**

**1. Blejan IE**, Ciupitu G, Arsene AL. Connecting the Customer Experience Concept with Pharmaceutical Care for Improving the Healthcare Status of Patients. Proceedings of the International Conference Innovative Business Management & Global Entrepreneurship, 2020, Warsaw, Poland, DOI: <https://doi.org/10.18662/lumproc/ibmage2020>.

#### **Lucrări publicate în rezumat, în volume de conferințe**

**2.** Arsene AL, **Blejan IE**, Moisi RE. The toxicity of silver nanoparticles: autophagy impairment. Archives of the Balkan Medical Union– Suppl 2019, 22nd Balkan Medical Days, 2019, Kyrenia – Cyprus.

**3.** Moisi RE, **Blejan IE**, Arsene AL. Survey regarding the integration of vaccination in community pharmacies. Archives of the Balkan Medical Union– Suppl 2019, 22nd Balkan Medical Days, 2019, Kyrenia – Cyprus.

**4. Blejan IE**, Stoilescu M, Ilie M. Trends in identification and fight against counterfeit Medicines. From law to practical approach. Romanian Medical Journal, Suppl, 2017, 9<sup>th</sup> Annual Congress of Romanian Medical Association, 2017, Bucharest, Romania.