

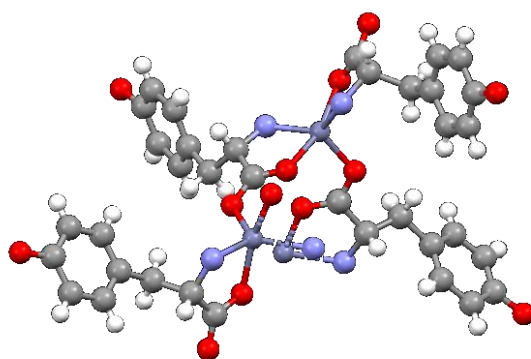


**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ**

**ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**ΔΙ-ΙΔΡΥΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ(Δ.Π.Μ.Σ.)**

**«ΑΝΟΡΓΑΝΗ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ»**



**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**“ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΝΕΩΝ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΩΝ ΥΔΡΟΓΕΛΩΝ ΠΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΥΝ ΦΥΣΙΚΑ ΠΡΟΙΟΝΤΑ ΣΥΖΕΥΓΜΕΝΑ ΜΕ ΙΟΝΤΑ ΨΕΥΔΑΡΓΥΡΟΥ ΩΣ ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ ΣΕ ΠΡΟΙΟΝΤΑ ΠΕΡΙΠΟΙΗΣΗΣ”**

**ΜΑΡΙΑΣ-ΦΩΤΕΙΝΗΣ ΑΛΕΒΙΖΟΥ**

**ΧΗΜΙΚΟΥ**

**ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΧΑΤΖΗΚΑΚΟΥ ΣΩΤΗΡΙΟΣ**

**ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2022**



Εισαγωγή στο ΔΙ-ΙΔΡΥΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ  
(Δ.Π.Μ.Σ.) «ΑΝΟΡΓΑΝΗ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ» της Αλεβίζου Μαρίας-Φωτεινής

Επιβλέπων μέλος ΔΕΠ: Χατζηκακού Σωτήριος

**Θέμα: «ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΝΕΩΝ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΠΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΥΝ ΦΥΣΙΚΑ ΠΡΟΙΟΝΤΑ ΣΥΖΕΥΓΜΕΝΑ ΜΕ ΙΟΝΤΑ ΨΕΥΔΑΡΓΥΡΟΥ ΓΙΑ ΤΗΝ ΧΡΗΣΗ ΤΟΥΣ ΣΕ ΠΡΟΙΟΝΤΑ ΠΕΡΙΠΟΙΗΣΗΣ»**

**ΟΡΙΣΜΟΣ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ από την Ε.Δ.Ε.:....-....**

**1 Σωτήριος Χατζηκακού Καθηγητής, Τμήματος Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων (Επιβλέπων)**

**2 Χριστιάννα Μητσοπούλου, Καθηγήτρια, Τμήματος Χημείας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών (Μέλος)**

**3 Αθανάσιος Κουτσολέλος , Καθηγητής, Τμήματος Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης (Μέλος)**

**Έγκριση μεταπτυχιακής διπλωματικής εργασίας στις:**

\_\_\_\_\_

**Ο Διευθυντής του Δ.Π.Μ.Σ.**

**Ο/Η Γραμματέας**

**Καθηγητής** \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

## **Ευχαριστίες**

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Ανόργανης Βιολογικής Χημείας του Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, στο πλαίσιο του διατμηματικού μεταπτυχιακού προγράμματος «ΑΝΟΡΓΑΝΗ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ» υπό την επίβλεψη του Καθηγητή, κ. Σωτήριου Χατζηκακού.

Πρώτα θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα της διπλωματικής μου εργασίας, κύριο Χατζηκακού Σωτήριο, Καθηγητή του Τμήματος Χημείας και υπεύθυνο του διατμηματικού μεταπτυχιακού προγράμματος «ΑΝΟΡΓΑΝΗ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ», για την καθοδήγηση, την υποστήριξη και συνεχή βοήθεια που μου παρείχε καθ' όλη τη διάρκεια της διπλωματικής μου εργασίας. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κυρία Χριστίνα Μπαντή μεταδιδάκτορα του Εργαστηρίου Βιολογικής Ανόργανης Χημείας και Διδάσκουσα Βιολογίας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, για την συνεχή καθοδήγηση της στα βιολογικά πειράματα αλλά και σε ότι άλλο τυχόν χρειάστηκα. Θα ήθελα να ευχαριστήσω την καθηγήτρια Τμήματος Χημείας ΕΚΠΑ κα. Μητσοπούλου Χριστιάννα και τον καθηγητή Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Κρήτης κ. Κουτσολέλο Αθανάσιο που δέχτηκαν να βρίσκονται στην τριμελή επιτροπή αξιολόγησης της διατριβής μου.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω και όλα τα μέλη του εργαστηρίου για την βοήθεια, τη συνεργασία καθώς και το ευχάριστο κλίμα που επικρατούσε. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την οικογένειά μου για την εμπιστοσύνη που μου έδειξαν μαζί με την ψυχολογική και υλική υποστήριξη καθώς και τους φίλους μου για την συνεχή υποστήριξη.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το νέο σύμπλοκο ψευδαργύρου (II) με τυροσίνη (TyrH) του τύπου  $\{[Zn(Tyr)_2](4/3)(DMSO)]\}_n$  (ZINT) συντέθηκε με αντίδραση  $Zn(NO_3)_2$  με TyrH (pH = 8) σε μοριακή αναλογία 1:2. Το σύμπλοκο χαρακτηρίστηκε από μια σειρά φυσικών και φασματοσκοπικών τεχνικών: σημείο τήξης, φασματοσκοπία υπέρυθρης μετατροπής ολικής ανάκλασης Fourier (ATR-FTIR), φθορισμός ακτίνων X (XRF), υπεριώδους-ορατού (UV-Vis),  $^1H$ -Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού ( $^1H$ -NMR). Το μοριακό βάρος του ZINT προσδιορίστηκε με κρυσκοπία. Η κρυσταλλική δομή του ZINT έχει προσδιοριστεί με ανάλυση περίθλασης ακτίνων X μονοκρυστάλλου. Η ένωση είναι 1D ομοιοπολικό πολυμερές. Δύο υποκαταστάτες τυροσίνης (TyrH) δρουν χηλικά στο ιόν ψευδαργύρου (II) μέσω του αμιδικού αζώτου και των αποπρωτονιωμένων καρβοξυλικών ατόμων οξυγόνου (N,O-Tyr) σχηματίζοντας δύο 5-μελείς δακτυλίους. Η σφαίρα συντονισμού συμπληρώνεται από ένα άτομο καρβονυλικού οξυγόνου από έναν τρίτο υποκαταστάτη TyrH (O-TyrH). Ο τύπος της μονομερούς είναι  $[Zn(N,O-Tyr)_2(O-Tyr)]$ . Δύο υποκαταστάτες TyrH γεφυρώνουν δύο άτομα ψευδαργύρου σχηματίζοντας 1D ομοιοπολικό πολυμερές του τύπου  $\{[Zn(N,O-Tyr)_2(O-Tyr)]_n\}$ .

Η αντιμικροβιακή δράση του ZINT αξιολογήθηκε έναντι του Gram αρνητικού βακτηρίου *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) με τη μέση ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (MIC), ελάχιστη βακτηριοκτόνο συγκέντρωση (MBC) και ζώνες αναστολής (IZ) αλλά και του *Staphylococcus Epidermidis* (*S. epidermidis*) με τη ζώνη αναστολής. Μελετήθηκε η διάσπαση του DNA του πλασμιδίου pUC18 του *E. coli* κατά την επώασή του με ZINT. Το μοντέλο *Artemia Salina* εφαρμόστηκε για την αξιολόγηση της τοξικότητας του ZINT in vivo.



## ABSTRACT

The new complex of zinc(II) with tyrosine (TyrH) of formula  $\{[\text{Zn}(\text{Tyr})_2](4/3)(\text{DMSO})\}_n$  (**ZINT**) was synthesized by reacting  $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$  with TyrH (pH= 8) in 1:2 molar ratio. The complex was characterized by a series of physical and spectroscopy techniques : melting point (m.p.), Attenuated Total Reflection Fourier Transform Infrared Spectroscopy (ATR-FTIR), X-ray fluorescence (XRF), Ultraviolet-Visible (UV-vis),  $^1\text{H}$ -Nuclear Magnetic Resonance ( $^1\text{H}$ -NMR) spectroscopic techniques. The molecular weight of **ZINT** was determined by cryoscopy. The crystal structure of **ZINT** has been determined by single-crystal X-ray diffraction analysis. The compound is 1D covalent polymer. Two TyrH ligands chelates zinc(II) ion through the amide nitrogen and the deprotonated carboxylic oxygen atoms (N,O-Tyr) forming two 5-member rings. The coordination sphere is completed by a carbonyl oxygen atom from a third TyrH ligands (O-TyrH). The formula of the monomeric unit is  $[\text{Zn}(\text{N,O-Tyr})_2(\text{O-Tyr})]$ . Two TyrH ligands bridged two zinc atoms forming 1D covalent polymer of formula  $\{[\text{Zn}(\text{N,O-Tyr})_2(\text{O-Tyr})]_n\}$ .

The antimicrobial activity of **ZINT** was evaluated against the Gram negative species *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) by the mean of Minimum Inhibitory Concentration (MIC), Minimum Bactericidal Concentration (MBC), and Inhibition Zones (IZ) and *Staphylococcus Epidermidis* by the mean of Inhibition Zones. The pUC18 plasmid DNA cleavage from *E. coli* upon its incubation with **ZINT** was studied. The *Artemia salina* model was applied for the evaluation of **ZINT** *in vivo* toxicity.

**Keywords:** Biological Inorganic Chemistry; covalent coordination polymer; Zinc(II); Tyrosine; antimicrobial study; DNA cleavage.





## Περιεχόμενα

<b>A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b> .....	12
<b>1.Βακτήρια-Αντιβιοτικά</b> .....	12
1.1 Εισαγωγή.....	12
<b>2. Ψευδάργυρος</b> .....	16
<b>2.1 Αντιμικροβιακές Ιδιότητες</b> .....	17
2.1.1 Ψευδάργυρος και Προϊόντα περιποίησης.....	22
<b>2.2 Ψευδάργυρος στον άνθρωπο</b> .....	23
2.2.1 Τοξικότητα Zn.....	24
<b>3. Αμινοξέα</b> .....	25
<b>3.1 Ιδιότητες Αμινοξέων</b> .....	28
<b>3.2 Τυροσίνη</b> .....	29
3.2.1 Γενικά .....	29
3.2.2 Λειτουργικότητα .....	30
3.2.3 Βιοσύνθεση τυροσίνης .....	30
3.2.4 Μεταβολισμός.....	31
3.2.5 Τυροσίνη και ορμόνες .....	32
3.2.6 Αποσύνθεση τυροσίνης .....	33
3.2.7 Τυροσίνη και μεταλλικά ιόντα .....	34
<b>4. Μεταλλικά σύμπλοκα με αμινοξέα</b> .....	35
<b>4.1 Μεταλλικά σύμπλοκα με τυροσίνη</b> .....	37
<b>4.2 Τοξικότητα μεταλλικών συμπλόκων σε μικροοργανισμούς</b> .....	40
<b>5 Καρβοξυμεθυλσελουλόζη (Carboxymethylcellulose)</b> .....	41
<b>6. Μικροοργανισμοί</b> .....	41
<b>6.1. Escherichia Coli</b> .....	44
6.1.1 Πλασμίδια .....	46
<b>6.2 Pseudomonas aeruginosa</b> .....	51
<b>6.3 Staphylococcus Epidermidis</b> .....	53

7. Τοποϊσομεράση.....	56
8. Μεταλλικά σύμπλοκα που κόβουν το πλασμιδιακό DNA .....	58
<b>B. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ .....</b>	<b>61</b>
<b>Γ. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....</b>	<b>63</b>
1. Χημικό μέρος.....	65
1.1 Σύνθεση.....	65
1.2 Σημείο τήξης.....	67
1.3 Διαλυτότητα.....	67
1.4 Κρυσκοπία .....	67
1.5 Φασματοσκοπία φθορισμού ακτίνων X (X-ray Fluorescence Spectroscopy, XRF).....	68
1.6 Φασματοσκοπία υπεριώδους-ορατού UV-Vis .....	69
1.7 Φασματοσκοπία υπεριώδους-ορατού FT-IR .....	70
1.8 Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού πρωτονίου ( <sup>1</sup> H-NMR).....	71
1.9 Περίθλαση μονοκρυστάλλου με ακτίνες X (single crystal X-ray crystallography) .	72
2. Βιολογικό Μέρος.....	74
2.1 Αντιμικροβιακή δράση .....	75
2.1.1 Ζώνη Αναστολής (IZ) .....	75
2.1.2 Ελάχιστη Ανασταλτική Συγκέντρωση(MIC).....	76
2.1.3 Ελάχιστη Βακτηριοκτόνος Συγκέντρωση (MBC) .....	76
2.2 Δράση τοποϊσομεράσης.....	77
2.3 Έλεγχος in vitro τοξικότητας στην <i>Artemia Salina</i> .....	79
<b>Δ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....</b>	<b>83</b>
1.Χαρακτηρισμός Ένωσης .....	83
1.1Γενικά.....	83
1.2 Σημείο τήξης.....	86
1.3 Διαλυτότητα.....	86

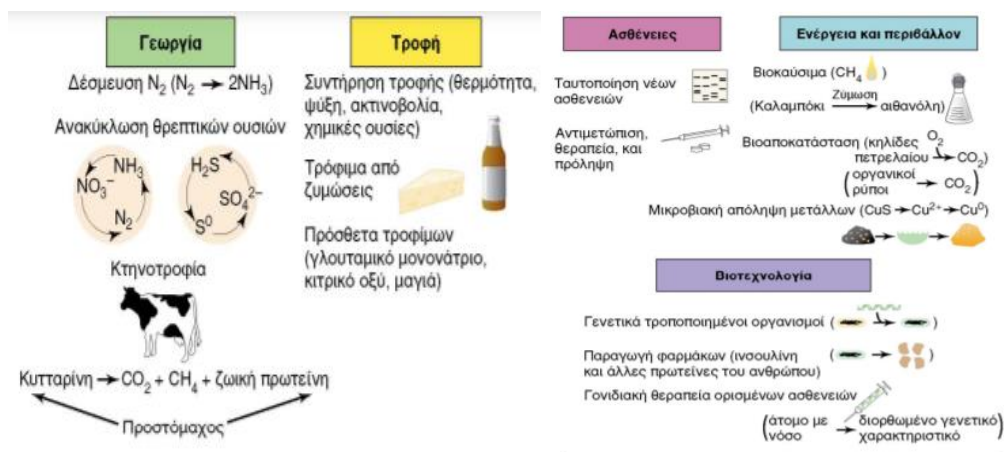
1.4 Κρυοσκοπία .....	87
1.5 Φασματοσκοπία Φθορισμού Ακτίνων X (XRF) .....	87
1.6 Φασματοσκοπία Υπεριώδους-Ορατού (UV-Vis) .....	88
1.7 Δονητική φασματοσκοπία υπέρυθρου μετασχηματισμού Fourier (FT-IR) .....	89
1.8 Φασματοσκοπία <sup>1</sup> H-NMR.....	95
1.8 Περίθλαση μονοκρυστάλλου με ακτίνες X (single crystal X-ray crystallography) .....	97
2. Μελέτη Σταθερότητας .....	99
2.1 Σταθερότητα σε διάλυμα με φασματοσκοπία υπεριώδους/ορατού (UV-Vis) .....	99
2.2 Σταθερότητα σε διάλυμα με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού πρωτονίου ( <sup>1</sup> H-NMR).....	100
3 Αντιμικροβιακή Δράση .....	102
3.1 Ζώνες Αναστολής -IZ (Inhibition Zones).....	102
3.2 Ελάχιστη Ανασταλτική συγκέντρωση (MIC) .....	106
3.3 Ελάχιστη Βακτηριοκτόνος Συγκέντρωση (MBC) .....	110
3.4 MBC/MIC .....	112
4 Έλεγχος δράσης τοποϊσομεράσης .....	113
5 Έλεγχος της in vivo τοξικότητας στον ζωντανό οργανισμό <i>Artemia salina</i> .....	116
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	117
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ-ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ .....	119
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	122

# Α. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

## 1. Βακτήρια-Αντιβιοτικά

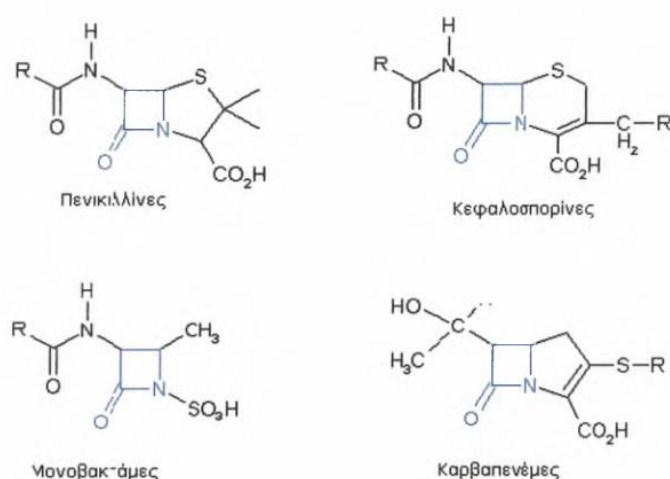
### 1.1 Εισαγωγή

Υπάρχουν πολλά και διαφορετικά είδη βακτηρίων, κάποια από τα οποία υπάρχουν φυσιολογικά στον άνθρωπο όντας χρήσιμα και προστατευτικά για αυτόν (κυρίως στο έντερο και στον κόλπο). Τα βακτήρια έχουν τρία βασικά σχήματα: σχήμα ράβδου (βάκιλλοι), σφαιρικά (κόκκοι) ή ελικοειδή (σπείριλα). Τα βακτήρια μπορούν επίσης να ταξινομηθούν ως Gram-θετικά ή Gram-αρνητικά. Τα θετικά κατά Gram βακτήρια έχουν παχύ κυτταρικό τοίχωμα ενώ τα αρνητικά κατά Gram όχι. Κάποια από αυτά μπορούν να μολύνουν τον ανθρώπινο οργανισμό προκαλώντας φλεγμονώδη αντίδραση όταν βρεθούν σε ένα σημείο του οργανισμού που δεν υπάρχουν φυσιολογικά και πιθανόν να προκαλέσουν σοβαρά νοσήματα, όπως για παράδειγμα μηνιγγίτιδα, πνευμονία, φυματίωση κ.λπ.[1]



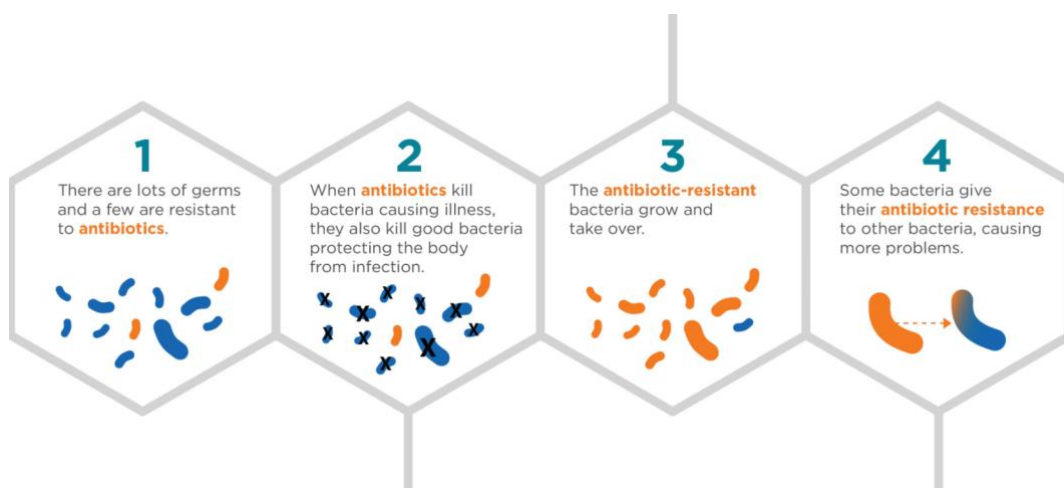
Εικόνα 1: Η επίδραση των μικροοργανισμών στη ζωή του ανθρώπου[7]

Η βακτηριακή λοίμωξη αποτελεί συχνό φαινόμενο και ορίζεται ως ο πολλαπλασιασμός ενός επιβλαβούς στελέχους βακτηρίων πάνω ή μέσα στο σώμα. Η λοίμωξη μπορεί να συμβεί ως αποτέλεσμα εισβολής μικροοργανισμών από το εξωτερικό περιβάλλον (εξωγενής λοίμωξη) ή σαν αποτέλεσμα υπερβολικής ανάπτυξης της φυσιολογικής χλωρίδας του οργανισμού (ενδογενής λοίμωξη). Αντιμικροβιακοί παράγοντες για την αναστολή του πολλαπλασιασμού και καταπολέμηση των βακτηριακών λοιμώξεων μπορεί να είναι συνθετικά αντιμικροβιακά φάρμακα είτε φυσικά αντιμικροβιακά (αντιβιοτικά). Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν ανάλογα αυξητικών παραγόντων όπως σουλφοναμίδες και ισονιαζίδιο και οι κινολόνες που αλληλεπιδρούν με τη DNA γυράση των βακτηρίων παρεμποδίζοντας την υπερέλικωση του βακτηριακού DNA.[7] Τα πιο κοινά αντιβιοτικά είναι οι β-λακτάμες. Έχουν έναν τετραμελή δακτύλιο με άζωτο εμποδίζοντας το βακτήριο να συνθέσει βακτηριακό τοίχωμα εμποδίζοντας τις σταυροσυνδέσεις των πλάγιων πεπτιδικών αλυσίδων του. Σε αυτά ανήκουν οι πενικιλίνες, οι κεφαλοσπορίνες, οι μονοβακτάμες και οι καρβαπενέμες όπως και φαίνονται παρακάτω:[34]



Εικόνα 2 : Τέσσερις βασικές κατηγορίες αντιβιοτικών β-λακτάμης[34]

Η κατάχρηση ή η κακή χρήση αντιβιοτικών, μπορεί να καταστήσει τα βακτήρια ανθεκτικά σε κάποιο αντιβιοτικό. Η ανθεκτικότητα των μικροβίων (AMR- Antimicrobial resistance) είναι η ικανότητα των μικροοργανισμών να αντέχουν στις αντιμικροβιακές θεραπείες και αποτελεί παγκόσμια κρίση υγείας απαιτώντας δραστικές ενέργειες για να παύσει να εξαπλώνεται. Ο τερματισμός εξάπλωσής της προϋποθέτει την καλύτερη κατανόηση όσον αφορά από πού προέρχονται και πως πολλαπλασιάζονται τα ανθεκτικά βακτήρια. Αυτό δεν συμβαίνει έως τώρα καθώς δεν δίνεται η προσοχή που θα έπρεπε από την κοινότητα.[30] Η εμφάνιση και εξάπλωση μικροοργανισμών που είναι ανθεκτικοί σε συγκεκριμένα αντιβιοτικά, καθιστά τη θεραπεία μη αποτελεσματική με τη δημόσια υγεία να τίθεται σε σοβαρούς κινδύνους. Τα ανθεκτικά στα αντιβιοτικά βακτήρια μπορούν να εξαπλωθούν μέσω πολλών οδών. Ένα πολύ γνωστό παράδειγμα ενός βακτηρίου που είναι ανθεκτικό σε πολλά αντιβιοτικά είναι ο ανθεκτικός στη μετικιλίνη *Staphylococcus aureus* (MRSA).[2]

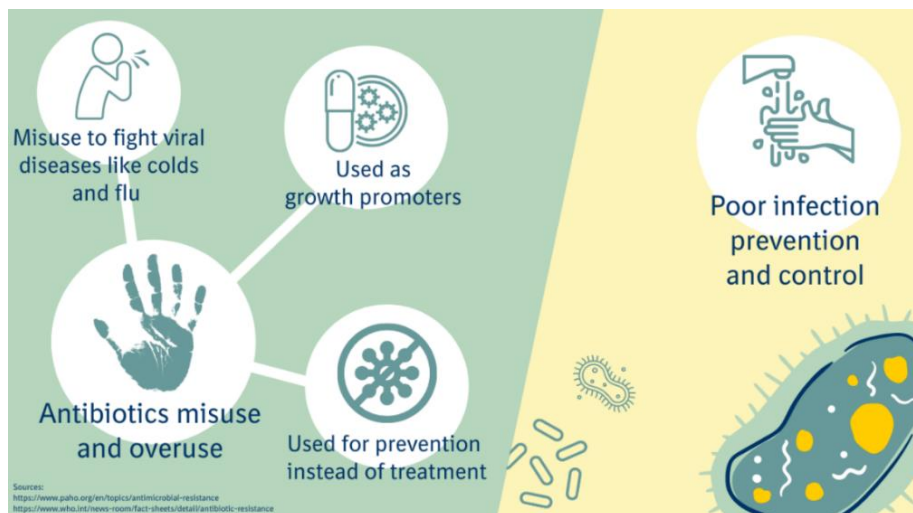


Εικόνα 3: Πως δημιουργείται η ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά[3]

Αυτή η ανθεκτικότητα των βακτηρίων στα αντιβιοτικά καθιστά αναγκαία την δημιουργία νέων αντιμικροβιακών παραγόντων που θα παρουσιάζουν μεγαλύτερη δραστικότητα έναντι των βακτηριακών λοιμώξεων.

Τα καλυπτήρια η αλλιώς επενδυτικά επιθήλια καλύπτουν πολλές κοιλότητες (όπως το στομάχι, το έντερο, κλπ.) και επιφάνειες (π.χ. δέρμα) ενώ μπορούν να εμποδίσουν αποτελεσματικά τη μόλυνση. Τα βακτηριακά κύτταρα από στελέχη των *Pseudomonas aeruginosa* ή *Staphylococcus aureus*, αναστέλλουν τη μετανάστευση των επιθηλιακών κυττάρων *in vitro* και *ex vivo*. [4]

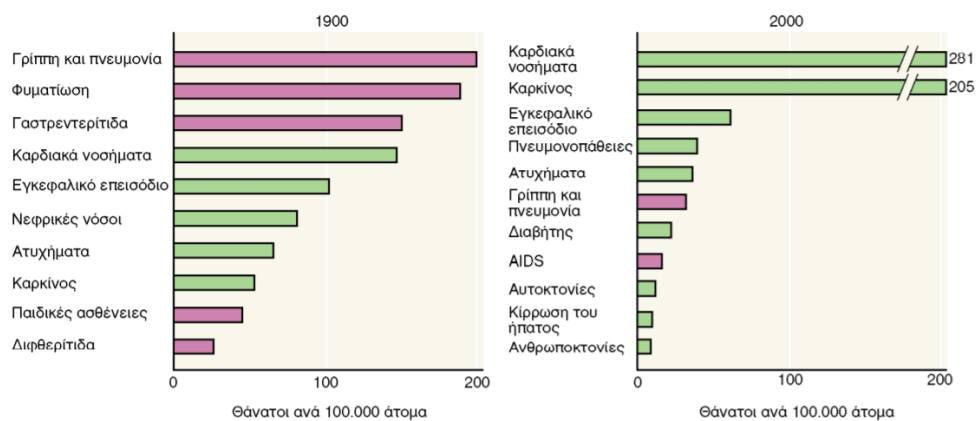
Τα τραύματα, από την άλλη πλευρά, είναι πιο ευαίσθητα σε βακτηριακές λοιμώξεις κυρίως από Gram θετικά ή αρνητικά βακτήρια, ως αποτέλεσμα της σήψης [5] Συνεπώς, η ανάπτυξη νέων υλικών που ενεργοποιούν και προάγουν την επιθηλιοποίηση των κυττάρων με αντιμικροβιακές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες καθίσταται αναγκαία.



Εικόνα 4: Γιατί αναπτύσσεται και εξαπλώνεται αντίσταση στα αντιβιοτικά [6]



Τα αντιβιοτικά προσφέρουν πολυάριθμα οφέλη στην ανθρώπινη ιατρική. Το 1900, 194 από κάθε 100.000 κατοίκους των ΗΠΑ πέθαναν από φυματίωση, η οποία τότε αποτελούσε μια από τις 3 βασικές αιτίες θανάτου. Σήμερα, οι ΗΠΑ έχουν ένα από τα χαμηλότερα ποσοστά κρουσμάτων στον κόσμο, σε μεγάλο βαθμό χάρη στην ανακάλυψη των αντιβιοτικών. Τα αντιβιοτικά χρησιμοποιούνται ως θεραπεία πολλών ασθενειών(πνευμονία, η οποία είναι σοβαρή και παρά τον εμβολιασμό) ενώ χρησιμοποιούνται και προληπτικά για την αποφυγή μόλυνσης. Η βιοασφάλεια, η προληπτική υγειονομική περίθαλψη και η ανάπτυξη νέων δραστικών αντιβιοτικών θα αποτελέσουν το κλειδί ώστε τα αντιβιοτικά να παραμένουν αποτελεσματικά.

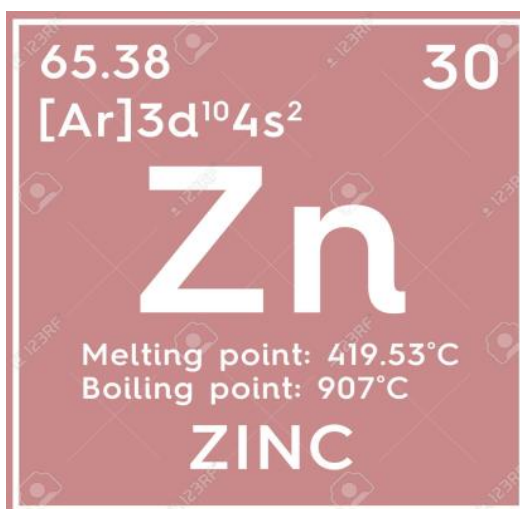


*Εικόνα 5: Θνησιμότητα από τα 10 κυριότερα αίτια θανάτου στις ΗΠΑ το 1900 και 2000.Οι μικροβιακές νόσοι παρίστανται με κόκκινο χρώμα. Οι λοιμώξεις ήταν η κυριότερη αιτία θανάτου το 1900.[7]*

## 2. Ψευδάργυρος

Ο ψευδάργυρος είναι ένα γαλαζωπό-άσπρο, διαμαγνητικό μέταλλο. Είναι λιγότερο πυκνό από το σίδηρο και έχει εξαγωνική δομή κρυστάλλου. Ο μεταλλικός

ψευδάργυρος είναι σκληρός και εύθραυστος στις περισσότερες θερμοκρασίες αλλά γίνεται ελατός μεταξύ 100 και 150°C. Είναι καλός αγωγός του ηλεκτρισμού και συγκριτικά με άλλα μέταλλα, ο ψευδάργυρος έχει σχετικά χαμηλό σημείο τήξης (~420 C) και βρασμού (~900°C). Το σημείο τήξης του είναι το χαμηλότερο όλων των στοιχείων μετάπτωσης εκτός από τον Υδράργυρο και το Κάδμιο.[8]



## 2.1 Αντιμικροβιακές Ιδιότητες

Ο ψευδάργυρος αποτελεί ένα από τα απαραίτητα στοιχεία στους ζωντανούς οργανισμούς και το δεύτερο σημαντικότερο ιόν μετάλλου μετάπτωσης στον ανθρώπινο σώμα. Ο ψευδάργυρος συναντάται σε περισσότερες από 3000 πρωτεΐνες στον άνθρωπο οι οποίες συμμετέχουν σε πολλές κυτταρικές λειτουργίες . Προσαρμόζει επίσης τη μεταγραφή και μετάφραση ορισμένων γονιδίων ενώ δίνει επιπλέον τη δυνατότητα σε ένα συγκεκριμένο είδος πρωτεϊνών να ρυθμίζει την έκφραση των γονιδίων. Σε πολλές ενζυματικές αντιδράσεις (για παράδειγμα στην περίπτωση της καρβονικής ανυδράσης, καρβοξυπεπτιδάσης και στην αλκοολική αφυδρογονάση) ο Ψευδάργυρος έχει αριθμό συντονισμού 4. Στις παραπάνω περιπτώσεις τα ελεύθερα τροχιακά του Zn(II),

καταλαμβάνονται από τρία άτομα αζώτου ιστιδίνης και ένα μόριο νερού. Το τελευταίο παράδειγμα είναι οι παράγοντες μεταγραφής που περιέχουν Zn με τη μορφή Zinc finger ( μιας πρωτεϊνικής δομής που χρησιμοποιεί ένα ή περισσότερα ιόντα ψευδαργύρου με συντονισμό για να σταθεροποιηθεί η πτυχή. Η οικογένεια πρωτεϊνών των zinc-fingers, αποτελείται από περίπου 2500 πρωτεΐνες διαχωρισμένες σε έξι κατηγορίες σύμφωνα με τον αριθμό καταλοίπων ιστιδίνης. και κυστεΐνης. Σε όλα αυτά, ο Zn(II) σταθεροποιεί αυτή τη δομή του δαχτύλου το οποίο μπορεί να συνδεθεί με την κύρια αύλακα της διπλής έλικας του DNA.[11]

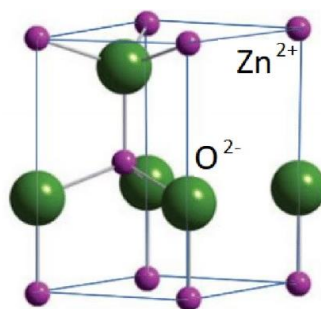
Στο σώμα ενός ενήλικα περιέχονται 2-3 g ψευδάργυρου (II), ενώ μόνο το 0,1% είναι καθημερινά επαναφορτιζόμενο ψευδάργυρο λαμβάνουμε κυρίως από τη διατροφή. Η έρευνα στην φαρμακευτική σήμερα, ασχολείται με την ανάπτυξη καινοτόμων συμπλόκων του Zn(II). Πολλά σύμπλοκα ψευδαργύρου έχουν αναφερθεί για την εξαιρετική αντιμικροβιακή τους δράση έναντι διαφορετικών μικροοργανισμών. Λόγω της ανθεκτικότητας που αναπτύσσουν οι μικροοργανισμοί στα αντιβιοτικά χρειάζονται νέα μεταλλοφάρμακα. Ως εκ τούτου, ο σχεδιασμός και η ανάπτυξη νέων μεταλλοφαρμάκων φιλικών προς το περιβάλλον υλικών με αντιμικροβιακή δράση αποτελεί φλέγον θέμα επιστημονικής πρόκλησης.[9]

Την τελευταία δεκαετία έχουν αναπτυχθεί νέα κυτταροτοξικά και μη-γενοτοξικά μεταλλοφάρμακα και διερευνάται ο ρόλος τους σε βιολογικές διεργασίες. Σήμερα, ο σχεδιασμός των μεταλλοφαρμάκων επικεντρώνεται σε μεταλλικά σύμπλοκα λόγω των ιδιοτήτων τους, κυρίως της ικανότητάς τους να στοχεύουν στο DNA. Τα ιόντα του Zn(II), παίζουν σημαντικό ρόλο καθώς ο ψευδάργυρος είναι γνωστό βιομέταλλο ευρισκόμενος σε περισσότερα από 3000 ένζυμα ζωντανών οργανισμών. Τα σύμπλοκα του Zn(II) έχουν ποικίλες ιδιότητες κάποιες από τις οποίες είναι πως αποτελούν

αποτελεσματικούς αντιβακτηριδιακούς παράγοντες, μπορούν και παρεμβάλλονται στο DNA, λειτουργούν ως ραδιοπροστατευτικά καρκινικών όγκων, ως φωτοευαισθητοποιητές, και ως αντιδιαβητικά ινσουλινομιμητικά. Ακόμη, πρόσφατες μελέτες μας δείχνουν πως σύμπλοκα του Zn(II) λόγω της χαμηλής τοξικότητας και τις ελάχιστες παρενέργειες που παρουσιάζουν, θα μπορούσαν να αποτελέσουν πιθανούς αντικαρκινικούς παράγοντες.[10]

Σε σύμπλοκα του Zn που έχουν συντεθεί μέχρι σήμερα, το βέλτιστο επίπεδο των ιόντων Zn(II) στα μικροβιακά κύτταρα κυμαίνεται από  $10^{-7}$  με  $10^{-5}$  M ανάλογα με το βακτηριακό στέλεχος. Συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από  $10^{-4}$  διαταράσσουν την ομοιόσταση των ιόντων Zn(II) και ενισχύεται η διαπερατότητά τους μέσω της κυτταρικής μεμβράνης και αυτό έχει κυτταροτοξικές επιδράσεις στους προκαρυώτες.

Η μερική διάλυση των σωματιδίων του οξειδίου του ψευδαργύρου (ZnO) απελευθερώνει ιόντα  $Zn^{2+}$  σε υδατικό εναιώρημα που συμβάλλει στην αντιμικροβιακή δράση του ZnO. Εκτός από τη δραστηριότητα των διαλυτών ειδών ψευδαργύρου που είναι κοινή με τα υδατοδιαλυτά άλατα ψευδαργύρου, το ZnO συνδυάζει δύο επιπρόσθετους μηχανισμούς αντιμικροβιακής δράσης που συμπληρώνουν τη δράση του ως συντηρητικού σε τοπικά σκευάσματα: δημιουργία δραστικών ειδών οξυγόνου και με άμεση επαφή με τα κύτταρα τοίχους.[12]



Εικόνα 6 : 3D δομή του οξειδίου του ψευδαργύρου[13]

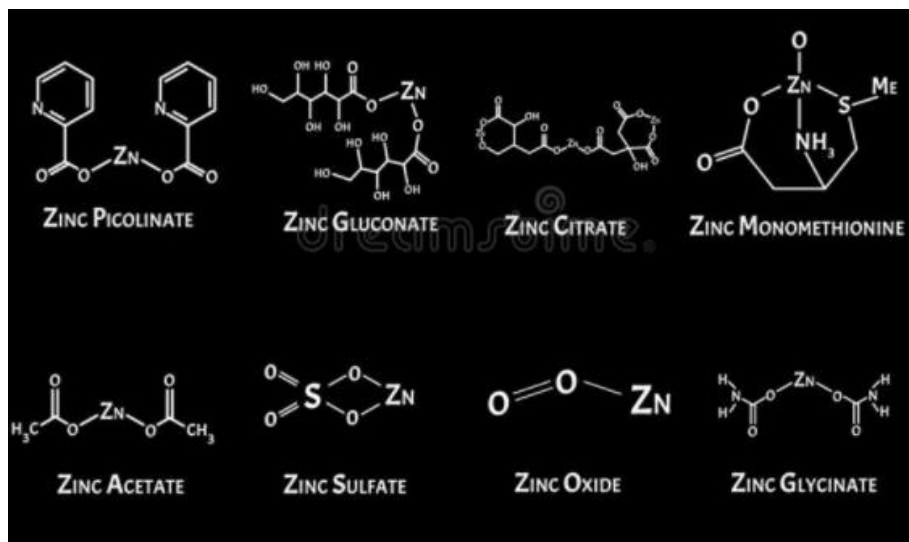
Ο οξικός ψευδάργυρος έχει μεγαλύτερη αντιμικροβιακή δράση έναντι των *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* σε σχέση με *Pseudomonas aeruginosa* με αποτελεσματικότητα πάνω από  $11 \text{ mmol L}^{-1}$  υπολογιζόμενη σε  $\text{Zn(II)}$ . . Τρεις μηχανισμοί έχουν προταθεί για αδιάλυτες ενώσεις  $\text{Zn}$  όπως το  $\text{ZnO}$ : παραγωγή δραστικών ειδών οξυγόνου (ROS) , η καταστροφή των κυτταρικών τοιχωμάτων, η άμεση επαφή με μικροβιακές μεμβράνες και η εγγενής κυτταροτοξική δράση που παρατηρείται με την απελευθέρωση ιόντων  $\text{Zn}^{2+}$ .

Όσον αφορά τα νανοσωματίδια του  $\text{ZnO}$ , έχει βρεθεί ότι η δραστηριότητα του  $\text{ZnO}$  εξαρτάται από το μέγεθος των σωματιδίων και την παρουσία ορατού φωτός. Η MIC έναντι του *S. aureus* βρέθηκε να είναι  $1 \text{ mM}$  για μικρότερα νανοσωματίδια  $\text{ZnO}$  ( $8 \text{ nm}$ ), αλλά  $15 \text{ mM}$  (ή  $1,2 \text{ mg mL}^{-1}$ ) για μεγαλύτερα ( $50\text{--}70 \text{ nm}$ ).

Δοσοεξαρτώμενη δυνατότητα αναστολής ανάπτυξης έναντι του *Escherichia Coli* παρουσιάζει επίσης ο χλωριούχος ψευδάργυρος. Ακόμη, ο θειικός ψευδάργυρος χρησιμοποιείται σε προϊόντα στοματικής φροντίδας σε περιεκτικότητα σε  $\text{Zn(II)}$  να κυμαίνεται μεταξύ  $0.02\text{--}0.5\%$ . Έχει ακόμη διαπιστωθεί πως η χρήση άλλων αλάτων ψευδαργύρου σε τέτοια προϊόντα, μπορεί να αναστείλλει τον σχηματισμό πλάκας.[11]

Δοσοεξαρτώμενη επίδραση έχει παρατηρηθεί επίσης και για το οξείδιο του ψευδαργύρου και τον γλυκονικό ψευδάργυρο. Το Challenge Test, που χρησιμοποιείται στη φαρμακοβιομηχανία και βιομηχανία καλλυντικών για τον έλεγχο της μικροβιολογικής ασφάλειας υπολογίζοντας την ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (MIC) και την ελάχιστη βακτηριοκτόνο συγκέντρωση (MBC), έχει δείξει πως το γλυκονικό άλας ψευδαργύρου έχει υψηλότερη αντιμικροβιακή δράση σε σχέση με το οξείδιο του ψευδαργύρου. Ο γλυκονικός ψευδάργυρος είναι περισσότερο

αποτελεσματικός έναντι των *A. brasiliensis*, *E. coli* και *C. albicans*, όμως το υπερκείμενο οξείδιο του ψευδαργύρου είναι πιο δραστικό έναντι του *S. aureus* και του *P. Aeruginosa*.

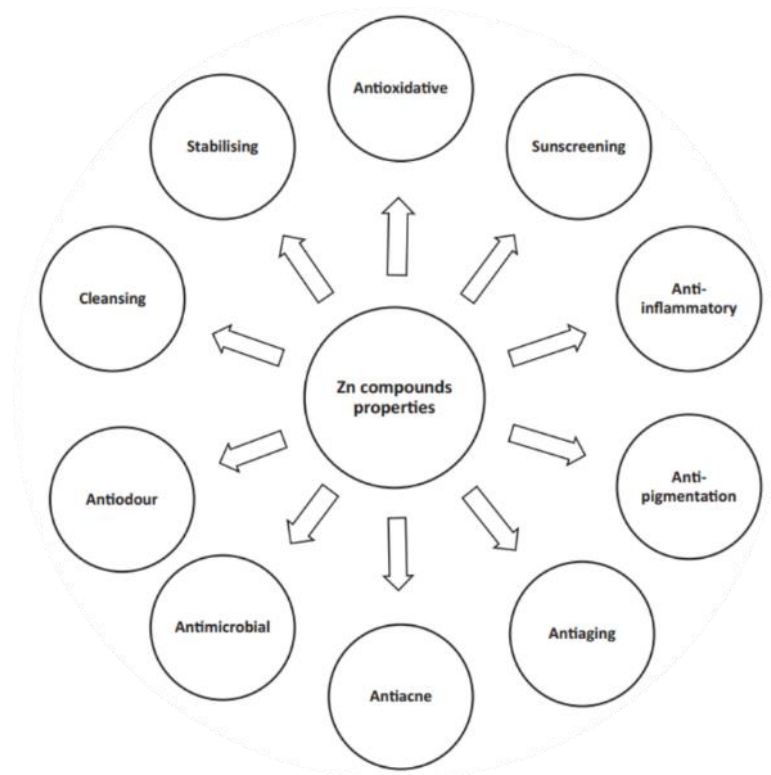


Εικόνα 7: Μοριακή δομή συμπλόκων ψευδαργύρου[14]

Μπορεί να γίνει μια βασική διάκριση στον αντιμικροβιακό μηχανισμό που έχει παρατηρηθεί μεταξύ συμπλόκων ψευδαργύρου που χρησιμοποιούνται από διαλυτά είδη και από αδιάλυτα είδη. Στην περίπτωση των διαλυτών ειδών, παρατηρείται αλληλεπίδραση μεταξύ των ιόντων  $Zn^{2+}$  και της κυτταρικής μεμβράνης, οδηγεί σε αποσταθεροποίηση και ενισχυμένη διαπερατότητά του, ενώ στην περίπτωση των αδιάλυτων ειδών, τα νουκλειικά οξέα πιστεύεται ότι αλληλεπιδρούν με τα ιόντα  $Zn^{2+}$ , προκαλώντας δυσλειτουργίες στα ένζυμα που συμμετέχουν στην κυτταρική αναπνοή.[11]

### 2.1.1 Ψευδάργυρος και Προϊόντα περιποίησης

Είναι γνωστό ότι όντα ψευδαργύρου χρησιμοποιούνται ευρέως και σε καλλυντικά προϊόντα. Καταλαβαίνουμε λοιπόν πως ο Ψευδάργυρος( συγκεκριμένα Zn(II)) διαθέτει ένα πολυλειτουργικό προφίλ ενώ αποτελεί και βασικό χημικό στοιχείο στο ανθρώπινο σώμα και ταξινομείται ως ιχνοστοιχείο μαζί με άλλα μέταλλα. Ένας μέσος άνθρωπος διαθέτει περίπου 2g Zn από τα οποία το 60% βρίσκεται στους μύες 30% στα οστά και περίπου το 6% στο δέρμα.



Εικόνα 8: Ιδιότητες που παρουσιάζουν σύμπλοκα του Zn[11]

Σε προϊόντα περιποίησης δέρματος, οι ενώσεις του ψευδαργύρου που χρησιμοποιούνται συνήθως είναι άλατα, σύμπλοκα, το οξείδιο του Zn που δε διαλύεται σχεδόν καθόλου στο νερό.[11] Η συγκέντρωση του Ψευδαργύρου διαφέρει μεταξύ των στιβάδων του δέρματος , με την ποσότητα του Zn στο κατώτερο στρώμα του δέρματος

να εκτιμάται ότι είναι το  $\frac{1}{6}$  αυτής σε επιδερμικής στιβάδας ενώ μειώνεται με την ηλικία στην επιδερμίδα. Αυτή η μείωση της συγκέντρωσης ψευδαργύρου μπορεί να είναι συνέπεια της μείωσης της τοπικής ενζυμικής δραστηριότητας, και έτσι τα κατάλληλα καλλυντικά προϊόντα που περιέχουν ιόντα Zn μπορούν να συμβάλλουν στην πρόληψη της γήρανσης του δέρματος.[11]

Στα προϊόντα περιποίησης και γενικότερα σε δερματολογικά προϊόντα, χρησιμοποιούνται ιόντα ψευδαργύρου ως αντιμικροβιακά συντηρητικά και βιοκτόνα. Οι ενώσεις που επιλέγονται για αυτόν τον σκοπό πρέπει να απελευθερώνουν υψηλή συγκέντρωση των  $Zn^{2+}$  και χρησιμοποιούνται είτε διαλυμένα σε υδατικά διαλύματα είτε ως στερεά σε σκόνη.[12]

## 2.2 Ψευδάργυρος στον άνθρωπο

Η περιεκτικότητα Ψευδαργύρου στον ανθρώπινο οργανισμό, εξαρτάται κυρίως από την διαιτητική πρόσληψη. Οι μέσες τιμές Zn που απαιτεί ένας άνθρωπος διαφέρουν ανάλογα με το μέγεθος του σώματος και την γενική κατάσταση του οργανισμού. Ο ψευδάργυρος βρίσκεται σε 3000 από τις εκατοντάδες χιλιάδες πρωτεΐνες του ανθρώπινου σώματος και σε περισσότερους από 12 τύπων κυττάρων στο ανθρώπινο σώμα περιέχουν ιόντα ψευδαργύρου. Αποτελεί συστατικό των σιελογόνων αδένων, του προστάτη, του ανοσοποιητικού συστήματος και του εντέρου.

Σημαντικός παράγοντας που πρέπει να λαμβάνεται υπόψιν, είναι η αναστολή απορρόφησης Zn λόγω αλληλεπίδρασης με το φυτικό άλας, που εντοπίζεται στις φυτικές ίνες. Αν και ο ψευδάργυρος περιέχεται σε πολλά τρόφιμα όπως το κρέας, τα ψάρια, τα αυγά, όσπρια και δημητριακά ολικής άλεσης, μπορεί να απορροφάται σε



πολύ μικρό βαθμό ενώ τα ιόντα Zn(II) αλληλεπιδρούν και με άλλα δισθενή ιόντα συμπεριλαμβανομένου του ασβεστίου, του του χαλκού και του σιδήρου. Η απορρόφησή του μπορεί να αυξηθεί με την πρόσληψη του ως χηλική ένωση.

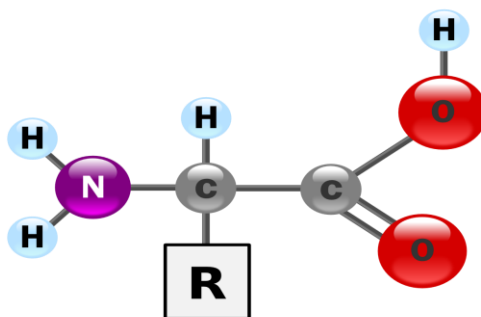
Αν και η τροφή είναι η κύρια πηγή ψευδαργύρου και ο καλύτερος τρόπος για την πρόληψη της ανεπάρκειας σε αυτόν είναι μια ισορροπημένη διατροφή, ο Zn(II) χορηγείται και σε μορφή συμπληρώματος διατροφής ακόμη και σε φάρμακα. Οι μορφές του που μπορούν να χορηγηθούν από το στόμα είναι ο θειικός, ο γλυκονικός, ο οξικός ψευδάργυρος και το ασπαραγινικό άλας.[11]

### **2.2.1 Τοξικότητα Zn**

Αν και ο ψευδάργυρος αποτελεί απαραίτητο στοιχείο για έναν υγιή ανθρώπινο οργανισμό, η υπερβολική ποσότητα αυτού μπορεί να προκαλέσει πρόβλημα. Η υπερβολική απορρόφηση αυτού, επηρεάζει την απορρόφηση άλλων μετάλλων καταστέλλοντας για παράδειγμα την απορρόφηση Χαλκού και Σιδήρου. Όσον αφορά τα φυτά, ασπόνδυλα και σπονδυλωτά ψάρια, ιόντα ψευδαργύρου σε διάλυμα είναι πολύ τοξικά ενώ έχει αποδειχθεί ότι μικρομοριακές ποσότητες αυτών, θανατώνουν διάφορους οργανισμούς. Τέλος, ο Zn αποτελεί και ρύπο που ευθύνεται για τη μόλυνση των υδάτων και συμβάλλει στην εμφάνιση ευτροφισμού, φαινόμενο κατά το οποίο αυξάνεται υπέρμετρα η συγκέντρωση των θρεπτικών στοιχείων, μειώνεται το διαλυμένο οξυγόνο στο νερό και συνεπώς η αλλοίωση της βιοποικιλότητας σε αυτό.[12]

### 3. Αμινοξέα

Τα αμινοξέα είναι μόρια που αποτελούνται από ένα άτομο άνθρακα στο κέντρο, που ονομάζεται α-άνθρακας. Στον α-άνθρακα ενώνεται μια αμινομάδα (-NH<sub>2</sub>), μια καρβοξυλομάδα (-COOH) και μια πλευρική ομάδα R, η οποία συνδέεται με αυτόν μέσω ομοιοπολικού δεσμού. Τα αμινοξέα αποτελούν τους δομικούς λίθους των πρωτεϊνών.[15]



Εικόνα 9 : Η γενική δομή ενός α-αμινοξέος. Η αμινομάδα βρίσκεται στα αριστερά και η καρβοξυλομάδα στα δεξιά[16]

Η πλευρική ομάδα που συμβολίζεται με το γράμμα R, είναι χαρακτηριστική και διαφορετική για κάθε αμινοξύ προσδίδοντάς του μοναδικές χημικές ιδιότητες. Έτσι, τα αμινοξέα ταξινομούνται σε κατηγορίες ανάλογα με το είδος της πλευρικής ομάδας και μπορεί να συμπεριφέρονται ως ασθενή οξέα, ως ασθενείς βάσεις, ως υδρόφιλα (αν είναι πολικά), ή ως υδρόφοβα (αν είναι λιπόφιλα-μη πολικά).

Συγκεκριμένα:

Μη πολικά αμινοξέα	π.χ. Λευκίνη.	Διαθέτουν πλευρικές ομάδες με $-CH_2$ ή $-CH_3$
Πολικά, μη φορτισμένα αμινοξέα	π.χ. Θρεονίνη	Οι πλευρικές τους ομάδες έχουν οξυγόνο ή μόνο υδρογόνο (H)
Φορτισμένα αμινοξέα	π.χ. Γλουταμικό οξύ	Με πλευρικές ομάδες που έχουν οξέα ή βάσεις
Αρωματικά αμινοξέα	π.χ. Φαινυλαλανίνη	Πλευρικές ομάδες με οργανικό δακτύλιο στον οποίο εναλλάσσονται απλοί-διπλοί δεσμοί
Αμινοξέα που πραγματοποιούν εξειδικευμένες λειτουργίες	π.χ. Μεθειονίνη	Τείνει να καταλαμβάνει την πρώτη θέση σε μια αμινοξική αλληλουχία

Πίνακας 1: Κατηγορίες αμινοξέων και χαρακτηριστικά της παράλευρης ομάδας τους[15]

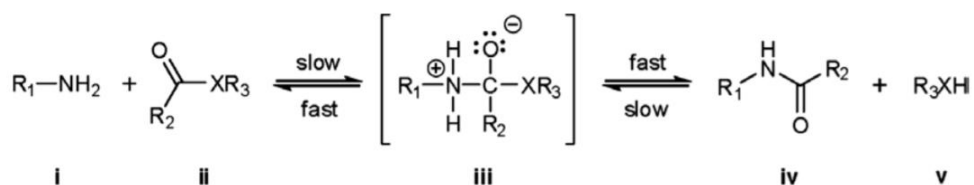
Αν και οι πρωτεΐνες είναι πολύπλοκα μόρια, μπορούν να αποτελέσουν πολυμερή μόνο με τα 20 παραπάνω αμινοξέα παραθετημένα σε καθορισμένη σειρά. Το μήκος των πρωτεϊνών κυμαίνεται από μικρές αλυσίδες, που αποτελούνται από 124 αμινοξέα, έως και μεγάλες αλυσίδες, αποτελούμενες από 4.563 αμινοξέα. Υπάρχουν πολλοί συνδυασμοί των 20 αυτών αμινοξέων και συγκεκριμένα για μια ακολουθία X-αμινοξέων υπάρχουν  $20^X$  συνδυασμοί που σχηματίζουν διαφορετικές πρωτεΐνες.[15]

20 αμινοξέα συνθέτουν τις πρωτεΐνες των ζωντανών οργανισμών και παρατίθενται παρακάτω:

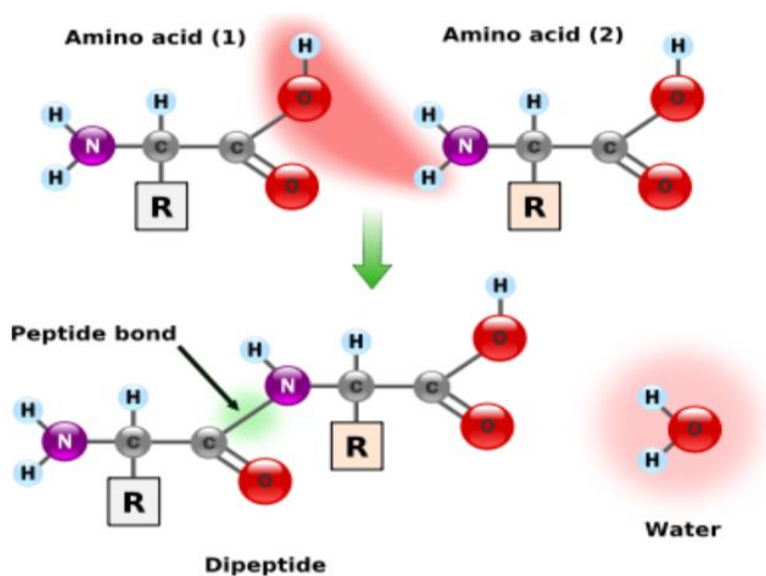
<b>Ελληνική Ονομασία</b>	<b>Διεθνής σύντμηση</b>	<b>Ελληνική Ονομασία</b>	<b>Διεθνής σύντμηση</b>
Αλανίνη	Ala	Λευκίνη*	Leu
Αργινίνη	Arg	Λυσίνη*	Lys
Ασπαραγίνη	Asn	Μεθειονίνη*	Met
Ασπαρτικό Οξύ	Asp	Φαινυλαλανίνη	Phe
Κυστεΐνη	Cys	Προλίνη	Pro
Γλουταμίνη	Gln	Σερίνη	Ser
Γλουταμικό οξύ	Glu	Θρεονίνη*	Thr
Γλυκίνη	Gly	Τρυπτοφάνη*	Trp
Ιστιδίνη	His	Τυροσίνη	Tyr
Ισολευκίνη*	Ile	Βαλίνη*	Val

*Πίνακας 2:* Τα αμινοξέα κατ' αλφαβητική διεθνή ονομασία. Ο αστερίσκος απεικονίζεται στα 8 βασικά αμινοξέα[15]

Διάφορα αμινοξέα συνδέονται μεταξύ τους με πεπτιδικούς δεσμούς ώστε να σχηματίσουν μια πρωτεΐνη. Συγκεκριμένα η καρβοξυλομάδα του ενός αμινοξέος αντιδρά με την αμινομάδα του διπλανού του απελευθερώνοντας ένα μόριο νερού ενώ δημιουργείται ο πεπτιδικός δεσμός όπως φαίνεται παρακάτω:



Εικόνα 10: Μηχανισμός σχηματισμού πεπτιδικού δεσμού (Fields and Noble, Solid-Phase Peptide-Synthesis Utilizing 9-Fluorenylmethoxycarbonyl Amino-Acids 1990).



Εικόνα 11: Σχηματισμός πεπτιδικού δεσμού [15]

### 3.1 Ιδιότητες Αμινοξέων

Τα περισσότερα αμινοξέα διαλύονται στο νερό και είναι επαμφοτερίζοντα. Όσον αφορά τη διαλυτότητά τους είναι διαφορετική για κάθε αμινοξύ και εξαρτάται από το pH. Υπάρχει ένα χαρακτηριστικό pH για κάθε αμινοξύ στο οποίο το συγκεκριμένο αμινοξύ είναι λιγότερο διαλυτό και ονομάζεται ισοηλεκτρικό σημείο (pI). Εκεί ιοντίζονται ομάδες αντίθετου φορτίου τόσες θετικές όσες και αρνητικές και

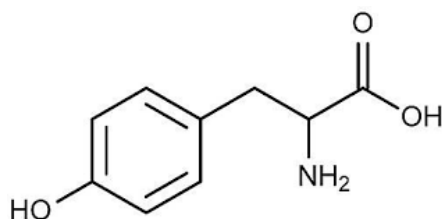
για αυτό το αμινοξύ είναι ηλεκτρικά ουδέτερο ακόμη και αν το αμινοξύ διαθέτει διαφορετικό αριθμό θετικών και αρνητικών ομάδων. [17]

## 3.2 Τυροσίνη

### 3.2.1 Γενικά

Η τυροσίνη είναι ένα μη απαραίτητο αμινοξύ, μεγάλου μεγέθους, ουδέτερου φορτίου και συναντάται τόσο σε ζωικές όσο και σε φυτικές πρωτεΐνες σε ποικίλες ποσότητες. Το όνομά της προέρχεται από το ελληνικό 'tyros' δηλαδή τυρί, καθώς ανακαλύφθηκε για πρώτη φορά από τον Γερμανό χημικό Justus von Liebig το 1846 στην καζεΐνη, πρωτεΐνη που βρίσκεται στο τυρί. [18]

Η L-τυροσίνη διαθέτει μια μη φορτισμένη αλλά πολική πλευρική ανθρακική αλυσίδα. Συντίθεται κυρίως στο ήπαρ και σε μικρότερο ποσοστό στον εγκέφαλο. Παράγεται μέσω της υδροξυλίωσης της φαινυλαλανίνης που είναι απαραίτητο αμινοξύ ενώ αποτελεί πρόδρομη ένωση των νευροδιαβιβαστών κατεχολαμίνης μέσω της δράσης υδροξυλάσης της τροσίνης.



Εικόνα 12 : Δομή της τυροσίνης ή 4-υδροξυ φαινυλαλανίνη [19]

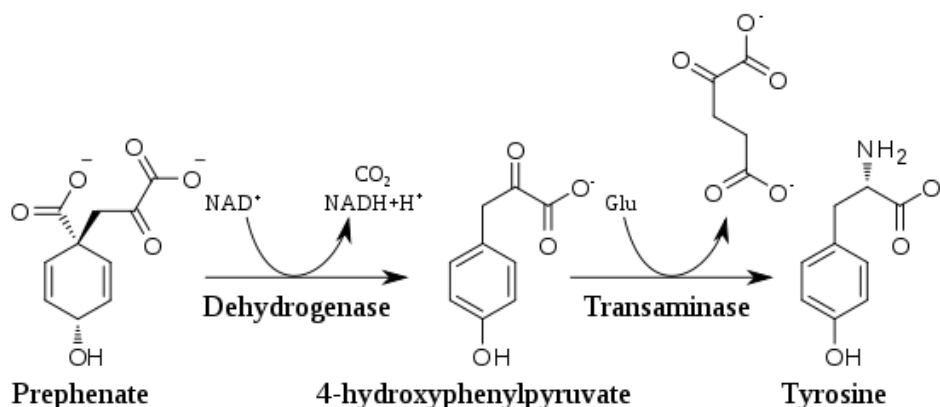
### 3.2.2 Λειτουργικότητα

Σημαντικό ρόλο στη δράση της τυροσίνης παίζει ο φαινολικός δακτύλιος που διαθέτει ενώ διαθέτει ένα υδρόφιλο και ένα υδρόφοβο τμήμα γεγονός που παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον. Βρίσκεται σε πρωτεΐνες που συμμετέχουν σε διαδικασίες μεταγωγής σήματος. Δέχεται φωσφορικές ομάδες που μεταφέρουν οι πρωτεϊνικές κινάσες (ονομάζονται υποδοχείς κινασών τυροσίνης) ενώ εάν φωσφορυλιωθεί η υδροξυλομάδα, η δραστηριότητα της πρωτεΐνης στοχου αλλάζει.

Το φωτοσύστημα II βρίσκεται στους χλωροπλάστες, αποτελεί κατάλοιπο της τυροσίνης και συμμετέχει στη φωτοσύνθεση. Δρα ως δότης ηλεκτρονίων για να μειωθεί η οξειδωμένη χλωροφύλλη και αποπρωτονιώνεται η υδροξυλομάδα του φαινολικού δακτυλίου. Δημιουργείται μια ρίζα η οποία μειώνεται στο φωτοσύστημα II από τετραπυρηνικό σύμπλοκο του Μαγγανίου.

### 3.2.3 Βιοσύνθεση τυροσίνης

Στα φυτά και σε πολλούς μικροοργανισμούς, η τυροσίνη βιοσυντίθεται από το prephenate που αποτελεί ενδιάμεση ένωση του shikimate pathway . Το προφαινικό αποκαρβοξυλιώνεται οξειδωτικά με δέσμευση της υδροξυλομάδας ώστε να δώσει p-υδροξυμεθυλπυροσταφυλικό το οποίο με τη βοήθεια του γλουταμικού που δρα ως πηγή αζώτου, τρανσαμινώνεται και προκύπτει τη τυροσίνη και το α-κετογλουταρικό όπως φαίνεται παρακάτω.



Εικόνα 13: Βιοσύνθεση της τυροσίνης.[18]

Στα θηλαστικά η τυροσίνη βιοσυντίθεται από την L-φαινυλαλανίνη η οποία λαμβάνεται μέσω των τροφίμων. Αυτή η αντίδραση καταλύεται από την υδροξυλάση της φαινυλαλανίνης. Το ένζυμο αυτό είναι μια μονο-οξυγενάση και καταλύει την αντίδραση προσθέτοντας μια υδροξυλομάδα στον άνθρακα της θέσης 6 του αρωματικού δακτυλίου της L-φαινυλαλανίνης και έτσι προκύπτει το μόριο της L-τυροσίνης. Έπειτα τα μόρια της L-τυροσίνης παίρνουν μέρος στις μεταβολικές οδούς της μελανίνης και των θυρεοειδικών ορμονών T<sub>3</sub> και T<sub>4</sub>. [18]

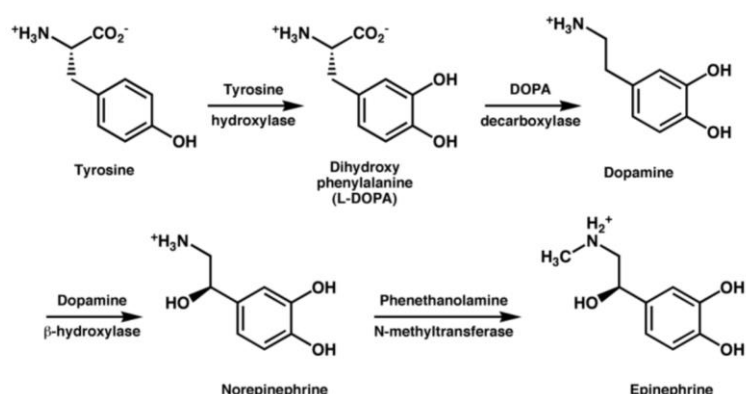
### 3.2.4 Μεταβολισμός

Κατάλοιπα τυροσίνης μπορούν και σημαίνονται με μια φωσφορική ομάδα και προκύπτει η φωσφοτυροσίνη. Η φωσφορυλίωση της τυροσίνης είναι σημαντική στις διαδικασίες μεταγωγής σήματος και στη ρύθμιση ενζυμικής δραστηριότητας. Εκτός από φωσφορυλίωση, τα κατάλοιπα τυροσίνης μπορούν να υποστούν και θείωση με την προσθήκηθειικής ομάδας.



### 3.2.5 Τυροσίνη και ορμόνες

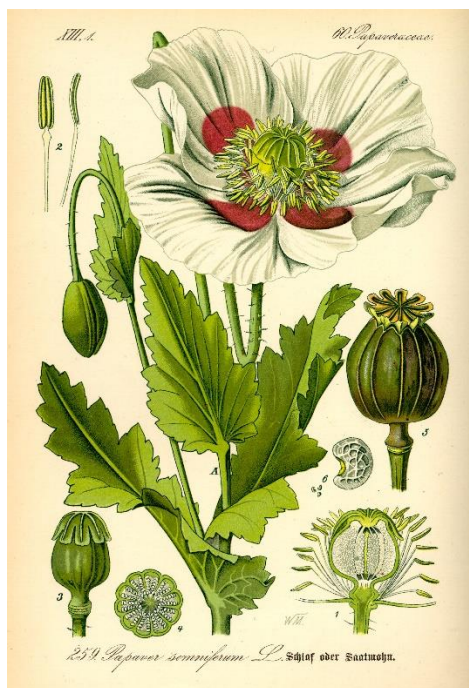
Από την τυροσίνη παράγονται οι θυρεοειδικές ορμόνες στο κολλοειδές του θυρεοειδούς T3 (τριιωδοθυρονίνη) και T4 (θυροξίνη). Οι κατεχολαμίνες είναι ορμόνες που παράγουν ο εγκέφαλος, νευρικοί ιστοί και τα επινεφρίδια. Ο ανθρώπινος οργανισμός παράγει κατεχολαμίνες όταν υφίσταται ψυχολογικό και σωματικό στρες. Κάποιες από τις κατεχολαμίνες είναι η ντοπαμίνη, η επινεφρίνη και νορεπινεφρίνη.



Εικόνα 14: Βιοσύνθεση των ορμονών ντοπαμίνης, νορεπινεφρίνης και επινεφρίνης από την τυροσίνη [18]

Αλλαγές στην διαθεσιμότητα της L-τυροσίνης στον εγκέφαλο, επηρεάζουν τη σύνθεση τόσο των ορμονών ντοπαμίνης όσο και της νορεπινεφρίνης σε πειραματόζωα και πιθανώς στον άνθρωπο. Σε στρεσογόνες συνθήκες, αυξάνεται η απελευθέρωση κατεχολαμινών και συνεπώς εξαντλούνται τα επίπεδά τους. Η εξάντληση αυτή διορθώνεται με χορήγηση της L-τυροσίνης. [20] Αξιοσημείωτο γεγονός αποτελεί ότι όταν γίνεται χορήγηση της τυροσίνης μέσω φαρμάκων πριν από οξεία έκθεση σε στρες, έχει αποδειχθεί ότι αυξάνεται η απελευθέρωση κατεχολαμινών στον εγκέφαλο. Συμπληρώματα τυροσίνης λοιπόν έχει φανεί να ανακουφίζουν από τις επιπτώσεις του στρες ενώ βελτιώνεται την απόδοση κάτω από παρόμοιες συνθήκες. [21]

Τέλος η τυροσίνη αποτελεί πρόδρομο μόριο της χρωστικής μελανίνης αλλά και αλκαλοειδών, συγκεκριμένα στο *Papaver somniferum*, την οπιούχα παπαρούνα, η τυροσίνη χρησιμοποιείται ώστε να παραχθεί το αλκαλοειδές μορφίνης.

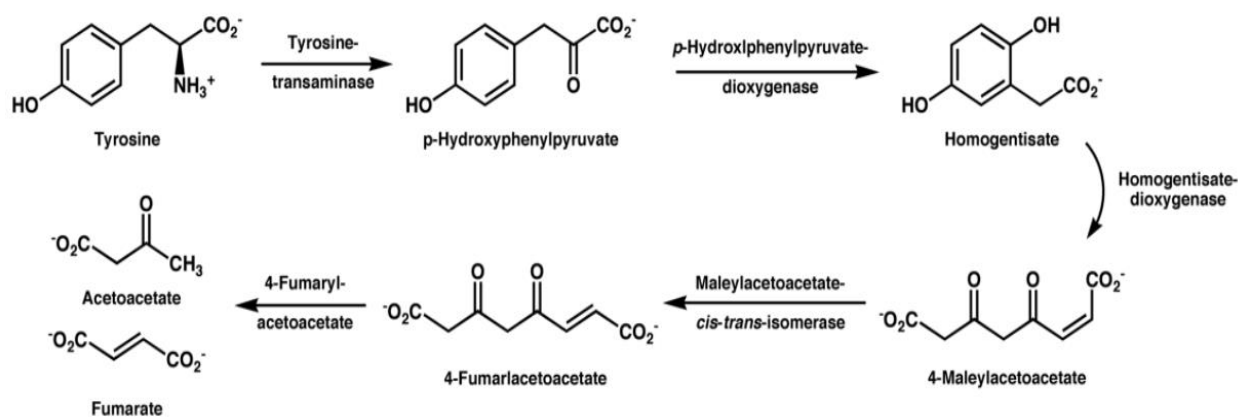


Εικόνα 15: Οπιούχα Παπαρούνα *Papaver somniferum*[22]

### 3.2.6 Αποσύνθεση τυροσίνης

Η αποσύνθεση της τυροσίνης προς ακετοξικό και φουμαρικό απαιτεί τη δράση δυο διοξυγενασών και τα τελικά προϊόντα εισέρχονται στον κύκλο κιτρικού οξέος. Ξεκινάει με μια τρανσαμίνωση εξαρτώμενη από α-κετογλουταρικό με τη βοήθεια τρανσαμινάσης τη τυροσίνης προς σχηματισμό p-υδροξυμεθυλπυροσταφυλικό. Έπειτα συμβαίνει οξείδωση την οποία καταλύει η διοξυγενάση του παρα-υδροξυμεθυλπυροσταφυλικό και διασπάται το CO<sub>2</sub>. Μια δεύτερη διοξυγενάση καταλύει μια δεύτερη οξείδωση για να διασπαστεί ο αρωματικός δακτύλιος. Με την εισχώρηση

ενός ακόμη O<sub>2</sub>, προκύπτει το μηλεΐλακετοξικό. Στο επόμενο στάδιο μια ισομεράση καταλύει την περιστροφή της καρβοξυλομάδας που προκύπτει από την υδροξυλομάδα μέσω οξείδωσης. Μια υδρολάση προσθέτει ένα μόριο νερού και διασπά το φουμαρυλακετοξικό. Αυτό οδηγεί σε απελευθέρωση του φουμαρικού και του ακετοξικού( μεταβολίτες του κύκλου του κιτρικού οξέος).



Εικόνα 16: Απούνθεση της τυροσίνης προς φουμαρικό και ακετοξικό[18]

### 3.2.7 Τυροσίνη και μεταλλικά ιόντα

Η συγκέντρωση της L-τυροσίνης στον οργανισμό μπορεί να μειωθεί καθώς μπορεί και σχηματίζει δημιουργεί με βιοϊόντα όπως για παράδειγμα Zn<sup>2+</sup> και Cu<sup>2+</sup>. Η τυροσίνη όπως και άλλα αμινοξέα μπορεί και συνδέεται με μεταλλικά ιόντα μέσω του ατόμου Z της αμινομάδας και του O της καρβοξυλομάδας που διαθέτει στο μόριό της σχηματίζοντας έτσι έναν χηλικό δακτύλιο. Εκτός από αυτόν τον τρόπο σύνδεσης, μπορεί να ενωθεί και γεφυρωτικά με μεταλλικά ιόντα και σπανιότερα μέσω συντονισμού του φαινολικού οξυγόνου.[23]

#### 4. Μεταλλικά σύμπλοκα με αμινοξέα

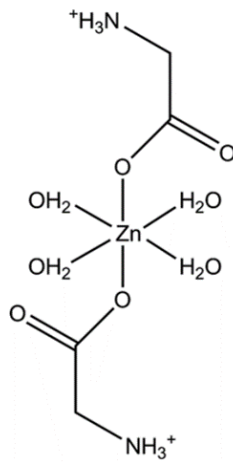
Γενικά οι οργανικές-ανόργανες δομές που αποτελούνται από κατιονικά μεταλλικά κέντρα συνδεδεμένα με οργανικούς υποκαταστάτες καλούνται πολυμερή συντονισμού με πιθανές εφαρμογές ως θερμοανθεκτικά υλικά, ημιαγωγοί, αντιμικροβιακά υλικά κ.α.[23] Ενσωματώνοντας λοιπόν μέταλλα σε οργανικά μόρια προκύπτουν πολυμερή συντονισμού με διαφορετικές ιδιότητες από αυτές των οργανικών πολυμερών. Τέτοια πολυμερή με αντιμικροβιακές ιδιότητες, έχουν εφαρμογές σε ευρύ φάσμα προϊόντων όπως πχ σε μεμβράνες τροφίμων που δεν είναι επιθυμητή η ανάπτυξη μικροοργανισμών.

Ο  $Zn^{2+}$  έχει τη δυνατότητα να δέχεται μονήρη ζεύγη ηλεκτρονίων και συμπλοκοποιείται με διάφορους υποκαταστάτες. Σε μια αντίδραση συμπλοκοποίησης, ο  $Zn^{2+}$  δρα ως οξύ κατά Lewis και οι υποκαταστάτες ως βάσεις Lewis. Συνήθως χρησιμοποιούνται άλατα μετάλλων και συγκεκριμένα τα άλατα ψευδαργύρου που έχουν ιοντικούς δεσμούς, σε υδατικό διάλυμα έχουν ασθενώς όξινο χαρακτήρα. Όσο ισχυρότερο είναι το οξύ από το οποίο προέρχεται το ανιόν, τόσο περισσότερο όξινη είναι η αντίδραση του άλατος. Το  $Zn^{2+}$  ενώνεται με 6 μόρια νερού και δημιουργούν ένα ασθενές κατιόν  $[Zn(H_2O)_6]^{2+}$  και στη συνέχεια με υδρόλυση προκύπτει ιόν υδρονίου.

Στην περίπτωση του Zn, χρησιμοποιείται και το ZnO αν και πολύ δυσδιάλυτο στο νερό, διαλύεται σε ισχυρά οξέα και δίνει παρέχοντας ιόντα  $Zn^{2+}$  και σε ισχυρές βάσεις δίνοντας ανιόντα  $[Zn(OH)_4]^{2-}$

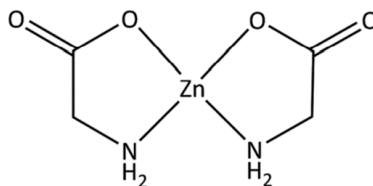
Σύμπλοκο Zn με το αμινοξύ γλυκίνη έχει σχηματιστεί και φαίνεται πως το μέταλλο με το συγκεκριμένο αμινοξύ μπορεί να συμπλοκοποιηθεί με ποικίλους τρόπους.

- Με ένα ή δυο οξυγόνα μέσω της καρβοξυλομάδας



Εικόνα 17: Ένταξη γλυκίνης μέσω της καρβοξυλομάδας[11]

- Χηλικά από άτομα οξυγόνου και αζώτου προς σχηματισμό χηλικών συμπλόκων.  
Αυτή η περίπτωση πραγματοποιείται όταν η γλυκίνη έχει ανιονική μορφή και διαθέτει μονήρες ζεύγος ηλεκτρονίων στο άζωτο:  $\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-COO}^-$



Εικόνα 18: Χηλικό σύμπλοκο Zn-glycine[11]

Η γλυκίνη όπως και όλα τα αμινοξέα, όταν βρίσκονται σε αμφοτερική μορφή, δρουν ως διδοντικοί υποκαταστάτες και μπορούν και γεφυρώνουν δυο μεταλλικά ιόντα μέσω των οξυγόνων της καρβοξυλομάδας τους.

Όσον αφορά τα αμινοξέα, αποτελούν βιοσυμβατούς υποκαταστάτες και μπορούν να μεταφέρουν το μεταλλικό ιον στον βιολογικό του στόχο αποτρέποντας τη μείωση του αριθμού οξειδωσής του υπό φυσιολογικές συνθήκες. Τα σύμπλοκα μετάλλων με αμινοξέα μπορεί να είναι πιο εκλεκτικά προς τα μη φυσιολογικά κύτταρα

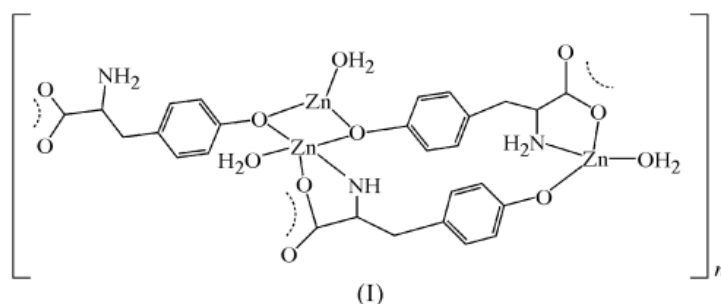
σε σχέση με τα φυσιολογικά. Αυτό οφείλεται στην υπερέκφραση των υποδοχέων αμινοξέων των μη φυσιολογικών κυττάρων.[39]

Με σκοπό τη συμπλοκοποίηση μετάλλων με αμινοξέα μπορούν να υποβοηθήσουν αυτή τη διαδικασία και άλλοι υποκαταστάτες όπως για παράδειγμα η διπυριδίνη. Δρα γεφυρωτικά και δημιουργεί μονο-, δις- και τριςδιάστατα πολυμερή (MOFs). Πράγματι, μελέτες σχετικές με τη οξειδοαναγωγική της δράση φαίνεται να συμβάλλουν στη δημιουργία μεταλλικών συμπλόκων. Με τα εως τώρα δεδομένα υπάρχει μόνο μια δομή διπυριδίνης με τυροσίνη μαζί με τον Zn: {[Zn(L-Tyr) (4,4' - bpy)<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)]NO<sub>3</sub> 2H<sub>2</sub>O}<sub>n</sub>. [24] Ενδιαφέρον παρουσιάζει και η αντίδραση γλυκίνης με νινυδρίνη. Όταν η νινυδρίνη αντιδράει με αμινοξέα, προκύπτει μια βάση Schiff χρώματος μωβ.(Ruhemann). Παρουσία μεταλλικών ιόντων δημιουργούνται έγχρωμα στερεά.[25]

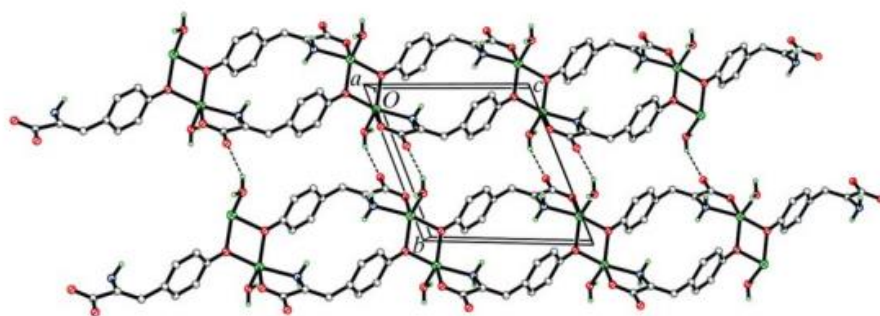
#### 4.1 Μεταλλικά σύμπλοκα με τυροσίνη

Μέχρι σήμερα τέσσερις κρυσταλλικές και μοριακές δομές συμπλόκων Zn(II) με τυροσίνη έχουν εναποτεθεί στο Cambridge Crystallographic Data Centre( CCDC).

➤ Αρχικά το (i) [Zn(Tyr)<sub>3</sub>(H<sub>2</sub>O)]<sub>n</sub>. [61]



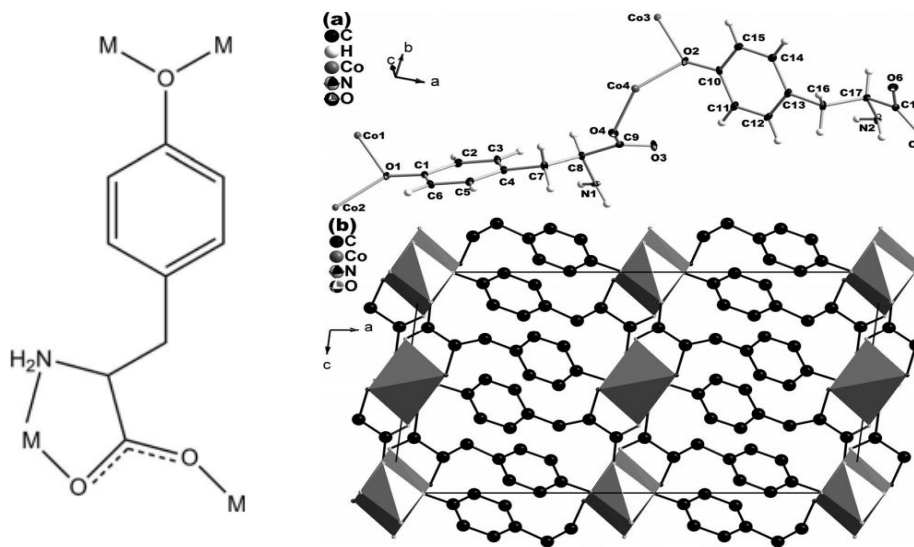
Εικόνα 19 : Σύμπλοκο Zn-Tyr [61]



Εικόνα 20: Το παραπάνω σύμπλοκο σχηματίζει ένα (100) φύλλου κατασκευασμένο από δεσμούς υδρογόνου [61]

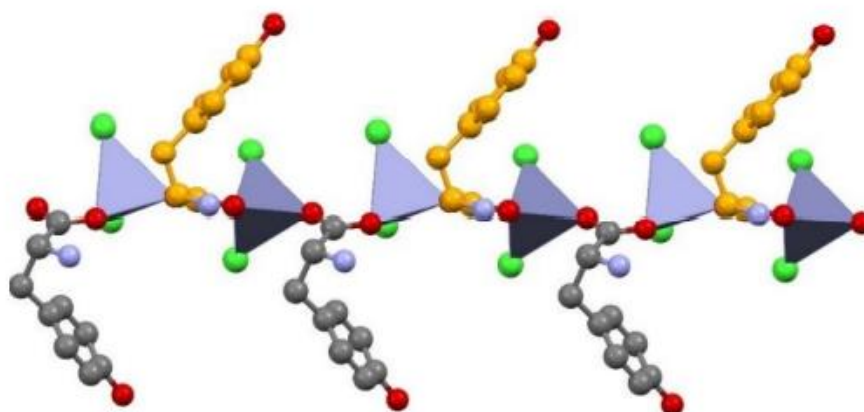
➤ Ένα ακόμη σύμπλοκο είναι το  $[Zn(L-Tyr)]_n$  αλλά και  $[Co(L-Tyr)]_n$  [62]

Η ασύμμετρη μονάδα  $L-tyrCo$ , περιέχει τέσσερα ιόντα  $Co^{2+}$  και δύο  $(l-tyr)_2$  υποκαταστάτες. Κάθε μόριο  $L$ -tyrosine σχηματίζει 5 δεσμούς με τέσσερα μεταλλικά άτομα.



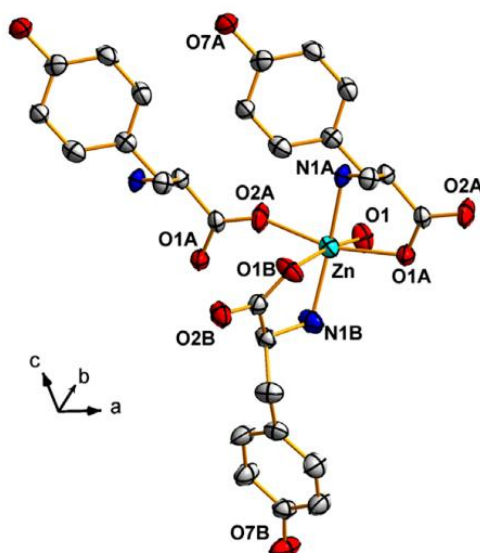
Εικόνα 21:  $[M(L-Tyr)]_n$  [62]

➤ Το  $[ZnCl_2Tyr_2]_n$  όπου και τα δύο οξυγόνα της καρβοξυλομάδας της τυροσίνης συμμετέχουν στην δέσμευση των κατιόντων  $Zn^{2+}$  [63]



Εικόνα 22:  $[\text{ZnCl}_2\text{Tyr}_2]_n$ [63]

- Τέλος το  $\{[\text{Zn}(\text{Tyr})_2(\text{H}_2\text{O})]\text{H}_2\text{O}\}_n$  στο οποίο ένα ανιόν τυροσίνης (A) συνδέεται με τον Ψευδάργυρο από το άτομο αζώτου της αμινομάδας και από τα δυο άτομα οξυγόνα της καρβοξυλομάδας, ενώ το δεύτερο ανιόν τυροσίνης (B) συνδέεται μέσω του ατόμου αζώτου και μόνο ενός άτομο οξυγόνου της καρβοξυλομάδας. Και τα δύο μόρια τυροσίνης δρουν ως χηλικοί υποκαταστάτες του  $\text{Zn}^{2+}$  [64]



Εικόνα 23: Σύμπλοκο  $\{[\text{Zn}(\text{Tyr})_2(\text{H}_2\text{O})]\text{H}_2\text{O}\}_n$ [64]



## 4.2 Τοξικότητα μεταλλικών συμπλόκων σε μικροοργανισμούς

Σύμπλοκα μετάλλων με υποκαταστάτες αμινοξέα, έχουν δείξει να εντείνουν τη λιπόφιλη φύση του μετάλλου και παράλληλα τον υδρόφοβο χαρακτήρα και συνεπώς τη λιποδιαλυτότητά του. Μπορούν να διαπερνούν πιο εύκολα τη βακτηριακή μεμβράνη συγκεκριμένα τη λιπιδική διπλοστοιβάδα. Μειώνεται και η δραστικότητα των ενζύμων που ευθύνονται για αναπνευστικές διεργασίες του βακτηρίου ενώ μπορούν και μετουσιώνονται πρωτεΐνες στο κύτταρο εμποδίζοντάς το να λειτουργεί φυσιολογικά.[37]

Συγκεκριμένα για τον ψευδάργυρο, η πρόσληψή του ελέγχεται από την ομοιόσταση. Όταν η συγκέντρωση του στα προκαρυωτικά κύτταρα υπερβεί τα  $10^{-7}$ - $10^{-5}$ M, διαταράσσεται η ομοιόσταση και ο ψευδάργυρος εισχωρεί στο βακτηριακό κύτταρο. Έτσι καταλήγει να δρα κυτταροτοξικά για το εκάστοτε βακτήριο. Έχει βρεθεί πως όταν άλατα του ψευδαργύρου διαλυθούν στο νερό, τα  $Zn^{2+}$  θα έχουν αντιμικροβιακή δράση ανάλογα με τη συγκέντρωσή τους στο διάλυμα και τη χρονική διάρκεια που θα βρίσκονται σε επαφή με το μικρόβιο. Δυο μηχανισμοί που υποκινούν ουσίες του ψευδαργύρου( οξικός και χλωριούχος ψευδάργυρος) αναφέρονται πως καταλήγουν τα βακτήρια σε θανάτωση:

- Αποσταθεροποίηση της βακτηριακής μεμβράνης με άμεση επαφή με αυτή και εισχώρηση των  $Zn^{2+}$
- Αφαίρεση λειτουργικότητας αναπνευστικών ενζύμων μέσω αλληλεπίδρασης με νουκλεϊκά οξέα.[12]

## 5 Καρβοξυμεθυλσελουλόζη (Carboxymethylcellulose)

Η καρβοξυμεθυλσελουλόζη παράγεται από την κυτταρίνη που έχει στο μόριό της ομάδες καρβοξυμεθυλίου ( $\text{CH}_2\text{-COOH}$ ). Έχει πολλές χρήσεις μια από τις οποίες είναι ως άλας νατρίου. Έχει εφαρμογές στα τρόφιμα, σταθεροποιεί γαλακτώματα αυξάνοντας το ιξώδες( πχ στα παγωτά), σε προϊόντα χαμηλών λιπαρών χωρίς γλουτένη, αλλά και σε άλλα προϊόντα όπως οδοντόκρεμες, απορρυπαντικά ως πολυμερές το οποίο δεσμεύει ρύπους, βαφές κ.α.. Στην οφθαλμολογία έχει εφαρμογή ως λιπαντικό για το μάτι σημαντικό στην ξηροφθαλμία. Η εφαρμογή του σε πληθώρα αντικειμένων βασίζεται στην μηδαμινή τοξικότητά του ενώ δεν προκαλεί αλλεργίες.

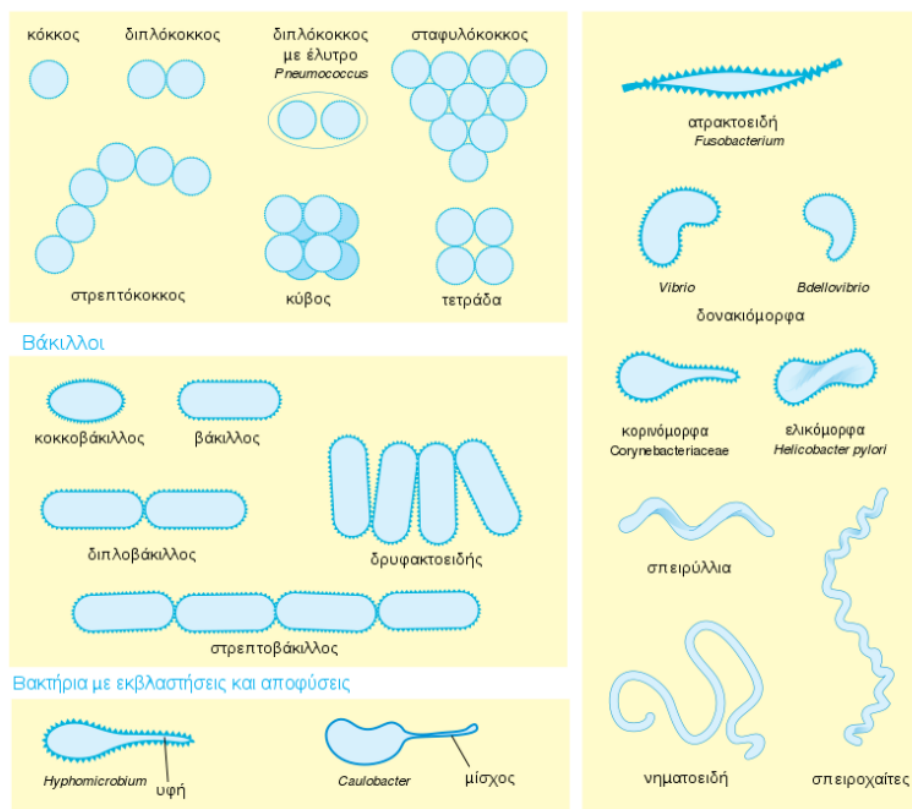
## 6. Μικροοργανισμοί

Τα βακτήρια είναι προκαρυωτικοί μονοκύτταροι οργανισμοί και μπορούν να βρεθούν στον άνθρωπο αλλά και στο έδαφος και τον ωκεανό. Τα βακτήρια παίζουν σημαντικό ρόλο στο να μας παρέχουν πολλά από τα τρόφιμα που καταναλώνουμε καθημερινά (πχ τυρί, γιαούρτι) αλλά και να μας βοηθούν σε λειτουργίες του οργανισμού μας όπως στην πέψη. Μπορεί όμως να μας προκαλέσουν βλάβη μολύνοντάς μας και προκαλώντας ασθένειες. Τα βακτήρια παρουσιάζονται με διάφορα σχήματα όπως σφαιρικό (κόκκοι), ραβδοειδές (βάκιλλοι), σπειροειδές (σπειρύλλια), καμπυλόγραμμες ράβδοι( δονάκια).

Σε μερικά είδη τα κύτταρα διακλαδίζονται ενώ σε άλλα ενώνονται μεταξύ τους σχηματίζοντας νήματα. Πολλά βακτήρια μένουν ακίνητα ενώ άλλα σε ορισμένα στάδια της εξέλιξής τους βγάζουν μαστίγια με τα οποία κινούνται μέσα στο νερό. Τα μαστίγια αυτά είτε είναι μεμονωμένα, πολικά τοποθετημένα στο άκρο του βακτηρίου, οπότε τα

βακτήρια αυτά ονομάζονται μονότριχα, είτε καλύπτουν όλη την επιφάνειά τους οπότε και καλούνται περίτριχα, μπορεί ακόμα και να σχηματίζονται σ' ένα μέρος της επιφάνειας και ονομάζονται λοφότριχα.

Η μορφή τους ποικίλλει και παρακάτω φαίνονται κάποιες από τις μορφολογίες τους:

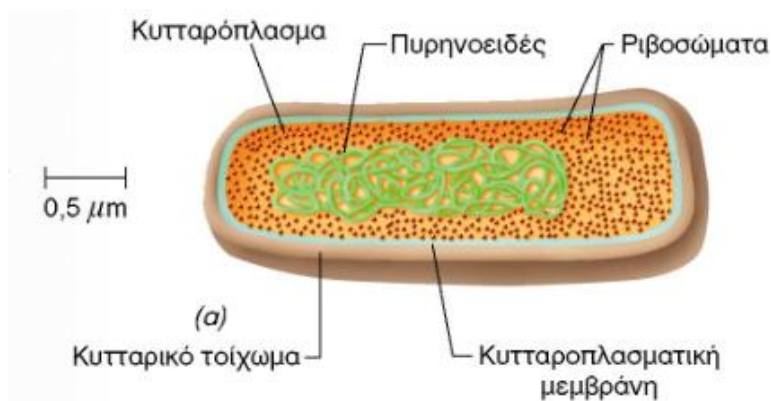


Εικόνα 24: Διαφορετικές μορφολογίες βακτηρίων[40]

Αντιθέτως με τα ευκαρυωτικά κύτταρα, τα προκαρυωτικά κύτταρα δε διαθέτουν ούτε αληθινό πυρήνα ούτε κάποιο άλλο μεμβρανικό ενδοκυττάριο οργανίδιο έτσι έχουν πολύ απλούστερη δομή από τα ευκαρυωτικά κύτταρα. Διαθέτουν κυτταρική μεμβράνη και το DNA είναι ελεύθερο χωρίς πυρηνική μεμβράνη ενώ κάποια βακτήρια μπορεί να διαθέτουν και πλασμίδια. Τα πλασμίδια είναι μικρά κυκλικά μόρια DNA αυτόνομα σε σχέση με το DNA του κυττάρου. Τα βακτήρια περιέχουν και ριβοσώματα εκεί όπου

γίνεται η πρωτεϊνοσύνθεση. Γενικά περιβάλλονται από δυο προστατευτικά καλύμματα, το εξωτερικό κυτταρικό τοίχωμα και την εσωτερική κυτταρική μεμβράνη. Ορισμένα βακτήρια μπορεί να έχουν και τρίτο εξωτερικό στρώμα, την κάψουλα που δρα προστατευτικά για το βακτήριο.[42]

Τα βακτήρια χωρίζονται σε Gram+ Gram- βακτήρια ανάλογα με τη χρώση κατά Gram. Αυτή είναι μία απλή μέθοδος κατά την οποία τα βακτήρια που διατηρούν το μπλε ιώδες χρώμα της χρώσης χαρακτηρίζονται ως θετικά ενώ εκείνα που χρωματίζονται ερυθρά ως αρνητικά[43]

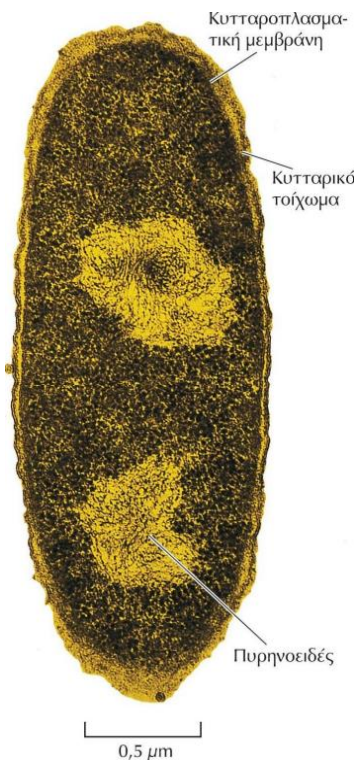


Εικόνα 25: Δομή προκαρυωτικού κυττάρου[41]

Τα βακτήρια αναπαράγονται μέσω δυαδικής σχάσης. Με αυτή τη διαδικασία το βακτηριακό κύτταρο το οποίο ονομάζεται θυγατρικό αντιγράφει το γενετικό του υλικό, διαχωρίζεται και προκύπτουν δυο νέα κύτταρα πανομοιότυπα με το αρχικό θυγατρικό. Ορισμένα βακτηριακά είδη, όπως τα κυανοβακτήρια αναπαράγονται με εκβλάστηση. Σε αυτή την περίπτωση, το θυγατρικό κύτταρο μεγαλώνει ως παρακλάδι του γονέα. Ξεκινάει αρχικά σαν μικρό κλαδί, μεγαλώνει μέχρι το μέγεθός του να φτάσει του γονέα του και να αποσυνδεθεί [42-43]

## 6.1. *Escherichia Coli*

Η *Escherichia Coli* (*E. coli*) είναι ένα Gram- εντεροβακτηρίδιο με σχήμα ραβδοειδές. Βρίσκεται φυσιολογικά στο έντερο αποτελώντας μέρος της φυσιολογικής χλωρίδας του. Μορφολογικά περικλύεται από δύσκαμπτο εξωτερικό τοίχωμα και στο εσωτερικό από την κυτταροπλασματική μεμβράνη και μόρια μπορούν να διαπερνούν μόνο το εξωτερικό δύσκαμπτο κυτταρικό τοίχωμα. Το κυτταρόπλασμα του είναι κοκκιώδες και αποτελείται από 30.000 ριβοσώματα ενώ το DNA του είναι κυκλικό και βρίσκεται στο πυρηνοειδές.[26]



Εξωτερικά φαίνεται το δύσκαμπτο κυτταρικό τοίχωμα, από κάτω η κυτταροπλασματική μεμβράνη και το DNA εντοπίζεται στο πυρηνοειδές που φαίνονται με πιο ανοιχτό κίτρινο χρώμα. (Menge and Wurtz/Biozentrum, University of Basel/ Science Photo Library/Photo Researchers, Inc.)

Εικόνα 26: Φωτογραφία ηλεκτρονικού μικροσκοπίου του *E. coli*

Σε αυτή τη θέση προσφέρουν οφέλη στον ξενιστή καθώς παράγουν βιταμίνη K<sub>2</sub> και αποτρέπουν την ανάπτυξη άλλων μικροοργανισμών στο έντερο. Διασπά το σάκχαρο λακτόζη ενώ δεν είναι ανθεκτικό σε υψηλές θερμοκρασίες, στους 70°C θανατώνεται. Ένα στέλεχος του, το O157:H7 είναι τοξικό καθώς παράγει μια τοξίνη

(καλούμενη Shiga) η οποία προκαλεί βλάβη στο έντερο μέσω αιμορραγικής κολίτιδας. Μια άλλη κοινή πάθηση που προκαλεί εάν βρεθεί σε γειτονικά όργανα είναι η ουρολοίμωξη εάν βρεθεί στην ουροδόχο κύστη ενώ μπορεί να προκαλέσει και μηνιγγίτιδα, γαστρεντερίτιδα και σήψη.[27]



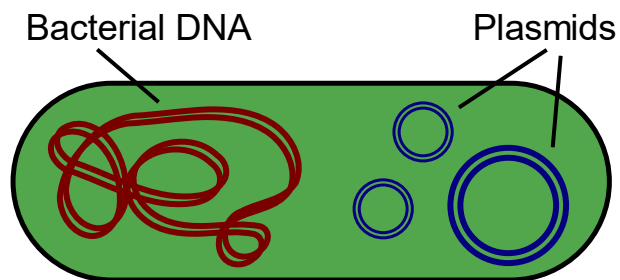
Εικόνα 27: *E. coli*- *Shigella*[28]

Στην κατηγορία των εντεροβακτηριδίων ανήκουν πολλά Gram- βακτήρια μεγέθους 0.3-1.0 μm πλάτος και μήκος 0.6-6.0 μm. Βρίσκονται στο έδαφος σε πηγές νερού, στη βλάστηση και υπό φυσιολογικές συνθήκες στο έντερο ζώων και ανθρώπων. Κάποιες από τις ιδιότητές τους είναι:

- Δεν δημιουργούν σπόρους
- Δεν μετακινούνται και αν το κάνουν θα είναι με τη βοήθεια των βλεφαρίδων τους
- Πολλαπλασιάζονται στα ίδια θρεπτικά υλικά
- Παρουσιάζουν αερόβια ανάπτυξη
- Χρησιμοποιούν τη γλυκόζη για να παράξουν οξέα

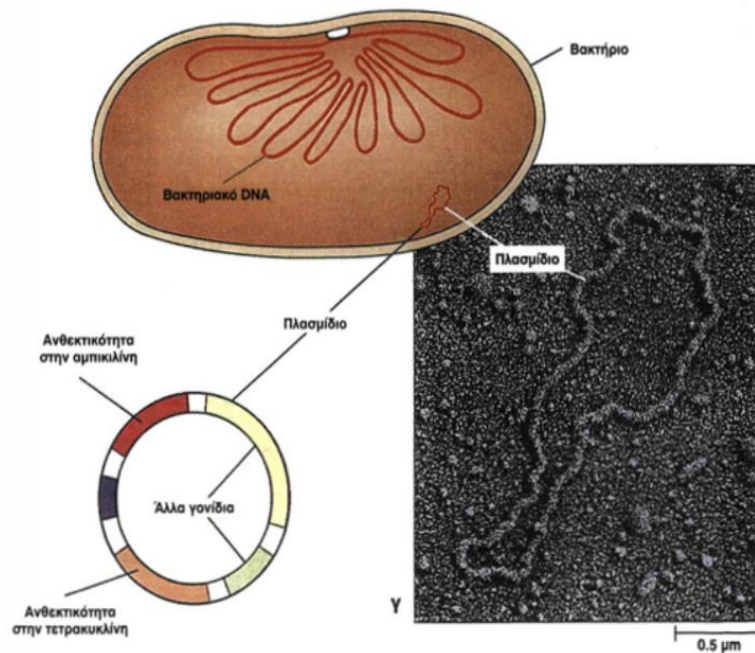
### 6.1.1 Πλασμίδια

Το DNA του *E. coli* και γενικά των βακτηρίων μπορεί να υπάρχει στο κυτταρόπλασμα αλλά και με μορφή πλασμιδίων. Τα πλασμίδια είναι μικρά μόρια DNA εξωχρωμοσομιακά, βρίσκονται μέσα στο κύτταρο και είναι διαφορετικά από το DNA των χρωμοσωμάτων και πολλαπλασιάζεται αυτόνομα. Αν και απαντώνται στα βακτήρια, μπορεί να υπάρχουν και σε κάποια αρχαία, και ευκαρώτες. Κατατάσσονται σε συζευκτικά και μη συζευκτικά πλασμίδια. Τα πρώτα διαθέτουν γονίδια μεταφοράς και μεταφέρονται μεταξύ διαφορετικών κυττάρων. Τα δεύτερα, δεν μπορούν να ξεκινήσουν μόνα τους την ένωση με άλλο βακτήριο παρά μόνο παρουσία των συζευκτικών. Τέλος υπάρχουν και τα πλασμίδια που ανήκουν ανάμεσα στην πρώτη και δεύτερη κατηγορία, δηλαδή διαθέτουν μόνο κάποια από τα γονίδια μεταφοράς.



Εικόνα 28: Αναπαράσταση του γενετικού υλικού σε βακτηριακό κύτταρο[29]

Οι πληροφορίες που βρίσκονται στα πλασμίδια έχουν να κάνουν με την επιβίωση του οργανισμού και υπάρχουν σ' αυτά γονίδια για αντίσταση στα αντιβιοτικά. Τα γονίδια που φέρουν δεν περιέχουν βασικές γενετικές πληροφορίες που χρειάζεται ο μικροοργανισμός αλλά οι πληροφορίες που διαθέτουν χρησιμοποιούνται κάτω από ορισμένες συνθήκες μόνο.



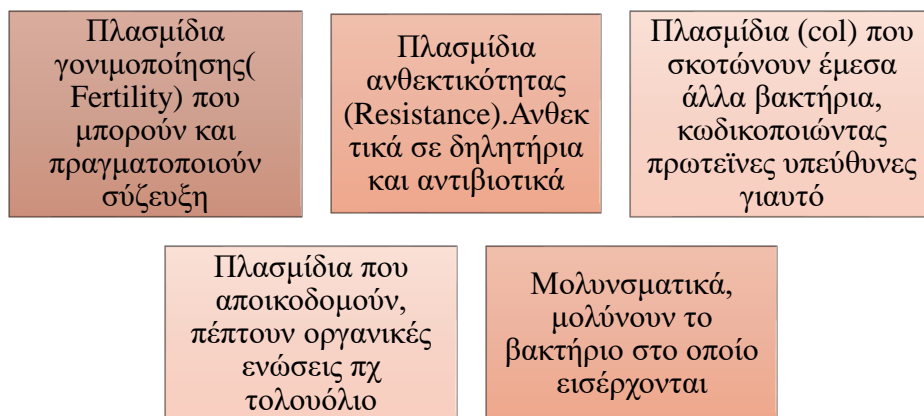
Εικόνα 29: Πλασμίδιο βακτηριακού κυττάρου(Βιβλίο Βιολογίας Προσανατολισμού Γ' Λυκείου)

Στο εργαστήριο χρησιμοποιούνται τεχνητά πλασμίδια συνήθως σαν φορείς για μοριακή κλωνοποίηση και τοποθετούνται στα κύτταρα με μετασχηματισμό ενώ αποτελούν σημαντικό εργαλείο στη Γενετική Μηχανική. Μπορούν να πολλαπλασιάζονται αυτόνομα όταν βρεθούν σε κάποιον ξενιστή. Μπορούν και ανταλλάσσουν γενετικό υλικό μεταξύ τους αλλά και με το κύριο μόριο DNA του βακτηρίου ενώ μεταφέρονται από βακτήριο σε βακτήριο μέσω σύζευξης μετασχηματίζοντας το καινούριο βακτήριο στο οποίο εισχωρούν παρέχοντάς του νέες ιδιότητες.[29]

Άλλος τρόπος κατάταξης των βακτηρίων με το αν ανήκουν σε μια ομάδα συμβατότητας ή ασυμβατότητας. Διαφορετικά πλασμίδια που συνυπάρχουν σε ένα μικρόβιο ονομάζονται συμβατά. Εάν δεν ισχύει αυτό, δεν θα καταφέρουν να βρίσκονται

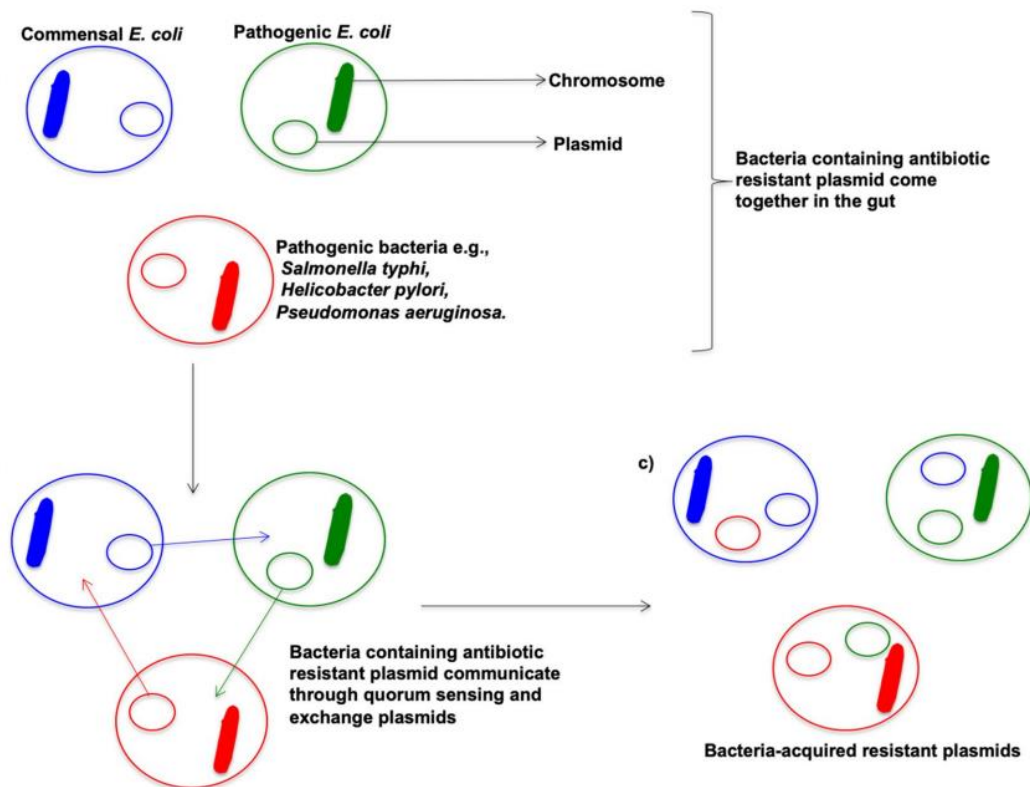


όλα στο ίδιο βακτήριο, κάποιο αποχωρεί. Μπορούν επίσης να ομαδοποιηθούν ανάλογα με τη λειτουργία τους. Έτσι προκύπτουν πέντε κατηγορίες:



Πίνακας 3: Κατηγορίες πλασμιδίων βάσει της δράσης τους[29]

Όπως προαναφέρθηκε, η ανοχή των βακτηρίων στα αντιβιοτικά είναι ένα κρίσιμο φαινόμενο που απαιτεί άμεσης αντιμετώπισης. Η ανοχή του *E. coli* στα αντιβιοτικά είναι πρωταρχικής σημασίας για αντιμετώπιση στον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας γι' αυτό και είναι ανάγκη σύνθεσης νέων αντιμικροβιακών συμπλόκων αποτελεσματικών για αυτόν τον μικροοργανισμό. Οι άνθρωποι, καθώς λαμβάνουν αντιβιοτικά για τη θεραπεία βακτηριακής λοίμωξης, το *E. coli* εκτίθεται σε αυτά και αναπτύσσει μηχανισμούς ανθεκτικότητας μέσω φυσικής επιλογής. Συγκεκριμένα το *E. coli* διασπείρει αυτήν την ανθεκτικότητα και σε άλλους παθογόνους μικροοργανισμούς με ανταλλαγή πλασμιδίων. [30]

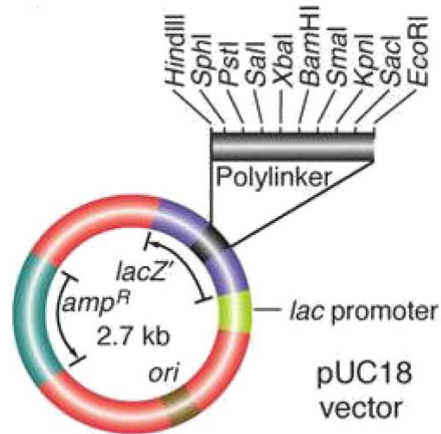


Εικόνα 30: Αναπαράσταση του τρόπου μεταφοράς αντιβιοτικής ανθεκτικότητας με ανταλλαγή πλασμιδίων.

Στην παραπάνω εικόνα φαίνεται η μεταφορά πλασμιδίων του παθογενούς *ecoli* σε άλλους μικροοργανισμούς που δε φέρουν αρχικά πλασμίδια με αντίσταση στα αντιβιοτικά. Αρχικά όλα τα βακτήρια συγκεντρώνονται στο έντερο (με και χωρίς τα πλασμιδια ανθεκτικότητας) . Έπειτα συνδέονται και ανταλλάσσουν πλασμίδια με αποτέλεσμα να προκύψουν περισσότερα βακτήρια με πλασμίδια που φέρουν πληροφορίες ανθεκτικότητας αντιβιοτικών.[30]

Το pUC18 είναι ένα τεχνητό πλασμίδιο του *E. coli* έχει κατασκευαστεί δηλαδή γενετικά ώστε να φέρει:

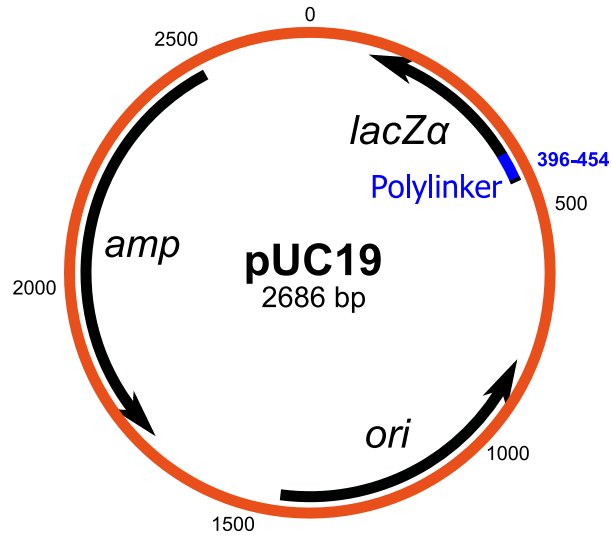
- Ένα γονίδιο για ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό αμπικιλίνη (*ampR*)
- Ένα γονίδιο της β-γαλακτοσιδάση μαζί με τον προαγωγέα του (*lacZ'*)



Εικόνα 31: Πλασμίδιο pUC18 που απεικονίζονται τα γονίδια που προαναφέρθηκαν[31]

Το όνομα pUC προκύπτει από τη λέξη πλασμίδιο(p- plasmid) και τη συντομογραφία του Πανεπιστημίου της Καλιφόρνιας και δημιουργήθηκε από τον Joachim Messing και τους συνεργάτες του. Είναι δίκλωνο κυκλικό μόριο με μήκος 2.686 ζεύγη βάσεων και μοριακό βάρος  $1,75 \times 10^6$  daltons. Όπως φαίνεται παραπάνω, το γονίδιο lacZ' περιλαμβάνει έναν πολυσυνδέτη. Σε αυτήν την περιοχή μπορούν να δράσουν τα ένζυμα περιοριστικές ενδονουκλεάσες, να κόψουν το πλασμίδιο και από κυκλικό να γίνει γραμμικό έτσι ώστε να μπορεί να ανασυνδυαστεί με διαφορετικό μόριο γραμμικού DNA το οποίο θα έχει υποστεί τομή από την ίδια ενδονουκλεάση.[31]

Το πλασμίδιο pUC19 είναι επίσης ένα δίκλωνο κυκλικό μόριο DNA με 2.686 ζεύγη βάσεων. Χρησιμοποιείται ευρέως ως φορέας κλωνοποίησης. Στο εργαστήριο προτιμάται συχνά καθώς τα ανασυνδυασμένα κύτταρα (δηλαδή αυτά με ξένο γονιδιακό υλικό) διαφέρουν από μη-ανασυνδυασμένα και είναι εύκολη η διάκρισή τους λόγω χρώματος. Το pUC19 είναι ίδιο με το pUC 18 με μόνη διαφορά τον προσανατολισμό της θέσης του πολυσυνδέτη, εκεί δηλαδή που κόβουν οι ενδονουκλεάσες.[32]



Εικόνα 32: Πλασμίδιο pUC19 με τα γονίδια να απεικονίζονται και η θέση του πολυσυνδέτη φαίνεται να είναι αντίστροφη με το pUC18[32]

## 6.2 *Pseudomonas aeruginosa*

Η Ψευδομονάδα (ή πυοκυανική) είναι ένα Gram- αερόβιο βακτήριο με ραβδοειδές σχήμα με μήκος 1-5μm και πλάτος 0,5-1,0μm. Κάποια στελέχη της διαθέτουν στο εξωτερικό τους ένα πολυσακχαρικό έλυτρο που τη βοηθά να φυλάσσεται από βλαβερές για αυτήν ουσίες και από φαγοκυττάρωση. Το γένος *Pseudomonas* ανήκει στα γ-πρωτεοβακτήρια και είναι αυτό που προσβάλλει συχνά τον άνθρωπο. Βρίσκεται φυσιολογικά στο έντερο ορισμένων ανθρώπων αποτελώντας μέρος της χλωρίδας του. Είναι ανθεκτική κάτω από αντίξοες συνθήκες και παρουσιάζει αντοχή σε πάρα πολλά αντιβιοτικά. Έχει την καλύτερη ανάπτυξη σε θερμοκρασία 37°C ενώ παράγει διάφορες υδατοδιαλυτές χρωστικές (πχ πυοκυανίνη) που σε καλλιέργειά της χρωματίζουν το θρεπτικό υλικό και όχι τις αποικίες.



Εικόνα 33: *Pseudomonas Aeruginosa*[36]

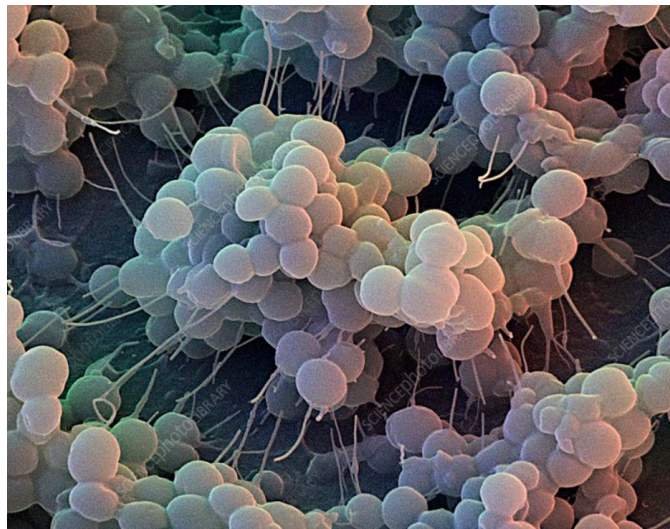
Η *Pseudomonas aeruginosa* όταν μολύνει ανθρώπους προκαλεί ουρολοίμωξη, πνευμονία, λοιμώξεις σε ήδη υπάρχοντα τραύματα αλλά μπορεί να μολύνει και το δέρμα όπως και το εξωτερικό τμήμα του αυτιού ενώ αντιμετωπίζεται με αντιβιοτικά. Είναι ο βασικός λόγος για πολλές ενδονοσοκομιακές λοιμώξεις προσβάλλοντας άτομα με ασθενές ανοσοποιητικό σύστημα, ασθενείς με κυστική ίνωση, ανοσοκατεσταλμένους. Η θεραπεία ωστόσο είναι δύσκολη καθώς όπως προαναφέρθηκε προσβάλλει άτομα νοσηλευόμενα που ήδη λαμβάνουν πολλά αντιβιοτικά και έτσι αποκτά ανθεκτικότητα στα περισσότερα από αυτά. Βρίσκουν ανελλιπώς καινούριους τρόπους αποφυγής των επιπτώσεων των αντιβιοτικών και των φαρμάκων γενικότερα. Αποτελεσματική θεραπεία λοιπόν θα υπάρξει μόνο με τη σωστή επιλογή αντιβιοτικού. Τα τελευταία ποσοστά θνησιμότητας από ενδονοσοκομιακές λοιμώξεις της *P. aeruginosa* είναι τρομακτικά υψηλά με το βασικό πρόβλημα να είναι η ανθεκτικότητα της σε πολλά φάρμακα. Απαιτούνται λοιπόν έρευνες για νέα αντιμικροβιακά αποτελεσματικά ενάντια της ψευδομονάδας. [33,34,35]

### 6.3 *Staphylococcus Epidermidis*

Ο Σταφυλόκοκκος Επιδερμίδης είναι ένα θετικό κατά Gram γένος βακτηρίων της οικογένειας των σταφυλόκοκκων. Στο μικροσκόπιο εμφανίζεται με τη μορφή σφαιρικών κόκκων και σχηματίζονται σε συστάδες που μοιάζουν με σταφύλια. Αποτελεί έναν ιδιαίτερα ανθεκτικό μικροοργανισμό και απαρτίζεται από μη πτητικούς κόκκους. Δημιουργεί λευκές, υπερωσφωμένες, συνεκτικές αποικίες των 1-2 μm σε διάμετρο μετά από επώαση για 24h. Αυτή η κατηγορία βακτηρίων είναι προαιρετικά αναερόβιοι οργανισμοί (ικανοί να αναπτυχθούν τόσο αερόβια όσο και αναερόβια). Το όνομα του βρέθηκε από τον Σκωτσέζο χειρουργό και βακτηριολόγο Alexander Ogston (1844–1929) το 1880 σύμφωνα με το πρότυπο που είχε προκύψει πέντε χρόνια νωρίτερα με την ονομασία του *Streptococcus*. Η λέξη προέρχεται από το πρόθεμα «σταφυλό-» (από τα αρχαία ελληνικά: σταφυλή «τσαμπί σταφυλιών»), και το επίθεμα της -coccus, «σφαιρικό βακτήριο» (από τα αρχαία ελληνικά: κόκκος). Ο σταφυλόκοκκος περιλαμβάνει τουλάχιστον 40 είδη πολλά από αυτά δεν προκαλούν ασθένεια στον άνθρωπο και κατοικούν φυσιολογικά στο δέρμα και τους βλεννογόνους των ανθρώπων και των ζώων ενώ βρίσκονται και στο μικροβίωμα του εδάφους.[54, 55, 56]

Ο *Staphylococcus epidermidis* είναι το πιο συχνά απομονωμένο μέλος της ομάδας των αρνητικών στην πηκτάση κοαγουλάση σταφυλόκοκκων. Οι σταφυλόκοκκοι, εκτός από τον χρυσίζοντα σταφυλόκοκκο (*S. aureus*), δεν παράγουν το ένζυμο πηκτάση (κοαγουλάση). Ο *S. epidermidis* αποικίζει στο δέρμα και στους βλεννογόνους του ανθρώπινου σώματος ενώ αντιπροσωπεύει το μεγαλύτερο μέρος της φυσιολογικής βακτηριακής χλωρίδας του δέρματος.

Ο *S. epidermidis* τα τελευταία χρόνια παρουσιάζει σημαντικό ενδιαφέρον καθώς αποτελεί τη σημαντικότερη αιτία νοσοκομειακών λοιμώξεων. Ενώ παλαιότερα θεωρούταν για μεγάλο χρονικό διάστημα σχετικά αβλαβείς, τελευταία χαρακτηρίζεται ως παθογόνο. Ο *S. epidermidis* απαιτεί έναν ξενιστή με προδιάθεση προκειμένου να μετατραπεί από ένα φυσιολογικό κάτοικο του ανθρώπινου δέρματος σε έναν μολυσματικό παράγοντα. [57]

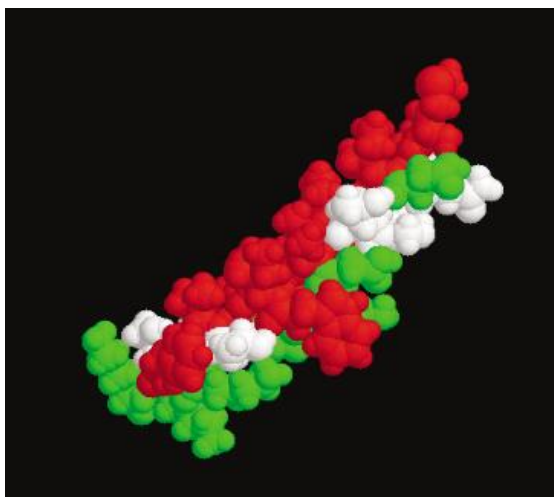


Εικόνα 34: *Staphylococcus epidermidis* bacteria, SEM[58]

Ο *S. epidermidis* αποτελεί ένα από τα πιο συχνά απομονωμένα παθογόνα βακτήρια στα νοσοκομεία γενικά και το πιο σημαντικό παθογόνο βακτήριο που εμπλέκεται σε νοσοκομειακές λοιμώξεις του αίματος, καρδιαγγειακές λοιμώξεις και λοιμώξεις του οφθαλμού, του αυτιού, της μύτης και του λαιμού. Σε αντίθεση με το *S. aureus*, ο *S. epidermidis* δεν προκαλεί πυογόνες λοιμώξεις με εξαίρεση την εγγενή ενδοκαρδίτιδα της βαλβίδας. Το γεγονός αυτό οφείλεται στις περιορισμένες τοξίνες του συγκριτικά με εκείνες που διαθέτει *S. aureus*.

Στην πραγματικότητα, υπάρχει μόνο μία τοξίνη, το αιμολυτικό πεπτιδίο δ-τοξίνη, που φαίνεται να εμπλέκεται στη νεκρωτική εντεροκολίτιδα στα νεογνά. Αυτό το

γεγονός έλλειψης τοξινών που καταστρέφουν σοβαρά τους ιστούς, οι λοιμώξεις του *S. epidermidis* είναι συνήθως υποξείες ή χρόνιες.[57]



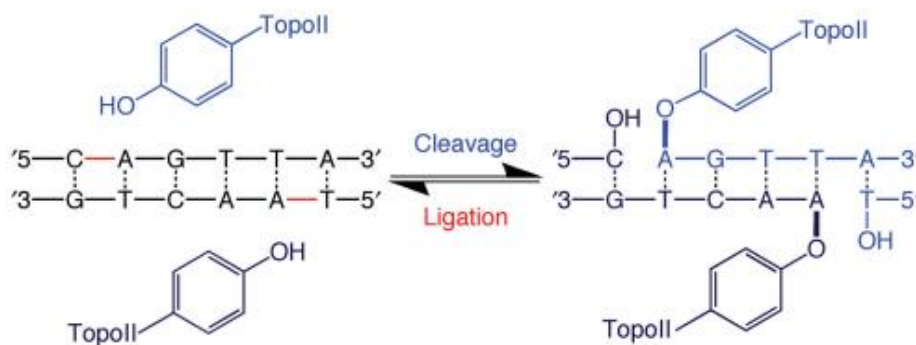
*Εικόνα 35:* Σταφυλοκοκκική δ-τοξίνη από NMR (Protein Data Bank ID: 2DTB), Τα υδρόφοβα αμινοξέα φαίνονται με κόκκινο χρώμα. Τα φορτισμένα αμινοξέα εμφανίζονται με πράσινο χρώμα.[57]

Στους ανθρώπους οι οποίοι είναι επιρρεπείς σε μόλυνση από τον *S. epidermidis* ανήκουν οι χρήστες ναρκωτικών, οι ανοσοκατεσταλμένοι ασθενείς (ασθενείς υπό ανοσοκατασταλτική θεραπεία, ασθενείς με AIDS και πρόωρα νεογνά). Ο σταφυλόκοκκος επιδερμίδης προκαλεί λοιμώξεις κύριως όταν εμπλέκονται ξένα σώματα, όπως καθετήρες και τυχόν εμφυτευμένες συσκευές. Σε αυτές τις συσκευές οι λοιμώξεις περιπλέκονται καθώς το βακτήριο σχηματίζει βιοφίλμ, και καθιστά την εξάλειψη των λοιμώξεων από *S. epidermidis* πολύ περίπλοκη και συνήθως, η αφαίρεση και επανατοποθέτηση της συσκευής καθίσταται απαραίτητη.[57]



## 7. Τοποϊσομεράση

Η τοποϊσομεράση II αποτελεί ένα βασικό ένζυμο απαραίτητο για κάθε διαδικασία που χρειάζεται κίνηση του DNA μέσα στον πυρήνα ή το άνοιγμα της διπλής έλικας. Αυτό το ένζυμο βοηθά ώστε το DNA να υπερτυλίγεται και να χαλαρώνει αφαιρώντας κόμπους και μπερδέματα από το γενετικό υλικό. Προκειμένου να πραγματοποιήσει τις κρίσιμες φυσιολογικές λειτουργίες της, η τοποϊσομεράση II δημιουργεί παροδικές δίκλωνες θραύσεις στο DNA. Κατά συνέπεια, ενώ είναι απαραίτητο για την επιβίωση των κυττάρων, το ένζυμο έχει επίσης την ικανότητα να κατακερματίζει το γονιδίωμα. Η αντίδραση διάσπασης/ένωσης DNA της τοποϊσομεράσης II είναι ο στόχος για μερικά από τα πιο επιτυχημένα αντικαρκινικά φάρμακα που υπάρχουν σήμερα για κλινική χρήση. Ωστόσο, αυτή η ίδια αντίδραση πιστεύεται πως πυροδοτεί χρωμοσωμικές μεταθέσεις που σχετίζονται με συγκεκριμένους τύπους λευχαιμίας. Η ικανότητα της τοποϊσομεράσης II να διασπά και να απολινώνει το DNA είναι βασικό στοιχείο σε όλες τις καταλυτικές της λειτουργίες.

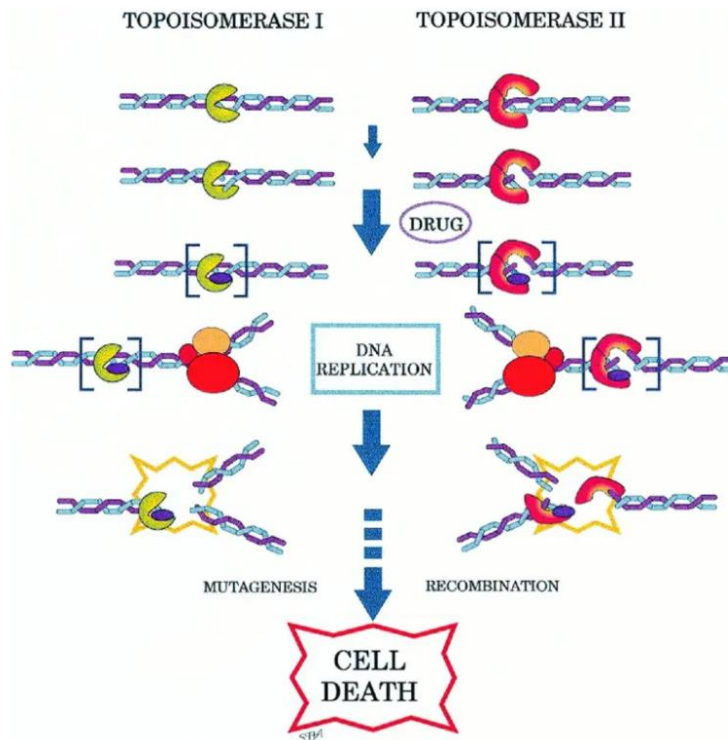


Εικόνα 36: Διάσπαση δίκλωνου DNA που προκαλείται από τοποϊσομεράση II[59]

Κατά τη διάσπαση, το κατάλοιπο τυροσίνης στην ενεργή θέση κάθε υπομονάδας τοποϊσομεράσης II συνδέεται ομοιοπολικά με το νεοπαραγόμενο τμήμα 5-τελικού

φωσφορικού σε κάθε κλώνο. Αυτή η ομοιοπολική σύνδεση διατηρεί την ενέργεια στη ραχοκοκαλιά DNA του σακχάρου-φωσφορικού. Η πρόσφατα παραγόμενη 3-υδροξυλομάδα αλληλεπιδρά με την τοποϊσομεράση II με μη ομοιοπολικό τρόπο. Η αντίδραση σύνδεσης αποτελεί το αντίστροφο αυτής της διαδικασίας και αφήνει το προϊόν DNA χημικά αμετάβλητο από το αρχικό υπόστρωμα.[59]

Εκτός από την τοποϊσομεράση II υπάρχει και η τοποϊσομεράση I η οποία είναι ένα ολοένζυμο με τρία άτομα Zn (II) κοντά στο καρβοξυτελικό άκρο. Έχει βάρος 97 kDa. Η τοποϊσομεράση I δεν απαιτεί υδρόλυση ATP για να καταλύσει την τοπολογική αναδιάταξη του DNA σε αντίθεση με την τοποϊσομεράση II. Για να διαχειριστεί τα μπερδέματα και τις υπερσπειρώσεις του DNA, η τοποϊσομεράση τύπου II μπορεί να κόβει και τους δύο κλώνους του DNA ταυτόχρονα. Για αυτή τη δραστηριότητα χρειάζεται υδρόλυση ATP.[60]

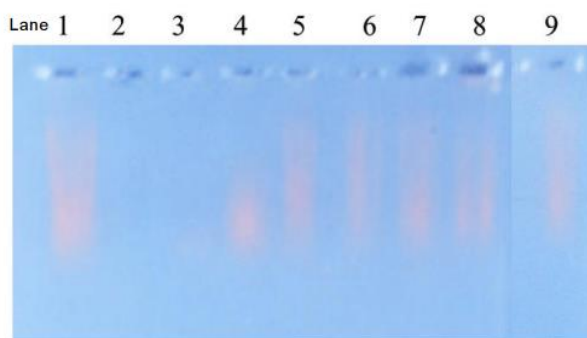


Εικόνα 37: Τοποϊσομεράση τύπου I και II[60]

Επομένως η διάσπαση του DNA με χρήση μεταλλικών συμπλόκων που διαθέτουν δηλαδή μιμητική συμπεριφορά με την τοποϊσομεράση, αποτελεί αντικείμενο σημαντικού ενδιαφέροντος.

## 8. Μεταλλικά σύμπλοκα που κόβουν το πλασμιδιακό DNA

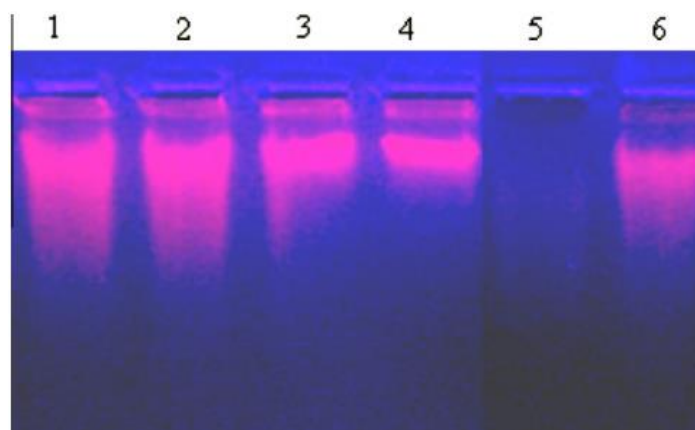
Μεταλλικά σύμπλοκα των Cu(II), Ni(II), Co(II), Mn(II), Zn(II) κ.α. με τη βάση Schiff (L) που προέρχεται από 4-αμινοαντιπυρίνη, 3-υδροξυ-4-νιτροβενζαλδεΐδη και ο-φαινυλενοδιαμίνη φάνηκε να αλληλεπιδρούν με DNA μετατρέποντας το υπερσπειρωμένο DNA (CT-DNA) σε ανοιχτό κυκλικό DNA.[65]



Εικόνα 38: Ηλεκτροφόρηση σε gel αгарόζης, συγκεκριμένα DNA:(lane 1), DNA + [CuL]Cl<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:(lane 2), DNA + [NiL]Cl<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:(lane 3), DNA + [CoL]Cl<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:(lane 4), DNA + [MnL]Cl<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:(lane 5), DNA + [ZnL]Cl<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:(lane 6), DNA + [Voi] SO<sub>4</sub> + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:(lane 7), DNA + [CdL]Cl<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:(lane 8), DNA + [HgL]Cl<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:(lane 9) [65]

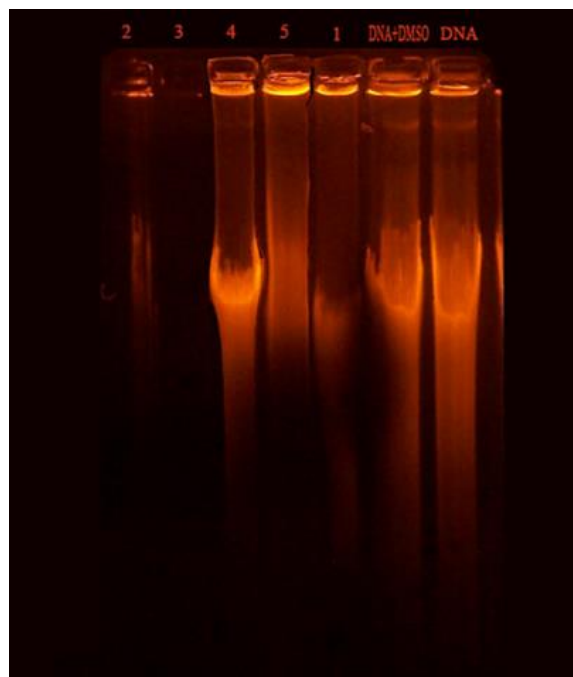
Συμπλοκα Co(II), Ni(II), Cu(II) και Zn(II) της βάσης Schiff που προέρχονται από ινδόλη-3-καρβοξυαλδεΐδη και m-αμινοβενζοϊκό οξύ. Έχει βρεθεί πως σύμπλοκο χαλκού μπρεί και διασπά το DNA πιο αποτελεσματικά παρουσία ενός οξειδωτικού. Αυτό

μπορεί να αποδοθεί στον σχηματισμό ελεύθερων ριζών υδροξυλίου, οι οποίες μπορούν να παραχθούν από μεταλλικά ιόντα που αντιδρούν με το  $H_2O_2$  για να παράγουν τη ρίζα υδροξυλίου ή μοριακό οξυγόνο, που μπορεί να βλάψει το DNA. Αυτή η ρίζα υδροξυλίου συμμετέχει στην οξείδωση του τμήματος της δεοξυριβόζης, ακολουθούμενη από υδρολυτική διάσπαση του κορμού σακχάρου-φωσφορικού. [66]



*Εικόνα 39:* Ηλεκτροφόρηση σε gel αγαρόζης μεταλλικών συμπλόκων, συγκεκριμένα Lane 1: control DNA; lane 2: DNA + L +  $H_2O_2$ ; lane 3: DNA +  $CoL_2$  +  $H_2O_2$ ; lane 4: DNA +  $NiL_2$  +  $H_2O_2$ ; lane 5: DNA +  $CuL_2$  +  $H_2O_2$ ; lane 6: DNA +  $ZnL_2$  +  $H_2O_2$  [66]

Μεταλλικά σύμπλοκα επίσης με τον υποκαταστάτη  $H_2PTP$  [4-(2-πυριδυλ)-3-θειοσεμικαρβαζίδιο και πυροσταφυλικό οξύ] μελετήθηκαν για τη δραστικότητα διάσπασης του DNA τους με τη μέθοδο ηλεκτροφόρησης σε τζελ αγαρόζης. Τα μεταλλικά σύμπλοκα έκοψαν το υπερτυλιγμένο DNA μετατρέποντάς το σε ανοιχτό κυκλικό DNA. Και σε αυτήν την περίπτωση ο προτεινόμενος μηχανισμός διάσπασης του DNA είναι από ρίζες υδροξυλίου μέσω αφαίρεσης ατόμου υδρογόνου από μονάδες σακχάρου. [67]



Εικόνα 40: Ηλεκτροφόρηση των συμπλόκων που προαναφέρθηκαν και συγκεκριμένα

$\text{H}_2\text{P}^+\text{T}^-$  **1**,  $[\text{Ni}(\text{HPTP})\text{Cl}](\text{H}_2\text{O})_2$  **2**,  $[\text{Mn}(\text{HPTP})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})_2]$  **3**  $[\text{Zn}(\text{HPTP})(\text{OAc})]$  **4**,

$[\text{Cr}(\text{HPTP})_2\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$  **5** [67]

Συμπεραίνουμε λοιπόν πως έχουν μελετηθεί πολλά μεταλλικά σύμπλοκα για την αλληλεπίδραση τους με CT-DNA και φαίνεται πως παρουσιάζουν ένα είδος αλληλεπίδρασης με αυτό διασπώντας το από ρίζες υδροξυλίου που σχηματίζονται.

## **B. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ**

Το πρόβλημα της ανθεκτικότητας των μικροβίων στα αντιβιοτικά αποτελεί σημαντικό παγκόσμιο φαινόμενο, είναι αναγκαία η αντιμετώπισή του. Συγκεκριμένα οι βακτηριακές λοιμώξεις που προσβάλλουν το δέρμα από βακτήρια θα μπορούσαν να αντιμετωπιστούν με νέους αντιμικροβιακούς παράγοντες χωρίς όμως να είναι τοξικοί για το δέρμα. Για τους παραπάνω λόγους σκοπός της μεταπτυχιακής διατριβής αποτελεί η σύνθεση του συμπλόκου του ψευδαργύρου με το αμινοξύ τυροσίνη, ο χαρακτηρισμός του συμπλόκου και η ενσωμάτωσή του σε υδρογέλη καρβοξυμεθυλσελουλόζης. Τέλος η βιολογική μελέτη της αντιμικροβιακής του δράσης σε βακτηριακά στελέχη μέσω προσδιορισμού της ζώνης αναστολής (IZ), της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (MIC) και της ελάχιστης βακτηριοκτόνου συγκέντρωσης (MBC) στα βακτήρια *P. aeruginosa* και *S. epidermidis*, ο έλεγχος αλληλεπίδρασης του με βακτηριακό πλασμιδιακό DNA δηλαδή ο έλεγχος δράσης τοποϊσομεράσης και τέλος ο έλεγχος in vivo τοξικότητας στο ζωντανό οργανισμό μοντέλο *Artemia Salina*.

Ο ψευδάργυρος είναι απαραίτητο στοιχείο για τους ζωντανούς οργανισμούς καθώς βρίσκεται φυσιολογικά στον ανθρώπινο οργανισμό και εμπλέκεται σε πολλές ζωτικές κυτταρικές αντιδράσεις. Συνεπώς δεν παρουσιάζει τοξικότητα για τον άνθρωπο. Για αυτούς τους λόγους επιλέχθηκε το συγκεκριμένο μέταλλο.

Επιλέχθηκε το αμινοξύ τυροσίνη καθώς αποτελεί ένα ελκυστικό βιοσυμβατό μόριο, χωρίς τοξικότητα για τον άνθρωπο αποτελώντας από μόνο του θεραπευτικό παράγοντα αφού είναι αμινοξύ και βρίσκεται ήδη στις πρωτεΐνες που συνθέτει ο άνθρωπος, αλλά επιλέχθηκε και για τη δομή της. Φέρει μια υδρόφιλη και μια υδρόφοβη ομάδα και έτσι μπορεί να καταστήσει το σύμπλοκο στο οποίο θα βρίσκεται υδατοδιαλυτό ή λιπόφιλο.



## Γ. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Για την επίτευξη των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω αντιδραστήρια:

- Νιτρικός ψευδάργυρος  $Zn(NO_3)_2$ , Zinc Nitrate Hexahydrate SIGMA-ALDRICH
- Αμινοξύ Tyrosine
- Καυστικό κάλιο, Potassium Hydroxide pellets Merck
- Methanol, Honeywell Riedel del Haën
- dd  $H_2O$
- Dimethyl Sulfoxide (DMSO), Honeywell Riedel del Haën

Χρησιμοποιήθηκε ο παρακάτω εργαστηριακός εξοπλισμός:

- Ζυγός απλός, Chyo, JL-180
- Ζυγός ακριβείας
- Μαγνητικός Αναδευτήρας- Θερμαντήρας
- Φούρνος Μικροκυμάτων
- FTIR Agilent
- Melting Point SMP1-Bibby Stuart Scientific
- UV-Vis φασματοφωτόμετρο U.V. 1600PC Spectrophotometer VWR
- Spectro UV-Vis Spectrometer
- Πρέσα για παστίλιες της Specac
- XRF Rigaku
- Gonotec Osmomat 3000 Basic Freezing Point Osmometer
- Πεχάμετρο, pH METER BASIC 20 CRISON
- NMR: Bruker Avance 400 (400MHz)



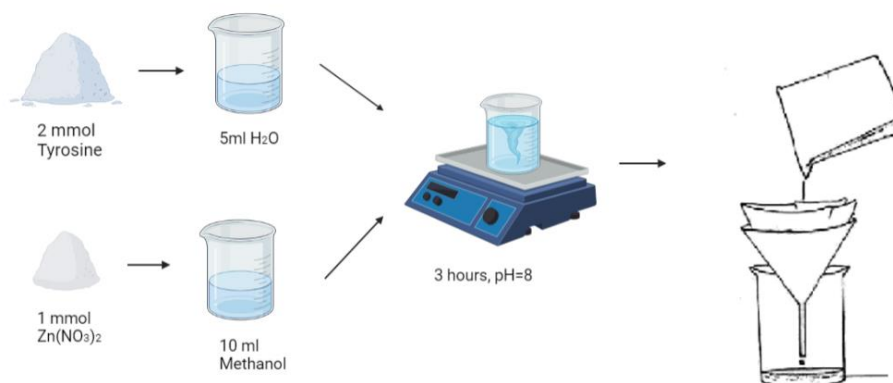
- Vortex SANICHEM

Χρησιμοποιήθηκαν επιπλέον γυάλινα σκεύη των 25 ml, 50 ml και 100 ml (ποτήρια ζέσεως, σφαιρικές και κωνικές φιάλες), γυάλινοι δοκιμαστικοί σωλήνες 15ml, μαγνήτες, σπάτουλες, πιπέτες των 10, 100, 1000 μl καθώς και πλαστικά tips και erppendorf των 1.5ml.

# 1. Χημικό μέρος

## 1.1 Σύνθεση

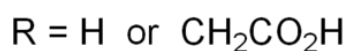
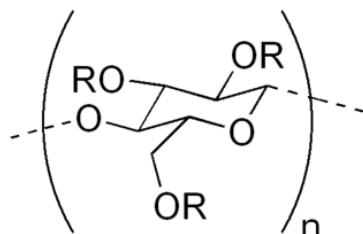
Η σύνθεση του συμπλόκου  $[Zn(Tyr)_2]$  (ZINT) έγινε σε ποτήρι ζέσεως των 25ml και συγκεκριμένα ο νιτρικός ψευδάργυρος (0.1519g) αντέδρασε με το αμινοξύ τυροσίνη (0.1836g) σε γραμμομοριακή αναλογία 1:2. Αρχικά ο νιτρικός ψευδάργυρος διαλύθηκε σε 10ml μεθανόλης (διάλυμα I) ενώ η τυροσίνη σε 5ml δις απεσταγμένου νερού (διάλυμα II). Υπό ανάδευση το διάλυμα II μεταφέρθηκε στο ποτήρι ζέσεως του διαλύματος I και έγινε ρύθμιση του pH στο 8 με διάλυμα καυστικού καλίου (1.5ml καυστικό κάλιο KOH 1M). Η ανάδευση συνεχίστηκε για 3 ώρες. Μετά το πέρας των τριών ωρών είχε σχηματιστεί λευκό στερεό στο μίγμα. Έγινε διήθηση σε ποτήρι ζέσεως των 25ml και με απλό ηθμό από διηθητικό χαρτί. Το στερεό αφέθηκε στον απλό ηθμό έως ότου ξηραθεί πλήρως. Η σύνθεση του ZINT φαίνεται στην παρακάτω εικόνα:



Εικόνα 38: Πειραματική Πορεία σύνθεσης του ZINT

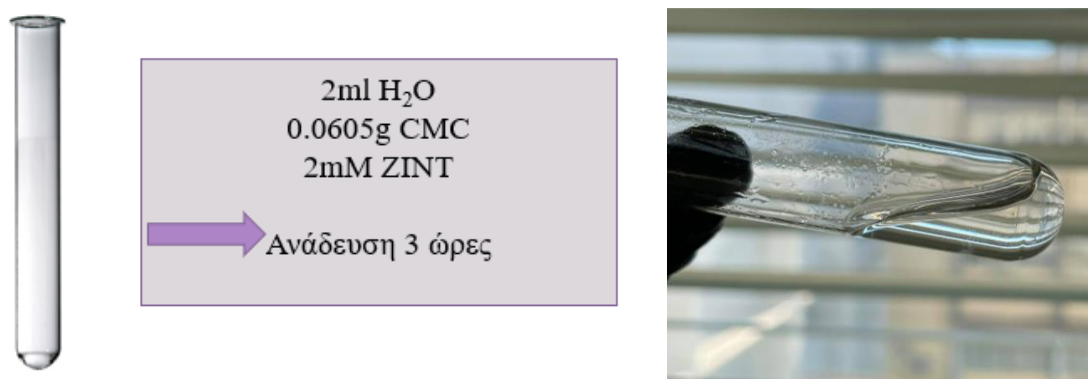
Για την κρυστάλλωση του συμπλόκου 0.0953g του ιζήματος που ήταν στο διηθητικό χαρτί, διαλύθηκαν σε 8 ml διμεθυλοσουλφοξειδίου (DMSO) υπό ανάδευση. Κρύσταλλοι παρατηρήθηκαν 4 μήνες μετά στο διάλυμα.

**Σύνθεση CMC@ZINT:** Μετά τη σύνθεση και το χαρακτηρισμό της ουσίας, έγινε διασπορά της σε υδρογέλη με τη βοήθεια του πολυμερούς καρβοξυμεθυλσελουλόζης (CMC).



*Εικόνα 39:* Δομή της Καρβοξυμεθυλσελουλόζης

Συγκεκριμένα 0.06g CMC προστέθηκαν σε 2ml ddH<sub>2</sub>O καθώς και ποσότητα ZINT 2mM. Ακολούθησε ανάδευση για 3 ώρες. Παρασκευάστηκαν επιπλέον δυο υδρογέλες καρβοξυμεθυλσελουλόζης, η μία περιείχε μόνο CMC και η δεύτερη με 2mM νιτρικού ψευδαργύρου. Υπολογίστηκε η περιεκτικότητα του πρώτου gel σε ψευδάργυρο φασματοφωτομετρικά.



*Εικόνα 40:* Παρασκευή CMC@ZINT

## 1.2 Σημείο τήξης

Για να βρεθεί το σημείο τήξης της συντιθέμενης ένωσης, χρησιμοποιήθηκαν τριχοειδείς σωλήνες BRIS micro haematocrit tubes (Soda Lime Glass, Vitrex Medical A/S). Ο τριχοειδής σωλήνας με το δείγμα τοποθετείται στο όργανο (Melting Point SMP1-Bibby Stuart Scientific) και πραγματοποιείται η μέτρηση του σημείου τήξεως. Τα σημεία τήξεως είναι μη-διορθωμένα.

## 1.3 Διαλυτότητα

Η εύρεση των διαλυτών στους οποίους διαλύεται η συντιθέμενη ένωση ήταν απαραίτητη για την διεξαγωγή και των υπόλοιπων πειραμάτων. Μικρή ποσότητα της ουσίας τοποθετήθηκε σε δοκιμαστικούς σωλήνες και σε κάθε σωλήνα τοποθετήθηκε διαφορετικός διαλύτης από τους n-Hexane, Toluene,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $\text{CHCl}_3$ , Acetone, MeOH, MeCN, DMSO, DMF,  $\text{H}_2\text{O}$ . Όλοι οι δοκιμαστικοί σωλήνες αναδεύτηκαν με τη βοήθεια του Vortex ενώ σε όσους υπήρχε ακόμη στερεή ουσία εξετάστηκε η διαλυτότητά τους με θέρμανση σε υδρόλουτρο.

## 1.4 Κρυοσκοπία

Κρυοσκοπία ονομάζεται η μέθοδος που προσδιορίζει την σχετική μοριακή μάζα της συντιθέμενης ουσίας με βάση τη μέτρηση πειραματικά της ταπείνωσης του σημείου πήξεως του διαλύτη. Χρησιμοποιήθηκε το Osmomat 3000 Freezing point osmometer της Gonotec και η αρχή της μεθόδου στηρίζεται στην ταπείνωση του σημείου πήξεως διαλύτη αφού προστεθεί σε αυτόν μια ένωση η οποία υπολογίζεται μέσω της σχέσης  $\Delta T_f = K_f m$ . Με  $\Delta T_f$  συμβολίζεται η ταπείνωση σ.π. του διαλύτη (σ.π. διαλύτη - σ.π. διαλύματος), όπου  $K_f$  αντιστοιχεί στην σταθερά ταπείνωσης σημείου πήξεως ή σταθερά

κρυσκοπίας, η οποία εξαρτάται από τη φύση του διαλύτη και το  $m$  είναι η μοριακότητα κατά βάρος του διαλύματος (molality) τα mol δηλαδή της διαλυμένης ουσίας σε 1000g διαλύτη (μοριακή συγκέντρωση κατά μάζα ) και ισούται με

$$m = \frac{1000m_1}{Mr m_2}$$

$$\text{Συνολικά: } \Delta T_f = K_f m = K_f \frac{m_{\text{ουσίας}} 1000}{Mr_{\text{ουσίας}} m_{\text{διαλύτη}}}$$

$m_1$	Μάζα διαλυμένης ουσίας
$m_2$	Μάζα διαλύτη
$Mr$	Σχετική μοριακή μάζα διαλυμένης ουσίας

10 mg/ml της νεοσυντιθέμενης ένωσης διαλύθηκε σε DMSO. Από αυτό το διάλυμα λήφθηκε 1μl και προστέθηκε σε 49 μl ddH<sub>2</sub>O και υπολογίστηκε το μοριακό βάρος του τελικού διαλύματος με το Gonotec Osmomat 3000 Basic Freezing Point Osmometer.

## 1.5 Φασματοσκοπία φθορισμού ακτίνων X (X-ray Fluorescence Spectroscopy, XRF)

Η φασματοσκοπία φθορισμού ακτίνων X βασίζεται στις μετρήσεις των χαρακτηριστικών «δευτερογενών» (ή φθορίζοντων) ακτίνων X που εκπέμπονται από το στοιχείο, το οποίο διεγείρεται από βομβαρδισμό με ακτίνες X ή γ-ακτίνες υψηλής ενέργειας. Το φαινόμενο χρησιμοποιείται ευρέως για στοιχειακή και χημική ανάλυση, ιδιαίτερα στη διερεύνηση μετάλλων. Τα στοιχεία που περιέχονται στο δείγμα δημιουργούν ακτινογραφίες φθορισμού, το δακτυλικό αποτύπωμα. Το δακτυλικό αποτύπωμα είναι χαρακτηριστικό για κάθε στοιχείο.

Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε αφορά αρχικά στην παρασκευή παστίλιας του ZINT με βορικό οξύ. Συγκεκριμένα ζυγίστηκε συγκεκριμένη ποσότητα της ουσίας μαζί με 500mg βορικού οξέος σε αναλυτικό ζυγό και στο ίδιο Eppendorf. Στη συνέχεια οι δυο ουσίες λειοτριβούνται σε γουδί και έπειτα χρησιμοποιήθηκε ειδική πρέσα της Specac. Έτσι σχηματίζεται παστίλια η οποία τοποθετείται στο μηχάνημα XRF Rigaku και προκύπτει το φάσμα.

## 1.6 Φασματοσκοπία υπεριώδους-ορατού UV-Vis

Η απορρόφηση ακτινοβολίας συμβαίνει όταν τα φωτόνια που προσπίπτουν στο δείγμα έχουν ίση ενέργεια με αυτή που χρειάζεται για να συμβεί κβαντισμένη ενεργειακή μεταβολή. Η ενέργεια των ηλεκτρονίων παρέχεται από τον παρακάτω τύπο:

$$E = E_1 - E_2 = h \cdot \nu = h \cdot \frac{c}{\lambda}$$

όπου E η ενέργεια, h η σταθερά του Plank,  $\nu$  η συχνότητα της ακτινοβολίας και  $\lambda$  το μήκος κύματος. Οι ποσοτικές μετρήσεις στην φασματοφωτομετρία UV-VIS βασίζεται στο ότι η απορρόφηση της ακτινοβολίας εξαρτάται από την ποσότητα της ουσίας που απορροφά την ακτινοβολία.

Έγινε χαρακτηρισμός και έλεγχος σταθερότητας της νεοσυντιθέμενης ένωσης σε διαλύτη DMSO (0, 24, 48 ώρες και μετά από 1 εβδομάδα). Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν στο μηχάνημα UV 1600PC Spectrophotometer VWR μέσω του προγράμματος M.Wave Professional 1.

Πρώτα λήφθηκε μέτρηση του τυφλού δηλαδή μόνο 2ml του διαλύτη, στην συγκεκριμένη περίπτωση 2ml DMSO. Αφού παρασκευάστηκε stock διάλυμα της ουσίας  $10^{-2}M$ , έγινε αραιώση αυτού μέχρι συγκέντρωσης  $10^{-4}M$  και λήφθηκε το φάσμα

του ZINT σε χρόνο μηδέν, 24h, 48h και μιας εβδομάδας. Όλα τα αποτελέσματα αποθηκεύονται ώστε να υπάρχει σύγκριση μεταξύ τους.

## **1.7 Φασματοσκοπία υπεριώδους-ορατού FT-IR**

Η υπέρυθρη φασματοσκοπία μετασχηματισμού Fourier (FTIR) χρησιμοποιείται για λήψη υπέρυθρου φάσματος απορρόφησης ή εκπομπής και μπορεί να πραγματοποιηθεί για στερεά υγρά και αέρια.

Η υπέρυθρη φασματοσκοπία IR βασίζεται στην αλληλεπίδραση των ουσιών με την υπέρυθρη ακτινοβολία. Προκαλεί, χαρακτηριστικές δονήσεις, οι οποίες είναι ανάλογες με το είδος των δεσμών στην προς μελέτη ένωση. Το FTIR είναι μέθοδος υπέρυθρης φασματοσκοπίας στην οποία χρησιμοποιείται ο μετασχηματισμός Fourier και ως αποτέλεσμα είναι να βελτιώνονται τα φάσματα που λαμβάνονται σε σχέση με τα συμβατικά φασματοφωτόμετρα. Τέλος η τεχνική ATR βασίζεται στο φαινόμενο της ολικής εσωτερικής ανάκλασης ενώ στόχο έχει την ενίσχυση της ευαισθησίας της φασματοσκοπίας.

Χρησιμοποιήθηκε το μηχάνημα FTIR Agilent με το πρόγραμμα MicroLab για λήψη των φασμάτων με το φάσμα συχνοτήτων της ακτινοβολίας να κυμαίνεται στα 4000-400 cm<sup>-1</sup>

## 1.8 Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού πρωτονίου ( $^1\text{H-NMR}$ )

Ο πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός (NMR) είναι ένα φυσικό φαινόμενο όπου όταν οι πυρήνες των ατόμων βρεθούν σε ένα μαγνητικό πεδίο μπορούν να απορροφούν ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία την οποία και επανεκπέμπουν. Αυτή η ενέργεια έχει μια συγκεκριμένη συχνότητα, είναι εξαρτώμενη από την ισχύ του μαγνητικού πεδίου και τις μαγνητικές ιδιότητες των ισotόπων κάθε ατόμου. Χαρακτηριστική παράμετρος του NMR είναι η συχνότητα συντονισμού μιας ουσίας που είναι ευθέως ανάλογη με την ένταση του μαγνητικού πεδίου που εφαρμόζεται.

Η τεχνική αυτή είναι η εφαρμογή πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού στη φασματοσκοπία NMR σχετικά με πυρήνες υδρογόνου στα μόρια μιας υπό εξέταση ουσίας με σκοπό τον προσδιορισμό της δομής των μορίων της. Τα φάσματα για την ένωση ZINT και τον ligand tyrosine λήφθηκαν σε δευτεριωμένο DMSO(DMSO- $d_6$ ).

Περίπου 10 mg της ουσίας διαλύθηκαν σε 350μl δευτεριωμένου DMSO και τοποθετήθηκαν σε ειδικό σωληνάκι NMR και λήφθηκε μέτρηση στο όργανο Bruker Avance 400 (400MHz) και το πρόγραμμα Topspin 2.1. Έτσι βρέθηκαν οι συντονισμοί των πυρήνων ατόμων υδρογόνου σε χρόνο μηδέν, 48 ώρες και μια εβδομάδα για να ελεγχθεί και η σταθερότητα της νεοσυντιθέμενης ένωσης. Τα φάσματα προβλήθηκαν και συγκρίθηκαν με το πρόγραμμα Mestrec23.



## 1.9 Περίθλαση μονοκρυστάλλου με ακτίνες X (single crystal X-ray crystallography)

Η περίθλαση μονοκρυστάλλου με ακτίνες X χρησιμεύει στον προσδιορισμό της δομής κρυσταλλικών στερεών και δίνει πληροφορίες για τις σχέσεις δομής-ιδιότητας τους. Αυτό το ισχυρό εργαλείο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την άμεση οπτικοποίηση των ακριβών και λεπτομερών δομικών πληροφοριών διάφορων πολυμερών και κυρίως συμπλόκων μετάλλων με οργανικές ενώσεις. Με αυτήν την τεχνική μετρήθηκε το ZINT αφού είχε κρυσταλλώσει με σκοπό την εύρεση της δομής του. Παρακάτω φαίνονται τα κρυσταλλογραφικά δεδομένα για την διεξαγωγή του πειράματος.

<b>Crystal Data</b>	
<b>Formula</b>	C <sub>18</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> Zn, 2(C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O S)
<b>Formula Weight</b>	582.01
<b>Crystal System</b>	orthorhombic
<b>Space group</b>	P212121 (No. 19)
<b>a, b, c [Å]</b>	5.4715(6) 21.193(3) 22.468(2)
<b>V [Å<sup>3</sup>]</b>	2605.3(5)
<b>Z</b>	4
<b>D(calc) [g/cm<sup>3</sup>]</b>	1.484
<b>Mu(MoKa) [mm<sup>-1</sup>]</b>	1.151
<b>F(000)</b>	1216
<b>Crystal Size [mm]</b>	0.02 x 0.02 x 0.30

<b>Data Collection</b>	
<b>Temperature (K)</b>	296
<b>Radiation [Å]</b>	MoKa 0.71073
<b>Theta Min-Max [Deg]</b>	2.9, 24.9
<b>Dataset</b>	-6: 5 ; -25: 25 ; -26: 26
<b>Tot., Uniq. Data, R(int)</b>	45529, 4542, 0.263
<b>Observed Data [I &gt; 2.0 sigma(I)]</b>	2811
<b>Refinement</b>	
<b>Nref, Npar</b>	4542, 338
<b>R, wR<sup>2</sup>, S</b>	0.0549, 0.1109, 0.96
<b>w = <math>\frac{1}{\sigma^2(F_o^2) + (0.0249P)^2}</math></b>	WHERE P=(FO <sup>2</sup> +2FC <sup>2</sup> )/3'
<b>Max. and Av. Shift/Error</b>	0.00, 0.00
<b>Flack x</b>	0.00(2)
<b>Min. and Max. Resd. Dens. [e/ Å<sup>3</sup>]</b>	-0.45, 0.35

*Πίνακας 4: Κρυσταλλικά δεδομένα*

## 2. Βιολογικό Μέρος

Χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω υλικά:

Χρησιμοποιήθηκε ο παρακάτω εξοπλισμός:

Tryptone (Biolife)	Δοκιμαστικοί σωλήνες των 15ml
Soytone (Biolife)	Πιπέτες (1000, 100, 10μl)
Beef extract (Biolife)	Τρυβλία Petri
Yeast extract (Sigma-Aldrich)	Κρικοφόρος και Βαμβακοφόρος Στειλεός
NaCl (Merck KGaA)	Χάρτινοι Δίσκοι 9mm
d-Glucose (Merck KGaA)	Λαβίδα
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Merck KGaA)	Καμινέτο
Peptone (Biolife)	Laminar Air Flow Hood (Hd-650 Laminar Flow Cabinetzhejiang Sujing Purification Equipment)
Agar (Sigma-Aldrich)	Γυάλινα Μπουκάλια (250,500ml)
ddH <sub>2</sub> O	Eppendorf
Ορός (NaCl 0.9M)	Tips
Βακτήρια ( <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus</i> <i>Epidermidis</i> ATCC)	Vortex
Μοντέλο <i>Artemia Salina</i>	Επωαστής
	Φυγόκεντρος PHOENIX Instrument CD2012 Plus
	Μηχάνημα σάρωσης (HP)
	Οργανολογία ηλεκτροφόρησης (omniPAGE Mini Wide Vertical Protein Electrophoresis System)

## 2.1 Αντιμικροβιακή δράση

Με σκοπό να διερευνηθεί η αντιμικροβιακή δράση του ZINT, έγινε μια σειρά πειραμάτων για εύρεση ζώνης αναστολής (IZ), της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (MIC) και της ελάχιστης βακτηριοκτόνου συγκέντρωσης (MBC) για το Gram- βακτήριο *P. Aeruginosa* και Gram+ *S. epidermidis* [46-53]. Όλα τα βακτήρια διατηρούνται στους -80°C και ο επωαστής όπου τα αναπτύσσουμε έχει 37°C. Για τη βέλτιστη ανάπτυξη της *Pseudomonas aeruginosa* χρησιμοποιήθηκαν tryptone (1%, 10g/L), yeast extract (0.5%, 5g/L) και NaCl (1%, 10g/L). Για το υγρό θρεπτικό υλικό χρησιμοποιήθηκε δις απεσταγμένο νερό (ddH<sub>2</sub>O). Για το στερεό θρεπτικό υλικό χρησιμοποιήθηκε και άγαρ (1.5%, 15g/L).

Όλα τα σκεύη χρησιμοποιήθηκαν αφού πρώτα αποστειρώθηκαν σε κλίβανο καθώς αποστειρώνονται και όλα τα θρεπτικά υλικά στα οποία εμβολιάζονται και αναπτύσσονται τα βακτήρια. Τέλος, όλα τα πειράματα διεξήχθησαν δίπλα σε φλόγα ή μέσα σε hood με laminar air flow για εξασφάλιση στείρων συνθηκών.

### 2.1.1 Ζώνη Αναστολής (IZ)

Η ζώνη αναστολής δείχνει τη διάμετρο στην οποία σταματάει η ανάπτυξη των βακτηρίων. Για τη διεξαγωγή πειραμάτων για εύρεση της ζώνης αναστολής, χρησιμοποιήθηκαν τρυβλία με στερεά θρεπτικά υλικά 20 ml, κατάλληλα για ανάπτυξη του εκάστοτε βακτηρίου. Επιπλέον χρειάστηκαν αποστειρωμένοι βαμβακοφόροι στείλεοί και αποστειρωμένα κυλινδρικά χαρτιά διαμέτρου 9mm.

Η πορεία που ακολουθήθηκε ήταν αρχικά εμβάπτιση του βαμβακοφόρου στείλεού σε διάλυμα βακτηρίου με απορρόφηση  $A=0.1(10^8 \text{ cfu/ml βακτήρια})$  για 20

sec και εμβολιασμός του στερεού θρεπτικού υλικού. Έπειτα, οι κυλινδρικοί δίσκοι από χαρτί εμβαπτίζονταν σε διάλυμα κάθε ουσίας συγκέντρωσης  $C=10\text{mM}$  για 10 sec και τοποθετούνται στο εμβολιασμένο στερεό θρεπτικό υλικό. Τα αποτελέσματα φαίνονται 24 ώρες μετά την επώασή τους. [46-53]

### **2.1.2 Ελάχιστη Ανασταλτική Συγκέντρωση(MIC)**

Η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση είναι η χαμηλότερη συγκέντρωση του αντιμικροβιακού υλικού που εμποδίζει την εμφανή ανάπτυξη ενός μικροοργανισμού και μετράται σε  $\mu\text{g/ml}$  ή  $\text{mg/L}$ . Η πορεία που ακολουθήθηκε για να βρεθεί η MIC υπολογίστηκαν οι κατάλληλοι όγκοι υγρού θρεπτικού υλικού, της ουσίας προς εξέταση και του διαλύματος βακτηρίου. Ο τελικός όγκος κάθε φορά είναι 2 ml και πρέπει να περιέχονται  $5 \times 10^5 \text{cfu/ml}$ . [46-53]

### **2.1.3 Ελάχιστη Βακτηριοκτόνος Συγκέντρωση (MBC)**

Η ελάχιστη βακτηριοκτόνος συγκέντρωση MBC είναι η χαμηλότερη συγκέντρωση στην οποία θανατώνεται το βακτήριο κατά 99.9% μετά από 24 ώρες και επώαση υπό κατάλληλες συνθήκες θερμοκρασίας. Ακολουθείται μετά το πείραμα της MIC με την υποκαλλιέργεια 4μl σε τρυβλίο με στερεό θρεπτικό υλικό 10ml. Η μικρότερη συγκέντρωση στην οποία δε θα εμφανιστούν αποικίες του βακτηρίου είναι η ελάχιστη βακτηριοκτόνος συγκέντρωση MBC. [46-53]

## 2.2 Δράση τοποϊσομεράσης

Η τοποϊσομεράση είναι ένα ένζυμο το οποίο συμμετέχει στη διαδικασία αντιγραφής του DNA. Με τη δέσμευσή της στο DNA η τοποϊσομεράση I διασπά τον ένα κλώνο μέσω ενός καταλοίπου τυροσίνης προσβάλλοντας ένα φωσφορικό. Μόλις σπάσει ο κλώνος, περιστρέφεται κατά έναν ελεγχόμενο τρόπο γύρω από τον κλώνο που δεν έχει διασπαστεί. Η αντίδραση συμπληρώνεται με την επανασύνδεση του κλώνου που έχει διασπαστεί. Η διεργασία αυτή έχει ως αποτέλεσμα τη μερική ή πλήρη χαλάρωση ενός υπερελικωμένου πλασμιδίου.

Με σκοπό λοιπόν να διερευνηθεί εάν το ZINT μπορεί να διασπάσει έναν κλώνο πλασμιδιακού DNA του βακτηρίου E.coli, διεξήχθη ηλεκτροφόρηση πλασμιδιακού DNA μετά από επώαση με την υπό εξέταση ένωση.

Για τη διεξαγωγή του πειράματος αρχικά είναι απαραίτητη η απομόνωση πλασμιδίου από το E.coli. Η πορεία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής:

### Απομόνωση πλασμιδίου:

- 1200ml υγρής βακτηριακής καλλιέργειας μεταφέρεται σε Eppendorf
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση 5 min/12000 στροφές
- Απορρίπτεται το υπερκείμενο και στο ίζημα προστίθενται 100 μl του Διαλύματος I\*
- Ανάδευση σε vortex και παραμονή σε θερμοκρασία δωματίου για 20 min
- Προσθήκη 200 μl του Διαλύματος II\*\*, ανακίνηση 6 φορές και παραμονή σε πάγο 20 min
- Προσθήκη 150 μl του Διαλύματος III\*\*\*και αφού σχηματιστεί λευκό ίζημα, παραμονή 20 min σε πάγο

- Φυγοκέντρηση 5min/12000 στροφές
- Απομάκρυνση 400 μl του υπερκείμενου και τοποθέτηση σε νέο Eppendorf
- Προσθήκη 800 μl EtOH 100% (η οποία είναι σε θερμοκρασία δωματίου), ανακίνηση και επώαση σε 7 min σε θερμοκρασία δωματίου
- Φυγοκέντρηση 5 min/12000 στροφές. Απόρριψη υπερκείμενου και προσθήκη 1 ml 70% κρύας EtOH
- Προσεκτική ανακίνηση χωρίς αποκόλληση ιζήματος
- Φυγοκέντρηση 3 min/12000 στροφές
- Απομάκρυνση υπερκείμενου και ξήρανση του ιζήματος στον αέρα
- Επαναιώρηση σε 10μl TE buffer και αποθήκευση στους -20°C

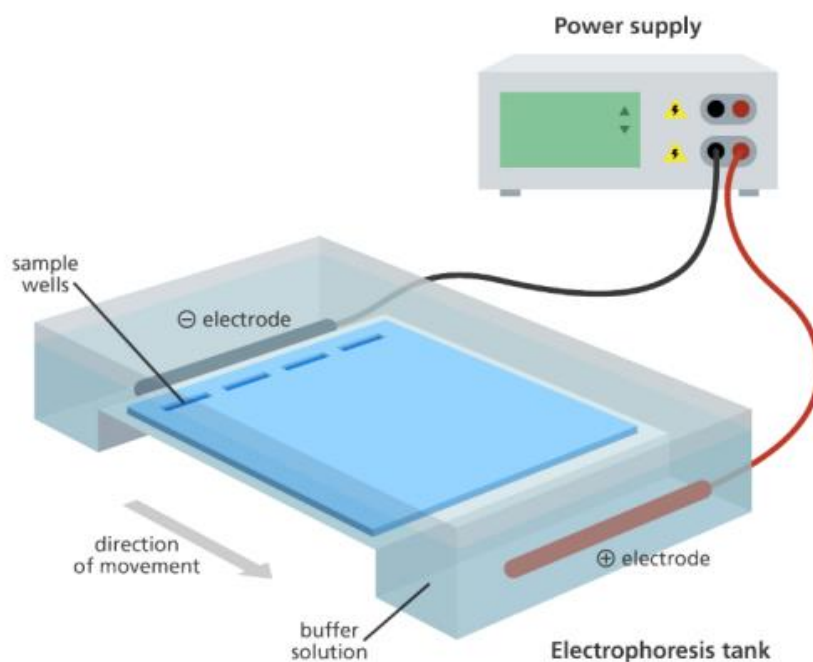
\*Διάλυμα I: 25mM Tris, 10mM EDTA, 50mM γλυκόζη, pH=8, να φυλάσσεται σε πάγο

\*\*Διάλυμα II: 0.2N NaOH, σε 1% SLS, παρασκευάζεται πριν την έναρξη του πειράματος

\*\*\*Διάλυμα III: CH<sub>3</sub>COOH-CH<sub>3</sub>COONa, αποθήκευση τους 0°C

#### Παρασκευή gel αγαρόζης :

- Παρασκευή διαλύματος 1xTAE
- 30ml του 1xTAE χρησιμοποιούνται καθώς και αγαρόζη για τελική περιεκτικότητα 0.8w/v και θερμαίνονται ώστε να δαλυθεί η αγαρόζη
- Προσθήκη βρωμιούχου αιθιδίου και απόχυση του διαλύματος στην ειδική φόρμα αφού έχει τοποθετηθεί το χτενάκι διαμόρφωσης πηγαδιών
- Αφού πήξει αφαιρείται το χτενάκι και τοποθέτηση του gel στη συσκευή ηλεκτροφόρησης



Εικόνα 41: Συσκευή Ηλεκτροφόρησης [45]

### Ηλεκτροφόρηση :

- Μετά την τοποθέτηση του gel αγαρόζης στη συσκευή, συμπληρώνεται με ρυθμιστικό διάλυμα 1xTAE 0.5cm πάνω από την επιφάνεια του gel
- Τοποθέτηση 12μl δείγματος πλασμιδίου-ZINT με το σύμπλοκο να βρίσκεται σε συγκέντρωση 10 mM αφού έχουν τοποθετηθεί 2μl γλυκερόλης
- Τοποθέτηση καλωδίων στους αντίστοιχους πόλους και εφαρμογή τάσης 30Volt
- Ανά 30 min ελέγχεται η πορεία της ηλεκτροφόρησης κάτω από ακτινοβολία UV και ακολουθεί σάρωση του gel αγαρόζης

### **2.3 Έλεγχος in vitro τοξικότητας στην *Artemia Salina***

Πραγματοποιήθηκε έλεγχος τοξικότητας μέσω της δοκιμής θνησιμότητας στον ζωντανό οργανισμό *Artemia Salina* (γαρίδα άλμης), η οποία είναι χρήσιμη για την πρόληψη διαφόρων βιοματικών δράσεων της προς μελέτη ένωσης. Τα πλεονεκτήματα



που παρουσιάζει αυτό το μοντέλο είναι η ευρεία κατανομή του, ο μικρός κύκλος ζωής του, η ευαισθησία της σε τοξικές ουσίες καθώς και ότι τα αποτελέσματα της είναι σε συγκρίσιμα με εκείνα άλλων θηλαστικών.



*Εικόνα 42: Artemia salina [70]*

Η πορεία του πειράματος που ακολουθήθηκε είναι η εξής : ποσότητα 0.5gr από τα αυγά της γαρίδας άλμης ενυδατώνονται με φρέσκο H<sub>2</sub>O για μισή ώρα μέσα σε διαχωριστική χοάνη. Οι συνθήκες θαλασσινού νερού προσομοιάστηκαν με την διάλυση 8.5 gr θαλασσινού αλατιού σε 250 ml εμφιαλωμένου H<sub>2</sub>O. Στη χοάνη παρέχεται συνεχής παροχή φρέσκου αέρα σε θερμοκρασία δωματίου και συνεχή παρουσία φωτός. Αφήνονται σε αυτές τις συνθήκες για τουλάχιστον 48 ώρες μέχρι να εκκολαφθούν τα αυγά.



*Εικόνα 43:* Τα αυγά της *Artemia Salina* στη διαχωριστική χοάνη με παροχή αέρα

Μετά την εκκόλαψη των αυγών, οι προνύμφες της γαρίδας άλμης μαζεύονται με μικροπιπέτα από την πλευρά της χοάνης που βρίσκεται η φωτεινή πηγή. Μετά τη συλλογή τους οι προνύμφες διαχωρίζονται από τα αυγά σε ένα ποτήρι που περιέχει NaCl 0.9%M. Στη συνέχεια κατάλληλη ποσότητα από το διάλυμα με τις προνύμφες (600  $\mu$ l) που περιέχει ~10-15 προνύμφες τοποθετείται σε κάθε βοθρίο ενός τρυβλίου με 24 βοθρία. Οι ενώσεις παρασκευάζονται σε συγκέντρωση  $10^{-4}$ ,  $2 \times 10^{-4}$  και  $5 \times 10^{-4}$  M σε DMSO και αραιώνονται με NaCl 0.9% w/v προκειμένου να επιτευχθούν οι τελικές συγκεντρώσεις των ουσιών σε τελικό όγκο 1 ml σε τριπλή επανάληψη η κάθε μια. Η επιβίωση του πληθυσμού της γαρίδας άλμης παρατηρήθηκε μετά από επώαση με το σύμπλοκο για 24 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου με την βοήθεια στερεοσκοπίου. Οι

προνύμφες θεωρήθηκαν νεκρές αν μένουν εντελώς ακίνητες για 10 sec παρακολούθησης. Κάθε πείραμα επαναλαμβάνεται τρεις φορές.



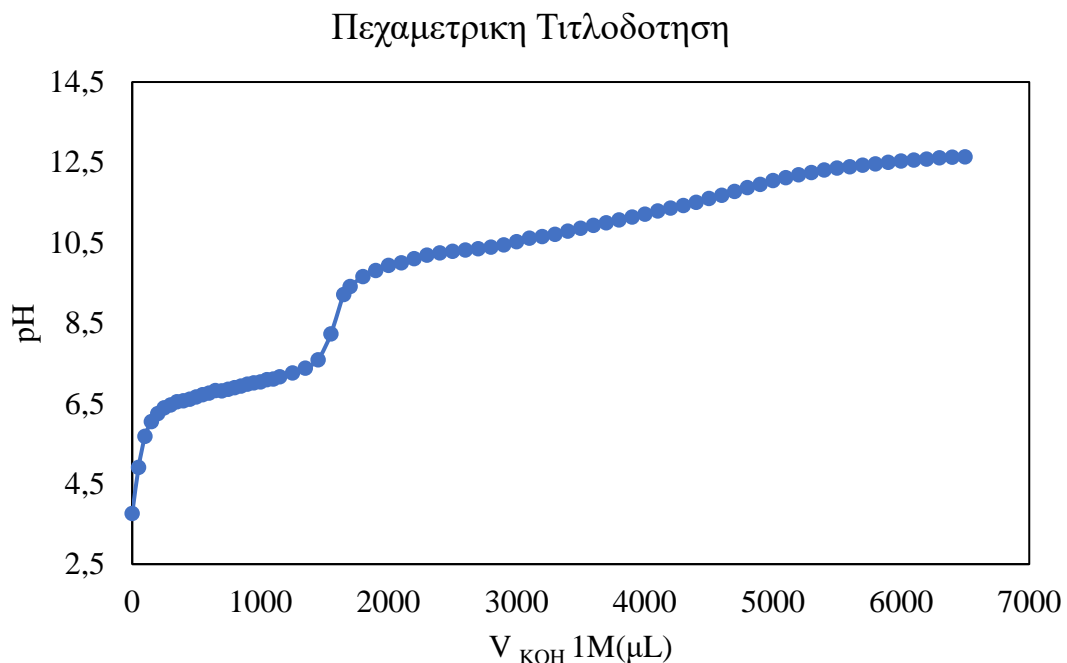
*Εικόνα 44: Παρατήρηση των Artemia Salina στο στερεοσκόπιο*

## Δ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 1.Χαρακτηρισμός Ένωσης

#### 1.1Γενικά

Από την πεχαμετρική τιτλοδότηση φαίνεται πως στο  $\text{pH} = 8$ , στο Ισοδύναμο Σημείο έχουμε το σχηματισμό του συμπλόκου ZINT που αντιστοιχεί σε προσθήκη 1.5 mL KOH 1M.

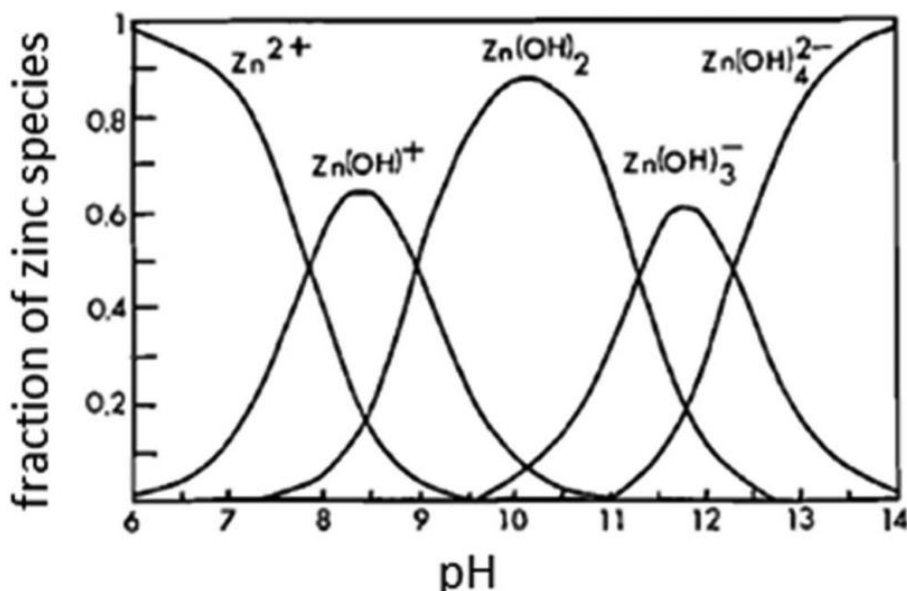


*Εικόνα Δ1:* Πεχαμετρική τιτλοδότηση αντίδρασης σχηματισμού ZINT με καυστικό κάλιο 1M

Συγκεκριμένα αφού αναμιχθούν το μεθανολικό διάλυμα του νιτρικού ψευδαργύρου με το υδατικό διάλυμα τυροσίνης, ηλεκτρόδια του πεχαμέτρου pH METER BASIC 20 CRISON βυθίστηκαν στο διάλυμα (αφού πρώτα είχαν ρυθμιστεί ξεχωριστά τα ηλεκτρόδια να μηδενίσουν με διάλυμα οξέος και βάσης). Η προσθήκη κάθε επόμενης

ποσότητας KOH γινόταν αφότου σταθεροποιούταν το pH και καταγραφόταν. Έτσι παρασκευάστηκε πρότυπη καμπύλη pH συναρτήσεως του  $V_{\text{KOH}}$  έτσι ώστε να βρεθεί το βέλτιστο pH στο οποίο σχηματίζεται το σύμπλοκο. Όπως φαίνεται στην παραπάνω καμπύλη τιτλοδότησης, το ZINT σχηματίζεται με την προσθήκη 1,5ml KOH 1M και όταν το pH βρίσκεται στο 8.

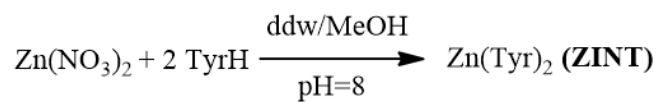
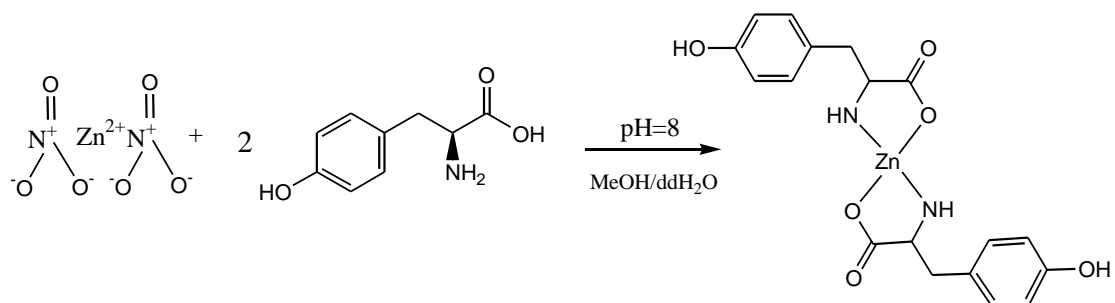
Από το παρακάτω διάγραμμα βρίσκεται το είδος του σωματιδίου ( $\text{Zn}(\text{OH})^+$ ) που σχηματίζεται στο αντίστοιχο pH σχηματισμού του ZINT (pH=8).



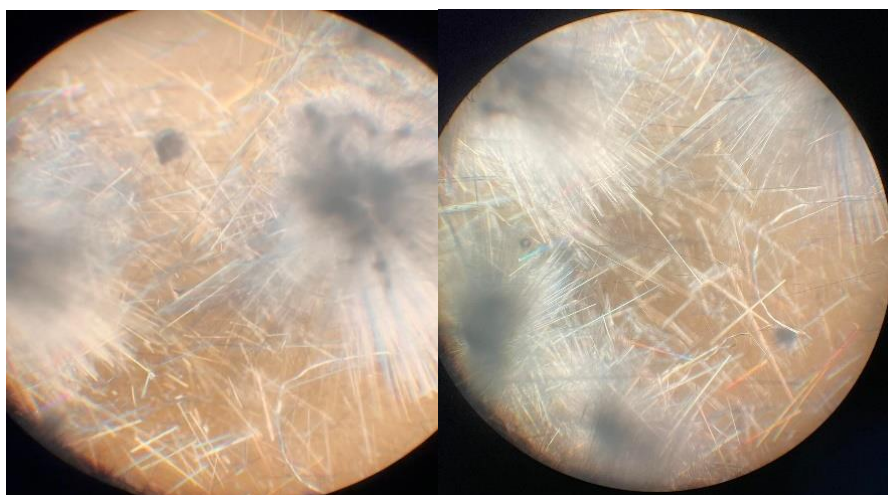
Εικόνα Δ2: Διάγραμμα κατανομής για είδη ψευδαργύρου ως συνάρτηση του pH του διαλύματος στους 25°C[44]

Η ένωση συντέθηκε με αντίδραση του νιτρικού ψευδαργύρου με το αμινοξύ τυροσίνη σε αναλογία 1:2 σε διάλυμα μεθανόλης-ddH<sub>2</sub>O και προσθήκη 1.5ml KOH 1M για να πετύχουμε pH=8. Η ένωση χαρακτηρίστηκε με σημείο τήξης, διαλυτότητα, φασματοσκοπία δονήσεων υπερώθρου (FT-IR), πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (<sup>1</sup>H-NMR), υπεριώδους-ορατού (UV-Vis), φθορισμού ακτίνων X (XRF), κρυσκοπία

και περίθλαση μονοκρυστάλλου με ακτίνες X (single crystal X-ray crystallography). Η αντίδραση σύνθεσης του ZINT φαίνεται παρακάτω:



Κρύσταλλοι ZINT σχηματίστηκαν σε διάλυμα DMSO οι οποίοι φαίνονται στην παρακάτω εικόνα.



Εικόνα 13: Κρύσταλλοι ZINT στο οπτικό μικροσκόπιο

## 1.2 Σημείο τήξης

Προσδιορίστηκε το σημείο τήξεως του συμπλόκου ZINT υπό κανονικές συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης με εφαρμογή θερμότητας. Όπως φαίνεται από τις τιμές του παραπάνω πίνακα, το σύμπλοκο τήκεται σε διαφορετική θερμοκρασία από τον υποκαταστάτη.

Ένωση	Θερμοκρασία
<b>Tyrosine</b>	268°C
<b>ZINT</b>	196-209°C
<b>ZINT crystals</b>	257-260°C

Πίνακας Δ1: Σημεία τήξης των ενώσεων tyrosine, ZINT και κρυστάλλων ZINT

## 1.3 Διαλυτότητα

Διαλύτες	ZINT
<b>n-hexane</b>	-
<b>Toluene</b>	-
<b>CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub></b>	-
<b>CHCl<sub>3</sub></b>	-
<b>Acetone</b>	-
<b>MeOH</b>	-
<b>MeCN</b>	-
<b>DMF</b>	-
<b>DMSO</b>	✓✓
<b>H<sub>2</sub>O</b>	✓

Πίνακας Δ2: Διαλυτότητα του ZINT στους παραπάνω διαλύτες

Το σύμπλοκο είναι αρκετά διαλυτό στο DMSO και μερικώς διαλυτό στο νερό.

#### 1.4 Κρυοσκοπία



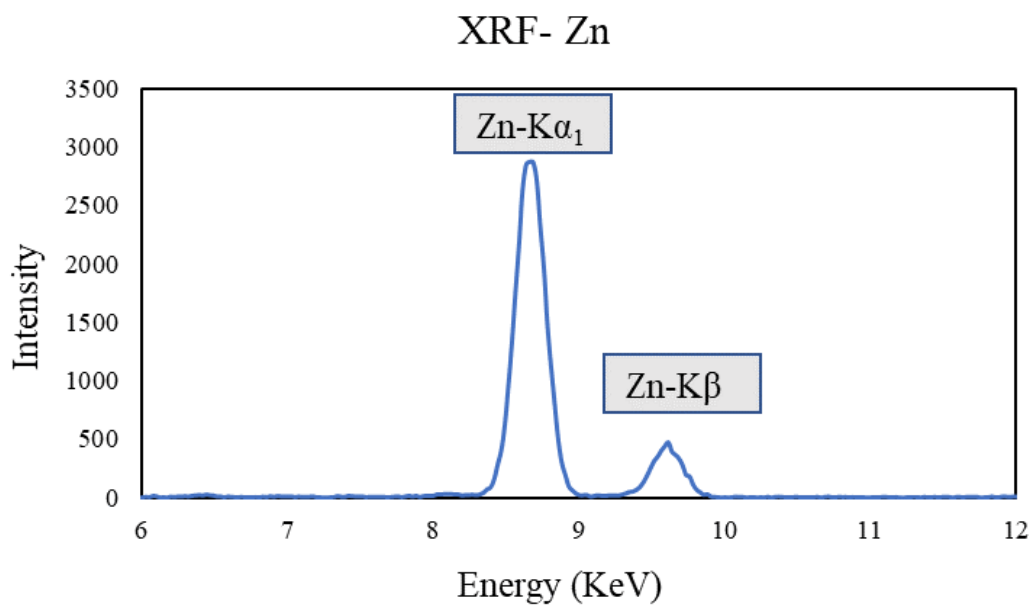
Διαλύθηκαν 10mg ένωσης ZINT σε 1 ml DMSO και ακολούθησαν πολλές μετρήσεις για επαναληψιμότητα. Βρέθηκε πως το μοριακό βάρος της ένωσης ZINT είναι 556,12g/mol για αναλογία 1:2 (Zn-Tyr) με το όργανο Gonotec Osmomat 3000 Basic Freezing Point Osmometer. Το ατομικό βάρος του ψευδαργύρου είναι 65,38g/mol και της τυροσίνης

181.19g/mol.

#### 1.5 Φασματοσκοπία Φθορισμού Ακτίνων X (XRF)

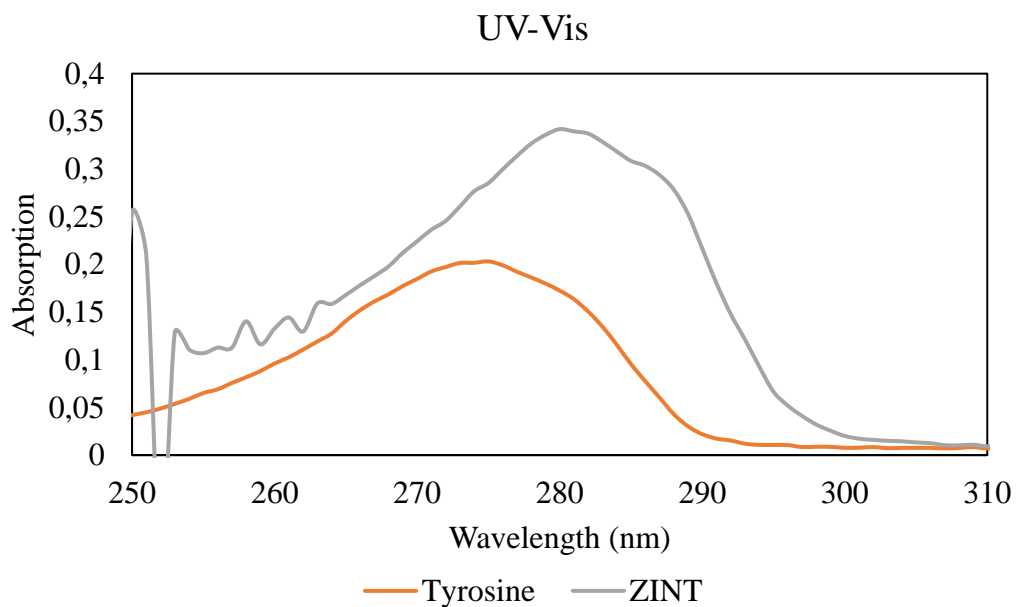
Από την φασματοσκοπία φθορισμού ακτίνων X βρέθηκε το ποσοστό του ψευδαργύρου στο ZINT το οποίο είναι 16.15 % w/w  $\pm 0.0021\%$  w/w, το θεωρητικό ποσοστό ψευδαργύρου που θα βρισκόταν στην ένωση υπολογίστηκε 15.22% w/w που βρίσκεται σε συμφωνία με με το αποτέλεσμα του XRF. Παρακάτω φαίνεται το φάσμα ακτίνων X του συμπλόκου





Εικόνα 14: Φάσμα XRF, περιεκτικότητα ψευδαργύρου στο ZINT

### 1.6 Φασματοσκοπία Υπεριώδους-Ορατού (UV-Vis)



Εικόνα 15: Φάσμα UV-Vis του ZINT  $10^{-4}$ M σε σύγκριση με την τυροσίνη  $10^{-3}$ M σε

DMSO

Στην εικόνα Δ5 φαίνονται τα φάσματα ορατού υπεριώδους σε διαλύματα DMSO του ZINT (γκρι) σε συγκέντρωση  $10^{-4}$  M, της τυροσίνης (πορτοκαλί) σε συγκέντρωση  $10^{-3}$  M. Από τα φάσματα βρέθηκαν τα  $\lambda_{\max}$  και υπολογίστηκε ο συντελεστής μοριακής απορρόφησης από τον νόμο του Beer  $A=\epsilon*b*c$  ( $A$ = Απορρόφηση,  $b$ = Μήκος της κυψελίδας,  $\epsilon$ = Συντελεστής μοριακής απορροφητικότητας και  $c$ = Συγκέντρωση της ουσίας), μοναδικός για κάθε ένωση. Παρακάτω φαίνονται τα  $\lambda_{\max}$  και οι συντελεστές μοριακής απορροφητικότητας του ZINT και της τυροσίνης που υπολογίστηκαν από το νόμο του Beer.

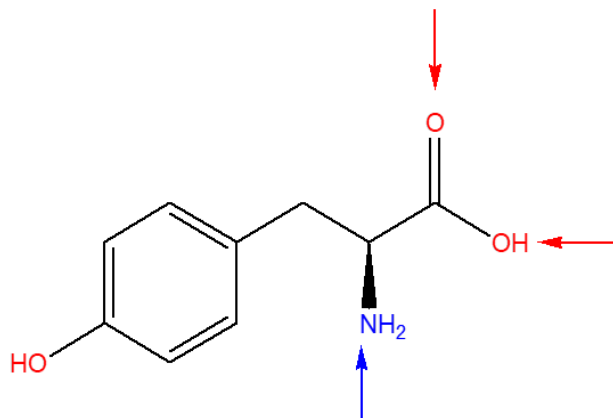
Το ZINT εμφανίζει μέγιστο στα 280 nm με απορρόφηση 0.34178 ενώ η τυροσίνη στα 275 nm με απορρόφηση 0.20314. Η διαφορά αυτή στους συντελεστές μοριακής απορροφητικότητας και στο shift στα nm αποτελούν ενδείξεις της ένταξης του υποκαταστάτη στο μέταλλο.

<i>Ένωση</i>	$\epsilon$ (L mol <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> )	$\lambda_{\max}$
<i>ZINT</i>	3441.8	280nm
<i>Tyrosine</i>	203.1	275nm

Πίνακας Δ3 :Συντελεστές μοριακής απορροφητικότητας του συμπλόκου και της τυροσίνης

### 1.7 Δονητική φασματοσκοπία υπέρυθρου μετασχηματισμού Fourier (FT-IR)

Οι πιθανές θέσεις ένταξης του  $Zn^{2+}$  στην τυροσίνη φαίνονται στην παρακάτω εικόνα:



*Εικόνα Δ6* :Πιθανές θέσεις της τυροσίνης όπου μπορεί να ενταχθεί το ιόν ψευδαργύρου

Παρακάτω παρουσιάζονται τα φάσματα FT-IR του συμπλόκου ZINT, της τυροσίνης και του άλατος της τυροσίνης με νάτριο. Στο φάσμα της τυροσίνης η δόνηση τους 1582 κυματάριθμους αντιστοιχεί  $\nu_{as}COO$ , στο φάσμα του άλατος της τυροσίνης με κάλιο παρουσιάζεται στους  $1567\text{ cm}^{-1}$  ενώ στο φάσμα του συμπλόκου η  $\nu_{as}COO$  έχει μετατοπιστεί στους  $1597\text{ cm}^{-1}$ .

Η δόνηση στο φάσμα του άλατος της τυροσίνης του  $\nu_{sym}COO^-$  παρουσιάζεται στα  $1435\text{ cm}^{-1}$  και στο φάσμα του ZINT έχει μετατοπιστεί στους  $1453\text{ cm}^{-1}$  λόγω της συμπλοκοποίησης. Η ταινία στο ZINT στους  $1402\text{ cm}^{-1}$  και  $1354\text{ cm}^{-1}$  συμφωνεί με την ένταξη της καρβοξυλομάδας.

Η κορυφή στα  $1245\text{ cm}^{-1}$  οφείλεται στην  $\rho NH_2$  της τυροσίνης στο σύμπλοκο ενώ στο φάσμα της τυροσίνης η  $\rho NH_2$  φαίνεται στα  $1098\text{ cm}^{-1}$ . Στους πιο χαμηλούς κυματάριθμους στο φάσμα ZINT  $534-600\text{ cm}^{-1}$  αντιστοιχεί στο δεσμό Zn-N, και  $456-498\text{ cm}^{-1}$  στο δεσμό Zn-O.

Όσον αφορά το φάσμα της τυροσίνης, η δόνηση στους  $3103\text{ cm}^{-1}$  οφείλεται στο  $\nu(\text{C}_{\text{αρωματικό}}-\text{H})$  και στους  $2930\text{ cm}^{-1}$  στον  $(\text{C}_{\text{κορ}}-\text{H})$ . Συγκρίνοντας τα φάσματα ZINT-άλατος τυροσίνης για τη  $\nu(\text{COO}_{\text{asym}})$  από  $1567\text{ cm}^{-1}$  μετατοπίστηκε στα  $1597$  στο σύμπλοκο και για την  $\nu(\text{COO}_{\text{sym}})$  από  $1435\text{ cm}^{-1}$  μεταφέρθηκε στους  $1453\text{ cm}^{-1}$ .

$\Delta\nu$ συμπλόκου $>..>$ $\Delta\nu$ άλατος	<b>Μονοδοντική ή ασύμμετρη διδοντική ένταξη</b>
$\Delta\nu$ συμπλόκου $<..<$ $\Delta\nu$ άλατος	<b>Χηλική ένταξη</b>
$\Delta\nu$ συμπλόκου $\approx$ $\Delta\nu$ άλατος	<b>Γεφυρωτική ένταξη</b>

Πίνακας 14: Τύποι ένταξης βάσει της  $\Delta\nu(\nu_{\text{as}}-\nu_{\text{s}})$  της καρβοξυλικής ένωσης

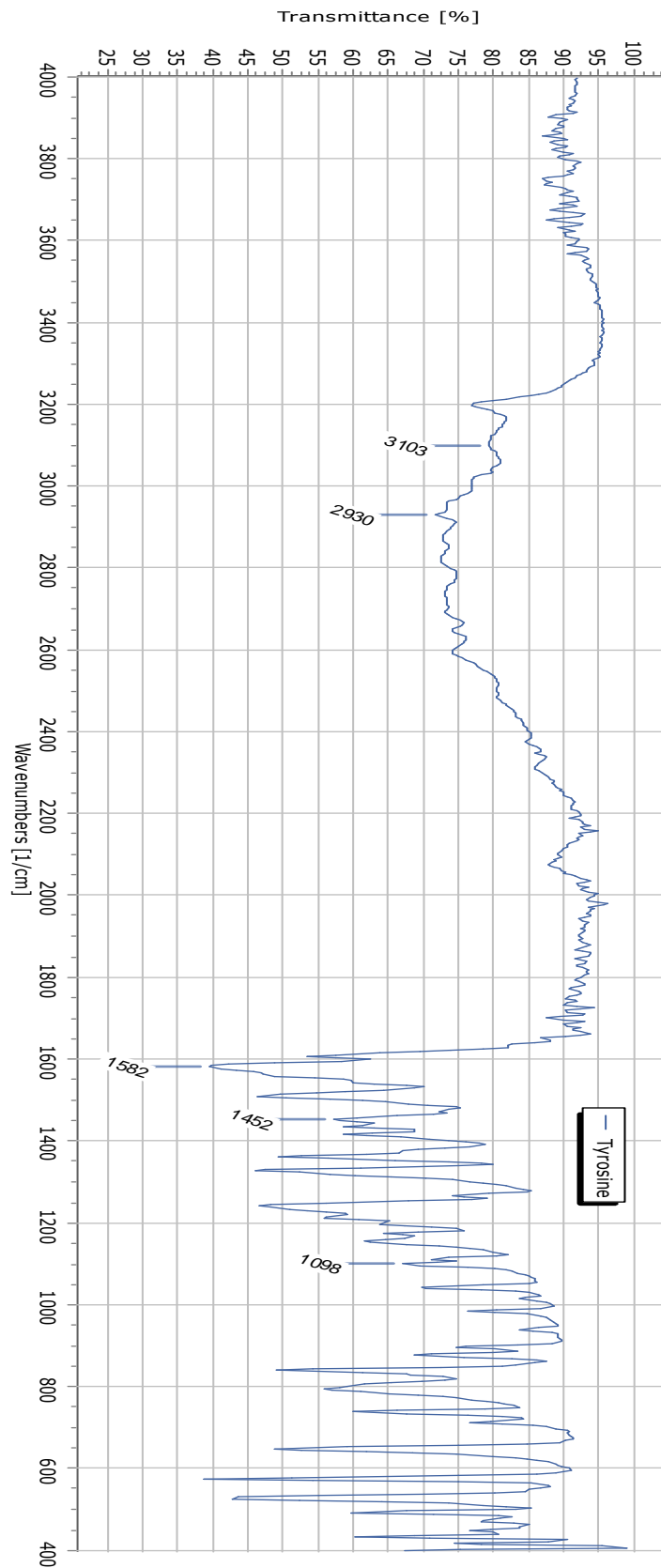
Στην περίπτωση του ZINT προκύπτει το αποτέλεσμα:

Τάσεις Δόνησης	Κυματάρια (cm <sup>-1</sup> )	
	ZINT	Sodium tyrosine
$\nu_{\text{as}}(\text{COO})$	1597	1567
$\nu_{\text{sym}}(\text{COO})$	1453	1435
$\Delta\nu$	144	132

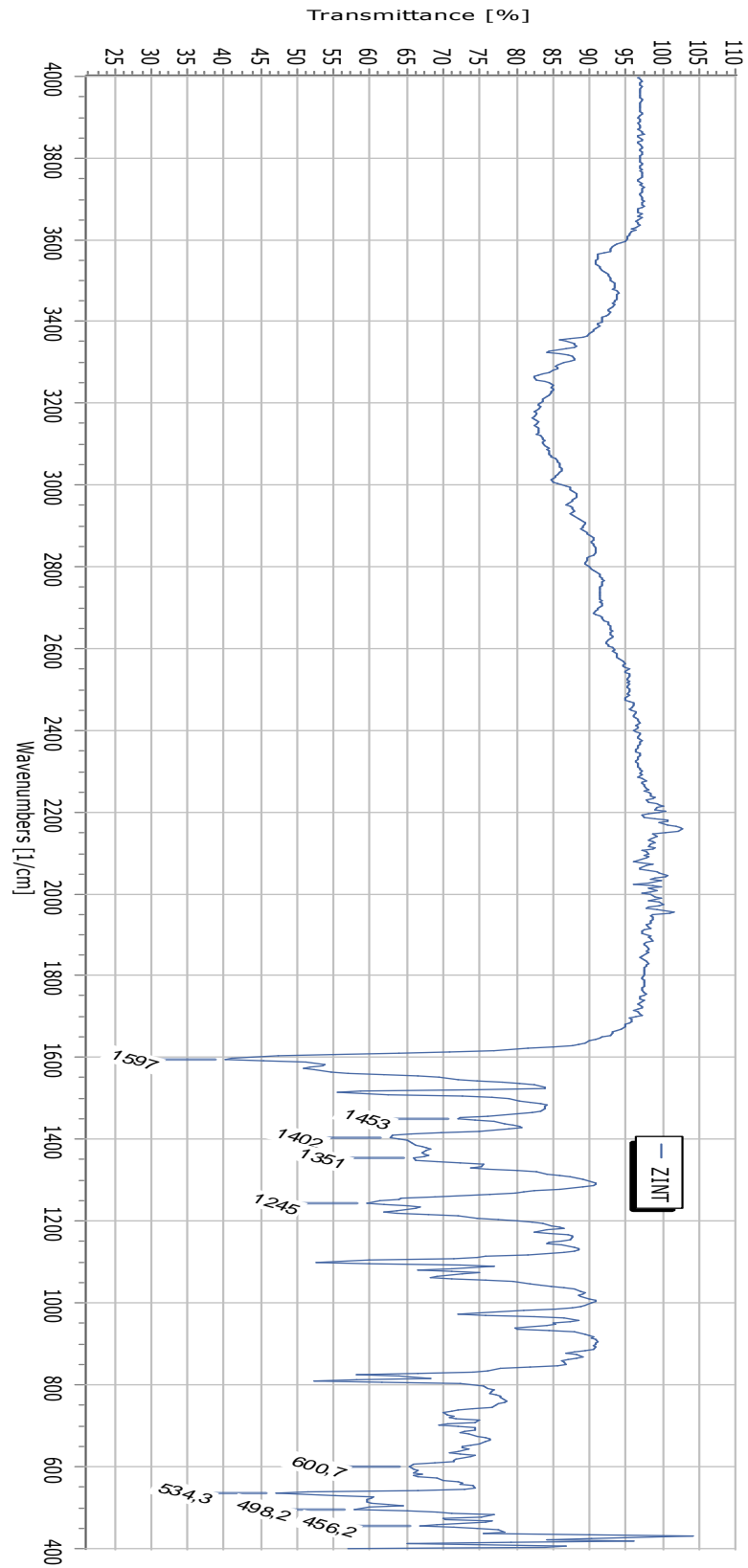
Πίνακας 15: Ασύμμετρες και συμμετρικές δονήσεις της καρβοξυλομάδας και του άλατος τυροσίνης με κάλιο

Αυτό που προκύπτει με τα παραπάνω δεδομένα είναι πως  $\Delta\nu_{\text{ZINT}} \approx \Delta\nu_{\text{salt}}$ .

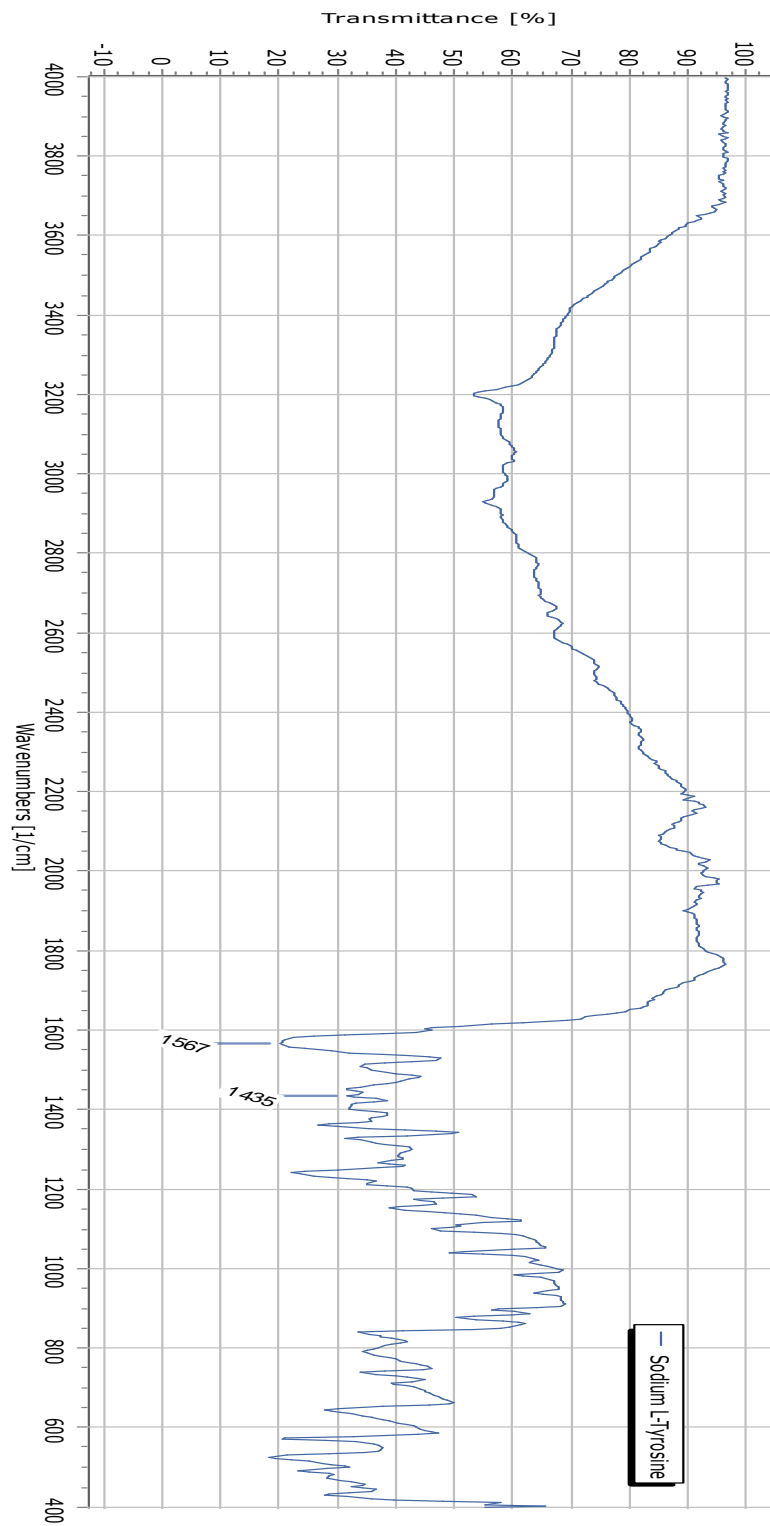
Συνεπώς η καρβοξυλομάδα εμφανίζει γεφυρωτική ένταξη.



Εικόνα Δ7: Φάσμα IR Tyrosine



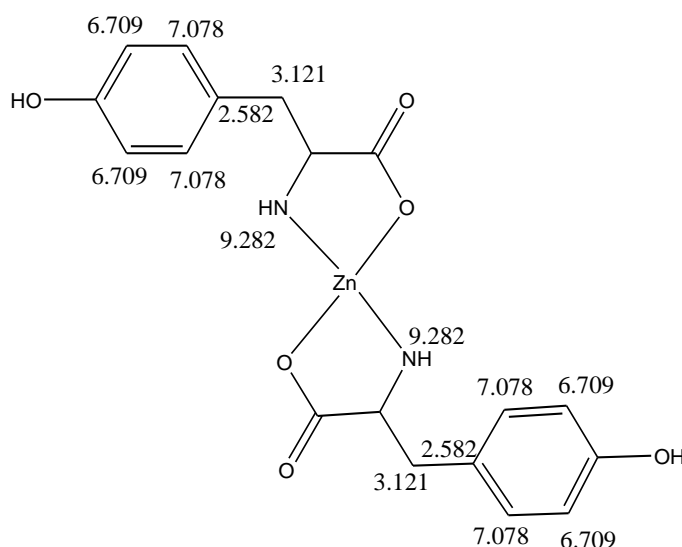
Εικόνα Δ8: Φάσμα IR ZINT



Εικόνα Δ9: Φάσμα IR του άλατος Τυροσίνης με Νάτριο

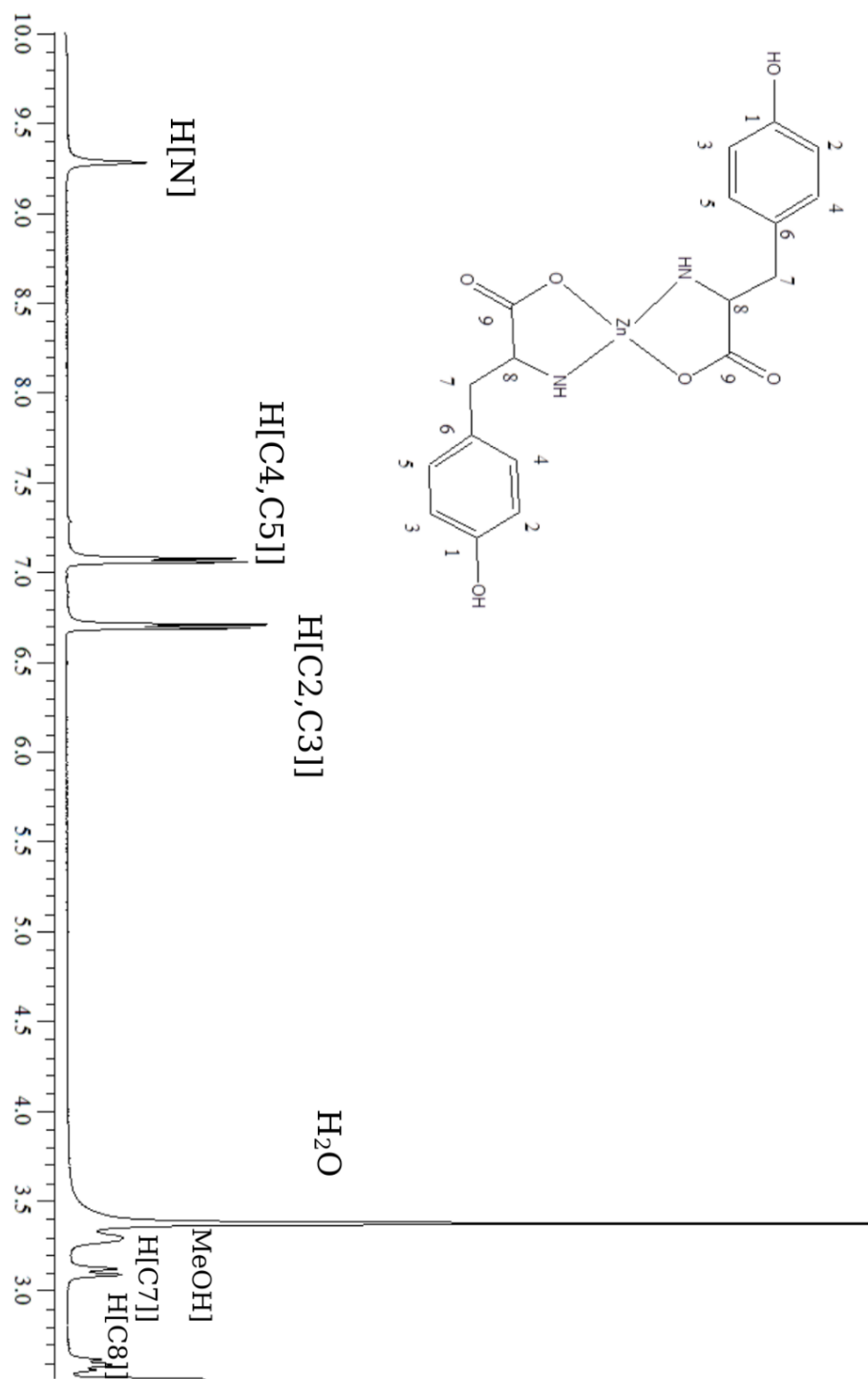
## 1.8 Φασματοσκοπία $^1\text{H-NMR}$

Στην εικόνα Δ11 φαίνεται το φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  του συμπλόκου **ZINT** σε διάλυμα δευτεριωμένου DMSO ( $\text{DMSO-}d_6$ ). Στο φάσμα η κορυφή στα 9.282 ppm αντιστοιχεί στο H της  $-\text{NH}_2$  της τυροσίνης που εντάσσεται στο μέταλλο έτσι γίνεται πιο όξινη και συντονίζεται σε υψηλά ppm. Η διπλή κορυφή στα 7.078 ppm αντιστοιχεί στα αρωματικά υδρογόνα των ανθράκων H[C4], H[C5], τα οποία συντονίζονται σε μεγαλύτερα ppm σε σχέση με τα αρωματικά υδρογόνα των ανθράκων H[C2], H[C3] στα οποία συσσωρεύεται αρνητική ηλεκτρονιακή πυκνότητα που παρέχει η υδροξυλομάδα μέσω των δομών συντονισμού και το αποτέλεσμα είναι να προστατεύονται και να συντονίζονται στα 6.709 ppm με μια διπλή κορυφή. Το σήμα στα 3.374 αντιστοιχεί στο  $\text{H}_2\text{O}$  ενώ το σήμα στα 3.282 ppm στην μεθανόλη. Η διπλή κορυφή στα 3.121 ppm ισοδυναμεί με τα πρωτόνια του C7, H[C7]. Τέλος η τριπλή κορυφή στα 2.585 αποτελεί το σήμα συντονισμού των πρωτονίων από τον C6, H[C6]. Παρακάτω φαίνονται τα αντίστοιχα ppm των ατόμων στο μόριο:



*Εικόνα Δ10:* Το σύμπλοκο ZINT με τα ppm αντιστοιχα που εμφανίζουν τα πρωτόνια των ατόμων στο φάσμα  $^1\text{H-NMR}$

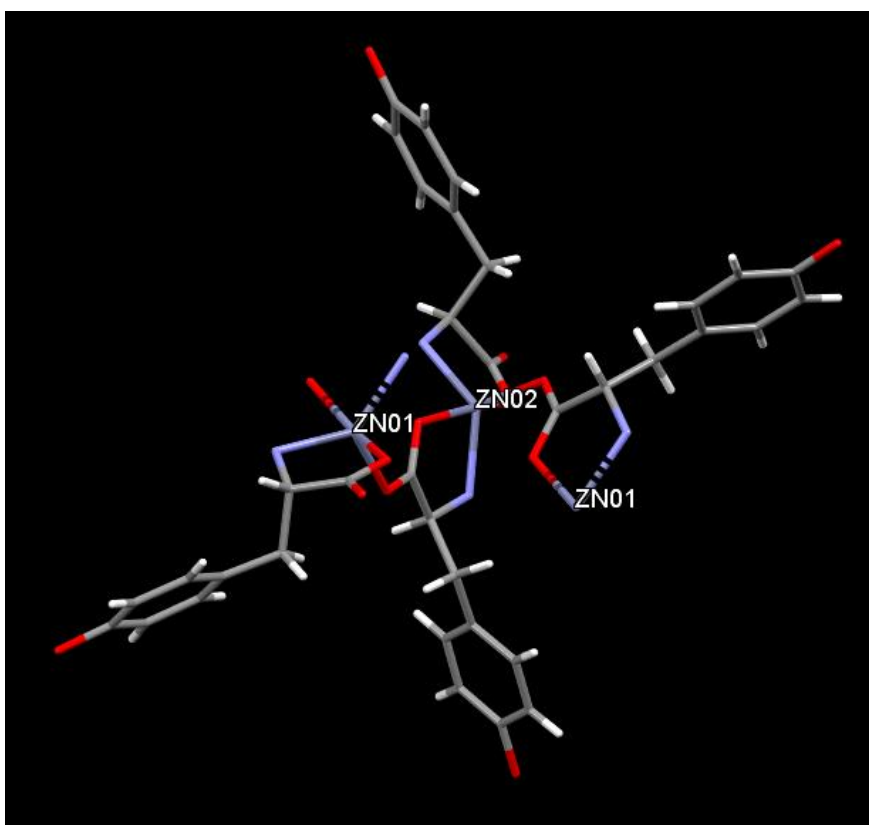




Εικόνα 111: Φάσμα H-NMR του ZINT σε DMSO-*d*<sub>6</sub> με τα πρωτόνια των αντίστοιχων ατόμων

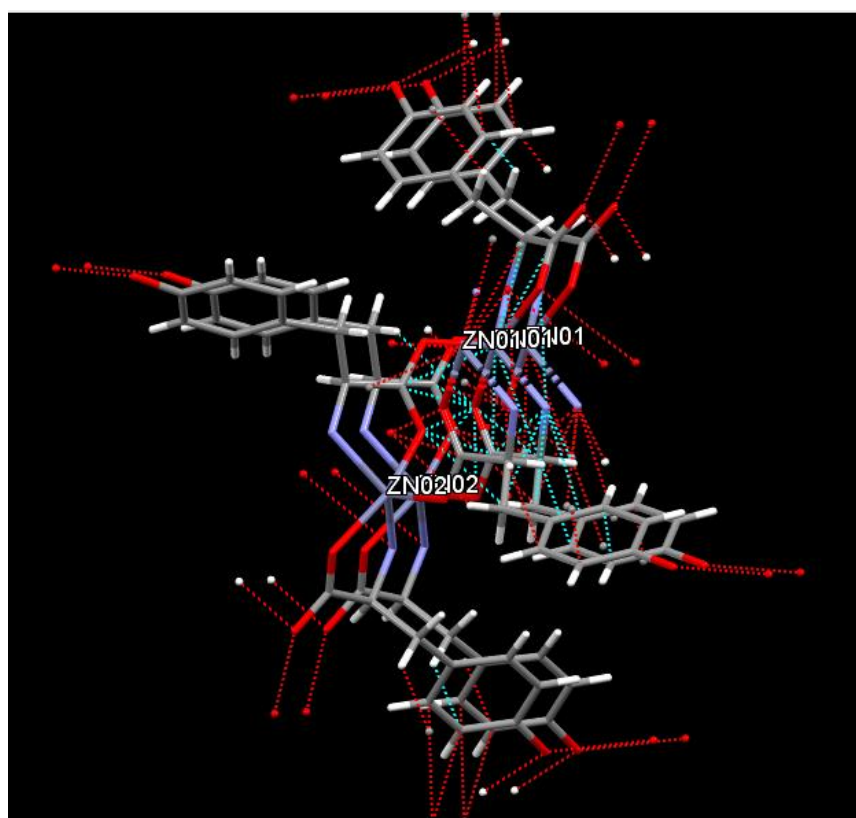
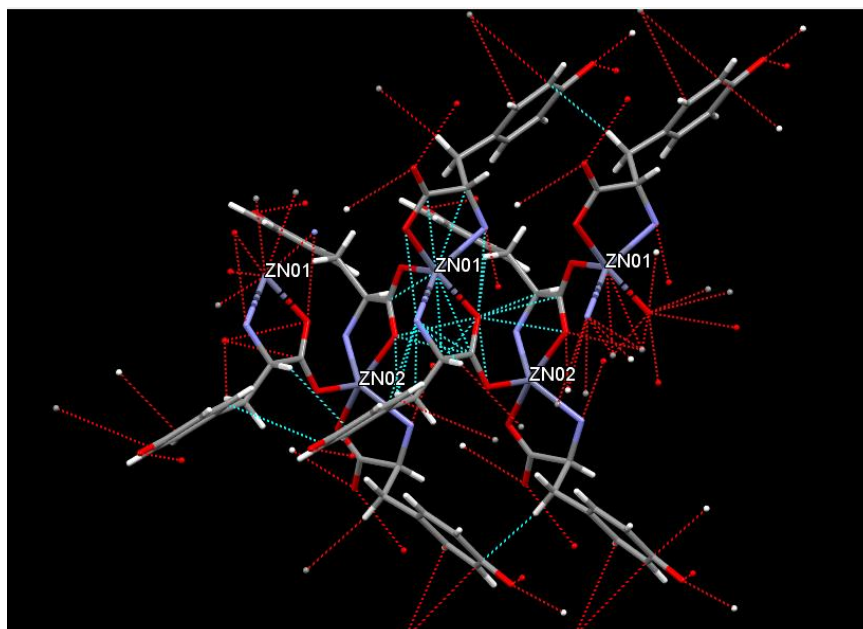
## 1.8 Περίθλαση μονοκρυστάλλου με ακτίνες X (single crystal X-ray crystallography)

Το σύμπλοκο ZINT είναι ελικοειδές πολυμερές μιας διάστασης. Δύο υποκαταστάτες TyrH δρουν χηλικά και ενώνονται στο ιόν Zn(II) μέσω του αμιδικού αζώτου και των αποπρωτονιωμένων καρβοξυλικών ατόμων οξυγόνου (N,O-Tyr) σχηματίζοντας δύο πενταμελείς δακτυλίους. Η σφαίρα ένταξης γύρω από τον ψευδάργυρο συμπληρώνεται από ένα άτομο οξυγόνου της καρβονυλομάδας μιας τρίτης τυροσίνης TyrH (O-TyrH). Ο μοριακός τύπος του ZINT είναι  $[Zn(N,O-Tyr)_2(O-Tyr)]$ . Δύο μόρια τυροσίνης TyrH γεφυρώνουν δύο άτομα ψευδαργύρου σχηματίζοντας ένα 1D πολυμερές με τύπο  $\{[Zn(N,O-Tyr)_2(O-Tyr)]_n\}$ .



Εικόνα A12 : Δομή ZINT

Η δομή του νεοσυντιθέμενου συμπλόκου ZINT επεκτείνεται όντας πολυμερές όπως φαίνεται παρακάτω:



Εικόνες Δ13: ZINT σε μορφή πλυμερούς που συμμετέχουν 4 Zn και 8 μόρια τυροσίνης

Οι γωνίες του ZINT σε [°]		
O1A-Zn1-O1B= 161.1(2)		
O1A-Zn1-N1A=80.6(3)		
O1A-Zn1-N1B=90.9(3)		
O1A-Zn1-O2B_a=100.2(2)		
O1B-Zn1-N1A=91.5(3)		<b>Τα μήκη δεσμού του ZINT σε (Å)</b>
O1B-Zn1-N1B=80.7(3)		Zn1-O1A=2.078(7)
O1B-Zn1-O2B_a=98.7(2)		Zn1 -O1B= 2.087(5)
N1A-Zn1-N1B=129.1(3)		Zn1-N1A=2.082(8)
O2B_a-Zn1-N1A=117.4(3)		Zn1-N1B=2.055(9)
O2B_a-Zn1-N1B=113.6(3)		Zn1-O2B_a=2.014(6)

Πίνακας Δ6: Γωνίες και μήκη δεσμών του ZINT

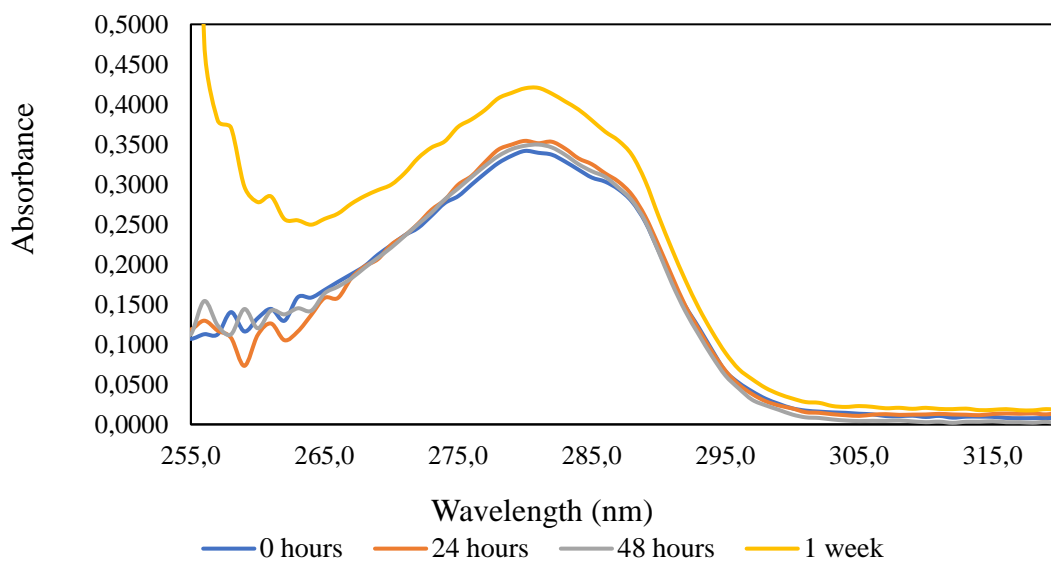
## 2. Μελέτη Σταθερότητας

### 2.1 Σταθερότητα σε διάλυμα με φασματοσκοπία υπεριώδους/ορατού

#### (UV-Vis)

Η μελέτη σταθερότητας για το σύμπλοκο ZINT, ελέγχθηκε μέσω φασματοσκοπίας UV-Vis. Παρασκευάστηκε έτσι διάλυμα συγκέντρωσης  $10^{-4}$  M, σε διαλύτη DMSO και λήφθηκαν μετρήσεις σε χρόνο 0, 24, 48 ώρες και σε μία εβδομάδα ώστε να διαπιστωθεί εάν το σύμπλοκο παραμένει σταθερό.

## Σταθερότητα ZINT UV-Vis



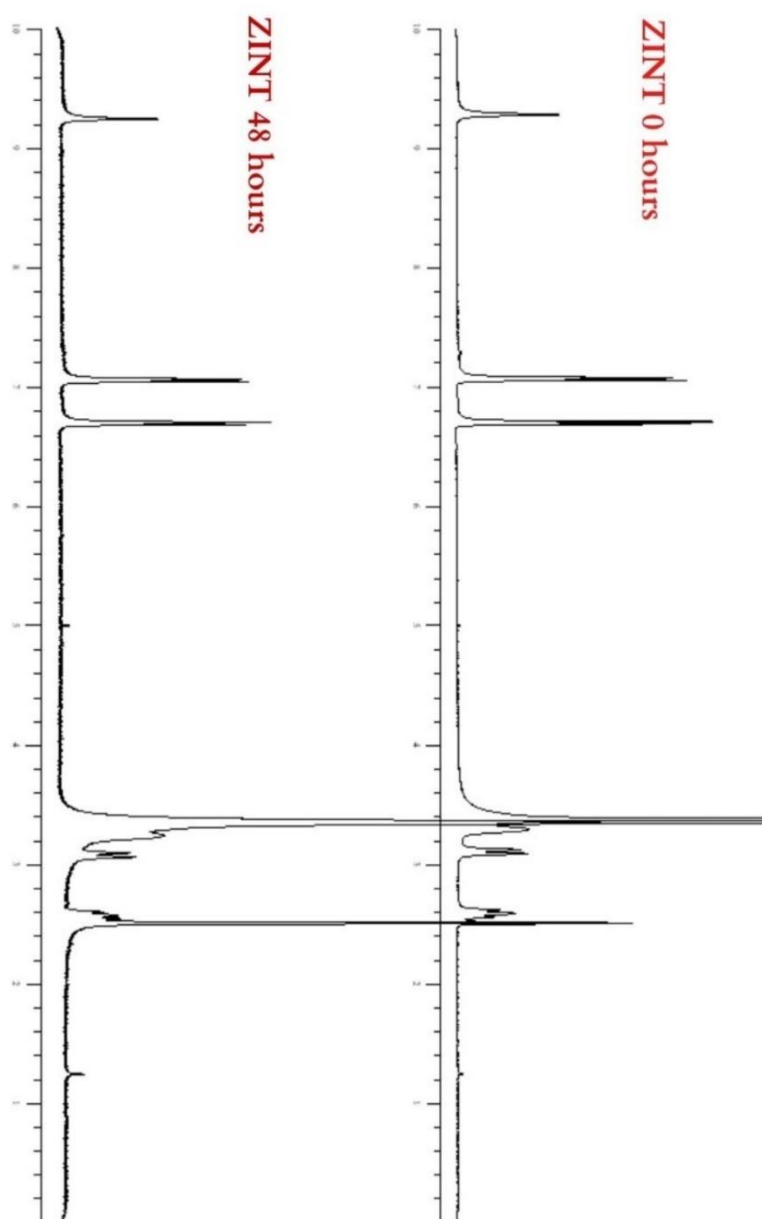
Εικόνα Δ14: Φάσματα UV-Vis της ένωσης ZINT στις 0, 24, 48 ώρες και 1 εβδομάδα

Παρατηρείται σταθερότητα του συμπλόκου ZINT σε διάλυμα για 48 ώρες ενώ φαίνεται μια ελαφρά αλλοίωση στη μια εβδομάδα και οι μετρήσεις λήφθηκαν σε 0, 24, 48 ώρες και δμέρες μετά την λήψη του πρώτου φάσματος.

## 2.2 Σταθερότητα σε διάλυμα με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού πρωτονίου ( $^1\text{H-NMR}$ )

Η σταθερότητα του ZINT ελέγχθηκε επιπλέον και με τη φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού πρωτονίου σε 0 και 48 ώρες χρησιμοποιώντας φασματόμετρο NMR. Ο διαλύτης που χρησιμοποιήθηκε για τα πειράματα σταθερότητας με  $^1\text{H-NMR}$  φασματοσκοπία είναι το  $\text{DMSO-}d_6$ .

Το σύμπλοκο φαίνεται να παραμένει σταθερό στο διάστημα 48 ωρών, καθώς δεν παρατηρείται κάποια μεταβολή στο πρώτο φάσμα 0 ωρών συγκριτικά με το αυτό των 48 ωρών.



Εικόνα Δ15 : Φάσματα  $^1\text{H-NMR}$  της ένωσης ZINT σε  $\text{DMSO-}d_6$  στις 0 και 48 ώρες

### 3 Αντιμικροβιακή Δράση

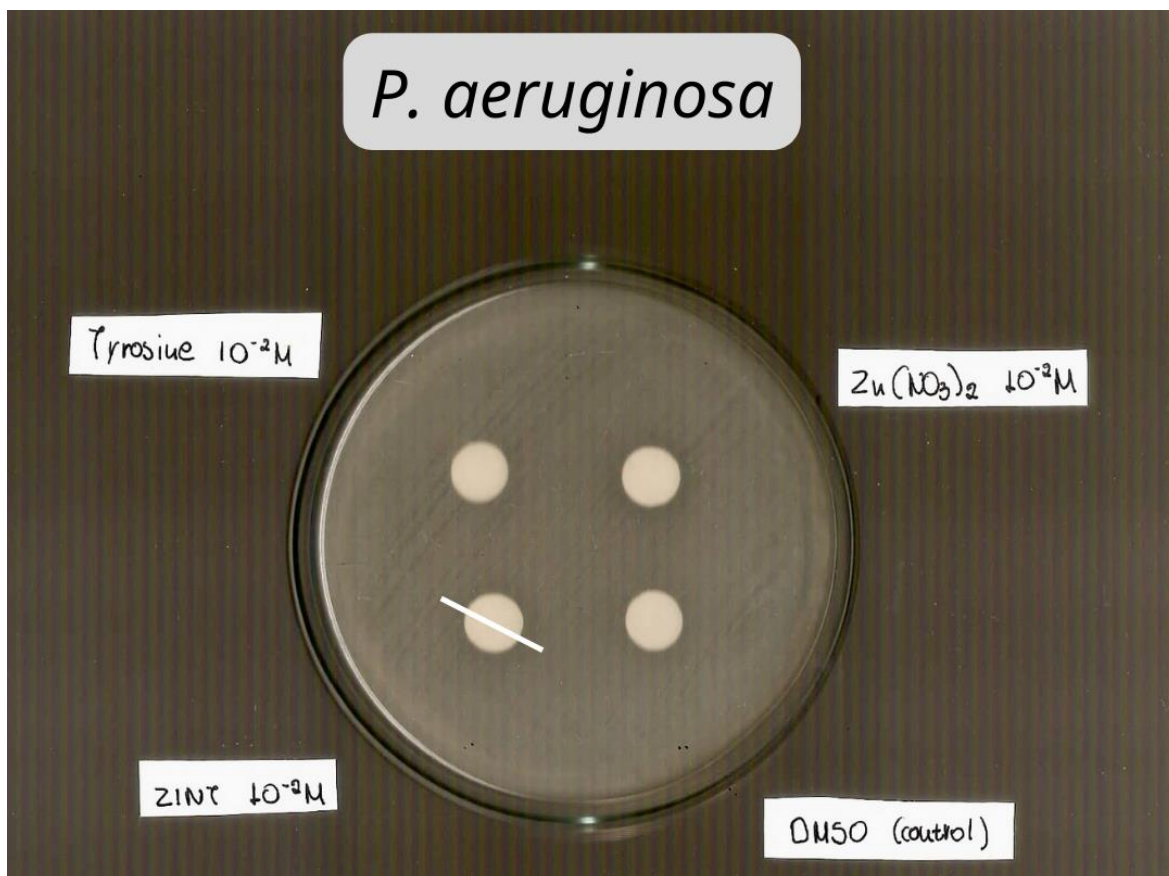
#### 3.1 Ζώνες Αναστολής -IZ (Inhibition Zones)

Η ζώνη αναστολής είναι η διάμετρος στην οποία σταματάει η βακτηριακή ανάπτυξη. Για τα πειράματα παρασκευάστηκαν διαλύματα  $10^{-2}M$  του ZINT και των ligands (Tyrosine,  $Zn(NO_3)_2$ ) με διαλύτη DMSO και διάλυμα DMSO για Control. Το ZINT παρουσιάζει ζώνη αναστολής έναντι της *Pseudomonas aeruginosa* ενώ όχι έναντι του *S. epidermidis*.

<b>IZ</b>	<b><i>P. aeruginosa</i></b>	<b><i>S. epidermidis</i></b>
<b>ZINT</b>	15 mm	9 mm
<b><math>Zn(NO_3)_2</math></b>	13 mm	9 mm
<b>Tyrosine</b>	10 mm	9 mm
<b>DMSO</b>	10.5 mm	9 mm

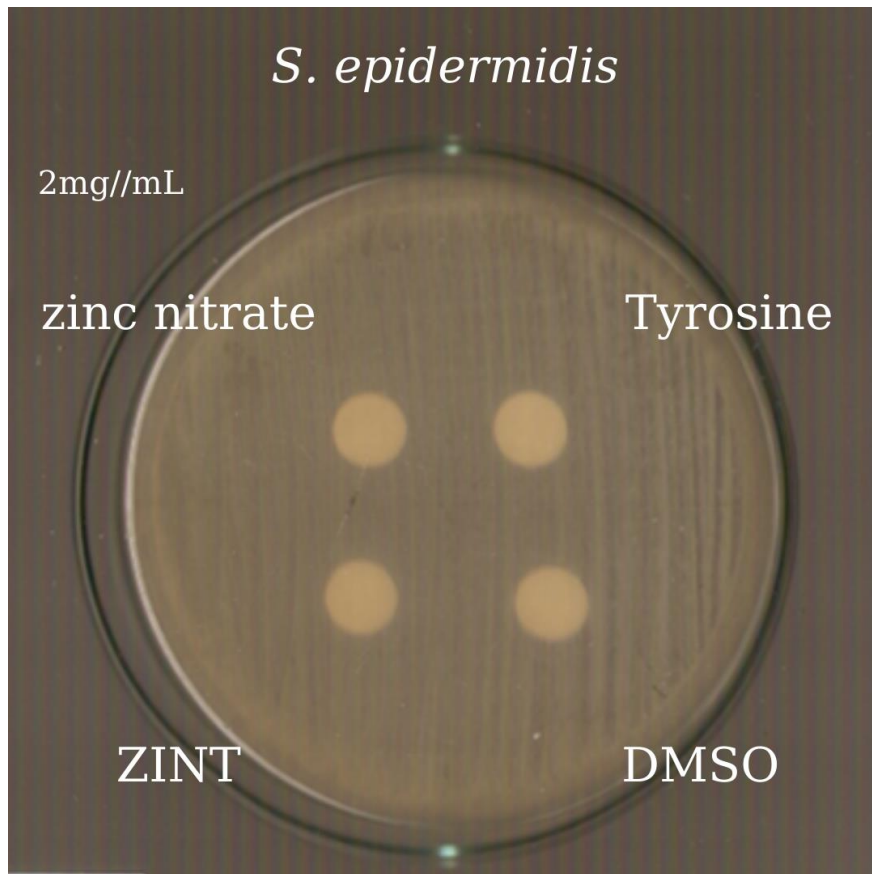
Πίνακας A7: Ζώνες Αναστολής των ενώσεων ZINT,  $Zn(NO_3)_2$ , Tyrosine, DMSO έναντι της *P. aeruginosa* και του *S. epidermidis*

Τα αποτελέσματα φαίνονται 24 ώρες μετά την επώασή τους και το τρυβλίο σκανάρεται και τα αποτελέσματα αποθηκεύονται. Η ζώνη αναστολής μετρήθηκε με τη βοήθεια χάρακα σε mm. Τα αντιβιοτικά ταξινομούνται σε: ευαίσθητα ( $IZ \geq 17$  mm), ενδιάμεσα ( $13$  mm  $\leq$  IZ  $\leq$  16 mm) και ανθεκτικά ( $IZ \leq 12$  mm). Το ZINT έχοντας 15 mm ζώνη αναστολής ανήκει στα ενδιάμεσα αντιμικροβιακά.



Εικόνα Δ16 : Ζώνες αναστολής (IZ) του ZINZ , των υποκαταστατών και του control στην *P. Aeruginosa*

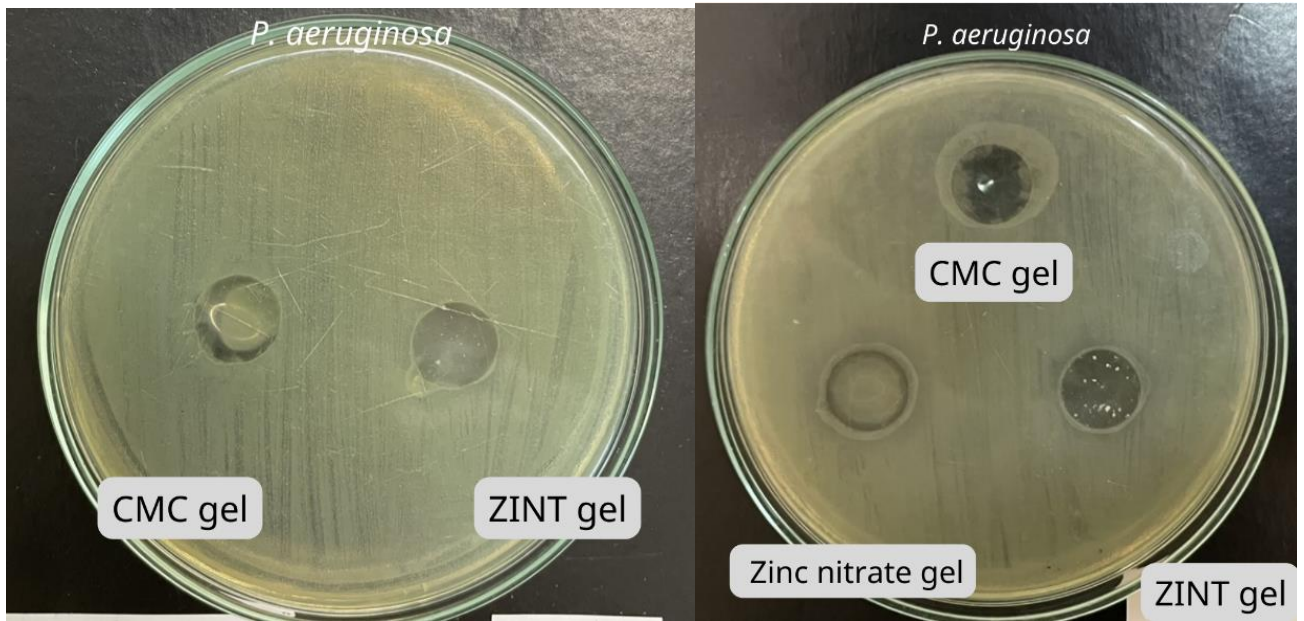




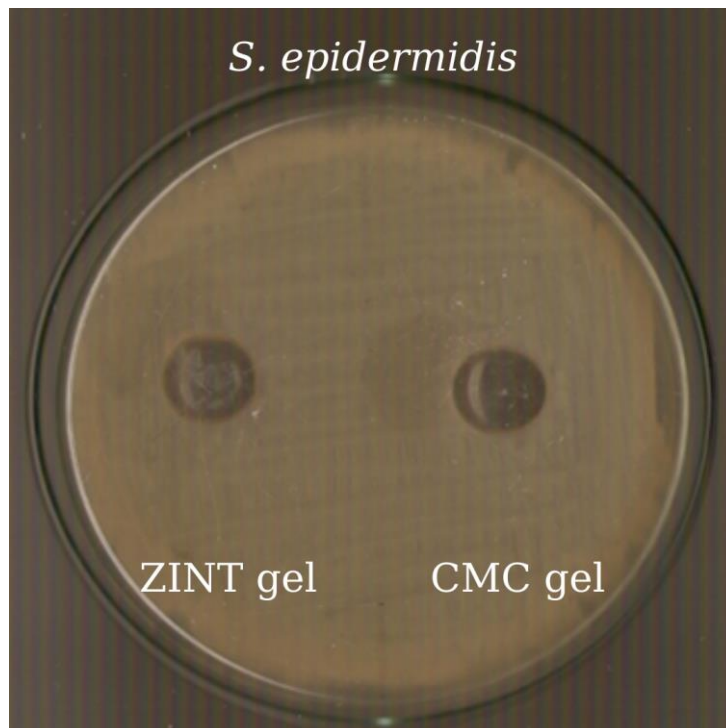
Εικόνα Δ17 : Ζώνες αναστολής (IZ) του ZINT  $2\text{mg/ml}$  , των υποκαταστατών και του control στον *S. epidermidis*

Φαίνεται πως το σύμπλοκο ZINT έχει δράση στην *P. aeruginosa* ενώ δεν δημιουργεί ζώνη αναστολής στον *S. epidermidis*.

Ελέγχθηκε επίσης το gel ZINT- καρβοξυμεθυλσελουλόζης  $10^{-2}\text{M}$  ή  $10\text{ mM}$  και δεν παρατηρήθηκε ανάπτυξη του βακτηρίου *P. aeruginosa* στο gel ZINT επιφανειακά σε αντίθεση με το control όπως φαίνεται παρακάτω:



Εικόνα Δ18: Ζώνες αναστολής (IZ) των gel CMC, ZINT,  $Zn(NO_3)_2$  σε συγκέντρωση  $10^{-2}$  M στην *P. aeruginosa*



Εικόνα Δ19: Ζώνες αναστολής (IZ) των gel CMC, ZINT  $10^{-2}$  M στον *S. epidermidis*

Επιφανειακά στα gels παρατηρείται βακτηριακή ανάπτυξη στα control δηλαδή στα gels που περιέχουν μόνο καρβοξυμεθυλσελουλόζη. Στην περίπτωση της ψευδομονάδας δε φαίνεται στο gel του ZINT να υπάρχει επιφανειακή βακτηριακή ανάπτυξη σε αντίθεση με του νιτρικού ψευδαργύρου. Τέλος στα gels για έλεγχο στον *S. epidermidis* παρατηρείται ανάπτυξη του βακτηρίου πάω στα gels τόσο σε αυτό με CMC όσο και σε αυτό που περιέχει το σύμπλοκο.

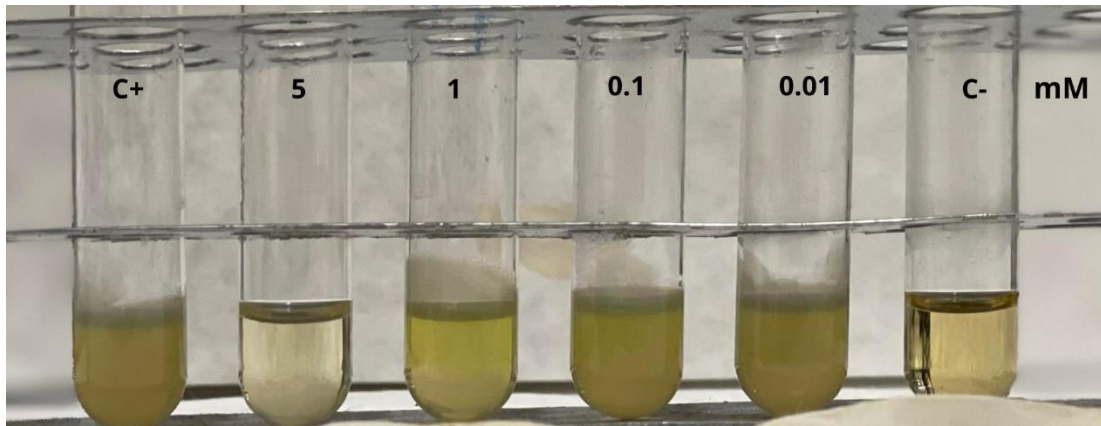
### 3.2 Ελάχιστη Ανασταλτική συγκέντρωση (MIC)

Η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (minimum inhibitory concentration, MIC) μελετήθηκε με το σύμπλοκο ZINT, το νιτρικό ψευδάργυρο και την τυροσίνη σε διαλύματα DMSO στην *P. aeruginosa*.

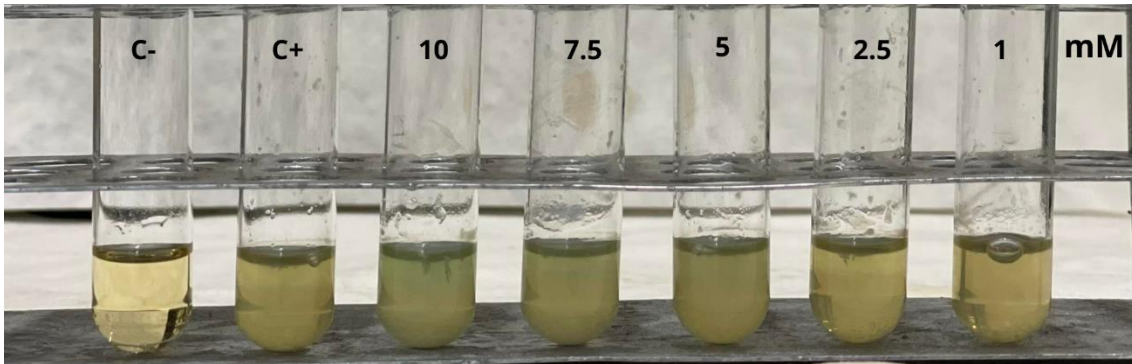
Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται οι τιμές των συγκεντρώσεων της MIC σε ( $\mu\text{M}$ ) για τις ενώσεις που αναφέρθηκαν.

MIC (mM)	<i>P. aeruginosa</i>
<b>ZINT</b>	5.2± 0.2
<b>Tyrosine</b>	>10
<b>Zn(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub></b>	3.5 ±0.1

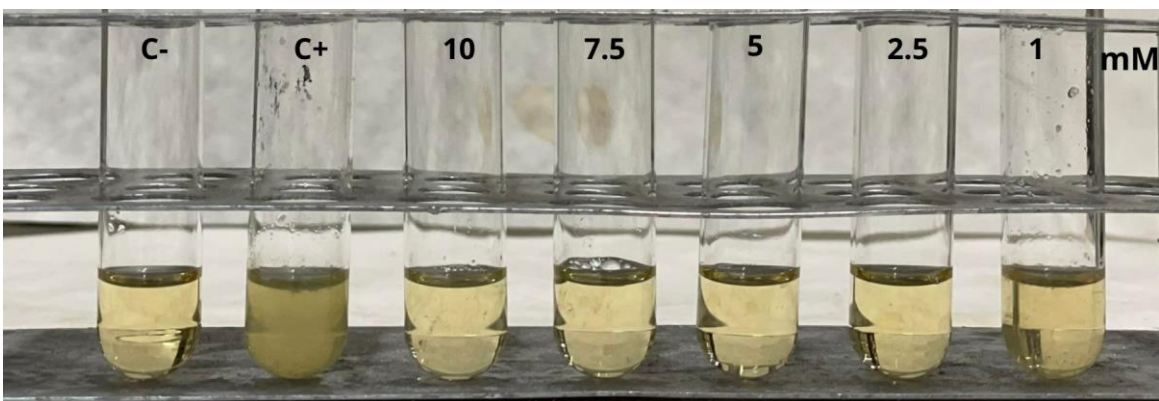
Πίνακας Δ8: Ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση(MIC) των ZINT, Tyrosine, Zn(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> σε mM



Εικόνα Δ20: Υγρές καλλιέργειες της *P.aeruginosa* με το σύμπλοκο ZINT σε αυξανόμενη συγκέντρωση σε mM



Εικόνα Δ21: Υγρές καλλιέργειες της *P.aeruginosa* με tyrosine σε αυξανόμενη συγκέντρωση



Εικόνα Δ22: Υγρές καλλιέργειες της *P.aeruginosa* με  $Zn(NO_3)_2$  σε αυξανόμενη συγκέντρωση

Στην εικόνα Δ20, παρουσιάζονται οι υγρές καλλιέργειες της *Pseudomonas Aeruginosa* που περιέχουν το θετικό κοντρόλ (C+) στο οποίο περιέχεται το θρεπτικό υλικό και το βακτήριο, το αρνητικό κοντρόλ (C-) που περιέχει μόνο το θρεπτικό υλικό και στους υπόλοιπους δοκιμαστικούς σωλήνες βρίσκεται θρεπτικό υλικό, σταθερή ποσότητα βακτηρίου και αυξανόμενες συγκεντρώσεις του ZINT. Στην εικόνα Δ21 φαίνονται οι υγρές καλλιέργειες της *Pseudomonas Aeruginosa* με την τυροσίνη σε αυξανόμενη συγκέντρωση και τέλος στην εικόνα Δ22 οι καλλιέργειες μαζί με το νιτρικό ψευδάργυρο.

Μετρήθηκε η οπτική απορρόφηση των παραπάνω διαλυμάτων στα 620 nm για τον υπολογισμό της εκατοστιαίας βιωσιμότητας των μικροβίων συναρτήσει της συγκέντρωσης. Το ZINT ελέγχθηκε σε συγκεντρώσεις 0.1-5 mM και οι υπόλοιπες ουσίες σε 1-10 Mm.

<b>Concentrations (mM)</b>	<b>Absorbance 1</b>	<b>Absorbance 2</b>
<b>Control (+)</b>	1.353	1.452
<b>0.01</b>	1.115	1.254
<b>0.1</b>	1.076	1.110
<b>1</b>	0.434	0.468
<b>5</b>	0.037	0.059

*Πίνακας Δ9: Οπτικές απορροφήσεις P. aeruginosa-ZINT*

<b>Concentrations (mM)</b>	<b>Absorbance 1</b>	<b>Absorbance 2</b>
<b>Control (+)</b>	0.500	0.582
<b>1</b>	0.119	0.162
<b>2.5</b>	0.008	0.007
<b>5</b>	0.0025	0.0022
<b>7.5</b>	0.0015	0.0018
<b>10</b>	0.0003	0.0002

*Πίνακας Δ10: Οπτικές απορροφήσεις P. aeruginosa-Zinc Nitrate*

<b>Concentrations (mM)</b>	<b>Absorbance 1</b>	<b>Absorbance 2</b>
<b>Control (+)</b>	0.628	0.518
<b>1</b>	0.514	0.691
<b>2.5</b>	0.530	0.664
<b>5</b>	0.935	0.684
<b>7.5</b>	1.199	1.135
<b>10</b>	1.528	1.217

*Πίνακας Δ11: Οπτικές απορροφήσεις P. aeruginosa-Tyrosine*

Παρατηρούμε πως ενώ οι οπτικές απορροφήσεις μειώνονται με αύξηση της συγκέντρωσης στην περίπτωση του ZINT και του νιτρικού ψευδαργύρου ενώ στην

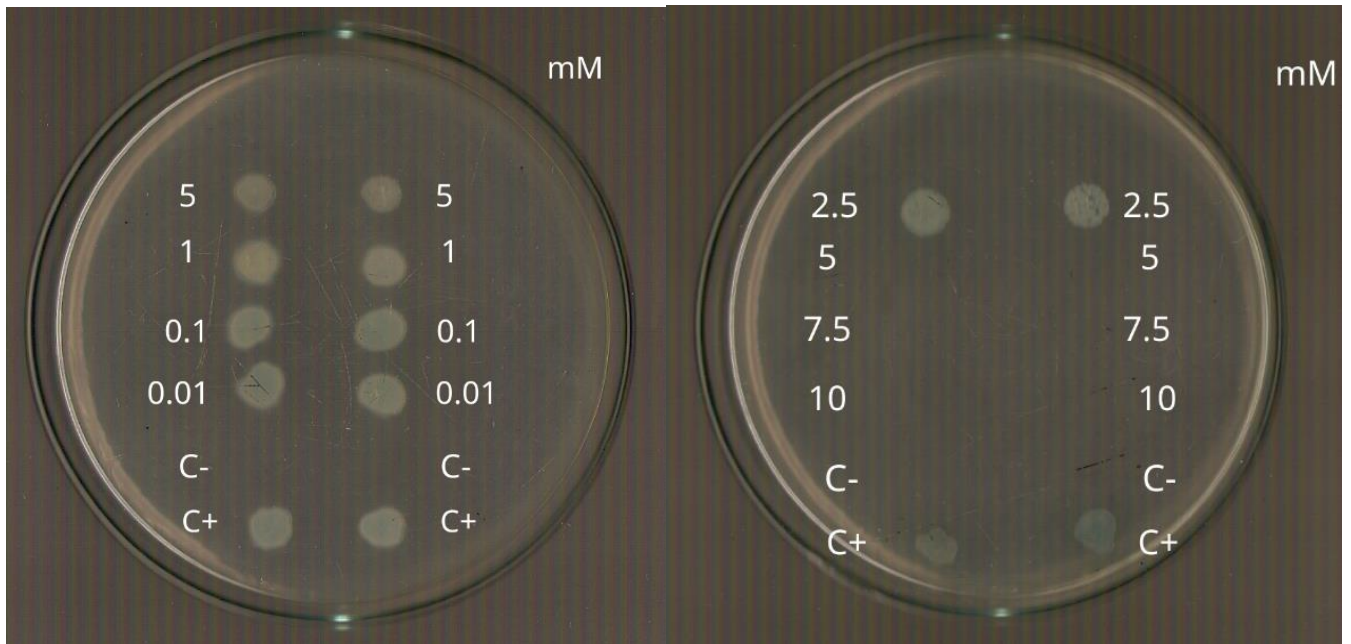
περίπτωση της τυροσίνης συμβαίνει το αντίθετο. Δεν αναστέλλει τη βακτηριακή ανάπτυξη αντίθετα την ενισχύει.

Αν η MIC<0.05mM το βακτήριο θεωρείται ευαίσθητο στο αντιβιοτικό. Αν MIC>0.1 mM θεωρείται ανθεκτικό.

### **3.3 Ελάχιστη Βακτηριοκτόνος Συγκέντρωση (MBC)**

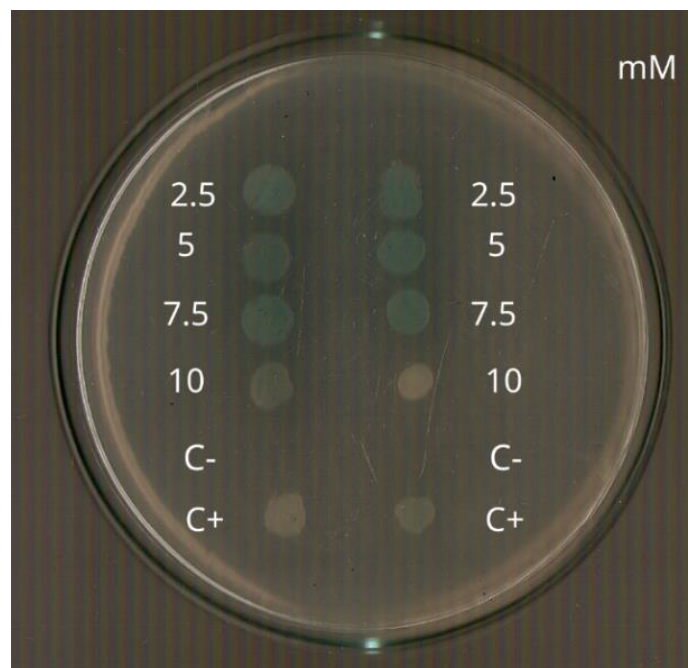
Έγινε μελέτη της ελάχιστης βακτηριοκτόνος συγκέντρωσης (Minimum Bacterial Concentration – MBC ) του συμπλόκου ZINT στο βακτήριο *P. aeruginosa*. Στον παρακάτω πίνακα ./παρουσιάζονται οι τιμές των συγκεντρώσεων της MBC σε (μM).

Παρακάτω απεικονίζονται τα τρυβλία με τη στερεή καλλιέργεια της ψευδομονάδας με τις τρεις ουσίες( ZINT, Tyrosine, Zinc Nitrate) ,τα οποία εμβολιάστηκαν με 4 μL από κάθε δοκιμαστικό σωλήνα που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα της MIC καθώς και πίνακας με τα αποτελέσματα από τις MBC των ουσιών αυτών.



(a)

(b)



(c)

Εικόνα 122: MBC των ενώσεων ZINT, Zn(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, Tyrosine, a, b, c αντίστοιχα σε mM



MBC (mM)	<i>P.aeruginosa</i>
ZINT	>5
Tyrosine	>10
Zn(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	5

Πίνακας Δ12: Ελάχιστη βακτηριοκτόνος συγκέντρωση(MBC) των ZINT, Tyrosine, Zn(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>

### 3.4 MBC/MIC

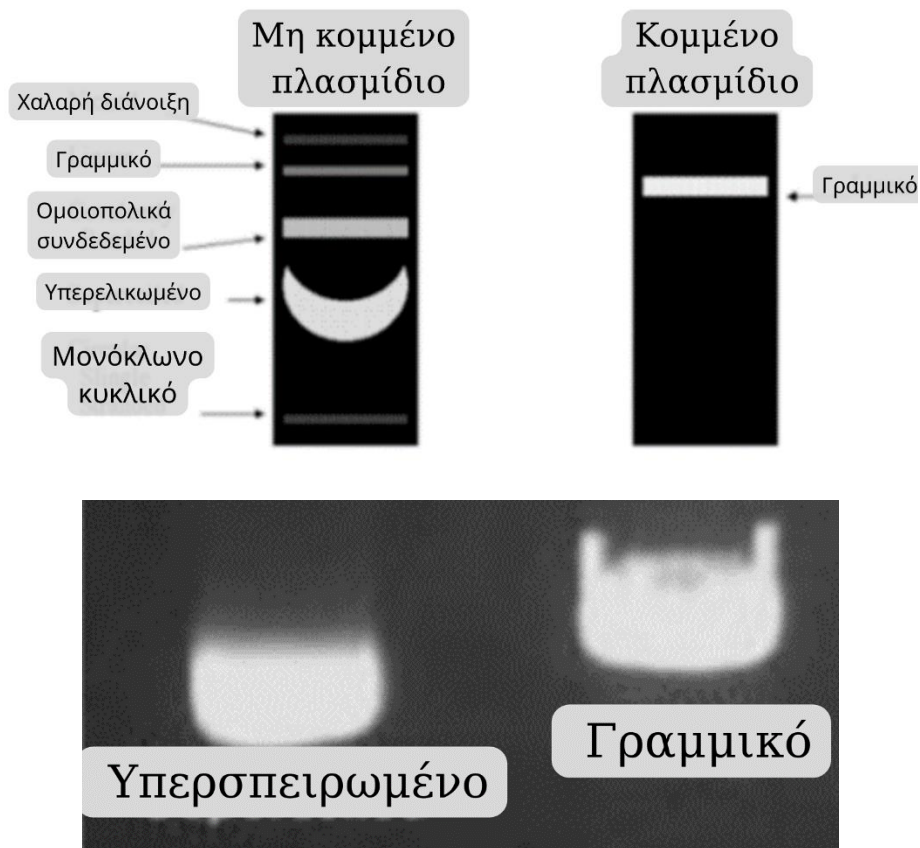
Από το λόγο MBC/MIC φαίνεται αν μια χημική ουσία είναι βακτηριοκτόνος, δηλαδή προκαλεί το θάνατο του 99,9% των βακτηρίων, ή βακτηριοστατική, δηλαδή ο μικροοργανισμός αναστέλλεται αλλά δε θανατώνεται. Αν  $MBC/MIC \leq 2$  η ένωση είναι βακτηριοκτόνα ενώ αν  $MBC/MIC \geq 4$  δρα βακτηριοστατικά.

<i>P. Aeruginosa</i>	ZINT	Zn(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
MBC/MIC	< 2	< 2

Πίνακας Δ13: Αναλογίες MBC/MIC των ZINT και Zn(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>

Επομένως το ZINT όπως και ο νιτρικός ψευδάργυρος δρουν βακτηριοκτόνα. Η τυροσίνη δεν έδειξε αναστολή ανάπτυξης της *P. aeruginosa* και έτσι δεν μπορούμε να βγάλουμε συμπέρασμα για τον λόγο MBC/MIC.

## 4 Έλεγχος δράσης τοποϊσομεράσης

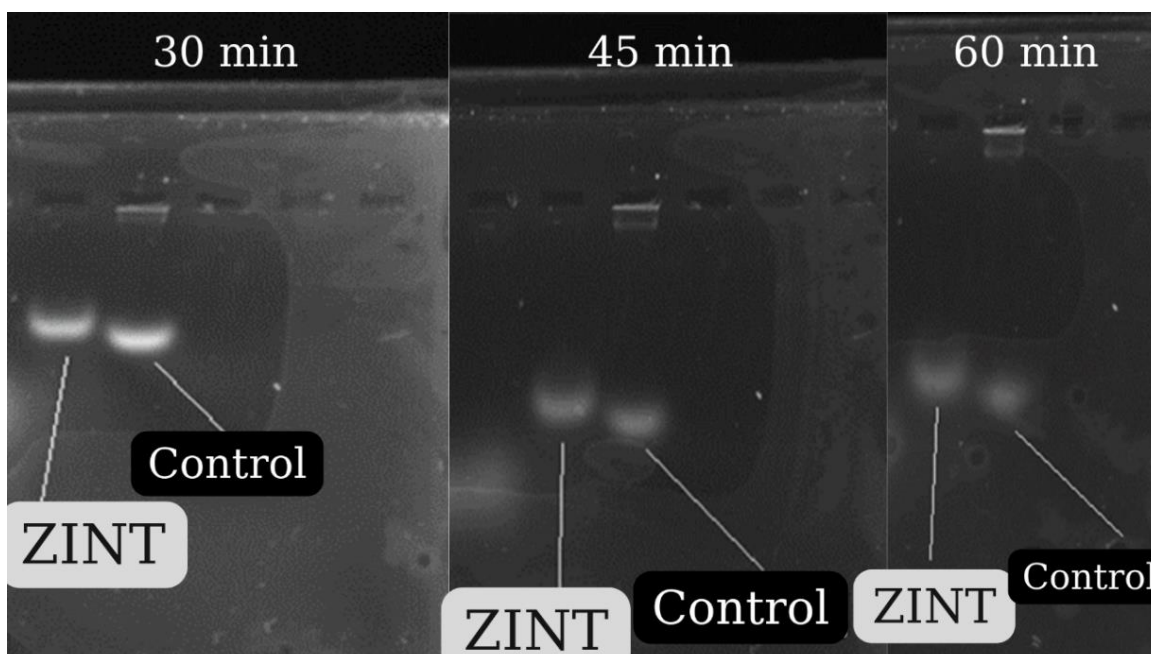


Εικόνα 123: Διαφορετικές μορφές πλασμιδιακού DNA σε gel αγαρόζης

Τα πλασμίδια είναι μικρά δίκλιωνα μόρια, ελικοειδούς, μη χρωμοσωμικού DNA. Κατά την εκχύλιση του πλασμιδιακού DNA από το βακτηριακό κύτταρο, ένας κλώνος του DNA αποσπάται. Αυτό χαλαρώνει τη στρεπτική τάση που απαιτείται για τη διατήρηση της υπερέλιξης, παράγοντας τη χαλαρή διάνοιξη του πλασμιδίου όπως φαίνεται στην πρώτη εικόνα.

Στα περισσότερα πλασμίδια τα δύο άκρα του δίκλωνου μορίου DNA που αποτελούν τα πλασμίδια συνδέονται ομοιοπολικά μεταξύ τους σχηματίζοντας έναν φυσικό κύκλο.

Με σκοπό να ελεγχθεί η ύπαρξη δράσης τοποϊσομεράσης στο σύμπλοκο ZINT σε συγκέντρωση 10 mM, επώαστηκε μαζί με το πλασμίδιο pUC18 του βακτηρίου *E. coli* και διεξήχθη ηλεκτροφόρηση της οποίας τα αποτελέσματα φαίνονται παρακάτω:

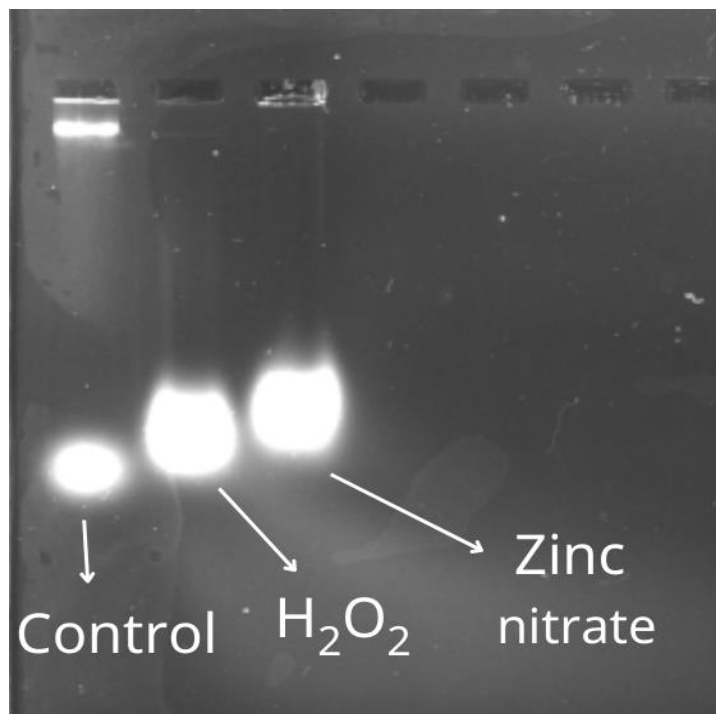


*Εικόνα 124:* Ηλεκτροφόρηση του ZINT με το πλασμίδιο συγκριτικά με το control σε χρόνο 30, 45 και 60 λεπτών σε 30Volt

Παρατηρούμε πως το δείγμα με το πλασμίδιο που έχει επωαστεί με το σύμπλοκο 'τρέχει' πιο αργά στο gel αγαρόζης σε σχέση με το control το οποίο περιέχει μόνο το πλασμίδιο. Αυτό συμβαίνει καθώς το σύμπλοκο έχει αλληλεπιδράσει με το πλασμιδιακό DNA και το έχει «κόψει» το πλασμιδιακό DNA με αποτέλεσμα από κυκλικό να έχει γίνει γραμμικό και προχωράει πιο αργά από το κυκλικό. Συνεπώς το ZINT εμφανίζει δράση τοποϊσομεράσης.

Ηλεκτροφόρηση σε τζελ αγαρόζης διεξήχθη σε διάλυμα νιτρικού ψευδαργύρου 10Mm καθώς και υπεροξειδίου του υδρογόνου μετά την επώασή τους με πλασμιδιακό

DNA για τον έλεγχο αλληλεπίδρασης αυτών των ουσιών με το πλασμίδιο με σκοπό τη σύγκριση των αποτελεσμάτων με το νεοσυντιθέμενο σύμπλοκο ZINT.



Εικόνα Δ25: Ηλεκτροφόρηση του  $Zn(NO_3)_2$  και  $H_2O_2$  μετά την επώασή τους με πλασμίδιο συγκριτικά με το control μετά από μια ώρα σε 30 Volt

Όπως είναι ευδιάκριτο στην παραπάνω εικόνα, τα δείγματα με το υπεροξείδιο του υδρογόνου και το νιτρικό ψευδάργυρο έχουν αλληλεπιδράσει με το πλασμιδιακό DNA, το έχουν καταστήσει γραμμικό με αποτέλεσμα να προχωράει στο gel αργότερα με πιο αργό ρυθμό συγκριτικά με το control στο οποίο το πλασμίδιο διατηρεί την κυκλική μορφή του. Μεγαλύτερη καθυστέρηση προκαλεί το δείγμα με το νιτρικό ψευδάργυρο σε σχέση με το υπεροξείδιο του υδρογόνου.

Συνεπώς και το σύμπλοκο ZINT και οι επιπλέον ουσίες που δοκιμάστηκαν προκαλούν τομή στο DNA του πλασμιδίου pUC18 του βακτηρίου *E. coli* και το βλέπουμε να προχωράει πιο αργά σε σχέση με το control.

## 5 Έλεγχος της in vivo τοξικότητας στον ζωντανό οργανισμό

### *Artemia salina*

Η τοξικότητα για το σύμπλοκο ZINT μελετήθηκε in vivo με το μοντέλο *Artemia Salina* (γαρίδα άλμης). Το ποσοστό βιωσιμότητας της *Artemia Salina* σε διαφορετικές συγκεντρώσεις του ZINT φαίνεται παρακάτω:

<i>Artemia Salina</i>	% Βιωσιμότητα			
Concentration	Control	100μM	200μM	500μM
ZINT	100± 0.00	100± 0.00	100± 0.00	100± 0.00

Πίνακας Δ14: Ποσοστό (%) βιωσιμότητας του ζωντανού οργανισμού *Artemia salina*

μετα από επώαση σε διάλυμα ZINT

Οι συγκεντρώσεις των διαλυμάτων ZINT στα οποία επώαστηκαν οι προνύμφες για 24 ώρες ήταν 100, 200, και 500 μM. Το σύμπλοκο δεν φαίνεται να δρα τοξικά καθώς επιβιώνει σχεδόν το 100% των προνύμφων.

## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στη παρούσα διατριβή πραγματοποιήθηκε η σύνθεση μιας ένωσης με τη σύζευξη του ψευδαργύρου με το αμινοξύ τυροσίνη. Αυτό το νέο σύμπλοκο χαρακτηρίστηκε με διάφορες φασματοσκοπικές μεθόδους, ώστε να συλλεχθούν τα φασματοσκοπικά του δεδομένα και να διαπιστωθεί ότι αυτή η ένωση έχει σχηματιστεί επιτυχώς ενώ ελέγχθηκε και η σταθερότητά της σε διάλυμα εντός 48 ωρών.

Συγκεκριμένα, το σύμπλοκο χαρακτηρίστηκε με σημείο τήξης, διαλυτότητα, φασματοσκοπίες FT-IR, UV-Vis,  $^1\text{H-NMR}$ , XRF, κρυοσκοπία ενώ η σταθερότητα ελέγχθηκε σε διάλυμα με φασματοσκοπία UV-Vis και  $^1\text{H-NMR}$ . Προσδιορίστηκε η δομή του με περίθλαση μονοκρυστάλλου με ακτίνες X και βρέθηκε να είναι ελικοειδές πολυμερές μιας διάστασης με τύπο  $\{[\text{Zn}(\text{Tyrl})_2](4/3)(\text{DMSO})\}_n$ . Έτσι επαληθεύτηκε η επιτυχής σύνθεση του καθώς και η σταθερότητά του σε διάλυμα.

Έπειτα βρέθηκε η αντιμικροβιακή δράση του ZINT έναντι της *P. aeruginosa* καθώς παρατηρήθηκε ζώνη αναστολής που δημιουργείται από το ZINT ενώ η MIC ήταν  $5.2 \pm 0.2$  mM σε αντίθεση με άλλα σύμπλοκα ψευδαργύρου των οποίων η MIC έχει βρεθεί 49 mM [68] ενώ σε σύμπλοκο ψευδαργύρου με γλουταμινικό οξύ η MIC βρέθηκε 11Mm [69]. Συμπεραίνουμε πως το ZINT έχει χαμηλότερη MIC από άλλα σύμπλοκα ψευδαργύρου άρα είναι περισσότερο δραστικό. Η MBC ήταν μεγαλύτερη από 5 mM και από το λόγο MBC/MIC να είναι μικρότερος του 2 επιβεβαιώθηκε το ZINT να δρα βακτηριοκτόνα.

Ο έλεγχος δράσης τοποϊσομεράσης του ZINT ακολούθησε μετά και φάνηκε πως το σύμπλοκο αλληλεπιδρά με το πλασμιδιακό DNA pUC18 του *E. coli*, το τέμνει καθιστώντας το γραμμικό και ως συνέπεια καθυστερεί να κινηθεί συγκριτικά με την

κυκλική μορφή του που προχωράει γρηγορότερα στο gel αγαρόζης. Έχουμε δηλαδή ένα μοντέλο τεχνητής τοποίσομεράσης.

Για τον προσδιορισμό της τοξικότητας in vivo, χρησιμοποιήθηκε και ο ζωντανός οργανισμός-μοντέλο *Artemia salina*. Το ZINT αποδείχθηκε πως δεν είναι τοξικό in vivo καθώς επιβίωσε το 100% των προνυμφών.

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ-ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

Συμβολισμός	Ονοματολογία	Μοριακός τύπος
<b>Tyrosine</b>	Αμινοξύ Τυροσίνη	$C_9H_{11}NO_3$
<b>Zn(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub></b>	Νιτρικός Ψευδάργυρος	
<b>KOH</b>	Υδροξείδιο του Καλίου	
<b>MeOH</b>	Μεθανόλη	$CH_3OH$
<b>MeCN</b>	Ακετονιτρίλιο	$CH_3CN$
<b>n-Hexane</b>	Εξάνιο	$C_6H_{14}$
<b>Toluene</b>	Τολουόλιο	$C_6H_5CH_3$
<b>Χλωροφόρμιο</b>	Τριχλωρομεθάνιο	$CHCl_3$
<b>Διχλωρομεθάνιο</b>	Μεθυλενοδιχλωρίδιο	$CH_2Cl_2$
<b>Acetone</b>	Ακετόνη (Προπανόλη)	$C_3H_6O$
<b>EtOH</b>	Αιθανόλη	$C_2H_5OH$
<b>DMSO</b>	Διμεθυλοσουλφοξείδιο	$C_2H_6OS$
<b>DMF</b>	Διμεθυλοφορμαμίδιο	$C_3H_7NO$
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	Δις απεσταγμένο νερό	
<b>CMC</b>	Καρβοξυμεθυλσελλουλόζη	$C_8H_{16}O_8$
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Υπεροξείδιο του υδρογόνου	

Πίνακας 1: Συντομογραφίες Αντιδραστηρίων και Διαλυτών



<b>Συντομογραφία</b>	<b>Ελληνική Ονομασία</b>	<b>Αγγλική Ονομασία</b>
<b>ATR-FT-IR</b>	Υπέρυθρη Φασματοσκοπία Μετασχηματισμού Fourier Ολικής Εσωτερικής Ανάκλασης	Attenuated Total Reflectance- Fourier Transform - Infrared Spectroscopy
<b>UV-Vis</b>	Απορρόφηση Υπέρυθρης-Ορατής Ακτινοβολίας	Ultraviolet–Visible Spectroscopy
<b><sup>1</sup>H-NMR</b>	Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός Πρωτονίου	Proton Nuclear Magnetic Resonance
<b>XRF</b>	Φθορισμός Ακτίνων Χ	X-Ray Fluorescence
<b>Single Crystal XRD</b>	Περίθλαση Ακτίνων Χ Μονοκρυστάλλου	Single Crystal X-Ray Diffraction
<b>IZ</b>	Ζώνη Αναστολής	Inhibition Zone
<b>MIC</b>	Ελάχιστη Ανασταλτική Συγκέντρωση	Minimum Inhibitory Concentration
<b>MBC</b>	Ελάχιστη βακτηριοκτόνος συγκέντρωση	Minimum bactericidal concentration

Πίνακας 2: Συντομογραφίες Μεθόδων και Τεχνικών

**Από αυτή τη Μεταπτυχιακή Διατριβή προέκυψαν δυο δημοσιεύσεις  
Poster:**

- Maria-Foteini K. Alevizou , Christina N. Banti, Sotiris K. Hadjikakou , **New antimicrobial hydrogel of natural products with zinc(II) as ingredients in care agents,**  
<https://drive.google.com/file/d/11y0ruC7NPmy2Kw6B4y1ZibiWIpgQjw36/view>

**10th International Conference of the Hellenic Crystallographic Association, 15 - 17 Oct. 2021** at the National Center for Scientific Research (NCSR) "Demokritos", in Athens, Greece <https://sites.google.com/view/hecra>



- Maria-Foteini K. Alevizou , Christina N. Banti, Sotiris K. Hadjikakou , John C. Plakatouras , **Zn(II) tyrosinate metal organic framework with helical assembly; Synthesis, characterization and plasmid cleavage study**

**Athens Conference on Advances in Chemistry 2022 (acac2022)**, 26 June 2022 to 1 July 2022, National and Kapodistrian University of Athens  
Department of Chemistry <https://conferences.uoa.gr/event/33/>



**Athens Conference on Advances in Chemistry**  
June 26 – July 1, 2022



HELLENIC REPUBLIC  
National and Kapodistrian  
University of Athens  
EST. 1837  
Department of Chemistry

## **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

[1]<https://medicalpq.gr/%CE%BC%CE%B9%CE%BA%CF%81%CF%8C%CE%B2%CE%B9%CE%B1-%CE%BA%CE%B1%CE%B9-%CE%B1%CE%BD%CF%84%CE%B9%CE%B2%CE%B9%CE%BF%CF%84%CE%B9%CE%BA%CE%AC/>

[2]<https://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/antimicrobial-resistance>

[3]<https://www.biomerieux-diagnostics.com/antimicrobial-stewardship>

[4] K.M. Brothers, N.A. Stella, K.M. Hunt, E.G. Romanowski, X. Liu, J.K. Klarlund, R.M.Q. Shanks, Putting on the brakes: bacterial impediment of wound healing, *Sci. Rep.* (2015) ,5, 14003–14017

[5] D. Church, S. Elsayed, O. Reid, B. Winston, R. Lindsay, Burn wound infections, *Clin. Microbiol. Rev.* (2006) 19 , 403–434.

[6]<https://www.boehringer-ingenheim.com/animal-health/our-responsibility/antibiotic-resistance-one-health-veterinary-medicine>

[7]Βιολογία των μικροοργανισμών- ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΕΣ ΕΚΔΟΣΕΙΣ ΚΡΗΤΗΣ-σημειώσεις κ.Σαΐνη Βιολογική Ανόργανη Χημεία-Βιολογία

[8]<https://el.wikipedia.org/wiki/%CE%A8%CE%B5%CF%85%CE%B4%CE%AC%CF%81%CE%B3%CF%85%CF%81%CE%BF%CF%82>

[9] Papadimitriou, A., Ketikidis, I., Stathopoulou, M. K., Banti, C. N., Papachristodoulou, C., Zoumpoulakis, L., ... & Hadjikakou, S. K.. Innovative material containing the natural product curcumin, with enhanced antimicrobial properties for active packaging. *Materials Science and Engineering*(2018): C, 84, 118-122.

- [10] Banti, C. N., Poyraz, M., Sainis, I., Sari, M., Rossos, G., Kourkoumelis, N., & Hadjikakou, S. K. The periodic table of urea derivative: small molecules of zinc (II) and nickel (II) of diverse antimicrobial and antiproliferative applications. *Molecular Diversity*, (2020) 24(1), 31-43.
- [11] Abendrot, M., & Kalinowska-Lis, U. Zinc-containing compounds for personal care applications. *International journal of cosmetic science*, (2018) 40(4), 319-327.
- [12] Pasquet, J., Chevalier, Y., Pelletier, J., Couval, E., Bouvier, D., & Bolzinger, M. A. The contribution of zinc ions to the antimicrobial activity of zinc oxide. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, (2014) 457, 263-274
- [13] [https://www.researchgate.net/figure/Wurtzite-structure-of-zinc-oxide-ZnO\\_fig2\\_341076255](https://www.researchgate.net/figure/Wurtzite-structure-of-zinc-oxide-ZnO_fig2_341076255)
- [14] [https://gr.dreamstime.com/search.php?srh\\_field=zinc%20oxide&s\\_il=y&s\\_st=new&s\\_sm=all&s\\_rsf=0&s\\_rst=7&s\\_mrg=1&s\\_sl0=y&s\\_sl1=y&s\\_sl2=y&s\\_sl3=y&s\\_sl4=y&s\\_sl5=y&s\\_clc=y&s\\_clm=y&s\\_orp=y&s\\_ors=y&s\\_orl=y&s\\_orw=y&s\\_mrc1=y&s\\_mrc2=y&s\\_mrc3=y&s\\_mrc4=y&s\\_mrc5=y&s\\_exc=&pg=1](https://gr.dreamstime.com/search.php?srh_field=zinc%20oxide&s_il=y&s_st=new&s_sm=all&s_rsf=0&s_rst=7&s_mrg=1&s_sl0=y&s_sl1=y&s_sl2=y&s_sl3=y&s_sl4=y&s_sl5=y&s_clc=y&s_clm=y&s_orp=y&s_ors=y&s_orl=y&s_orw=y&s_mrc1=y&s_mrc2=y&s_mrc3=y&s_mrc4=y&s_mrc5=y&s_exc=&pg=1)
- [15] Αβραμίδου, Ι. (2009). Εντοπισμός πεπτιδίου σήματος σε διαμεμβρανικές πρωτεΐνες με εφαρμογή του συνεχούς μετασχηματισμού κυματιδίων. Σελ 5-7
- [16] <https://el.wikipedia.org/wiki/%CE%91%CE%BC%CE%B9%CE%BD%CE%BF%CE%BE%CE%AD%CE%B1#/media/%CE%91%CF%81%CF%87%CE%B5%CE%AF%CE%BF:AminoAcidball.svg>
- [17] <https://el.wikipedia.org/wiki/%CE%91%CE%BC%CE%B9%CE%BD%CE%BF%CE%BE%CE%AD%CE%B1>

[18] <https://www.wikidoc.org/index.php/Tyrosine>

[19] <https://en.wikipedia.org/wiki/Tyrosine>

[20] Young, S. N. L-tyrosine to alleviate the effects of stress?. *Journal of Psychiatry and Neuroscience* (2007), 32(3), 224-225.

[21] Attipoe, S., Zeno, S. A., Lee, C., Crawford, C., Khorsan, R., Walter, A. R., & Deuster, P. A. Tyrosine for mitigating stress and enhancing performance in healthy adult humans, a rapid evidence assessment of the literature. *Military Medicine*, (2015), 180(7), 754-765

[22] <https://el.wikipedia.org/wiki/%CE%9C%CE%AE%CE%BA%CF%89%CE%BD%CE%B7%CF%85%CF%80%CE%BD%CE%BF%CF%86%CF%8C%CF%81%CE%BF%CF%82>

[23] Nishat, N., Hasnain, S., Dhyani, S., & Asma, Coordination polymers of glutaraldehyde with glycine metal complexes: synthesis, spectral characterization, and their biological evaluation. *Journal of Coordination Chemistry*, (2010) 63(21), 3859-3870.

[24] Wojciechowska, A., Janczak, J., Zierkiewicz, W., Dylong, A., & Matczak-Jon, E. Structural and spectroscopic properties and density functional theory (DFT) calculations of a linearly bridged zinc (II) L-tyrosinato complex. *Polyhedron*, (2015), 85, 665-674.

[25] Koteswara Rao, N. S. R. R. M. M., & Ram Reddy, M. G. Studies on the synthesis, characterisation and antimicrobial activity of new Co (II), Ni (II) and Zn (II) complexes of Schiff base derived from ninhydrin and glycine. *Biology of Metals*, (1990), 3(1), 19-23.

[26] Σημειώσεις της Δρ. Χριστίνα Μπαντή, MSc, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιου Ιωαννίνων στο μάθημα Ειδικά Θέματα Βιοχημείας-Μοριακής Βιολογίας του ΔΠΜΣ Ανόργανη Βιολογική Χημεία

[27][https://el.wikipedia.org/wiki/%CE%95%CF%83%CE%B5%CF%81%CE%AF%CF%87%CE%B9%CE%B1\\_%CE%BA%CF%8C%CE%BB%CE%B9](https://el.wikipedia.org/wiki/%CE%95%CF%83%CE%B5%CF%81%CE%AF%CF%87%CE%B9%CE%B1_%CE%BA%CF%8C%CE%BB%CE%B9)

[28] Βαϊτσίδου, Ζ. (2021). Διερεύνηση μηχανισμών αντοχής σε στελέχη εντεροβακτηριακών και ειδικότερα της *Escherichia coli* που απομονώθηκαν από ασθενείς τεταρτοβάθμιου Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου.

[29] <https://en.wikipedia.org/wiki/Plasmid>

[30] Nji, E., Kazibwe, J., Hambridge, T., Joko, C. A., Larbi, A. A., Dampsey, L. A. O., ... & Lien, L. T. Q. High prevalence of antibiotic resistance in commensal *Escherichia coli* from healthy human sources in community settings. *Scientific reports*, (2021), 11(1), 1-11

[31] [https://www.mun.ca/biology/scarr/Plasmid\\_pUC18.html](https://www.mun.ca/biology/scarr/Plasmid_pUC18.html)

[32] <https://en.wikipedia.org/wiki/PUC19>

[33][https://el.wikipedia.org/wiki/%CE%A8%CE%B5%CF%85%CE%B4%CE%BF%CE%BC%CE%BF%CE%BD%CE%AC%CE%B4%CE%B1\\_%CE%B7\\_%CF%80%CF%85%CE%BF%CE%BA%CF%85%CE%B1%CE%BD%CE%B9%CE%BA%CE%AE](https://el.wikipedia.org/wiki/%CE%A8%CE%B5%CF%85%CE%B4%CE%BF%CE%BC%CE%BF%CE%BD%CE%AC%CE%B4%CE%B1_%CE%B7_%CF%80%CF%85%CE%BF%CE%BA%CF%85%CE%B1%CE%BD%CE%B9%CE%BA%CE%AE)

[34] Σακελλάρης, Β. (2010). Μελέτη του γενετικού μηχανισμού αντοχής στις καρβαπενέμες σε κλινικά στελέχη *Pseudomonas aeruginosa* (Bachelor's thesis).

[35] Τοπαλίδου Σοφία (2018), ΕΝΔΟΝΟΣΟΚΟΜΕΙΑΚΕΣ ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ ΚΑΙ Η ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΤΟΥΣ, Πτυχιακή εργασία

- [36] <https://www.cdc.gov/hai/organisms/pseudomonas.html>
- [37] Aljahdali, M. Synthesis, characterization and equilibrium studies of some potential antimicrobial and antitumor complexes of Cu (II), Ni (II), Zn (II) and Cd (II) ions involving 2-aminomethylbenzimidazole and glycine. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, (2013) 112, 364-376.
- [38] [https://en.wikipedia.org/wiki/Carboxymethyl\\_cellulose](https://en.wikipedia.org/wiki/Carboxymethyl_cellulose)
- [39] T.P. Andrejevic, B.D. Glišić, M.I. Djuran, Amino Acids and Peptides as Versatile Ligands in the Synthesis of Antiproliferative Gold Complexes, *Chemistry* 2020, 2, 203–218
- [40] <https://el.wikipedia.org/wiki/%CE%92%CE%B1%CE%BA%CF%84%CE%AE%CF%81%CE%B9%CE%BF>
- [41] Εισαγωγή στην Μικροβιολογία, Δομή του Προκαρυωτικού κυττάρου: (κεφάλαιο 4 ) <https://docplayer.gr/108748456-Domi-toy-prokaryotikoy-kyttaroy-kefalaio-4-apo-to-vivlio-eisagogi-stin-mikroviologia.html>
- [42] Alcamo IE (2001). *Fundamentals of microbiology*. Boston: Jones and Bartlett
- [43] Madigan, Michael; Martinko, John Brock, *Βιολογία των Μικροοργανισμών (Biology of Microorganisms)*. I. Επιστημονική επιμέλεια Ελληνικής έκδοσης: Οικονόμου Τάσος. Pearson Education (Ελληνική: Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης) (2005).
- [44] [https://www.researchgate.net/figure/Distribution-diagram-for-zinc-species-as-a-function-of-the-solution-pH-at-25-C-16-17\\_fig2\\_322598184](https://www.researchgate.net/figure/Distribution-diagram-for-zinc-species-as-a-function-of-the-solution-pH-at-25-C-16-17_fig2_322598184)

[45] <https://www.student.cc.uoc.gr> Χαρακτηρισμός πρωτεϊνών και νουκλεϊνικών οξέων με ηλεκτροφόρηση

[46] Kyros, L.; Banti, C.N.; Kourkoumelis, N.; Kubicki, M.; Sainis, I.; Hadjidakou, S.K. Synthesis, characterization, and binding properties towards CT-DNA and lipoxygenase of mixed-ligand silver(I) complexes with 2-mercaptothiazole and its derivatives and triphenylphosphine. *J. Biol. Inorg. Chem.* 2014, 19, 449–464.

[47] Sainis, I.; Banti, C.N.; Owczarzak, A.M.; Kyros, L.; Kourkoumelis, N.; Kubicki, M.; Hadjidakou, S.K. New antibacterial, non-genotoxic materials, derived from the functionalization of the anti-thyroid drug methimazole with silver ions. *J. Inorg. Biochem.* 2016, 160, 114–124

[48] Papadimitriou, A.; Ketikidis, I.; Stathopoulou, M.K.; Banti, C.N.; Papachristodoulou, C.; Zoumpoulakis, L.; Agathopoulos, S.; Vagenas, G.V.; Hadjidakou, S.K. Innovative material containing the natural product curcumin, with enhanced antimicrobial properties for active packaging. *Mater. Sci. Eng. C* 2018, 84, 118–122

[49] Milionis, I.; Banti, C.N.; Sainis, I.; Raptopoulou, C.P.; Psycharis, V.; Kourkoumelis, N.; Hadjidakou, S.K. Silver ciprofloxacin (CIPAG): A successful combination of antibiotics in inorganic-organic hybrid for the development of novel formulations based on chemically modified commercially available antibiotics. *J. Biol. Inorg. Chem.* 2018, 23, 705–723. *Antibiotics* 2020, 9, 845 22 of 23

[50] Stathopoulou, M.-E.K.; Banti, C.N.; Kourkoumelis, N.; Hatzidimitriou, A.G.; Kalampounias, A.G.; Hadjidakou, S.K. Silver complex of salicylic acid and its hydrogel-cream in wound healing chemotherapy. *J. Inorg. Biochem.* 2018, 181, 41–55.



- [51] Chrysouli, M.P.; Banti, C.N.; Milionis, I.; Koumasi, D.; Raptopoulou, C.P.; Psycharis, V.; Sainis, I.; Hadjikakou, S.K. A water-soluble silver (I) formulation as an effective disinfectant of contact lenses cases. *Mater. Sci. Eng. C* 2018, 93, 902–910.
- [52] Karetsi, V.A.; Banti, C.N.; Kourkoumelis, N.; Papachristodoulou, C.; Stalikas, C.D.; Raptopoulou, C.P.; Psycharis, V.; Zoumpoulakis, P.; Mavromoustakos, T.; Sainis, I.; et al. An Efficient Disinfectant, Composite Material {SLS@[Zn<sub>3</sub> (CitH)<sub>2</sub> ]} as Ingredient for Development of Sterilized and Non Infectious Contact Lens. *Antibiotics* 2019, 8, 213.
- [53] Ketikidis, I.; Banti, C.N.; Kourkoumelis, N.; Tsiafoulis, C.G.; Papachristodoulou, C.; Kalampounias, A.G.; Hadjikakou, S.K. Conjugation of Penicillin-G with Silver(I) Ions Expands Its Antimicrobial Activity against Gram Negative Bacteria. *Antibiotics* 2020, 9, 25.
- [54] Harris LG, Foster SJ, Richards RG. "An introduction to *Staphylococcus aureus*, and techniques for identifying and quantifying *S. aureus* adhesins in relation to adhesion to biomaterials: review". *European Cells & Materials*. 2002 4: 39–60.
- [55] Jacquemyn H, Lenaerts M, Brys R, Willems K, Honnay O, Lievens B. "Among-population variation in microbial community structure in the floral nectar of the bee-pollinated forest herb *Pulmonaria officinalis* L." 2013, 8(3), e56917
- [56] <https://en.wikipedia.org/wiki/Staphylococcus>
- [57] VUONG C.; OTTO M. *Staphylococcus epidermidis* Infections. *Microbes and infection*, 2002, 4.4: 481-489.
- [58] <https://www.sciencephoto.com/media/12836/view>

[59] Deweese, Joseph E., and Neil Osheroff. "The DNA cleavage reaction of topoisomerase II: wolf in sheep's clothing." *Nucleic acids research* (2009) 37.3: 738-748.

[60] <https://www.differencebetween.com/difference-between-topoisomerase-i-and-vs-ii/>

[61] LI, D.-Q.; ZHOU, Jian; LIU, Xing. The one-dimensional chain polymer of aqua (tyrosinato) zinc (II). *Acta Crystallographica Section C: Crystal Structure Communications*, 2007, 63.8: m371-m373

[62] Zhou B., Silva N. J., Shi F. N., Palacio F., Mafra L., & Rocha J, CoII/ZnII–(L-Tyrosine) Magnetic Metal–Organic Frameworks. *European Journal of Inorganic Chemistry*, 2012, (32), 5259-5268

[63] SHEMCHUK O.; GREPIONI F.; BRAGA D. Co-crystallization of racemic amino acids with ZnCl<sub>2</sub>: an investigation of chiral selectivity upon coordination to the metal centre. *CrystEngComm*, 2020, 22.34: 5613-5619

[64] WOJCIECHOWSKA A.; DASZKIEWICZ M.; BIENKO A. Polymeric Zn (II) and Cu (II) complexes with exobidentate bridging l-tyrosine: Synthesis, structural and spectroscopic properties. *Polyhedron*, 2009, 28.8: 1481-1489

[65] RAMAN, N.; DHAVEETHU RAJA, J.; SAKTHIVEL, A. Synthesis, spectral characterization of Schiff base transition metal complexes: DNA cleavage and antimicrobial activity studies. *Journal of Chemical sciences*, 2007, 119.4: 303-310.

[66] Nair, M. S., Arish, D., & Joseyphus, R. S. Synthesis, characterization, antifungal, antibacterial and DNA cleavage studies of some heterocyclic Schiff base metal complexes. *Journal of Saudi Chemical Society*, (2012). 16(1), 83-88.

[67] Yousef, T. A., El-Reash, G. A., El-Gammal, O. A., & Bedier, R. A. Synthesis, characterization, optical band gap, in vitro antimicrobial activity and DNA cleavage studies of some metal complexes of pyridyl thiosemicarbazone. *Journal of Molecular Structure*, 2013, 1035, 307-317.

[68] RAMAN, N.; ALI, Syed Fathima S.; RAJA, Dhaveethu J. Designing, synthesis and spectral characterization of Schiff base transition metal complexes: DNA cleavage and antimicrobial activity studies. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 2008, 73.11: 1063-1071.

[69] Abendrot, M., Chęcińska, L., Kusz, J., Lisowska, K., Zawadzka, K., Felczak, A., & Kalinowska-Lis, U. Zinc (II) complexes with amino acids for potential use in dermatology: Synthesis, crystal structures, and antibacterial activity. *Molecules*, 2020, 25(4), 951.

[70] BANTI, Christina N.; HADJIKAKOU, Sotiris K. Evaluation of toxicity with brine shrimp assay. *Bio-protocol*, 2021, 11.2: e3895-e3895.