



UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
"CAROL DAVILA"
BUCUREȘTI

TEZĂ DE DOCTORAT



REZUMAT

CONDUCĂTOR DE DOCTORAT:

Prof. Univ. Dr. Farm. DUMITRU LUPULEASA

FARMACIST SPECIALIST- DOCTORAND:

ABBAS HAZEM

BUCUREȘTI

2019

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

**OBȚINEREA UNOR PREPARATE
MEDICAMENTOASE DE UZ TOPIC DESTINATE
INFECȚIILOR CAUZATE DE
VIRUSURILE PAPILOMA UMANE
- REZUMAT -**

Conducător de doctorat:

Prof. Univ. Dr. Farm. DUMITRU LUPULEASA

**Farmacist specialist- doctorand:
ABBAS HAZEM**

- 2019 -

CUPRINS

INTRODUCERE

ABREVIERI

A. PARTEA GENERALĂ

CAPITOLUL I

PROPOLISUL - PRODUS APICOL CU EFECTE BENEFICE PENTRU SĂNĂTATE

Propolisul, sursă naturală de componente active cu acțiune biologică complexă	pg. 1
1.1. ACȚIUNEA PROPOLISULUI CA AGENT CHEMOPREVENTIV	pg. 2
1.1.1. Proprietățile farmacologice ale propolisului ca agent chemopreventiv	pg. 2
1.1.2. Propolisul - activitate antivirală și antibacteriană	pg. 3
1.1.3. Propolisul și activitatea antitumorală	pg. 4
1.1.4. Propolisul și componentul activ - esterul acidului cafeic (CAPE)	pg. 5
1.1.5. Propolisul - cu rol de scavenger de radicali liberi superoxidici (ROS)	pg. 8
1.1.6. Propolisul - modulator și stimulent al sistemului imunitar	pg. 8
1.1.7. Propolisul activitate antiinflamatoare și de refacere a țesutului lezat	pg.10

CAPITOLUL II

COMPUȘII NATURALI, FLAVONOIDELE - AGENȚI CHEMOPREVENTIVI

2.1. Agenții chemopreventivi - compuși naturali cu acțiune antitumorală	pg.13
2.1.1. Agenții chemopreventivi - ca inhibitori ai formării carcinogenilor	pg.14
2.1.2. Agenții blocați - inhibitori ai inițierii tumorilor	pg.14
a. Agenți blocați - ca inhibitori ai citocromului P450	pg.14
b. Agenți blocați - ca inductori ai enzimelor fazei a II-a de metabolizare a xenobioticelor	pg.15
c. Agenți blocați - ca agenți antioxidanți	pg.15
d. Agenți blocați - ca inhibitori ai metabolismului acidului arahidonic	pg.15
e. Agenți blocați - ca inductori ai diferențierii celulare	pg.15
f. Agenți blocați - modulatori ai semnalizării celulare	pg.16
g. Agenți blocați - modulatori ai sistemului imun și stimulatori ai apoptozei	pg.16
2.2. Proprietățile biologice ale flavonoidelor	pg.16
2.2.1. Flavonoidele ca fitonutrienți, modificatori naturali ai răspunsului biologic	pg.16
2.2.2. Activitatea antimicrobiană a unor flavonoizi	pg.17
2.2.3. Activitatea antioxidantă a flavonoidelor	pg.18

2.2.4. Acțiunea benefică a flavonoidelor în unele afecțiuni	pg.19
2.2.5. Activitatea antitumorală a flavonoidelor	pg.20
2.3. Proprietățile biologice ale quercetinei - important agent chemopreventiv	pg.21
2.3.1. Activitatea antioxidantă a quercetinei	pg.22
2.3.2. Activitatea antiinflamatoare a quercetinei	pg.24
2.3.3. Activitatea antineoplazică a quercetinei	pg.24
2.3.4. Quercetina și apoptoza	pg.24
2.3.5. Quercetina și activitatea antivirală	pg.25

CAPITOLUL III

VIRUSURILE PAPILOMA UMANE (HPV) - IMPLICATE ÎN TRANSFORMAREA ONCOGENĂ A CELULELOR NORMALE

3.1. Cauzele infecțioase ale malignizării - Considerații generale	pg.26
3.2. Transformarea celulară indusă de virusuri	pg.27
3.3. Date generale despre virusurile <i>Papilloma umane</i> (HPV)	pg.28
3.4. Biologia virusului Papilloma uman (HPV)	pg.32
3.5. Etapele ciclului infecțios ale virusului <i>Papilloma uman</i>	pg.35
3.6. Tipurile virusurilor <i>Papilloma umane</i> și manifestările lor clinice	pg.36
3.7. Carcinogeneza indusă de virusul <i>Papilloma uman</i>	pg.40
3.8. Formele clinice de cancer asociate cu HPV	pg.43
3.9. Epidemiologia infecției cu HPV	pg.46
3.10. Factorii de risc în infecția virusului <i>Papilloma uman</i>	pg.47
3.11. Diagnosticul și tratamentul în infecțiile HPV	pg.50

CAPITOLUL IV.

ACICLOVIR - AGENT CHIMIOTERAPIC ANTIVIRAL

4.1. Acicloguanozina sau Aciclovir și structura sa chimică	pg.56
--	-------

CAPITOLUL V.

BIOFILMUL MICROBIAN - FORMĂ DE REZISTENȚĂ A MICROORGANISMELOR FAȚĂ DE AGENȚII ANTIMICROBIENI

5.1. Biofilmul microbial - forma de organizare și comunicare a bacteriilor	pg.59
5.2. Formarea biofilmului microbial	pg.61
5.3. Dezvoltarea biofilmului microbial	pg.63
5.4. Rolul matricei extracelulare	pg.66
5.5. Proprietățile bacteriilor care formează biofilmul	pg.67
5.6. Comunicarea bacteriană în biofilme	pg.68

CERCETĂRI PERSONALE

B. PARTEA EXPERIMENTALĂ

OBȚINEREA UNOR PRODUSE MEDICAMENTOASE DE UZ TOPIC DESTINATE INFECȚIILOR CAUZATE DE VIRUSURILE *PAPILLOMA* UMANE

SCOPUL ȘI OBIECTIVELEpg.72

B1. PROPRIETĂȚILE FIZICO-CHIMICE ȘI MICROBIOLOGICE ALE MATERIILOR PRIME - EXTRACTUL DE PROPOLIS 30% - *materie primă*

CAPITOLUL VI

EXTRACTUL DE PROPOLIS 30% - *materie primă* ȘI COMPONENTELE SALE BIOACTIVE pg.76

6.1. Prepararea extractului de propolis 30%, luat în studiupg.77

6.2. Fișa analitică a extractului de propolis 30% - folosit ca materie primăpg.81

6.3. Rezultate privind determinările fizico-chimice ale propolisuluipg.88

6.4. Activitatea antimicrobiană a extractului de propolis 30% - ca materie primăpg.90

Concluziipg.100

B2. PROPRIETĂȚILE BIOLOGICE ȘI MECANISMELE DE ACȚIUNE ALE EXTRACTULUI DE PROPOLIS 30% - *materie primă*.....pg.101

CAPITOLUL VII

EPECTELE ANTIVIRALE/ VIRUCIDE ALE UNOR EXTRACTE ALCOOLICE ȘI APOASE DE PROPOLIS DIN ORADEA - ROMÂNIA

7.1. Metode de lucrupg.102

7.2. Rezultatepg.106

7.2.1. Citotoxicitatea extractelor de propolispg.106

7.2.2. Evaluările morfologice ale efectului citopatic (ECP)pg.107

7.2.3. Pre-tratamentul celulelor urmat de inocularea virusuluipg.108

7.2.4. Post-tratamentul celulelor după inocularea virusuluipg.109

7.3. Discuțiipg.112

Concluziipg.115

CAPITOLUL VIII

ACTIVITATEA ANTIMICROBIANĂ A UNOR EXTRACTE DE PROPOLIS, BOGATE ÎN COMPUSI

DE TIP FLAVONOID

8.1. Activitatea antimicrobiană a extractului de propolis 30%, materie primăpg.117

• *Screening-ul* calitativ al sensibilității unor tulpini microbiene față de extractele de propolis cu potențială
acțiune antimicrobianăpg.120

• Testarea cantitativă a activității antimicrobiene în vederea determinării unor parametri cantitativi ai acțiunii antimicrobiene (CMI) pe tulpini microbienne de referință	pg.120
• Studiul influenței extractelor de propolis testate asupra dezvoltării de biofilme microbiene pe substrat inert	pg.121
8.2. Rezultate și Discuții	pg.122
8.2.1. Activitatea antibacteriană a extractelor de propolis	pg.123
8.2.2. Activitatea antifungică a propolisului	pg.128
Concluzii	pg.130

CAPITOLUL IX

ANALIZA DINAMICII DE PROLIFERARE A LINIEI DE CELULE TUMORALE A495 ÎN CULTURĂ *IN VITRO*, ÎN PREZENȚA EXTRACTULUI APOS DE PROPOLIS 30%

9.1. Materiale și metode	pg.132
9.2. Metode de lucru utilizate	pg.132
9.3. Rezultate și discuții	pg.133
9.3.1. Efectele extractului de propolis asupra proliferării și viabilității celulare	pg.133
9.3.2. Efectele extractului de propolis asupra dinamicii ciclului celular	pg.135
9.3.3. Efectele extractului hidrosolubil de propolis asupra dinamicii ciclului celular (histograme)	pg.137
9.4. Efectele tratamentului cu extractul apos de propolis asupra ultrastructurii celulelor tumorale A549	pg.138
9.5. Rezultate și discuții	pg.139
Concluzii	pg.144

CAPITOLUL X

STUDIUL MECANISMELOR DE ACȚIUNE AL EXTRACTELOR APOASE ȘI ALCOOLICE DE PROPOLIS ÎN CELULA INFECTATĂ CU HPV

10.1. Materiale și metode	pg.146
10.2. Rezultate obținute	pg.149
10.2.1. Compoziția compușilor activi ai extractelor testate de propolis	pg.149
10.2.2. Citotoxicitatea extractelor de propolis	pg.150
10.2.3. Efectul apoptotic al extractelor de propolis	pg.151
10.2.4. Metilarea promotorului genei DAPK	pg.152
10.2.5. Analiza expresiei ADN metiltransferazelor	pg.153
10.2.6. Analiza nivelurilor de expresie ale E7 HPV	pg.153
10.3. Discuții	pg.154

Concluzii	pg.155
-----------------	--------

CAPITOLUL XI

OBȚINEREA UNOR PRODUSE MEDICAMENTOASE PENTRU UZ TOPIC

11.3. Fișa analitică a produsului - Cremă cu extract de propolis în asociere cu Aciclovir	pg.160
---	--------

11.5. Fișa analitică a produsului - Gel cu extract de propolis în asociere cu Aciclovir	pg.165
---	--------

11.6. Eficacitatea antimicrobiană a produsului - Cremă cu extract de propolis în asociere cu Aciclovir	pg.168
--	--------

11.7. Rezultate privind eficacitatea antimicrobiană a produsului - Cremă cu extract de propolis în asociere cu Aciclovir	pg.173
--	--------

11.8. Eficacitatea antimicrobiană a produsului - Gel cu extract de propolis în asociere cu Aciclovir	pg.176
--	--------

11.8.4. Rezultate privind eficacitatea antimicrobiană a produsului - Gel cu extract de propolis în asociere cu Aciclovir	pg.178
--	--------

11.9. Rezultate privind studiul eficacității antimicrobiene a produselor de uz topic (comparativ) - Cremă și Gel cu extract de propolis în asociere cu Aciclovir	pg.181
--	--------

Concluzii	pg.185
-----------------	--------

CAPITOLUL XII

TESTE DE FARMACOTOXICOLOGIE ALE PRODUSELOR MEDICAMENTOASE

DE UZ TOPIC

12.1. Testarea iritației tegumentare ale produselor	pg.186
---	--------

12.4.1. Rezultatele obținute	pg.189
------------------------------------	--------

Concluzii	pg.189
-----------------	--------

CONCLUZII GENERALE	pg.190
---------------------------------	--------

BIBLIOGRAFIE	pg.194
---------------------------	--------

ANEXA I - REZULTATE EXPERIMENTALE PRIVIND EFICACITATEA ANTIMICROBIANĂ A EXTRACTULUI DE PROPOLIS 30%, materie primă.

ANEXA II - REZULTATE EXPERIMENTALE PRIVIND EFICACITATEA ANTIMICROBIANĂ A PRODUSELOR MEDICAMENTOASE OBȚINUTE:

1. CREMĂ CU EXTRACT DE PROPOLIS ÎN ASOCIERE CU ACICLOVIR

2. GEL CU EXTRACT DE PROPOLIS ÎN ASOCIERE CU ACICLOVIR

INTRODUCERE

Produsele apicole reprezintă o sursă importantă de compuși bioactive, cu multiple activități terapeutice și fără efecte nocive asupra celulelor și țesuturilor gazdei. Propolisul este un produs apicol cu dublă origine: vegetală și animală, fiind utilizat din cele mai vechi timpuri în medicina tradițională. Datorită compoziției chimice complexe, propolisul este considerat cel mai valoros produs apicol, prezentând o mare varietate de acțiuni terapeutice: antimicrobiene, antivirale, antioxidante, antitumorale, antiinflamatoare, imunomodulatoare, analgezice, epitelizante și regeneratoare.

Multă vreme s-a considerat că apariția cancerului are loc prin modificările genetice ale genomului celular, iar agenții cauzali ai acestor modificări sunt reprezentați de toxine sau provin din poluarea mediului ambiant. În prezent, s-au conturat și cauze infecțioase ale cancerului, fiind demonstrată asocierea unor infecții cu procesul de malignizare. Cauza principală infecțioasă a malignității o constituie unele virusuri oncogene, alături de infecțiile bacteriene care, pot să fie responsabile pentru dezvoltarea cancerului. Totodată, imunosupravegherea, inclusiv imunitatea anti-infecțioasă, are un rol semnificativ în prevenirea cancerului.

Chemoprevenția cancerului este considerată abordarea cea mai promițătoare pentru prevenirea, inhibarea sau suprimarea proceselor cancerigene prin intervenția cu produse naturale, mai ales că, un număr mare de medicamente tradiționale din plante și principiile lor bioactive, au fost raportate ca având proprietăți chemopreventive.

Agenții chemopreventivi - compuși naturali cu acțiune antitumorală, sunt substanțe care pot preveni, stopa sau reversa procesul de carcinogeneză [Mișcalencu D. și colab.(2010)]. Printre substanțele care au o acțiune de prevenire a cancerului, citați în literatura de specialitate, sunt compușii și complexele bioactive din plante precum: *flavonoidele*, vitaminele, carotenii, acizii fenolici (acidul ferulic, acidul galic, acidul cafeic) etc., unele dintre ele prezente și în propolis – un valoros produs apicol cu activitate chemopreventivă, care pot inhiba mecanismele biochimice și celulare legate de procesul de malignizare și de inducere a apoptozei [Ray A.(2005)].

De aceea, realizarea acestor produse pentru uz topic cu acțiune antivirală (HPV și VHS) s-a efectuat în etape, urmărindu-se:

- *în primul rând*, prepararea unui extract, bogat în polifenoli de tip flavonoid, componente hidrosolubile și hidroalcoolice din propolis pentru obținerea unui extract concentrat, bogat în polifenoli de tip flavonoid și,

• *in al doilea rând*, folosirea unor concentrații optime de combinare a extractului concentrat de propolis cu Aciclovir (chimioterapie de sinteză cu activitate antivirală cunoscută), în vederea preparării unor forme farmaceutice, în special, cu acțiune antivirală HPV și a cofactorului VHS, dar și cu proprietăți imunomodulatoare și antitumorale.

În felul acesta, am urmărit prepararea unui remediu sub diferite forme farmaceutice (creme, geluri etc.) cu proprietăți terapeutice și biodisponibilitate specifică infecțiilor cu HPV, cu risc crescut oncogen, din zona genitală și ano-rectală.

În **capitolul I** sunt descrise efectele profilactice și terapeutice ale propolisului în diferite tipuri de afecțiuni. *Propolisul* reprezintă una din cele mai mari provocări, atât pentru nutriționiști, cât și pentru lumea științifică medicală, fiind o *sursă naturală de componente active cu acțiune biologică complexă* (de exemplu, flavonoide, acizi aromatici, acizi fenolici și esterii, triterpene, acizi diterpenici și lignani), care posedă o paletă deosebit de largă de acțiuni terapeutice [Burdock G.A. (1998); Tahira Farooqui și Akhlaq A.Farooqui, (2010)].

Propolisul este utilizat ca supliment nutrițional, adjuvant în tratamentul cancerului, exercitând activitate antioxidantă, pro-apoptotică [Scheller S. și colab.(1990), Kimoto T. și colab.(1998); Nomura M.și colab. (2001)], activarea genelor supresoare tumorale p53 și p21 [Sawicka D. și colab.(2012); Ansoerge S. și colab.(2003)], inhibitoare a neoangiogenezei [Song Y.S.și colab.(2002)], imunomodulatoare [Banskota A.H. și colab.(2001); Suzuki și colab.(2002); Ansoerge S.și colab.(2003); Oršolić N. și colab.(2001)].

De asemenea, propolisul posedă activitate antiinflamatoare, ca inhibitor de ciclooxigenază (COX-2) [Olinescu R. (1991); Mirzoeva O.K., Calder P.C. (1996)], este un antibiotic și antiviral natural [Eșanu V. și colab.(1981); Shub T.A.și colab.(1981); Amoros M. și colab.(1994); Popova M.P. și colab.(2009)], regenerador tisular [Martinotti S., Ranzato E. (2013 și 2015)], protector față de efectele negative ale chimio- și radioterapici [Paulino N. și colab. (2009); Scheller S.și colab. (1989b)].

Capitolul II descrie mecanismele de acțiune antitumorală ale compușilor naturali ai propolisului, cu accent pe *flavonoide*, în general (Figura 1), cunoscute pentru efectele favorabile ale acestora asupra organismului: efecte antioxidante și/sau captarea radicalilor liberi, efecte antiinflamatorii și imunomodulatoare, modificarea sau inhibarea funcționării unor enzime ale metabolismului, activități antivirale și antibacteriene, efecte antitumorale, hepato- și vasculo-protectoare și *quercetină*, în particular. *Quercetina este un flavonoid cunoscut ca un puternic*

antioxidant, iar împreună cu alte flavonoide, este un *chemopreventiv* mai eficient decât resveratrolul, un alt antioxidant foarte puternic. În multe privințe, quercetina este considerată, drept cel mai important flavonoid studiat ca agent chemopreventiv.

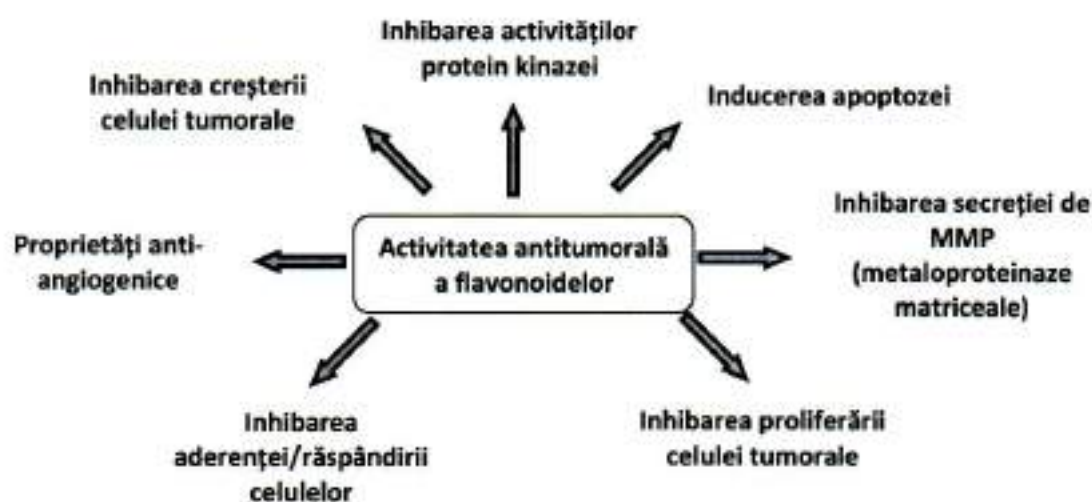


FIGURA Nr. 1 Activitatea antitumorală a flavonoidelor¹

Sunt prezentate mecanismele care stau la baza *activității antioxidante a quercetinei*, un inhibitor competitiv al enzimei lipoxigenaza [Hou L. și colab. (2004)], *antiinflamatoare*, care se datorează efectelor inhibitorii pe care le exercită asupra ciclooxigenazei (COX-2), lipoxigenazei, leucotrienelor și prostaglandinelor și a inhibării degranulării mastocitelor și a bazofilelor [O'Leary K.A. și colab., (2004)], *antineoplazice*, atribuită influenței sale asupra sistemului de detoxifiere exprimată în nivelul de glutatation, glutatation-S-transferază, glutatation-peroxidază, catalază și superoxid-dismutază [De S., Chakraborty J. și colab. (2000)] și a efectului pro-apoptotic [Borcka S. și colab. (2004)], *antivirale* (demonstrată prin inhibarea replicării HSV-1, virusul polio tip 1, virusul parainfluenza tip 3 și a virusului respirator sincițial) [Middleton E. Jr., Kandaswami C., Theoharides T.C.(2000)]. Asocierea cu flavonoidele: quercetină, quercitrină și apigenină potențează activitatea antivirală a aciclovirului [Mucsi I., Gyulai Z., Beladi I. (1992)].

Capitolele III, IV și V prezintă modele experimentale utilizate în partea originală a tezei.

În capitolul III este prezentat modelul experimental viral, respectiv virusul *HPV (Virusul Papilloma Uman)*. Sunt prezentate mecanismele oncogenezei virale, definită ca un ansamblu de

¹ după Shashank Kumar, Abhay K. Pandey (2013)

modificări ale funcțiilor biologice celulare ce rezultă prin dereglarea funcțiilor celulei gazdă de către genele virale, conferindu-i celulei infectate anumite proprietăți caracteristice neoplaziei. Deseori, aceste modificări rezultă în urma integrării genomului viral în genomul celulei gazdă, conducând frecvent la pierderea controlului creșterii celulare, invazia matricei extracelulare, dediferențierea și apariția unor aberații cromozomiale.

Ulterior, sunt prezentate structura, organizarea genomului (Figura 2), ciclul de multiplicare și etapele infecției cu HPV (Figura 3), tipurile de infecții produse, mecanismele carcinogenezei cu HPV, epidemiologia, factorii de risc, diagnosticul, tratamentul și profilaxia infecției HPV.

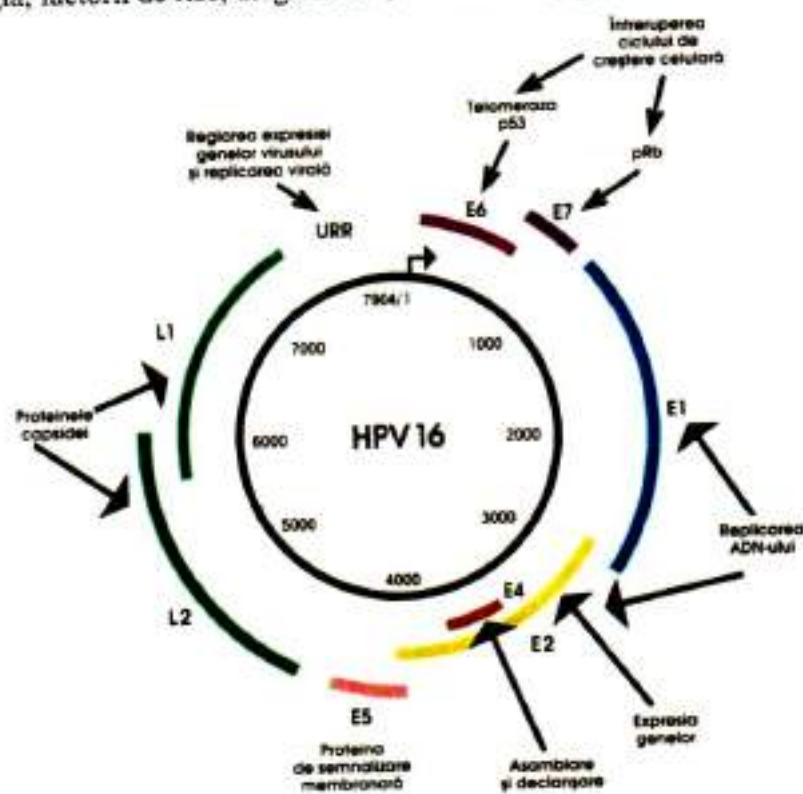


FIGURA Nr. 2 Organizarea genomului HPV-16, virus cu risc oncogen crescut²

Situsul inițial al infecției HPV îl reprezintă fie *celulele bazale*, fie *celulele primitive "basal-like" ale epitelului scuamos imatur*, datorită prezenței unor receptori specifici pentru HPV pe membrana celulară a acestui tip de celule. HPV poate exista în celulele bazale în două stări biologice diferite: i) *infecția virală neproductivă (latentă)*, în care ADN-HPV continuă să fie prezent în

² după Goodman și Wilbur, 2009

celulele bazale, fără a fi produși virioni cu potențial infecțios; ii) **infecția virală productivă**, în care replicarea ADN-viral apare independent de sinteza ADN-cromozomial al celei gazdă, ce permite formarea unor mari cantități de virioni intacti, care determină efecte citopatice caracteristice infecției HPV, efecte care pot fi detectate citologic și histologic (acantoză, vacuolizarea citoplasmatică, koilocitoză, multinuclearea și atipiile nucleare) [Wright T.C. și colab.(2002)].

Proteinele virale timpurii E6 și E7 sunt absolut necesare în procesul de cancerizare prin activitatea lor antiapoptotică, împiedicând moartea celulelor transformate neoplazic, dereglarea ciclului celular normal prin inactivarea anti-oncogenelor (*p53*, *pRb*). Proteinele **structurale L** pot interfera cu metabolismul celular, favorizând transformarea neoplazică a celei gazdă [Mișcalencu D. și colab.(2002)] (Figura 4).

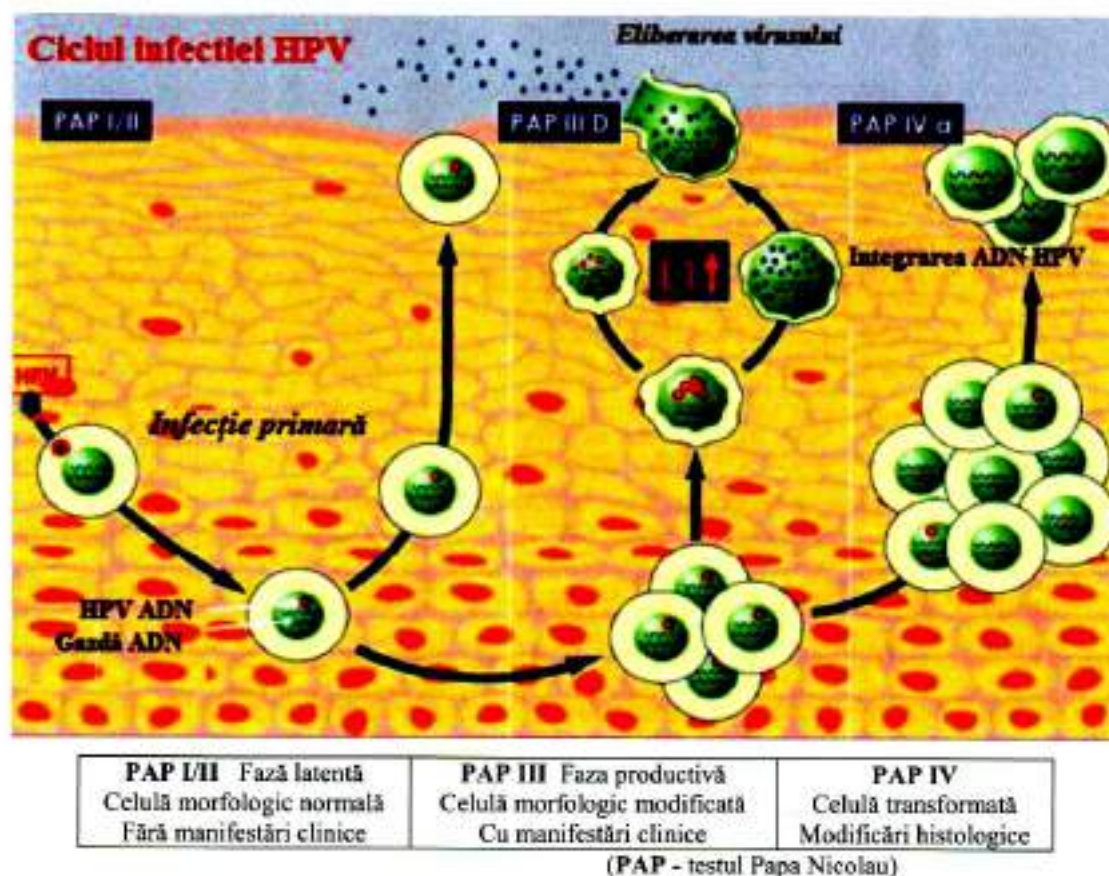


FIGURA Nr. 3 Etapele ciclului infecțios ale virusului *Papilloma uman*¹

Legenda:

infecția primară cu HPV a celei bazale epiteliale; celula infectată conține ADN celular și ADN HPV; integrarea ADN HPV în celula infectată; eliberare de virioni

¹ după Ralf Hilfrich (2013)

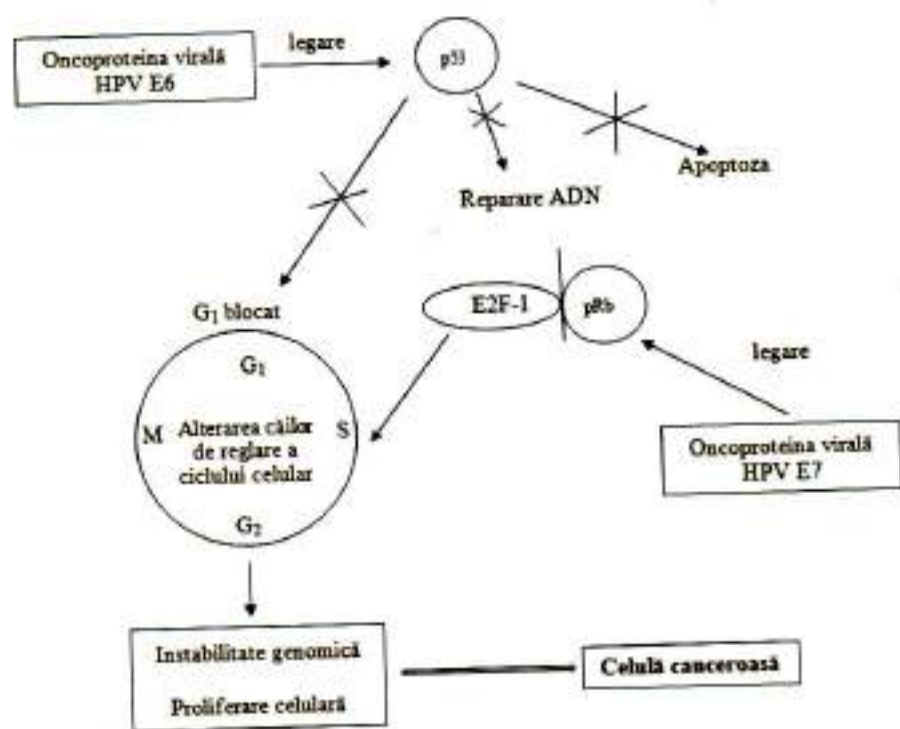


FIGURA Nr. 4 Mecanismele moleculare ale infecției virusului oncogen *Papilloma uman*⁴

Legenda: oncoproteine virale E6 și E7 leagă p53 și pRb - proteine supresoare tumorale; E2F - factor de transcripție cu rol în progresia ciclului celular; alterarea căilor de reglare ale ciclului celular prin blocarea G₁ (G₁-perioada postmitotică; G₂-perioada premitotică; S-perioada sintetică; M-perioada mitotică); blocarea reparării ADN; blocarea apoptozei; instabilitatea genomică; proliferarea celulară; celula canceroasă

Capitolul IV prezintă structura și mecanismele de acțiune ale *aciclovirului* (9-[(2-hidroxi-2-toksi)-metil]-guanină) - un agent chimioterapeutic important în chimioterapia antivirală.

Capitolul V prezintă modelul experimental microbial utilizat, reprezentat de celule microbiene în fază de creștere aderată, sub formă de biofilme.

Biofilmul reprezintă o comunitate structurată de microorganisme sesile, aderentă ireversibil la o suprafață vie sau inertă, care își dezvoltă o matrice extracelulară de substanțe polimerice (EPS) și prezintă un fenotip modificat cu privire la rata de creștere și transcripție a genelor [Zarnea G., Popescu O.V. (2011)]. **Biofilmele pot fi produse nu numai de bacterii Gram pozitive și Gram negative, ci și de fungi filamentoși și levuriformi, inclusiv de dermatofiți.** Biofilmele sunt implicate într-o varietate largă de infecții microbiene în organism (un procent de 80% din totalul infecțiilor la

⁴ după D.T.Gómez, J.L.Santos (2007)

om), în mare parte produse de bacterii oportuniste (infecții ale tractului urinar și infecții de cateter, endocardită, infecții de plagă, infecțiile din fibroza chistică și infecții ale dispozitivelor permanente) [Lewis K.(2001); Parsek M.R., Singh P.K.(2003); Davis S.C. și colab.(2008)].

Sunt descrise etapele formării biofilmului (Figura 5), mecanismele rezistenței la substanțe antimicrobiene, rolul mecanismului de comunicare intra- și intercelulară mediată de mecanismul de "quorum-sensing and response" în formarea biofilmului.

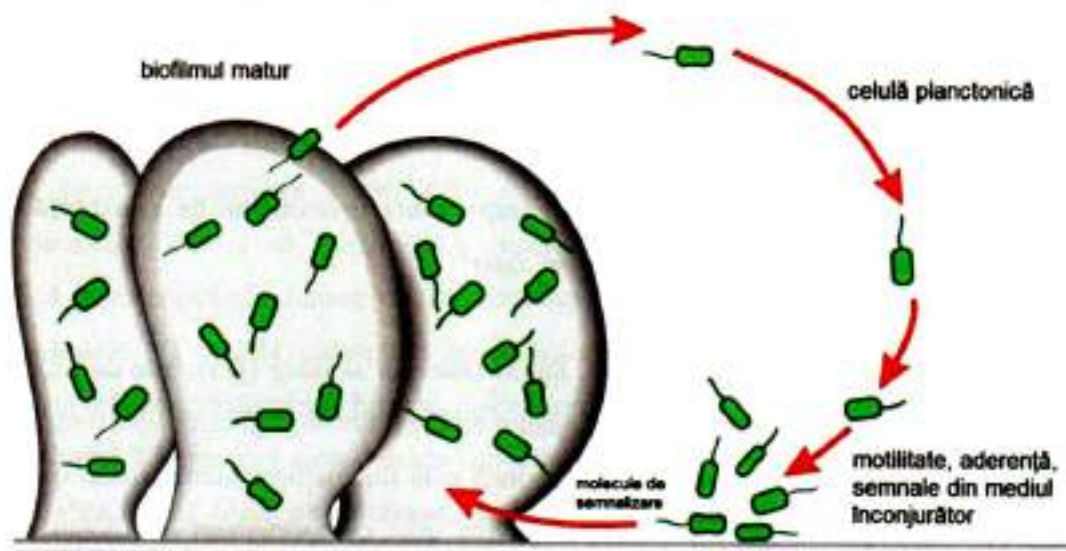


FIGURA Nr. 5 Biofilmul matur microbial⁵

Matricea biofilmului protejează celulele în cazul expunerii la radiații UV, soluții acide, deshidratare, salinitate excesivă, fagocitoză și agenți antimicrobieni, făcând posibilă rezistența la cele mai ostile condiții de mediu [Stoodley L. și colab. (2002)]. S-a estimat că bacteriile incluse în biofilme sunt de 20-1000 de ori mai rezistente la acțiunea antibioticelor, comparativ cu bacteriile planctonice [Thomas J., Nakaishi L. (2006)].

Cauzele rezistenței fenotipice sau a toleranței biofilmelor la antibiotice sunt insuficient elucidate și, includ: efectul de barieră al EPS, care inhibă pătrunderea antibioticelor în interiorul biofilmului; acumularea în matricea biofilmului a enzimelor (de exemplu: beta-lactamaze) care degradează antibioticele; diferențierea unor fenotipuri rezistente și a unor *populații persister* în biofilm (Figura 6).

⁵ după Marié S., Vraneș J. (2007)

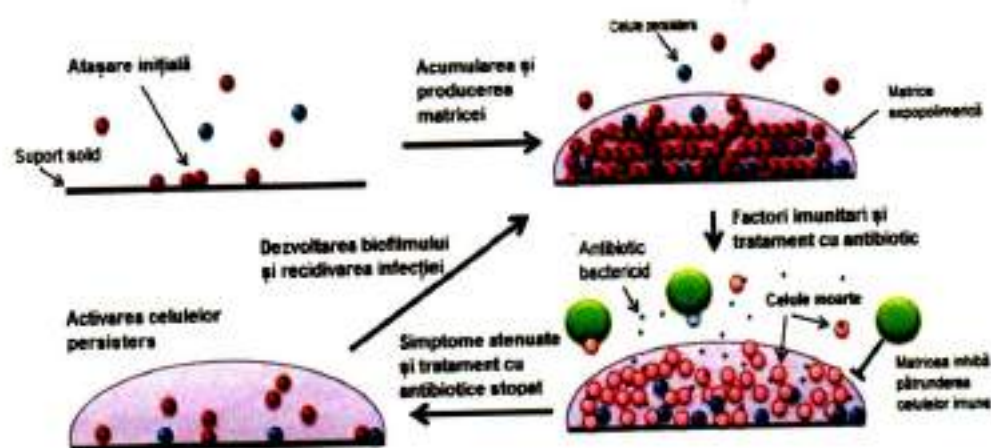


FIGURA Nr. 6. Unul dintre cele mai importante mecanisme de rezistență a celulelor bacteriene din biofilm - *prezența celulelor persister*⁶

Sistemul de semnalizare intercelulară, numit *Quorum sensing (QS)*, este un proces prin care permite microorganismelor să monitorizeze mediul înconjurător în legătură cu prezența altor bacterii sau fungi și, pe de altă parte, le permite să răspundă și la fluctuații ca număr și/sau specii prezente, prin modificarea expresiei genelor pentru obținerea unui comportament coordonat al populației microbiene care se găsește în biofilm. Sistemele microbiene de comunicare reprezintă în prezent ținta pentru dezvoltarea de noi strategii optime privind intervenția terapeutică în lupta continuă și permanentă de control asupra agenților patogeni microbieni [Shadaba Asad, Steven M. Opal (2008)].

Partea experimentală a tezei de doctorat cuprinde **contribuțiile personale** privind obținerea unor produse medicamentoase de uz topic (creme/geluri), destinate tratamentului infecțiilor cauzate de virusurile *Papilloma umane (HPV)*.

Scopul tezei de doctorat este prepararea unor produse medicamentoase sub diferite forme farmaceutice cu administrare topică (creme și geluri) pentru asigurarea unor proprietăți optime de prevenire, combatere și biodisponibilitate farmacologică specifică în cazul infecțiilor cu HPV, cu risc oncogen crescut, care se pot dezvolta în zona genitală și ano-rectală, dar și la nivelul oro-laringelui și al oro-faringelui.

Realizarea acestor produse se bazează, atât pe *terapia biologică*, modalitate terapeutică modernă în prevenirea și combaterea infecțiilor cauzate de HPV, cât și pe *chemoprevenția în*

⁶ după Lebeaux David, Ghigo J.M., Beloin Ch. (2014)

profilaxia bolii canceroase, o abordare nouă legată de prevenirea, inhibarea sau suprimarea proliferării neoplazice prin *intervenția cu produse naturale și/sau în asociere cu substanțe chimice de sinteză cu acțiune antivirală cunoscută*.

Rezultatele indică faptul că atât VHS-2, cât și HPV pot fi asociate în cancerul cervical, însă mecanismele implicate sunt diferite. Aceste virusuri pot acționa sinergic în dezvoltarea carcinomului cervical [Jones Clinton, (1995)]. De aici și ipoteza combinării unui chimioterapic de sinteză - agentul antiviral **ACICLOVIR**, folosit în terapia curentă pentru reducerea multiplicării VHS-2 și dezvoltarea locală a leziunilor herpetice, *cu un produs apicol - activ antiviral, cu proprietăți imunomodulatoare* – **PROPOLISUL** [Tahira Farooqui și Akhlaq A.Farooqui, (2010)], care ar putea să determine stoparea multiplicării virale a HPV, dezvoltarea locală a leziunilor și reepitelizarea lor, dar și să manifeste o influență pozitivă asupra mecanismelor de apărare nespecifică ale organismului împotriva agresiunii agenților virali.

Capitolele VI – XII corespund obiectivelor propuse, fiecare prezentând materialele și metodologia utilizate, rezultatele obținute, discuțiile și concluzii.

Capitolul VI prezintă metodologia utilizată pentru obținerea rezultatelor corespunzătoare **primului obiectiv al tezei de doctorat**, reprezentat de *studiul proprietăților fizico-chimice și biologice ale extractului concentrat de propolis 30%* utilizat. Metodologia utilizată a inclus prepararea extractului de propolis 30%, folosit ca materie primă; determinarea conținutului în polifenoli totali și flavonoide totale; caracterizarea fizico-chimică și microbiologică ale acestuia; eficacitatea antimicrobiană a extractului de propolis 30% - materie primă. Conținutul în polifenoli totali, exprimați în acid cafeic/clorogenic, %, min. și în flavonoide, exprimate în rutin/quercetină, %, min., a fost determinat cu ajutorul metodelor de analiză fizico-chimice în conformitate cu Farmacopeea Europeană, ediția IX în vigoare și Farmacopeea Română ediția X. Pentru identificarea polifenolilor și a flavonoidelor s-a utilizat metoda HPLC, folosindu-se următoarele soluții de referință (PhytoLab Sigma): apigenin, kaempferol, luteolin, acid clorogenic, acid ferulic, rutin, p-cumarin, apigenin-7-glucozide, quercitin, acid cafeic, catechin, catechin hidrate, acid cinnamic, acid galic, epicatechin, cianidin-3-glucozide, acid tanic, quercitin 3-glucozide, acid 3-carboxi cumarinic, isoquercitroside, cinarina.

Controlul contaminării microbiene și al eficacității antimicrobiene ale extractului de propolis 30% - materie primă s-a realizat prin metode standardizate, din Farmacopeea Europeană, ediția IX în vigoare.

Rezultatele susțin, pe de o parte, că *extractul concentrat de propolis 30% obținut este bogat în constituenți bioactivi* (polifenoli și flavonoide) și, pe de altă parte, prezența acestor componente bioactive are influență asupra proprietăților biologice testate.

Prin metoda HPLC, analiza compoziției chimice a extractului concentrat de propolis 30% scoate în evidență că, *propolisul este un amestec complex de substanțe naturale, în cea mai mare parte de tip flavonoid*, care îi conferă un spectru larg de activități biologice cu potențial terapeutic ridicat.

Capitolul VII prezintă rezultatele *studiului efectelor antivirale/virucide ale unor extracte alcoolice și apoase de propolis din zona Oradea - România*, studiu care a demonstrat că pre-/post-tratamentul cu extracte de propolis la concentrații non-citotoxice nu asigură protecție antivirală pentru toate tulpinile virale testate, iar extractele alcoolice/apoase îmbogățite în acizi clorogenici și cafeici posedă un efect puternic antiviral.

Au fost utilizate culturi de celule aderente (HeLa [ATCC® CCL-2™], MG63 [ATCC® CRL-1427™]) menținute la 37°C în atmosferă de CO₂ 5%, în mediu de cultură DMEM/F12 (Sigma), 10% ser fetal bovin (Sigma) și 400 UI/mL penicilină, 200 μg/mL streptomycină. Pentru evaluarea efectului citotoxic s-au utilizat diferite concentrații netoxice ale extractelor de propolis, stabilite anterior acestui experiment. Din acest motiv, pentru testarea efectului citotoxic s-a utilizat kitul CellTiter 96® Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay și tehnica trypan blue pentru stabilirea numărului de celule viabile.

În vederea testării efectului citotoxic s-a utilizat tehnica creșterii celulelor în monostrat. Efectul extractelor de propolis asupra viabilității celulelor a fost stabilit în procente de celule viabile, comparativ cu proba martor.

În testările noastre s-au utilizat trei tulpini de virus: HSV-tip 1 (tulpina VR # 3), Varicella-Zoster și Adenovirus de tip 5 din colecția de referință a Institutului de Virologie "Ștefan S. Nicolau".

S-au efectuat următoarele tratamente: 1% extract apos de propolis 30%; 0,5% extract apos de propolis 50%; 0,06% tinctură de propolis 30%; 0,06% tinctura de propolis 50%; 0,16 mg/ml acid clorogenic; 0,25 mg/ml acid cafeic; 0,0078 mg/ml quercetină; 0,5 mg/ml Aciclovir. Experimentele au fost efectuate în triplicat pentru fiecare concentrație și fiecare extract de propolis.

Infectivitatea fiecărui virus analizat a fost determinată prin monitorizarea apariției și a evoluției efectului citopatic (ECP) și prin imunofluorescență. Ca atare, efectul citopatic (ECP) a fost monitorizat zilnic timp de o săptămână. Titrul infectant a fost calculat prin metoda Spearman

Karber.

Tratamentul cu extract de propolis s-a realizat înainte, după inocularea și în același timp cu inocularea virusului.

Capitolul VIII prezintă rezultatele *studiului activității antimicrobiene a unor extracte alcoolice și apoase 30 și 50%, bogate în compuși de tipul flavonoidelor*, care a pus în evidență caracteristicile microbicide și anti-biofilm ale extractelor de propolis testate.

Pentru testări s-au folosit următoarele tulpini de referință microbiene: *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* 25922, *Candida albicans* ATCC 10231.

Activitatea antimicrobiană a fost determinată printr-o metodă adaptată de difuzie a agarului și prin metoda microdiluării pentru evaluarea concentrațiilor minime de inhibare (MIC) și a eradicării biofilmului minim (MBEC).

Capitolul IX prezintă rezultatele *studiului dinamicii de proliferare a liniei de celule tumorale A495 în cultură in vitro, în prezența extractului apos de propolis 30%*, care a demonstrat inducerea de către propolis a unor alterări semnificative la nivelul ultrastructurii celulare, care conduc la moartea celulelor, fie prin necroză, fie prin apoptoză.

S-a utilizat ca material biologic linia celulară A549, de carcinom pulmonar, comercializată de ATCC (The American Type Culture Collection [număr de cod al liniei: ATCC® CCL-185™, iar ca metode determinarea densității celulare cu ajutorul unui hemocitometru Neubauer (Marienfeld); determinarea viabilității celulare cu soluție 1% albastru de tripan; celulele (diferitele variante de tratament, precum și martorul) au fost analizate și fotografiate la microscopul inversat marca Nikon, prevăzut cu cameră de fotografiat digitală (DCM 900). Pentru pregătirea probelor în vederea analizei ciclului celular prin citometrie în flux, a fost utilizat kitul *CycleTEST™PLUS DNA Reagent Kit*, produs de firma Becton-Dickinson (SUA) (nr.de catalog 340242).

Capitolul X. prezintă rezultatele *studiului mecanismelor de acțiune a extractelor apoase și alcoolice de propolis în celula infectată cu HPV*, realizat pe linii celulare imortalizate cu HPV cu risc ridicat, care demonstrează că, extractele de propolis și componentele sale exercită o gamă largă de proprietăți biologice în liniile celulare.

În acest studiu au fost utilizate liniile celulare standardizate CaSki (ATCC® CRL-1550™), HaCaT (CLS Cell Lines Service, 300493) și HeLa (ATCC® CCL-2™).

Viabilitatea celulară a fost evaluată cu albastru tripan. ADN a fost izolat din culturi celulare

utilizând metoda Miller, Dykes și Polesky modificată [Miller S.A. și colab. (1988)]. ARN-total a fost izolat din culturi celulare cu ajutorul kit-ului PureLink RNA Mini (Thermo Fisher Scientific). O cantitate de 50 ng cADN din fiecare probă au fost utilizate în fiecare reacție Real Time PCR, care s-a efectuat pe un sistem PCR ABI 7300 (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Nivelurile de expresie ale caspazei 3 (Hs00234387_m1), caspazei 7 (Hs00169152_m1), caspazei 9 (Hs00154261_m1) și GAPDH ca și control endogen au fost cuantificate utilizând kiturile de expresie genetică Taqman prevalidate (Applied Biosystems/Thermo Fisher Scientific). Datele de real-time PCR au fost analizate și expresia relativă a fost calculată prin metoda Cq (ciclul de cuantificare) $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak KJ, Schmittgen TD (2001)). Metoda *Direct Q-MSP* a fost utilizată pentru a evalua gradul de metilare a promotorului genei DAPK. Procentul de metilare a promotorului genei DAPK a fost calculat conform formulei: $\% M = 100 \times [\text{ng gena metilată A} / (\text{ng gena metilată A} + \text{gena nemetilată A})]$, unde ADN al genei țintă total a fost luat ca suma U + M. GraphPad v.5.0 a fost folosit pentru analiza statistică. Mann-Whitney (nonparametric) a fost utilizat pentru compararea cazurilor versus control, $p < 0,05$ pentru diferențe semnificative statistice.

Capitolele XI și XII prezintă rezultatele corespunzătoare *celui de al doilea obiectiv al tezei de doctorat, reprezentat de prepararea unor produse medicamentoase pentru uz topic (creme/geluri)*.

Capitolul XI prezintă metodologia de lucru și rezultatele privind *obținerea unor produse medicamentoase pentru uz topic cremă cu extract de propolis 30%, în asociere cu Aciclovir și Gel cu extract de propolis 30%, în asociere cu Aciclovir și caracterizarea lor fizico-chimică și microbiologică* privind eficacitatea antimicrobiană a celor două preparate.

Capitolul XII prezintă metodologia de lucru și rezultatele privind *testele de farmacotoxicologie ale produselor medicamentoase de uz topic analizate*. Testarea potențialului iritant la expunere cutanată repetată timp de 3 zile scoate în evidență că, cele două produse analizate determină iritație tegumentară încadrată ca Neglijabilă.

CONCLUZII

1. Principalele proprietăți bioactive ale *extractului de propolis* sunt atribuite *compușilor polifenolici de tip flavonoid* (compuși naturali larg răspândiți în regnul vegetal) a căror efecte se exercită la nivel celular prin *interacție cu un larg spectru de enzime celulare și lanțuri metabolice*.
2. Datorită *concentrației ridicate de flavonoide și polifenoli*, propolisul este un agent chemopreventiv ce poate acționa ca inhibitor al formării carcinogenilor și capacitatea de a modifica anumite reacții ale organismului față de acțiunea nocivă a unor contaminanți (virusuri, bacterii și substanțe carcinogene), fiind considerat "*modificator natural al răspunsului biologic*".
3. Testarea extractului concentrat de propolis 30% - folosit ca materie primă, a demonstrat că nu prezintă contaminare bacteriană sau fungică și are eficacitate antimicrobiană față de microorganismele – test utilizate în experimente: *Staphylococcus aureus; Pseudomonas aeruginosa; Aspergillus brasiliensis și Candida albicans*.
4. Extractul concentrat de propolis 30%, materie primă, contaminat forțat cu *Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, Aspergillus brasiliensis și Candida albicans* a redus numărul de celule microbiene în mod treptat începând cu 14 zile până la 21 zile de la contaminare.
5. Pre-/post-tratamentul cu extracte de propolis la concentrații non-citotoxice nu asigură protecție antivirală pentru toate tulpinile virale testate.
6. Ca agent virucidal, tinctura de propolis a arătat o activitate puternică anti-HSV și anti-VZV în contact direct cu virusurile analizate, similar cu cea a Aciclovirului, a acidului cafeic și clorogenic.
7. Extractul apos de propolis a fost mai puțin eficient față de HSV și VZV, chiar și în contact direct, dar a prezentat cel mai puternic efect inhibitor în pre-tratamentul celulelor infectate cu ADV5.
8. Toate rezultatele obținute indică următoarele: tinctura de propolis ca un posibil agent preventiv pentru contactul direct în infecția HSV/VZV; extractul apos de propolis ca un posibil agent preventiv pentru infecția cu ADV5 și, indirect, extractele alcoolice / apoase de propolis îmbogățite în acizi clorogenic și cafeic care pot avea efect puternic antiviral.
9. De aceea, caracterizarea compoziției chimice a propolisului din diferite regiuni ale țării

noastre și a acțiunilor sinergice ale componentelor sale este extrem de utilă pentru continuarea cercetărilor în vederea găsirii unor substanțe alternative și eficiente față de diferite virusuri.

10. Rezultatele cantitative ale testării activității antimicrobiene au evidențiat caracteristicile microbicide și anti-biofilm ale extractelor de propolis testate, demonstrând potențialul lor de a fi utilizate ca agenți antimicrobieni, ca adjuvanți pentru antibiotice curenți sau ca și conservanți în industria farmaceutică, cosmetică și alimentară.
11. În general, extractele apoase și alcoolice mai diluate (30%) au fost mai eficiente decât cele concentrate (50%), ceea ce demonstrează necesitatea unui mediu apos pentru solubilizarea compușilor cu acțiune antimicrobiană.
12. Valorile CMI obținute au relevat o mai bună acțiune față de bacteriile Gram-pozitive testate și față de tulpina de *Candida albicans*, comparativ cu tulpinile Gram-negative, rezultate ce confirmă alte studii din literatura de specialitate.
13. În majoritatea cazurilor, extractele apoase și alcoolice de propolis au manifestat o acțiune inhibitorie similară față de celulele microbiene în fază de creștere planctonică și aderată, ceea ce demonstrează efectul lor anti-biofilm și potențialul de utilizare în managementul infecțiilor cronice, asociate formării biofilmelor.
14. Extractul apos de propolis 30% testat afectează procesul de multiplicare a celulelor tumorale A549, de carcinom pulmonar și reduce semnificativ numărul celulelor viabile, comparativ cu martorul. Efectul este dependent de doza administrată în cultură și de timpul de acțiune al propolisului asupra celulelor.
15. Rezultatele obținute demonstrează că extractul apos de propolis testat a avut un efect negativ asupra celulelor tumorale în cultură, iar mecanismul prin care se exercită acest efect ar fi acela de amplificare a diviziunii celulare; deoarece celulele tumorale sunt instabile din punct de vedere genetic, creșterea ratei de multiplicare celulară este asociată cu o rată ridicată de moarte celulară.
16. Efectul final al acestui extract de propolis asupra celulelor tumorale a fost scăderea semnificativă a numărului total de celule, ca și a numărului celulelor viabile, în variantele de tratament comparativ cu martorul.
17. Cele mai interesante rezultate privind modificări ale ultrastructurii celulare sub influența extractului apos de propolis 30% s-au observat la concentrații mari (25%), unde acesta

induce alterări semnificative ale arhitecturii intracelulare. Apar nuclee cu forme atipice, cu invaginări mai profunde sau mai superficiale în masa nucleară; aspecte de fragmentare nucleară, ceea ce reflectă tendința de trecere la amitoza; zone de vacuolizare a citoplasmei, lizozomi/peroxizomi, incluzii lipidice. Au fost remarcate și celule în apoptoză.

18. Aceste rezultate demonstrează că, într-adevăr, extractul apos de propolis 30% testat are capacitate de a altera structura internă a celulelor tumorale, conducând la scăderea viabilității și a capacității de proliferare a acestor celule, și, în cele din urmă, la moartea lor, fie prin necroză, fie prin apoptoză.
19. Cel mai semnificativ efect citotoxic a fost observat în celulele HeLa ca urmare a tratamentelor cu tinctură de propolis care au condus la o viabilitate <40%, în corelație inversă cu nivelele de expresie ale caspazelor 7 și 9.
20. Extractele apoase de propolis au indus un răspuns limitat în liniile celulare CaSki și HaCaT (viabilitate >90%), în timp ce tincturile au diminuat viabilitatea la 75%. Acestea s-au corelat cu reducerea nivelurilor de expresie a caspazei-3, creșterea caspazei-7 în celulele CaSki și HaCaT tratate cu extract apos de propolis 30% și scăderea semnificativă a caspazelor-3 și 7 indusă de tratamentele cu tinctură de propolis 50%.
21. Tratamentele cu extract apos de propolis 50% (APE) și cu tincturi de propolis induc în linia de celule HeLa o creștere semnificativă a procentului de metilare a DAPK ($p = 0,0121$), în timp ce în liniile celulare HaCaT și CaSki creșterea este fără semnificație statistică ($p = 0,0186$, respectiv $p = 0,0778$).
22. În celulele HeLa tratate s-a observat scăderea semnificativă a nivelelor de expresie a ADN metiltransferazelor *de novo*, DNMT3a și DNMT3b, spre deosebire de CaSki și HaCaT, unde scăderea este puțin redusă.
23. Profilul de expresie al oncogenei virale E7 indus de diferitele tratamente a fost similar în ambele linii celulare imortalizate cu HPV, extractele apoase de propolis inducând creșterea nivelurilor oncogenei virale (efectul mai pronunțat în HeLa), iar tincturile de propolis inducând inhibarea acesteia, în special, la concentrații mai mari.
24. Profilul de expresie al oncogenei virale E7 indus de expunerea pe durată scurtă de timp (24h) la extractele de propolis s-a asociat cu scăderea viabilității celulare, acesta putând reprezenta mecanismul de acțiune al propolisului în celulele infectate cu HPV.
25. Cele două produse topice obținute, respectiv gel și cremă cu extract de propolis în asociere

cu Aciclovir au îndeplinit condițiile de acceptabilitate prevăzute de Farmacopeea Europeană, ediția IX în vigoare, privind contaminarea microbiană și eficacitatea antimicrobiană.

26. În condițiile experimentului privind testarea potențialului iritant la expunere cutanată repetată în cadrul evaluării conform OCD test 404, produsele testate determină iritație tegumentară încadrată ca Neglijabilă, în cazul expunerii repetate timp de 3 zile.

BIBLIOGRAFIE SELECTATĂ

- 1.- Adekunle O.O. (2012). Cervical intraepithelial neoplasia (CIN-squamous dysplasia); pp.279-310, in: *Intraepithelial Neoplasia*, Edited by Dr. Supriya Srivastava; Publisher InTech; (www.intechopen.com).
- 2.- Amoros M., Sauvager F., Girre L., Cormier M. (1992a). *In vitro* antiviral activity of propolis. *Apidologie*; Springer Verlag; 23(3):231-240.
- 3.- Amoros M., Lurton F., Bowwtie J. și colab. (1994). Comparison of the antiherpes simplex virus activities of propolis and 3-methylbu-2 enyl caffeate. *J. Nat. Prod.*, 57, pp.644-647.
- 4.- Ansorge S., Reinhold D., Lendeckel U. (2003). Propolis and some of its constituents down-regulate DNA synthesis and inflammatory cytokine production but induce TGF-beta1 production of human immune cells. *Z. Naturforsch.*, 58:580-589.
- 5.- Bankova V. (2005). Recent trends and important developments in propolis research. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2(1):29-32.
- 6.- Banskota A.H., Tezuka Y., Kadota S. (2001). Recent progress in pharmacological research of propolis; *Phytotherapy Research*, vol.15, nr.7; pp.561-571.
- 7.- Barroso P.R., Lopes-Rocha R., Pereira E.M.F., Marinho S.A. (2012). Effect of propolis on mast cells in wound healing; *Inflammopharmacology*; 20:289-294.
- 8.- Bassler B.L. (2002). Small talk. Cell-to-cell communication in bacteria. *Cell*; 109:421-424.
- 9.- Borcka S. și colab. (2004). The effects of quercetin vs. cisplatin on proliferation and the apoptotic process in A549 and SW1271 cell lines in *in vitro* conditions. *Folia Morphol. (Warsz)*, 63(1):103-105.
- 10.- Bryers James D. (2008). Medical biofilms; *Biotechnol. Bioeng.*; 100(1):1-18.
- 11.- Burdock G.A. (1998). Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (Propolis); *Food Chem. Toxicol.*, 36:347-363.
- 12.- Calistru P., Iftimovici R., Constantinescu I., Muțiu A.P. (2015). *Oncogeneza virală*; pag.3-90; Ed. Acad. Română, București.
- 13.- Chifiriuc M.C., Mihăescu G., Lazăr V. (2011). *Microbiologie și virusologie medicală*. Ed. Universității din București, pp.388-393.
- 14.- Costerton, J.W., Cheng, K.J., Gessey, G.G., Ladd, T.I., Nickel, J.C., Dasgupta, M., Marrie, T.J. (1987). Bacterial biofilms in nature and disease; *Ann. Rev. in Microbiology*, 41:435-464.

- 15.- Costerton J.W., Lewandowski Z., Caldwell D.E., Korber D.R., Lappin-Scott H.M. (1995). Microbial biofilms. *Ann. Rev. Microbiol.*; 49:pp.711-745.
- 16.- Crișan I., Muțiu A., Șahnazarov N., Cioca V., Eșanu V., Popescu A. (1976). The propolis effect on herpes viruses *in vitro*; Third International Symposium on Apitherapy, Bucharest, Apimondia.
- 17.- Crișan I., Dorobăț G., Cajal N. (1995). Efectele bacteriostatice și bactericide ale extractului hidrosolubil de propolis asupra unor bacterii Gram-pozitive și Gram-negative; Sesiunea științifică anuală a IVN.
- 18.- Davis S.C., Ricotti C., Cazzaniga A. et al. (2008). Microscopic and physiologic evidence for biofilm-associated wound colonization *in vivo*. *Wound Repair Regen.*; 16(1):23-29.
- 19.- De S., Chakraborty J. și colab. (2000). Chemopreventive activity of quercetin during carcinogenesis in cervix uteri in mice. *Phytother. Res.*, 14(5):347-351.
- 20.- Debiaggi M., Tateo F., Pagani L., Luini M., Romero E. (1990). Effects of propolis flavonoids on virus infectivity and replication. *Microbiologica*, 13, pp.207-221.
- 21.- Dobrowolski J.W., Vohora S.B. și colab. (1991). Immunomodulatory action of propolis. Influence on anti-infectious protection and macrophage function. *Apidologie*, 22(2):155-162.
- 22.- Eșanu V., Prahoveanu E., Crișan I., Cioca V. (1981). The effect of aqueous propolis extract on experimental influenza virus infection in mice, *Virologie*, 32, pp.213-215.
- 23.- Eșanu V., Prahoveanu E., Cioca V., Crișan I. (1982). The effect of aqueous propolis extract, of rutin and of quercetin mixture on experimental influenza virus infection in mice. *Revue Roumaine de Medecine, Virologie*, 37.
- 24.- Farooqui Tahira, Farooqui A.Akhlaq. (2010). Molecular mechanism underlying the therapeutic activities of propolis: A critical review; *Current Nutrition and Food Science*; 6(3):1-15.
- 25.- Fresco P., Borges F., Marques M.P.M., Diniz C. (2010). The anticancer properties of dietary polyphenols and its relation with apoptosis; *Current Pharmaceutical Design*; 16:114-134
- 26.- Fuqua C., Greenberg E. P. (1998). Self perception in bacteria: quorum sensing with acylated homoserine lactones. *Curr. Opin. Microbiol.*; 1:183-189.
- 27.- Gómez Daniel Tena, Santos Juana López (2007). Human Papillomavirus infection and cervical cancer: Pathogenesis and epidemiology; *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology A*. Méndez-Vilas (Ed); pp.680-688.
- 28.- Goodman A. (2000). Role of routine human papillomavirus subtyping in cervical screening, *Cur. Opin. Obstet. Gynecol.*, 12:11-14.

- 29.- Goodman A., D.C.Wilbur (2009). *Engl.J.Med.*, microbiologybytes.com@2009, MicrobiologyBytes.
- 30.- Hertzog D.I., Tica O.S. (2012). Molecular mechanism underlying the anticancerous action of flavonoids. *Current Health Sci.Journal*; vol.38, nr.4.
- 31.- Hilfrich Ralf (2013). HPV L1 detection as a prognostic marker for management of HPV high risk positive abnormal Pap smears; Chapter 4 in *Human Papillomavirus and related diseases from bench to bedside a diagnostic and preventive perspective*; edited by Davy Vanden Broeck, 2013, ISBN 978-953-51-1072-9, Germany.
- 32.- Hou L., Zhou B., Yang L., Liu Z.L. (2004). Inhibition of free radical initiated peroxidation of human erythrocyte ghosts by flavonoids and their glycosides, *Org. Biomol. Chem.*, 2(9):1419-1423.
- 33.- Jones Clinton. (1995). Cervical cancer: Is Herpes simplex virus type II a cofactor ? *Clinical Microbiol. Rev.*, vol.8, nr.4, pp.549-556.
- 34.- Kimoto T., Arai S., Kohguchi M., Aga M., Nomura Y., Micallef M.J., Kurimoto M. and Mito K. (1998). Apoptosis and suppression of tumor growth by artemisin C extracted from Brazilian propolis. *Cancer Detect. Prev.*, 22:506-515.
- 35.- Koss L., Durfee G.R. (1956). Unusual patterns of squamous epithelium of uterine cervix: cytologic and pathologic study of koilocytotic atypia. *Ann N Y Acad Sci.*; 63(6):1245-1261.
- 36.- Lazăr V., Herlea V., Cernat R., Balotescu C., Bulai D., Morariu A. (2004). *Microgiologie Generală; Manual de lucrări practice*, Ed. Universității din București.
- 37.- Lebeaux David, Ghigo J.M., Beloin Ch. (2014). Biofilm-Related Infections: Bridging the Gap between Clinical Management and Fundamental Aspects of Recalcitrance toward Antibiotics; *Microbiol. Mol. Biol.Rev.*; vol.78, no.3: pp.510-543.
- 38.- Lewis K. (2001). Riddle of biofilm resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.*; 45(4):999-1007.
- 39.- Lewis K. (2007). Persister cells, dormancy and infections disease. *Nat. Rev. Microbiol.*; 5(1); pp.48-56.
- 40.- Marić S., Vraneš J. (2007). Characteristics and significance of microbial biofilm formation; *Periodicum Biologorum*; vol.109; nr.2.
- 41.- Martinotti S., Ranzato E. (2013). Dynamic interplay between cell types during wound healing. In: Ranzato E., editor. *Keratinocytes: structure, molecular mechanisms and role in immunity*. Hauppauge, New York: Nova Publishers Inc; pp.:1-12.

- 42.- Martinotti S., Ranzato E. (2015). Propolis: a new frontier for wound healing? *Burns & Trauma*, vol.3:9.
- 43.- Mateescu C. (1999). Propolis as therapeutic agents; *Honey Science*, vol.20, nr.2, pp.53-63.
- 44.- Middleton E.Jr. și colab. (2000). The effect of plant flavonoids on mammalian cells: Implications for inflammation, Heart Disease and cancer, *Pharmacological Rev.* 52(4):673-751.
- 45.- Mirzoeva O.K., Calder P.C. (1996). The effect of propolis and its components on eicosanoid production during the inflammatory response; *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*; 55(6):441-449.
- 46.- Mișcalencu D., Ivanciu L., Mailat F., Bordea C. (2002). *Oncogenele virale*; Univ. București.
- 47.- Mișcalencu D. și colab. (2010). Cancerizare chimică și substanțe anticanceroase din plante; *Compuși naturali cu acțiune anticanceroasă*, pag.322-324 și pag.349-368; Ed. ICAR București.
- 48.- Mucsi L., Gyulai Z., Beladi I. (1992). Combined effects of flavonoids and acyclovir against herpes viruses in cell cultures. *Acta Microbiol. Hung.*, 39:137-147.
- 49.- Nomura M., Kaji A., Ma W., Miyamoto K., Dong Z. (2001). Suppression of cell transformation and induction of apoptosis by caffeic acid phenethyl ester; *Mol. Carcinog.* 31:83-89.
- 50.- O'Leary K.A. și colab. (2004). Effect of Flavonoids and Vitamin E on cyclooxygenase-2 (COX-2) transcription. *Mutat. Res.* 551(1-2):245-254.
- 51.- Olinescu R. (1991). Antioxidant and anti-inflammatory action of propolis; *Studii și Cercetări Biochimice*, vol.34; pp.19-25.
- 52.- Oršolić N., Horvat A., Bašić I. (2001). A comparison of antitumor activity of propolis and its related flavonoids; *Proceedings of 37th International Apicultural Congress*, 28 October-01 November, South Africa, Apimondia.
- 53.- Parsek M.R., Singh P.K. (2003). Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis. *Ann. Rev. Microbiol.*; 57:677-701.
- 54.- Paulino N., Abreu S.R.L., Machado G., Silveira E. (2009). Scientific evidences to pharmacological anticancer action of *Baccharis dracunculifolia* brazilian propolis; *Rev. Pesq. Inov. Farm.* 1(1):15-26.
- 55.- Popova M.P., Chinou I.B., Marekov I.N., Bankova V.S. (2009). Terpenes with antimicrobial activity from Cretan propolis; *Phytochemistry*, 70:1262-1271.

- 56.- Popovici I., Lupuleasa D. (2008). Tehnologia farmaceutică, vol.2; Cap. XXII: Emulsii multiple, structurate și miniemulsii; pp.266; Ed. Polirom.
- 57.- Ray A. (2005). Cancer preventive role of selected dietary factors. *Indian J.Cancer.*, 42(1):11-20.
- 58.- Sawicka D., Halina Car, Borawska M.H., Niklinski J. (2012). The anticancer activity of propolis; *Folia Histochemica et Cytobiologica*, vol.50, nr.1, pp.25-37.
- 59.- Scheller S., Gazda G., Krol W. și colab. (1989b). The ability of ethanol extract of propolis (EEP) to protect mice against gamma irradiation. *Z. Naturforsch.*; 44C, pp.1049-1052.
- 60.- Scheller S., Wilczok T., Imielski S., Krol W., Gabrys J., Shani J. (1990). Free radical scavenging by ethanol extract of propolis. *Int. J. Radiat. Biol.* 57:461-465.
- 61.- Shashank-Kumar, Abhay K. Pandey (2013). Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview; *The Scientific World Journal*.
- 62.- Shub T.A., Kagramonova K.A., Voropaeva S.D., Kivman G.Y.A. (1981). Effect of propolis on strains of *Staphylococcus aureus* resistant to antibiotics; *Antibiotiki*, 26:268-271.
- 63.- Song Y.S., Park E.H., Jung K.J., Jin C. (2002). Inhibition of angiogenesis by propolis; *Arch. Pharm. Res.*, 25:500-504.
- 64.- Stewart P.S., Costerton J.W. (2001). Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet*, vol.14; 358(9276):135-138.
- 65.- Stoodley P., Sauer K., Davies D. și colab. (2002). Biofilms as complex differentiated communities; *Ann. Rev. Microbiol.*; 56:187-209.
- 66.- Suzuki I., Hayashi I., Takaki T., Groveman D.S. and Fujimiya Y. (2002). Antitumor and anticytopenic effects of aqueous extracts of propolis in combination with chemotherapeutic agents. *Cancer Biother. Radiopharm.*; 17:553-562.
- 67.- Thomas J.C., Lindsay A., Nakaishi B.S. (2006). Managing the complexity of a dynamic biofilm. *J.A.D.A.*; 137(Suppl 3):10-15.
- 68.- Wright T.C., Kurman R.J., Ferenczy A. (2002). Precancerous Lesions of the Cervix. In Kurman R.J. ed. *Blaustein's Pathology of the Female Genital Tract*. 5th ed. New York, Springer-Verlag; p.253-265.
- 69.- Zănea G., Popescu O.V. (2011). Dicționar de microbiologie generală și biologie moleculară. Ed. Academiei Române, București, pp. 187-188.

- 70.- zur-Hausen Harald, Meinhof W., Scheiber W., Bornkamm G.W. (1974). Attempts to detect virus-specific Dna sequences in human tumors: I. Nucleic acid hybridizations with complementary RNA of human wart virus. *Int. J. Cancer*; 13, pp.650-656.
- 71.- zur Hausen H., de Villiers E.M., Gissmann L. (1981). Papillomavirus infections and human genital cancer. *Gynecol. Onco.*, 12:S124-S128.
- 72.- xxxx Annual Review of Microbiology (vol.56, 2002 by Annual Reviews; www.annualreviews.org).
- 73.- xxxx Farmacopeea Română, ediția a X-a, Ed. Medicală, București, 1993.
- 74.- xxxx Farmacopeea Europeană, ediția IX-a in vigoare.

LISTA CU LUCRĂRI PUBLICATE ȘI SAU COMUNICATE LA EVENIMENTE ȘTIINȚIFICE NAȚIONALE ȘI INTERNAȚIONALE

1.

O.F. Systems / International Conference, FROM SCIENCE TO GUIDANCE AND PRACTICE, 19-21 October 2015, "STUDY ON MICROBIOLOGICAL PROPERTIES OF A NATURAL EXTRACT RICH IN POLYPHENOLS OF FLAVONOIDS TYPE"

HAZEM ABBAS¹, CARMEN POPESCU^{2*}, CANDICE POPESCU³, DUMITRU LUPULIASA¹

¹"Carol Davila" University of Medicine and Pharmacy, Faculty of Pharmacy, Bucharest, Romania

²"Vasile Goldiș" Western University, Faculty of Pharmacy, Arad, Romania

³INNERGY (INNER Chi Nature srl), 284 Mamaia Blv. Office no.13, Constanta, Romania -working point Voluntari, Ilfov

*corresponding author: popescu_carmen88@yahoo.com

2. Lucrare publicată BDI

INTERNATIONAL SYMPOSIUM, Print: ISSN 2344 - 4118 CD-ROM: ISSN 2344 - 4126 Online: ISSN 2537 - 3773; ISSN-L 2344 - 4118

ISB-INMA-THEH, AGRICULTURAL AND MECHANICAL ENGINEERING, Bucharest 27-29 October 2016, "THE INFLUENCE OF HARVESTING PROCEDURE ON THE PROPOLIS QUALITY AND SAFETY/ INFLUENȚA PROCEDURII DE RECOLTARE ASUPRA CALITĂȚII ȘI SECURITĂȚII PROPOLISULUI"

PhD. Pharm. Abbas H.¹⁾, Assoc.Prof.PhD.Pharm. Eng. Popescu C.^{2,3)}, Ph.D. Stud. Eng. Mircea C.⁴⁾, PhD. Eng. Vlăduț V.⁴⁾, PhD. Pharm. Popiniuc C.^{1,5)}, Prof. PhD.Pharm. Lupuleasa D.¹⁾

¹⁾ University of Medicine and Pharmacy "Carol Davila" - Faculty of Pharmacy, Bucharest / Romania

²⁾ S.C. HOFIGAL Export Import S.A., Bucharest/ Romania;

³⁾ Faculty of Pharmacy, "Vasile Goldiș" Western University, Arad / Romania;

⁴⁾ INMA Bucharest / Romania; ⁵⁾ Innergy (SC INNER Chi Nature srl), Constanta, Romania-working point, Voluntari / Romania

*Tel : +40722611658 ; E-mail : popescu_carmen88@yahoo.com

3. Lucrare publicată ISI

FARMACIA, 2017, Vol. 65, 6; THE ANTIVIRAL/ VIRUCIDAL EFFECTS OF ALCHOOLIC AND AQUEOUS EXTRACTS WITH PROPOLIS

ABBAS HAZEM¹, IOANA MĂDĂLINA PITICĂ-ALDEA², CARMEN POPESCU^{3,4*}, LILIA MATEI², DENISA DRAGU², MIHAELA ECONOMESCU², IRINA ALEXIU², IULIANA CRIȘAN³, CARMEN CRISTINA DIACONU², CORALIA BLEOTU², DUMITRU LUPULIASA¹

¹"Carol Davila" University of Medicine and Pharmacy, Faculty of Pharmacy, Bucharest, Romania

²“Ștefan S. Nicolau” Institute of Virology, Bucharest, Romania

³S.C. HOFIGAL Export Import S.A., Bucharest, Romania

⁴“Vasile Goldiș” Western University, Faculty of Pharmacy, Arad, Romania

*corresponding author: popescu_carmen88@yahoo.com

4. Lucrare publicată ISI

FARMACIA, 2017, Vol. 65, 5; *ANTIBACTERIAL EFFICIENCY OF FIVE PROPOLIS EXTRACTS ON PLANKTONIC AND ADHERENT MICROBIAL STRAINS*

ABBAS HAZEM¹, CARMEN VIOLETA POPESCU^{3,4*}, IULIANA CRIȘAN³, MARCELA POPA², MARIANA CARMEN CHIFIRIUC², GRAȚIELA GRADIȘTEANU PIRCALABIORU², DUMITRU LUPULIASA¹

¹“Carol Davila” University of Medicine and Pharmacy, Faculty of Pharmacy, Bucharest, Romania

²Research Institute of the University of Bucharest, ICUB, Bucharest, Romania

³S.C. HOFIGAL Export Import S.A., Bucharest, Romania

⁴“Vasile Goldiș” Western University, Faculty of Pharmacy, Arad, Romania

*corresponding author: popescu_carmen88@yahoo.com

5. Lucrare comunicată

Second Propolis Conference - Propolis in human and bee health conference - Sofia 2018, Sofia, Bulgaria, on 28 – 29 September 2018

A. Journal of Apitherapy and Nature/Apiterapi ve Doğa Dergisi, 1(3), 70-70, 2018

Apiterapi ve Doğa Dergisi Journal of Apitherapy and Nature www.dergipark.gov.tr/jan

Antimicrobial Efficacy of Some Products with Propolis Hydroalcoholic Extract 30% and Antiviral Synthesis

Carmen Violeta POPESCU^{1,2}, Hazem ABBAS³, Ștefan MANEA¹, Lili IVOPOL¹, Alina DUNE¹, Candice POPINIUC⁴, Dumitru LUPULEASA³

¹ S.C. Hofigal Export Import S.A., Bucharest, Romania

² Faculty of Pharmacy, “Vasile Goldiș” Western University, Arad, Romania

³ University of Medicine and Pharmacy “Carol Davila” - Faculty of Pharmacy, Bucharest, Romania

⁴ Innergy (SC Inner Chi Nature srl), Constanta, Romania - working point, Voluntari, Romania

*popescu_carmen88@yahoo.com

Received/ Geliş Tarihi: 08/10/2018, Accepted/ Kabul Tarihi: 19/10/2018

B. Poster

Antimicrobial Efficacy of Some Products with Propolis Hydroalcoholic Extract 30% and Antiviral Synthesis

Carmen Violeta POPESCU^{1,2}, Hazem ABBAS³, Ștefan MANEA¹, Lili IVOPOL¹, Alina DUNE¹, Candice POPINIUC⁴, Dumitru LUPULEASA³

¹ S.C. Hofigal Export Import S.A., Bucharest, Romania

² Faculty of Pharmacy, “Vasile Goldiș” Western University, Arad, Romania

³ University of Medicine and Pharmacy “Carol Davila” - Faculty of Pharmacy, Bucharest, Romania

⁴ Innergy (SC Inner Chi Nature srl), Constanta, Romania - working point, Voluntari, Romania

*popescu_carmen88@yahoo.com