

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE “VICTOR BABEȘ”  
DIN TIMIȘOARA  
FACULTATEA DE MEDICINĂ  
DEPARTMENT IX: CHIRURGIE I  
OTORINOLARINGOLOGIE**

**PANCU DANIEL FLORIN**



# **TEZA DE DOCTORAT**

**CONTRIBUȚII LEGATE DE ROLUL ANTIBIOTICELOR ÎN  
PROCESELE TUMORALE - O PERSPECTIVĂ A ANALIZEI  
PRECLINICE CU RELEVANȚĂ ÎN ABORDAREA CLINICĂ**

**– R E Z U M A T –**

Conducător științific  
**PROF. MARIOARA POENARU**

**Timișoara  
2023**

# CUPRINS

Lista articolelor publicate .....	VI
Lista abrevierilor .....	VII
Indexul figurilor .....	VIII
Indexul tabelelor .....	XIII
Mulțumiri .....	XIV
INTRODUCERE .....	XV
<b>PARTEA GENERALĂ</b> .....	1
CAPITOLUL I. ASPECTE GENERALE CU PRIVIRE LA ANTIBIOTICELE CONVENȚIONALE .....	1
I.1 Scurt istoric .....	1
I.2 Clasificarea antibioticelor .....	4
I.3 Aspecte legate de toxicitatea antibioticelor .....	9
I.3.1 Noțiuni generale .....	9
I.3.2 Tipuri de efecte adverse .....	10
I.3.3 Selectarea atentă a criteriilor relevante pentru reducerea toxicității antibioticelor .....	15
CAPITOLUL II. COMPUȘI NATURALI CU EFECT ANTIBACTERIAN .....	17
II.1 Introducere .....	17
II.2 Clase de compuși naturali cu acțiune antimicrobiană .....	18
CAPITOLUL III. ANTIBIOTICELE ȘI CANCERUL .....	23
III.1 Introducere .....	23
III.2 Antibioticele ca terapie pentru cancer .....	24
III.3 Antibioticele ca și promotori ai cancerului .....	27
III.4 Mecanisme potențiale pro-tumorale de acțiune legate de antibiotice .....	28
<b>PARTEA SPECIALĂ</b> .....	30
CAPITOLUL IV. EVALUAREA PRECLINICĂ A EFECTULUI AMPICILINEI ASUPRA CELULELOR CARCINOMULUI FARINGIAN .....	32
IV.1 Introducere .....	32
IV.2 Materiale și metode .....	34
IV.2.1 Reactivi .....	34
IV.2.2 Culturi celulare .....	35
IV.2.3 Evaluarea viabilității celulare .....	35
IV.2.4 Morfologia celulară .....	36
IV.2.5 Evaluarea potențialului de migrare .....	36
IV.2.6 Imunocitochimie fluorescentă .....	37
IV.2.7 Analiza statistică .....	37
IV.3 Rezultate .....	37
IV.3.1 Evaluarea viabilității celulare .....	37
IV.3.2 Morfologia celulară .....	38
IV.3.3 Evaluarea potențialului de migrare .....	40
IV.3.4 Imunocitochimie fluorescentă .....	43
IV.4. Discuții .....	44
IV.5. Concluzii .....	47
CAPITOLUL V. EVALUAREA PRECLINICĂ A EFECTULUI TETRACICLINEI ASUPRA CELULELOR CARCINOMULUI FARINGIAN .....	48
V.1 Introducere .....	48
V.2 Materiale și metode .....	50
V.2.1 Reactivi .....	50
V.2.2 Culturi celulare .....	50
V.2.3 Evaluarea viabilității celulare .....	51
V.2.4 Morfologia celulară .....	51
V.2.5 Evaluare potențialului de migrare .....	51

V.2.6	Imunocitochimie fluorescentă.....	52
V.2.7	Analiza statistică.....	52
V.3	Rezultate.....	53
V.3.1	Evaluarea viabilității celulare.....	53
V.3.2	Morfologia celulară.....	54
V.3.3	Evaluarea potențialului de migrare.....	56
V.3.4	Imunocitochimie fluorescentă.....	58
V.4	Discuții.....	60
V.5	Concluzii.....	63
<b>CAPITOLUL VI. EVALUAREA EFECTELOR BIOLOGICE ALE ASOCIERII</b>		
<b>DINTRE TETRACICLINĂ ȘI ULEIUL ESENȚIAL DE CIMBRU.....</b>		
VI.1	Introducere.....	64
VI.2	Materiale și metode.....	65
VI.2.1	Prepararea și caracterizarea probelor.....	65
VI.2.2	Analiza activității antimicrobiene.....	66
VI.2.3	Culturile celulare și viabilitatea.....	67
VI.2.4	Analiza statistică.....	67
VI.3	Rezultate.....	68
VI.3.1	Caracterizarea probelor.....	68
VI.3.2	Analiza activității antimicrobiene.....	69
VI.3.3	Activitatea citotoxică.....	71
VI.4	Discuții.....	73
VI.5	Concluzii.....	83
<b>CONCLUZII GENERALE ȘI CONTRIBUȚII PARTICULARE.....</b>		
<b>BIBLIOGRAFIE.....</b>		
<b>ANEXE.....</b>		

## REZUMAT

Medicamentele din clasa antibioticelor sunt considerate o piatră de temelie a medicinei moderne, iar descoperirea lor a dus la o abordare spectaculoasă a bolilor infecțioase. Cu toate acestea, utilizarea lor excesivă în ultimii ani, la nivel mondial, a generat o problemă critică de sănătate publică, iar rezistența microbiană corelată cu pierderea acțiunii antibiotice este o provocare pentru specialiștii din domeniu. Găsirea de noi abordări terapeutice inovatoare pentru combaterea rezistenței bacteriene este necesară urgent, iar compușii naturali cu efecte antibacteriene ar putea fi considerați o opțiune promițătoare. Rolul jucat de antibiotice în procesele tumorale și interrelația lor cu microbiota sunt un subiect dezbătut care este încă departe de a fi elucidat. Prin urmare, teza actuală oferă o perspectivă globală asupra antibioticelor din punct de vedere al evoluției dintr-o perspectivă istorică, cu accent pe principalele clase de antibiotice și efectele lor adverse; aprofundează conexiunea dintre antibiotice și microbiotă, subliniind rolul dual jucat de antibiotice în tumorigeneză. În plus, se discută utilizarea compușilor naturali cu proprietăți antibacteriene/antitumorale ca alternative potențiale la terapia cu antibiotice clasice.

Compușii naturali au o diversitate chimică extraordinară, care este responsabilă pentru o multitudine de efecte biologice și, prin urmare, pot fi considerați resursele cele mai promițătoare pentru descoperirea și dezvoltarea de noi medicamente antibacteriene/antitumorale. Cercetări recente în domeniul terapiei antitumorale și antibiotice au evidențiat faptul că unele antibiotice pot provoca apoptoza celulelor canceroase, prevenind astfel creșterea și metastazarea lor. Pe de altă parte, unele studii au atras atenția asupra faptului că, consumul de antibiotice poate provoca o perturbare a florei microbiene saprofite. Microbiomul intestinal joacă un rol semnificativ în abordarea curativă a cancerului. Prin urmare, consumul de antibiotice poate provoca, pe lângă distrugerea florei intestinale, o scădere a sistemului imunitar și o promovare a proceselor inflamatorii, toate având efecte pro-tumorale și duc la o scădere a eficacității tratamentului antitumoral. Astfel, antibioticele pot fi văzute ca o sabie cu două tăișuri, care exercită un efect benefic în terapia cancerului, precum și un efect pro-cancer, reprezentând un risc pentru oameni.

Având în vedere cele de mai sus și luând în considerare complexitatea efectelor benefice și mai puțin benefice asociate cu antibiotice (de exemplu, acțiune antibacteriană/consum în exces care duce la rezistență microbiană, acțiune antitumorală/efecte pro-tumorale), lucrarea de față a avut trei obiective științifice specifice, după cum este prezentat în cele ce urmează:

- (1) Evaluarea efectelor exercitate de ampicilină asupra celulelor carcinomului faringian (celulele Detroit-562) în ceea ce privește viabilitatea, morfologia, migrația celulară și structura fibrelor nucleare și actinei-având în vedere ipoteza conform căreia antibiotice cu spectru larg exercită efecte nocive asupra microbiotei umane și carcinomul faringian poate fi afectat de astfel de modificări.
- (2) Evaluarea efectelor exercitate de tetraciclină asupra celulelor carcinomului faringian. Prin urmare, a fost examinată viabilitatea și morfologia celulară, precum și structura fibrelor de actină și a nucleilor și a capacității celulelor de a migra.
- (3) Analiza combinației dintre uleiul esențial de cimbru și tetraciclină cu privire la: (a) activitatea antimicrobiană împotriva bacteriilor gram-pozitive (*Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* și *Streptococcus pyogenes*) și bacteriilor gram-negative (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia* și *Pseudomonas aeruginosa*) și (b) activitatea citotoxică asupra celulelor adenocarcinomului colorectal uman.

Teza actuală este structurată în conformitate cu normele metodologice în două părți principale: partea generală și partea specială. În partea generală, cele mai noi date din literatura de specialitate sunt descrise cu referire la: (a) aspecte generale privind antibioticele convenționale (scurt istoric, clasificare a antibioticelor, aspecte legate de toxicitatea antibioticelor), (b) compuși naturali cu efect antibacterian (cu accentul asupra claselor de compuși naturali cu acțiune antimicrobiană) și (c) antibiotice și cancer (antibiotice ca terapie cancer, antibiotice ca promotori de cancer, potențiale mecanisme pro-tumorale de acțiune legate de antibiotice). Partea specială este structurată în trei capitole, după cum urmează: evaluarea preclinică a efectului ampicilinei asupra celulelor carcinomului faringian; evaluarea preclinică a efectului tetraciclinei asupra celulelor carcinomului faringian; evaluarea efectelor biologice ale asocierii dintre tetraciclină și uleiul esențial de cimbru. Lucrarea prezintă, de asemenea, o parte din concluzii generale și contribuții particulare și se încheie cu referințe bibliografice care susțin informațiile prezentate și rezultatele originale obținute.

**Primul capitol** din partea experimentală este legat de evaluarea preclinică a efectului ampicilinei asupra celulelor carcinomului faringian. În ceea ce privește incidența, cancerul de cap și gât se află pe locul șase și aproape jumătate din cazuri sunt cancere orale. Deși s-au înregistrat progrese semnificative în gestionarea și tratamentul acestor tipuri de cancer, rata de supraviețuire de cinci ani pentru cancerul oral scade în continuare sub 50% în majoritatea țărilor. Având în vedere eterogenitatea cancerului de cap și gât, tratarea acestor afecțiuni poate fi o provocare pentru specialiștii din domeniul medical. Diferiți factori contribuie la dezvoltarea cancerului oral, inclusiv fumatul, expunerea la razele ultraviolete, inflamația cronică și anumite infecții bacteriene sau virale. Opțiunile de protocol terapeutic pentru cancerele orofaringiene includ chimioterapie, radioterapie și chirurgie. O abordare imunoterapeutică pentru tratarea acestor tipuri de cancer este cea mai recentă opțiune de

tratament, dar este încă însoțită de o serie de reacții adverse necunoscute. Dezavantajul major asociat cu terapia antitumorală este apariția reacțiilor toxice atât la nivel local, cât și sistemic. În unele cazuri, atât chimioterapia, cât și radioterapia pot duce la necesitatea unui tratament cu antibiotice. Majoritatea antibioticelor utilizate în acest caz sunt antibiotice cu spectru larg de acțiune, care cresc riscul de a schimba microbiomul fiziologic. În ultimii ani, studiile s-au concentrat pe rolul microbiotei în patogeneză și răspunsul la tratament într-o mare varietate de boli, inclusiv cancer. În ceea ce privește cancerul de gât, cum ar fi cancerul faringian, există puține dovezi cu privire la rolul microbiotei. O diferență substanțială a fost găsită între microbiota pacienților cu cancer la gât și cea a pacienților sănătoși, subliniind astfel rolul important jucat de microbiotă în acest tip de cancer. Antibioticele sunt considerate pietrele de temelie ale medicinei moderne, dar în prezent, sunt asociate cu probleme legate de rezistența bacteriană și, ca urmare, devin din ce în ce mai ineficiente zi de zi. În același timp, rezistența antimicrobiană poate fi asociată cu o virulență și o transmisie semnificativă, jucând un rol crucial în răspândirea globală a bacteriilor rezistente. Există o controversă considerabilă cu privire la utilizarea ampicilinei la pacienții cu cancer. În ciuda faptului că ampicilina poate fi utilizată profilactic la pacienții cu cancer, nu se știe exact ce efect poate avea asupra dezvoltării și proliferării celulelor tumorale. Prin urmare, există dovezi contradictorii cu privire la relația dintre ampicilină și tumorigeneză. Pe de o parte, unele studii oferă dovezi că ampicilina are proprietăți antitumorale. Cu toate acestea, în literatura de specialitate există dovezi că ampicilina are un efect pro-tumoral, ceea ce duce la stimularea proliferării celulelor tumorale, crescând dimensiunea tumorii. Având în vedere ipoteza că antibioticele cu spectru larg exercită efecte nocive asupra microbiotei umane, iar carcinomul faringian poate fi afectat de astfel de modificări, principalul obiectiv al acestui studiu a fost evaluarea efectelor ampicilinei asupra celulelor carcinomului faringian. Au fost evaluate efectele asupra viabilității, morfologiei, migrației celulare și structurii fibrelor nucleare și actinei. Ampicilina nu a arătat un efect citotoxic semnificativ. De fapt, la cele mai mici concentrații testate (10, 25 și 50  $\mu\text{M}$ ), viabilitatea celulară a crescut în comparație cu celulele de control netratate. Între timp, concentrațiile de 75 și 100  $\mu\text{M}$  au dus la o ușoară scădere a viabilității, dar scăderea nu a fost semnificativă, ajungând în jurul valorii de 94%. Morfologia celulară, precum și structura nucleară și organizarea fibrelor de actină, nu au arătat diferențe importante în comparație cu cele observate în celulele nestimulate cu antibiotice.

**Al doilea capitol** s-a bazat pe evaluarea preclinică a efectului tetracilinei asupra celulelor carcinomului faringian. În prezent, cancerul faringian este o problemă majoră cu care se confruntă omenirea, în mare parte din cauza consumului de alcool și a fumatului. A existat un interes considerabil în examinarea relației de cauzalitate dintre compoziția microbiotei și dezvoltarea cancerului. Drept urmare, s-a dovedit că diferite modificări ale microbiotei sunt asociate cu dezvoltarea diferitelor tipuri de cancer. S-a documentat că microbiota intestinală

joacă un rol semnificativ în dezvoltarea cancerului gastric. În schimb, relația dintre disbioza orală și cancerul oral nu este pe deplin înțeleasă. În literatură s-a propus că influența microbiană asupra procesului de cancer poate fi mediată prin diferite mecanisme de acțiune, dintre care cel mai recunoscut mecanism este inducerea inflamației cronice. În plus față de acest mecanism de acțiune, bacteriile pot influența, de asemenea, procesul de proliferare celulară și pot inhiba apoptoza celulară, contribuind astfel la dezvoltarea mai multor tipuri de cancer. Studii recente au arătat că unele antibiotice pot fi utile în tratamentul cancerului prin: (a) promovarea apoptozei în celule; (b) inhibarea proliferării liniilor celulare; și (c) prevenirea metastazelor. Există controverse în ceea ce privește utilizarea antibioticelor în tratamentul pacienților cu cancer. Pe lângă modificarea microbiotei, antibioticele reduc, de asemenea, imunitatea și promovează inflamația, ceea ce contribuie la dezvoltarea tumorii și la scăderea eficacității tratamentului. În literatura de specialitate au fost discutate mai multe antibiotice cu activitate antitumorală, despre un efect anti-proliferativ puternic asupra celulelor tumorale. Există mai multe mecanisme comune legate de tetraccline care afectează tumorile, inclusiv inhibarea sintezei proteinelor mitocondriale, inhibarea metaloproteinazelor matriceale, inhibarea factorului nuclear de semnalizare kappa, etc. Pe baza celor de mai sus, studiul actual a investigat efectele tetraciclinei asupra celulelor carcinomului faringian. Prin urmare, a fost evaluată viabilitatea celulară și morfologia, precum și structura fibrelor de actină și a nucleelor și a capacității celulelor de a migra. Concentrațiile selectate pentru studiul *in vitro* au fost cuprinse între 10  $\mu\text{M}$  și 100  $\mu\text{M}$ . Pe baza rezultatelor, tetraciclina provoacă o scădere a viabilității celulare proporționale direct cu concentrația sa. Viabilitatea celulară a scăzut la aproximativ 71% la o concentrație de 10  $\mu\text{M}$ , în timp ce la o concentrație de 100  $\mu\text{M}$  viabilitatea a scăzut la aproximativ 46%. Pentru a obține o înțelegere mai profundă a efectelor antibioticului asupra celulelor carcinomului faringian, a fost analizată morfologia celulară. Tetraciclina provoacă modificări morfologice și o scădere a confluentei celulare într-un mod dependent de concentrație. Modificările morfologice au fost observate la toate concentrațiile studiate, incluzând (a) rotunjirea celulelor, (b) detașarea celulară de plăci și (c) scăderea confluentei și a numărului de celule. Efectele celei mai mari concentrații asupra morfologiei celulare au fost cele mai evidente. Având în vedere că migrația celulară este o caracteristică a celulelor tumorale, studiul de față a evaluat impactul tetraciclinei testate în trei concentrații (10, 50 și 100  $\mu\text{M}$ ) asupra migrației celulare. Efectele tetraciclinei au fost evidente în inhibarea migrației celulare, precum și în modificările morfologice. A existat o corelație între concentrația testată și scăderea capacității celulelor de a migra. Drept urmare, la o concentrație de 10  $\mu\text{M}$ , rata de vindecare a scăzut la aproximativ 27%, comparativ cu aproximativ 64% pentru celulele de control. La concentrații de 50 și 100  $\mu\text{M}$ , s-au observat scăderi mai mari ale migrației celulare. Ca o imagine mai cuprinzătoare a modului de acțiune a tetraciclinei la nivel celular, imunocitochimia fluorescentă a fost utilizată pentru a observa modificări la nivelul fibrelor de

actină și a nucleului după stimularea cu tetraciclină în trei concentrații (10, 50 și 100  $\mu\text{M}$ ) timp de 72 h. Fibrele de actină au fost vizualizate folosind colorarea cu rodamină-phaloidină. O modificare a distribuției fibrelor de actină a fost observată în celulele tratate cu tetraciclină în comparație cu celulele de control. De-a lungul celulelor, fibrele de actină au fost puternic concentrate la margini, indicând o stare condensată. În timp ce celulele nestimulate aveau distribuții uniforme ale fibrelor de actină în întreaga celulă. În ceea ce privește efectul asupra nucleilor, tetraciclina a provocat o condensare puternică a cromatinei, apariția corpurilor apoptotice și o scădere a numărului de nuclee. Concentrații de 100  $\mu\text{M}$  au dus la cele mai semnificative modificări. Efectele citotoxice ale tetraciclinei pot rezulta dintr-o varietate de mecanisme biologice posibile, inclusiv: (a) inhibarea sintezei proteice mitocondriale; (b) inhibarea metaloproteinazelor matriciale; (c) deteriorarea angiogenezei; (d) eradicarea celulelor stem canceroase; și (e) creșterea sensibilității celulelor tumorale la radioterapie prin reglarea în jos a proteinei kinazei dependente de ADN.

**Al treilea capitol** a fost axat pe evaluarea efectelor biologice ale asocierii dintre tetraciclină și uleiul esențial de cimbru. Pentru a face față provocărilor rezistenței la antibiotice, o abordare cheie este stimularea descoperirii substanțelor bioactive într-un stadiu incipient. Completarea acțiunilor farmacologice ale antibioticelor clasice cu substanțe de origine naturală este intens studiată pentru a obține eficiență în clinică, corelat cu un obiectiv real de dezvoltare a unei noi generații de medicamente chimioterapeutice derivate din surse naturale, având în vedere diversitatea chimică fără egal a acestora. Rezistența dezvoltată de bacteriile Gram-pozitive și Gram-negative la mai multe medicamente le-a făcut dificil de tratat și/sau chiar netratabile cu antibioticele disponibile în prezent. Mai mult, este de o importanță majoră să fie identificate noi ținte și noi clase de antibiotice care pot face față agenților patogeni bacterieni rezistenți la medicamente. Acest lucru necesită cercetări de bază pentru a descoperi noi lacune și pentru a dezvolta noi abordări cu antibiotice. Scopul prezentei cercetări a fost de a evalua o combinație de ulei esențial de cimbru și tetraciclină în ceea ce privește: (a) activitatea antimicrobiană împotriva bacteriilor Gram-pozitive (*Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* și *Streptococcus pyogenes*) și Gram-negative (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* și *Pseudomonas aeruginosa*) și (b) activitatea citotoxică asupra celulelor de adenocarcinom colorectal uman. Sensibilitatea bacteriilor la uleiul esențial de cimbru și combinația sa cu tetraciclină, determinată prin metoda difuziei pe disc, a arătat că uleiul esențial prezintă o activitate dependentă de doză crescută în toate tulpinile testate, cu excepția *P. aeruginosa*. Zona maximă de inhibiție produsă de uleiul esențial de cimbru a fost la cea mai mare concentrație testată (50 $\mu\text{L/mL}$ ) împotriva *S. aureus* și *K. pneumoniae*, în timp ce combinația cu tetraciclină a dus la o ușoară creștere a diametrului. Pentru a determina efectul citotoxic al uleiului esențial de cimbru și tetraciclinei, au fost testate diferite concentrații pe linia celulară de adenocarcinom colorectal uman. Viabilitatea celulară a fost evaluată

folosind testul MTT la intervale de 48 de ore. În cazul tetraciclinei, s-a observat o ușoară scădere a viabilității celulare numai la cea mai mare concentrație testată (10  $\mu\text{g/mL}$ ). În schimb, uleiul esențial de cimbru a exercitat o scădere mai mare de 30% a viabilității celulare la cea mai mare concentrație testată (50  $\mu\text{L/mL}$ ). În ceea ce privește evaluarea celei mai mari concentrații de tetraciclină și trei concentrații diferite de ulei esențial de cimbru asupra comportamentului celulelor, s-au obținut următoarele valori cuprinse între 98-84%.

Principalele concluzii sunt prezentate în cele ce urmează.

- Toate experimentele au fost efectuate conform protocoalelor bine stabilite și recunoscute: viabilitatea celulară cu testul MTT, capacitatea de migrare printr-o procedură automată, modificări la nivel de nucleu prin marcarea nucleară pentru a reflecta procesele apoptotice.
- Au fost identificate anumite efecte deosebite exercitate de antibiotic și anume: s-a înregistrat o creștere a viabilității celulare la cele mai mici concentrații de antibiotic testat și o ușoară reducere a acesteia la cele mai mari concentrații testate; migrația celulară nu a fost afectată semnificativ statistic în cazul stimulării celulelor cu antibiotice comparativ cu celulele nestimulate și nu au fost observate procese pro-apoptotice în nuclee.
- tetraciclina are un efect citotoxic dependent de concentrație, caracterizat prin scăderea viabilității celulare, precum și modificări morfologice caracteristice apoptozei (condensarea nucleului și a fibrelor de actină, apariția corpurilor apoptotice).
- tetraciclina s-a dovedit a fi un potențial agent antitumoral, dar sunt necesare studii suplimentare pentru a clarifica mecanismul ei biologic de acțiune și a determina profilul său de siguranță.
- sunt necesare studii suplimentare pentru a înțelege pe deplin modul în care tetraciclina afectează microbiota orală și modul în care această microbiotă contribuie la cancerul faringian.
- compoziția chimică a uleiului esențial de cimbru a fost evaluată prin metoda cromatografiei gazoase-spectrometrie de masă, capacitatea antioxidantă prin testul DPPH, proprietățile antibacteriene și sinergice au fost determinate prin metoda difuziei pe disc, iar activitatea citotoxică prin cuantificarea celulelor viabile prin utilizarea testul MTT.
- uleiul esențial de cimbru are activitate antioxidantă crescută, potențial antibacterian atât împotriva bacteriilor Gram-pozitive cât și Gram-negative, în special *S. aureus* și *K. pneumoniae* la cea mai mare concentrație testată, având și efect sinergic atunci când este combinat cu tetraciclina.

- celulele tratate cu ulei esențial au prezentat o reducere dependentă de doză a viabilității celulelor de adenocarcinom colorectal, în timp ce combinația cu tetraciclină a dus la o scădere semnificativ atenuată a viabilității.
- Asocierea produsului biologic cu antibioticul clasic tetraciclină a demonstrat păstrarea proprietăților sale citotoxice și creșterea activității antimicrobiene împotriva *S. aureus*, *E. coli* și *K. pneumoniae*.