

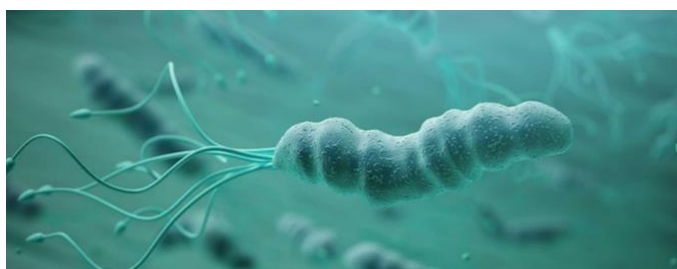


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

Διδραματικό Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών (Δ.Π.Μ.Σ.)

«Ανόργανη Βιολογική Χημεία»

Σύζευξη αντιμικροβιακών βιοδραστικών ενώσεων που χρησιμοποιούνται κατά του ελικοβακτηριδίου του πυλωρού, με στόχο την ανάπτυξη νέων χημικοθεραπευτικών για το καρκίνο του στομάχου.



Γεωργία Εξαρχοπούλου

Χημικός

Διπλωματική Εργασία Μεταπτυχιακού Διπλώματος

Επιβλέπων Καθηγητής: Δρ Σωτήριος Χατζηκακού



Πανεπιστήμιο
Ιωαννίνων

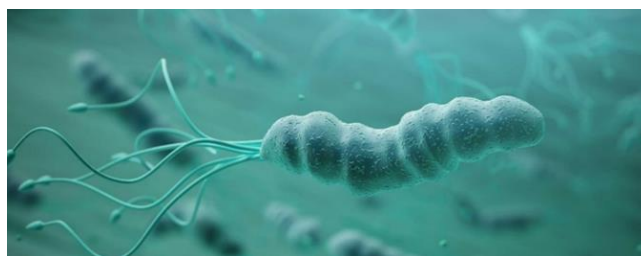
ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2021



UNIVERSITY OF IOANNINA
M.SC BIOLOGICAL INORGANIC CHEMISTRY

Diploma Thesis:

Conjugation of antimicrobial bioactive compounds used against *Helicobacter pylori* for the development of new chemotherapeutic agents for gastric cancer.



Georgia I.Exarchopoulou

Bsc Chemistry



University of
Ioannina

Ioannina 2021

Επιβλέπων καθηγητής :

Δρ Σωτήριος Κ. Χατζηκακού

Θέμα:

«Σύζευξη αντιμικροβιακών βιοδραστικών ενώσεων που χρησιμοποιούνται κατά του ελικοβακτηριδίου του πυλωρού, με στόχο την ανάπτυξη νέων χημικοθεραπευτικών για το καρκίνο του στομάχου.»

Ορισμός Τριμελούς Εξεταστικής Επιτροπής:

1. Χατζηκακού Κ. Σωτήριος, Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων.....(Επιβλέπων)
2. Κουτσολέλος Γ. Αθανάσιος, Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης.....(Μέλος)
3. Τασιόπουλος Γ. Αναστάσιος, Καθηγητής, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Κύπρου.....(Μέλος)

Έγκριση Μεταπτυχιακής Διατριβής: .../.../...

Ευχαριστίες

Η παρούσα διατριβή αποτελεί την διπλωματική μου εργασία στο πλαίσιο του μεταπτυχιακού Προγράμματος Ειδίκευσης "Ανόργανη Βιολογική Χημεία" του τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, και εκπονήθηκε στο εργαστήριο Εφαρμοσμένης Βιολογικής Χημείας υπό την επίβλεψη του Καθηγητή, κ. Χατζηκακού Κ. Σωτήριου.

Πρωτίστως, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή μου, κ. Χατζηκακού Κ. Σωτήριο, για την καθοδήγηση, την στήριξη και την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπο μου, καθώς και τις γνώσεις που μου μεταλαμπάδεψε αυτούς τους 18 μήνες.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Κουτσολέλος Γ. Αθανάσιος, καθηγητή του τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης και τον κ. Τασιόπουλος Γ. Αναστάσιος, καθηγητή του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Κύπρου που δέχτηκαν να είναι μέλη της τριμελούς επιτροπής αξιολόγησης της διπλωματικής μου εργασία.

Ευχαριστώ θερμά την κα Χριστίνα Μπαντή, μεταδιδάκτορα του Εργαστηρίου Βιολογικής Ανόργανης Χημείας και Διδάσκουσα Βιολογίας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, για την συνεχή καθοδηγησή της στο βιολογικό μέρος της εργασίας, η οποία ήταν κομβική.

Ακολούθως, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. Παπαχριστοδούλου Χριστίνα, μέλος ΕΔΙΠ του τμήματος Φυσικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων για τη λήψη των φασμάτων XRF και XRPD, καθώς και τον κ. Καρκαμπούνα Αθανάσιο για τη λήψη του φάσματος HRMS.

Ευχαριστώ και όλη την ομάδα του εργαστηρίου Εργαστηρίου Βιολογικής Ανόργανης Χημείας, που με υποδέχτηκαν θερμά και με βοήθησαν καθ' όλη τη διάρκεια του μεταπτυχιακού, και ιδιαίτερα την "εργαστηριακή μου γειτόνισσα" Κοραλία Σαρακηνού, η οποία ήταν στήριγμα για εμένα.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στους ανθρώπους που ήταν δίπλα μου όλο αυτό το διάστημα, Βαγγέλη, Μαριέλα, Ντίνα, Ειρήνη και Βάσω, με τους οποίους μοιράστηκα τις χαρές και τα άγχη μου και με στήριξαν καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της διατριβής.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω πιο πολύ από όλους τους γονείς μου, Ηρακλή και Σοφία, και την αδερφή μου, Αλίκη, για την απύθμενη και άνευ όρων αγάπη, εμπιστοσύνη, υπομονή όπως και για την ηθική και ψυχολογική στήριξη όλων αυτών των χρόνων που με οδήγησαν εδώ.

Μάιος, 2021

Εξαρχοπούλου Γεωργία

Περίληψη

Ο καρκίνος του στομάχου είναι ο τέταρτος πιο συχνός καρκίνος, με πολύ υψηλό ποσοστό θνησιμότητας που τον καθιστά τη δεύτερη πιο κοινή αιτία θανάτου από καρκίνο παγκοσμίως μετά τον καρκίνο του πνεύμονα. Πιστεύεται πως το κύριο αίτιο της ασθένειας είναι η μόλυνση του στομάχου από το Ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού (*H.pylori*). Στη χημειοθεραπεία κατά του καρκίνου χρησιμοποιείται ένα κοκτέιλ αντιβιοτικών φαρμάκων και βισμούθιου.

Σκοπός μας είναι η ανάπτυξη νέου χημικοθεραπευτικού φαρμάκου που προκύπτει με τη σύζευξη αντιβιοτικού φαρμάκου (*ciprofloxacin*) και αντιμονίου .

Έτσι παρασκευάσαμε ένωση CIPAN , η οποία χαρακτηρίστηκε μέσω σημείου τήξης, διαλυτότητας ,φασματοσκοπίας IR , καθώς και αναλύσεις XRF, XRPD και HRMS. Μελετήθηκε η σταθερότητα της με φασματοσκοπία UV-Vis και NMR. Η αντιμικροβιακή δράση της ένωσης εξετάστηκε στα βακτήρια *Pseudomonas aeruginosa* (*P aeruginosa*), *Escherichia coli* (*E.coli*), *Staphylococcus Aureus* (*S. aureus*), *Staphylococcus Epidermidis*(*S. epidermidis*) και προσδιορίστηκε η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (MIC), η ελάχιστη βακτηριοκτόνα συγκέντρωση (MBC), η ελάχιστη συγκέντρωσης αναστολής βιοφιλμ καθώς και οι ζώνες αναστολής (IZ). Τέλος μελετήθηκε η *in vitro* τοξικότητα της ένωσης σε ανθρώπινα κύτταρα ινοβλάστες(MRC-5) , ενώ η *in vivo* τοξικότητα σε πειραματικό μοντέλο *Artemia Salina* , και *Allium Cera*, καθώς και η αλληλεπίδραση της ένωσης με το DNA.

Abstract

Stomach cancer is the fourth most common cancer, with a very high mortality rate making it the second most common cause of cancer death worldwide after lung cancer. It is believed that the main cause of the disease is the infection of the stomach by *Helicobacter pylori* (*H. pylori*). A cocktail of antibiotics and bismuth is used in anti-cancer chemotherapy.

Our goal is to develop a new chemotherapeutic drug that results from the coupling of an antibiotic (ciprofloxacin) and antimony.

Thus, we prepared a CIPAN compound, which was characterized by melting point, solubility, IR spectroscopy, as well as XRF, XRPD and HRMS analyzes. Its stability was studied by UV-Vis and NMR spectroscopy. The antimicrobial activity of the compound was tested in the bacteria *Pseudomonas aeruginosa* (*P aeruginosa*), *Escherichia coli* (*E.coli*), *Staphylococcus Aureus* (*S. aureus*), *Staphylococcus Epidermids* (*S. epidermidis*) was evaluated by the mean of minimum inhibitory concentration (MIC) ,minimum bactericidal concentration (MBC), minimum inhibitory concentration for biofilm as well as inhibitor zones (IZ). The in vitro toxicity of the compound against human fibroblasts was studied (MRC-5), while in vivo toxicity was tested against the fish experimental model *Artemia Salina*, and the plant cells *Allium Cepa*. Finally, the interaction with ct-DNA was studied.

❖ Περιεχόμενα

1.	Καρκίνος	13
1.1.	Ορισμός	13
1.1.1.	Τύποι	15
1.1.2.	Καρκινογένεση	16
1.1.3.	Χαρακτηριστικά καρκινικών κυττάρων	16
1.2.	Καρκίνος του στομάχου	18
1.2.1.	Ιστοπαθολογία	18
1.2.2.	Αίτια	19
1.2.3.	Θεραπεία	20
2.	Ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού	22
2.1.	Χαρακτηριστικά	22
2.2.	Ασθένειες	23
2.3.	Χρόνια φλεγμονή και καρκίνος	26
2.4.	Θεραπεία	27
3.	Φάρμακο	29
3.1.	Αντιβιοτικά φάρμακα	29
3.2.	Κατηγορίες Αντιβιοτικών	30
3.3.	Μηχανισμός δράσης	30
3.4.	Κινολόνες	33
3.4.1.	Σιπροφλοξασίνη	34
3.5.	Τροποποιημένα φάρμακα	36
3.5.1.	Πλεονεκτήματα	36
3.5.2.	Στάδια	37
4.1.	Γενικά	38
4.2.	Χαρακτηριστικά	38
4.3.	Τριφαίνυλο Αντιμόνιο (tpSb)	41
5.	Μικροβιολογία – Μικρόβια	42
5.1.	Γενικά	42
5.2.	Προκαρυωτικά κύτταρα	43
5.3.	Βακτήρια	44
5.3.1.	<i>Escherichia coli</i> (<i>E.coli</i>)	48
5.3.2.	<i>Ψευδομονάδα πνοκυανική</i> (<i>P. aeruginosa</i>)	49
5.3.3.	<i>Σταφυλόκοκος χρυσίζων</i> (<i>Staphylococcus aureus</i>)	52
5.3.4.	<i>Σταφυλόκοκος επιδερμίδας</i> (<i>Staphylococcus epidermidis</i>)	54

6.	Ο Σκοπός	57
6.1.	Προσέγγιση	58
7.	Χημικό Μέρος	60
7.1.	Σύνθεση	60
7.2.	Σημείο τήξης	60
7.3.	Διαλυτότητα	61
7.4.	Κρυοσκοπία	61
7.5.	Φασματομετρία μάζας υψηλής ανάλυσης (High Resolution Mass Spectrometry, HR-MS).	62
7.6.	Φασματοσκοπία φθορισμού ακτίνων X (X-ray Fluorescence Spectroscopy, XRF)	63
7.7.	Περίθλαση ακτίνων X σε σκόνη (X-ray powder diffraction, XRPD)	63
7.8.	Φασματοσκοπία υπεριώδους-ορατού UV-Vis	64
7.9.	Φασματοσκοπία υπέρυθρου FT-IR	64
7.10.	Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού NMR	65
8.	Βιολογικό Μέρος	66
8.1.	Αντιμικροβιακή δράση	66
8.2.	Ζώνες Αναστολής – IZ	67
8.3.	Ελάχιστη Ανασταλτική Συγκέντρωση (MIC)	68
8.4.	Ελάχιστη Βακτηριακτόνος Συγκέντρωση (MBC)	68
8.5.	Biofilm	69
9.	Μελέτη τοξικότητας	70
9.1.	Μελέτη τοξικότητας σε κύτταρα	70
9.1.1.	Μέθοδος εύρεσης κυτταροτοξικότητας in vitro με χρήση της Sulforhodamine B.	71
9.1.2.	Έλεγχος της in vitro γονοτοξικότητας με την μέθοδο των μικροπυρηνίσκων (Micronucleus assay)	73
9.2.	Έλεγχος της in vivo τοξικότητας στον ζωντανό οργανισμό μοντέλο <i>Artemia salina</i>	74
9.3.	Έλεγχος της in vivo γονοτοξικότητας στον οργανισμό μοντέλο <i>Allium cepa</i> (<i>Allium cepa</i> test)	76
10.	Αλληλεπίδραση του συμπλόκου με το DNA	78
10.1.	Φασματοσκοπία υπεριώδους-ορατού (UV-Vis)	78
10.2.	Μελέτη της ανταγωνιστικής δράσης με το αιθίδιο βρωμίδιο με φασματοσκοπία φθορισμού	79
10.3.	Ιξωδομετρία	80
11.	Χαρακτηρισμός Ένωσης	83
11.1.	Σημείο τήξης	83
11.2.	Διαλυτότητα	84

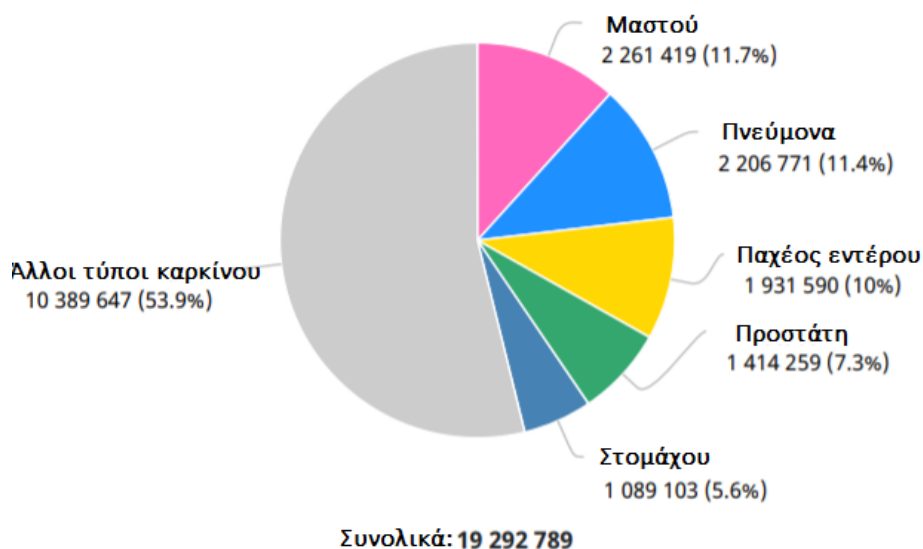
11.1.	Κρυοσκοπία	85
11.2.	Φασματομετρία μάζας υψηλής ανάλυσης (HR-MS).....	85
11.1.	Φασματοσκοπία Φθορισμού Ακτίνων Χ (XRF)	86
11.2.	Ανάλυση περίθλασης ακτίνων Χ σε σκόνη (X-ray powder diffraction, XRPD)	87
11.1.	Φασματοσκοπία Υπεριώδους-Ορατού (UV-Vis).....	88
11.2.	Δονητική φασματοσκοπία υπέρυθρου μετασχηματισμού Fourier (FT-IR).	90
11.3.	Φασματοσκοπία ¹ H-NMR	94
11.4.	Μελέτη Σταθερότητας	95
11.4.1.	Σταθερότητα σε διάλυμα με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού πρωτονίου (¹ H-NMR).....	95
11.4.2.	Σταθερότητα σε διάλυμα με φασματοσκοπία υπεριώδους/ορατού (UV-Vis).....	96
12.	Αντιμικροβιακή δράση	97
12.1.	Ζώνες Αναστολής -IZ.....	97
12.2.	Ελάχιστη Ανασταλτική συγκέντρωση (MIC).....	99
12.3.	Ελάχιστη Βακτηριοκτόνος Συγκέντρωση (MBC).....	101
12.4.	Biofilm.....	104
13.	Μελέτη τοξικότητας	105
13.1.	Τοξικότητα <i>in vitro</i> σε φυσιολογικά κύτταρα MRC-5	105
13.2.	Έλεγχος της <i>in vitro</i> γονοτοξικότητας με τη μέθοδο των μικροπυρήνων.....	106
13.3.	Έλεγχος της <i>in vivo</i> τοξικότητας στον ζωντανό οργανισμό <i>Artemia salina</i>	108
13.1.	Έλεγχος της <i>in vivo</i> γονοτοξικότητας στον ζωντανό οργανισμό <i>Allium cepa</i>	110
14.	Αλληλεπίδραση του συμπλόκου με το DNA	113
14.1.	Έλεγχος με φασματοσκοπία υπεριώδους-ορατού UV-Vis.....	113
14.2.	Μελέτη της ανταγωνιστικής δράσης με το αιθίδιο βρωμίδιο με φασματοσκοπία φθορισμού	116
14.3.	Έλεγχος με ιξωδομετρία.....	118
15.	Συμπεράσματα	120
16.	Παράρτημα - Αντιδραστήρια	125
16.1.	Αντιδραστήρια και Διαλύτες	125
16.2.	Πίνακας συντομογραφιών Αντιδραστηρίων και Διαλυτών.....	126
17.	Παραπομπές-Βιβλιογραφία	128

Θεωρητικό Μέρος

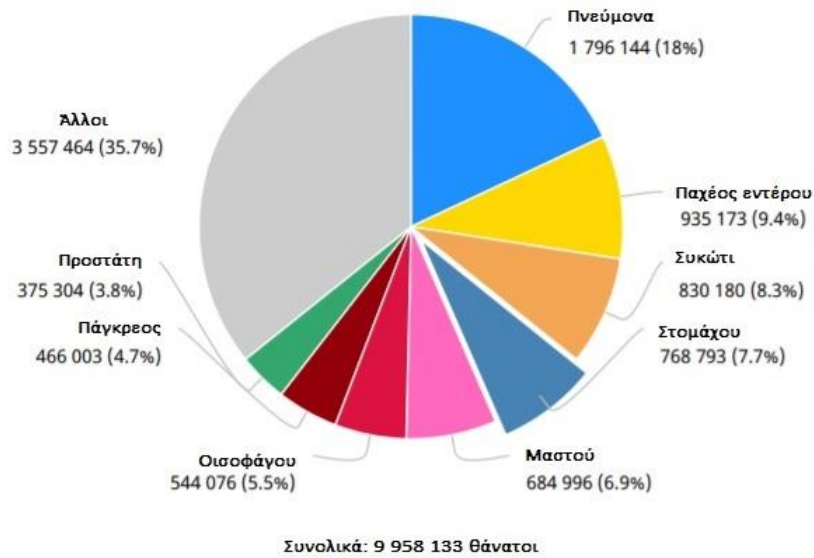
1. Καρκίνος

1.1.Ορισμός

Ως καρκίνο ονομάζεται ένα σύνολο ασθενειών που έχουν σχέση τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό καθώς και την εξάπλωση μεταλλαγμένων κυττάρων σε άλλα μέρη του σώματος, Δημιουργείται από οποιονδήποτε τύπο κυττάρου, καθώς και σε όλα τα όργανα και εξαρτάται από εύρος παραγόντων [1]. Σε αντίθεση με τα φυσιολογικά κύτταρα ,τα καρκινικά κύτταρα πολλαπλασιάζονται ανεξέλεγκτα και έτσι αναπτύσσεται μια μάζα κυττάρων που ονομάζεται όγκος. Άλλοι όροι που χρησιμοποιούνται είναι ο κακοήθης όγκος και το κακοήθες νεόπλασμα, ενώ σε περίπτωση που ο όγκος δεν κάνει μεταστάσεις χρησιμοποιείται ο όρος καλοήθης. Ο καρκίνος αποτελεί τη δεύτερη πιο συχνή αιτία θανάτου αμέσως μετά τις καρδιοπάθειες και και αντιπροσωπεύει το 1/4 όλων των θανάτων, ενώ επηρεάζει ανθρώπους όλων των ηλικιών [7,8,9]. Βάση της έκθεσης GLOBOCAN 2020, καταγράφηκαν 19.3 νέα περιστατικά καρκίνου μέσα στο 2020 , ενώ οι καταγεγραμμένοι θάνατοι ανέρχονται σχεδόν στα 9.9 εκατομμύρια (Εικόνα 1.1.1) [4].



(α)

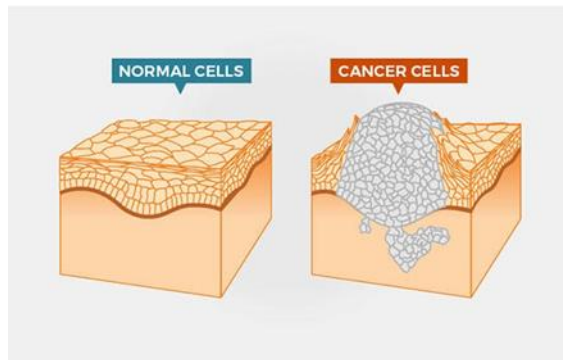


(β)

Εικόνα 1.1 Τα ποσοστά νέων περιπτώσεων (α) και θανάτου (β) από καρκίνο το 2020 [4]

Τα αίτια που προκαλούν καρκίνο δεν είναι πλήρως κατανοητά, Ωστόσο υπάρχουν πολλοί παράγοντες που είναι γνωστοί ότι αυξάνουν την πιθανότητα εμφάνισής της νόσου, όπως το κάπνισμα, η περίσσεια βάρους και οι κληρονομικές γενετικές μεταλλάξεις.[3] Είναι μια πολύ περίπλοκη ασθένεια , και κατά συνεπεία ένα μόνο φάρμακο δεν θα μπορούσε να οδηγήσει σε αποτελεσματική θεραπεία.[5] Για αυτό το μέλλον των αντικαρκινικών φαρμάκων αποτελούν οι στοχευμένες θεραπείες , καθώς γίνονται πιο κατανοητοί οι μοριακές οδοί που οδηγούν στην ανάπτυξη και εξέλιξη των διαφόρων καρκίνων.[6]

1.1.1. Τύποι



Εικόνα 1.1.1 Μορφολογία φυσιολογικών και καρκινικών κυττάρων [10]

Όπως αναφέρθηκε αυτή η μάζα κυττάρων που σχηματίζεται μπορεί να είναι είτε καλοήθης ή κακοήθης. Στην πρώτη περίπτωση γύρω από τα κύτταρα υπάρχει συνδετικός ιστός και δεν είναι επεκτατικοί. αυτό έχει ως αποτέλεσμα να μην προκαλούν σοβαρές βλάβες εκτός από την περίπτωση να πιέζουν ζωτικά όργανα. στην περίπτωση όμως των κακοήθων όγκων τα κύτταρα διαφέρουν του φυσιολογικού και μπορούν να επεκταθούν σε άλλα όργανα γειτονικά ή μη, μέσω της κυκλοφορίας του αίματος ή της λέμφου. Με αυτό τον τρόπο σχηματίζονται οι δευτερογενείς όγκοι, μέσω της μετάστασης [10].

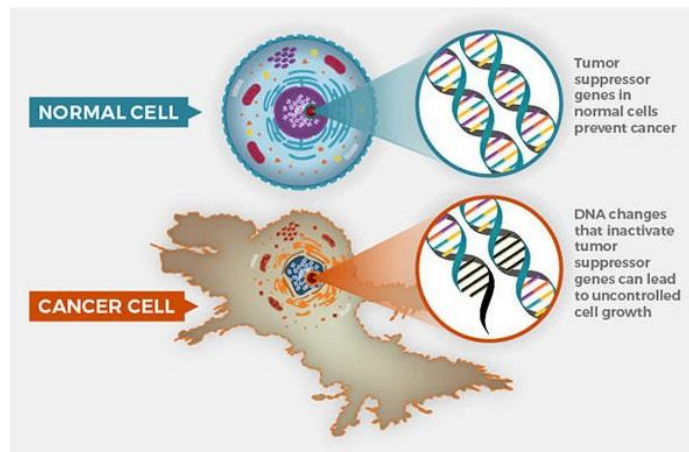
Για τους καρκίνοι που εμφανίζονται στο αίμα χρησιμοποιούνται οι όροι λευχαιμίες και λεμφώματα, Ενώ υπάρχουν και τα σαρκώματα που αποτελούν μία κατηγορία κακοήθων όγκων. Τα συμπτώματα εξαρτώνται από το όργανο το οποίο προσβάλλεται καθώς και από τον ασθενή.

Μερικά από αυτά είναι:

- ασυνήθιστες αιμορραγίες η εκκρίσεις
- εμφάνιση εξογκώματος η διόγκωση του οργάνου
- επιμονή βραχνάδα και βήχας
- δυσπεψία
- πληγές που δεν θεραπεύονται [10]

1.1.2. Καρκινογένεση

Ο καρκίνος είναι ουσιαστικά το αποτέλεσμα της αποτυχημένης ανάπτυξης ενός ιστού. Το φυσιολογικό κύτταρο για να μετατραπεί σε καρκινικό πρέπει να υποστεί μία ή περισσότερες γονιδιακές μεταλλάξεις. Τα γονίδια τα οποία μπορούν να οδηγήσουν σε τέτοιες μεταλλάξεις είναι τα ογκογονίδια, τα οποία είναι υπεύθυνα για την ανάπτυξη ενός ιστού και τα ογκοκατασταλτικά γονίδια, που είναι υπεύθυνα για την σωστή διακοπή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού [10].



Εικόνα 1.1.2 Διαφορές στο DNA φυσιολογικών και καρκινικών κυττάρων [10].

Διάφορες μεταλλάξεις μπορεί να συμβούν κατά τη μίτωση, όπως στην περίπτωση που χάνεται ή διπλασιάζεται μία περιοχή ενός χρωμοσώματος, η οποία μπορεί να εμφανιστεί μία μετάθεση δηλαδή δύο χρωμοσώματα να ενώνονται μία ομαλά [10].

1.1.3. Χαρακτηριστικά καρκινικών κυττάρων

- Αντίσταση στην απόπτωση

Τα υγιή κύτταρα αυξάνονται, διαιρούνται και πεθαίνουν με έναν αυστηρά ελεγχόμενο τρόπο. Τα καρκινικά κύτταρα δεν ακολουθεί τις φυσιολογικές διαδικασίες της απόπτωσης ή άλλης μορφής προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου.

➤ Αντίσταση στο μηχανισμό γήρανσης

Μετά την ενηλικίωση του ανθρώπου ,τα κύτταρα του ανθρώπου διαιρούνται ώστε να αντικαταστήσουν κύτταρα που έχουν φθαρεί ή έχουν πεθάνει. Σε αντίθεση ,τα καρκινικά κύτταρα διαιρούνται ανεξέλεγκτα , εξαιτίας μεταλλάξεων του γονιδιώματος και χάρη σε ένα ένζυμο, την τελομεράση, που βρίσκεται μόνο στα γαμετικά κύτταρα και στα καρκινικά. Τα κύτταρα στα οποία εκφράζεται η τελομεράση ονομάζονται αθανατοποιημένα, και ο συνεχόμενος πολλαπλασιασμός τους έχει ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη μιας μάζας κυττάρων.

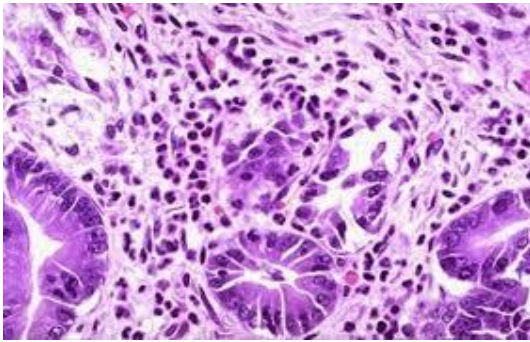
➤ Αγγειογένεση

Πολλοί όγκοι μπορεί να σχηματίσουν δικό τους αγγειακό δίκτυο, το οποίο όμως είναι πιο άτακτο και πυκνό από το φυσιολογικό.

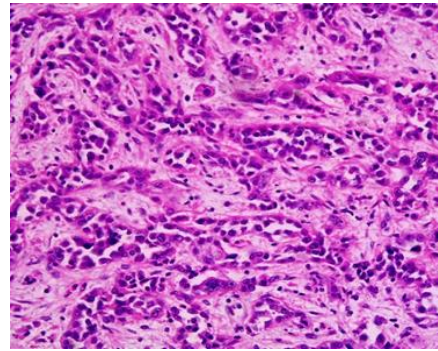
➤ Μετάσταση

Τα καρκινικά εμφανίζουν διαφορετική μορφολογία από τα υγιή και μπορούν να εισβάλλουν σε γειτονικούς ιστούς ή ακόμη και να μεταφερθούν σε άλλα σημεία του σώματος μέσω της κυκλοφορίας του αίματος ή της λέμφου, σχηματίζοντας δευτερογενείς όγκους, φαινόμενο γνωστό και ως μετάσταση [10].

1.2.Καρκίνος του στομάχου



(α)



(β)

Εικόνα 1.2.1 Υγιή(α) και καρκινικά (β) κύτταρα στομάχου

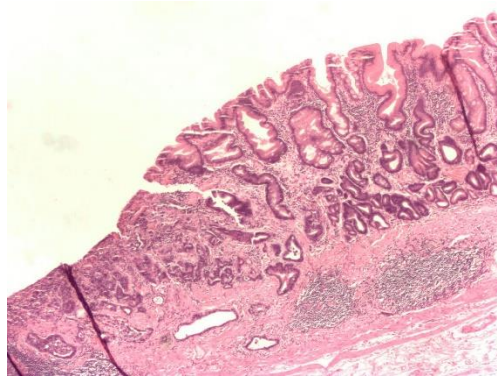
Με τον όρο γαστρικό καρκίνο , γνωστό και ως καρκίνο του στομάχου, αναφερόμαστε στον καρκίνο που αναπτύσσεται είτε σε μέρος του στομάχου, είτε σε ολόκληρο το όργανο [11].Μπορεί να ανπτυχθεί σε οποιοδήποτε μέρος του στομάχου και μπορεί να εξαπλωθεί από το στομάχι σε άλλα όργανα[13]. Είναι ο πέμπτος πιο συχνός καρκίνος και αποτελεί μια κοινή αιτία θανάτου παγκοσμίως καθώς είναι ο τέταρτος σε θνησιμότητα καρκίνος, [12].

1.2.1. Ιστοπαθολογία

Οι καρκίνοι στομάχου είναι συντριπτικά αδενοκαρκινώματα (90%) ενώ περίπου 5% των γαστρικών κακοηθών είναι λεμφώματα (MALTomas, ή λέμφωμα MATL). Ο γαστρικός καρκίνος διαχωρίζεται σε δύο τύπους γαστρικών αδενοκαρκινωμάτων , οι οποίοι παρουσιάζουν διαφορετικά επιδημιολογικά και προγνωστικά χαρακτηριστικά και είναι οι εξής (ταξινόμηση Lauren): εντερικός τύπος ή διάχυτος τύπος [14].

Ο διάχυτος τύπος συνήθως εμφανίζει κυτταρική μορφολογία είδος σφραγιστήρος δακτυλίου , η αδενική δομή δεν είναι συνεκτική και έχει πτωχή διαφοροποίηση[15]. Έχουν την τάση να εισβάλουν επιθετικά στον γαστρικό τοίχο διεισδύοντας στο βλεννογόνο και το υπό

βλεννογόνο. τα διάχυτα κύτταρα ενώ είναι μη κολλώδη , εκκρίνουν βλέννα η οποία εισχωρεί στο διάμεσο χώρο, σχηματίζοντας οπτικά κενά διαστήματα.



Εικόνα 1.2.2 Απεικόνιση γαστρικού αδενοκαρκινώματος και εντερικής μεταπλασίας [17]

Η εντερική μορφή γαστρικού καρκίνου χαρακτηρίζεται από παρουσία αδενοειδών σωληνωδών σχηματισμών που προσομοιάζουν με εντερικούς αδένες ,Τις πολλαπλάσιες μονάδες Λουμεν, και συχνά συνδέεται με το γειτονικό βλεννογόνο [16]. Κατηγοριοποιείται σε τρεις βαθμούς διαφοροποίησης ανάλογα με την αδενική αρχιτεκτονική: καλά, μέτρια και κακώς διαφοροποιημένο. Επίσης σχετίζεται με διάφορους περιβαλλοντολογικούς και διαιτητικούς παράγοντες.

1.2.2. Αίτια

Πειραματικά δεδομένα δείχνουν ότι η χρόνια φλεγμονή από το ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού είναι η κυριότερη αιτία για τη δημιουργία του καρκίνου ,όπως επίσης και του πολύ πιο σπάνιου γαστρικού λεμφώματος (MALT) στο βλεννογόνο ιστό [18].

Πρόσφατες μοριακές πειραματικές γενετικές μελέτες επιβεβαιώνουν ότι η ανάπτυξη του αδενοκαρκινωμάτων είναι αποτέλεσμα συσσώρευσης διαφόρων γενετικών μεταβολών στις οποίες κατά κύριο λόγο εμπλέκονται οι εξής τρεις παράγοντες: ενεργοποίηση ογκογονιδίων, αδρανοποίηση ογκοκατασταλτικών γονιδίων και μεταβολές σε γονίδια τα οποία συμμετέχουν

στη διεργασία διορθώσεως λαθών που συμβαίνουν κατά τον διπλασιασμό του DNA (DNA mismatch repair) .

Η χρόνια φλεγμονή από το ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού καθώς και η έκθεση σε διάφορες τοξίνες που είναι δυνατόν να προκαλέσουν ατροφική γαστρίτιδα, εντερική μεταπλασία και δυσπλασία και εν τέλει φαίνεται να ενισχύει την ανάπτυξη του γαστρικού καρκίνου [19-21]. Επίσης κατά την χρόνια φλεγμονή από το ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού στρατολογούνται αρχέγονα κύτταρα του μυελού των οστών από την κυκλοφορία στο γαστρικό βλεννογόνο, τα οποία συμβάλλουν και αυτά στην ογκογένεση [22].

1.2.3. Θεραπεία

Η θεραπεία του καρκίνου γενικότερα προσαρμόζεται στον ασθενή καθώς εξαρτάται από το μέγεθος ,την τοποθεσία ,την έκταση του όγκου , το στάδιο της ασθένειας και την γενικότερη κατάσταση της υγείας του ασθενή. Ο καρκίνος του στομάχου όπως προαναφέραμε ,έχει μεγάλο ποσοστό θνησιμότητας, κάτι που οφείλεται στη διάγνωση σε προχωρημένο στάδιο λόγω των ελάχιστων συμπτωμάτων. Οι συνήθεις θεραπείες λοιπόν περιλαμβάνουν χειρουργική επέμβαση, χημειοθεραπεία, και / ή ακτινοθεραπεία.

Η χειρουργική επέμβαση είναι η πιο συχνή επιλογή, κατά την οποία αφαιρείται μέρος ή το σύνολο του στομάχου ,καθώς και τους γύρω λεμφαδένες. Βέβαια ανάλογα με την έκταση του όγκου, μπορεί να αφαιρεθεί και μέρος του εντέρου ή του παγκρέατος. Για τον πρωτογενή καρκίνο του στομάχου, όγκων που περιλαμβάνουν μόνο το βλεννογόνο, μπορεί να γίνει ενδοσκοπική χειρουργική εκτομή του βλεννογόνου (EMR), δηλαδή αφαίρεση μόνο της εσωτερικής επένδυσης του στομάχου.

Η χημειοθεραπεία περιλαμβάνει ένα κοκτέιλ φαρμάκων, και στοχεύει περισσότερο στην ανακούφιση του πόνου και των συμπτωμάτων παρά στην θεραπεία, καθώς ο καρκίνος του στομάχου δεν έχει ιδιαίτερη ευαισθησία σε αυτά τα φάρμακα. Μερικά από τα φάρμακα που χρησιμοποιούνται είναι 5-FU (φθοριοουρακίλη) ή αναλογική καπεσιταμίνη της, BCNU (καρμουστίνη), μεθυλο-CCNU (Semustine), και δοξορουβικίνη (αδριαμυκίνη), καθώς και Μιτομυκίνη C, και πιο πρόσφατα cis-platin, σε διάφορους συνδυασμούς.

Η θεραπεία με ακτινοβολία περιλαμβάνει τη χρήση υψηλής ενέργειας ακτίνες για την καταστροφή των καρκινικών κυττάρων και να την αναχαίτιση της ανάπτυξής των. Μόνη της χρησιμοποιείται μόνο για ανακούφιση των συμπτωμάτων. Για πιο αποτελεσματική θεραπεία χρησιμοποιείται σε συνδυασμό είτε με χειρουργική επέμβαση, είτε με χημειοθεραπεία [23].

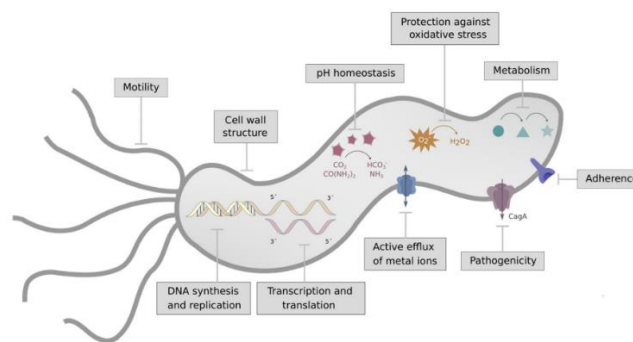
2. Ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού

2.1.Χαρακτηριστικά

Το ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού (*Helicobacter pylori*) είναι ένα Gram(-) αρνητικό βακτήριο, μικροαερόφιλο, με ελικοειδές σχήμα, και μήκος μόλις 3μm και διάμετρο 0,5μm, το οποίο εντοπίζεται στο στομάχι. Είναι ικανό να σχηματίσει βιοφίλμ[25]. Το ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού έχει 4 ως 6 λοφιοτρίχια, συμπολυμερισμένες φλαγγελίνες, τα οποία του προσδίδουν ιδιαίτερη κινητικότητα, και έτσι μπορεί να εισχωρήσει στη βλεννογόνο του στομάχου και έτσι καταφέρνει να επιβιώσει στο όξινο pH του στομάχου, φωλιάζοντας κοντά στο επιθήλιο.



Εικ.2.1 Απεικόνιση *H.pylori* [24]



Εικόνα 2.2 Δομή του *H.pylori* [30]

Εξωτερικά φέρει πέντε κύριες εξωτερικές πρωτεϊνικές οικογένειες. Η μεγαλύτερη αυτών περιλαμβάνει τα μόρια προσκόλλησης, ενώ οι υπόλοιπες περιλαμβάνουν πορίνες, μεταφορείς σιδήρου, πρωτεΐνες συνδεδεμένες με τα μαστίγια και άλλες άγνωστης λειτουργίας.



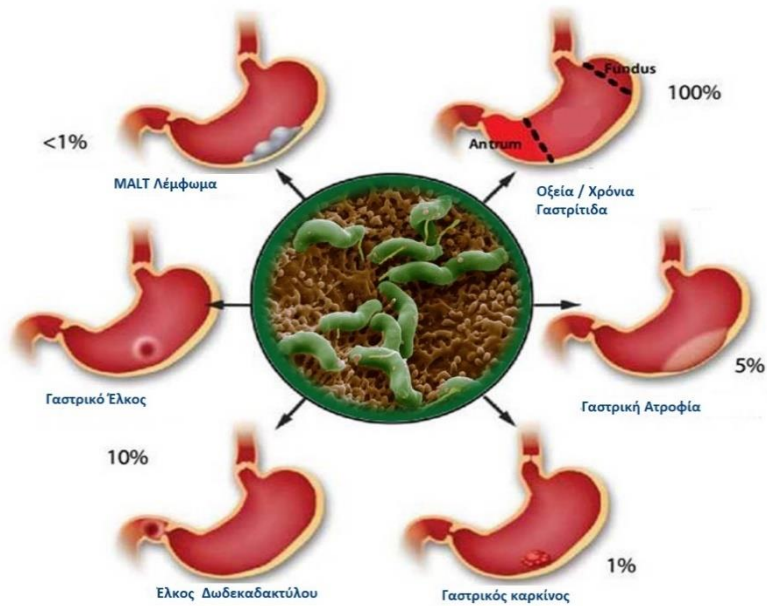
Εικ 2.3 Δομη ουρεάσης [31]

Βέβαια, στην επιβίωση του παίζει καθοριστικό ρόλο η ουρεάση, την οποία παράγει σε μεγάλες ποσότητες.[27]. Η ουρεάση διασπά την ουρία που εκκρίνεται φυσιολογικά στο στομάχι ,σε αμμωνία και διοξείδιο του άνθρακα. Έπειτα η αμμωνία δεχόμενη ένα πρωτόνιο ,μετατρέπεται σε αμμώνιο

,το οποίο εν τέλει είναι αυτό που ουδετεροποιεί το γαστρικό οξύ. Επιπρόσθετα μέσω μιας υδρογενάσης , οξειδώνει το μοριακό υδρογόνο που παράγουν τα εντερικά βακτήρια σαν παροχή ενέργειας [26].

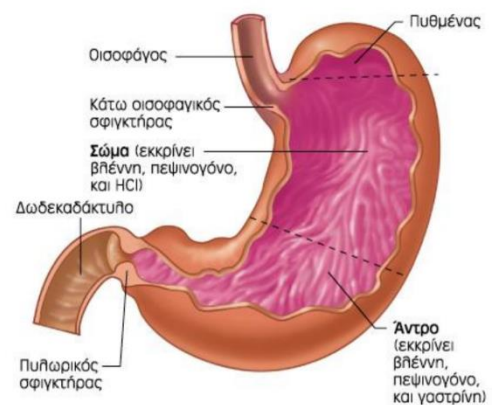
2.2.Ασθένειες

Ο αποικισμός του στομάχου από το ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού έχει ως αποτέλεσμα δημιουργία φλεγμονής στην εσωτερική επιφάνεια του στομάχου, γνωστή και ως χρόνια γαστρίτιδα. Η ένταση της φλεγμονής φαίνεται να αποτελεί τη βάση για άλλες ασθένειες. Ο τύπος του έλκους που θα αναπτυχθεί είναι αντίστοιχος με το σημείο εντόπισης της χρόνιας γαστρίτιδας, δηλαδή το σημείο στο οποίο αποικίζει το ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού. Η οξύτητα εντός του αυλού του στομάχου επηρεάζει τον αποικισμό του ελικοβακτηριδίου του πυλωρού και ουσιαστικά καθορίζει την εμφάνιση ενός δωδεκαδακτυλικού ή γαστρικού έλκους. Το έλκος του δωδεκαδακτύλου και του στομάχου προκύπτει ως συνέπεια της προαναφερθείσας φλεγμονής, αφού επιτρέπεται στο οξύ και την πεψίνη του αυλού του στομάχου να υπερνικήσουν τους προστατευτικούς μηχανισμούς της βλεννογόνου του στομάχου και του δωδεκαδακτύλου [29].



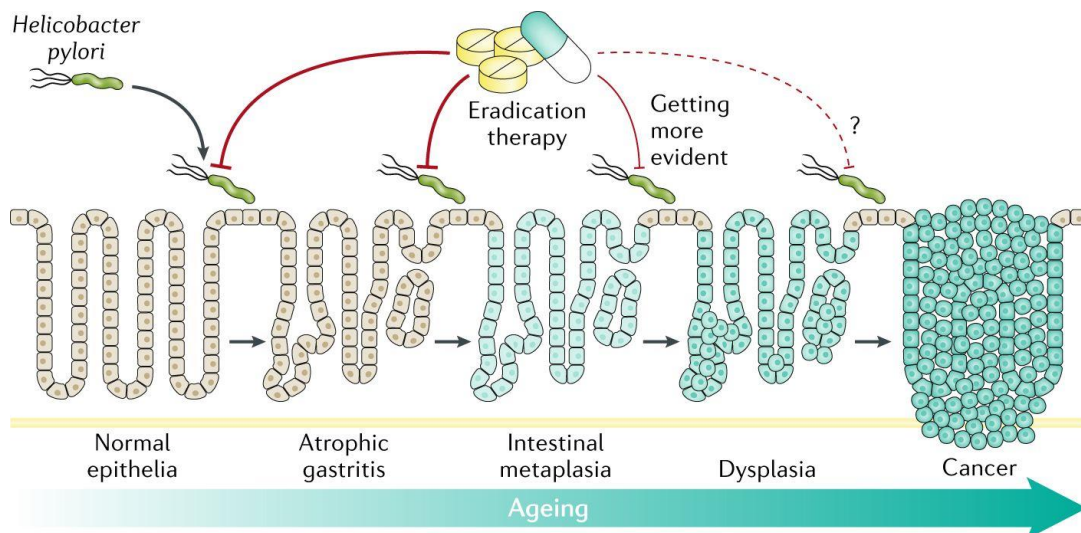
Εικόνα 2.4 Ασθένειες που προκαλεί το *H.pylori* [33]

Στα άτομα που παράγουν μεγάλες ποσότητες οξέος, το ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού αποικεί στο άντρο του στομάχου έτσι ώστε να αποφύγει τα κύτταρα του τοιχώματος που εκκρίνουν οξύ. Η φλεγμονώδης απόκριση που προκύπτει από τα βακτήρια, παρακινεί τα G κύτταρα του άντρου να εκκρίνουν την ορμόνη γαστρίνη η οποία ταξιδεύει μέσω της κυκλοφορίας του αίματος στο σώμα του στομάχου. Έπειτα η γαστρίνη διεγείρει τα τοιχωματικά κύτταρα, με αποτέλεσμα την έκκριση περισσότερου οξέος στον αυλό του στομάχου. Χρονίως αυξανόμενα επίπεδα γαστρίνης προκαλούν εν τέλει αύξηση των τοιχωματικών κυττάρων, κλιμακώνοντας την ποσότητα του εκκρινόμενου οξέος, το οποίο προκαλεί βλάβη στο δωδεκαδάκτυλο και ενδέχεται να ακολουθήσει και εξέλκωση.



Εικόνα 2.5 Επιμέρη σημεία του στομάχου

Τα γαστρικά έλκη σε αντίθεση με τα δωδεκαδακτυλικά συσχετίζονται με φυσιολογική ή μειωμένη έκκριση γαστρικού οξέος, γεγονός που υποδηλώνει ότι οι προστατευτικοί μηχανισμοί της βλεννογόνου του στομάχου είναι ελαττωματικοί. Σε αυτή την περίπτωση, το ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού αποικεί στο σώμα του στομάχου όπου εντοπίζονται τα τοιχωματικά κύτταρα. Η χρόνια φλεγμονή που προκαλείται από τα βακτήρια προκαλεί επιπλέον μείωση της παραγωγής του οξέος και εν τέλει στην ατροφία της εσωτερικής επιφάνειας του στομάχου, με αποτέλεσμα την εμφάνιση γαστρικού έλκους καθώς και την αύξηση της πιθανότητας εμφάνισης καρκίνου του στομάχου[29].



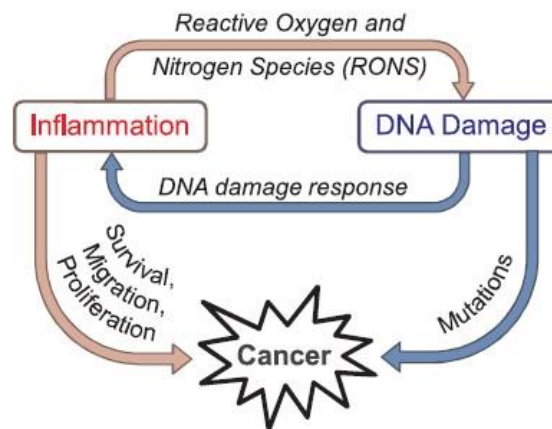
Εικόνα 2.6 Ανάπτυξη καρκίνου του στομάχου

Οι μηχανισμοί μέσω των οποίων το ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού θα μπορούσε να προκαλέσει καρκίνο είναι υπό διερεύνηση αλλά επικρατούν δυο. Ο πρώτος μηχανισμός περιλαμβάνει την αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών από το ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού και τον αυξημένο βαθμό μεταβολής των χαρακτηριστικών του κυττάρου ξενιστή. Ο δεύτερος μηχανισμός, γνωστός και ως περιγεννητικός δρόμος, περιλαμβάνει σημαίνει μετατροπή του φαινοτύπου το ξενιστή με τη βοήθεια μετατροπών σε κυτταρικές πρωτεΐνες όπως τις πρωτεΐνες προσκόλλησης. Το ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού έχει εισηγηθεί ότι επάγει τη φλεγμονή και

τοπικά αυξημένα επίπεδα TNF-a και/ή ιντερλευκίνης 6. Σύμφωνα με τον προτεινόμενο περιγεννητικό μηχανισμό μόρια σηματοδότησης σχετιζόμενα με τη φλεγμονή όπως ο TNF-a μπορούν να τροποποιήσουν την προσκόλληση στα επιθηλιακά κύτταρα του στομάχου και να οδηγήσει στη διασπορά και μετανάστευση μεταλλαγμένων επιθηλιακών κυττάρων χωρίς τη βοήθεια επιπλέον μεταλλάξεων σε ογκοκατασταλτικά γονίδια [29].

2.3.Χρόνια φλεγμονή και καρκίνος

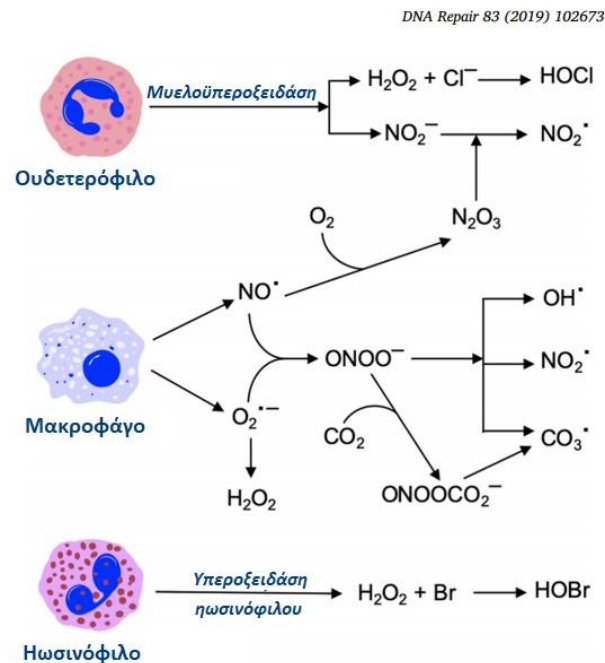
Η χρόνια φλεγμονή πολλές φορές είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη καρκίνου [34]. Το φλεγμονώδες περιβάλλον προωθεί τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την επιβίωση των κυττάρων [35], την υποβάθμιση και την αναδιαμόρφωση της εξωκυτταρικής μήτρας, καθώς και την αποδυνάμωση των αγγειακών φραγμών για να διευκολύνει τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος να προσέλθουν [36-37]. Επίσης οδηγεί τα κύτταρα σε απόπτωση, νέκρωση ή σε μεταλλάξεις, αποσταθεροποιώντας την ομοιότητα του ιστού[38].



Εικόνα 2.7 Διαγραμματική απεικόνιση της συσχέτισης φλεγμονής, βλαβών DNA και πως συμβάλλουν στη δημιουργία καρκίνου [42]

Οι περισσότερες βλάβες που προκαλούνται στο DNA κατά τη φλεγμονή, οφείλονται στα RONS (Reactive Oxygen and Nitrogen Species), δηλαδή στο οξειδωτικό οξυγόνο και Νιτρικό, τα οποία είναι ισχυρά μεταλλαξιογόνα. Τα RONS παράγονται κατά τη φλεγμονή απο τα ανοσοκύτταρα ,που παράγουν NO σε υψηλα επίπεδα καθώς και τα μακροφάγα που

παράγουν υπεροξείδιο (O_2^-) και διάφορα άλλα ένζυμα που συμβάλλουν σε χημικές αντιδράσεις που παράγουν RONS ($\cdot OH$, $NO_2\cdot$, $ONOO^-$, N_2O_3 , $HOCl$, $HOBr$ κλπ)[39-41].



Εικόνα 2.8 Παραγωγή RONS από ανοσοκύτταρα [43]

2.4.Θεραπεία

Η συνήθης θεραπεία είναι η τριπλή θεραπεία που αποτελείται από αναστολείς της αντλίας πρωτονίων (H_2 -αγωνιστές), όπως η ομεπραζόλη ή η λανσοπραζόλη, σε συνδυασμό με δύο αντιβιοτικά, τη κλαριθρομυκίνη και την αμοξικιλίνη, και έχει αποδειχθεί να θεραπεύει τα πεπτικά έλκη. Υπάρχουν διάφορες παραλλαγές της τριπλής θεραπείας, όπως η χρήση διαφορετικού αναστολέα της αντλίας πρωτονίων, όπως η παντοπραζόλη ή η ραμπεπραζόλη, ή η αντικατάσταση αμοξικιλίνης με μετρονιδαζόλη για τους ανθρώπους που είναι αλλεργικοί στην πενικιλίνη. Άλλα αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνται είναι η λεβοφλοξασίνη, η μετρονιδαζόλη, η τετρακυκλίνη, η ριφαβουτίνη και η σιπροφλοξασίνη.

Λόγω της ανθεκτικότητας που αποκτούν τα βακτήρια στα αντιβιοτικά, πολλές φορές η τριπλή θεραπεία αποτυγχάνει. Για την θεραπεία των ατόμων αυτών χρησιμοποιείται είτε πρόσθετος γύρος θεραπείας, είτε εναλλακτικές θεραπείες. Ένα τέτοιο παράδειγμα αποτελεί η τετραπλή θεραπεία, κατά την οποία προστίθεται ένα κολλοειδές βισμούθιο στην τριπλή θεραπεία, όπως το υποσαλικυλικό βισμούθιο [32].

Γίνονται πολλές μελέτες για την θεραπεία του καρκίνου του στομάχου μέσω εξάλειψης του ελικοβακτηριδίου του πυλωρού, εφόσον αποτελεί το κύριο αίτιο για την ανάπτυξη του καρκίνου αυτού.

3. Φάρμακο

Ως φάρμακο ορίζεται η χημική ουσία , η οποία όταν εισέλθει σε έναν οργανισμό έχει την ικανότητα να μεταβάλλει την λειτουργία του. Στόχος του είναι να ανακουφίσει ή να θεραπεύσει από κάποιο πόνο ή ασθένεια. Οι μεταβολές που μπορούν να προκληθούν από τα φάρμακα μελετώνται από τη φαρμακολογία , η οποία χωρίζεται σε τρεις κλάδους, τη φαρμακοδυναμική, τη φαρμακοκινητική και τη τοξικολογία.

- ❖ Η φαρμακοδυναμική ασχολείται με το μηχανισμό δράσης των φαρμάκων, καθώς και τις επιθυμητές ή μη ενέργειες που εμφανίζουν.
- ❖ Η φαρμακοκινητική ασχολείται με τη μετακίνηση του φαρμάκου μέσα στον οργανισμό, δηλαδή πως γίνεται η απορρόφηση , η κατανομή και το μεταβολισμό και την απέκκριση του φαρμάκου.
- ❖ Η τοξικολογία ασχολείται με την επιστήμη των δηλητηρίων ,καθώς και τις ουσίες που μπορούν να τα εξουδετερώσουν.

3.1.Αντιβιοτικά φάρμακα

Τα αντιβιοτικά είναι χημειοθεραπευτικά φάρμακα τα οποία θεραπεύουν ή προλαμβάνουν λοιμώξεις κυρίως από βακτήρια, αλλά και από μύκητες ή παράσιτα. Ενώ αρχικά ο όρος αναφερόταν σε ουσίες που προέρχονταν αποκλειστικά από μικροοργανισμούς, πλέον περιλαμβάνει πλήθος συνθετικών ή ημισυνθετικών φαρμάκων. Η δράση τους βασίζεται είτε στην ικανότητα τους να σκοτώνουν βακτήρια (βακτηριολυτικά) είτε στην αναστολή του πολλαπλασιασμού τους (βακτηριοστατικά), και ανάλογα με την εστίαση της δράσης χωρίζονται σε ευρέος και στενού φάσματος.

Η σύγχρονη μελέτη των αντιβιοτικών ξεκίνησε το 1909 , με την ανάπτυξη της σαλβαρσάνης από τον Paul Ehrlich και συνεχίστηκε με την ανακάλυψη της δράσης της πενικιλίνης έναντι του Staphylococcus aureus το 1928 από τον Alexander Fleming. Παρόλο που έχουν απομονωθεί πάνω από 4000 αντιβιοτικά και έχουν παρασκευασθεί 30.000 ημισυνθετικά, χρησιμοποιούνται περίπου 100.

3.2.Κατηγορίες Αντιβιοτικών

Τα αντιβιοτικά ταξινομούνται σε κατηγορίες ανάλογα με:

- Τη χημική δομή τους
- Το τρόπο δράσης και το βιοχημικό μονοπάτι στο οποίο παρεμβαίνει
- Το μικροοργανισμό που έχει ως στόχο καθώς και το φάσμα δράσης

3.3.Μηχανισμός δράσης

- ❖ Αναστολή της σύνθεσης του κυτταρικού τοιχώματος

Το κυτταρικό τοίχωμα των βακτηρίων κατά κύριο λόγο αποτελείται από πεπτιδογλυκάνες. Η αναστολή της σύνθεσης αυτών ,έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό ενός κυτταρικού τοιχώματος χαμηλής αντοχής , το οποίο θα οδηγήσει το κύτταρο σε λύση. Με αυτού του είδους τον μηχανισμό δρούν αντιμικροβιακές ανώσεις όπως η πενικιλίνη.

- ❖ Αναστολή της πρωτεϊνοσύνθεσης

Μέσω της πρωτεϊνοσύνθεσης το κύτταρο εξασφαλίζει τις πρωτεΐνες που είναι απαραίτητες για την επιβίωσή του ,καθώς και άλλες σημαντικές λειτουργίες. Αυτή η πολύ

σημαντική διεργασία λαμβάνει χώρα στα ριβοσώματα ,τα οποία συντιθενται από μόρια rRNA και βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων. Τα ριβοσώματα των ευκαρυωτικών κυττάρων διαφέρουν σημαντικά από αυτά των προκαρυωτικών κυττάρων. Συγκεκριμένα , τα ευκαρυωτικά κύτταρα διαθέτουν ριβοσώματα 80S, ενώ τα προκαρυωτικά ριβοσώματα 70S (Svedberg, περιγράφει την ταχύτητα καθίζησης υπό φυγοκέντρωση υψηλών στροφών). Σ αυτή τη διαφορά βασίζεται η δράση του αντιβιοτικού.

❖ Βλάβες στην κυτταροπλασματική μεμβράνη

Ένα αντιβιοτικό μπορεί να δράσει αυξάνοντας τη διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης που θα έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια σημαντικών για το κύτταρο μεταβολιτών .Όσο αυξάνεται η διαπερατότητα, τόσο μεγαλύτερη και η απώλεια με τελικό αποτέλεσμα τη λύση του κυττάρου.

❖ Αναστολή της σύνθεσης των νουκλεϊκών οξέων

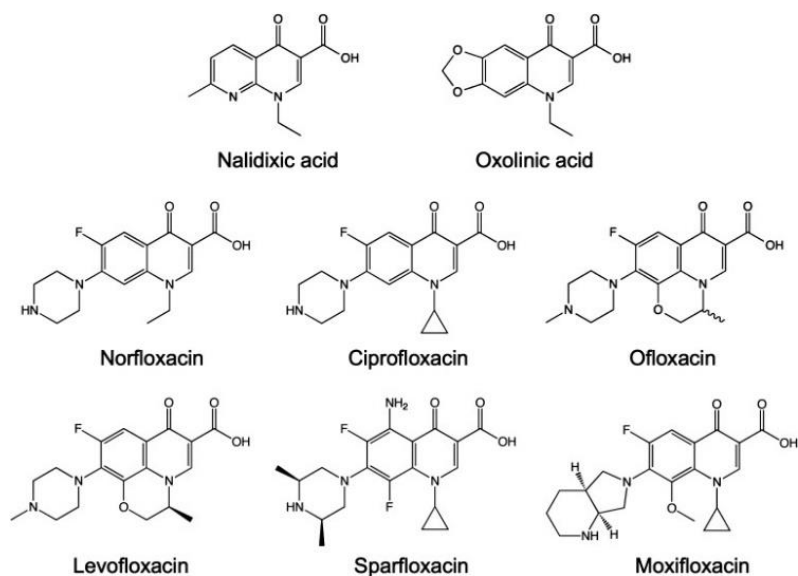
Η αναστολή της σύνθεσης του DNA γίνεται παρεμποδίζοντας τη διαδικασία αντιγραφής και μεταγραφής των νουκλεϊκών οξέων. Στα αντιβιοτικά με που δρουν με τέτοιο μηχανισμό ανήκουν οι κινολόνες ,όπως η σιπροφλοξασίνη, ειτουργεί αναστέλλοντας την τοποϊσομεράση τύπου II (γυράση DNA) και την τοποϊσομεράση IV, απαραίτητη για τον διαχωρισμό του βακτηριακού DNA, αναστέλλοντας έτσι την κυτταρική διαίρεση.

❖ Αναστολή της σύνθεσης απαραίτητων μεταβολιτών

Για τη σύνθεση πουρινών και πυριμιδινών (αζωτούχων βάσεων των νουκλεϊκών οξέων) είναι απαραίτητο το παρα-αμινο-βενζοϊκο οξύ (PABA) .Σε πολλούς μικροοργανισμούς

αποτελεί υπόστρωμα για τη σύνθεση του φυλλικού οξέος, το οποίο δρα ως συνένζυμο για τη σύνθεση των αζωτούχων βάσεων του DNA και του RNA . Το αντιβιοτικό σουλφαναμίδη δεσμεύει το ένζυμο που καταλύει την αντίδραση μετατροπής του PABA σε φυλλικό οξύ και κατ' επέκταση εμποδίζει την ανάπτυξη του μικροοργανισμού. [44]

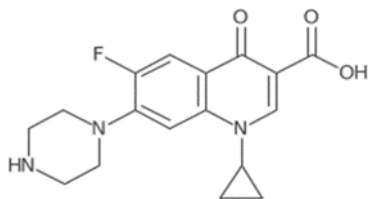
3.4.Κινολόνες



Εικόνα 3.1 Δομές διάφορων κινολονών [45]

Οι κινολόνες είναι μια ομάδα αντιβιοτικών, χημικώς συγγενικά μεταξύ τους, και είναι αναστολείς της γυράσης. Το όνομα τους προκύπτει από την κινολίνη, η οποία περιέχει μια καρβονυλική και μια καρβοξυλική ομάδα στο σύστημα αζωτούχου δακτυλίου. Όταν στον βενζοϊκό δακτύλιο περιέχεται ένα άτομο φθορίου, ονομάζονται φθοριοκινολόνες. Στην κατηγορία των κινολονών ανήκουν η σιπροφλοξασίνη, λεβοφλοξασίνη, ιβαδλοξακίνη, ναδιφλοξακίνη και πολλές άλλες.

3.4.1. Σιπροφλοξασίνη



Εικόνα 3.2 Δομή σιπροφλοξασίνης [46]

Η σιπροφλοξασίνη (ciprofloxacin) ανήκει στις κινολόνες, οι οποίες ανήκουν στα αντιβιοτικά ευρέως φάσματος. Χρησιμοποιείται για τη θεραπεία βακτηριακών λοιμώξεων και πιο συγκεκριμένα λοιμώξεις οστών, αρθρώσεων και του ουροποιητικού, ενδοκοιλιακές, αναπνευστικές, δερματικές, λοιμώξεις καθώς και τυφοειδή πυρετό. Έχει μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα έναντι κατά Gram(-) αρνητικών βακτηρίων (όπως *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, *Moraxella catarrhalis*, *Proteus mirabilis* και *Pseudomonas aeruginosa*) και λιγότερο έναντι κατά Gram(+) θετικών βακτηρίων (όπως *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* και *Enterococcus faecalis*). Οι αναερόβιοι μικροοργανισμοί είναι λιγότερο ευαίσθητοι.

❖ Μηχανισμός δράσης

Ως αντιβακτηριακός παράγοντας της οικογένειας των φθοροκινολονών, η βακτηριοκτόνος δράση της σιπροφλοξασίνης προκύπτει από την αναστολή τόσο της τοποϊσομεράσης τύπου II (DNA-γυράση) όσο και της τοποϊσομεράσης IV, που απαιτούνται για την αντιγραφή, μεταγραφή, επιδιόρθωση και ανασυνδυασμό του βακτηριακού DNA.

❖ Φαρμακοδυναμική

Η σιπροφλοξασίνη, μια φθοροκινολόνη, είναι διαθέσιμη με τη μορφή μονοϋδροχλωρικού μονοένυδρου άλατος του 1-κυκλοπρστυλ-6 φθορο-1,4-διυδρο-4-οξο-7-(1-

πιπεραζινυλο) 3-κινολονοκαρβοξυλικού οξέος. Είναι ασθενώς κιτρινωπή έως κίτρινη κρυσταλλική σκόνη μοριακού βάρους 385,8. Ο εμπειρικός της τύπος είναι $C_{17}H_{18}FN_3O_3HClH_2O$.

Η σιπροφλοξασίνη έχει γρήγορη μικροβιακή δράση, ακόμη και κατά τη φάση ηρεμίας των μικροβίων (resting phase). Για την αναπαραγωγή του βακτηρίου, τα χρωμοσώματα "διπλώνουν" και "ξεδιπλώνουν". Το ένζυμο DNA γήρανση παίζει καθοριστικό ρόλο στη διαδικασία αυτή. Η σιπροφλοξασίνη αναστέλλει τη δράση αυτού του ενζύμου, και έχει ως αποτέλεσμα να σταματά τον βακτηριακό μεταβολισμό, εφόσον οι ζωτικές πληροφορίες δεν είναι δυνατόν να αναγνωσθούν από τα χρωμοσώματα του βακτηρίου. Χάρη στον ειδικό τρόπο δράσης, η σιπροφλοξασίνη δεν υπόκειται σε διασταυρούμενη αντοχή με άλλα μικροβιοκτόνα με σημαντικές ζημικές διαφορές όπως β-λακτάμες, αμινογλυκοσίδες, τετρακυκλίνες, μακρολίδια ή πεπτιδικά αντιβιοτικά, σουλφοναμύδια, τριμεθοπρίμη ή παράγωγα νιτροφουρανίου.

Παρόλο που με άλλους αναστολείς της γυράσης παρατηρείται διασταυρούμενη αντίσταση, λόγω της υψηλής πρωτογενούς ευαισθησίας που εμφανίζουν οι περισσότεροι μικροοργανισμοί περιορίζεται αρκετά. Αυτό τη καθιστά αποτελεσματική έναντι μικροοργανισμών που έχουν αναπτύξει αντίσταση σε άλλους αναστολείς της γυράσης. Τέλος μπορεί να συνδυαστεί και με άλλα αντιβιοτικά φάρμακα, καθώς μελέτες έδειξαν πως δρουν αθροιστικά σε συνδυασμό με β-λακτάμες και αμινογλυκοσίδες.

❖ Παρενέργειες

Η σιπροφλοξασίνη εμφανίζει παρενέργειες που αφορούν τους τένοντες, τους μύες, τις αρθρώσεις και το κεντρικό νευρικό σύστημα. Κλινικές μελέτες περιγράφουν τα συμπτώματα ως ήπια και πως μειώνονται αμέσως μετά τη διακοπή της θεραπείας.

3.5. Τροποποιημένα φάρμακα

Η τροποποίηση φαρμάκων είναι μια μέθοδος που μπορεί να βοηθήσει τη συμβατική διαδικασία ανακάλυψης φαρμάκων χρησιμοποιώντας υπάρχοντα φάρμακα για τη θεραπεία μιας ασθένειας παρά την αρχική της ένδειξη. Τα τελευταία χρόνια η ανάγκη για την εύρεση νέων αντιβιοτικών είναι αυξημένη, καθώς έχει αναπτυχθεί ανθεκτικότητα έναντι των υπάρχοντων αντιβιοτικών. Το κόστος όμως είναι ιδιαίτερα υψηλό και έτσι οι ερευνητές ψάχνουν νέες θεραπευτικές εφαρμογές για τα ήδη υπάρχοντα φάρμακα, δημιουργώντας τα τροποποιημένα φάρμακα [47].

Αυτό περιλαμβάνει την ανακατεύθυνση και ανακύκλωση των φαρμάκων για τα οποία είναι ήδη γνωστά η φαρμακοκινητική, η τοξικότητα, οι κλινικές μελέτες και ο τρόπος δράσης. Την τελευταία δεκαετία, η τροποποίηση φαρμάκων έχει μεγάλη εφαρμογή όχι μόνο σε ακαδημαϊκές μελέτες αλλά και στη φαρμακευτική βιομηχανία [48-49].

3.5.1. Πλεονεκτήματα

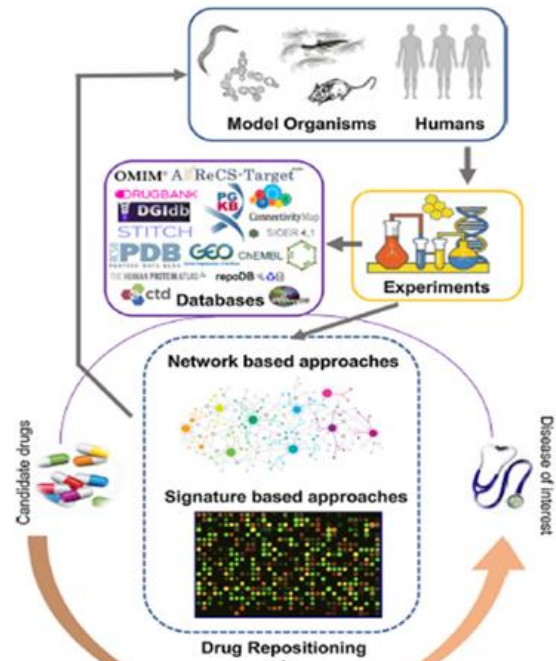
Πολλές από αυτές τις μελέτες χρησιμοποιούν *in silico* μελέτες για τα υποθετικά αποτελέσματα για την εφαρμογή του τροποποιημένου φαρμάκου σε διάφορα βιολογικά επίπεδα[50].

Κατά τη χημειοθεραπεία οι ασθενείς παρουσιάζουν πολλές παρενέργειες που μειώνουν σημαντικά τη ποιότητα ζωής τους. Μέσω της τροποποίησης φαρμάκων μπορούμε να αξιοποιήσουμε φάρμακα που αρχικά δεν προορίζονταν για χρήση έναντι καρκίνου, τα οποία έχουν λίγες και ανεκτές παρενέργειες [51]. Για παράδειγμα, οι αναστολείς αντλίας πρωτονίων (PPIs) είναι μια κατηγορία φαρμάκων που μειώνουν τα οξέα του στομάχου με στόχο τη μείωση των συμπτωμάτων σε ασθενείς που έχουν καούρα, έλκη και παλινδρόμηση οξέος [52] και

χρησιμοποιούνται μαζί με μια ποικιλία χημικοθεραπευτικών φαρμάκων, έναντι αρκετών καρκίνων, συμπεριλαμβανομένου και του στομάχου [53].

3.5.2. Στάδια

- a. Μελέτη βιολογικού συστήματος
- b. Μελέτη μεθοδολογίας
- c. Τροποποίηση φαρμάκου
- d. In silico, in vitro, ex vivo και εν τέλει in vivo δοκιμή [54]



Εικόνα 3.3 Στάδια τροποποίησης φαρμάκων [54].

4. Αντιμόνιο

4.1.Γενικά

Το αντιμόνιο είναι ένα σπουδαίο χημικό στοιχείο , το οποίο συμβολίζεται Sb (από το λατινικό stibium), έχει ατομικό αριθμό 51, ατομικό βάρος 121,76u και ανήκει στην ομάδα του αζώτου. Είναι ένα στιλπνό γκριζο μεταλλοειδές, το οποίο συναντάται στη φύση κυρίως με τη μορφή του αντιμονίτη (Sb_2S_3) αλλά και σε πολλά άλλα ορυκτά. Συμπεριφέρεται τόσο ως μέταλλο, όσο και ως αμέταλλο (μεταλλοειδές) και εμφανίζεται με πολλές αλλοτροπικές μορφές. [57].



(α)



(β)

Εικόνα 4.1 Το αντιμόνιο σε καθαρή μορφή (α) και σε ορυκτό (β) [55]

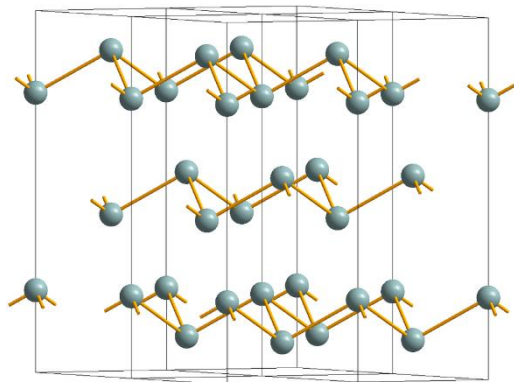
4.2.Χαρακτηριστικά

❖ Ιδιότητες

Το αντιμόνιο ανήκει στην ομάδα του αζώτου και έχει ηλεκτραρνητικότητα 2,05 , είναι δηλαδή πιο ηλεκτραρνητικό από τον κασσιτερο και το βισμούθιο. Σε θερμοκρασία δωματίου είναι σταθερό ,αλλα όταν θερμαίνεται αντιδρά με το οξυγόνο δημιουργώντας τριοξείδιο του

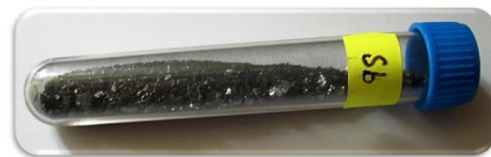
αντιμονίου (Sb_2O_3). Είναι πολύ μαλακό για να δημιουργήσει σκληρά αντικείμενα καθώς στην κλίμακα Mohs έχει σκληρότητα ίση με 3.

Υπάρχουν τέσσερις αλλοτροπικές μορφές του αντιμονίου, μια σταθερή μεταλλική μορφή και τρεις μετασταθερές μορφές (εκρηκτική, μαύρη και κίτρινη). Το μεταλλικό αντιμόνιο είναι γυαλιστερό, αργυρόλευκο και εύθραστο. Με αργή ψύξη το λιωμένο αντιμόνιο σχηματίζει μια



(α)

τριγωνική μορφή, η οποία είναι ισομορφική με την γκρίζα αλλοτροπική μορφή του αρσενικού.



(β)

Εικόνα 4.2 Η κρυσταλλική δομή κοινή στο αντιμόνιο και το γκρι αρσενικό (α)

Φιάλη με το μαύρο αλλότροπο του αντιμονίου (β)

Η σπάνια εκρηκτική μορφή του αντιμονίου σχηματίζεται μέσω ηλεκτρόλυσης του τριχλωρίδιου του αντιμονίου, και αν ξυστεί με αιχμηρό αντικείμενο παράγεται λευκός καπνός καθώς σχηματίζεται μεταλλικό αντιμόνιο, ενώ αν τριφτεί προκαλείται ισχυρή έκρηξη. Με την απότομη ψύξη των ατμών που προκαλούνται από το μεταλλικό αντιμόνιο σχηματίζεται το μαύρο αντιμόνιο, το οποίο έχει την ίδια κρυσταλλική δομή με τον κόκκινο φωσφορο και το μαύρο αρσενικό, οξειδώνεται στον αέρα και αναφλέγεται στιγμιαία. Στους 100°C παίρνει τη πιο σταθερή του μορφή, Τέλος, η κίτρινη αλλοτροπική μορφή είναι η ασταθέστερη. Παράγεται με την οξείδωση του αντιμονίτη στους -90°C , αλλά πάνω από αυτή τη θερμοκρασία μετατρέπεται στη σταθερότερη μαύρη μορφή.

Το μεταλικό αντιμόνιο έχει δομή στρωμάτων , όπου τα στρώματα αποτελούνται από δακτυλίους 6 μερών. Ο κοντινότερος και ο αμέσως κοντινότερος γείτονας σχηματίζουν ένα ακανόνιστο οκτάεδρο σύμπλεγμα, με τα τρία άτομα στο ίδιο διπλό στρώμα να είναι σχετικά πιο κοντά από τα τρία άτομα στο επόμενο. Αυτό προκαλεί την υψηλή πυκνότητα του (6.69 g/cm^3) αλλά λόγω οι αδύναμοι δεσμοί μεταξύ των στρωμάτων το καθιστούν μαλακό και αρκετά εύθραστο [58].

❖ Ισότοπα

Το αντιμόνιο έχει δυο σταθερά ισότοπα , το ^{121}Sb (57,36 %) και το ^{123}Sb (42,64%) , και 35 ραδιοϊσότοπα, από τα οποία μεγαλύτερη ζωή έχει το ^{125}Sb με ημιζωή σχεδόν 3 χρόνια. Ακόμη έχουν εντοπιστεί 29 μετασταθερές καταστάσεις , με σταθερότερη το $^{120\text{m}1}\text{Sb}$ με χρόνο ημιζωής 5 μέρες. Διάφορα άλλα ισότοπα ελαφρύτερα από το σταθερό ^{123}Sb , τείνουν να αποσυντίθενται μέσω της β^+ αποσύνθεσης, και αυτά που είναι βαρύτερα τείνουν να αποσυντίθενται μέσω της β^- αποσύνθεσης, με μερικές εξαιρέσεις.

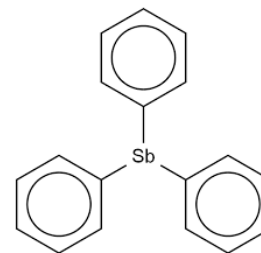
❖ Ενώσεις

Οι ενώσεις του αντιμονίου κατατάσσονται βάση της οξειδωτικής του κατάστασης Sb(III) και Sb(V) και χωρίζονται στις εξής κατηγορίες:

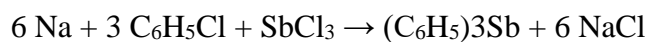
- Οξείδια και υδροξείδια
- Αλογονίδια
- Αντιμονίδια, υδρίδια και οργαναντιμονικές ενώσεις

4.3. Τριφαίνυλο Αντιμόνιο (tpSb)

Το τριφαίνυλο αντιμόνιο (triphenylstibine) είναι μια χημική ένωση με τύπο $\text{Sb}(\text{C}_6\text{H}_5)_3$ ή πιο σύντομα SbPh_3 . Είναι ένα άχρωμο στερεό, πυριμιδικό με διάταξη που μοιάζει με έλικα και θεωρείται πρωτότυπη οργανοαντιμονική ένωση [59]. Το μοριακό του βάρος είναι 353,07g/mol.



Πρώτη φορά αναφέρεται το 1886 να προκύπτει από την εξής αντίδραση του SbCl_3 :



5. Μικροβιολογία – Μικρόβια

5.1.Γενικά

Η μικροβιολογία αποτελεί κλάδο της Βιολογίας, που μελετά τους έμβιους μικροοργανισμούς καθώς και με ποιον τρόπο αναπτύσσονται και λειτουργούν. Οι μικροοργανισμοί, μπορεί να είναι είτε μονοκύτταροι είτε μικροσκοπικοί πολυκύτταροι οργανισμοί. Τα κύτταρα είναι είτε ευκαρυωτικά ,όπως οι μύκητες ,ή προκαρυωτικά όπως τα βακτήρια και τα αρχαιοβακτήρια . Οι ιοί αποτελούν επίσης αντικείμενο της μικροβιολογίας [55].

Τα βακτήρια αποτελούν μία μεγάλη ομάδα κυττάρων, τα οποία παρουσιάζουν μεγάλο ενδιαφέρον καθώς έχουν πολύ μεγάλη σημασία όχι μόνο πρακτικά αλλά και θεωρητικά. ο κύριος σκοπός της είναι η μελέτη του έργου των μικροβίων στο περιβάλλον, στους ανθρώπους , τους ζωντανούς οργανισμούς, στα ζώα και τα φυτά [55].

Ο κλάδος αναπτύχθηκε περίπου στα μέσα του δέκατου ένατου αιώνα και μέχρι σήμερα έχει ραγδαία ανάπτυξη. Μαζί με την μελέτη των μικροοργανισμών προέκυψαν και ερωτήματα σχετικά με την προέλευσή τους καθώς και με τις επιπτώσεις που μπορεί να έχουν στην ανθρώπινη υγεία. Ο Pauster ήταν που εστίασε στο πρώτο ερώτημα , και το κατέρριψε διαπιστώνοντας πως μικροοργανισμοί υπάρχουν ακόμη και στον ατμοσφαιρικό αέρα και εναποτίθενται σε διάφορα αντικείμενα, και δεν προέρχονται από αυθόρμητη γέννηση. Έπειτα , ο Koch ήταν εκείνος που κατάφερε να αποδείξει με πολυπληθή πειράματα πώς τα βακτήρια είναι υπεύθυνα για τις μολυσματικές ασθένειες. Το αξίωμα του Koch, όπως ονομάστηκε, αποτελείται από τα εξής κριτήρια:

- Ο μικροοργανισμός πρέπει να εντοπίζεται σε οργανισμούς που φέρουν την νόσο , όχι όμως στους υγιείς.

- Ο μικροοργανισμός να μπορεί να καλλιεργηθεί σε αμιγή καλλιέργεια Εκτός του έμβιου οργανισμού.
- Ο μικροοργανισμός Αφού καλλιεργηθεί σε καλλιέργεια και προσβάλλει έναν υγιή οργανισμό θα πρέπει να προκαλεί τα ίδια συμπτώματα.
- Ο μικροοργανισμός να μπορεί να απομονωθεί εκ νέου από τον ασθενή οργανισμό και να επαναληφθεί η προαναφερθείσα διαδικασία.

Είναι πλέον γνωστό πως στη φύση εμφανίζονται μικροοργανισμοί οι οποίοι δεν είναι απαραίτητα επιβλαβής για την ανθρώπινη υγεία. Οι μικροοργανισμοί συμβάλλουν σημαντικά στην εξέλιξη της ζωής καθώς η ύπαρξη του οξυγόνου στην ατμόσφαιρα οφείλεται στην μικροβιακή δραστηριότητα [55].

5.2. Προκαρυωτικά κύτταρα

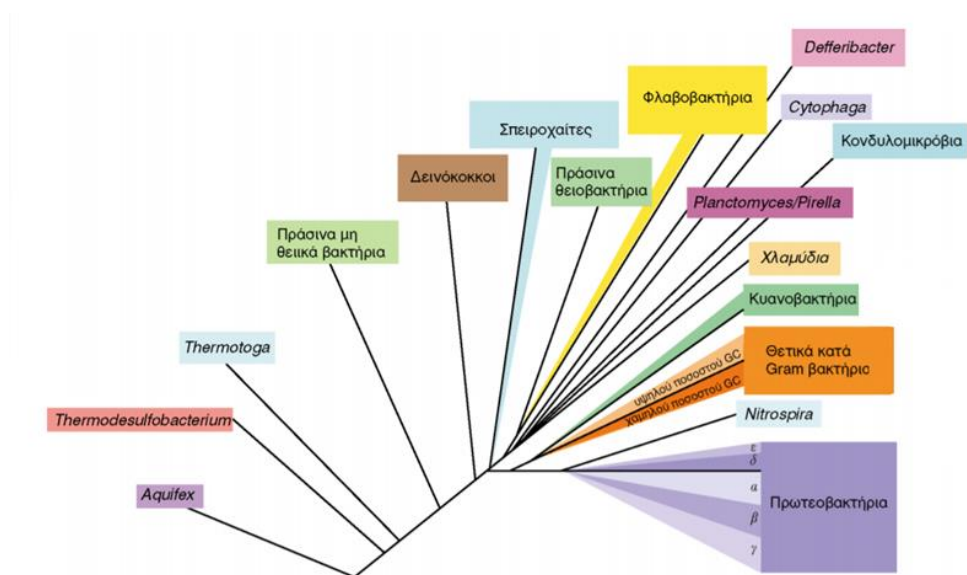
Με τον όρο προκαρυωτικά χαρακτηρίζονται τα κύτταρα που δεν έχουν σχηματισμένο πυρήνα, σε αντίθεση με τα ευκαρυωτικά. Η δομή των προκαρυωτικών κυττάρων είναι σαφώς απλούστερη και έχουν μικρότερο μέγεθος. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν ως επί το πλείστον μονοκύτταροι οργανισμοί, οι οποίοι κατηγοριοποιούνται σε δυο μεγάλες ομάδες τα Βακτήρια και τα Αρχαία [60].

Στα Αρχαία ανήκουν μονοκύτταροι προκαρυωτικοί οργανισμοί, οι οποίοι παρουσιάζουν μεγάλες διαφορές στο σχήμα και σε διάφορες άλλες ιδιότητες της έμβιας ύλης. Πολλά είδη που ανήκουν στη κατηγορία των Αρχαίων, τα ακραιόφιλα, έχουν την ικανότητα να επιβιώνουν και να αναπτύσσονται σε ακραίες συνθήκες, όπως απουσία οξυγόνου, αυξημένες θερμοκρασίες και ακραίες τιμές pH.

Στα βακτήρια ανήκουν πολλά είδη μικροοργανισμών ,παθογόνων ή μη, με μεγάλη ποικιλία στη μορφολογία, και στην αλληλεπίδραση με το περιβάλλον [61].

5.3.Βακτήρια

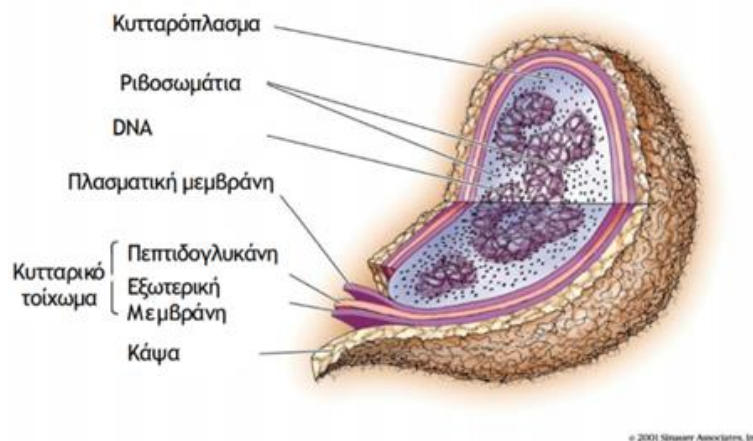
Τα βακτήρια είναι μικροσκοπικοί ,προκαρυωτικοί ,μονοκύτταροι οργανισμοί τα οποία συναντώνται σε διάφορους βιότοπους σε πολύ μεγάλους αριθμούς. Αυτοί οι οργανισμοί μπορούν να ζουν στο έδαφος, στον ωκεανό και στο ανθρώπινο έντερο. Η σχέση των ανθρώπων με τα βακτήρια είναι πολύπλοκη. Μερικές φορές τα βακτήρια μας δίνουν ένα χέρι βοήθειας, όπως για παράδειγμα το γάλα σε γιαούρτι ή τη βοήθεια με την πέψη μας. Σε άλλες περιπτώσεις, τα βακτήρια είναι καταστρεπτικά, προκαλώντας ασθένειες όπως η πνευμονία. Τη μορφολογία καθώς και τη δράση τους τα μελετά η Βακτηριολογία.



Εικόνα 5.1 Κατηγορίες βακτηρίων

Τα βακτήρια έχουν πολύ μικρό μέγεθος και συνήθως μετριοούνται σε μικρόμετρα (μm) και είναι ορατά με μικροσκόπιο. Μπορούν να εντοπιστούν σε οποιοδήποτε περιβάλλον, όπως σε πάγους ή σε ερήμους. τα περισσότερα από αυτά χαρακτηρίζονται ενεργά σε θερμοκρασία

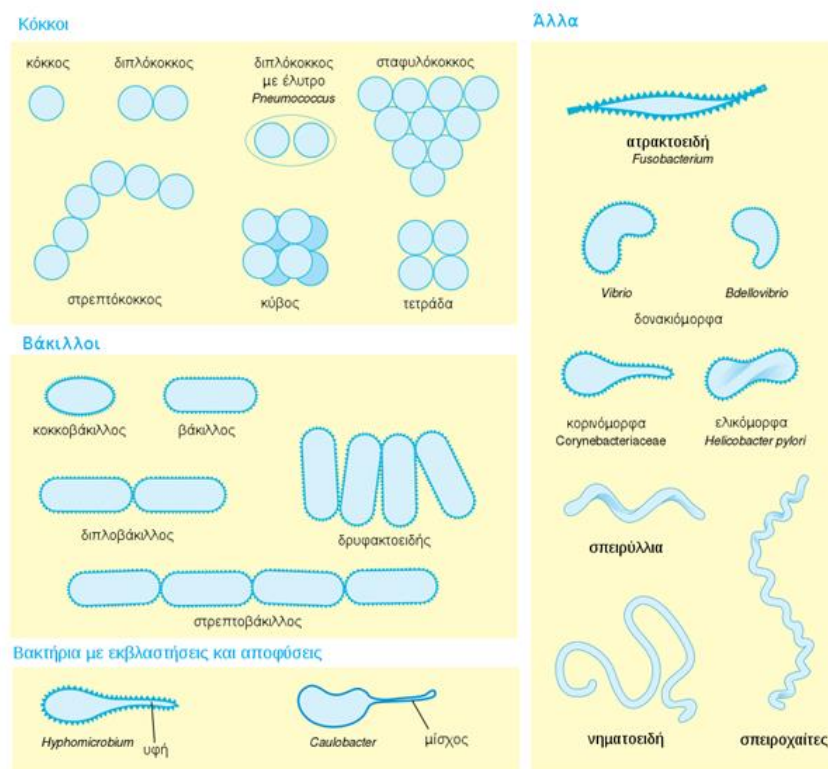
περιβάλλοντος μεγαλύτερη των 5 °C ,με εξαίρεση μερικά είδη θαλάσσιων η εδαφικών ,που παραμένουν ενεργά στους μηδέν ή και χαμηλότερους βαθμούς. Τα βακτήρια, γενικά, εμφανίζουν αξιοσημείωτο εύρος ιδανικής θερμοκρασίας ανάπτυξης, ανάλογα με το φύλο τους. Το γένος Aquifex), για παράδειγμα, εμφανίζει άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης τους 85 °C, ενώ μπορεί να αναπτυχθεί μέχρι και τους 95 °C. Σε ακραίες θερμοκρασίες ή υπό την επίδραση ακτινοβολιών και άλλων ιδιαίτερα βλαβερών περιβαλλοντικών παραγόντων ορισμένα γένη βακτηρίων σχηματίζουν ανθεκτικές, μη αναπαραγωγικές δομές, τα ενδοσπόρια [62].



Εικόνα 5.2 Δομή βακτηρίου

Η κυτταρική δομή των βακτηρίων είναι πολύ απλή . έχουν κυτταρική μεμβράνη η οποία αποτελείται από ημικυτταρινες ή πηκτινοειδείς ουσίες, μέσα στην οποία Δεν υφίσταται κυτταρικός πυρήνας καθώς και σύνθετα οργανίδια. Το DNA τους οργανώνεται χωρίς πυρηνική μεμβράνη και πολλά βακτήρια περιέχουν επιπλέον πλασμίδια δηλαδή μικρά κυκλικά αυτόνομα μόρια DNA, τα οποία έχουν την ικανότητα να μεταφέρονται από ένα βακτήριο στο άλλο ,με αποτέλεσμα να προσθέτουν νέες ιδιότητες. τα βακτήρια διαθέτουν ριβοσώματα τα οποία είναι τα κέντρα της πρωτεϊνοσύνθεσης. Τα βακτηριακά κύτταρα περιβάλλονται γενικά από δύο προστατευτικά καλύμματα ένα εξωτερικό κυτταρικό τοίχωμα και μια εσωτερική κυτταρική μεμβράνη. Ορισμένα βακτήρια, όπως είναι τα μυκοπλάσματα, δεν έχουν καθόλου κυτταρικό

τοίχωμα. Μερικά βακτήρια μπορεί ακόμη να έχουν ένα τρίτο εξωτερικό προστατευτικό στρώμα που ονομάζεται κάψουλα [63]. Η ταξινόμηση των βακτηρίων βασίζεται κατά κύριο λόγο στην χρήση της τεχνικής της χρώσης κατά Gram κατά την οποία χαρακτηρίζονται ως αρνητικά ή θετικά κατά Gram. Η χρώση κατά Gram είναι μία απλή μέθοδος κατά την οποία τα βακτήρια που διατηρούν το μπλε ιώδες χρώμα της χρώσης χαρακτηρίζονται ως θετικά ενώ εκείνα που λαμβάνουν Ερυθρό χρώμα ως αρνητικά [64].



Εικόνα 5.3 Κατηγορίες βακτηρίων [65]

Τα βακτήρια εμφανίζονται σε διάφορα σχήματα και ονοματίζονται ανάλογα:

- Σφαιρικό (χαρακτηρίζονται ως κόκκοι)
- Ραβδοειδές (χαρακτηρίζονται ως βάκιλλοι)
- Σπειροειδές (χαρακτηρίζονται ως σπειρούλλια)
- Καμπυλόγραμμες ράβδοι (χαρακτηρίζονται ως δονάκια).

Μερικά από αυτά είτε διακλαδίζονται είτε ενώνονται σχηματίζοντας ίνες. Πολλά βακτήρια δεν κινούνται καθόλου , ενώ άλλα φέρουν μαστίγια με τα οποία κινούνται ταχύτατα μέσα στο νερό. Η ποσότητα των μαστίγιων διαφέρει ανάλογα με τον μικροοργανισμό και ονομάζονται μόνοτρίχα όταν έχουν ένα μαστίγιο πολικά τοποθετημένο στο άκρο του βακτηρίου, περίτριχα όταν όλη η επιφάνεια τους καλύπτεται από μαστίγια, ή λοφότριχα όταν σχηματίζονται μαστίγια σε ένα μέρος της επιφάνειας.

Τα βακτήρια αναπαράγονται μέσω δυαδικής σχάσης. Σε αυτή τη διαδικασία το βακτηριακό κύτταρο που ονομάζεται θυγατρικό κύτταρο αντιγράφει το γενετικό του υλικό και εν συνεχεία διαχωρίζεται σε δυο νέα κύτταρα πανομοιότητα με το μητρικό κύτταρο. Ορισμένα βακτηριακά είδη, όπως τα κυανοβακτήρια και τα σταθερά, αναπαράγονται με εκβλάστηση. Σε αυτή την περίπτωση, το θυγατρικό κύτταρο μεγαλώνει ως παρακλάδι του γονέα. Ξεκινάει σαν ένα μικρό , μεγαλώνει μέχρι να έχει το ίδιο μέγεθος με τον γονέα του και να αποσυνδεθεί [63-64].

5.3.1. *Escherichia coli* (*E.coli*)

❖ Χαρακτηριστικά

Το *Escherichia coli* (*E.coli*) είναι ένα κατά Gram αρνητικό αναερόβιο βακτήριο, το οποίο έχει την ικανότητα να ανταπεξέρχεται συνθήκες ζύμωσης ή απουσία σου οξυγόνου. Χαρακτηρίζεται ως κολοβακτηρίδιο καθώς συναντάται το κατώτερο έντερο των θερμών αιμοφόρων οργανισμών [66-67].



Εικόνα 5.4 Ο μικροοργανισμός *Escherichia coli* [71]

Ενώ τα περισσότερα στελέχη είναι αβλαβή, υπάρχουν ορισμένοι τύποι που μπορούν να προκαλέσουν δηλητηρίαση τους ξενιστές [68]. Τα αβλάβη στελέχη αποτελούν μέρος της φυσιολογικής μικροχλωρίδας του εντέρου είναι ωφέλιμη για τους ξενιστές αφού προάγουν την παραγωγή βιταμίνης K, ενώ παράλληλα αποτρέπουν τον αποικισμό του εντέρου από παθογόνα βακτήρια, έχοντας μία συμβιωτική σχέση [69].

Το βακτήριο αποβάλλεται από τον ανθρώπινο οργανισμό στο περιβάλλον μέσω των περιττωμάτων. αναπτύσσεται μαζικά σε φρέσκα υλικά υπό αερόβιες συνθήκες για τρεις ημέρες αλλά ο αριθμός του έπειτα μειώνεται [70].

❖ Μεταβολισμός

Το *E.coli* έχει την ικανότητα να επιβιώνει σε μεγάλη ποικιλία υποστρωμάτων χρησιμοποιώντας μικτή οξύνει ζύμωση σε αναερόβιες συνθήκες και παράγοντας γαλακτικό οξύ, ηλεκτρικό οξύ, αιθανόλη, οξικό οξύ και διοξείδιο του άνθρακα. Τα μονοπάτια σε ζύμωση με μικτά οξέα παράγουν αέριο υδρογόνο και συνεπώς οι οδηγοί αυτοί απαιτούν τα επίπεδα υδρογόνου να είναι χαμηλά όπως συμβαίνει όταν το βακτήριο ζει μαζί με άλλους οργανισμούς που καταναλώνουν υδρογόνο όπως τα όπως μεθανόγωνα ή βακτηρίδια που μειώνουν τα θειικά [72].

❖ Μολύνσεις

Τα παθογόνα στελέχη του *E.coli* διαθέτουν ειδικά ινίδια, που τους επιτρέπουν να προσκολλώνται σε συγκεκριμένα κύτταρα του εντερικού επιθηλίου. Οι τοξίνες που παράγονται από το *E.coli* προκαλούν γαστρεντερικές διαταραχές γνωστές και ως γαστρεντερίτιδα [71].

5.3.2. Ψευδομονάδα πνοκυανική (*P. aeruginosa*)

❖ Χαρακτηριστικά

Η ψευδομονάδα πνοκυανική (*P.aeruginosa*) είναι ένα κατά Gram αρνητικό βακτήριο και κατά κανόνα κινητό αερόβιο βακτήριο. Ανήκει στην κατηγορία των βακτηριδίων έχει δηλαδή ραβδοειδές σχήμα και το μήκος του κυμαίνεται από 1 έως 5 μm. Χαρακτηρίζεται ως αμφίτριχο καθώς έχει ένα μόνο μαστίγιο σε κάθε πόλο, και τα κύτταρα του βακτηριδίου διατάσσονται είτε μεμονωμένα είτε ως ζεύγη σε μικρές αλυσίδες. Εξωτερικά του κυττάρου σε μερικά στελέχη συναντάται ένα πολυσακχαρικό έλυτρο που το προστατεύει από τη φαγοκυττάρωση και από επικίνδυνες για αυτό ουσίες [73-74].



Εικόνα 5.5 ο μικροοργανισμός PAO1 [90]

Η *P.aeruginosa* ευθύνεται για πολλές ασθένειες στον άνθρωπο στα ζώα και τα φυτά, ενώ το 10% των ανθρώπων την φέρει ως μέρος της φυσιολογικής χλωρίδας του εντέρου. Απαντάται σε διάφορες τοποθεσίες του φυσικού περιβάλλοντος, στο έδαφος και το νερό και μπορεί να επιβιώσει σε δυσμενείς συνθήκες καθώς αντιστέκεται στη φόρτωση και τα περισσότερα αντιβιοτικά. Η *P.aeruginosa* αναπτύσσεται κυρίως σε αερόβια και προαιρετικά σε αναερόβιες συνθήκες σε κοινά θρεπτικά υλικά. Ιδανικά αναπτύσσεται σε θερμοκρασία 37 °C μπορεί όμως να αναπτυχθεί και σε 4 έως 43°C .



Εικόνα 5.6 Καλλιέργεια του μικροοργανισμού PAO1 [71]

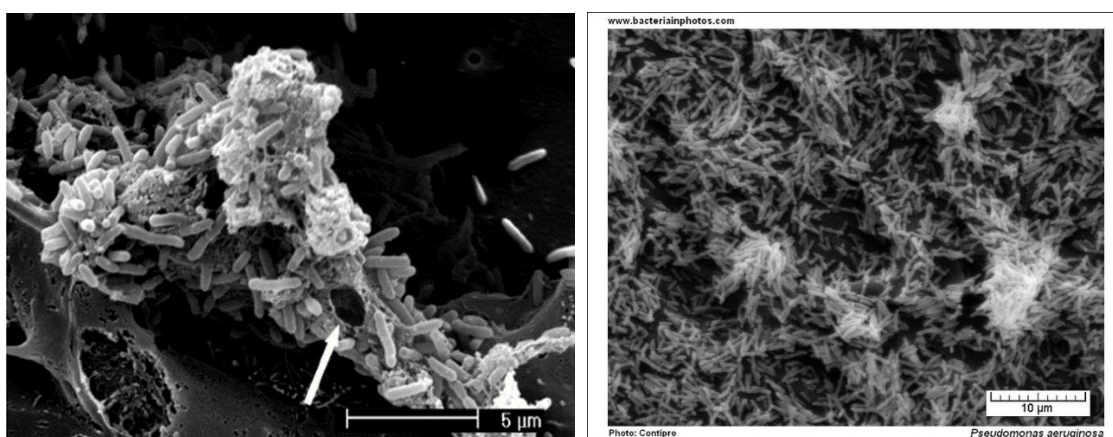
Εάν οι αποικίες του μικροοργανισμού αναπτυχθούν σε ζωικά όργανα (πνεύμονες, ουροποιητικό σύστημα και νεφρά) προκαλείται σοβαρή μόλυνση και μερικές φορές τα αποτελέσματα είναι θανατηφόρα[75].

❖ Μεταβολισμός

Το βακτήριο *P.aeruginosa* όπως αναφέρθηκε ήδη έχει την ικανότητα να αναπτύσσεται παρουσία ή μη οξυγόνου. Σε αναερόβιες συνθήκες το βακτήριο χρησιμοποιεί το νιτρικό ή το νιτρώδες άλας ανάπτυξή του κάνοντας την μετατροπή σε αργινίνη και πυροσταφυλικό οξύ προς την παραγωγή γλυκόζης μέσω της βιοχημικής διεργασίας της γλυκονεογένεσης [76].

❖ Biofilm

Η *P.aeruginosa* έχει αφενός μεγάλη ανθεκτικότητα σε πολλά αντιβιοτικά και αφετέρου μπορεί να σχηματίσει biofilm [77]. Ο σχηματισμός του biofilm χαρακτηρίζεται ως ένας φαύλος κύκλος κατά τον οποίον βακτηριακά κύτταρα οργανώνονται σε κοινότητες μέσα σε μία μήτρα οι οποίες τα συγκρατούν σε μία επιφάνεια [79].



Εικόνα 5.7 Φωτογραφίες SEM του biofilm της PAO1 [78,84]

Μέχρι σήμερα έχουν προταθεί τεχνικές με σκοπό τη διατάραξη του σχηματισμού του biofilm. Η πρώτη είναι η αποφυγή της μικροβιακής προσκόλληση στην επιφάνεια, δεύτερον η διαταραχή της ανάπτυξης του biofilm στην αρχιτεκτονική με αποτέλεσμα να εισχωρούν τα αντιβιοτικά με μεγαλύτερη ευκολία και τρίτον η διαταραχή της ωρίμανσης του biofilm [80-81].

❖ Μολύνσεις

Το παθογόνο βακτήριο *P. aeruginosa* συνήθως μολύνει τον αεραγωγό το ουροποιητικό σύστημα καθώς και εγκαύματα ή τραύματα προκαλώντας άλλες μολύνσεις αίματος. κάποιες από τις μολύνσεις που προκαλεί συνήθως είναι η πνευμονία, το σηπτικό σοκ, η λοίμωξη του ουροποιητικού συστήματος, η εντερική λοίμωξη καθώς και οι μολύνσεις του δέρματος και των μαλακών μορίων [75].

5.3.3. Σταφυλόκοκκος χρυσίζων (*Staphylococcus aureus*)

➤ Χαρακτηριστικά

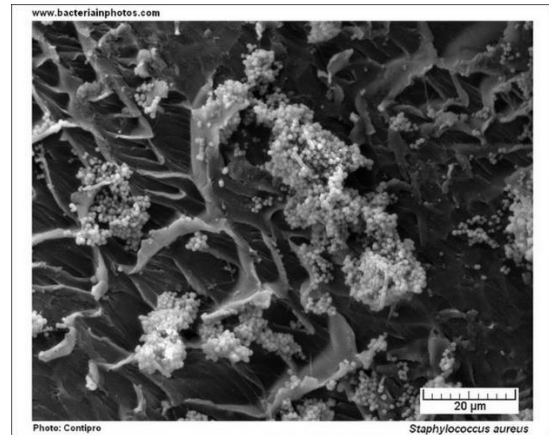
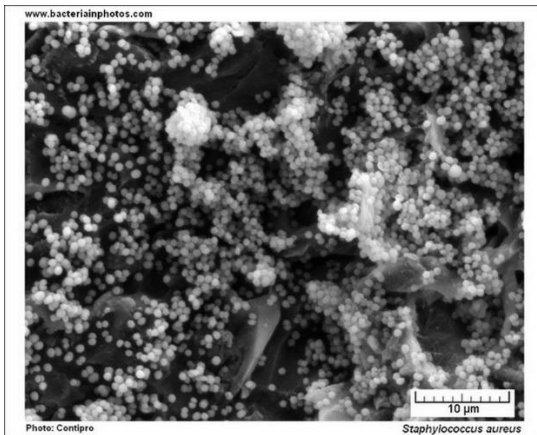
Ο Σταφυλόκοκκος χρυσίζων (*S.Aureus*) είναι ένα στρογγυλό, κατά Gram θετικό βακτήριο με μορφή κόκκων, και είναι συνηθισμένο μέλος της μικρόβιωσης του σώματος. Στο μικροσκόπιο φαίνεται ότι σχηματίζει ομάδες που μοιάζουν οπτικά με τσαμπί σταφυλιού. Συναντάται συχνά στο αναπνευστικό σύστημα και στο δέρμα.



Εικόνα 5.8 Ο μικροοργανισμός *S.aureus* [83]

➤ Biofilm

Ο *S.Aureus* έχει και αυτός την ικανότητα να σχηματίζει biofilm, σχηματίζει δηλαδή κοινότητες από βακτηριακά κύτταρα μέσα σε μια μήτρα έξωκυτταρικών πολυμερών ουσιών (EPS), σχηματίζοντας έτσι μια επιφάνεια η οποία διαπερνάται δύσκολα.



Εικόνα 5.9 Φωτογραφίες SEM του biofilm *S.Aureus* [84]

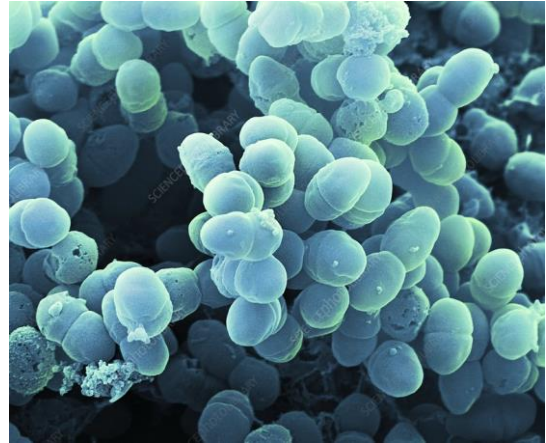
➤ Μολύνσεις

Παρόλο που ο *S.Aureus* κατατάσσεται στα βακτήρια που υπάρχουν φυσιολογικά στον ανθρώπινο οργανισμό, μπορεί να αποτελέσει και ένα ευκαιριακό παθογόνο υπεύθυνο για δερματικές λοιμώξεις, αποστήματα, λοιμώξεις του αναπνευστικού συστήματος, τροφική δηλητηρίαση, πνευμονία, μηνιγγίτιδα, οστεομυελίτιδα, σύνδρομο τοξικού σοκ, βακτηραιμία και σηψαιμία. Αποτελεί επίσης μία από τις πέντε πιο συχνές αιτίες νοσοκομειακών λοιμώξεων ιδιαίτερα σε λοιμώξεις από τραύματα μετά από χειρουργική επέμβαση [82].

5.3.4. Σταφυλόκοκκος επιδερμίδας (*Staphylococcus epidermidis*)

➤ Χαρακτηριστικά

Ο σταφυλόκοκκος επιδερμίδας (*S.Epid*) είναι ένα θετικό καταγραφούν βακτήριο και ένα από 40 είδη που ανήκουν στο γένος *Staphylococcus* [85]. Ο *S. Epidermidis* είναι ένας ιδιαίτερα ανθεκτικός μικροοργανισμός και αποτελείται από μη πτητικούς κόκκους, διατεταγμένος σε ομάδες που μοιάζουν με σταφύλια. Δημιουργεί λευκές, υπερυψωμένες, συνεκτικές αποικίες περίπου 1-2 μm σε διάμετρο μετά από επώαση για 24h. Είναι προαιρετικά αναερόβιο βακτήριο, μπορεί δηλαδή να αναπτυχθεί με αερόβια αναπνοή ή με ζύμωση . Ορισμένα όμως στελέχη μπορεί να μην υπόκεινται στη διαδικασία της ζύμωσης [86] .



Εικόνα 5.10 Φωτογραφία SEM του μικροοργανισμού *S.Epid* [89]

Από βιοχημικές δοκιμές φαίνεται ότι αυτός ο οργανισμός μπορεί να εκτελέσει μία ασθενώς θετική αντίδραση στη δοκιμή αναγωγής νιτρικού άλατος. συγκεκριμένα είναι θετικό για την παραγωγή της ουρεάσης να μπορεί να χρησιμοποιήσει γλυκόζη σακχαρόζη και λακτόζη για να σχηματίσει όξινα προϊόντα. τα κυτταρικά τοιχώματα του *S.Epid*, όπως και του *S.Aureus* έχουν μια πρωτεΐνη δέσμησης, την τρανσφερίνη που βοηθά τον οργανισμό να λάβει σίδηρο. Τα τετραμερή μιας εκτεθειμένης στην επιφάνεια πρωτεΐνης, της αφυδρογονάσης γλυκεραλδεϋδης-3-φωσφορικής, πιστεύεται ότι δεσμεύονται με τρανσφερίνη και απομακρύνουν το σίδηρο. Τα επόμενα βήματα περιλαμβάνουν μεταβίβαση σιδήρου σε

επιφανειακές λιποπρωτεΐνες, στη συνέχεια μεταφορά πρωτεϊνών που μεταφέρουν το σίδηρο στο κύτταρο[87] .

➤ Μολύνσεις

Αποτελεί μέρος της φυσιολογικής χλωρίδας του ανθρώπου και συνήθως εντοπίζεται στο δέρμα καθώς και στη χλωρίδα του βλεννογόνου. Συνήθως ο *S.Epidermidis* δεν είναι παθογόνος, αλλά σε ασθενείς με αδύναμο ανοσοποιητικό σύστημα μπορεί να αναπτύξει οι λοιμώξεις. Αποτελεί μία από τις πιο κοινές αιτίες νοσοκομειακών λοιμώξεων, μιας και έχει υψηλή ανθεκτικότητα έναντι των αντιβιοτικών[88].

Σκοπός

6. Ο Σκοπός

Ο καρκίνος του στομάχου είναι ένας πολύ συχνός καρκίνος, με μεγάλη θνησιμότητα. Η μεγάλη θνησιμότητα του οφείλεται κατά κύριο λόγο στην αργή διάγνωση λόγω των ήπιων συμπτωμάτων. Μέχρι στιγμής οι θεραπείες που χρησιμοποιούνται είναι η χειρουργική επέμβαση, η χημειοθεραπεία και η ακτινοθεραπεία, συνήθως συνδυαστικά.

Το κύριο αίτιο εμφάνισης του καρκίνου του στομάχου είναι το ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού (*H.pylori*), το οποίο υπάρχει στη φυσιολογική χλωρίδα του στομάχου. Για τη θεραπεία λοίμωξης από *H.pylori* χρησιμοποιείται η τριπλή θεραπεία, κατά την οποία ο ασθενής χορηγείται δυο αντιβιοτικά και έναν αναστολέα της αντλίας πρωτονίων. Υπάρχει και η τετραπλή θεραπεία κατά την οποία προστίθεται στη τριπλή θεραπεία και το βισμούθιο.

Στόχος μας είναι η μια διαφορετική προσέγγιση της θεραπείας του καρκίνου, κατά την οποία ο ασθενής δεν θα λαμβάνει ένα κοκτεϊλ φαρμάκων, αλλά μόνο ένα φάρμακο. Έτσι η θεραπεία θα είναι πιο απλή, πιο συστηματική και εύχρηστη από τον ασθενή.

Σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής είναι η ανάπτυξη και μελέτη ενός νέου χημειοθεραπευτικού που προκύπτει από την σύζευξη της σιπροφλοξασίνης, μια αντιμικροβιακή βιοδραστική ένωση που χρησιμοποιούνται ήδη κατά του ελικοβακτηριδίου του πυλωρού, με το αντιμόνιο (Sb) προκειμένου να ελεγχθεί η δράση του έναντι του καρκίνου του στομάχου. Μελέτη βιολογικής δράσης *in vitro* και του μοριακού μηχανισμού της ένωσης *ex vivo*. Επίσης γίνεται μελέτη της τοξικότητας και της γένοτοξικότητας *in vitro* και *in vivo*.

6.1. Προσέγγιση

Το σύμπλοκο που προκύπτει από την προαναφερθείσα σύζευξη θα χαρακτηριστεί με διάφορες μεθόδους ώστε να διαπιστωθεί η δημιουργία του. Έπειτα θα μελετηθεί η αντιμικροβιακή του δράση, με τον προσδιορισμό της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (MIC), της ελάχιστης βακτηριοκτόνου συγκέντρωσης (MBC), των ζωνών αναστολής (IZ) στα βακτήρια *P. aureoginosa*, *E. coli*, *S. aureus*, *S. Epidermidis*, και την τιμή της συγκέντρωσης εξάλειψης του βιοφίλμ (BEC) στα βακτήρια *P. aureoginosa*, , *S. aureus*.

Ακόμη θα μελετηθεί η τοξικότητα και η γένοτοξικότητα *in vitro* έναντι των κυττάρων MRC-5, και *in vivo* τοξικότητα με τον ζωντανό οργανισμό *Allium cepa* και η γένοτοξικότητα *in vivo* με το πειραματικό μοντέλο *Artemia salina*. Τέλος θα μελετηθεί ο *ex vivo* μοριακός μηχανισμός δράσης μέσω της αλληλεπίδρασης του συμπλόκου με το μόριο του DNA με τις φασματοσκοπικές τεχνικές ορατού – υπεριώδους και φθορισμού, καθώς και με ιξωδομετρία.

Πειραματικό Μέρος

7. Χημικό Μέρος

Υλικά: γυάλινα σκεύη 25ml, γυάλινοι σωλήνες 15ml, σπάτουλες, μαγνήτες, erpendorf 1,5m, ddH₂O, tips, Ciprofloxacin(Ladinin 500mg) , Triphenylstibine, Dimethyl Sulfoxide, , H₂O₂, Et₂O.

Όργανα: σημείο τήξης: Melting Point SMP1-Bibby Stuart Scientific, ATR-FT-IR, UV-Vis: φασματοφωτόμετρο U.V. 1600PC Spectrophotometer VWR, NMR: Bruker Avance 400 (400MHz), Laboratory hoods (laminar flow hoods/ biosafate cabinets). Πιπέτες (1000, 100, 10μl), ζυγός ακριβείας

7.1.Σύνθεση

Η σύνθεση της ένωσης CIPAN πραγματοποιήθηκε σε σφαιρική φιάλη των 100 ml χρησιμοποιώντας 0,332 gr (1 mmol) σιπροφλοξασίνης και 0,179 gr (0,5 mmol) διαλυμένα σε 25 ml Et₂O μαζί με 50 μl H₂O₂ . Το διάλυμα έμεινε εντός παγόλουτρου για 24 hr υπό ανάδευση. Την επόμενη μέρα το διάλυμα διηθήκε με διπλό διηθητικό χαρτί και έμεινε ως ότου στεγνώσει πλήρως και συλλεχθεί σε erpendorf.

7.2.Σημείο τήξης

Για την εύρεση του σημείου τήξης της ένωσης χρησιμοποιήθηκαν τα τριχοειδή σωληνάκια BRIS micro haematocrit tubes (Soda Lime Glass, Vitrex Medical A/S) όπου φέρουν μια χαρακτηριστική ένδειξη για την εισαγωγή του δείγματος. Αφού κλείσει η μια άκρη του τριχοειδούς σωληναρίου με την βοήθεια της φλόγας, τοποθετείται με το δείγμα και αναποδογυρίζεται το σωληνάριο, ώστε το δείγμα να μεταφερθεί στο κλειστό άκρο του

τριχοειδούς. Τοποθετείται το τριχοειδές με το δείγμα στη συσκευή για την εύρεση του σημείου τήξεως (Melting Point SMP1-Bibby Stuart Scientific) και μετράται η θερμοκρασία με την χρήση ενός θερμομέτρου.

7.3. Διαλυτότητα

Η διαλυτότητα της ένωσης εξετάστηκε σε διάφορους διαλύτες (n-Hexane, Toluene, CH₂Cl₂, CHCl₃, Acetone, MeOH, MeCN, DMSO, DMF, H₂O) με σκοπό να αποφανθεί ποιοι διαλύτες είναι κατάλληλοι για την διεξαγωγή των υπόλοιπων πειραμάτων. Τοποθετήθηκε ισόποση ποσότητα της ουσίας σε δοκιμαστικούς σωλήνες και προστέθηκε η ίδια ποσότητα από κάθε διαλύτη για να ελεγχθεί η διαλυτότητα κατόπιν αναδέυσεως του διαλύματος.

7.4. Κρυοσκοπία

Δείγμα της ένωσης διαλύθηκε σε DMSO και μέσω κρυοσκοπίας υπολογίστηκε το μοριακό της βάρος. Η τεχνική της κρυοσκοπίας βασίζεται στη ταπείνωση του σημείου πήξεως ενός διαλύτη μετά την προσθήκη μιας ουσίας, την οποία μετράμε με τη σχέση $\Delta\theta = K \cdot m$, (1), όπου K είναι κρυοσκοπική σταθερά χαρακτηριστική για κάθε διαλύτη, και m η μοριακή συγκέντρωση κατά μάζα (δηλαδή τα mol διαλυμένης ουσίας σε 1000 g διαλύτη). Το m θα

ισούται με:
$$m = \frac{1000 m_2}{M_r m_1}$$
 (2), όπου m₁ η μάζα της διαλυμένης ουσίας, m₂ η μάζα του διαλύτη και M_r η σχετική μοριακή μάζα της διαλυμένης ουσίας. Έτσι από τη συσχέτιση των σχέσεων (1) και (2) είναι δυνατός ο υπολογισμός της σχετικής μοριακής μάζας της διαλυμένης ουσίας.

Το όργανο που χρησιμοποιήθηκε για τη μέτρηση ήταν το Osmomat 3000 Freezing point osmometer της Gonotec.

7.5.Φασματομετρία μάζας υψηλής ανάλυσης (High Resolution Mass Spectrometry, HR-MS).

Φασματομετρία μάζας (MS) είναι μια αναλυτική τεχνική που χρησιμοποιείται για τη μέτρηση της αναλογίας μάζας προς φορτίο των ιόντων . Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται συνήθως ως φάσμα μάζας , μια γραφική παράσταση έντασης συνάρτηση του λόγου μάζας προς φόρτιση. Ένα φάσμα μάζας είναι μια γραφική παράσταση του σήματος ιόντων ως συνάρτηση του λόγου μάζας προς φόρτιση. Αυτά τα φάσματα χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό της στοιχειακής ή ισοτοπικής υπογραφής ενός δείγματος, των μαζών των σωματιδίων και των μορίων , και για να διευκρινιστεί η χημική ταυτότητα ή δομή των μορίων και άλλων χημικών ενώσεων .

Σε μια τυπική διαδικασία MS, ένα δείγμα, το οποίο μπορεί να είναι στερεό, υγρό ή αέριο, ιονίζεται, για παράδειγμα βομβαρδίζοντας το με μια δέσμη ηλεκτρονίων. Αυτό μπορεί να προκαλέσει τη διάσπαση ορισμένων μορίων του δείγματος σε θετικά φορτισμένα θραύσματα ή απλά να φορτωθούν θετικά χωρίς να κατακερματιστούν. Αυτά τα ιόντα (θραύσματα) στη συνέχεια διαχωρίζονται σύμφωνα με την αναλογία μάζας προς φόρτιση, για παράδειγμα επιταχύνοντάς τα και υποβάλλοντάς τα σε ηλεκτρικό ή μαγνητικό πεδίο: ιόντα του ίδιου λόγου μάζας προς φόρτιση θα υποστούν την ίδια ποσότητα εκτροπής. Τα ιόντα ανιχνεύονται από έναν μηχανισμό ικανό να ανιχνεύει φορτισμένα σωματίδια, όπως έναν πολλαπλασιαστή ηλεκτρονίων. Τα αποτελέσματα εμφανίζονται ως φάσματα της έντασης σήματος των ανιχνευόμενων ιόντων ως συνάρτηση του λόγου μάζας προς φόρτιση. Τα άτομα ή τα μόρια στο δείγμα μπορούν να ταυτοποιηθούν συσχετίζοντας γνωστές μάζες (π.χ. ένα ολόκληρο μόριο) με τις αναγνωρισμένες μάζες ή μέσω ενός χαρακτηριστικού σχεδίου κατακερματισμού.

Δείγμα της ένωσης διαλύθηκε σε MeOH και το φάσμα της πάρθηκε χρησιμοποιώντας το φασματογράφο ORBITRAP-LC-MS για τον προσδιορισμό του μοριακού της θραύσματος και έπειτα αναλύονται με το πρόγραμμα Excalibur.

7.6.Φασματοσκοπία φθορισμού ακτίνων X (X-ray Fluorescence Spectroscopy, XRF).

Η Φασματοσκοπία φθορισμού ακτίνων X ,XRF είναι μια μη καταστρεπτική αναλυτική τεχνική που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της στοιχειακής σύνθεσης των υλικών. Οι αναλυτές XRF προσδιορίζουν τη χημεία ενός δείγματος μετρώντας τη φθορίζουσα (ή δευτερεύουσα) ακτινογραφία X που εκπέμπεται από ένα δείγμα όταν διεγείρεται από μια πρωτογενή πηγή ακτίνων X. Κάθε ένα από τα στοιχεία που υπάρχουν σε ένα δείγμα παράγει ένα σύνολο χαρακτηριστικών ακτινογραφιών φθορισμού («δακτυλικό αποτύπωμα») που είναι μοναδικό για αυτό το συγκεκριμένο στοιχείο, γι 'αυτό η φασματοσκοπία XRF είναι μια εξαιρετική τεχνολογία για ποιοτική και ποσοτική ανάλυση της σύνθεσης του υλικού.

7.7.Περίθλαση ακτίνων X σε σκόνη (X-ray powder diffraction, XRPD)

Η διάθλαση σκόνης XRPD ή X-Ray είναι μια μέθοδος μέτρησης των ακτίνων X που διασκορπίζονται από ένα πολυκρυσταλλικό δείγμα ως συνάρτηση της γωνίας σκέδασης. Η ανάλυση αυτής της κατανομής δίνει πολλές πληροφορίες σχετικά με τη μικροδομή και τις ιδιότητες του δείγματος.

7.8.Φασματοσκοπία υπεριώδους-ορατού UV-Vis

Ο χαρακτηρισμός και η σταθερότητα (0 ώρες- 48 ώρες-1εβδομάδα) των ενώσεων (σιπροφλοξασίνης, tpSb, CIPAN) ελέγχθηκε και με φάσματα υπεριώδους-ορατού και ο διαλύτης που χρησιμοποιήθηκε είναι το DMSO. Το πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε είναι το M.Wave Professional 1.0 και βρίσκεται στο μηχάνημα U.V. 1600PC Spectrophotometer VWR. Η πορεία που ακολουθήθηκε είναι η εξής: File, New,Spectrum Scan,Operation,Set up, 600-250nm. Αφού θέσουμε τα όρια τοποθετούμε την κυψελίδα με το τυφλό διάλυμα και επιλέγεται η ένδειξη z1, επαληθεύονται ξανά οι ρυθμίσεις και επιλέγεται το scan. Μετά την μέτρηση του τυφλού διαλύματος, ακολουθεί η φωτομέτρηση της προς μελέτη ουσίας. Η διαδικασία αυτή γίνεται με την επιλογή της ένδειξης play. Όταν ολοκληρωθεί η μέτρηση, το αποτέλεσμα αποθηκεύεται για να πραγματοποιηθεί η επεξεργασία και η σύγκριση με τα υπόλοιπα φάσματα.

7.9.Φασματοσκοπία υπέρυθρου FT-IR

Η ένωση CIPAN χαρακτηρίστηκε με φασματοσκοπία infra red (IR). Η υπέρυθρη φασματοσκοπία μετασχηματισμού Fourier (FTIR) είναι μια τεχνική που χρησιμοποιείται για να ληφθεί ένα φάσμα υπέρυθρου απορρόφησης ή εκπομπής ενός στερεού, υγρού ή αερίου. Ο όρος FTIR προέρχεται από το γεγονός ότι απαιτείται ο μετασχηματισμός Fourier (μια μαθηματική διαδικασία) για την μετατροπή των πρώτων δεδομένων στο πραγματικό φάσμα. Για τη λήψη του φάσματος, χρησιμοποιήθηκε το μηχάνημα FTIR Agilent καθώς και το πρόγραμμα MicroLab Expert . Τα βήματα που ακολουθήθηκαν είναι τα εξής: που ακολουθήθηκε είναι η εξής: εκκίνηση του προγράμματος MicroLab, Start, λήψη background, ονομασία του δείγματος, λήψη του φάσματος. Όταν ολοκληρωθεί η μέτρηση, το αποτέλεσμα αποθηκεύεται και επεξεργάζεται με το κατάλληλο software.

7.10. Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού NMR

Τα φάσματα πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού πρωτονίου ($^1\text{H-NMR}$) των ενώσεων (σιπροφλοξασίνης, tpSb, CIPAN) πάρθηκαν σε δευτεριωμένο DMSO ($d^6\text{-DMSO}$). Ζυγίστηκαν περίπου 10 mg της κάθε ένωσης και διαλύθηκαν σε 470μl του διαλύτη. Το διάλυμα αυτό μεταφέρθηκε στο σωληνάκι του NMR και το μηχάνημα που χρησιμοποιήθηκε είναι το Bruker Avance 400 (400MHz) και το πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε είναι το Topspin 2.1. Εντοπίστηκαν οι συντονισμοί των πυρήνων ατόμων ^1H . Επιπλέον ελέγχθηκε η σταθερότητα των διαλυμάτων σε 0 ώρες, 48 ώρες και μια εβδομάδα μετά. Η σύγκριση έγινε με το πρόγραμμα Mestrec23.

8. Βιολογικό Μέρος

Υλικά: Tryptone (Biolife), Soytone (Biolife), Beef extract (Biolife), Yeast extract (Sigma-Aldrich), NaCl (Merck KGaA), d-Glucose (Merck KGaA), K₂HPO₄ (Merck KGaA), Peptone (Biolife), Agar (Sigma-Aldrich), ddH₂O, τρυβλία petri, σωλήνες των 15ml, πιπέτες (1000, 100, 10μl), κρικοφόρος στειλεός, - βαμβακοφόρος στειλεός, -χάρτινοι δίσκοι 9mm,- ορός (NaCl 0,9M), λαβίδες, καμινέτο, hood με laminar air flow (HD-650 laminar flow cabinet Zhejing sujing Purification Equipment), μπουκάλια (500, 250ml), tips, vortex, σακούλες αποβλήτων, διάλυμα της ένωσης, ddH₂O, βακτήρια (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* και *Staphylococcus epidermidis* ATCC), επωαστής, μηχανήμα σάρωσης (Hewlett Packard)

8.1. Αντιμικροβιακή δράση

Η αντιμικροβιακή δράση της Ένωσης ελέγχθηκε μέσω πειραμάτων εύρεσης ζωνών αναστολής (IZ), ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (MIC), ελάχιστες βακτηριοκτόνου συγκέντρωσης (MBC) και δράση έναντι βιοφίλμ. Για την διεξαγωγή των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν δυο θετικά κατά Gram βακτήρια (*S. aureus* και *S. epidermidis*) και δύο αρνητικά κατά Gram βακτήρια (*E. coli* και *P. aeruginosa*).

Τα βακτήρια διατηρούνταν στο εργαστήριό μας κάτω από κατάλληλες συνθήκες (37°C για ανάπτυξη, -80°C για αποθήκευση). Τα θρεπτικά υλικά μέσα ήταν διαφορετικά και τα βέλτιστα για το κάθε βακτήριο σύμφωνα με την American Type Culture Collection (ATCC). Για την *Pseudomonas aeruginosa* χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω υλικά tryptone (1%, 10g/L), yeast extract (0,5%, 5g/L) και NaCl (1%, 10g/L). Για τον *S. epidermidis* χρησιμοποιήθηκε beef extract (1%, 3g/L) και peptone (0,5%, 5g/L). Για τον *S. aureus*

χρησιμοποιήθηκαν tryptone (1,7%, 17g/L), soytone (0,3%, 3g/L), dextrose (0,25%, 2,5g/L), NaCl (0,5%, 5g/L), και K₂HPO₄ (0,25%, 2,5g/L). Για το υγρό θρεπτικό μέσο χρησιμοποιήθηκε δις απεσταγμένο νερό (ddH₂O). Για το στερεό θρεπτικό μέσο χρησιμοποιήθηκε και άγαρ (1,5%, 15g/L).

Όλα τα σκεύη που χρησιμοποιούνται για την διαχείριση των βακτηρίων έχουν αποστειρωθεί κάτω από κατάλληλες συνθήκες σε εργαστηριακό κλίβανο, όπως αποστειρώνονται και τα θρεπτικά μέσα στα οποία θα εμβολιαστούν τα βακτήρια. Για να εξασφαλίσουμε στείρες συνθήκες χωρίς επιμολύνσεις ,τα πειράματα που περιλαμβάνουν βακτήρια πραγματοποιήθηκαν είτε μέσα σε hood με laminar air flow είτε κάτω από στείρα φλόγα .

8.2.Ζώνες Αναστολής – IZ

Η ζώνη αναστολής εμφανίζει την διάμετρο, κατά την οποία σταματά η ανάπτυξη των βακτηρίων. Για τα πειράματα των IZ απαιτούνται τρυβλία με θρεπτικά στερεά συστατικά κατάλληλα για την ανάπτυξη του κάθε βακτηρίου των 20 ml, αποστειρωμένος βαμβακοφόρος στειλούς και αποστειρωμένα κυλινδρικά χαρτιά διαμέτρου 9 mm. Αρχικά ο βαμβακοφόρος στειλούς εμβαπτίζεται για 20 sec σε διάλυμα βακτηρίου με A = 0,1 (10⁸ cfu/ml βακτήρια) και εμβολιάζεται το θρεπτικό υλικό. Εν συνεχεία τα απορροφητικά χαρτιά εμβαπτίζονται σε διάλυμα της χημικής ουσίας C = 1 mM και τοποθετούνται πάνω στο θρεπτικό υλικό. Τα αποτελέσματα καθίστανται ορατά σε 24h όπου σκανάρεται το τρυβλίο και αποθηκεύεται το αποτέλεσμα.

Η διάμετρος της ζώνης αναστολής μετρήθηκε με τη βοήθεια χάρακα που μετράει σε mm. Τα βακτήρια μπορούν να ταξινομηθούν σε τρεις κατηγορίες, ανάλογα με τη διάμετρο της

ζώνης αναστολής που εμφανίζουν μετά την επώαση με τα αντιβιοτικά ως εξής : ευαίσθητα ($IZ \geq 17 \text{ mm}$), ενδιάμεσα ($13 \text{ mm} \leq IZ \leq 16 \text{ mm}$) και ανθεκτικά ($IZ \leq 12 \text{ mm}$).

8.3.Ελάχιστη Ανασταλτική Συγκέντρωση (MIC)

Ως ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (Minimum Inhibitory Concentration-MIC) ορίζεται η χαμηλότερη συγκέντρωση του αντιμικροβιακού παράγοντα που εμποδίζει την οπτικά εμφανή ανάπτυξη ενός μικροοργανισμού κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες και συνήθως έχει τιμές $\mu\text{g/ml}$ ή mg/L [65,66]. Για νέα υποψήφια φάρμακα, ο προσδιορισμός της MIC είναι ένα από τα πρώτα βήματα για την αξιολόγηση του αντιμικροβιακού δυναμικού. Για την εύρεση της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης ακολουθήθηκαν τα παρακάτω βήματα. Υπολογίζουμε τους κατάλληλους όγκους από το θρεπτικό, την ουσία προς εξέταση ουσία καθώς και του μικροβίου. Σε τελικό όγκο 2ml θέλουμε να έχουμε $5 \times 10^5 \text{ cfu}$ (colony forming unit)/ml [65]. Έτσι σε 2 ml 0,9M NaCl διαλύουμε κατάλληλη ποσότητα.

Τα στελέχη των βακτηρίων με $MIC < 50 \mu\text{M}$ θεωρούνται ευαίσθητα στο αντιβιοτικό ,ενώ εκείνα με $MIC > 100 \mu\text{M}$ θεωρούνται ανθεκτικά.

8.4.Ελάχιστη Βακτηριακτόνος Συγκέντρωση (MBC)

Ως ελάχιστη βακτηριοκτόνος συγκέντρωση (Minimum Bacterial Concentration – MBC) ορίζεται η χαμηλότερη συγκέντρωση που θανατώνεται ο μικροοργανισμός κατά 99.9% μετά από 24 ώρες επώαση υπό κατάλληλες συνθήκες θερμοκρασίας. Η MBC μπορεί να προσδιοριστεί μετά από το πείραμα της MIC με την υποκαλλιέργεια ενός μικρού δείγματος (της τάξεως των 4 μL) σε τρυβλίο με 10 ml στερεό θρεπτικό υλικό κατάλληλο για το κάθε βακτήριο. Η μικρότερη συγκέντρωση που δε θα εμφανιστούν αποικίες βακτηριακού πληθυσμού θεωρείται ως η ελάχιστη βακτηριοκτόνος συγκέντρωση (MBC).

Από την αναλογία MBC/MIC συμπεραίνεται αν μια χημική ουσία είναι βακτηριοκτόνος ή βακτηριοστατική. Βακτηριοκτόνος ουσία χαρακτηρίζεται μια χημική ένωση όταν προκαλεί τον θάνατο του 99,9% των βακτηρίων και ο λόγος MBC / MIC είναι μικρότερος ή ίσος του δυο (≤ 2). Αντίθετα, εάν ο λόγος MBC / MIC μιας ένωσης είναι ≥ 4 , τότε είναι βακτηριοστατικό, πράγμα που δείχνει ότι αναστέλλει αλλά δεν σκοτώνει τον οργανισμό.

8.5. Biofilm

Το βιοφίλμ απαρτίζεται από μια συνομοταξία βακτηριακών κυττάρων. Αρχικά τα βακτήρια με πυκνότητα $6,7 \cdot 10^6$ cfu/ml εμβολιάζονται σε κατάλληλο θρεπτικό υλικό για τα μικρόβια που θα αναπτυχθούν και καλλιεργούνται για 24h στους 37°C. Το περιεχόμενο κάθε σωλήνα απομακρύνεται και οι δοκιμαστικοί σωλήνες εκπλένονται με 1 ml ddH₂O. Τα βακτήρια επωάζονται σε συγκεντρώσεις από 100-500 μ M και ο τελικός τους όγκος είναι V=2 ml και επωάζονται για 20 ώρες στους 37°C.

9. Μελέτη τοξικότητας

Υλικά:, Cell Culture Media, Sulforhodamine b, Τριχλωροξικό οξύ (TCA), Tris base, Phosphate-Buffered Saline(PBS), KCl, MRC-5 cells, Βολβοί κρεμμυδιών (Allium cepa), διαμέτρου περίπου 1,5-2,0 cm, ξυραφάκια, γυάλινη πλάκα μικροσκοπίου (75 x 25 mm), Coverslips (Fisher Scientific, αριθμός καταλόγου: 12- 543D), Eppendorf 1,5 ml, Διπλά αποσταγμένο νερό (ddH₂O), Υδροχλωρικό οξύ, Οξικό οξύ, Αντιδραστήρια Schiff , οπτικό μικροσκόπιο (Olympus, 10x objective), Ψηφιακή κάμερα (Nikon, model: COOLPIX P100, 10.3 megapixel, 26x zoom), Artemia Salina, NaCl 0,9%

9.1.Μελέτη τοξικότητας σε κύτταρα

❖ Συνθήκες καλλιέργειας των κυττάρων

Η κυτταρική σειρά φυσιολογικών κυττάρων MRC-5, αναπτύχθηκαν σε επωαστικό κλίβανο που παρέχει σταθερή θερμοκρασία 37°C, κατάλληλες συνθήκες υγρασίας και ατμόσφαιρα εμπλουτισμένη με 5% CO₂. Το θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιήθηκε είναι το Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) το οποίο εμπλουτίζεται με ορό εμβρύου βοός (fetal bovine serum, FBS) σε αναλογία 10% (50 ml), με 1% (5 ml) από τα αντιβιοτικά στρεπτομυκίνη (100 µg/ml) και πενικιλίνη (100 IU/ml), και με το αμινοξύ L-γλουταμίνη (L-glutamine) (2.5 ml). Το πλήρες θρεπτικό υλικό διατηρείται στους 4 °C.

❖ Συνθήκες ανακαλλιέργειας των κυττάρων.

Ανάλογα με τον ρυθμό ανάπτυξης των κυττάρων γίνεται ανακαλλιέργεια στα κύτταρα ανά ~3 μέρες αφήνοντας το 1/3 αυτών στο τρυβλίο. Η διαδικασία που ακολουθείται για την ανακαλλιέργεια είναι η εξής: αφαίρεση του θρεπτικού από το τρυβλίο, ξέπλυμα των κυττάρων με διάλυμα Phosphate Buffer Saline (PBS) προκειμένου να απομακρυνθεί η περίσσεια του

θρεπτικού που έμεινε στο τρυβλίο, προσθήκη 1ml θρυψίνης 1x και επώαση στους 37ο C για 3-5 λεπτά, προκειμένου να αποκολληθούν τα κύτταρα από το ταπήτιο του τριβλίου. Η θρυψίνη είναι ένα ένζυμο το οποίο διασπά τις συνδέσεις των κυττάρων με την επιφάνεια προσκόλλησής τους στο τρυβλίο, και για να δράσει απαιτείται πλήρης απομάκρυνση του θρεπτικού αλλιώς ο ορός που περιέχει την απενεργοποιεί. Τα κύτταρα ελέγχονται στο μικροσκόπιο και αν δεν έχουν αποκολληθεί τα βοηθάμε μηχανικά χτυπώντας ελαφρώς το τρυβλίο με το χέρι. Στη συνέχεια προστίθενται 5 ml από το θρεπτικό DMEM για να απενεργοποιηθεί το ένζυμο και το εναίωρημα κυττάρων αναδεύεται με την πιπέτα κυκλικά προκειμένου να αποκολληθούν τα εναπομείναντα κύτταρα. Τέλος κρατείται η επιθυμητή ποσότητα των κυττάρων, ενώ τα υπόλοιπα απορρίπτονται, και προστίθεται θρεπτικό DMEM μέχρι τελικό όγκο 7 ml.

9.1.1. Μέθοδος εύρεσης κυτταροτοξικότητας in vitro με χρήση της Sulforhodamine B.

Η κυτταροτοξική δράση της ουσίας προσδιορίστηκε με τη μέθοδο της sulforodamine B (sulforodamine B assay, SRB). Η τεχνική αυτή αναπτύχθηκε το 1990 και χρησιμοποιείται μέχρι σήμερα ευρέως για τον έλεγχο της κυτταροτοξικότητας in vitro. Η SRB προσδένεται σε πρωτεϊνικά μέρη του κυττάρου τα οποία πρώτα έχουν μονιμοποιηθεί με τρι-χλώρο-ακετικό οξύ (trichloroacetic acid, TCA). Είναι μια χρωστική αμινοξανθάνη με δύο θειολικές ομάδες οι οποίες μπορούν και προσδένονται σε βασικά αμινοξικά κατάλοιπα σε όξινες συνθήκες αλλά αποδεσμεύονται από αυτά σε βασικές συνθήκες. Το πλεονέκτημα της χρωστικής είναι η υψηλή ευαισθησία και η χρώση των κυττάρων ανεξάρτητα από την μεταβολική τους κατάσταση. Η έντονη χρώση της SRB επιτρέπει στη μέθοδο να εφαρμοστεί σε τρυβλίο με 96 βοθρία[90-91]. Η εύρεση της συγκέντρωσης της ουσίας που αναστέλλει την ανάπτυξη των κυττάρων στο 50%

είναι σημαντική για να ελεγχθεί η κυτταροτοξική της δράση (Inhibitory Concentration 50%, IC₅₀).

Το πρωτόκολλο που ακολουθείται είναι ίδιο μέχρι την αποκόλληση των κυττάρων και την απενεργοποίηση του ενζύμου με θρεπτικό. Μετά γίνεται υπολογισμός του αριθμού των κυττάρων που βρίσκονται στο τρυβλίο μέσω χρήσης της πλάκας Neubauer. Ο αριθμός των κυττάρων (N) που μετρείται επεξεργάζεται ως εξής: $(N/4) \times (5.8) \times (10^4)$, όπου 5.8 είναι τα ml της αραιώσης που πραγματοποιήθηκε και 4 είναι τα τετράγωνα της πλάκας. Μετά ανάλογα τον αριθμό των κυττάρων που απαιτούνται μέσα σε κάθε βοθρίο από ένα τρυβλίο με 96 βοθρία (MRC-5: 2000 κύτταρα/βοθρίο), λαμβάνεται ο κατάλληλος όγκος κυττάρων από την κυρίως καλλιέργεια, πραγματοποιείται η κατάλληλη αραιώση με θρεπτικό, και με την χρήση πολυπιπέτας διανέμονται στα βοθρία σε τελικό όγκο 100 μl.

Το τρυβλίο με τα κύτταρα τοποθετείται στον επωαστικό κλίβανο για 24 ώρες και μετά γίνεται η προσθήκη της προς μελέτη ένωσης. Η ένωση διαλύθηκε σε DMSO σε αρχική συγκέντρωση 10^{-3} M και έπειτα αραιώνεται με θρεπτικό DMEM σε συγκέντρωση 10^{-4} M και 10^{-5} M.

Τα κύτταρα επωάζονται με τις ουσίες γίνεται για 48 ώρες. Κατόπιν αφαιρείται το θρεπτικό μέσο και προστίθεται κρύο διάλυμα TCA 10% (50 μl/βοθρίο) και το τρυβλίο επωάζεται για 30 min στους 4°C. Ακολουθούν πλύσεις (5x) με 100μl δις-απεσταγμένου νερού (ddH₂O) και το τρυβλίο αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για 24 ώρες ώστε να στεγνώσει.

Ακολουθεί προσθήκη 70 μl της χρωστικής SRB 0.4% w/v διαλυμένη σε διάλυμα 1% οξικού οξέος σε κάθε βοθρίο και το τρυβλίο επωάζεται για 20 min σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα ακολουθούν πλύσεις (5x) με 100μl οξικού οξέος 1%. Η χρωστική που έχει προσδεθεί στα κύτταρα διαλυτοποιείται με 200 μl διαλύματος unbuffered Tris-Base 10 mM και η απορρόφηση

μετρείται σε μηχανήματα Elisa (MMP-96 HiPo, Biosan) στα 540 nm. Το πείραμα επαναλαμβάνεται τουλάχιστον τρεις φορές.

9.1.2. Έλεγχος της *in vitro* γενετοξικότητας με την μέθοδο των μικροπυρηνίσκων (Micronucleus assay)

Η παρουσία μικροπυρηνίσκων στα κύτταρα αποτελεί δείκτη μετάλλαξιόγόνου/γενετοξικής επίδρασης μιας ουσίας. Οι χημικές ουσίες εξωγενείς παράγοντες μπορούν να σχηματίσουν μικροπυρηνίσκοι στα κύτταρα κατά το στάδιο της μίτωσης ή κατά τη μετάβαση από την μετάφαση στην ανάφαση. Οι μικροπυρηνίσκοι εμφανίζονται στο κυτταρόπλασμα ως μικρά θραύσματα DNA προσκολλημένα στη μεμβράνη του κυττάρου καθώς δεν μπορούν να ενσωματωθούν στα θυγατρικά κύτταρα. Η μέθοδος των μικροπυρηνίσκων χρησιμοποιείται ευρέως με σκοπό τον έλεγχο γενετικών βλαβών σε διάφορους τύπους ιστών και κυττάρων, ώστε να αποφευχθεί ο έλεγχος τοξικότητας ουσιών σε ζώα.

Το πρωτόκολλο που ακολουθείται είναι το εξής : τοποθετείται μια καλυπτρίδα σε κάθε βοθρίο σε ένα τρυβλίο με 6 βοθρία, και πάνω σε αυτή προστίθεται ο κατάλληλος αριθμός κυττάρων (40000 κύτταρα MRC-5/βοθρίο) σε τελικό όγκο 3ml. Το τρυβλίο τοποθετείται στον επωαστικό κλίβανο για 24 ώρες. Την επόμενη μέρα προστίθεται η ένωση σε διπλή επανάληψη και αφήνεται για επώαση 48 ωρών. Αφαιρείται το θρεπτικό και κάθε βοθρίο ξεπλένεται (3x) με 1 ml PBS. Προστίθεται σε κάθε βοθρίο 1 ml KCl 75 mM και το τρυβλίο επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 10 min. Έπειτα κάθε βοθρίο εκπλένεται (3x) με 2 ml διαλύματος οξικού οξέος-αιθανόλης 1/3 v/v. Γίνεται έκπλυση (1x) με 2 ml μεθανόλης που περιέχει οξικό οξύ 1% v/v. Προστίθεται σε κάθε βοθρίο 2 ml από τη χρωστική acridine orange (50 µg/ml) διαλυμένη σε θρεπτικό DMEM και ακολουθεί επώαση στον επωαστικό κλίβανο για 15 min. Ακολουθεί έκπλυση (3x) με 1 ml PBS. Τέλος αφαιρείται η καλυπτρίδα από κάθε βοθρίο και

τοποθετείται ανάποδα πάνω σε αντικειμενοφόρο πλάκα και μελετάται η ύπαρξη μικροπυρηνίσκων σε μικροσκόπιο φθορισμού. Το ποσοστό εμφάνισης μικροπυρηνίσκων μετρείται ανά 1000 κύτταρα [90].

9.2. Έλεγχος της in vivo τοξικότητας στον ζωντανό οργανισμό μοντέλο

Artemia salina

Ένα από τα αρχικά πειράματα τοξικότητας είναι η δοκιμή θνησιμότητας στον οργανισμό *Artemia salina* (γαρίδα άλμης), η οποία είναι χρήσιμη για την πρόληψη διαφόρων βιοματικών δράσεων της προς μελέτη ένωσης. Αυτό οφείλεται στην ευρεία κατανομή της *Artemia salina*, το μικρό κύκλο ζωής, την ευαισθησία της σε τοξικές ουσίες καθώς και ότι τα αποτελέσματα της είναι σε συγκρίσιμα με εκείνα άλλων θηλαστικών.



Εικόνα 9.1 Ο οργανισμός μοντέλο *Artemia salina*

Το πρωτόκολλο της δοκιμασίας αυτής είναι το εξής : ποσότητα 1 gr από τα αυγά της γαρίδας άλμης ενυδατώνονται με φρέσκο H₂O για περίπου μια ώρα μέσα σε ένα εκχυλιστικό χωνί. Οι συνθήκες θαλασσινού νερού προσομοιάστηκαν με την διάλυση 17 gr θαλασσινού αλατιού σε 500 ml απεσταγμένου H₂O. Το δοχείο ανάπτυξής τους εξοπλίζεται με συνεχή παροχή φρέσκου αέρα σε θερμοκρασία δωματίου και συνεχή παρουσία φωτός. Αφήνονται σε αυτές τις συνθήκες για τουλάχιστον 48 ώρες μέχρι να εκκολαφθούν τα αυγά.

Αφού εκκολαφθούν τα αυγά, οι προνύμφες της γαρίδας άλμης συλλέγονται με μικροπιπέτα κοντά στην φωτεινή πλευρά του δοχείου ανάπτυξης με τη χρήση σταθερής πηγής φωτός. Μετά τη συλλογή τους οι προνύμφες διαχωρίζονται από τα αυγά σε ένα ποτήρι που περιέχει NaCl 0.9%M. Έπειτα κατάλληλη ποσότητα από το διάλυμα με τις προνύμφες (0.5 ml) που περιέχει ~10-15 προνύμφες τοποθετείται σε κάθε



Εικόνα 9.2 Οι προνύμφες μέσα στα βοηθία

βοθρίο ενός τρυβλίου με 24 βοηθία. Οι ενώσεις παρασκευάζονται σε συγκέντρωση 10^{-3} M και 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 και σε διπλή επανάληψη η κάθε μια. Η επιβίωση του πληθυσμού της γαρίδας άλμης παρατηρήθηκε μετά από επώαση με τις ουσίες για 24 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου με την βοήθεια στερεοσκοπίου. Οι προνύμφες θεωρήθηκαν νεκρές αν δεν έδειχναν κανένα σημάδι κίνησης για 10 sec παρακολούθησης. Κάθε πείραμα επαναλαμβάνεται τρεις φορές [95].

9.3. Έλεγχος της in vivo γονοτοξικότητας στον οργανισμό μοντέλο

Allium cepa (*Allium cepa* test)

Μέσω της μεθόδου *Allium cepa* μπορούμε να έχουμε μεγάλη συσχέτιση με τα τεστ σε ζωικούς οργανισμούς και χρησιμοποιείται ευρέως, ούτως ώστε να εξεταστεί η κυτταροτοξική και η μεταλλαξιογόνος δράση διαφόρων ουσιών. Έχει χαμηλό κόστος και είναι αρκετά εύκολη στο χειρισμό ενώ παράλληλα επιτρέπει την αξιολόγηση διαφόρων παραμέτρων όπως οι χρωμοσωμικές ανωμαλίες ο υπολογισμός του μιτωτικού δείκτη (η αναλογία μεταξύ των κυττάρων που βρίσκονται ή όχι σε μίτωση) καθώς και η ύπαρξη μικροπυρηνίσκων. Μπορούμε δηλαδή να εξετάσουμε γονοτοξικότητα (βλάβη στο DNA σε χρωμοσωμικό επίπεδο συμβάλλει στην καρκινογένεση), κυτταροτοξικότητα (αύξηση ή την μείωση του μιτωτικού δείκτη) και τη μεταλλαξιογόνο δράση μιας ουσίας.



Το πρωτόκολλο που ακολουθείται είναι το παρακάτω : τοποθετείται περίσσεια βολβών κρεμμυδιών (*Allium cepa*) σε δοκιμαστικούς σωλήνες που περιέχουν 16 ml ddH₂O και επωάζονται για 48 ώρες σε κατάλληλες συνθήκες (25°C, 12 ώρες φως, 12 ώρες σκοτάδι, 50-60% υγρασία) ώστε να αναπτύξουν ρίζες. Έπειτα επιλέγονται τρεις βολβοί με το ίδιο

μήκος ριζών για κάθε συγκέντρωση (control και 3 συγκεντρώσεις). Οι ενώσεις διαλύονται σε DMSO με αρχική συγκέντρωση 10⁻³ M και οι τελικές συγκεντρώσεις υπολογίζονται σε τελικό όγκο 3 ml. Κατόπιν οι βολβοί αφήνονται να αναπτύξουν τις ρίζες τους παρουσία των ουσιών για ακόμα 48 ώρες στις ίδιες συνθήκες. Ακολουθεί μονιμοποίηση των ριζών με διάλυμα οξικού οξέος-μεθανόλης 1/3 v/v για 24 ώρες στους 4°C. Μετά την μονιμοποίηση οι βολβοί μπορούν να αποθηκευτούν σε διάλυμα αιθανόλης 70%.

Προκειμένου να παρατηρηθούν τα κύτταρα του μεριστοματικού άκρου των ριζών του *Allium cepa* ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία: αφαιρούνται 6-8 ρίζες περίπου ίδιου μήκους από κάθε βολβό και τοποθετούνται σε διάλυμα HCl 6N για 10 min στους 37°C ώστε να υδρολυθούν. Έπειτα αφαιρείται το HCl και οι ρίζες ξεπλένονται με H₂O για 1 min. Κατόπιν οι ρίζες τοποθετούνται σε erpendorf που περιέχει την χρωστική βάση του Schiff και επωάζονται με αυτή για 40-70 min στους 37°C. Ακολούθως αφαιρούνται οι ρίζες από την χρωστική και τοποθετούνται σε erpendorf που περιέχει διάλυμα οξικού οξέος 45% v/v/ για 1 λεπτό.

Κάθε ρίζα τοποθετείται πάνω σε αντικειμενοφόρο πλάκα και με την χρήση μια λεπίδας αποκόπτεται το μεριστοματικό της άκρο (1-2 mm) καθώς είναι αυτό που πολλαπλασιάζεται και έτσι θα είναι εμφανής η επίδραση της ουσίας. Προστίθενται λίγες σταγόνες από το διάλυμα του οξικού οξέος μέσα στο οποίο βρίσκονται οι ρίζες, και τοποθετείται μια καλυπτρίδα πάνω από κάθε μεριστοματικό άκρο. Πιέζεται καλά η καλυπτρίδα με τη σβήστρα ενός μολυβιού προκειμένου να χωριστεί το μεριστοματικό άκρο σε μονά κύτταρα. Τέλος κάθε ρίζα παρατηρείται σε οπτικό μικροσκόπιο και γίνεται λήψη βίντεο χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα ISCapture και την κάμερα Tuscen Camera. Γίνεται λήψη βίντεο για τουλάχιστον 6 ρίζες από κάθε συγκέντρωση και το control και από τους τρεις βολβούς συνολικά. Έπειτα τα βίντεο επεξεργάζονται με το πρόγραμμα Free Video to JPEG Converter (DVDVideoSoft) προκειμένου να μετατραπούν σε εικόνες για την περαιτέρω επεξεργασία τους.

Από κάθε ρίζα ελέγχονται περίπου 300 κύτταρα καταγράφοντας τις διάφορες φάσεις του κυτταρικού κύκλου [92-94].

10. Αλληλεπίδραση του συμπλόκου με το DNA

Αρχικά παρασκευάστηκε ένα ρυθμιστικό διάλυμα (buffer) το οποίο περιείχε 15 mM κιτρικό τρι-νάτριο (trisodium citrate) και 150 mM NaCl 0,9%Μ σε τελικό όγκο 500 ml (ddH₂O) και το pH ρυθμίστηκε με διάλυμα NaOH 1 M ώστε να είναι pH= 7. Έπειτα παρασκευάστηκε stock διάλυμα του CT-DNA (calf thymus DNA) σε αναλογία CT-DNA νερό-buffer να είναι 1:1:19. Υπολογίστηκε η αναλογία των απορροφήσεων στο UV στα 260 και 280 nm (A_{260}/A_{280}), ώστε να καθοριστεί η καθαρότητα του διαλύματος. Εφόσον στα 260 nm απορροφά το DNA ενώ στα 280 nm οι πρωτεΐνες, συνεπώς η αναλογία ιδανικά θα πρέπει να είναι >1.8 ώστε να μην υπάρχει επιμόλυνση του DNA από πρωτεΐνες . Η συγκέντρωση του CT-DNA υπολογίστηκε από την από την απορρόφηση στο UV στα 260 nm μετά από αραιώση 1:20 χρησιμοποιώντας $\epsilon = 6600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [97].

10.1. Φασματοσκοπία υπεριώδους-ορατού (UV-Vis).

Χρησιμοποιώντας τη φασματοσκοπία UV-Vis μπορούμε να μελετήσουμε τον τρόπο αλληλεπίδρασης ενώσεων DNA ,καθώς και πόσο ισχυρή είναι η σύνδεση της ένωσης με αυτό. Αρχικά λαμβάνονται τα φάσματα UV διαλύματος CT-DNA (Calf Thymus)Με την προσθήκη αυξανόμενης ποσότητας Ένωσης σε διάφορες αναλογίες και κατόπιν εξετάζεται η μεταβολή της απορρόφησης του CT-DNA. Εμφάνιση οποιασδήποτε μεταβολής της απορρόφησης αποτελεί ένδειξη αλληλεπίδρασης. η μετατόπιση της θέσης του λ_{max} δείχνει Εάν η έλικα του DNA σταθεροποιείται ή όχι κατά την αλληλεπίδραση με την ένωση. Η αύξηση η μείωση του λ_{max} (υπερχρωμία ή υποχρωμία αντίστοιχα) είναι ένδειξη είτε καταστροφής των δεσμών υδρογόνου μεταξύ των βάσεων είτε παρεμβολή της ένωσης ανάμεσα στις βάσεις DNA.

Σε δεύτερη φάση λαμβάνουμε φάσματα UV διαλύματος με σταθερή ποσότητα ενώσεις και αυξανόμενη ποσότητα CT-DNA , και καταγράφονται οι μεταβολές της απορρόφησης. από τις μεταβολές αυτές μπορούμε να υπολογίσουμε τη σταθερά σύνδεσης K_b Γνωρίζοντας το συντελεστή μοριακής απορρόφησης της Ελεύθερης Ένωσης (ϵ_f), τον συντελεστή μοριακής απορρόφησης της πλήρους συνδεδεμένης ενώσεις στο DNA (ϵ_b), καθώς και συγκέντρωση του [DNA].

Για τα πειράματα τιτλοδότησης καταγράφηκαν φάσματα στο UV του CT-DNA στο ρυθμιστικό διάλυμα, απουσία ή παρουσία της ένωσης προς έλεγχο σε διάφορες αναλογίες $r = 0, 0.02, 0.05, 0.07, 0.10, 0.12$ ($r = [\text{complex}]/[\text{DNA}]$, $[\text{DNA}] = 5 \times 10^{-5} \text{ M}$). Η ένωση σε αυτό το πείραμα διαλύθηκε σε DMSO σε αρχική συγκέντρωση 10^{-3} M . Για τον υπολογισμό της σταθεράς πρόσδεσης K_b λήφθηκαν φάσματα στο UV των ενώσεων παρουσία ή απουσία του CT-DNA σε διάφορες αναλογίες $r = 1, 0.5, 0.25, 0.16, 0.125, 0.1$ ($r = [\text{complex}]/[\text{DNA}]$, $[\text{complex}] = 10 \mu\text{M}$).

10.2. Μελέτη της ανταγωνιστικής δράσης με το αιθίδιο βρωμίδιο με φασματοσκοπία φθορισμού

Προκειμένου να επιβεβαιωθεί ο τρόπος σύνδεσης στο DNA μέσω παρεμβολής χρησιμοποιείται ως φθορισμομετρικός αισθητήρας (ένωση αναφοράς) το αιθίδιο βρωμίδιο (= ethidium bromide, EtBr). Το EtBr (=3,8-diamino-5-ethyl-6-phenylphenanthridinium bromide) είναι ένα φθορίζον μόριο που σχηματίζει ευδιάλυτα σύμπλοκα με νουκλεϊκά οξέα και αυξάνει την τιμή της έντασης φθορισμού παρουσία DNA λόγω της παρεμβολής του επίπεδου δακτυλίου της φαινανθριδίνης μεταξύ δύο γειτονικών βάσεων της διπλής έλικας του DNA.

Όταν το διάλυμα του EtBr διεγερθεί με ακτινοβολία μήκους κύματος $\lambda_{\max} = 540 \text{ nm}$, εμφανίζει ασθενή σχετικά φθορισμό εκπομπής με $\lambda_{\max} = 600 \text{ nm}$. Με την προσθήκη του διαλύματος DNA στο αρχικό διάλυμα, εμφανίζεται αυξημένος φθορισμός εκπομπής που οφείλεται στη σύνδεση του EtBr σύνδεσή του με του επιπέδου της φαινανθριδίνης μεταξύ δύο γειτονικών βάσεων της διπλής έλικας του DNA. Όταν σε αυτό το διάλυμα προστεθεί και μία δεύτερη ένωση η οποία συνδέεται με το DNA ισχυρότερα από το EtBr, παρατηρείται μείωση του φθορισμού. Τα φάσματα φθορισμού καταγράφηκαν σε ένα φασματοφωτόμετρο φθορισμού Jasco FP8200 και πρόγραμμα MicroLab Expert.

10.3. Ιξοδομετρία

Η επίδραση χημικών ενώσεων με το DNA μπορεί να μελετηθεί και με τη μέτρηση του ιξώδους καθώς οι υδροδυναμικές μετρήσεις είναι ευαίσθητες στην αύξηση του μήκους του DNA και η ιξοδομετρία είναι μία αρκετά αξιόπιστη μέθοδος για την εξακρίβωση του τρόπου σύνδεσης. Αύξηση του μήκους της έλικας του DNA προκύπτει σε ένα κλασικό μοντέλο παρεμβολής καθώς τα ζεύγη βάσεων διαχωρίζονται για να φιλοξενήσουν την ένωση με αποτέλεσμα και την αύξηση του ιξώδους.

- Αν η ένωση παρεμβάλλεται στο DNA, το DNA επιμηκώνεται και το ιξώδες αυξάνεται.
- Αν η ένωση συνδέεται ηλεκτροστατικά με το DNA, δεν υπάρχει καμία επίδραση στο μήκος του DNA και δεν παρατηρείται καμία σημαντική μεταβολή στο ιξώδες.
- Αν η ένωση προκαλεί ρήξη του DNA, το μήκος του DNA ελαττώνεται και το ιξώδες μειώνεται σημαντικά.

Το κινηματικό ιξώδες του DNA παρουσία ή απουσία της προς μελέτη ένωσης μετρήθηκε σε ένα γυάλινο τριχοειδές ιξωδόμετρο τύπου Ubbelohde. Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα ίδια με το πείραμα με φασματοσκοπία UV-Vis. Η αρχική συγκέντρωση του CT-DNA

υπολογίστηκε με UV-Vis για να ελεγχθεί η καθαρότητα του από πρωτεΐνες. Η τιμή του κινηματικού ιξώδους υπολογίστηκε ως ο μέσος όρος μετρήσεων σε τριπλή επανάληψη σε σταθερή θερμοκρασία (25oC) [98].

Το διάλυμα του CT-DNA (0.1 mM) επώαστηκε με τις ενώσεις ώστε η αναλογία [complex]/[DNA] να είναι $r = 0, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.10, 0.12, 0.14, 0.16, 0.18, 0.2, 0.22, 0.24, 0.26, 0.28, 0.3, 0.32, 0.34$. Το σχετικό ιξώδες του DNA (η/η_0) σχετίζεται με το μήκος του DNA (L/L_0) μέσω της εξίσωσης $L/L_0 = (\eta/\eta_0)^{1/3}$, όπου η = ιξώδες DNA παρουσία της ένωσης, η_0 = ιξώδες DNA χωρίς την ένωση, L_0 = μήκος του DNA χωρίς της ένωση

Το ιξώδες η υπολογίζεται ως εξής: $\eta = (t - t_0)/(t_0)$, όπου t = ο χρόνος ροής του CT-DNA παρουσία ή απουσία της ένωσης, και t_0 = ο χρόνος ροής του ρυθμιστικού διαλύματος μόνο [99-101].

Αποτελέσματα

11. Χαρακτηρισμός Ένωσης

Γενικό Μέρος

Η ένωση συντέθηκε με αντίδραση της σιπροφλοξασίνης με το τριφαίνυλο αντιμόνιο σε αναλογία 2:1 παρουσία διαιθυλαιθέρα (Et₂O) και υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂). Η ένωση χαρακτηρίστηκε με σημείο τήξης, διαλυτότητα, φασματοσκοπίες δονήσεων υπέρυθρου (FT-IR), πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (¹H-NMR), υπεριώδους-ορατού (UV-Vis), φθορισμού ακτίνων X (XRF), ανάλυση περίθλασης σκόνης ακτίνων X (XRPD) και ατομική απορρόφηση, κρυοσκοπία και με φασματομετρία μάζας υψηλής ανάλυσης (HR-MS).

11.1. Σημείο τήξης

Προσδιορίστηκε το σημείο τήξεως του συμπλόκου CIPAN υπό κανονικές συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης με εφαρμογή θερμότητας. Όπως παρατηρούμε από τις τιμές του Πίνακα, το σύμπλοκο τήκεται σε διαφορετική θερμοκρασία από τον αντίστοιχο υποκαταστάτη.

Ένωση	Θερμοκρασία
CIPAN	234-237°C
HCIP	255-257 °C
tpSb	52-54°C

Πίνακας 11.1 Σημεία τήξης των ενώσεων CIPAN, HCIP, tpSb

11.2. Διαλυτότητα

<i>Διαλύτες</i>	<i>CIPAN</i>
n-hexane	-
Toluene	-
CH₂Cl₂	-
CHCl₃	-
Acetone	-
MeOH	+
MeCN	-
DMSO	+++
DMF	++
H₂O	-

Πίνακας 11.2 Διαλυτότητα της ένωσης CIPAN

Όπως φαίνεται από το πίνακα, το σύμπλοκο είναι διαλυτο μόνο σε τρεις από τους διαλύτες, με μεγαλύτερη διαλυτότητα στο DMSO, και μικρότερη στο DMF και στη MeOH.

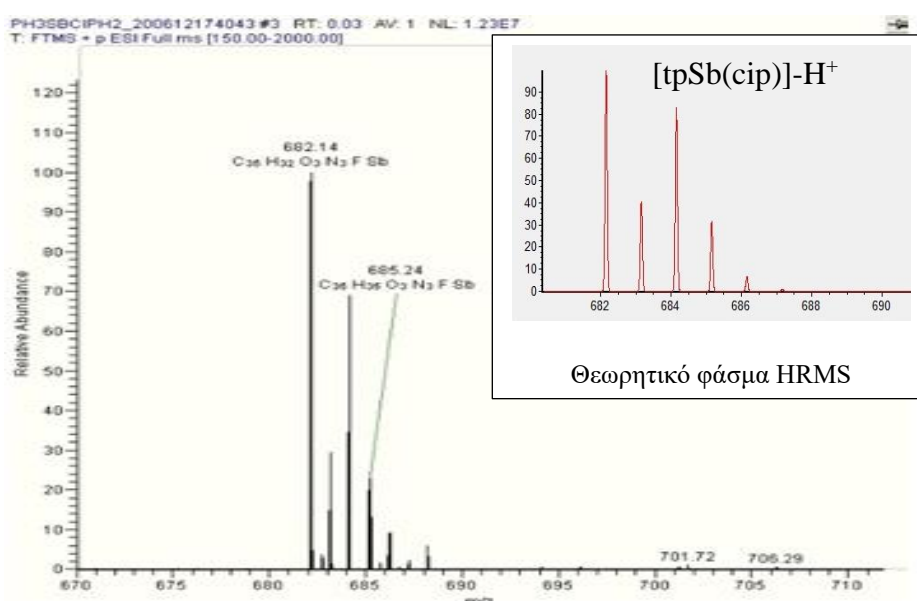
11.1. Κρυοσκοπία



Διαλύθηκαν 0,4mg ένωσης CIPAN σε 50μl DMSO και έγιναν πολλαπλές μετρήσεις. Από την ταπείνωση του σημείο πήξης το διαλύτη DMSO, υπολογίστηκε πως το μοριακό βάρος της ένωσης CIPAN είναι 683,416 g/mol, το οποίο αντιστοιχεί σε αναλογία 1:1 (HCIP: tpSb), καθώς το μοριακό βάρος της HCIP είναι 331,346g/mol και του tpSb 353,07g/mol.

11.2. Φασματομετρία μάζας υψηλής ανάλυσης (HR-MS).

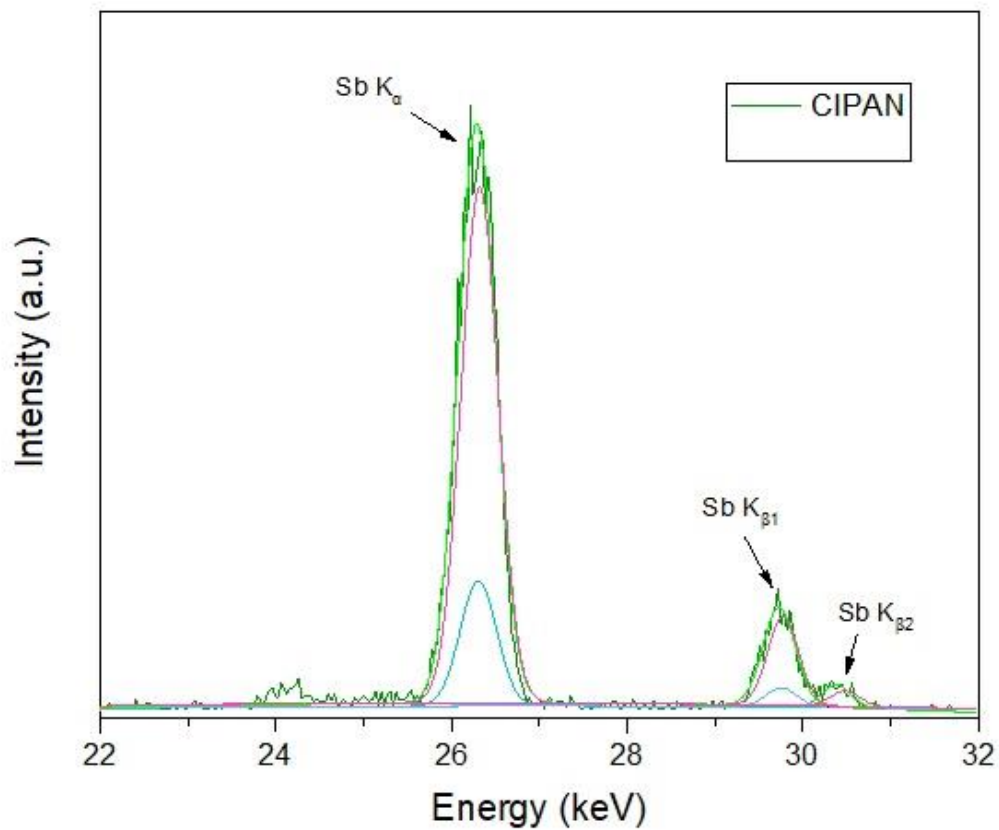
Το μοριακό βάρος επιβεβαιώθηκε με φασματομετρία μάζας υψηλής ανάλυσης (high resolution mass spectrometry, HR-MS). Μετά την ανάλυση HRMS του συμπλόκου, η οποία έγινε σε διάλυμα MeOH, βρέθηκε το μοριακό θραύσμα στα 684,14 (m/z) το οποίο αντιστοιχεί σε $C_{35}H_{32}O_3N_3FSb$, το οποίο είναι η δομή συν ένα υδρογόνο, καθώς η μέτρηση έγινε με θετικά ιόντα. Το πειραματικό φάσμα ταυτίζεται απόλυτα με το θεωρητικό φάσμα για την ένωση $[tpSb(cipH)]-H^+$.



Εικόνα 11.1 Πειραματικό μοτίβο του αντιμονίου υπολογίστηκε με το πρόγραμμα Excalibur

11.1. Φασματοσκοπία Φθορισμού Ακτίνων X (XRF)

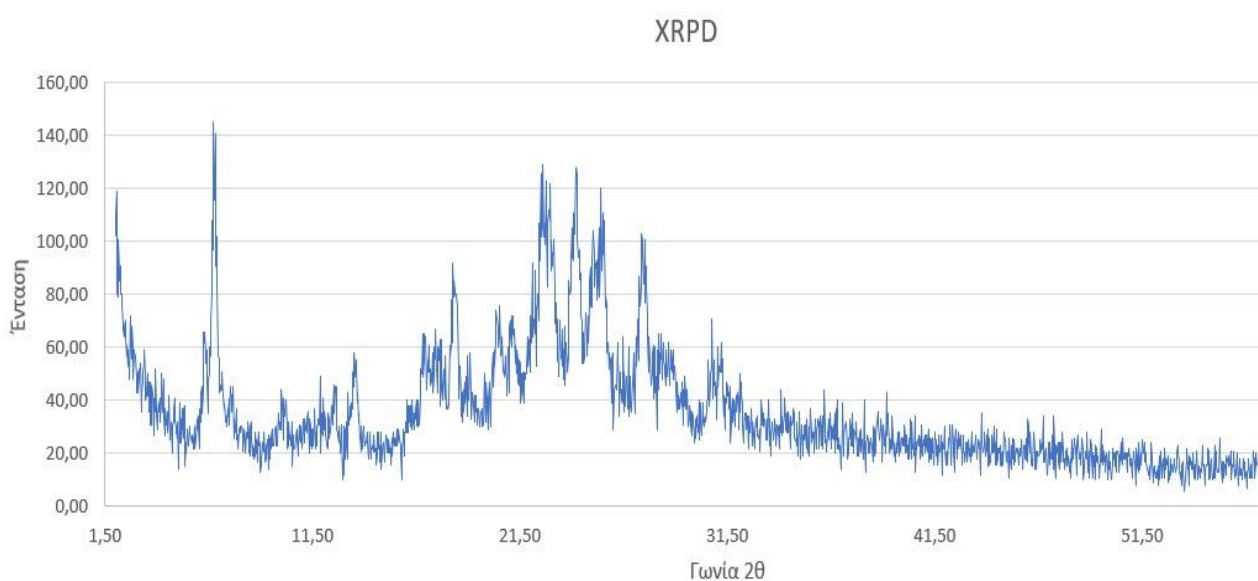
Από την φασματοσκοπία φθορισμού ακτίνων X βρέθηκε το ποσοστό του αντιμονίου στην ένωση το οποίο είναι $13.5 \pm 1.9\%$ w/w, το θεωρητικό ποσοστό αντιμονίου που θα περιείχε η ένωση υπολογίστηκε 17.8% και ταιριάζει με την μέτρηση του XRF. Στην παρακάτω εικόνα φαίνεται το φάσμα ακτίνων X του συμπλόκου



Εικόνα 11.2 Φάσμα XRF, περιετικότητα CIPAN σε Αντιμόνιο(Sb)

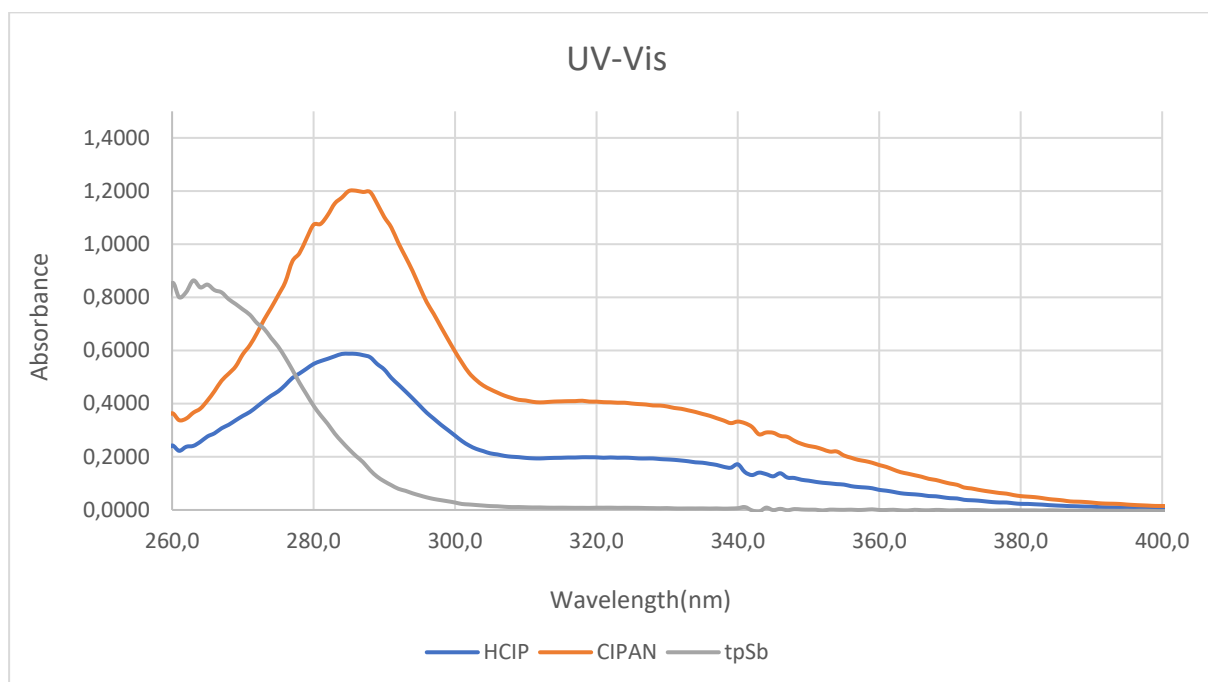
11.2. Ανάλυση περίθλασης ακτίνων X σε σκόνη (X-ray powder diffraction, XRPD)

Στην παρακάτω εικόνα (11,3) φαίνεται το φάσμα XRPD του συμπλόκου CIPAN. Από το γράφημα αυτό προκύπτει ότι η σκόνη του προϊόντος είναι μικροκρυσταλλική λόγω των κορυφών που εμφανίζονται.



Εικόνα 11.3 Φάσμα XRPD του συμπλόκου CIPAN

11.1. Φασματοσκοπία Υπεριώδους-Ορατού (UV-Vis)



Εικόνα 11.4 Φάσμα UV-Vis του CIPAN σε σύγκριση με HCIP και tpSb

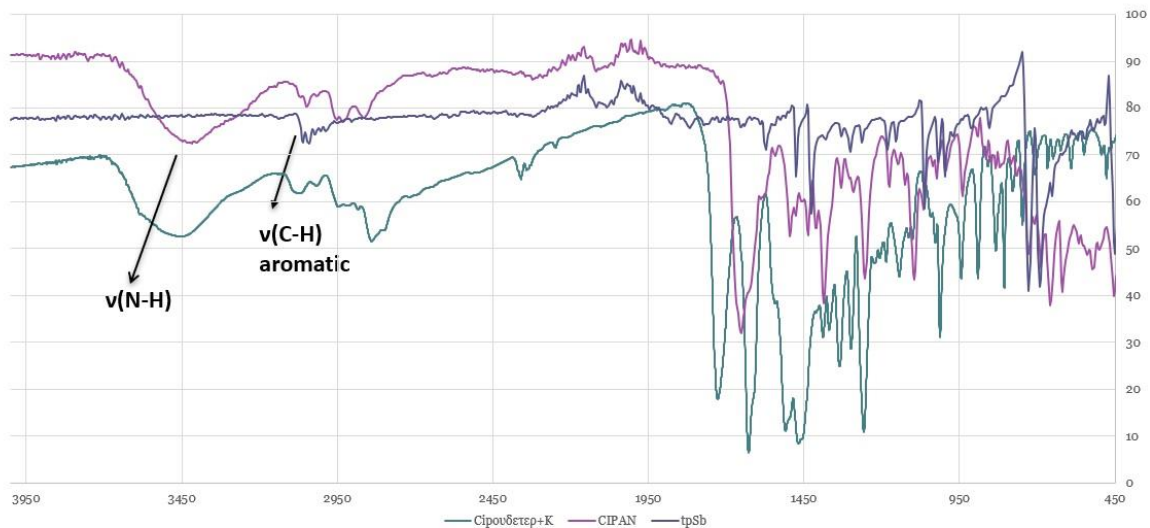
Στην παραπάνω εικόνα 11.4 παρουσιάζονται τα φάσματα ορατού υπεριώδους σε διαλύματα DMSO του tpSb (γκρι) σε συγκέντρωση $5 \cdot 10^{-5}$ M, της σιπροφλοξασίνης (μπλε) σε συγκέντρωση 10^{-5} M και του συμπλόκου CIPAN σε συγκέντρωση 10^{-5} M (πορτοκαλί). Τα φάσματα λήφθηκαν σε διαλύματα DMSO.

	ϵ ($\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)
<i>HCIP</i>	$5.88 \cdot 10^4$ (285)
<i>tpSb</i>	$1.72 \cdot 10^4$ (263)
<i>CIPAN</i>	$12.0 \cdot 10^4$ (285)
	$3.66 \cdot 10^4$ (263)

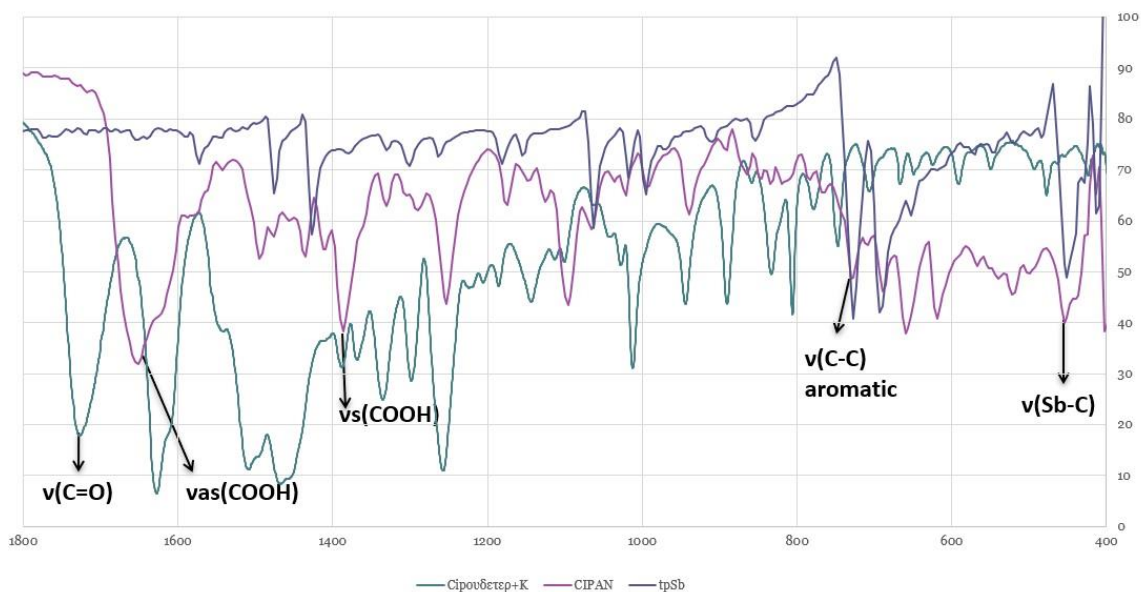
Πίνακας 11.3 Συντελεστής μοριακής απορρόφησης των υποκαταστατών και του συμπλόκου CIPAN

Από τα φάσματα βρέθηκαν τα λ_{\max} των υποκαταστατών και υπολογίστηκε ο συντελεστής μοριακής απορρόφησης από τον τύπο $A=b*\epsilon*c$ (όπου $A=$ η απορρόφηση, $b=$ το μήκος της κυψελίδας, $\epsilon=$ συντελεστής μοριακής απορρόφησης και $c=$ η συγκέντρωση της ουσίας), ο οποίος είναι μοναδικός για κάθε ένωση. Στον πίνακα 11.3 απεικονίζονται τα λ_{\max} των υποκαταστατών και οι συντελεστές μοριακής απορρόφησης αυτών και του συμπλόκου στα ίδια λ_{\max} . Οι συντελεστές μοριακής απορρόφησης του συμπλόκου είναι διπλάσιοι από τους αντίστοιχους των δυο υποκαταστατών, το οποίο αποτελεί ένδειξη της ένταξης της σιπροφλοξασίνης στο μέταλλο.

11.2. Δονητική φασματοσκοπία υπέρυθρου μετασχηματισμού Fourier (FT-IR).



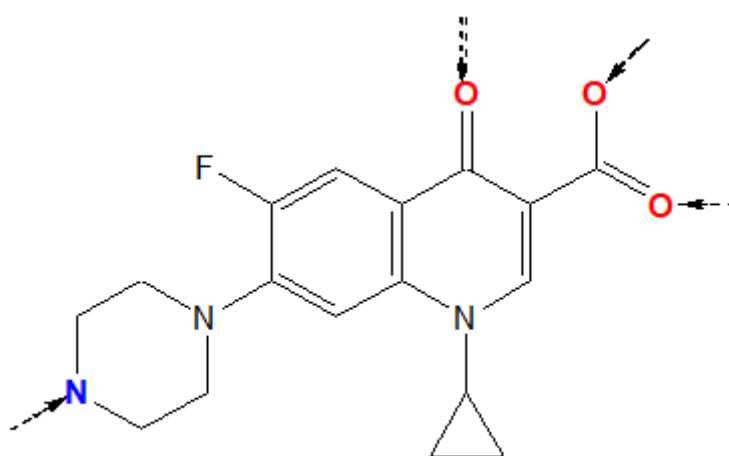
Εικόνα 11.5 Φάσμα IR του συμπλόκου CIPAN σε σύγκριση με την ιοντική ένωση CIPK και το tpSb



Εικόνα 11.6 Φάσμα IR του συμπλόκου CIPAN σε σύγκριση με την ιοντική ένωση KCIP και το tpSb στη περιοχή του δακτυλικού αποτυπώματος

Στην εικόνα 11.5 και 11.6 απεικονίζονται οι δονήσεις δεσμών του συμπλόκου CIPAN (μωβ) σε σύγκριση με τις δονήσεις δεσμών της ιοντικής ένωσης της σιπροφλοξασίνης KCIP (γαλάζιο) και του trSb (μπλέ σκούρο). Αρχικά στα $3020\text{-}3060\text{ cm}^{-1}$ η δόνηση τάσης του δεσμού $\nu(\text{C-H})$ των αρωματικών H στο φάσμα του συμπλόκου. Παρατηρείται επίσης η δόνηση του αρωματικού δεσμού $\nu(\text{C-C})$ των αρωματικών C στα 727 cm^{-1} και δόνηση του δεσμού $\nu(\text{Sb-C})$ στα 454 cm^{-1} που υπάρχουν τόσο στο trSb όσο και στο σύμπλοκο CIPAN.

Οι πιθανές θέσεις ένταξης της σιπροφλοξασίνης στο μέταλλο απεικονίζονται παρακάτω.



Εικόνα 11.7 Θέσεις ένταξης της σιπροφλοξασίνης στο μέταλλο Sb

Στο φάσμα του συμπλόκου CIPAN όμως παρατηρείται στα 3417 cm^{-1} η ευρεία δόνηση του δεσμού $\nu(\text{N-H})$ όπως και στην ιοντική ένωση της σιπροφλοξασίνης και κατά συνέπεια το άζωτο δεν συμμετέχει στην ένταξη της σιπροφλοξασίνης στο μέταλλο Sb. Έπειτα από τη περιοχή του δακτυλικού αποτυπώματος που φαίνεται στην εικόνα 11.6, παρατηρείται η έλλειψη της δόνησης του καρβονυλίου $\nu(\text{C=O})$ στο φάσμα του συμπλόκου, υποδεικνύοντας την ένταξη του καρβονυλικού οξυγόνου στο μέταλλο. Ακόμη παρατηρείται μετατόπιση της ασύμμετρης $\nu_{\text{as}}(\text{COOH})$ και της συμμετρικής $\nu_{\text{s}}(\text{COOH})$ δόνησης του δεσμού της

καρβοξυλικής ομάδας στο φάσμα του συμπλόκου. Στο πίνακα 11.4 φαίνονται οι δονήσεις δεσμών και οι αντίστοιχοι κυματάρθμοι τους.

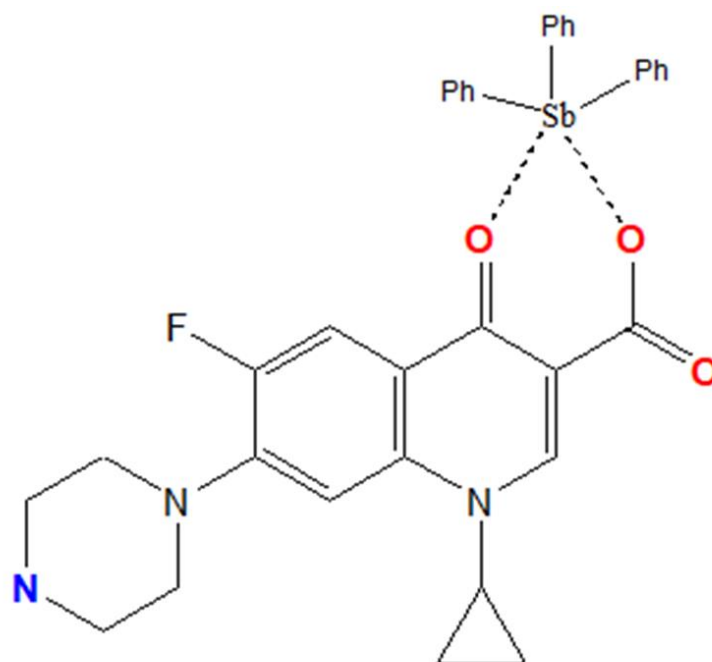
(cm^{-1})	$\nu(N-H)$	$\nu(C=O)$	$\nu_{as}(COO)$	$\nu_{s}(COO)$	$\Delta\nu(\nu_{as}-\nu_s)$
CIPAN	3417.9	-	1651.5	1386.5	267
KCIP	3436.5	1725	1630.5	1387.5	243

Πίνακας 11.4 Δονήσεις δεσμών στο σύμπλοκο CIPAN και στην ιοντική ένωση KCIP

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

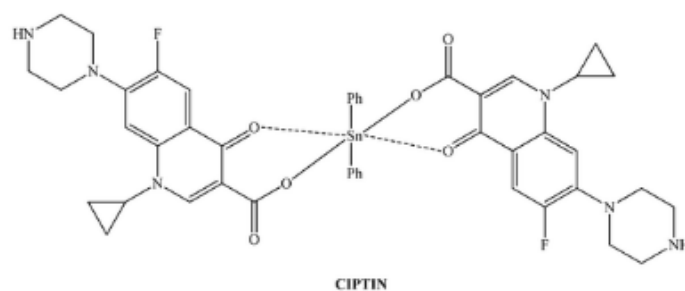
Πίνακας 11.5 Τύποι ένταξης βάση της $\Delta\nu(\nu_{as}-\nu_s)$ της καρβοξυλικής ένωσης

Συγκρίνοντας την διαφορά της ασύμμετρης και της συμμετρικής δόνησης της καρβοξυλικής ομάδας του συμπλόκου CIPAN και την αντίστοιχη της ιοντικής ένωσης KCIP, μπορούμε να συμπεράνουμε πως το οξυγόνο της καρβοξυλικής ομάδας εντάσσεται στο μέταλλο μονοδοντικά. Έτσι η δομή που προτείνεται βάση της φασματοσκοπίας IR είναι η ακόλουθη:



Εικόνα 11.8 Δομή του συμπλόκου CIPAN

Αντίστοιχη ένταξη παρατηρείται και στη δομή του συμπλόκου CIPTIN, όπου το καρβοξύλιο εντάσσεται μονοδοντικά στον κασσίτερο μαζί με το καρβονυλικό οξυγόνο.

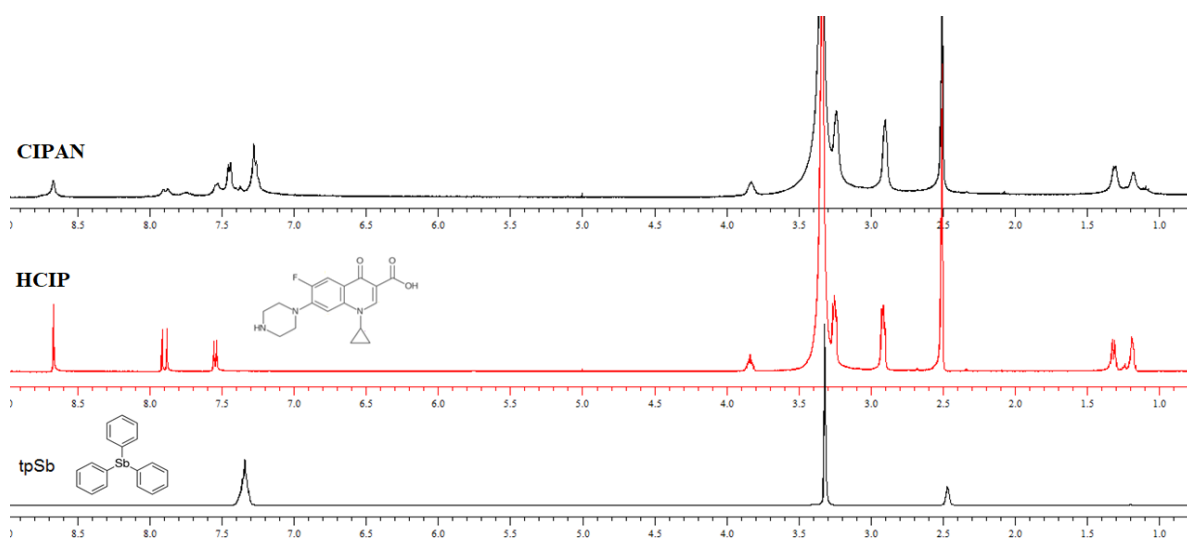


Εικόνα 11.9 Κρυσταλλική δομή του συμπλόκου CIPTIN [102]

11.3. Φασματοσκοπία $^1\text{H-NMR}$

Ο πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός (NMR) είναι ένα φυσικό φαινόμενο στο οποίο οι πυρήνες των ατόμων σε ένα μαγνητικό πεδίο απορροφούν και επανεκπέμπουν ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία. Αυτή η ενέργεια έχει μια συγκεκριμένη συχνότητα συντονισμού, η οποία εξαρτάται από την ισχύ του μαγνητικού πεδίου και τις μαγνητικές ιδιότητες των ισοτόπων κάθε ατόμου. Έτσι, χαρακτηριστικό γνώρισμα του NMR είναι η συχνότητα συντονισμού μιας συγκεκριμένης ουσίας που είναι ευθέως ανάλογη της έντασης του εφαρμοζόμενου μαγνητικού πεδίου.

Παρακάτω φαίνονται τα φάσματα $^1\text{H-NMR}$ του συμπλόκου CIPAN, της σιπροφλοξασίνης και του τριφένυλο-αντιμονίου σε διάλυμα δευτεριωμένου DMSO (d^6 -DMSO).



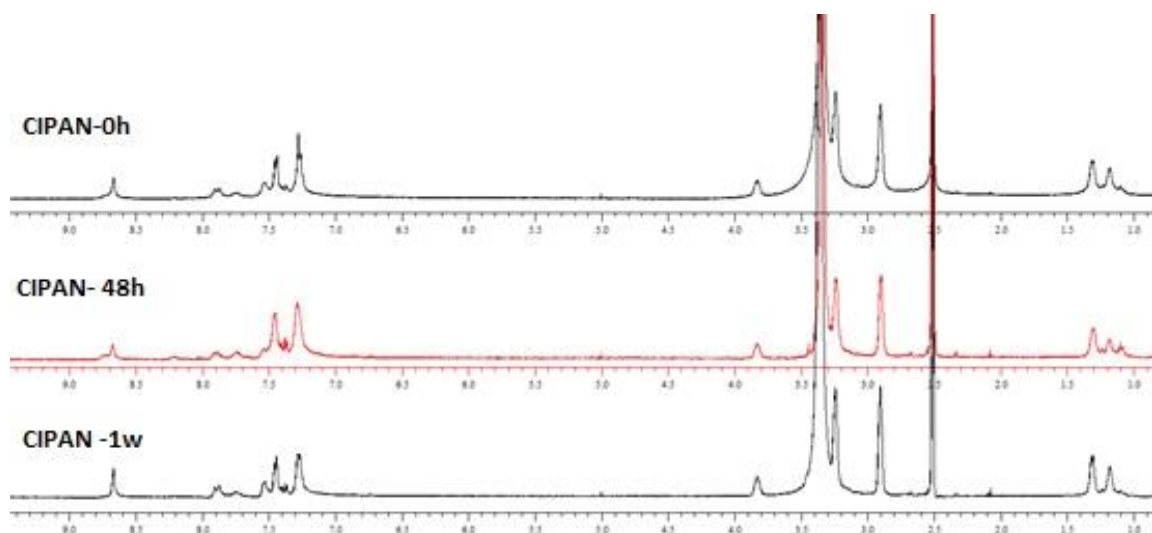
Εικόνα 11.7 Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ του CIPAN σε σύγκριση με HCIP και tpSb

Στην εικόνα 11.7 παρουσιάζονται τα φάσματα NMR από 9-1 ppm. Από τον συνδυασμό των παραπάνω φασμάτων παρατηρείται πως η κορυφή των αρωματικών πρωτονίων του φάσματος του tpSb σε συνδυασμό με τις κορυφές του υποκαταστάτη HCIP, εμφανίζονται στο φάσμα του συμπλόκου CIPAN.

11.4. Μελέτη Σταθερότητας

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

Προκειμένου να ελεγχθεί η σταθερότητα του συμπλόκου CIPAN σε διάλυμα για χρονικό διάστημα από 0 ώρες μέχρι και μια βδομάδα πάρθηκαν φάσματα διαλύματος της ένωσης χρησιμοποιώντας φασματόμετρο NMR. Ο διαλύτης που χρησιμοποιήθηκε για τα πειράματα σταθερότητας με $^1\text{H-NMR}$ φασματοσκοπία είναι το $\text{d}^6\text{-DMSO}$. Τα χρονικά διαστήματα που ελέγχθηκε η σταθερότητα περιλαμβάνουν όλους τους χρόνους επώασης με το σύμπλοκο που απαιτούνται για τα βιολογικά πειράματα.

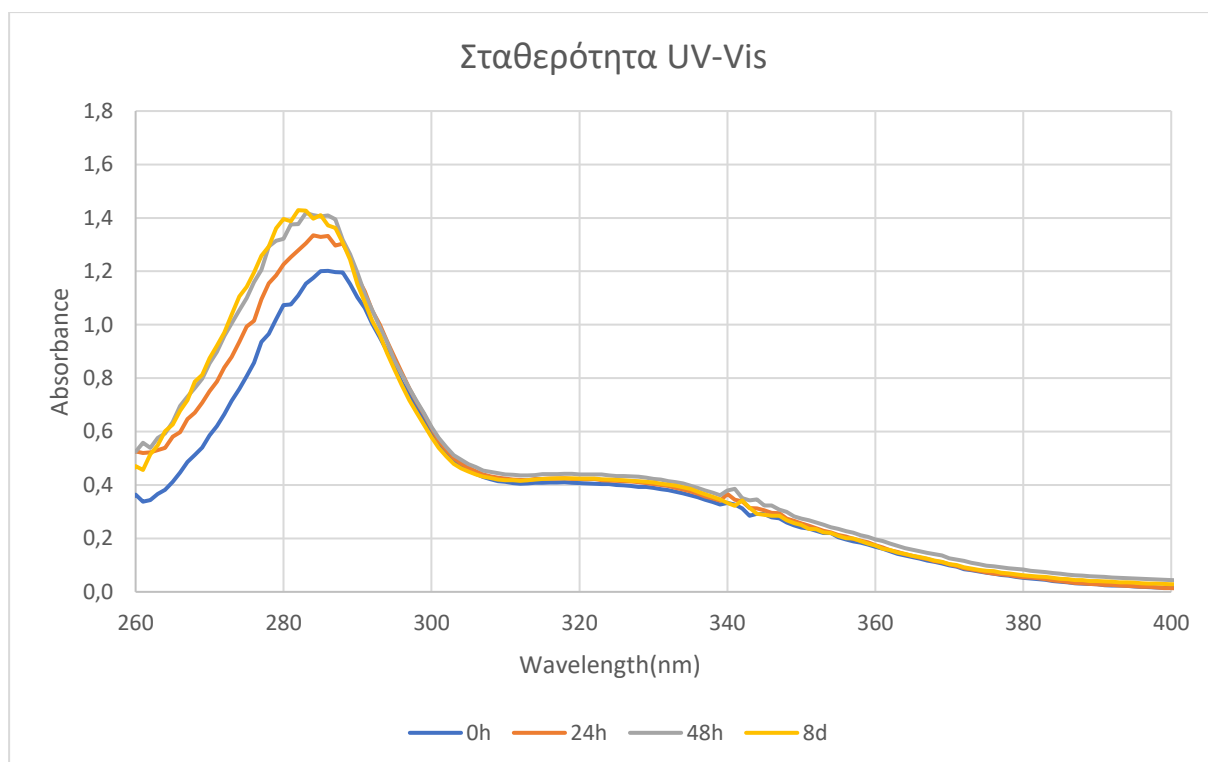


Εικόνα 11.8 Φάσματα της ένωσης CIPAN στις 0, 48 ώρες και 1 εβδομάδα

Το σύμπλοκο φαίνεται να παραμένει σταθερό στο διάστημα της μιας εβδομάδας, καθώς δεν παρατηρείται κάποια μεταβολή στα φάσματα που ληφθηκαν στις 0, 48 ώρες και 1 εβδομάδα. .

11.4.2. Σταθερότητα σε διάλυμα με φασματοσκοπία υπεριώδους/ορατού (UV-Vis)

Η μελέτη σταθερότητας του συμπλόκου ελέγχθηκε επιπλέον και μέσω φασματοσκοπίας UV-Vis. Για το λόγο αυτό, παρασκευάστηκε διάλυμα συγκέντρωσης 10^{-5} M, σε διαλύτη DMSO και τα χρονικά διαστήματα που ελέγχθηκε η σταθερότητα περιλαμβάνουν δηλαδή όλους τους χρόνους επώασης με τα σύμπλοκα που απαιτούνται για τα βιολογικά πειράματα.



Εικόνα 11.9 Φάσματα της ένωσης CIPAN στις 0, 24, 48 ώρες και 8 μέρες

Το σύμπλοκο βρέθηκε να είναι σταθερό σε διάλυμα μέχρι και για μια εβδομάδα, και τα χρονικά διαστήματα που ελέγχθηκαν είναι οι 0, 24, 48 ώρες και 8 μέρες μετά την λήψη του πρώτου φάσματος. Παρατηρείται μια αύξηση της απορρόφησης της τάξης του 12%.

12. Αντιμικροβιακή δράση

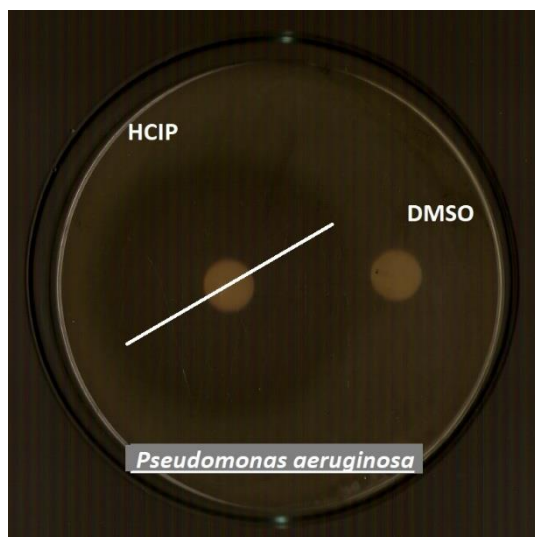
12.1. Ζώνες Αναστολής -IZ

Ως ζώνη αναστολής ορίζεται η διάμετρος κατά την οποία σταματά η ανάπτυξη των βακτηρίων. Για τα πειράματα παρασκευάστηκαν διαλύματα 1mM του CIPAN , HCIP και tpSb με διαλύτη DMSO και διάλυμα DMSO ως Control. Στο πίνακα φαίνονται τα αποτελέσματα των ζωνών αναστολής.

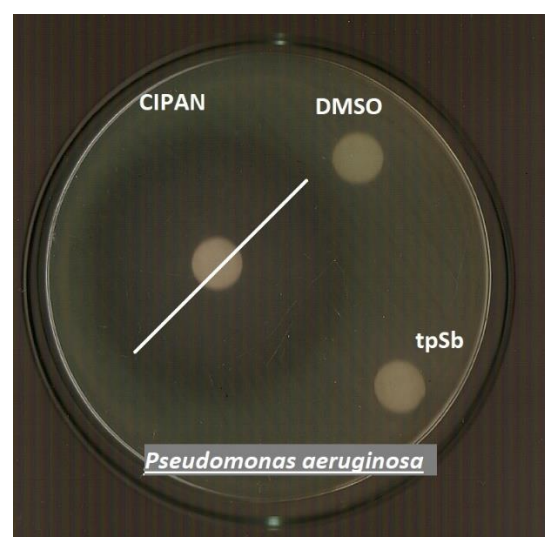
IZ (mm)	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E.coli</i>	<i>S.Aureus</i>	<i>S.Epidermidis</i>
CIPAN	45.7 ± 3.2	38 ± 2.9	33.1 ± 1.4	38.6 ± 1.5
HCIP	35.5 ± 0.6	33.0 ± 0.8	30.5 ± 0.6	37.5 ± 0.9
tpSb	9	9	9	9
DMSO	9	9	9	9

Πίνακας 12.1 Ζώνες Αναστολών των ενώσεων CIPAN, HCIP ,tpSb έναντι των βακτηρίων *P.aeruginosa*, *E.coli*, *S.Aureus*, *S.Epid* σε (mm)

Και τα τέσσερα βακτήρια χαρακτηρίζονται ως ευαίσθητα προς το σύμπλοκο καθώς οι ζώνες αναστολής είναι μεγαλύτερες των 17 mm.



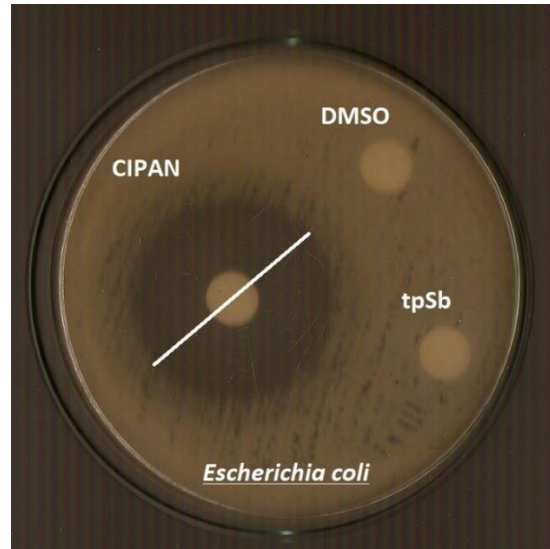
(α)



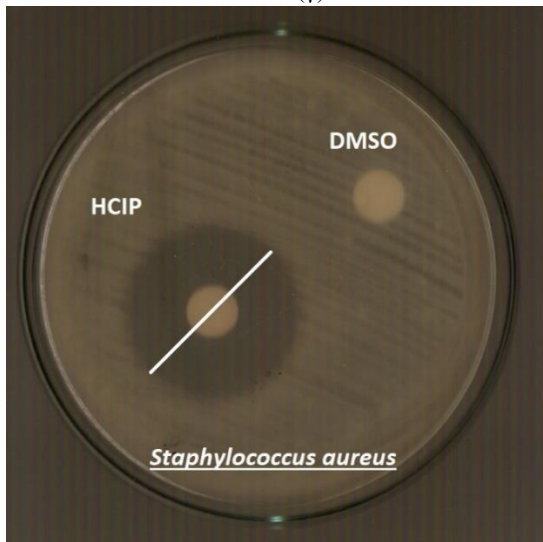
(β)



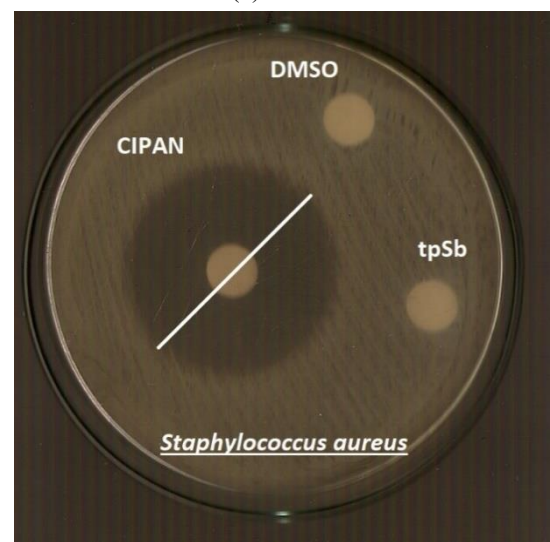
(γ)



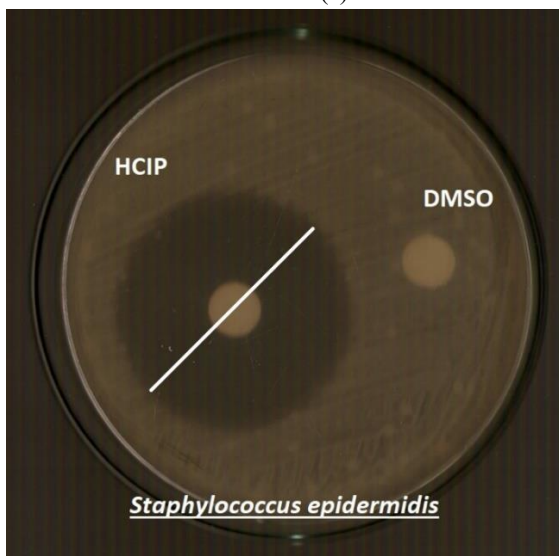
(δ)



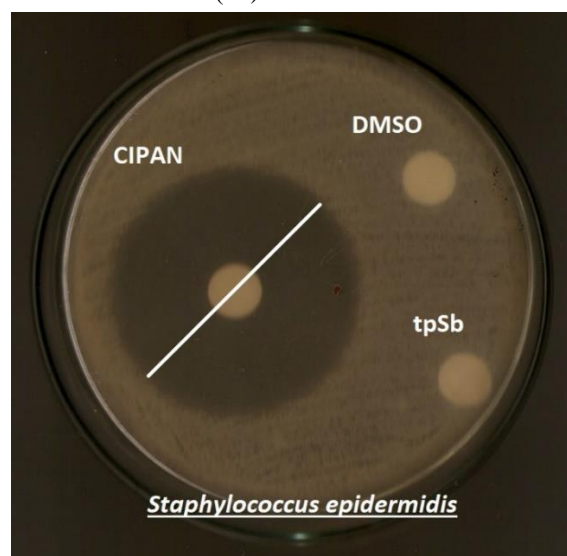
(ε)



(στ)



(ζ)



(η)

Εικόνα 12.1 Ζώνες αναστολής (IZ) των συμπλόκων στα βακτήρια PAO1(α,β) , E.coli (γ,δ) , S.Aureus (ε,στ) και S.Epid (ζ,η)

12.2. Ελάχιστη Ανασταλτική συγκέντρωση (MIC)

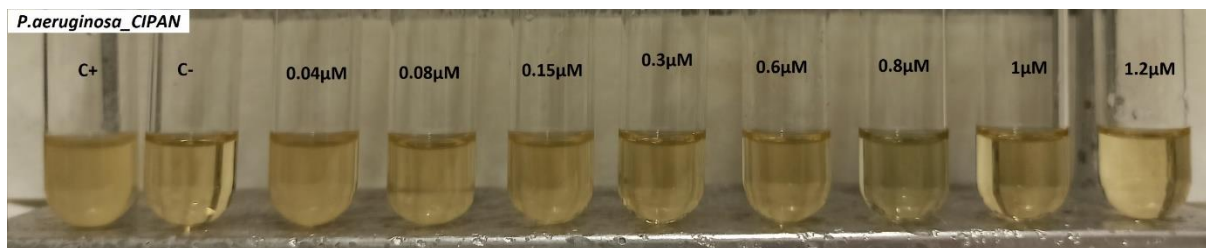
Εγινε μελέτη της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (minimum inhibitory concentration, MIC) με το σύμπλοκο CIPAN , και το tpSb σε διαλύματα DMSO στα τέσσερα βακτήρια *P.aeruginosa*, *E.coli*, *S. Aureus* και *S.Epid*. Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται οι τιμές των συγκεντρώσεων της MICσε (μM) για το κάθε βακτήριο.

MIC (μM)	<i>P.aeuroginosa</i>	<i>E.coli</i>	<i>S.Aureus</i>	<i>S.Epidermidis</i>
CIPAN	0.83±0.19	1.39±0.14	1.63±0.14	1.43±0.19
HCIP	1.048 ± 0.037	0.443 ± 0.041	1.459 ± 0.013	0.699 ± 0.025
tpSb	<400	<400	<400	<400

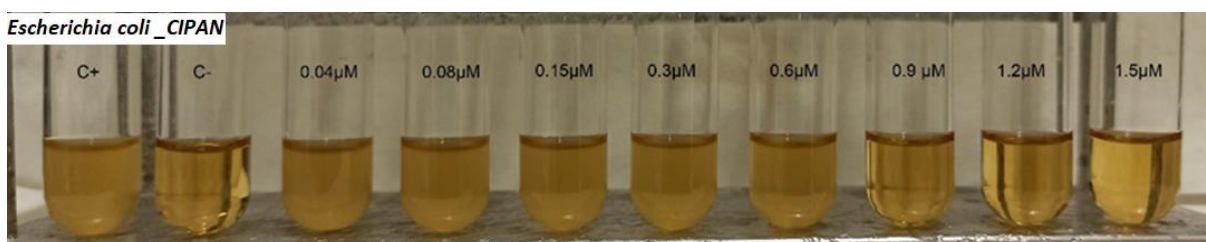
Πίνακας 12.2 Ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση(MIC) των CIPAN και tpSb σε σύγκριση με της HCIP [102]

Τα βακτήρια είναι ευαίσθητα έναντι του συμπλόκου CIPAN καθώς και της HCIP,κ ενώ φαίνονται ανθεκτικά έναντι του tpSb. Πιο συγκεκριμένα, το σύμπλοκο CIPAN είναι πιο δραστικό έναντι της *P.aeuroginosa* , ένα κατά Gram (-) βακτήριο.

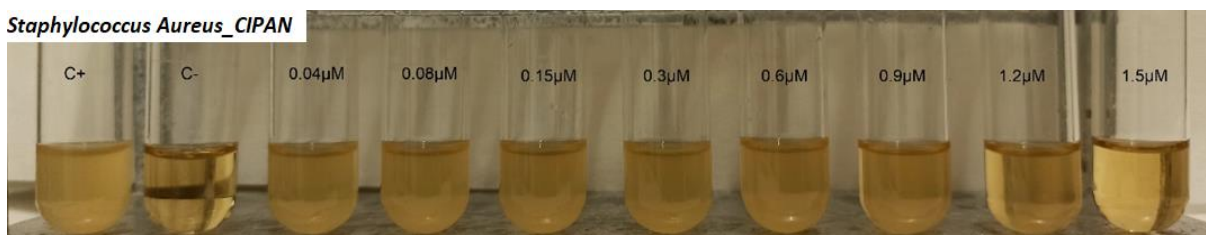
Στις παρακάτω εικόνες παρουσιάζονται οι υγρές καλλιέργειες των τεσσάρων βακτηρίων. Απεικονίζεται το θετικό control (C+) (πρώτος δοκιμαστικός σωλήνας) που περιέχει μόνο το θρεπτικό υλικό και τον μικροοργανισμό. Έπειτα, το αρνητικό control (C-) που περιέχει μόνο θρεπτικό υλικό χωρίς βακτήριο και στη συνέχεια τα υπόλοιπα διαλύματα αποτελούνται από θρεπτικό υλικό, βακτήριο και αυξανόμενη συγκέντρωση του συμπλόκου CIPAN.



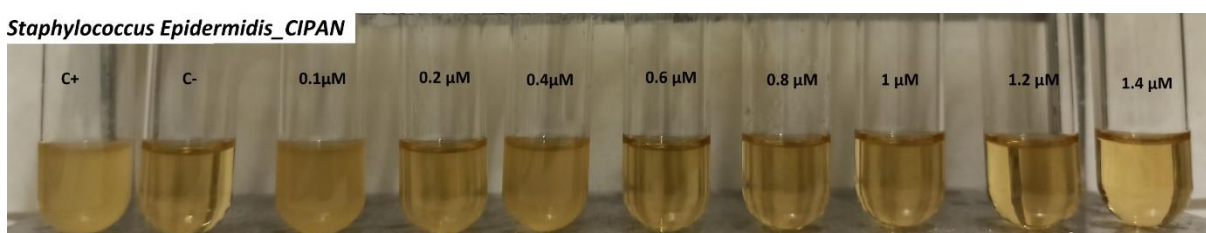
(α)



(β)



(γ)



(δ)

Εικόνα 12.2 Υγρές καλλιέργειες των βακτηρίων *P.aeruginosa* (α), *E.coli* (β), *S.Aureus* (γ) και *S.Epid* (δ) με το σύμπλοκο CIPAN

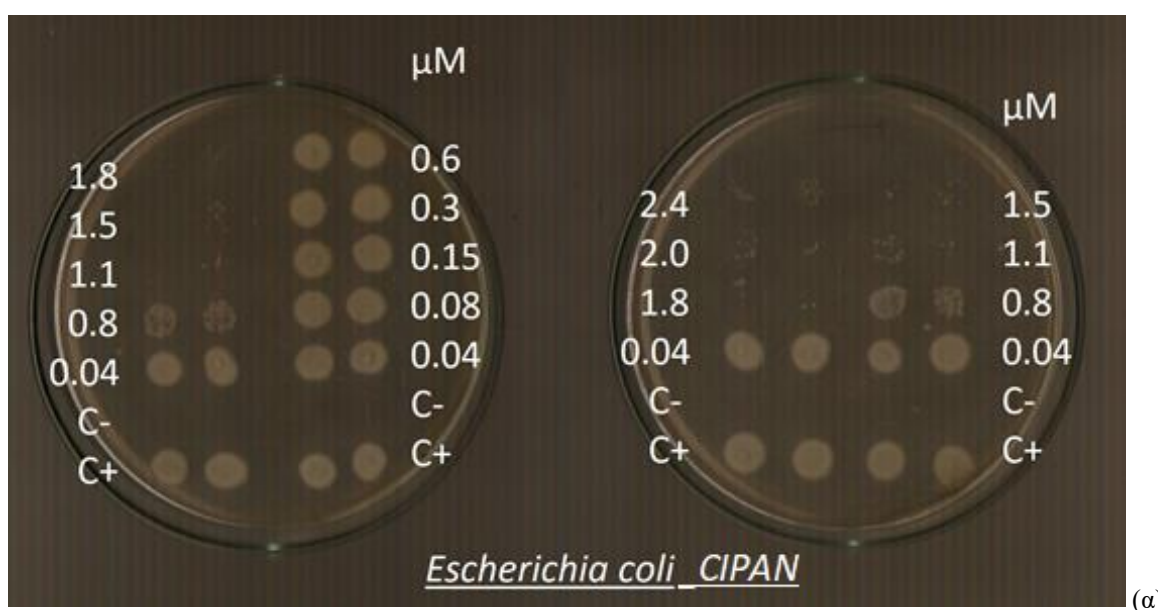
12.3. Ελάχιστη Βακτηριοκτόνος Συγκέντρωση (MBC)

Εγινε μελέτη της ελάχιστης βακτηριοκτόνος συγκέντρωσης (Minimum Bacterial Concentration – MBC) του συμπλόκου CIPAN στα τέσσερα βακτήρια *P.aeruginosa*, *E.coli*, *S. Aureus* και *S.Epid*. Στο *trSb* δεν μετρήθηκε η MBC καθώς η MIC ήταν >400 μM . Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται οι τιμές των συγκεντρώσεων της MBC σε (μM) για το κάθε βακτήριο.

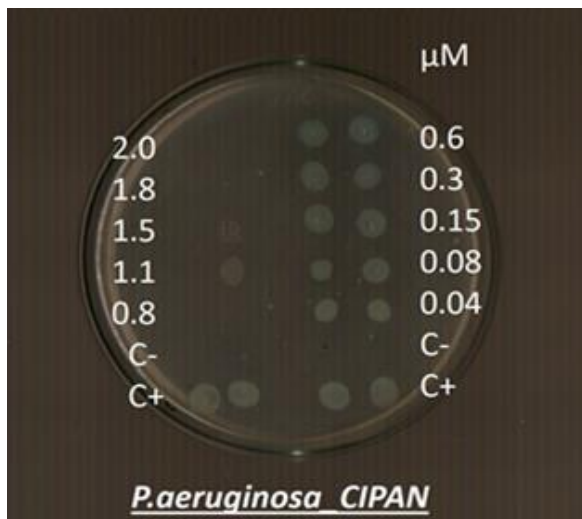
MBC (μM)	<i>P.aeruginosa</i>	<i>E.coli</i>	<i>S.Aureus</i>	<i>S.Epidermidis</i>
CIPAN	1.0 ± 0.20	>12	1.7 ± 0.6	1.5 ± 0.7
HCIP	1.280 ± 0.096	1.250 ± 0.098	2.225 ± 0.050	1.200 ± 0.160

Πίνακας 12.3 Ελάχιστη βακτηριοκτόνος συγκέντρωση(MBC) του CIPAN σε σύγκριση με της HCIP [102]

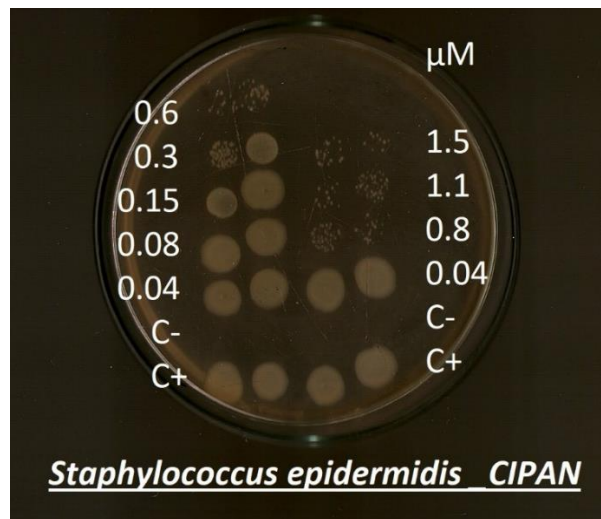
Στις παρακάτω εικόνες απεικονίζονται τα τρυβλία με τη στερεή καλλιέργεια των τεσσάρων βακτηρίων ,τα οποία εμβολιάστηκαν με 4 μL από κάθε δοκιμαστικό σωλήνα που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα της MIC.



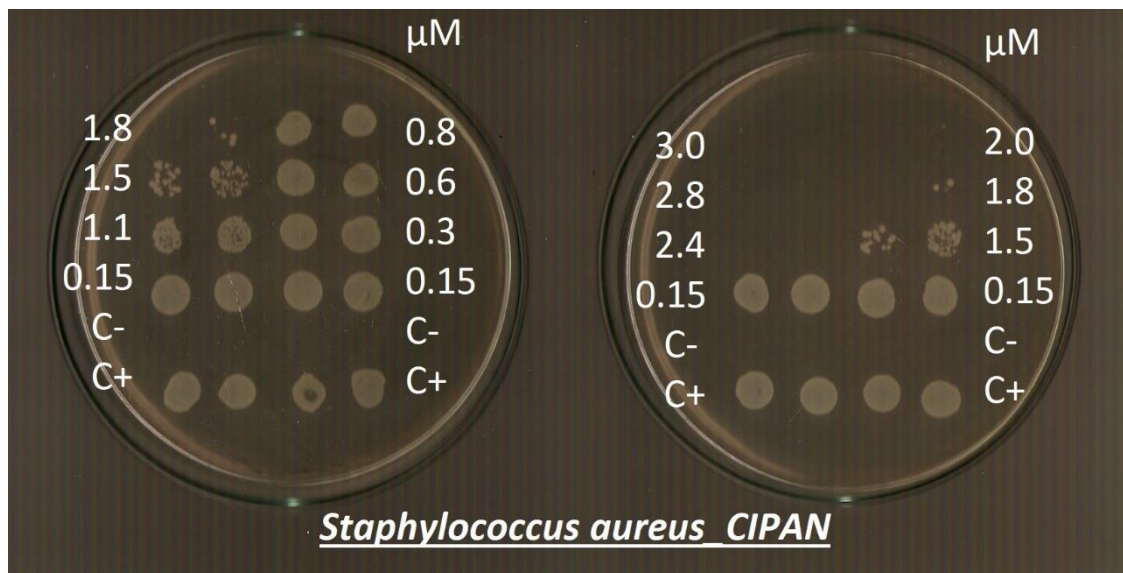
(α)



(β)



(γ)



(δ)

Εικόνα 12.4 MBC των βακτηρίων *E.coli*(α), *P.aeruginosa* (β), *S.Epid* (γ) και *S.Aureus* (δ) με το σύμπλοκο CIPAN

❖ MBC/MIC

Από την αναλογία MBC/MIC συμπεραίνεται αν μια χημική ουσία είναι βακτηριοκτόνος ή βακτηριοστατική. Μια ουσία χαρακτηρίζεται ως βακτηριοκτόνος, όταν θανατώνει το βακτηριακό πληθυσμό, ενώ ο όρος βακτηριοστατική, χαρακτηρίζει την αναστολή της ανάπτυξης των βακτηρίων, χωρίς τη θανάτωσή αυτών. Όταν η αναλογία MBC/MIC είναι ≤ 2 , θεωρείται πως η ουσία έχει βακτηριοκτόνο δράση, ενώ όταν $MBC/MIC \geq 4$, θεωρείται πως έχει βακτηριοστατική δράση.

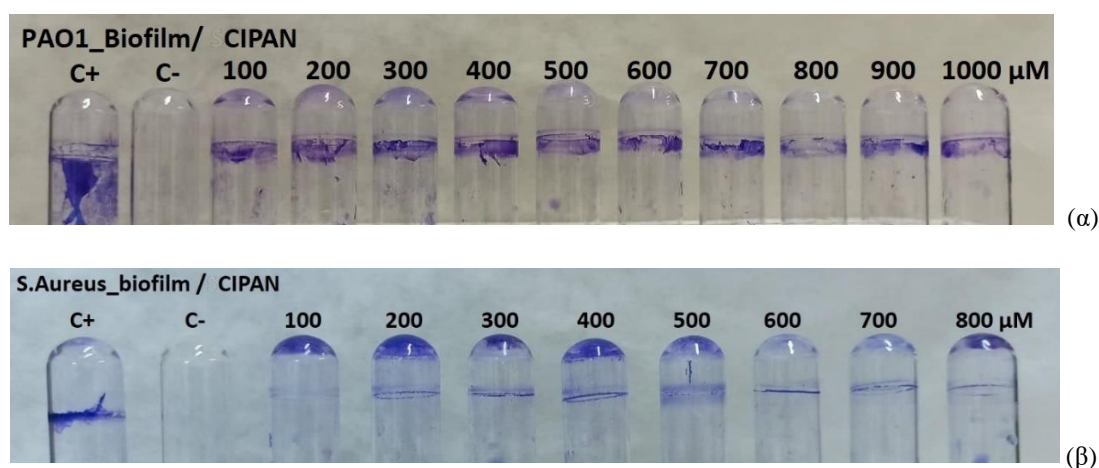
<i>MBC/MIC</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>E.coli</i>	<i>S.Aureus</i>	<i>S.Epidermidis</i>
CIPAN	1.20	8.63	1.04	1.04
HCIP	1.22	2.82	1.53	1.72

Πίνακας 12.4 Αναλογίες MBC/MIC των CIPAN και HCIP [102]

Από τον πίνακα 12.4 παρατηρείται πως το σύμπλοκο CIPAN έχει βακτηριοκτόνο δράση έναντι των βακτηρίων *P.aeruginosa*, *S.Aureus*, *S.Epidermidis*, ενώ έναντι της *E.coli* έχει βακτηριοστατική δράση.

12.4. Biofilm

Εγινε μελέτη της επίδρασης του συμπλόκου CIPAN σε διάλυμα DMSO στο biofilm της *P.aeruginosa* και του *S. Aureus*. Στην παρακάτω εικόνα παρουσιάζονται τα Biofilm των δυο βακτηρίων χρωματισμένα με την χρωστική crystal violet. Απεικονίζεται το θετικό control (C+) (πρώτος δοκιμαστικός σωλήνας) που περιέχει μόνο biofilm. Έπειτα, το αρνητικό control (C-) που περιείχε μόνο θρεπτικό και απουσιάζει το biofilm. Οι υπόλοιποι δοκιμαστικοί σωλήνες αντιστοιχούν στην ανάπτυξη του biofilm παρουσία του CIPAN σε εύρος συγκεντρώσεων από 100-1000 μM .



Εικόνα 12.5 Biofilm των βακτηρίων *P.aeruginosa* (α) και *S.Aureus* (β) με το σύμπλοκο CIPAN

Biofilm (μM)	<i>P.aeruginosa</i>	<i>S.Aureus</i>
CIPAN	998.3	--
HCIP	2140	2463

Πίνακας 12.5 Biofilm των βακτηρίων PAO1 και S.Aureus των CIPAN και HCIP [102]

Από τον πίνακα 12.5 φαίνεται πως το σύμπλοκο έχει διπλάσια δράση έναντι του βιοφιλμ του βακτηρίου *P.aeruginosa* σε σχέση με την HCIP, ενώ δεν εμφανίζει δράση έναντι του βιοφιλμ του *S.Aureus*.

13. Μελέτη τοξικότητας

13.1. Τοξικότητα *in vitro* σε φυσιολογικά κύτταρα MRC-5

Η κυτταροτοξικότητα του συμπλόκου CIPAN ελέγχθηκε *in vitro* έναντι της φυσιολογικής κυτταρικής σειράς MRC-5. Τα MRC-5 είναι φυσιολογικοί ανθρώπινοι ινοβλάστες πνεύμονος που προέρχονται από έμβρυο και συνήθως χρησιμοποιούνται για να ελεγχθεί η τοξικότητα των εκάστοτε σύμπλοκων ενώσεων [90]. Για το πείραμα χρησιμοποιήθηκε διάλυμα CIPAN σε DMSO .

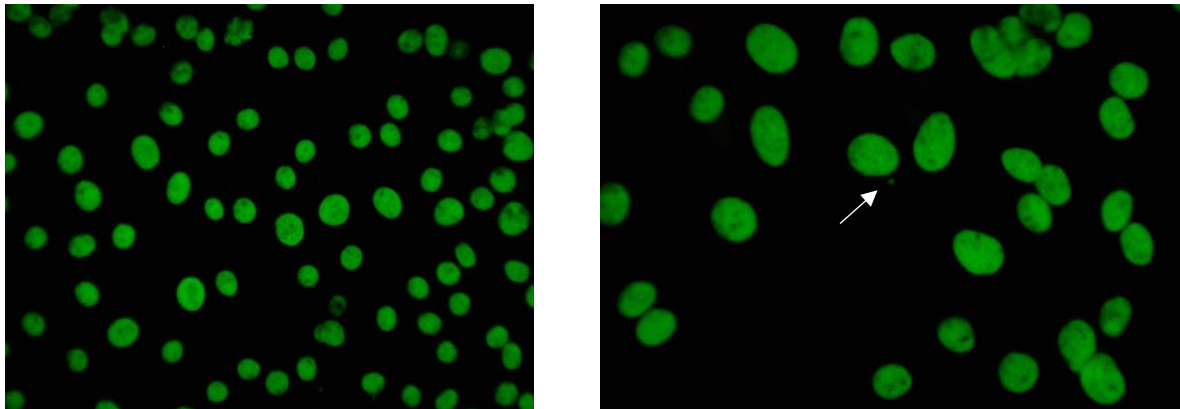
<i>IC</i> ₅₀ (μM)	MRC-5
CIPAN	10,3 ±0,43
HCIP	>30

Πίνακας 13.1 Τιμές *IC*₅₀ σε (μM) του συμπλόκου CIPAN και της HCIP σε κύτταρα MRC-5

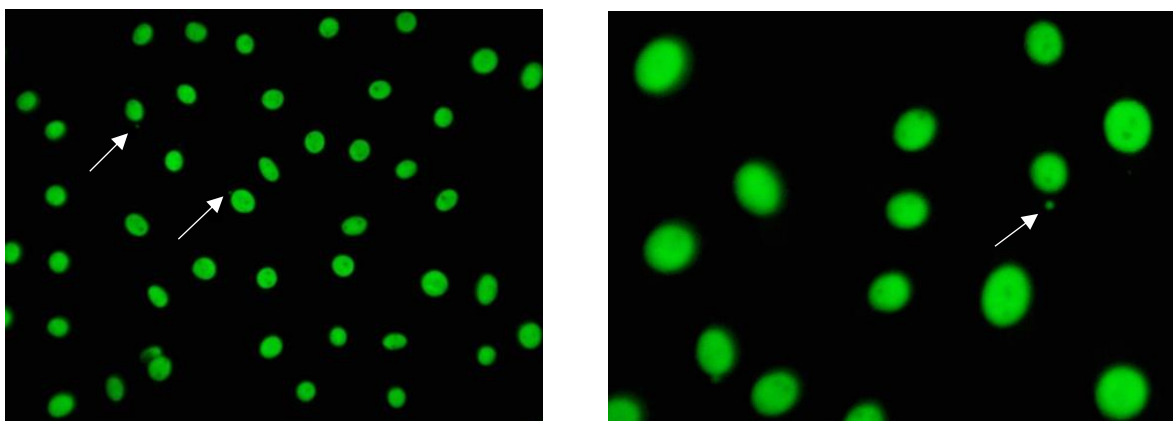
Σπο την τιμή της *IC*₅₀, συμπεραίνουμε πως το σύμπλοκο CIPAN είναι τοξικό *in vitro* σε συγκέντρωση 10 φορές μεγαλύτερη της MIC των βακτηρίων *P.aeruginosa*, *E.coli*, *S. Aureus* και *S.Epid*.

13.2. Έλεγχος της *in vitro* γενετοξικότητας με τη μέθοδο των μικροπυρήνων

Η γενετοξικότητα *in vitro* του συμπλόκου CIPAN ελέγχθηκε με τη μέθοδο των μικροπυρήνων σε φυσιολογικά κύτταρα MRC-5. Η παρουσία των μικροπυρήνων (micronucleus, MN) στα κύτταρα είναι βιοδείκτης μεταλλαξιόγону, γονοτοξικής ή τερατογόνου δράσης μιας ουσίας. Για το πείραμα χρησιμοποιήθηκε διάλυμα συγκέντρωσης 10^{-3} M σε διαλύτη DMSO.



(α)



(β)

Εικόνα 13.1. Αντιπροσωπευτικές εικόνες με μικροπυρήνες που σχηματίστηκαν στα MRC-5 μετά από επώαση 48 ωρών απουσία (α) ή παρουσία του συμπλόκου CIPAN (β). Με τα βέλη δηλώνονται οι μικροπυρήνες.

<i>Micronucleus (%)</i>	<i>MRC-5</i>
Control	0,85
DMSO	1,0
CIPAN	2,64
Cisplatin	1.6

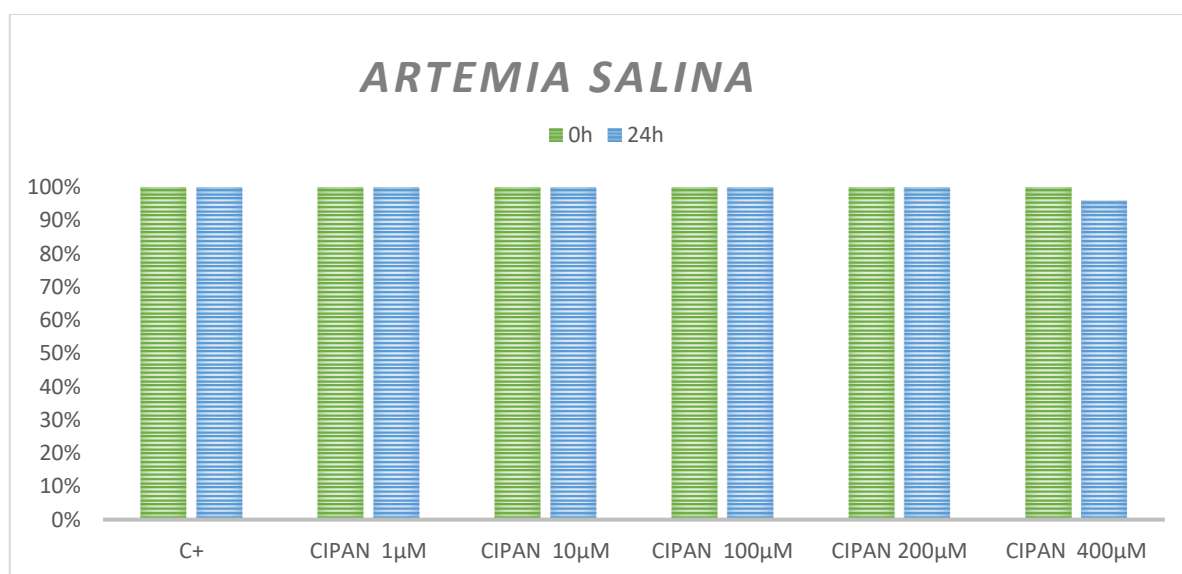
Πίνακας 13.2 Ποσοστό (%) εμφάνισης μικροπυρήνων στα κύτταρα MRC-5 μετά από την επώαση στη τιμή IC₅₀ του συμπλόκου CIPAN, σε διαλύτη DMSO και στο cisplatin [90]

Στον πίνακα 13.2 παρατηρείται τα κύτταρα που επώαστηκαν σε διάλυμα με το σύμπλοκο CIPAN με συγκέντρωση ίση με την IC₅₀ αυξάνεται το ποσοστό εμφάνισης των μικροπυρηνίσκων. Φαίνεται λοιπόν πως *in vitro* εμφανίζει χαμηλή γενετοξικότητα σε συγκέντρωση 10 φορές μεγαλύτερη της MIC.

13.3. Έλεγχος της *in vivo* τοξικότητας στον ζωντανό οργανισμό

Artemia salina

Η τοξικότητα του συμπλόκου CIPAN πέρα από τα φυσιολογικά κύτταρα (*in vitro*) ελέγχθηκε και *in vivo* χρησιμοποιώντας τον ζωντανό οργανισμό μοντέλο *Artemia salina* (γαρίδα άλμης). Ο οργανισμός *Artemia salina* έχει μεγάλη ευαισθησία σε τοξίνες και τα αποτελέσματα αυτού είναι συγκρίσιμα με τα αποτελέσματα θηλαστικών.



Εικόνα13.2 Γραφική παράσταση Ποσοστό (%) βιωσιμότητας του ζωντανού οργανισμού *Artemia salina* στις 0h και 24h σε διάλυμα CIPAN

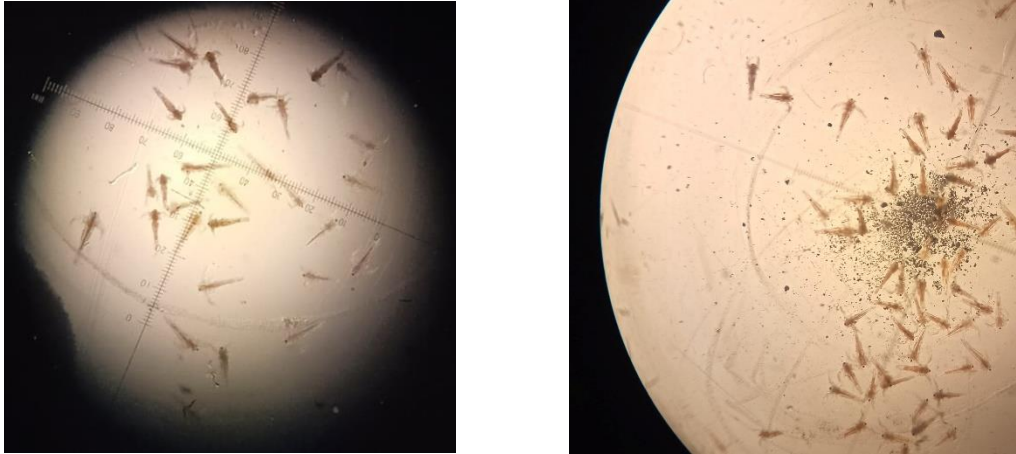
Artemia Salina

Ποσοστό βιωσιμότητας (%)

Concentration	Control	1 μM	10 μM	100 μM	200 μM	400 μM
CIPAN	100± 0,00	100± 0,0	100± 0,0	100 ± 0,0	100 ± 0,0	98,3±1,8
HCIP	100± 0,00	100± 0,0	100± 0,0	100 ± 0,0	100 ± 0,0	100 ± 0,00

Πίνακας 13.3 Ποσοστό (%) βιωσιμότητας του ζωντανού οργανισμού *Artemia salina* μετά από επώαση σε διάλυμα CIPAN και HCIP

Οι συγκεντρώσεις στις οποίες ελέγχθηκε η πιθανή τοξική δράση των ενώσεων CIPAN και HCIP περιλαμβάνουν την τιμή της MIC (1 μ M) και 400 φορές μεγαλύτερη αυτής. Όπως παρατηρείται στο πίνακα 13.3, το σύμπλοκο δεν παρουσιάζει τοξικότητα *in vivo* ακόμη και στη μεγαλύτερη συγκέντρωση (400 μ M).

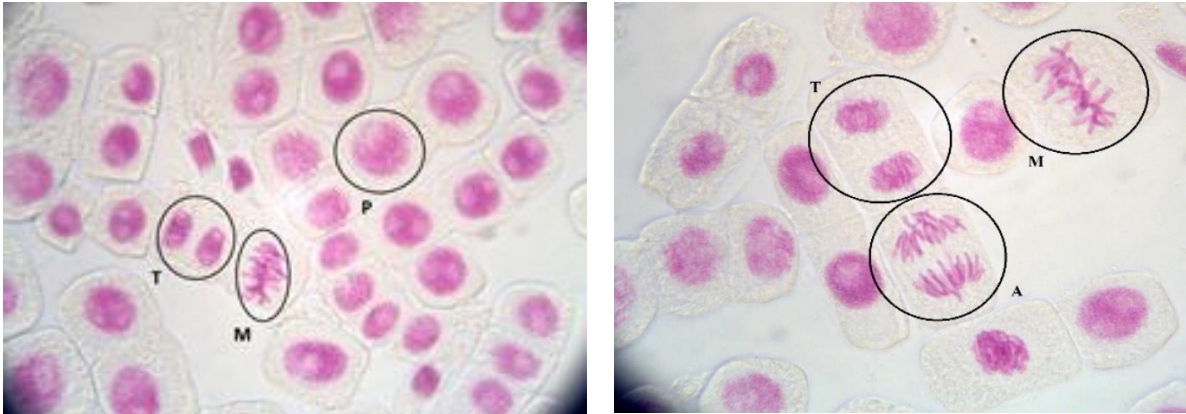


Εικόνες 13.3 Φωτογραφίες του οργανισμού *Artemia Salina* από το μακροσκόπιο

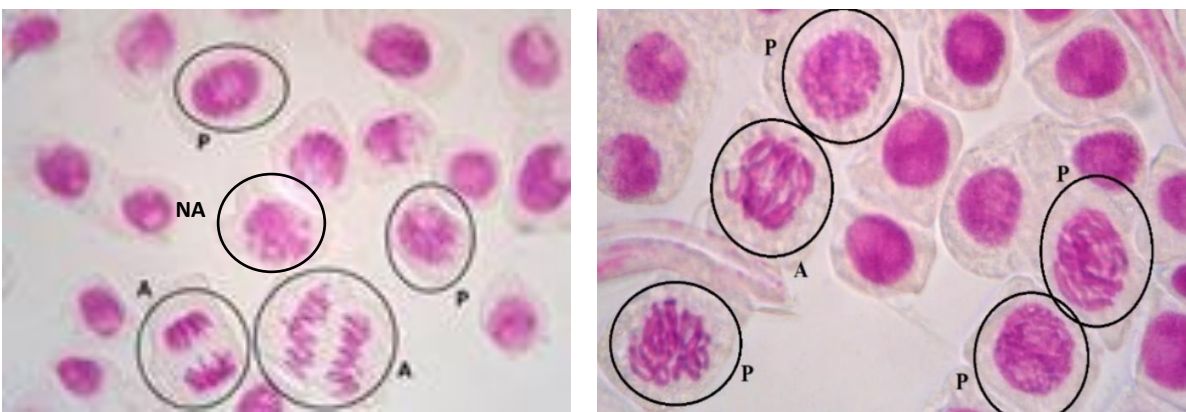
13.4. Έλεγχος της *in vivo* γενετοξικότητας στον ζωντανό οργανισμό

Allium cepa.

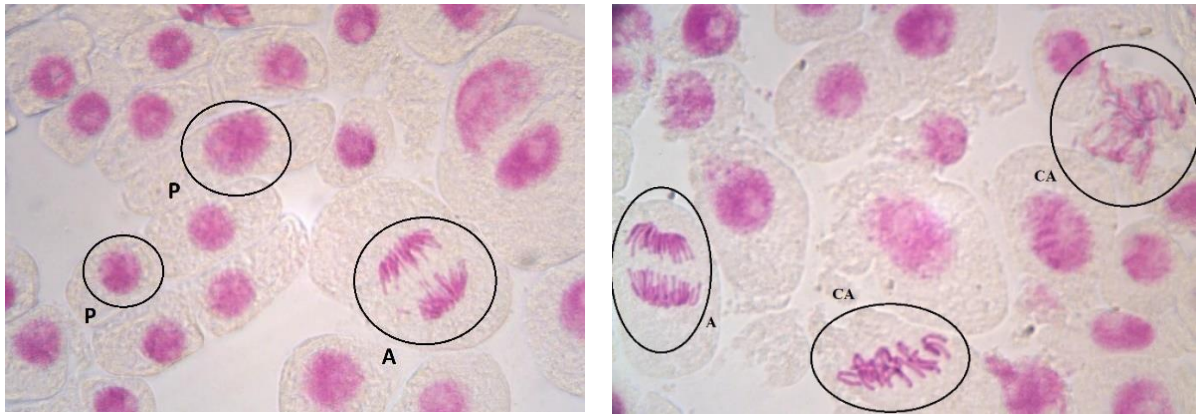
Η γενετοξικότητα του συμπλόκου CIPAN ελέγχθηκε *in vivo* στον ζωντανό οργανισμό *Allium cepa* (κρεμμύδι). Οι συγκεντρώσεις που ελέγχθηκαν για το σύμπλοκο CIPAN είναι 1, 10 και 100 μM , εύρος που περιλαμβάνει τις τιμές MIC και IC₅₀. Κατόπιν υπολογίστηκαν οι αλλαγές στον μιτωτικό δείκτη καθώς και στην εμφάνιση χρωμοσωμικών/πυρηνικών ανωμαλιών και μικροπυρήνων.



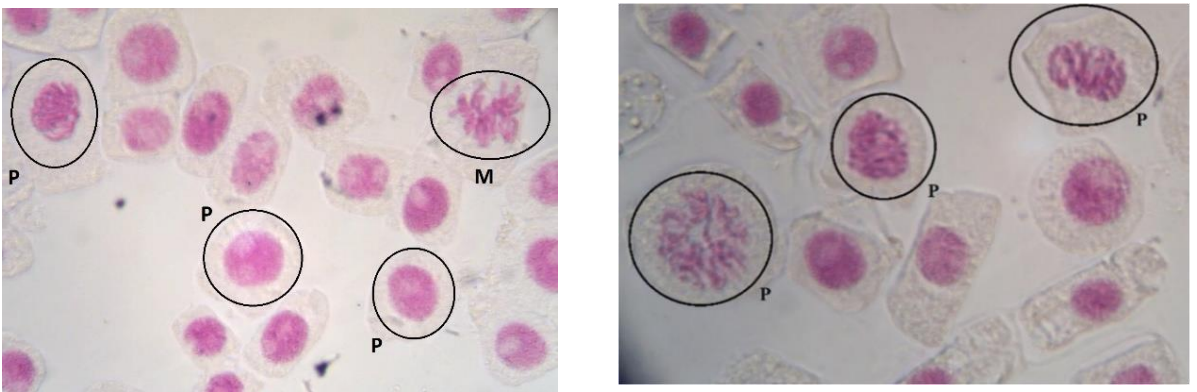
(α)



(β)



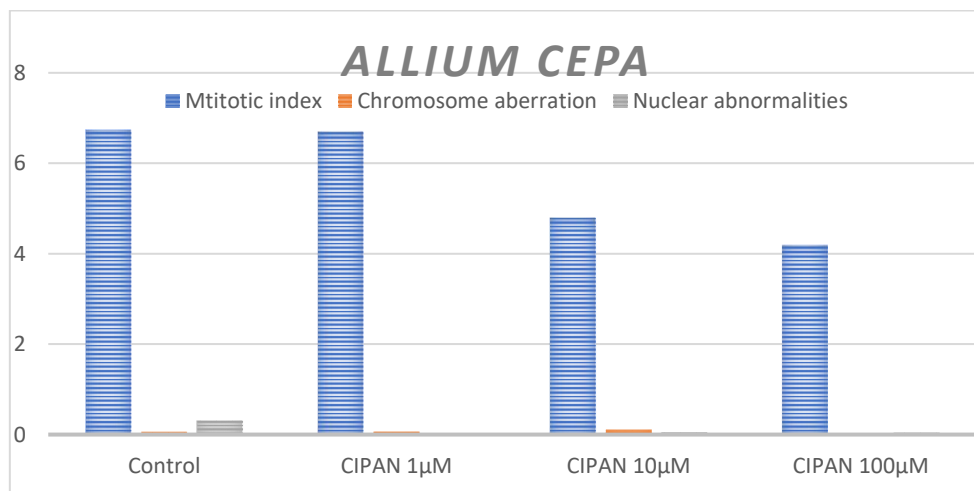
(γ)



(δ)

Εικόνα 13.3 . Χαρακτηριστικές εικόνες των μεριστοματικών κυττάρων του *Allium cepa* του control (α), και μετά από έκθεση στο σύμπλοκο CIPAN σε συγκέντρωση 1 μM (β), 10 μM (γ) και 100 μM (δ).

P= prophase, M= metaphase, A= anaphase, T= telophase, CA= chromosome aberration, NA= nucleus abnormalities



Εικόνα13.4 Το ποσοστό (%) του μιτωτικού δείκτη, χρωμοσωμικών και πυρηνικών ανωμαλιών μετά από επώαση του *Allium cepa* με το σύμπλοκο CIPAN

<i>Allium Cera</i>	Μιτωτικός δείκτης	Χρωμοσωμικές ανωμαλίες	Πυρηνικές ανωμαλίες
Control	6,73 ± 1,60	0,05 ± 0,1	0,31 ± 0,62
CIPAN 1μM	6,69 ± 2,46	0,055 ± 0,10	0
CIPAN 10μM	4,79 ± 1,99	0,10 ± 0,2	0,05 ± 0,10
CIPAN 100μM	4,18 ± 1,17	0	0,04 ± 0,09

Πίνακας 13.4 Το ποσοστό (%) του μιτωτικού δείκτη, χρωμοσωμικών και πυρηνικών ανωμαλιών μετά από επώαση του *Allium cera* με το σύμπλοκο CIPAN σε διάφορες συγκεντρώσεις

Ο μιτωτικός δείκτης δείχνει το ρυθμό πολλαπλασιασμού των κυττάρων. Αύξηση ή μείωση αυτού αποτελεί ένδειξη ύπαρξης κάποιας τοξικής ουσίας. Από τον πίνακα 13.4 παρατηρούμε πως ο μιτωτικός δείκτης δεν αλλάζει σε συγκέντρωση 1μM σε σχέση με το control, υποδηλώνοντας πως το σύμπλοκο αυτό δεν είναι μεταλλαξιογόνο ή γενοτοξικό στη συγκέντρωση της MIC. Στη συγκέντρωση 10 μM, που είναι ίση με την IC₅₀, παρατηρείται ελαφριά μείωση του μιτωτικού δείκτη, όπως και στα 100μM, χωρίς όμως να εμφανίζονται περισσότερες χρωμοσωμικές ή πυρηνικές ανωμαλίες, ούτε μικροπυρηνίσκοι.

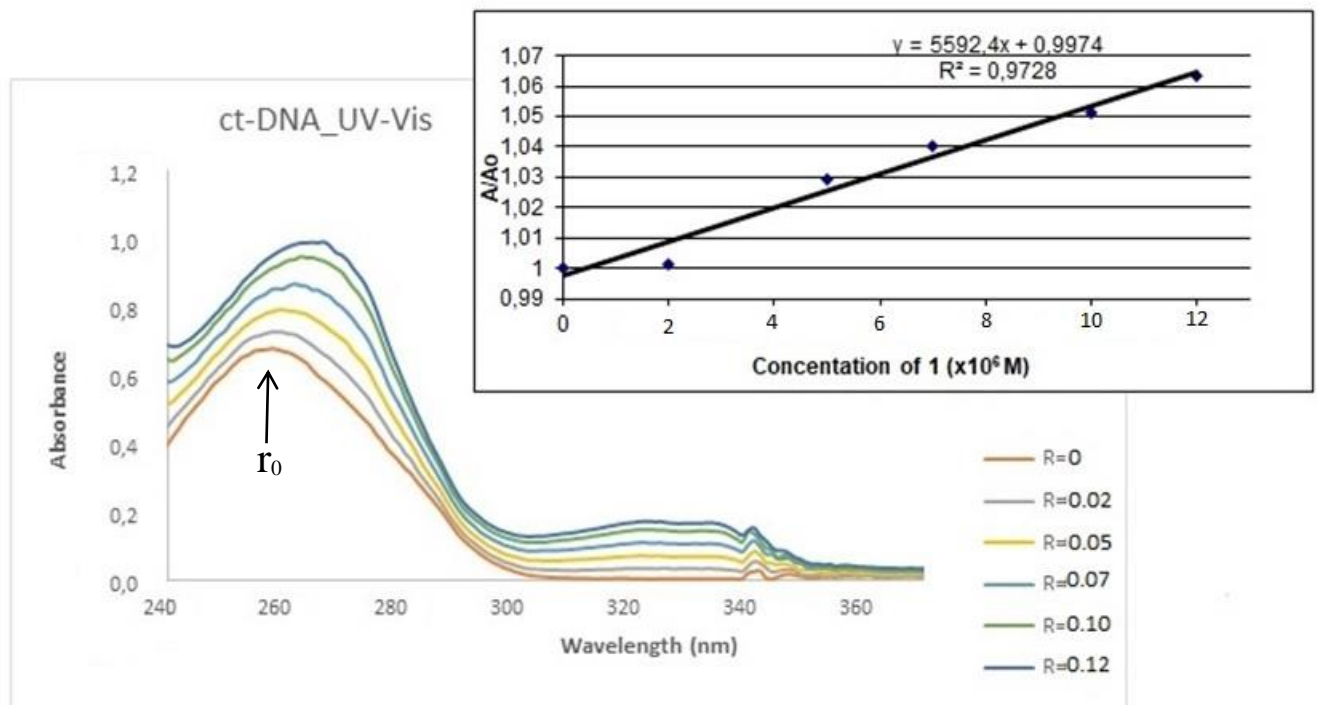
14. Αλληλεπίδραση του συμπλόκου με το DNA

Το DNA είναι στόχος των χημειοθεραπευτικών που χρησιμοποιούνται ενάντια των διαφόρων καρκίνων. Υπάρχουν τρεις τρόποι πρόσδεσης κάποιας ουσίας στο DNA:

- μέσω ηλεκτροστατικής αλληλεπίδρασης με τις αρνητικά φορτισμένες φωσφορικές ομάδες του σκελετού του DNA
- μέσω πρόσδεσης στις αύλακες της διπλής έλικας του DNA,
- μέσω παρεμβολής ανάμεσα στις βάσεις του DNA

14.1. Έλεγχος με φασματοσκοπία υπεριώδους-ορατού UV-Vis.

Στα πειράματα χρησιμοποιήθηκε το calf thymus-DNA (CT-DNA) και η αλληλεπίδρασή του με το σύμπλοκο CIPAN ελέγχθηκε με UV-Vis φασματοσκοπία.

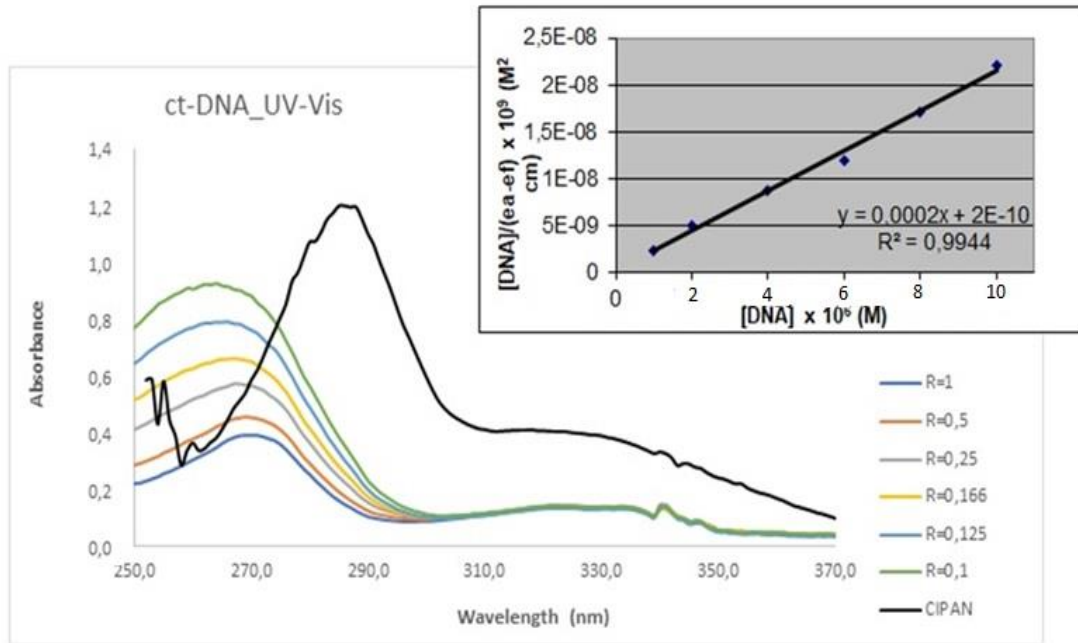


Εικόνα 14.1 Φάσμα UV-vis τιτλοδότησης του CT-DNA με αυξανόμενες συγκεντρώσεις συμπλόκου CIPAN

Το παραπάνω σχήμα δείχνει τα φάσματα UV - vis του CT-DNA (σε σταθερή συγκέντρωση) σε ρυθμιστικό διάλυμα απουσία και παρουσία του CIPAN σε διάφορες r τιμές ($r = [\text{σύμπλοκο}] / [\text{DNA}]$) και το γράφημα του A / A_0 έναντι $[\text{σύμπλοκο}]$ σε $\lambda_{\text{max}} = 257\text{nm}$.

Σε σταθερή συγκέντρωση DNA και αυξανόμενη συγκέντρωση CIPAN η απορρόφηση του DNA αυξάνεται. Παρατηρείται λοιπόν υπερχρωισμός με βαθυχρωμική μετατόπιση. Το ποσοστό υπερχρωματικότητας είναι 2,12 %, ενώ η ερυθρή μετατόπιση είναι 7nm.

Ο υπερχρωισμός που παρατηρείται στα φάσματα μπορεί να αποδοθεί σε σχάση της διπλής έλικας, σε εξωτερική επαφή ή στο μερικό ξετύλιγμα της ελικοειδούς δομής του DNA, εκθέτοντας περισσότερες βάσεις του DNA, ή σε δέσμευση στην αύλακα του DNA (ένας αρωματικός δακτύλιος που ταιριάζει πολύ με την ελικοειδή στροφή είναι απαραίτητο να είναι μέρος της μεταλλικής ένωσης). Εφόσον παρατηρείται όμως και βαθυχρωμική μετατόπιση, κατά την οποία σταθεροποιείται το DNA, συμπεραίνουμε πως το σύμπλοκο σύνδεεται με την αύλακα του DNA (groove binding).



Εικόνα 14.2 Φάσμα UV-vis τιτλοδότησης του συμπλόκου CIPAN με αυξανόμενες συγκεντρώσεις CT-DNA

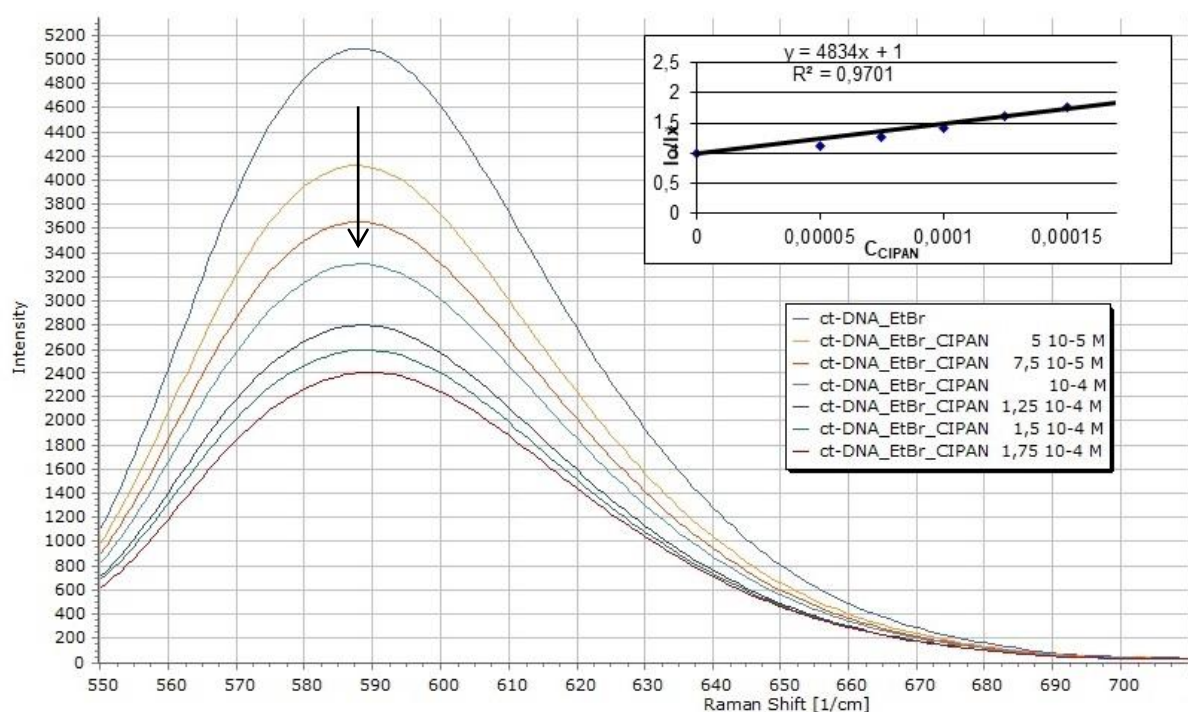
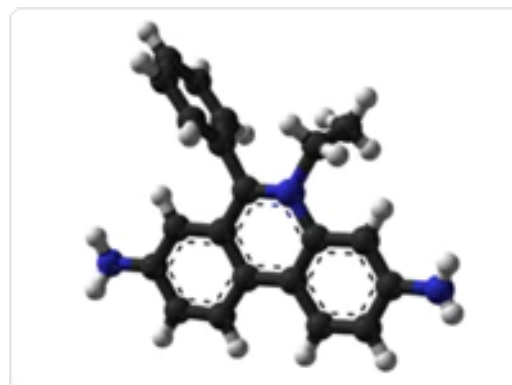
Από την εξίσωση Εξίσωση Wolfe-Shimer , υπολογιστηκε η σταθερά σύνδεσης K_b .

$$\frac{[DNA]}{(\epsilon_A - \epsilon_f)} = \frac{[DNA]}{(\epsilon_b - \epsilon_f)} + \frac{1}{K_b(\epsilon_b - \epsilon_f)}$$

Η υπολογισμένη τιμή K_b για το CIPAN είναι $15,5 \pm 9,3 \times 10^4 \text{ M}$ υποδηλώνοντας ισχυρή αλληλεπίδραση με CT-DNA.

14.2. Μελέτη της ανταγωνιστικής δράσης με το EtBr με φασματοσκοπία φθορισμού

Τα φάσματα εκπομπής στα 588 nm των διαλυμάτων EB (2,3 μM) που περιέχουν CT-DNA (26 μM) απουσία ή παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων συμπλόκου (0-0,175 μM) καταγράφηκαν κατά τη διέγερσή τους στα 527 nm.



Εικόνα 14.3 Φάσμα φθορισμού CT-DNA σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις συμπλόκου CIPAN, παρουσία Et-Br

Στο φάσμα εκπομπών φθορισμού του CT-DNA-EB παρουσία του συμπλόκου CIPAN σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις, παρατηρείται μείωση του φθορισμού (quenching). Αυτό οφείλεται στην αλληλεπίδραση του συμπλόκου με την αύλακα του DNA (groove binding), η οποία εμποδίζει την αλληλεπίδραση του EtBr με το DNA και μειώνεται ο φθορισμός.

Η σταθερά σύνδεσης K_{app} του αποσβέστη-DNA μπορεί να υπολογιστεί από την εξίσωση :

$$K_{app} = K_{EB} \times [EB] / [Q_{50}] \quad (1)$$

όπου $[Q_{50}]$ η συγκέντρωση σβέσης στη μείωση κατά 50% του φθορισμού, η $K_{EB} = 10^7 M^{-1}$ (σταθερά σύνδεσης του EtBr-DNA) και $[EB] = 2,3 \mu M$. Μπορεί επίσης να υπολογιστεί και από την εξίσωση Stern-Volmer :

$$I_0 / I = 1 + K_{sv} \times [Q] \quad (2)$$

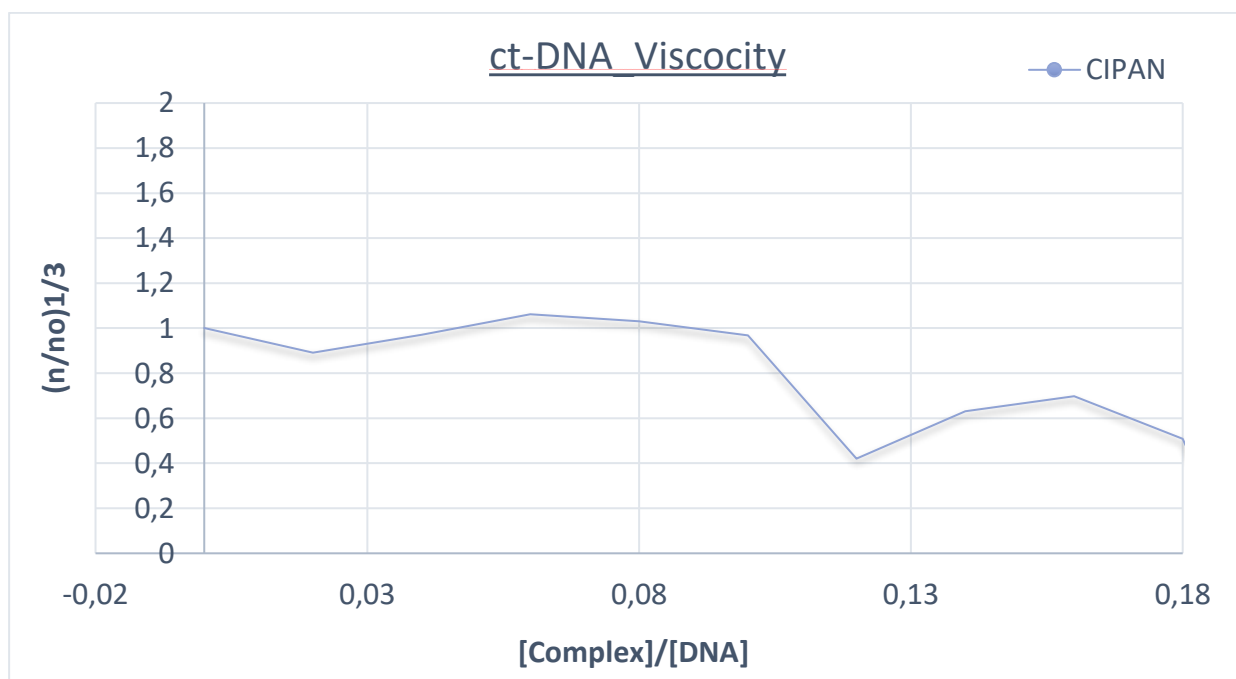
όπου I_0 και I είναι οι εντάσεις φθορισμού του CT-DNA απουσία και παρουσία του συμπλόκου CIPAN αντίστοιχα, το $[Q]$ είναι η συνολική συγκέντρωση του αποσβέστη (CIPAN). Από τον συνδυασμό των δυο εξισώσεων, παίρνουμε την εξίσωση με την εξής μορφή:

$$K_{app} = K_{EB} \times [EB] \times K_{sv} \quad (3)$$

Η τιμή K_{sv} (σταθερά απόσβεσης) του συμπλόκου CIPAN είναι $5,72 \pm 0,86 \times 10^3 M^{-1}$. Από την εξίσωση (3) λαμβάνουμε την τιμή της K_{app} , την οποία μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε για την αξιολόγηση του τρόπου σύνδεσης του συμπλόκου με το DNA. Έτσι, υπολογίστηκε πως η K_{app} για το σύμπλοκο CIPAN είναι $13,32 \pm 2,02 \times 10^4 M^{-1}$, που υποδηλώνει ισχυρή δέσμευση του συμπλόκου με την αύλακα του DNA (groove binding).

14.3. Έλεγχος με ιξωδομετρία

Το μήκος του DNA μπορεί να αλλάξει μετά από επίδραση ενός αντικαρκινικού παράγοντα με αποτέλεσμα να επηρεάζεται το ιξώδες (η) του διαλύματός του. Επομένως οι αλλαγές στο ιξώδες επιδεικνύουν μεγάλη ευαισθησία στις αλλαγές που υφίσταται το DNA και χρησιμοποιείται και για τη μελέτη των διαφόρων τρόπων πρόσδεσης εξωγενών παραγόντων στο DNA.



Εικόνα 14.4 Επίδραση του συμπλόκου CIPAN στο ιξώδες διαλύματος CT-DNA ([DNA]= 0.1 mM) σε διάφορες αναλογίες $r = [\text{σύμπλοκο}]/[\text{DNA}]$, όπου η είναι το ιξώδες του DNA παρουσία του συμπλόκου CIPAN και του προσδέτη και η_0 το ιξώδες του DNA απουσία παράγοντα.

Από την παρουσία του συμπλόκου παρατηρείται ελαφριά μείωση του ιξώδους, ενώ μετά την αναλογία 0,12 εντείνεται η μείωση του ιξώδους αισθητά. Η μείωση αυτή υποδηλώνει σύνδεση του συμπλόκου με την αύλακα του DNA (groove binding), το οποίο συμφωνεί με τα αποτελέσματα της φασματοσκοπίας UV-Vis και φθορισμού.

Συμπεράσματα

15. Συμπεράσματα

Στη παρούσα διατριβή πραγματοποιήθηκε η σύνθεση μιας ένωσης επείτα από σύζευξη του αντιβιοτικού σιπροφλοξασίνη και του αντιμονίου (μεταλλοειδές). Η νέα αυτή ένωση χαρακτηρίστηκε με διάφορες φασματοσκοπικές μεθόδους, ώστε να συλλεχθούν τα φασματοσκοπικά της δεδομένα και να διαπιστωθεί ότι αυτή η ένωση έχει σχηματιστεί επιτυχώς σε όλη της τη μάζα, καθώς και πως παραμένει σταθερή σε διάστημα μίας εβδομάδας σε διάλυμα.

Πιο συγκεκριμένα χαρακτηρίστηκαν με σημείο τήξης, φασματοσκοπίες FT-IR, UV-Vis, ¹H-NMR, XRF, HRMS, περίθλαση ακτίνων X και κρυοσκοπία, και η σταθερότητα ελέγχθηκε σε διάλυμα DMSO με φασματοσκοπία UV-Vis και ¹H-NMR. Έτσι επιβεβαιώθηκε πως έχει σχηματιστεί επιτυχώς η ένωση, η οποία παραμένει σταθερή σε διάλυμα και προτάθηκε η δομή της.

Στη συνέχεια μελετήθηκε η αντιμικροβιακή της δράση έναντι τεσσάρων βακτηρίων (*P.aeruginosa*, *E.coli*, *S. Aureus* και *S.Epid.*). Το σύμπλοκο CIPAN εμφανίζει μεγαλύτερες από την HCIP ζώνες αναστολής και στα τέσσερα βακτήρια, ενώ μικρότερη MIC μόνο έναντι της *P.aeruginosa*. Ωστόσο και τα υπόλοιπα τρία βακτήρια είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα στα σύμπλοκο, καθώς η MIC κυμαίνονται μεταξύ 1,4-1,6 μM. Έπειτα και από την μέτρηση της MBC και τον υπολογισμό της αναλογίας MBC/MIC βρέθηκε πως το σύμπλοκο έχει βακτηριοκτόνο δράση έναντι *P.aeruginosa*, *S.Aureus* και *S.Epidermidis*, ενώ έναντι της *E.coli* βακτηριοστατική. Ακόμη το σύμπλοκο είχε πολύ καλή δράση έναντι του βιοφίλμ της *P.aeruginosa*, ενώ δεν είχε δράση έναντι του βιοφίλμ του *S.Aureus*.

Έπειτα μελετήθηκε η τοξικότητα *in vitro* σε φυσιολογικά κύτταρα MRC-5. Η τιμή IC₅₀ του συμπλόκου είναι δεκαπλάσια από την MIC των τεσσάρων βακτηρίων. Ελέγχθηκε περαιτέρω και η ικανότητα του συμπλόκου να έχει γενοτοξική δράση *in vitro*, καθώς η γενοτοξικότητα

μπορεί να προκαλέσει γενετικές βλάβες εν δυνάμει κληρονομήσιμες. Χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος των μικροπυρήνων καθώς η εμφάνισή τους μετά την εφαρμογή ενός παράγοντα δηλώνουν βλάβη στο DNA. Το ποσοστό εμφάνισης μικροπυρήνων στη τιμή IC_{50} δείχνει πως το σύμπλοκο είναι ελαφρώς γενοτοξικό, σε συγκέντρωση 10 φορές μεγαλύτερη της MIC.

Για τον προσδιορισμό της τοξικότητας *in vivo*, χρησιμοποιήθηκε και το ζωντανό οργανισμός-μοντέλο *Artemia salina*. Οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν και για το σύμπλοκο ήταν ως και 400 φορές μεγαλύτερες από εκείνη της MIC, και τα ποσοστά επιβίωσης ήταν 100%. Η γενοτοξική δράση ελέγχθηκε *in vivo* χρησιμοποιώντας τον ζωντανό οργανισμό *Allium cepa*. Οι συγκεντρώσεις που ελέγχθηκαν περιλαμβάνουν την τιμή της MIC, της IC_{50} καθώς και συγκέντρωση δεκαπλάσια αυτής. Δεν παρατηρείται αύξηση των χρωμοσωμικών και πυρηνικών ανωμαλιών σε καμία συγκέντρωση, ενώ ο μιτωτικός δείκτης μειώνεται ελαφρά στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις αλλά καθόλου στη συγκέντρωση της MIC, υποδηλώνοντας χαμηλή γενοτοξικότητα.

Συμπερασματικά, το σύμπλοκο CIPAN, δεν είναι είναι τοξικά *in vivo*, καθώς επίσης βρέθηκε να είναι ελαφρώς γενοτοξικό τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*.

Ένας ακόμη πιθανός στόχος των διάφορων χημειοθεραπευτικών είναι το μόριο του DNA. Η δράση του ευρέως χρησιμοποιούμενου αντικαρκινικού φαρμάκου Cisplatin οφείλεται στη στόχευσή του στο DNA. Επομένως ελέγχθηκε η πιθανή στόχευση του συμπλόκου στο μόριο του DNA. Οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν για να ελεγχθεί η πρόσδεση του συμπλόκου στο DNA περιλαμβάνουν τη φασματοσκοπία UV-Vis, την φασματοσκοπία φθορισμού και την ιξωδομετρία. Και από τις τρεις τεχνικές φαίνεται πως το σύμπλοκο προσδένει ισχυρά την αύλακα του DNA και σταθεροποιεί την έλικα του DNA.

Ανακεφαλαιώνοντας, η τροποποίηση φαρμάκων αποτελεί όπλο έναντι βακτηρίων που έχουν αναπτύξει ανθεκτικότητα στα υπάρχοντα αντιβιοτικά και ανοίγει το δρόμο για την ανάπτυξη νέων φαρμάκων με μεγαλύτερο εύρος δράσης.

Έτσι, η παρασκευή του συμπλόκου από το αντιβιοτικό σιπροφλοξασίνη, που χρησιμοποιείται ήδη κατά του ελικοβακτηριδίου του πυλωρου, αποτελεί μια διαφορετική προσέγγιση της θεραπείας του καρκίνου του στομάχου. Στοχεύει σε μια πιο αποτελεσματική θεραπεία του καρκίνου του στομάχου, αντικαθιστώντας το κοκτέιλ φαρμάκων που χρησιμοποιείται μέχρι τώρα, με ένα φάρμακο. Αυτό θα έχει ως αποτέλεσμα η θεραπεία να είναι πιο απλή και εύχρηστη για τον ασθενή, πιο συστηματική και με λιγότερες παρενέργειες.

Ωστόσο, στη παρούσα διατριβή δεν έγινε μελέτη σε καρκινικά κύτταρα και κατά συνέπεια δεν μπορούμε να το προτείνουμε ακόμη ως χημειοθεραπευτικό. Τα μέχρι τώρα αποτελέσματα αποτελούν εύνασμα για περαιτέρω έρευνα καθώς το σύμπλοκο έχει πολύ καλή αντιμικροβιακή δράση και χαμηλή τοξικότητα και γένοτοξικότητα.

Από την παρούσα Διατριβή προέκυψε μία συμμετοχή παρουσίασης Poster στο 18^ο Πανελλήνιο Συμπόσιο Φαρμακευτικής Χημείας (HSMC-18) με τίτλο:

Modification of commercially available antibiotics for new formulations development; Ciprofloxacin-triphenylstibine(III) an example of novel chemotherapeutic with strong antimicrobial activity.

Georgia I. Exarchopoulou, Christina N. Banti, Christina Papachristodoulou, Sotiris K. Hadjidakou

Βρίσκεται στη διαδικασία της συγγραφής:

Ciprofloxacin conjugation with antimony; an example of novel chemotherapeutic formulation with strong antimicrobial activity

Georgia I. Exarchopoulou, Christina N. Banti, Sotiris K. Hadjidakou et al, 2021 in preparation

Παράρτημα

16. Παράρτημα - Αντιδραστήρια

16.1. Αντιδραστήρια και Διαλύτες


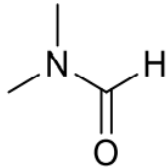
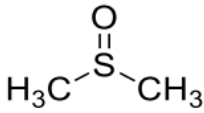
Το αντιδραστήριο tpSb είναι διαθέσιμο στο εμπόριο από την εταιρεία Merck και χρησιμοποιήθηκε χωρίς περαιτέρω καθαρισμό, ενώ η HCIP απομονώθηκε από το φάρμακο Ladinin 500mg με την εξής διαδικασία:

- Κονιορτοποίηση του χαπιού σε γουδί
- Διάλυση της σκόνης με 25ml H₂O και ανάδευση υπο ήπια θέρμανση για 10΄
- Διήθηση σε ποτήρι ζέσεως με διπλό διηθητικό χαρτί, ώστε να απομακρυνθούν τα έκδοχα τα οποία δεν είναι υδατοδιαλυτά
- Προσθήκη 1,36mmol KOH στο διάλυμα και ανάδευση για άλλα 10΄
- Διήθηση με διπλό διηθητικό χαρτί και συλλογή της εξουδετερωμένης HCIP

Όλοι οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν αναλυτικώς καθαροί (reagent grade) και προέρχονται από την εταιρεία Riedel-deHaen. Οι περισσότεροι χρησιμοποιούμενοι διαλύτες καθ' όλη τη διάρκεια των πειραμάτων ήταν το διμέθυλο σουλφοξείδιο (DMSO), και το δις απεσταγμένο νερό (ddH₂O).

16.2. Πίνακας συντομογραφιών Αντιδραστηρίων και Διαλυτών

Ακολουθεί πίνακας με την ονοματολογία όλων των αντιδραστηρίων, καθώς και των διαλυτών που χρησιμοποιήθηκαν κατά το μεγαλύτερο μέρος διεξαγωγής των πειραμάτων .

Συμβολισμός	Ονοματολογία	Χημική Δομή
<i>HCIP</i>	Ουδέτερη σιπροφλοξασίνη	$C_{17}H_{18}FN_3O_3HClH_2O$.
<i>tpSb</i>	Τριφαίνυλο-αντιμόνιο	$(C_6H_5)_3Sb$
H_2O_2	Υπεροξειδίο του Οξυγόνου	
<i>Et₂O</i>	Διαιθυλαιθέρας	
<i>MeOH</i>	Μεθανόλη	CH_3OH
<i>MeCN</i>	Ακετονιτρίλιο	CH_3CN
<i>n-Hexane</i>	Εξάνιο	C_6H_{14}
<i>Toluene</i>	Τολουόλιο	$C_6H_5CH_3$
<i>Χλωροφόρμιο</i>	Τριχλωρομεθάνιο	$CHCl_3$
<i>Διχλωρομεθάνιο</i>	Μεθυλενοδιχλωρίδιο	CH_2Cl_2
<i>Acetone</i>	Ακετόνη (Προπανόλη)	C_3H_6O
<i>EtO</i>	Αιθανόλη	C_2H_5OH
<i>DMF</i>	Διμεθυλοφορμαμίδιο	
<i>DMSO</i>	Διμεθυλοσουλφοξείδιο	

Παραπομπές-Βιβλιογραφία

17. Παραπομπές-Βιβλιογραφία

1. M.M Abd Elhalim, N.S.M. Ismail, S.M.M. Yahya, Y.Y. Omar, A.A. Abd Rabou, D.S. Lasheen, M.F. Zawrah, G.A. Elmegeed, Synthesis, Characterization, and Evaluation of Cytotoxic Effects of Novel Hybrid Steroidal Heterocycles as PEG Based Nanoparticles, 2017, Asian Pac. J. Cancer Prev., 18(7), 1937-1946.
2. American Cancer Society, Cancer Facts & Figures 2020, Atlanta: © 2020, American Cancer Society; Inc., Surveillance Research.
3. S. Tabassum, S. Yadav, F. Arjmand, Exploration of glycosylated-organotin(IV) complexes as anticancer drug candidates, 2014, Inorg. Chim. Acta, 423, 38-45
4. GLOBOCAN 2020, The Global Cancer Observatory, International Agency for Research on Cancer, World Health Organization
5. G.A. Elmegeed, W.K.B. Khalil, R.M. Mohareb, H.H. Ahmed, M.M. Abd-Elhalim, G.H. Elsayed, Cytotoxicity and gene expression profiles of novel synthesized steroid derivatives as chemotherapeutic anti-breast cancer agents, 2011, Bioorg. Med. Chem., 19, 6860-6872
6. N. A. Seebacher, A. E. Stacy, G. M. Porter, A. M. Merlot, Clinical development of targeted and immune based anti-cancer therapies, 2019, J. Exp. Clin. Cancer Res., 38, 156-194
7. M.A. Tantawy, M.S. Nafie, G.A. Elmegeed, I.A.I. Ali, Auspicious role of the steroidal heterocyclic derivatives as a platform for anti-cancer drugs, 2017, Bioorg. Chem., 73, 128-146
8. Y. Yang, M. Hong, L. Xu, J. Cui, G. Chang, D. Li, C. Li, Organotin(IV) complexes derived from Schiff base N'-[(1E)-(2-hydroxy-3-methoxyphenyl)methylidene]pyridine-3-carbohydrazone: Synthesis, in vitro cytotoxicities and DNA/BSA interaction, 2016, J. Organomet. Chem., 804, 48-58

9. R.L. Siegel, K.D. Miller, A. Jemal, Cancer Statistics, 2020, CA Cancer J. Clin., 70, 7-30.230
10. «Cancer Fact sheet N°297». World Health Organization. Φεβρουάριος 2014, // «Defining Cancer». National Cancer Institute., 10 Ιουνίου 2014]
11. "Cancer (Fact sheet N°297)". World Health Organization. February 2009. Retrieved 2009-05-11
12. https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-table?v=2020&mode=cancer&mode_population=continents&population=900&populations=900&key=asr&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&group_cancer=1&include_nmsc=1&include_nmsc_other=1
13. Gastric (Stomach) Cancer: Types, Causes, Symptoms, Treatment, Medicinenet.com
14. Mingchao, Devereux TR, Stockton P, Sun K, Sills RC, Clayton N, Portier M, Flake G. Loss of E-cadherin expression in gastric intestinal metaplasia and later stage p53 altered expression in gastric carcinogenesis. Exp Toxicol Pathol 2001;53:237-46.
15. Kozuki T, Yao T, Nakamura S, Matsumoto T, Tsuneyoshi M. Differences in p53 and cadherin-catenin complex expression between histological subtypes in diffusely infiltrating gastric carcinoma. Histopathology 2002;41:56-64.
16. Ford JM. Inherited susceptibility to gastric cancer: advances in genetics and guidelines for clinical management. In: American Society of Clinical Oncology: 2002 Educational book. Perry MC (ed.) 2002; pp. 116-25
17. [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Gastric adenocarcinoma.jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Gastric_adenocarcinoma.jpg)
18. Houghton JM, Stoicov C, Nomura S, Rogers AB, Carlson J, Li H, Cai X, Fox JG, Goldenring JR, Wang TC. Gastric cancer originating from bone marrow-derived cells. Science 2004;306:1568-71.], [21] Helicobacter and Cancer Collaborative Group,

Gastric cancer and *Helicobacter pylori*: a combined analysis of 12 case control studies nested within prospective cohorts, *Gut* 49 (2001) 347–353 Review.

19. Bresalier RS, Kim YS. Malignant neoplasms of the large intestine. In: Sleisenger & Fordtran's *Gastrointestinal and Liver Disease*. 6th Edn, Saunders WR, Philadelphia 1998; p. 1906.
20. Rustgi AK, Podolsky DK. Principles of gastrointestinal neoplasia. In: Sleisenger & Fordtran's *Gastrointestinal and Liver Disease*. 6th Edn, Saunders WR, Philadelphia 1998; p. 49.
21. Meining A, Morgner A, Miehke S, Bayerdorffer E, Stolte M. Atrophy-metaplasia-dysplasia-carcinoma sequence in the stomach: a reality or merely an hypothesis? *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2001;15:983-98.
22. Houghton JM, Stoicov C, Nomura S, Rogers AB, Carlson J, Li H, Cai X, Fox JG, Goldenring JR, Wang TC. Gastric cancer originating from bone marrow-derived cells. *Science* 2004;306:1568-71.
23. "Detailed Guide: Stomach Cancer Treatment Choices by Type and Stage of Stomach Cancer". American Cancer Society. 2009-11-03.
24. <https://www.sciencephoto.com/media/528860/view/helicobacter-pylori-bacteria-sem>
25. Chan WY, Hui PK, Leung KM, Chow J, Kwok F, Ng CS (October 1994). «Coccoid forms of *Helicobacter pylori* in the human stomach». *Am J Clin Pathol* 102 (4): 503–7. PMID 7524304.
26. Olson JW, Maier RJ (November 2002). «Molecular hydrogen as an energy source for *Helicobacter pylori*». *Science* 298 (5599): 1788–90. doi:10.1126/science.1077123. PMID 12459589.
27. B.J. Marshall, S.R. Langton, Urea hydrolysis in patients with *Campylobacter pylori* infection, *Lancet* 1 (1986) 965–966

28. P. Correa, A human model of gastric carcinogenesis, *Cancer Res.* 48 (July (13)) (1988) 3554–3560 Review
29. Sipponen P. Atrophic, Gastritis as a premalignant condition, *Ann. Med.* 21 (1989) 287–290.
30. (Salillas S, Sancho J. Flavodoxins as Novel Therapeutic Targets against *Helicobacter pylori* and Other Gastric Pathogens. *Int J Mol Sci.* 2020 Mar 10;21(5):1881. doi: 10.3390/ijms21051881. PMID: 32164177; PMCID: PMC7084853).
31. (Jabri E, Carr MB, Hausinger RP, Karplus PA (May 1995). "The crystal structure of urease from *Klebsiella aerogenes*". *Science.* 268(5213): 998–1004. doi:10.1126/science.7754395. PMID 7754395.
32. P. Malfertheiner, F. Megraud, C.A. O'Morain, J. Atherton, A.T. Axon, F. Bazzoli, G. F. Gensini, J.P. Gisbert, D.Y. Graham, T. Rokkas, E.M. El-Omar, E.J. Kuipers, European *Helicobacter* Study Group, Management of *Helicobacter pylori* infection—the Maastricht IV/Florence Consensus Report, *Gut* 61 (2012) 646– 664, doi:http://dx.doi.org/10.1136/gutjnl-2012-302084
33. https://www.researchgate.net/figure/A-pictorial-representation-of-the-diseases-involving-H-pylori-Source-The-Mechanisms_fig1_309425976
34. K. Anuja, S. Roy, C. Ghosh, P. Gupta, S. Bhattacharjee, B. Banerjee, Prolonged inflammatory microenvironment is crucial for pro-neoplastic growth and genome instability: a detailed review, *Inflammation Res.* 66 (2) (2017) 119–128, <https://doi.org/10.1007/s00011-016-0985-3> PubMed PMID: 27653961
35. E. Pikarsky, R.M. Porat, I. Stein, R. Abramovitch, S. Amit, S. Kasem, E. GutkovichPyest, S. Urieli-Shoval, E. Galun, Y. Ben-Neriah, NF-kappaB functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer, *Nature* 431 (7007) (2004) 461–466, <https://doi.org/10.1038/nature02924> Epub 2004/08/27 PubMed PMID:15329734.

36. J. Zhang, L. Chen, M. Xiao, C. Wang, Z. Qin, FSP1+ fibroblasts promote skin carcinogenesis by maintaining MCP-1-mediated macrophage infiltration and chronic inflammation, *Am. J. pathol.* 178 (1) (2011) 382–390, <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2010.11.017> Epub 2011/01/13. PubMed PMID: 21224075; PMCID: PMC3070559.
37. P. Allavena, C. Garlanda, M.G. Borrello, A. Sica, A. Mantovani, Pathways connecting inflammation and cancer, *Curr. Opin. gene. dev.* 18 (1) (2008) 3–10, <https://doi.org/10.1016/j.gde.2008.01.003> Epub 2008/03/08. PubMed PMID: 18325755.
38. A.M. Westbrook, B. Wei, K. Hacke, M. Xia, J. Braun, R.H. Schiestl, The role of tumour necrosis factor-alpha and tumour necrosis factor receptor signalling in inflammation-associated systemic genotoxicity, *Mutagenesis* 27 (1) (2012) 77–86, <https://doi.org/10.1093/mutage/ger063> Epub 2011/10/08. PubMed PMID: 21980144; PMCID: 3241942.
39. R.S. Lewis, S. Tamir, S.R. Tannenbaum, W.M. Deen, Kinetic analysis of the fate of nitric oxide synthesized by macrophages in vitro, *J. Biol. Chem.* 270 (49) (1995) 29350–29355 PubMed PMID: 7493969
40. D.J. Stuehr, M.A. Marletta, Synthesis of nitrite and nitrate in murine macrophage cell lines, *Cancer Res.* 47 (21) (1987) 5590–5594 PubMed PMID: 3117354.
41. R. Takahashi, K. Edashige, E.F. Sato, M. Inoue, T. Matsuno, K. Utsumi, Luminol chemiluminescence and active oxygen generation by activated neutrophils, *Arch. Biochem. Biophys.* 285 (2) (1991) 325–330 Epub 1991/03/01. PubMed PMID: 1654772
42. Kay, J., Thadhani, E., Samson, L., & Engelward, B. (2019). Inflammation-Induced DNA Damage, Mutations and Cancer. *DNA Repair*, 102673. [doi:10.1016/j.dnarep.2019.102673](https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2019.102673)
43. Lonkar and Dedon, *International Journal of Cancer*, 2011. DOI: 10.1002/ijc.25815.

44. «DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones». *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 61 (3): 377–92. September 1997. doi:10.1128/.61.3.377-392.1997. PMID9293187.(2) «DNA topoisomerases and their poisoning by anticancer and antibacterial drugs». *Chemistry & Biology* 17 (5): 421–33. May 2010. doi:10.1016/j.chembiol.2010.04.012. PMID20534341.
45. <https://www.creative-proteomics.com/services/quinolones-analysis-service.htm>
46. <https://www.galinos.gr/web/drugs/main/substances/ciprofloxacin>
47. T.T. Ashburn, K.B. Thor, Drug repositioning: identifying and developing new uses for existing drugs, *Nat. Rev. Drug Discov.* 3 (2004) 673–683, <https://doi.org/10.1038/nrd1468>
48. P.P. Deotarse, A.S. Jain, M.B. Baile, N.S. Kolhe, A.A. Kulkarni, Drug repositioning : a review, *Int. J. Pharma Res. Rev.* 4 (2015) 51–58.
49. Y.Y. Li, S.J.M. Jones, Drug repositioning for personalized medicine, *Genome Med.* (2012), <https://doi.org/10.1186/gm326>. [8] P. Pantziarka, G. Bouche, L. Meheus, V. Sukhatme, V.P. Sukhatme, The repurposing drugs in oncology (ReDO) project, *Eccancermedicalscience.* 8 (2014) 1–13, <https://doi.org/10.3332/ecancer.2014.442>.
50. R.A. Hodos, B.A. Kidd, K. Shameer, B.P. Readhead, J.T. Dudley, In silico methods for drug repurposing and pharmacology, *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.* 8 (2016) 186–210, <https://doi.org/10.1002/wsbm.1337>.
51. Systems biology based drug repositioning for development of cancer therapy Beste Turanlia,b,c,1 , Ozlem Altaya,1 , Jan Borénd , Hasan Turkeze , Jens Nielsenf , Mathias Uhlena , Kazim Yalcin Argab , Adil Mardinoglua,g .
52. D.S.1 Strand, D.2 Kim, D.A.1 Peura, 25 years of proton pump inhibitors: a comprehensive review, *Gut Liver* 11 (1) (2017) 27–37, <https://doi.org/10.5009/gnl15502>.

53. ClinicalTrials.gov. National Library of Medicine (U.S.), (2000) February 29 –
)Retrieved August 19, 2019 from:
<https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=proton+pump+inhibitors&term=cancer&cntry=&state=&city=&dist=>
54. Turanli B, Altay O, Borén J, Turkez H, Nielsen J, Uhlen M, Arga KY, Mardinoglu A. Systems biology based drug repositioning for development of cancer therapy. *Semin Cancer Biol.* 2021 Jan;68:47-58. doi: 10.1016/j.semcancer.2019.09.020. Epub 2019 Sep 27. PMID: 31568815.
55. Richard A. Harvey, Pamela C. Champe, Bruce D. Fisher, William A. Strohl, Microbiology, Lippincott Williams & Wilkins, 2006 ISBN 0-7817-8215-5
56. <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Stibnite.jpg>
57. Norman, Nicholas C (1998). Chemistry of arsenic, antimony, and bismuth. σελίδες 50–51
58. Norman, Nicholas C (1998). Chemistry of arsenic, antimony, and bismuth. σελίδες 50–51. ISBN 978-0-7514-0389-3.
59. Adams, E. A.; Kolis, J. W.; Pennington, W. T. "Structure of triphenylstibine" *Acta Crystallographica* 1990, volume C46, pp. 917-919.
60. Ν.Σ. Χριστοδουλάκης "Σύγχρονη Βιολογία" Εκδ. Πατάκη 1994
61. G.J. Tortora, "Εισαγωγή στη μικροβιολογία", 2009
62. Madigan, Michael; Martinko, John (2005). Brock Βιολογία των Μικροοργανισμών (Biology of Microorganisms). I. Επιστημονική επιμέλεια Ελληνικής έκδοσης: Οικονόμου Τάσος. Pearson Education (Ελληνική: Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης)
63. Alcamo IE (2001). Fundamentals of microbiology. Boston: Jones and Bartlett.

64. Madigan, Michael; Martinko, John (2005). Brock Βιολογία των Μικροοργανισμών (Biology of Microorganisms). I. Επιστημονική επιμέλεια Ελληνικής έκδοσης: Οικονόμου Τάσος, Pearson Education (Ελληνική: Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης).
65. K
66. P. Singleton, “ Bacteria in biology, biotechnology and medicine”, 2004
67. S. Baron, “Medical microbiology”, 1996
68. R Bentley R, "Biosynthesis of vitamin K (menaquinone) in bacteria", Microbiology reviews, 1982
69. [45] JB Russell, "Practical mechanisms fro interrupting the oral-fecal lifestyle of Escherichia coli", J Mol microbial biotechnol, 2001
70. MT Madigan MT, “Brock : Biology of microorganism”, 2017
71. <https://www.sciencenews.org/article/new-antibiotic-uses-sneaky-tactics-kill-drug-resistant-superbugs>
72. <https://www.independent.co.uk/life-style/health-and-families/e-coli-bacteria-symptoms-infection-egypt-outbreak-treatment-explained-a8525486.html>
73. Μαυρίδου, Α; Καμπούρης, Μ; Νικολαΐδου, Α (2012). Γενική μικροβιολογία. Αθήνα: Π.Χ. Πασχαλίδης. ISBN 978-960-489-163-4.
74. Πόγγας, Ν; Χαρβάλου, Α (2011). Ιατρική μικροβιολογία. Αθήνα: Εκδόσεις Οδυσσέας. ISBN 978-960-210-577-1.
75. N. Høiby, “Pseudomonas aeruginosa biofilms in cystic fibrosis,” Future Microbiology, 2010
76. T. Bjarnsholt, “The role of bacterial biofilms in chronic infections,” APMIS Supplementum, 2013.
77. RM. Donlan, “Biofilms: microbial life on surfaces,” Emerging infectious diseases, 2002.

78. https://www.researchgate.net/figure/An-SEM-photomicrograph-of-a-PAO-1-biofilm-structure-on-respiratory-epithelium-showing_fig2_5264457
79. E. Karatan, "Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms", *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2009
80. MS Blackledge, "Biologically inspired strategies for combating bacterial biofilms", *Current Opinion in Pharmacology*, 2013
81. J. Masak, "Pseudomonas biofilms: possibilities of their control," *FEMS Microbiology and Ecology*, 2014.
82. J Bowersox, "Experimental Staph Vaccine Broadly Protective in Animal Studies". NIH/ National institute of allergy and infectious disease, 1999
83. <https://www.dicyt.com/viewItem.php?itemId=41000>
84. <http://www.bacteriainphotos.com/bacterial-biofilm.html#>
85. KH Schleifer, "Isolation and Characterization of Staphylococci from Human Skin I. Amended Descriptions of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus saprophyticus* and Descriptions of Three New Species *Staphylococcus cohnii*, *Staphylococcus haemolyticus*, and *Staphylococcus xylosus*". *International Journal of Systematic Bacteriology*, 2015
86. A Abigali, "Bacterial pathogenesis : A molecular approach", 2002
87. SY Queck SY "Staphylococcus epidermidis and other Coagulase-Negative Staphylococci". *Staphylococcus: Molecular Genetics.*, 2008
88. W Levinson, "Medical microbiology and immunology", *Review of Medical Microbiology and Immunology*, 2014
89. <https://www.sciencephoto.com/media/129706/view/staphylococcus-epidermidis-bacteria-sem>

90. C.N. Banti, C. Papatriantafyllopoulou, M. Manoli, A.J. Tasiopoulos, S.K. Hadjikakou, Nimesulide Silver Metalldrugs, Containing the Mitochondriotropic, Triaryl Derivatives of Pnictogen; Anticancer Activity against Human Breast Cancer Cells, 2016, *Inorg. Chem.*, 55, 8681-8696
91. V. Vichai, K. Kirtikara, Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening, 2006, *Nat. Protoc.*, 1(3), 1112-1116
92. D.M. Leme, M.A. Marin-Morales, *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application, 2009, *Mutat. Res.*, 682, 71-81. 161)
93. M.-E.K. Stathopoulou, C.N. Banti, N. Kourkoumelis, A.G. Hatzidimitriou, A.G. Kalampounias, S.K. Hadjikakou, Silver complex of salicylic acid and its hydrogel-cream in wound healing chemotherapy, 2018, *J. Inorg. Biochem.*, 181, 41-55.
94. M.P. Chrysouli, C.N. Banti, N. Kourkoumelis, N. Panayiotou, G.S. Markopoulos, A.J. Tasiopoulos, S.K. Hadjikakou, Chloro(triphenylphosphine)gold(I) a forefront reagent in gold chemistry as apoptotic agent for cancer cells, 2018, *J. Inorg. Biochem.*, 179, 107- 120
95. I. Ketikidis, C.N. Banti, N. Kourkoumelis, C.G. Tsiafoulis, C. Papachristodoulou, A.G. Kalampounias, S.K. Hadjikakou, Conjugation of Penicillin-G with Silver(I) Ions
96. Expands Its Antimicrobial Activity against Gram Negative Bacteria, 2020, *Antibiotics*, 9, 25-42.
97. C.N. Banti, A.D. Giannoulis, N. Kourkoumelis, A.M. Owczarzak, M. Poyraz, M. Kubicki, K. Charalabopoulos, S.K. Hadjikakou, Mixed ligand–silver(I) complexes with 251 anti-inflammatory agents which can bind to lipoxygenase and calf-thymus DNA, modulating their function and inducing apoptosis, 2012, *Metallomics*, 4, 545-560.
98. G.K. Latsis, C.N. Banti, N. Kourkoumelis, C. Papatriantafyllopoulou, N. Panagiotou, A. Tasiopoulos, A. Douvalis, A.G. Kalampounias, T. Bakas, S.K. Hadjikakou, Poly

- Organotin Acetates against DNA with Possible Implementation on Human Breast Cancer, 2018, *Int. J. Mol. Sci.*, 19, 2055.
99. C.N. Banti, V. Tsiatouras, K. Karanicolas, N. Panagiotou, A.J. Tasiopoulos, N. Kourkoumelis, S.K. Hadjikakou, Antiproliferative activity and apoptosis induction, of organo antimony(III)–copper(I) conjugates, against human breast cancer cells, 2019, *Mol. Divers*
100. M. Kyropoulou, C.P. Raptopoulou, V. Psycharis, G. Psomas, Ni(II) complexes with nonsteroidal anti-inflammatory drug diclofenac: Structure and interaction with DNA and albumins, 2013, *Polyhedron*, 61, 126-136. 167)
101. L. Tabrizi, H. Chiniforoshan, P. McArdle, M. Ebrahimi, T. Khayamian, A novel bioactive Cd(II) polymeric complex with mefenamic acid: Synthesis, crystal structure and biological evaluations, 2015, *Inorg. Chim. Acta*, 432, 176-184
102. M. P. Chrysouli , C. N. Banti, N. Kourkoumelis , E. E. Moushi , A. J. Tasiopoulos. A. Douvalis C. Papachristodoulou , A. G. Hatzidimitriou , T. Bakas and S. K. Hadjikakou, Ciprofloxacin conjugated to diphenyltin(IV): a novel formulation with enhanced antimicrobial activity
103. Suhani Patel et al., 2016