



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

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

«ΑΝΟΡΓΑΝΗ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΝΕΩΝ ΥΛΙΚΩΝ ΑΝΘΕΚΤΙΚΩΝ ΣΤΗ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΜΟΛΥΝΣΗ ΓΙΑ

ΧΡΗΣΗ ΣΕ ΙΑΤΡΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ»



ΑΦΡΟΔΙΤΗ ΤΣΙΓΑΡΑ

ΧΗΜΙΚΟΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΧΑΤΖΗΚΑΚΟΥ ΣΩΤΗΡΙΟΣ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2023

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

Επιβλέπων μέλος ΔΕΠ: Χατζηκακού Σωτήριος

Θέμα: «ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΝΕΩΝ ΥΛΙΚΩΝ ΑΝΘΕΚΤΙΚΩΝ ΣΤΗ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΜΟΛΥΝΣΗ
ΓΙΑ ΧΡΗΣΗ ΣΕ ΙΑΤΡΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ»

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

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

2 Παναγιώτης Ζουμπουλάκης, Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήματος Επιστήμης και
Τεχνολογίας Τροφίμων, Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής (Μέλος)

3 Κωνσταντίνος Μήλιος, Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήματος Χημείας, Πανεπιστήμιο
Κρήτης (Μέλος)

Έγκριση μεταπτυχιακής διπλωματικής εργασίας στις:

Ο Διευθυντής του Δ.Π.Μ.Σ.

Ο/Η Γραμματέας

Καθηγητής _____

Ευχαριστίες

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

Πρώτα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα της διπλωματικής μου εργασίας, κύριο Χατζηκακού Σωτήριο, Καθηγητή του Τμήματος Χημείας και υπεύθυνο του διατμηματικού μεταπτυχιακού προγράμματος «ΑΝΟΡΓΑΝΗ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ», για την καθοδήγηση που μου παρείχε καθ' όλη τη διάρκεια της διπλωματικής μου εργασίας. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κυρία Χριστίνα Μπαντή μεταδιδάκτορα του Εργαστηρίου Βιολογικής Ανόργανης Χημείας και Διδάσκουσα Βιολογίας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, για την συνεχή καθοδήγηση της στα βιολογικά πειράματα. Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής κ. Ζουμπουλάκη Παναγιώτη και τον καθηγητή Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Κρήτης κ. Μήλιο Κωνσταντίνο, που δέχτηκαν να βρίσκονται στην τριμελή επιτροπή αξιολόγησης της διατριβής μου.

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

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι μολυσματικές ασθένειες αποτελούν συνεχή απειλή για την ανθρώπινη υγεία. Ωστόσο τα τελευταία χρόνια η αυξημένη χρήση αντιβιοτικών για την αντιμετώπισή τους, έφερε στην επιφάνεια ένα από τα σοβαρότερα προβλήματα του 21ου αιώνα, αυτό της αντιμικροβιακής αντοχής (AMR). Ένα από τα μέτρα για την καταπολέμησή της είναι η ενίσχυση της έρευνας και της καινοτομίας για την ανάπτυξη νέων αντιβιοτικών και διαγνωστικών, προς αυτή την κατεύθυνση.

Οι τετρακυκλίνες είναι αντιβιοτικά, γνωστά για τις πολυάριθμες ιδιότητες που διαθέτουν. Λόγω της αποτελεσματικότητάς τους τόσο σε Gram+ , όσο και σε Gram – βακτήρια, της χαμηλής τους τοξικότητας, των ελάχιστων παρενεργειών καθώς και της δυνατότητα χορήγησής τους ενδοφλέβια και από του στόματος, για την πλειοψηφία των μελών της τάξης τους, θεωρούνται ιδανικές ως αντιβιοτικά φάρμακα.

Όμως η χρήση τους πλέον έχει περιοριστεί σε λοιμώξεις με επιβεβαιωμένη ευαισθησία λόγω της ανάπτυξης και εξάπλωσης μηχανισμών ανθεκτικών στην TC. Επιπλέον, η δραστηριότητά της μειώνεται συνεχώς, καθώς ένα μέρος του αντιβιοτικού κατά τη διέλευσή του από το γαστρεντερικό σωλήνα εξουδετερώνεται κάθε φορά, από τα ένζυμα του στομάχου, βακτήρια και ένζυμα του εντέρου και από τα ηπατικά κύτταρα. Σε αυτά τα πλαίσια, είναι αναγκαία η ανάπτυξη νέων υδατοδιαλυτών, μη τοξικών, δραστικότερων συμπλόκων TC που θα χορηγούνται για παράδειγμα με τη μορφή σταγόνων. Η τετρακυκλίνη έχει μικρή διαλυτότητα στο νερό, επομένως η φαρμακευτική της δράση θα εμφανίζεται μειωμένη. Μία από τις μεθόδους που χρησιμοποιούνται για να ξεπεραστεί η χαμηλή της διαλυτότητα είναι η υδροχλωρίωσή της, διότι η διαλυτότητά της υδροχλωριωμένης μορφής στο νερό, είναι περίπου δύο τάξεις μεγέθους μεγαλύτερη σε σχέση με την μη υδροχλωριωμένη.

Κατά τη διάρκεια της μελέτης μας, για την ανάπτυξη νέων αντιβιοτικών στηριζόμενοι στην τροποποίηση εμπορικών φαρμάκων συντέθηκε το διανιόν της τετρακυκλίνης με νάτριο TCNa. Το σύμπλοκο χαρακτηρίστηκε από μια σειρά φυσικών και φασματοσκοπικών τεχνικών: σημείο τήξης, φασματοσκοπία υπέρυθρης μετατροπής ολικής ανάκλασης Fourier (ATR-FTIR), υπεριώδους-ορατού (UV-Vis), ^1H -Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (^1H -NMR) Το μοριακό βάρος του TCNa προσδιορίστηκε με κρυσκοπία. Η κρυσταλλική δομή του, έχει προσδιοριστεί με ανάλυση περίθλασης ακτίνων X μονοκρυστάλλου.

Η αντιβακτηριακή δράση του TCNa αξιολογήθηκε έναντι Gram+ και Gram- βακτηρίων, όπως τα *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*), *Escherichia coli* (*E.coli*), *Staphylococcus epidermidis* (*S. Epidermidis*) and *Staphylococcus aureus* (*S. Aureus*). Συγκεκριμένα μετρήθηκαν, η ελάχιστη βακτηριοκτόνος συγκέντρωση MBC, η ελάχιστη βακτηριοστατική συγκέντρωση MIC, η ζώνη αναστολής IZ και το βιοφίλμ. Σημειώνεται πως το βιοφίλμ μελετήθηκε μόνο για τα *P.aeruginosa* και *S.aureus* μιας και τα υπόλοιπα δεν σχηματίζουν. Η *in vivo* τοξικότητα αξιολογήθηκε με τη μέθοδο της γαρίδας άλμης (*Artemia salina* assay). Η *in vitro* τοξικότητα και γενοτοξικότητά του δοκιμάζεται έναντι φυσιολογικών ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων του κερατοειδούς (HCEC).

ABSTRACT

Infectious diseases are a constant threat to human health. However, in recent decades, the widespread use of antibiotics to treat them, has brought to the surface one of the most serious problems of the 21st century, that of antimicrobial resistance (AMR). One of the measures to combat AMP is to strengthen research and innovation for the development of new antibiotics and diagnostics, in this direction.

Tetracyclines are antibiotics known for a variety of properties. Thanks to their efficiency against Gram+ as well as Gram- bacteria, their low toxicity, and few side-effects, they are considered ideal antibiotics.

However, their usage has been restricted due to AMR. Moreover, its activity is in decline, as part of the antibiotic is neutralized during its passage through the digestive track, due to stomach and intestinal enzymes as well as bacteria. Therefore, it is necessary to develop new water-soluble, non-toxic, more efficient TC complexes.

In the course of our study for the development of new antibiotics by the modification of commercial drugs the sodium dianion of tetracycline (TCNa) was synthesized and characterized by melting point and spectroscopic techniques, ATR-FTIR, ¹H-NMR, UV/Vis. Cryoscopy was employed for the molecular weight determination. The crystal structure of TCNa₂ (TCNa) was also characterized by single crystal diffraction analysis. The antibacterial activity of TCNa is evaluated against Gram negative and positive bacterial species like *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*), *Escherichia coli* (*E.coli*), *Staphylococcus epidermidis* (*S. Epidermidis*) and *Staphylococcus aureus* (*S. Aureus*). The in vitro toxicity of TCNa was evaluated against normal human corneal epithelial cells (HCECs) whereas the in vitro genotoxicity was evaluated by the

micronucleus (MN) assay in HCECs. The *Artemia salina* model was also applied for the evaluation of its in vivo toxicity

Πίνακας περιεχομένων

| | |
|--|-----------|
| A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ | 14 |
| ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 | 14 |
| 1.1 Ιστορική αναδρομή της μικροβιολογίας και λοιμωξιολογίας..... | 14 |
| 1.2 Λοιμώξεις: πηγές και τρόποι μετάδοσης | 16 |
| 1.3 Δομή και μορφολογία των μικροοργανισμών..... | 17 |
| 1.3.1 Ανατομία βακτηριακού κυττάρου..... | 18 |
| 1.3.2 Κυτταροπλασματική μεμβράνη | 19 |
| 1.3.3 Κυτταρικό τοίχωμα..... | 24 |
| 1.3.4 Έλυτρο | 27 |
| 1.3.5 Στρώματα S..... | 28 |
| 1.3.6 Μαστίγια | 28 |
| 1.3.7 Βλεφαρίδες | 28 |
| 1.3.8 Σμήριγγες..... | 29 |
| 1.3.9. Χρωματόσωμα-Πλασμίδια..... | 29 |
| 1.3.10 Ριβοσώματα | 29 |
| 1.4 Βακτηριακή ανάπτυξη, φυσιολογία και θάνατος | 30 |
| 1.4.1 Φάσεις βακτηριακής ανάπτυξης σε υγρό θρεπτικό υλικό | 31 |
| 1.4.2 Καταστολή βακτηριακής ανάπτυξης..... | 32 |
| 1.4.2.1 Θέρμανση..... | 33 |
| 1.4.2.2 Ακτινοβόληση..... | 33 |

| | |
|--|-----------|
| 1.4.2.3 Χημική αποστείρωση | 33 |
| 1.4.2.4 Διήθηση..... | 34 |
| 1.5 Βακτήρια..... | 35 |
| 1.5.1 Pseudomonas aeruginosa | 35 |
| 1.5.2 Escherichia coli | 37 |
| 1.5.3 Staphylococcus..... | 38 |
| ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 | 41 |
| 2.1 Ιστορική αναδρομή αντιβιοτικών | 41 |
| 2.2 Κατηγοριοποίηση αντιβιοτικών | 42 |
| 2.3 Τετρακυκλίνες | 43 |
| 2.3.1 Ιστορικά στοιχεία | 43 |
| 2.3.2 Εφαρμογές-πιθανές παρενέργειες | 46 |
| 2.3.3. Διαλυτότητα-Χορήγηση | 47 |
| 2.3.4 Σχέση δομής και δράσης..... | 53 |
| 2.3.5 Μηχανισμός δράσης | 55 |
| 2.4 Μεταλλοφάρμακα..... | 58 |
| 2.5 Νάτριο | 60 |
| 2.6 Μικροβιακή αντοχή..... | 61 |
| 2.6.1 Γενικά στοιχεία..... | 61 |
| 2.6.2 Μηχανισμοί αντοχής στις τετρακυκλίνες..... | 63 |
| 2.7 Μικροβιακή κερατίτιδα..... | 65 |

| | |
|---|-----------|
| B. ΣΚΟΠΟΣ..... | 66 |
| Γ. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ..... | 67 |
| 3.1. Χημικό μέρος..... | 67 |
| 3.1.1. Χημικά αντιδραστήρια και διαλύτες..... | 67 |
| 3.1.2. Όργανα και σκεύη | 67 |
| 3.1.3. Σύνθεση..... | 68 |
| 3.1.4. Διαλυτότητα | 68 |
| 3.1.5. Σημείο τήξης..... | 69 |
| 3.1.6. Κρυσκοπία..... | 69 |
| 3.1.10. XRD | 75 |
| 3.1.11. Σύνθεση μη μολυσματικής υδρογέλης ρHEMA..... | 75 |
| 3.2.2. Αντιμικροβιακή μελέτη | 76 |
| 3.2.2.1 Ζώνες αναστολής (IZ) | 77 |
| 3.2.2.2 Ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (MIC)..... | 78 |
| 3.2.2.3 Ελάχιστη βακτηριοκτόνος συγκέντρωση (MBC) και ποσοστό επιβίωσης παρουσία υδρογελών. | 79 |
| 3.2.2.4 Ελάχιστη συγκέντρωσης εξάλειψης βιοφίλμ (BEC) και ποσοστό βιωσιμότητας παρουσία υδρογελών | 80 |
| 3.3 Μελέτη της <i>in vivo</i> τοξικότητας με τη μέθοδο γαρίδας άλμης (<i>Artemia salina assay</i>) . | 81 |
| 3.4 Μελέτη της <i>in vitro</i> τοξικότητα σε κύτταρα HCEC | 82 |
| 4.1. Χημικό μέρος..... | 84 |
| 4.1.2. Σύνθεση TCNa | 84 |

| | |
|--|------------|
| 4.1.3. Διαλυτότητα | 85 |
| 4.1.4. Σημείο τήξης..... | 86 |
| 4.1.5. Κρυσκοπία..... | 86 |
| 4.1.6. Φασματοσκοπία ATR-FTIR..... | 87 |
| 4.1.7. Φασματοσκοπία UV/Vis..... | 90 |
| 4.1.9. Φασματοσκοπία ¹ H-NMR..... | 91 |
| 4.1.10. Σταθερότητα μέσω UV/Vis και ¹ H-NMR..... | 95 |
| 4.1.11. XRD | 96 |
| 4.1.12 Σύνθεση μη μολυσματικής υδρογέλης | 99 |
| 4.2 Αντιμικροβιακή μελέτη | 100 |
| 4.2.1 Προσδιορισμός ζώνης αναστολής (IZ) | 100 |
| 4.2.2 Προσδιορισμός ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (MIC) και ποσοστού επιβίωσης παρουσία υδρογελών | 104 |
| 4.2.3 Προσδιορισμός ελάχιστης βακτηριοκτόνου συγκέντρωσης (MBC) | 107 |
| 4.2.4 Προσδιορισμός Ελάχιστη συγκέντρωσης εξάλειψης βιοφίλμ (BEC) και ποσοστού βιωσιμότητας βιοφίλμ, παρουσία υδρογελών..... | 109 |
| 4.3 Μελέτη της <i>in vivo</i> τοξικότητας με τη μέθοδο γαρίδας άλμης (<i>Artemia salina assay</i>) | 114 |
| 4.4 Μελέτη της <i>in vitro</i> τοξικότητας σε HCECs..... | 116 |
| E. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ | 117 |
| Βιβλιογραφία | 119 |
| Δημοσιεύσεις | 126 |

Α. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

1.1 Ιστορική αναδρομή της μικροβιολογίας και λοιμωξιολογίας

Μέσα στο στόμα και στο έντερο, πάνω στο δέρμα ενός ανθρώπου κατοικούν πάνω από 10^{14} μικρόβια, 100 φορές περισσότερα από τα κύτταρα που συνιστούν το ανθρώπινο σώμα. Η πλειοψηφία των ανθρώπων ζει εν αγνοία τόσο της παρουσίας αυτών των πολυάριθμων μικροοργανισμών, όσο και του γεγονότος ότι με κάθε άγγιγμα μιας επιφάνειας, με κάθε χειραγία ή ομιλία είναι δυνατή η μετάδοσή τους. Ο ενοφθαλμισμός ενός λάθος είδους μικροβίου μπορεί να οδηγήσει στο θάνατο, ωστόσο ο άνθρωπος όχι μόνο επιβιώνει αλλά ευδοκμεί παρά τη συνεχή έκθεσή του στον κόσμο των μικροβίων.

Διαφορετικές πορείες ακολουθήθηκαν από τη μικροβιολογία και τη λοιμωξιολογία για χιλιάδες χρόνια. Οι πρώτες σχετικές, με τις λοιμώξεις και τις επιδημίες, απόψεις φαίνεται πως διατυπώθηκαν από τον Ιπποκράτη τον 3^ο αι. π.Χ. Ωστόσο χρειάστηκε να περάσουν 2000 χρόνια πριν προταθεί από τον G. Fracstoro (1483-1553) στο βιβλίο του «De Contagione», πως οι «μολυσματικού σπόροι» και όχι τα «πνεύματα του αιθέρα» πιθανόν ευθύνονται για τις λοιμώξεις [1].

Τελείως ανεξάρτητα, η παρατήρηση μικρών αντικειμένων που δεν ήταν αντιληπτά με γυμνό μάτι άρχισε από τους πρώτους μικροσκόπους. Ο Ολλανδός A.V. Leeuwenhoek, ο σημαντικότερος του είδους του, με τη χρήση ενός περίτεχνου χειροποίητου μικροσκοπίου ανακάλυψε στο σάλιο, στο εντερικό περιεχόμενο υγιών ατόμων καθώς και σε υλικά όπως η λάσπη και το νερό, πληθώρα μικροοργανισμών και κατέληξε στο συμπέρασμα πως ήταν ζωντανά λόγω της κίνησής τους [1].

Στο δεύτερο μισό του 19^{ου} αιώνα αποδείχθηκαν τρία βασικά χαρακτηριστικά των λοιμώξεων.

1. Ο J. Hunter (1728-1793) απέδειξε τη μεταδοτικότητα των λοιμώξεων και συγκεκριμένα ης σύφιλης και της γονόρροιας μετά τον ενοφθαλμισμό εκκρίσεων των γεννητικών οργάνων ασθενούς σε υγιές άτομο [2].
2. Ο E. Jenner (1749-1823) με την εφαρμογή μιας παραλλαγής του ενοφθαλμισμού, τον δαμαλισμό, από ήπιες περιπτώσεις ευλογιάς επέδειξε την προφυλακτική ικανότητα της μεθόδου. Η πρακτική αυτή ονομάστηκε εμβολιασμός (vaccination, από τη λατινική λέξη vacca: αγελάδα) και επεκτάθηκε πολύ γρήγορα σε όλη την Ευρώπη [2].
3. Ο J.Snow (1813-1858) απέδειξε την αποτροπή μετάδοσης λοιμώξεων με την εφαρμογή κατάλληλων μέτρων και συγκεκριμένα κατάφερε να σταματήσει την εξάπλωση της χολέρας, εμποδίζοντας την πρόσβαση σε μολυσμένη πηγή νερού [1].

Ο L. Pasteur και ο R. Koch (1843-1910) δύο σημαντικές προσωπικότητες της μικροβιολογίας απέδειξαν πως τα μικρόβια είναι η αιτία των λοιμώξεων. Ο L.Pasteur κατέρριψε δύο δόγματα που επικρατούσαν στην εποχή του: τη θεωρία πως η αλκοολική ζύμωση ήταν καθαρά χημική διεργασία, αποδεικνύοντας την αναγκαιότητα ύπαρξης μικροοργανισμών και τη θεωρία της αυτόματης γέννησης καθώς απέδειξε την στειρότητα των θρεπτικών διαλυμάτων, εμποδίζοντας την είσοδο μικροοργανισμών σε αυτά. Η έρευνα του Pasteur συνέβαλε στην ανακάλυψη των αιτιών πολλών νοσών και στη διαπίστωση πως η καλλιέργεια των μικροβίων σε τεχνητά θρεπτικά υλικά οδηγεί στην εξασθένηση της λοιμογονικότητάς τους [2].

Από την άλλη ο R.Koch θεμελίωσε ορισμένες βασικές αρχές, γνωστές ως αξιώματα του Koch στις οποίες διατυπώνονται οι απαραίτητες προϋποθέσεις για την τεκμηρίωση της αιτιολογικής σχέσης ενός συγκεκριμένου μικροοργανισμού με μία συγκεκριμένη νόσο. Βέβαια η εφαρμογή των αξιωμάτων του R.Koch δεν είναι πάντοτε δυνατή [3].

Σχεδόν έναν αιώνα μετά η περιγραφή της δομής του DNA από τους J. Watson, F. Crick, M. Wilkins και R. Franklin το 1953 σε συνδυασμό με τις θεωρίες των Koch και Pasteur αποτέλεσαν αφετηρία επαναστατικών ανακαλύψεων για την αναλυτική μελέτη των μικροβίων [2].

1.2 Λοιμώξεις: πηγές και τρόποι μετάδοσης

Για την σύλληψη των τρόπων αλληλεπίδρασης των μικροβίων με τον άνθρωπο, είναι απαραίτητη η κατανόηση των διαφορετικών τρόπων ζωής των διάφορων μικροβίων και του βαθμού εξάρτησης από τον άνθρωπο. Τα μικρόβια που έχουν σχέση απόλυτης εξάρτησης με τον άνθρωπο για την επίτευξη του πολλαπλασιασμού τους ονομάζονται υποχρεωτικώς ανθρώπινα παράσιτα [4]. Για την αναπαραγωγή ορισμένων από αυτά είναι υποχρεωτική η πρόκληση νόσου, για αυτό και ονομάζονται υποχρεωτικώς παθογόνα [4]. Ένα τέτοιο μικρόβιο είναι το Μυκοβακτηρίδιο της φυματίωσης. Ωστόσο στις περισσότερες περιπτώσεις η νόσος αποτελεί τυχαίο φαινόμενο, πολλές φορές και κίνδυνος για τη μακροχρόνια επιβίωση του μικροοργανισμού [2].

Η μετάδοση κάθε λοίμωξης στον εκάστοτε ξενιστή γίνεται από συγκεκριμένη πηγή και με συγκεκριμένο τρόπο ή τρόπους. Το φυσικό περιβάλλον στο οποίο ζει και πολλαπλασιάζεται ένας μικροοργανισμός, πολλές φορές συνιστά την άμεση πηγή της λοίμωξης [4]. Μπορεί όμως να αποτελεί και την δεξαμενή κατά την προσπάθεια ελέγχου της λοίμωξης. Στην περίπτωση

που δεξαμενή και πηγή δεν ταυτίζονται, η καταστροφή της πηγής συνεπάγεται περιορισμός της λοίμωξης ενώ η καταστροφή της δεξαμενής συνεπάγεται «ξερίζωμα» της λοίμωξης [4].

Οι λοιμώξεις μπορούν να μεταδοθούν με διάφορους τρόπους : με άμεση επαφή με μολυσμένα άτομα, με μολυσμένα αντικείμενα, με την εισπνοή σταγονιδίων μολυσμένων ατόμων κατά την απελευθέρωσή τους στον αέρα, μέσω των τροφίμων και του νερού [2].

Ωστόσο το μεγαλύτερο ποσοστό των λοιμώξεων είναι ενδογενείς, δηλαδή προκαλούνται από μικροοργανισμούς που υπό φυσιολογικές συνθήκες κατοικούν στον οργανισμό του ξενιστή αποτελώντας τη φυσιολογική χλωρίδα του [2]. Μπορεί να προκληθούν όταν ένας μικροοργανισμός βρεθεί σε λάθος μέρος στον οργανισμό, όπως για παράδειγμα σε περιπτώσεις τραυματισμών και χειρουργικών επεμβάσεων ή αδυναμίας του ξενιστή να εμποδίσει την εξάπλωση των μικροοργανισμών σε πιθανές θέσεις πρόκλησης βλάβης. Ένας ακόμη λόγος διατάραξης της φυσιολογικής χλωρίδας είναι τα αντιβιοτικά τα οποία επιτρέπουν σε ανθεκτικούς σε αυτά μικροοργανισμούς να προκαλέσουν λοίμωξη. Τα μικρόβια αυτά χαρακτηρίζονται ευκαιριακώς παθογόνα [2]. Στην περίπτωση των ενδογενών λοιμώξεων η πηγή και η δεξαμενή της λοίμωξης ταυτίζονται [4]. Εάν η πηγή είναι εξωτερική η λοίμωξη χαρακτηρίζεται εξωγενής και το φυσικό περιβάλλον του μικροβίου αποτελεί την δεξαμενή της λοίμωξης [4]. Η γνώση των τρόπων μετάδοσης και πρόκλησης μίας νόσου επιτρέπει τη διαμόρφωση κατάλληλων στρατηγικών αντιμετώπισης συγκεκριμένων λοιμώξεων και ανθεκτικών στα αντιβιοτικά μικροοργανισμών.

1.3 Δομή και μορφολογία των μικροοργανισμών.

Τα μικρόβια είναι μικροσκοπικοί, συνήθως μονοκύτταροι μικροοργανισμοί και η διάκρισή τους γίνεται με τη χρήση μικροσκοπίου. Η καλλιέργειά τους σε στερεά θρεπτικά

υλικά, έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό μακροσκοπικά ορατών δομών που ονομάζονται αποικίες και αποτελούνται από περίπου 10^8 κύτταρα. Κατατάσσονται σε τρεις ομάδες: τα

Βακτήρια, τα Αρχαία και τα Ευκάρυα. Οι δύο πρώτες ανήκουν στους προκαρυωτικούς οργανισμούς, καθώς δε διαθέτουν σαφή οριοθετημένο πυρήνα [5]. Οι σημαντικότερες διαφορές μεταξύ προκαρυωτικών και ευκαρυωτικών οργανισμών παρουσιάζονται στον Πίνακα 1.

Πίνακας 1: Χαρακτηριστικά ευκαρυωτικών και προκαρυωτικών κυττάρων.

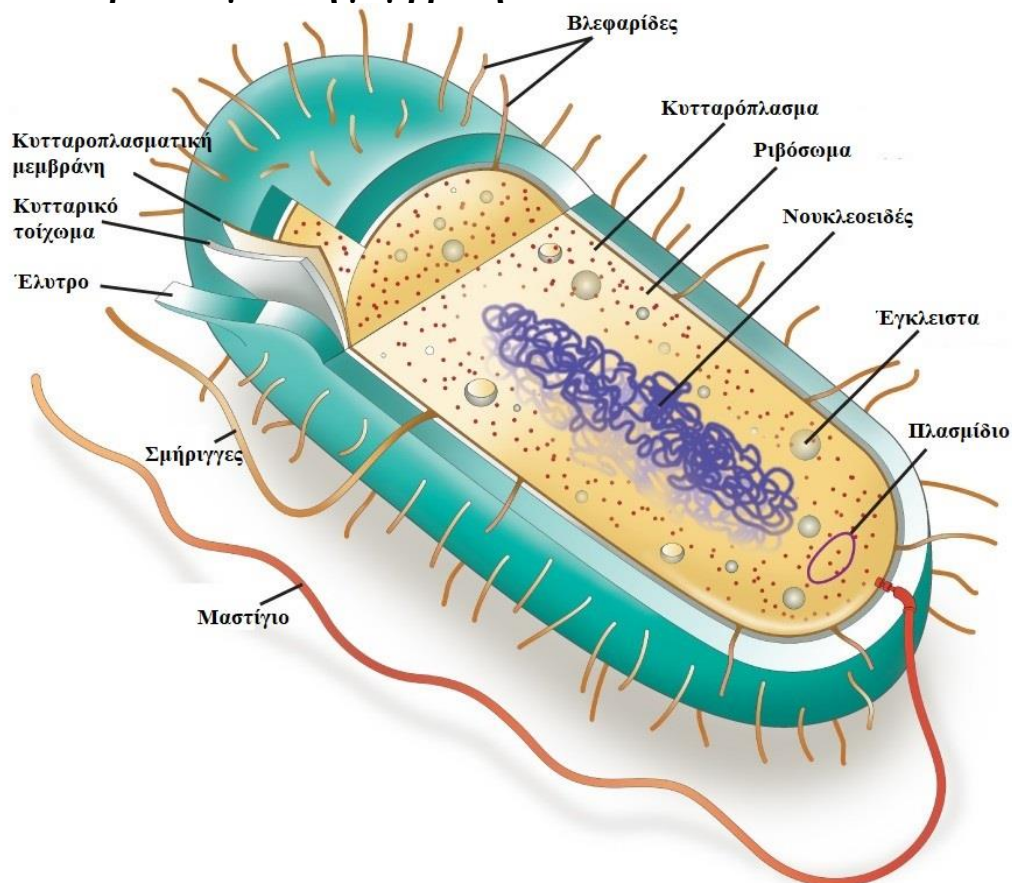
| Χαρακτηριστικά | Προκαρυωτικά | Ευκαρυωτικά |
|--------------------------------|---------------------------------|-----------------------------------|
| Πυρήνας | OXI | NAI |
| Διάμετρος (Μ.Ο) | ~1 μM | ~ 10-100 μM |
| Κυτταροσκελετός | OXI | NAI |
| Μεμβρανικά οργανίδια | OXI | NAI |
| Μέγεθος DNA (ζ, β) | $1 \cdot 10^6$ - $5 \cdot 10^6$ | $1.5 \cdot 10^7$ - $5 \cdot 10^9$ |
| Δομή χρωμοσωμάτων | Ένα κυκλικό μόριο DNA | Πολλά γραμμικά χρωμοσώματα |

1.3.1 Ανατομία βακτηριακού κυττάρου

Στους προκαρυωτικούς οργανισμούς δεν παρατηρούνται ενδοκυτταρικά οργανίδια (Εικόνα 1.1). Το γενετικό υλικό των βακτηρίων συνήθως είναι κυκλικό και βρίσκεται στο χρωματόσωμα. Στο κυτταρόπλασμα μαζί με το χρωματόσωμα εντοπίζονται και πολλά ριβοσώματα. Ορισμένα βακτηριακά κύτταρα έχουν μαστίγια για την κίνησή τους ή άλλες δομές

όπως τα ινίδια. Σε όλα σχεδόν τα προκαρυωτικά κύτταρα υπάρχει ένα τοίχωμα που περιβάλλει την κυτταρική μεμβράνη και λειτουργεί προστατευτικά ως προς το κύτταρο [5].

1.3.2 Κυτταροπλασματική μεμβράνη



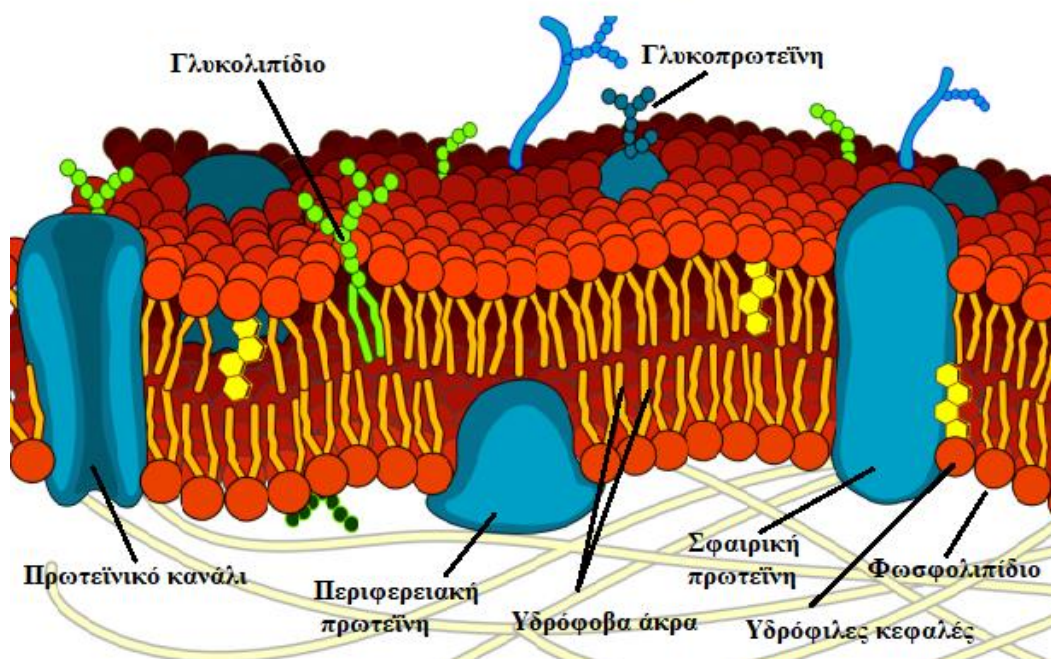
Εικόνα 1.1: Δομή προκαρυωτικού κυττάρου. Τροποποιημένη [6].

Η ζωντανή ύλη ή αλλιώς το πρωτόπλασμα ενός βακτηριακού κυττάρου οριοθετείται από μία λεπτή ελαστική ημιπερατή μεμβράνη που ονομάζεται κυτταροπλασματική μεμβράνη. Έχει δομή φωσφολιπιδικής διπλοστιβάδας, με ένα υδρόφοβο εσωτερικό μέρος και ένα υδρόφιλο εξωτερικό και το πάχος της κυμαίνεται από 5 έως 10 nm [5].

Διαθέτει μεγάλο αριθμό πρωτεϊνών με λειτουργίες αντίστοιχες των πρωτεϊνών των ευκαρυωτικών μεμβρανών. Οι πολλαπλές τους λειτουργίες είναι το χαρακτηριστικό

διαφοροποίησής των κυτταροπλασματικών μεμβρανών των προκαρυωτικών κυττάρων από αυτές των ευκαρυωτικών. Συγκεκριμένα, οι πρωτεΐνες των ευκαρυωτικών κυττάρων εκκρίνονται και κατεργάζονται στο ενδοπλασματικό δίκτυο και στη συσκευή Golgi ενώ η μεταφορά των ηλεκτρονίων και η οξειδωτική φωσφορυλίωση πραγματοποιούνται στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων [2]. Στην περίπτωση των προκαρυωτικών κυττάρων όλες αυτές οι λειτουργίες εκτελούνται από μία μόνο μεμβράνη. Επομένως, εξηγείται γιατί οι κυτταρικές μεμβράνες των προκαρυωτικών κυττάρων χαρακτηρίζονται από αφθονία πρωτεϊνών αφήνοντας περιορισμένο χώρο στα φωσfolιπίδια [5].

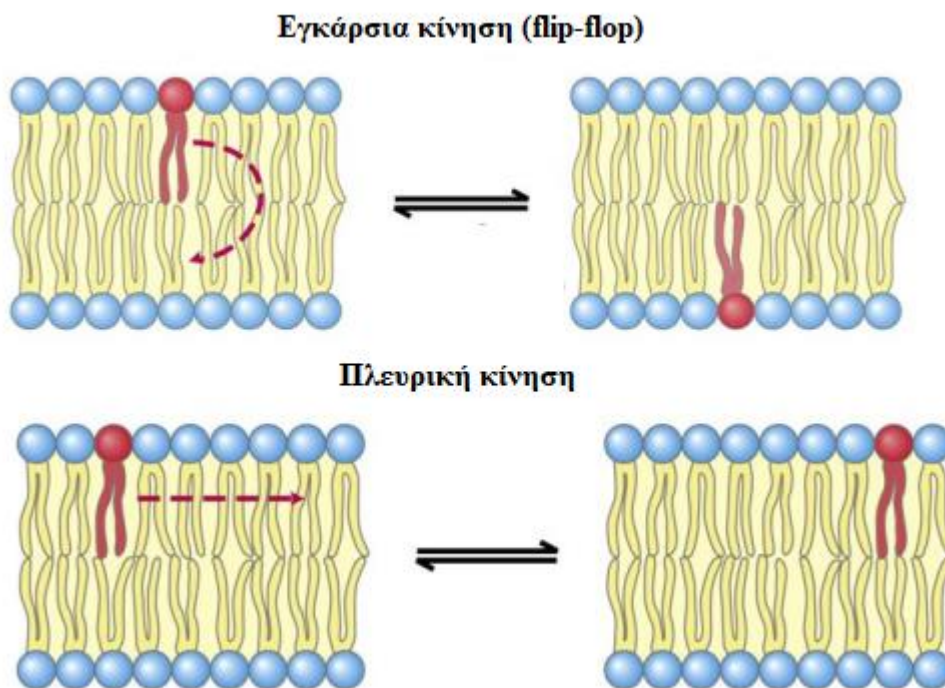
Στηριζόμενοι στην κινητικότητα των πρωτεϊνών οι S. J. Singer και G. Nikolson για να περιγράψουν τη συνολική δομή και τον τρόπο οργάνωσης των μεμβρανών, το 1972 πρότειναν το μοντέλο ρευστού μωσαϊκού (Εικόνα 1.2). Με βάση αυτό οι μεμβράνες θεωρούνται διαλύματα δύο διαστάσεων αποτελούμενα από προσανατολισμένες πρωτεΐνες και προσανατολισμένα λιπίδια [5]. Στα βακτήρια οι αλειφατικές αλυσίδες των λιπιδίων συνδέονται



Εικόνα 1.2: Δομή κυτταρικής μεμβράνης. Τροποποιημένη [6].

μέσω εστερικών δεσμών με τη γλυκερόλη. Αυτές οι αλειφατικές ομάδες είναι λιπαρά οξέα 16 ή 18 ατόμων άνθρακα ευθείας αλυσίδας.

Τα φωσφολιπίδια έχουν τη δυνατότητα να κινούνται με πλευρική ή με εγκάρσια (flip-flop) διάχυση (Εικόνα 1.3) Η εγκάρσια διάχυση των φωσφολιπιδίων, δηλαδή η μεταφορά τους από τη μία πλευρά τη μεμβράνης στην άλλη, θεωρείται πολύ αργή διαδικασία καθώς χρειάζεται 10^9 περισσότερο χρόνο σε σχέση με την πλευρική διάχυση (ίδια πλευρά) στο επίπεδο της μεμβράνης. Στις πρωτεΐνες λόγω των εκτεταμένων πολικών περιοχών που διαθέτουν, οι φραγμοί της ελεύθερης ενέργειας στην περίπτωση της εγκάρσιας διάχυσης είναι αρκετά μεγαλύτεροι σε σχέση με των λιπιδίων. Από την ρευστότητα της μεμβράνης εξαρτώνται διαδικασίες όπως η μεταφορά ουσιών και η μεταγωγή σήματος [7].



Εικόνα 1.3: Εγκάρσια και πλευρική κίνηση των φωσφολιπιδίων. Τροποποιημένη [8].

Η εκλεκτική της διαπερατότητα της μεμβράνης αφορά χημικές ενώσεις ιόντα και νερό. Η μεταφορά τους μπορεί να γίνει με διάφορους μηχανισμούς οι οποίοι διακρίνονται ανάλογα με το αν καταναλώνεται ενέργεια ή όχι. Στην παθητική μεταφορά (απλή διάχυση, διευκολυνόμενη διάχυση, ώσμωση) δεν απαιτείται ενέργεια ενώ στην ενεργό μεταφορά δαπανάται είτε χημική ενέργεια (ATP) είτε ηλεκτροχημική (Protonmotive force PMF) [7]. Η μεταφορά ενός μορίου εκτός από τη ρευστότητα της φωσφολιπιδικής διπλοστιβάδας εξαρτάται και από τη διαθεσιμότητα μιας πηγής ενέργειας [2].

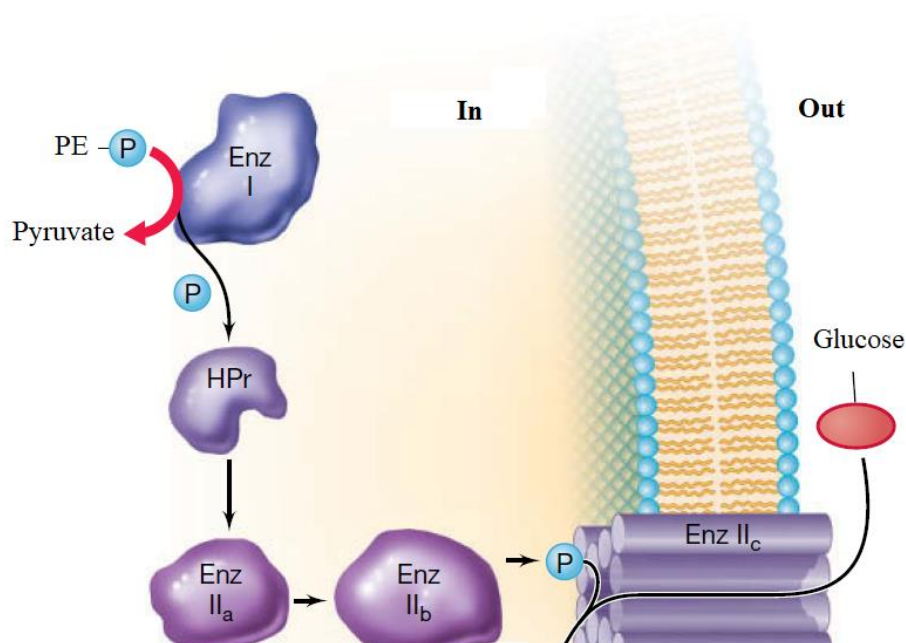
Ορισμένα μόρια (λιπόφιλα) είναι ικανά να περάσουν την κυτταρική μεμβράνη καθώς διαλύονται στη λιπιδική διπλοστιβάδα. Τέτοια μόρια, παραδείγματος χάριν αποτελούν οι στεροειδείς ορμόνες [2]. Η διακίνηση των μορίων αυτών με απλή διάχυση γίνεται με κατεύθυνση τη χαμηλότερη συγκέντρωσή τους, όπως ορίζεται και από το δεύτερο θερμοδυναμικό νόμο, χωρίς την κατανάλωση ενέργειας. Τα μόρια που διαπερνούν την μεμβράνη χρησιμοποιούνται σε διάφορες αντιδράσεις του μεταβολισμού του κυττάρου, με αποτέλεσμα να διατηρείται η διαφορά των συγκεντρώσεων εκατέρωθεν της μεμβράνης. Συνεπώς ο ρυθμός με τον οποίο διαχέονται τα μόρια εξαρτάται από τον ρυθμό με τον οποίο τα διερχόμενα μόρια χρησιμοποιούνται στον μεταβολισμό. Η διαδικασία ολοκληρώνεται όταν επέλθει ισορροπία [5].

Πολικά μόρια όπως τα ιόντα νατρίου αδυνατούν να περάσουν το υδρόφοβο τμήμα της διπλοστιβάδας. Το πέρασμα τέτοιων μορίων γίνεται με τη βοήθεια εξειδικευμένων διαύλων (δομικές πρωτεΐνες-φορείς) χωρίς κατανάλωση ενέργειας [7]. Όπως και στην απλή διάχυση, ώθηση για τη μεταφορά των ιόντων αποτελεί η ενέργεια της βαθμίδωσης της συγκέντρωσης των ίδιων των ιόντων. Σε αυτόν τον τύπο διάχυσης η ουσία που πρόκειται να μετακινηθεί συνδέεται σε ειδική θέση του φορέα στη μία πλευρά της μεμβράνης. Η σύνδεση αυτή οδηγεί σε μεταβολή της στερεοδιαμόρφωσης τμήματος του φορέα και έτσι μετατοπίζεται η θέση πάνω

στην οποία βρίσκεται η ουσία, στην άλλη πλευρά της μεμβράνης. Η αποσύνδεση της ουσίας από τον φορέα συνεπάγεται και ολοκλήρωση της διάχυσης [5].

Για τη μετακίνηση μορίων χημικών ενώσεων ανεξαρτήτως της συγκέντρωσης των μορίων, είναι απαραίτητη η είσοδος ενέργειας στο σύστημα καθώς μειώνεται η εντροπία του. Αυτός ο τύπος διέλευσης ονομάζεται ενεργός μεταφορά διότι απαιτείται ενέργεια από άλλη πηγή [7]. Μπορεί να επιτευχθεί με την βοήθεια ειδικών πρωτεϊνών των περμεασών με την κατανάλωση ηλεκτροχημικής ενέργεια από την ιοντική διαβάθμιση της μεμβράνης (PMF). Μέσω αυτού του μηχανισμού μεταφοράς, προσλαμβάνονται θρεπτικά συστατικά μεγάλης σημασίας για τους προκαρυωτικούς οργανισμούς [7].

Οι αναερόβιοι και οι προαιρετικά αναερόβιοι οργανισμοί χρησιμοποιούν ένα άλλο σύστημα για τη μεταφορά ενέργειας, αυτό του φωσφο-ενολο-πυροσταφυλικού-φωσφορο-τρανσφεράσης (Phospho-enol-pyruvate: phosphor-transferase system, PEP:PTS). Σύμφωνα με



Εικόνα 1.5: Μεταφορά σακχάρων μέσω του PEP:PTS κατά την οποία γίνεται αρχικά μεταφορά της φωσφορικής ομάδας από το PEP στην HPr και καταλύεται από το Ένζυμο I. Η φωσφορική ομάδα μεταφέρεται από την HPr αρχικά στο Ένζυμο III κ στη συνέχεια στο Ένζυμο II που είναι υπεύθυνο για τη φωσφορυλίωση και μεταφορά του μορίου [9].

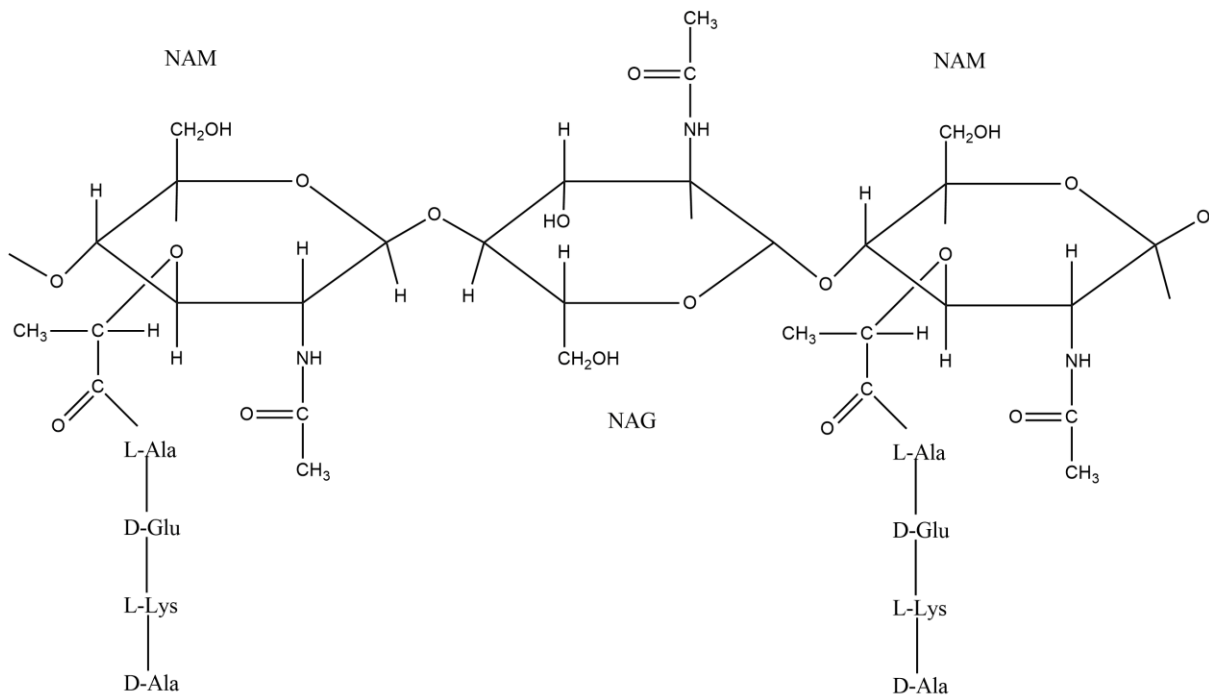
αυτόν τον μηχανισμό κατά τη μεταφορά ενός μορίου πραγματοποιείται η φωσφορυλίωσή του μέσω της κυτταρικής μεμβράνης με τη βοήθεια τριών ενζύμων και μίας κυτταροπλασματικής πρωτεΐνης που περιέχει ιστιδίνη (HPt) (Εικόνα 1.4). Στα Gram αρνητικά βακτήρια μπορεί να πραγματοποιηθεί ενεργός μεταφορά μέσω δεσμευτικών πρωτεϊνών (πορινών) και ενός συμπλέγματος τριών πρωτεϊνών των MaIF, MaIG, MaIK. [7].

1.3.3 Κυτταρικό τοίχωμα

Εξωτερικά της κυτταρικής μεμβράνης εντοπίζεται πορώδες κυτταρικό τοίχωμα πάχους 10-25 nm. Το κυτταρικό τοίχωμα είναι διαπερατό για μόρια διαμέτρου μικρότερης του 1 nm και μάζας μικρότερης των 10 kD [5]. Χαρακτηρίζεται από ανθεκτικότητα και σχετική ακαμψία αν και παρατηρείται μικρή ελαστικότητα προστατεύοντας την κυτταρική μεμβράνη από την ωσμωτική πίεση (5 και 25 atm σε Gram αρνητικά και Gram θετικά κύτταρα αντιστοίχως) [7]. Διατηρεί το σχήμα του βακτηρίου και από την ακεραιότητά του εξαρτάται η επιβίωση της ζωντανής ύλης του βακτηριακού κυττάρου [10] Αν το κυτταρικό τοίχωμα εξασθενήσει ή επέλθει ρήξη του, η εισροή νερού στο πρωτόπλασμα λόγω ώσμωσης θα οδηγήσει σε λύση του κυττάρου, δηλαδή στη θανάσιμη αποσύνθεση και διάλυσή του [5].

Κατά την κυτταρική διαίρεση το κυτταρικό τοίχωμα έχει σημαντικό ρόλο καθώς στον ισημερινό του κυττάρου, περιφερειακά προς το εσωτερικό σχηματίζεται ένα εγκάρσιο διάφραγμα. Το διάφραγμα αναπτύσσεται από το υλικό του κυτταρικού τοιχώματος και καταλήγει στο σχηματισμό ενός πλήρους χωρίσματος που διαχωρίζει τα θυγατρικά κύτταρα μεταξύ τους. Η παρακολούθηση αυτής της διαδικασίας καθώς εκτυλίσσεται σε ζωντανά κύτταρα είναι δυνατή μετά από σήμανση της πρωτεΐνης διαίρεσης FtsZ, με τη χρήση μικροσκοπίου φθορισμού [5].

Το κύριο δομικό συστατικό του κυτταρικού τοιχώματος είναι η πεπτιδογλυκάνη ή μουρεΐνη [2]. Η δομή της ποικίλει από βακτήριο σε βακτήριο αλλά όλες οι επαναλαμβανόμενες

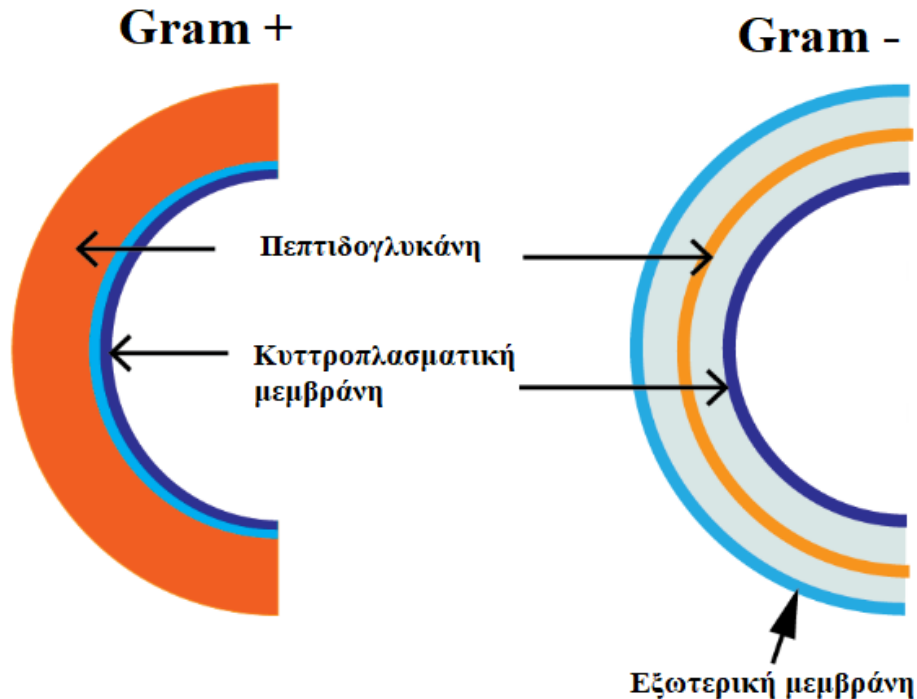


Σχήμα 1.1: Σχηματισμός πεπτιδογλυκάνης με β (1-4) γλυκοζιτικό δεσμό.

μονάδες της αποτελούνται από έναν δισακχαρίτη N-ακετυλογλυκοζαμίνης (NAG) και N-ακετυλομουραμικού οξέος (NAM) που συνδέονται εναλλάξ με β -1,4-γλυκοσιδικούς δεσμούς σχηματίζοντας ένα στρώμα [2]. Το πάχος του είναι μεγάλης σημασίας για την ταξινόμηση των βακτηρίων.

Το 19^ο αιώνα ο C. Gram, Δανός γιατρός, επινόησε μια διαδικασία χρωματισμού, με τη χρήση κρυσταλλικού ιώδους, για τη διάκριση των βακτηρίων ανάλογα με το πάχος του στρώματος πεπτιδογλυκάνης [2]. Τα βακτήρια με παχύ στρώμα ονομάζονται Gram-θετικά, ενώ εκείνα με λεπτό Gram-αρνητικά (Εικόνα 1.5). Κατά τη διαδικασία αυτή, μετά τη χρώση των βακτηριακών κυττάρων, αυτά αποχρωματίζονται με αλκοόλη, έλαιο ανιλίνης ή ακετόνη. Τα Gram θετικά εμφανίζουν αντοχή στον αποχρωματισμό διατηρώντας το ιώδες χρώμα. Αντίθετα στα Gram αρνητικά αρχικά παρατηρείται αποχρωματισμός, ενώ στη συνέχεια με εφαρμογή

διαφορετικής χρωστικής χρωματίζονται κόκκινα. Η χρωστικές που χρησιμοποιούνται συνήθως είναι: ουδέτερο ερυθρό ή αραιό διάλυμα φουξίνης και σαφρανίνη [5].



Εικόνα 1.6: Απλοποιημένη απεικόνιση κυτταρικού τοιχώματος θετικών και αρνητικών κατά Gram βακτηρίων. Τροποποιημένη [11].

Κάθε μόριο NAM της πεπτιδογλυκάνης συνδέεται με ένα πεπτίδιο το οποίο διαφέρει ανάλογα με το είδος του βακτηρίου. Στα Gram θετικά το μικρό αυτό πεπτίδιο συνήθως αποτελείται από I-αλανίνη, d-γλουταμινικό οξύ, L-λυσίνη και D-αλανυλο-D-αλανίνη ενώ στα Gram αρνητικά η L-λυσίνη αντικαθίσταται με μέσο-διαμινοπιμελικό οξύ [5]. Οι αλυσίδες NAM-NAG στο στρώμα της πεπτιδογλυκάνης συνδέονται μεταξύ τους με το σχηματισμό δεσμών είτε μέσω της λυσίνης είτε του μέσο-διαμινοπιμελικού οξέος της μίας αλυσίδας με την προτελευταία D-αλανίνη της επόμενης [5]. Πολλές φορές στα Gram θετικά βακτήρια, για τον σχηματισμό των δεσμών μεταξύ των δύο αλυσίδων, παρεμβάλλεται μία πενταπεπτιδική αλυσίδα. Σε κάθε περίπτωση χάνεται η τελευταία D-αλανίνη [5]. Ο σχηματισμός αυτών των

δεσμών καθιστά το κυτταρικό τοίχωμα πιο ανθεκτικό. Πολλά αντιβιοτικά έχουν ως στόχο δράσης τη σύνθεση του στρώματος της πεπτιδογλυκάνης [2].

Στο βακτηριακό τοίχωμα περιέχονται ορισμένα επιπλέον συστατικά των οποίων η φύση και η ποσότητα εξαρτώνται από το είδος του μικροβίου. Για παράδειγμα στα Gram θετικά βακτήρια περιέχονται σημαντικές ποσότητες τειχικού οξέος, μέρος του οποίου συνδέεται με λιπίδια της μεμβράνης σχηματίζοντας το λιποτειχικό οξύ [5].

Μετά από παρατήρηση στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, διαπιστώθηκε πως τα Gram αρνητικά βακτήρια έχουν μία επιπλέον μεμβράνη εξωτερικά της πεπτιδογλυκάνης. Η μεμβράνη σχηματίζεται από δύο στιβάδες εκ των οποίων η εξωτερική αποτελείται από το λιποπολυσακχαρίτη (LPS) [10]. Όπως και στην κυτταροπλασματική μεμβράνη, στην εξωτερική μεμβράνη περιέχεται πλήθος πρωτεϊνών, όπως οι πορίνες για τον έλεγχο της διαπερατότητας και οι προσκολλητίνες για τον έλεγχο της προσκόλλησης. Επιπλέον η εξωτερική μεμβράνη λειτουργεί προστατευτικά για την πεπτιδογλυκάνη καθώς δεν επιτρέπει το ένζυμο της λυσοζύμης να δράσει σπάζοντας το δεσμό NAM-NAG και δυσκολεύει ορισμένα αντιβιοτικά να εισέλθουν στο κύτταρο [5].

1.3.4 Έλυτρο

Σε πολλά βακτήρια παρατηρείται ένα σχετικά συνεχές αλλά άμορφο στρώμα εξωτερικά του κυτταρικού τοιχώματος που φαίνεται να παίζει ρόλο στην επαφή του μικροβίου με πιθανά εχθρικά περιβάλλοντα. Στην περίπτωση που είναι ενυδατωμένο και μπορεί να διακριθεί με οπτικό μικροσκόπιο καλείται έλυτρο ή κάψα. Αποτελείται κυρίως από νερό και περίπου 2% στερεό υλικό, κάποιο πολυσακχαρίτη ή κυρίως κάποιο πεπτίδιο. Το έλυτρο δρα προστατευτικά για τα βακτήρια ενάντια στη φαγοκυττάρωση, τη λυτική δράση του συμπληρώματος καθώς και

την εισβολή βακτηρίων. Τα βακτήρια που δεν έχουν έλυτρο δεν είναι παθογόνα διότι δεν έχουν την ικανότητα αντιμετώπισης επιθέσεων των λευκών αιμοσφαιρίων του ανθρώπου [2].

1.3.5 Στρώματα S

Ορισμένα βακτήρια διαθέτουν ένα πρωτεϊνικό στρώμα, το οποίο φαίνεται να έχει ορισμένες κοινές λειτουργίες με το έλυτρο και η παρατήρησή του είναι εφικτή με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο [2].

1.3.6 Μαστίγια

Τα μαστίγια είναι επιμήκεις, λεπτές ίνες σπειροειδώς συνεστραμμένες με κυματοειδή μορφή αποτελούμενα από την πρωτεΐνη φλαγγελίνη και αποτελούν όργανα κίνησης των βακτηρίων [10]. Το μήκος τους είναι αρκετά μεγαλύτερο από το μήκος των βακτηρίων και το πάχος τους είναι περίπου 0.2 μm [5]. Ο τρόπος κατανομής του στο βακτηριακό κύτταρο είναι χαρακτηριστικός για κάθε είδος. Η έκφυση τους μπορεί να γίνεται είτε από τους πόλους του κυττάρου (πολικά μαστίγια) είτε από τις πλευρές (πλευρικά). Αν τα πλευρικά μαστίγια είναι περισσότερα από ένα, τότε ονομάζονται περίτριχα [2]. Το τμήμα του μαστιγίου που βρίσκεται σε επαφή με την κυτταρική μεμβράνη, περιέχει κάποιες υπομονάδες για την στήριξη και την παροχή ενέργειας στο όργανο ενώ το εξωκυττάριο τμήμα είναι πολυμερές μίας πρωτεΐνης της φλαγγελίνης [10].

1.3.7 Βλεφαρίδες

Εκτείνονται πλευρικά του κυττάρου και ο αριθμός τους μπορεί να κυμαίνεται από 100 έως 500. Είναι κατά κύριο λόγο ευθείες, με το πάχος τους να είναι σχεδόν το μισό (4-8 nm) από τα μαστίγια και το μήκος τους αρκετά μικρότερο (0.1-0.5 μm). Η παρατήρησή τους είναι δυνατή μόνο με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο [5].

1.3.8 Σμήριγγες

Οι σμήριγγες είναι κυλινδρικές τριχοειδείς εκφύσεις αποτελούμενες από πρωτεΐνες, υδατάνθρακες και φωσφορικά άλατα και συναντώνται στην επιφάνεια ορισμένων αρνητικών κατά Gram βακτηρίων. Παίζουν ρόλο στην σύζευξη των βακτηρίων και στην προσκόλλησή τους σε διάφορες επιφάνειες [7].

1.3.9. Χρωματόσωμα-Πλασμίδια

Το γενετικό υλικό των προκαρυωτικών κυττάρων (χρωματόσωμα) δεν είναι οριοθετημένο όπως των ευκαρυωτικών και είναι κυκλικό. Σε αυτό περιέχεται σχεδόν όλο το DNA με ένα ποσοστό της τάξης του 1-5% να περιέχεται σε κυκλικά μόρια DNA τα πλασμίδια. Το DNA των βακτηρίων είναι μακρομόριο του οποίου το μήκος μπορεί να φτάσει μέχρι το 1mm, ωστόσο λόγω της υπερσυσπείρωσής του καταλαμβάνει πολύ μικρό χώρο. Ο αριθμός των βάσεων του χρωματοσώματος διαφέρει από βακτήριο σε βακτήριο, ενδεικτικά στο E. Coli υπάρχουν 4.7×10^6 ζεύγη βάσεων [7].

Τα πλασμίδια είναι μικρά κυκλικά μακρομόρια DNA που διαθέτουν τη δυνατότητα της αυτό-αντιγραφής και περιέχουν κωδικοποιημένες πληροφορίες σημαντικές για την επιβίωση ενός βακτηριακού κυττάρου [7]. Η ταξινόμησή τους γίνεται βάση των πληροφοριών που κωδικοποιούν. Για παράδειγμα υπάρχουν πλασμίδια που σχετίζονται με την ικανότητα σύζευξης των βακτηρίων (Πλασμίδια F) και της ανθεκτικότητάς τους στα αντιβιοτικά (Πλασμίδια R) [5].

1.3.10 Ριβοσώματα

Τα ριβοσώματα είναι μικρά διακριτά σωματίδια στα οποία γίνεται η πρωτεϊνοσύνθεση και εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα. Περιέχουν 60-80% rRNA και 15-40% πρωτεΐνη και ο αριθμός τους σε ένα προκαρυωτικό κύτταρο κυμαίνεται από 5,000 έως 50,000 αναλόγως τον

ρυθμό αύξησης του κυττάρου. Επιπλέον στα προκαρυωτικά κύτταρα το μέγεθός τους είναι 70S (Μονάδες Svedberg) [5]. Αποτελούνται από δύο υπομονάδες την 30S και την 50S στις οποίες αριθμός των πρωτεϊνών και των rRNA διαφέρουν [7]. Την 50S υπομονάδα αποτελούν δύο rRNA, 23S και 5S με 2900 και 120 νουκλεοτίδια αντίστοιχα ενώ την 30S ένα μόριο rRNA 16S περίπου 1540 νουκλεοτιδίων. [7]. Πρόσθετα η 50S διαθέτει 34 πρωτεΐνες ενώ η 30S 21 [7].

1.4 Βακτηριακή ανάπτυξη, φυσιολογία και θάνατος

Τα βακτήρια διακρίνονται για την ικανότητα τους για ταχύτατη αναπαραγωγή, η οποία ευθύνεται για την ταχύτητα με την οποία εξαπλώνονται κάποιες λοιμώξεις αλλά και για την ευκολία αλλαγής του φαινότυπου των βακτηρίων. Για την ανάπτυξη των βακτηρίων είναι απαραίτητη η ύπαρξη κατάλληλου θρεπτικού υλικού και συγκεκριμένων φυσικών και χημικών συνθηκών. Σε αυτές τις συνθήκες αρχίζουν αυξάνονται σε μέγεθος με παράλληλο διπλασιασμό των συστατικών τους και ξεκινά η διαίρεση με αποτέλεσμα δύο κύτταρα το μητρικό και το θυγατρικό [7]. Η βακτηριακή ανάπτυξη σε εργαστηριακό επίπεδο είναι χρήσιμη για την ταυτοποίηση και τη μελέτη του μικροβίου ώστε να καθοριστεί η θεραπεία και τελικά να εκτιμηθεί η αποτελεσματικότητά της.

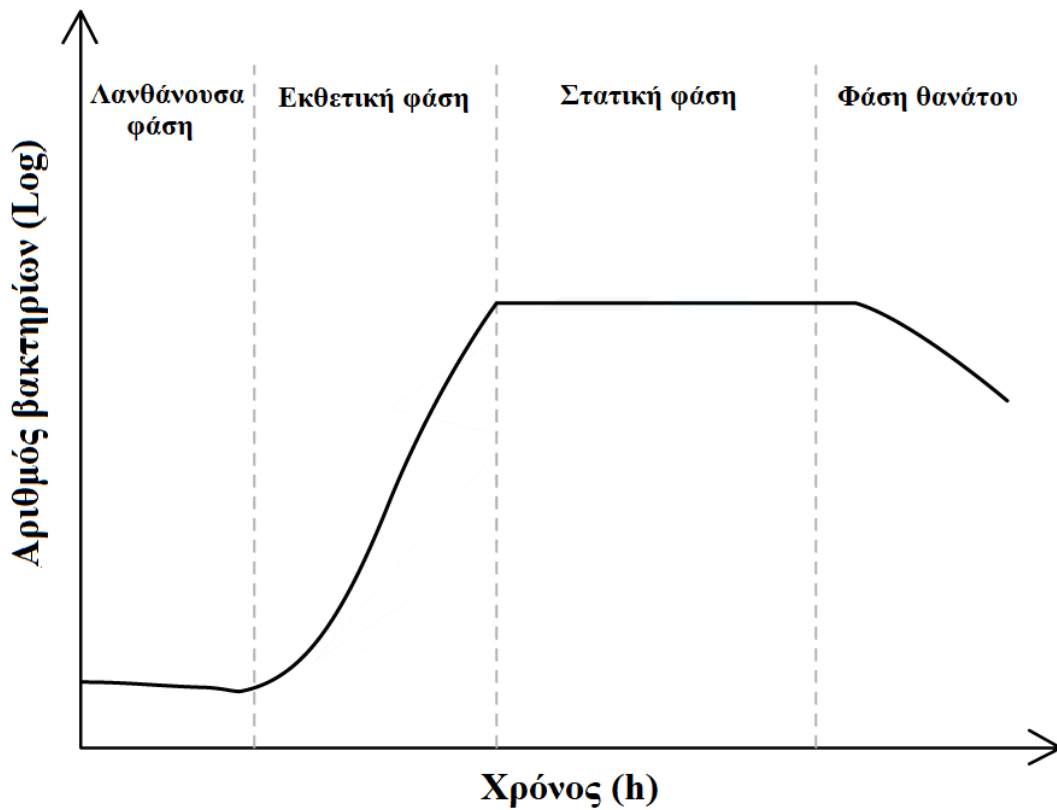
Υπάρχουν τρεις τύποι για την ανάπτυξη των βακτηρίων στο εργαστήριο:

1. Αποικίες: αφορά στερεή καλλιέργεια της οποίας το αποτέλεσμα είναι ορατό με γυμνό μάτι [5].
2. Καλλιέργεια σε υγρό διαυγές θρεπτικό υλικό όπου μετά την βακτηριακή ανάπτυξη μετασχηματίζεται σε θολερό διάλυμα [5].
3. Σχηματισμός βιομεμβράνης (biofilm), δηλαδή ανάπτυξη βακτηρίων σε αδρανή επιφάνεια μετά από καλλιέργεια σε υγρό θρεπτικό υλικό [5].

1.4.1 Φάσεις βακτηριακής ανάπτυξης σε υγρό θρεπτικό υλικό

Η περιγραφή των φάσεων ανάπτυξης παρουσιάζεται σε μία ιδανική καμπύλη στο Σχήμα 1.1. Σε αυτήν παρουσιάζεται ο λογάριθμος του αριθμού των κυττάρων που αυξάνονται γραμμικά συναρτήσει του χρόνου. Μετά τον ενοφθαλισμό των βακτηρίων σε υγρό θρεπτικό υλικό φαίνεται πως αρχικά ο αριθμός των βακτηριακών κυττάρων δεν μεταβάλλεται καθώς τα κύτταρα βρίσκονται σε φάση προσαρμογής. Έπειτα ο αριθμός τους αυξάνεται εκθετικά μέχρι το μέγιστο ρυθμό ανάπτυξης για τις συγκεκριμένες συνθήκες. Η συγκεκριμένη φάση ανάπτυξης ονομάζεται εκθετική. Επειδή τα θρεπτικά συστατικά ή οι παράγοντες είναι περιορισμένα δηλαδή το σύστημα καλλιέργειας είναι κλειστό, η εκθετική φάση δε συνεχίζεται επ'άπειρον. Σε αυτή τη φάση (φάση στασιμότητας) ο αριθμός των κυττάρων αφού φτάσει στο μέγιστο σταθεροποιείται. Τέλος, καθώς τα θρεπτικά υλικά μειώνονται και παράλληλα

αυξάνονται οι τοξικοί μεταβολικοί παράγοντες, ο πληθυσμός της καλλιέργειας οδηγείται σε φάση θανάτου [7].



Σχήμα 1.1: Καμπύλη ανάπτυξης μικροβίων.

Η βακτηριακή ανάπτυξη εξαρτάται από την επάρκεια των θρεπτικών υλικών σε διάφορα χημικά στοιχεία, όπως το οξυγόνο, το άζωτο ο άνθρακας, το θείο, ο φώσφορος, τα ιχνοστοιχεία και τα μέταλλα και τις συνθήκες της καλλιέργειας όπως είναι το pH, η θερμοκρασία [2].

1.4.2 Καταστολή βακτηριακής ανάπτυξης

Απαραίτητη προϋπόθεση για τη μελέτη ενός μικροοργανισμού είναι η απομόνωση από το φυσικό περιβάλλον του και στη συνέχεια η εργαστηριακή καλλιέργεια. Για τη λήψη ποιοτικών και μετρήσιμων αποτελεσμάτων απαιτείται η χρήση αποστειρωμένων θρεπτικών

υλικών, σκευών και χώρων ώστε να είναι απαλλαγμένα από οποιοδήποτε ζωντανό κύτταρο. Η διαδικασία της αποστείρωσης μπορεί να συμβεί με τη χρήση διαφόρων μεθόδων όπως αυτές της θέρμανσης, της ακτινοβολήσης, της διήθησης ή της χρήσης χημικών μέσων.

1.4.2.1 Θέρμανση

Η θέρμανση θεωρείται ο πιο αποτελεσματικός τρόπος αποστείρωσης, εξαιτίας της μεγάλης διεισδυτικότητας και της μη εκλεκτικότητας της. Με την θέρμανση τα βιολογικά μόρια μετουσιώνονται ενώ η κυτταρική δομή καταστρέφονται. Συνήθως προτιμάται αποστείρωση με υπέρθερμο ατμό καθώς είναι ταχύτερη συγκριτικά με την ξηρή θερμότητα. Η πραγματοποίησή της σε μικρή κλίμακα επιτυγχάνεται με αυτόκαυστα (autoclave) στα οποία πρώτα χρειάζεται εκδίωξη του αέρα από τον θάλαμο αποστείρωσης. Η διαδικασία ξεκινάει 10 λεπτά μετά την επίτευξη της επιθυμητής θερμοκρασίας κι συνεχίζεται για 5 λεπτά μετά τη διακοπή παροχής ατμού. Μόλις το αυτόκαυστο ψυχθεί και η εσωτερική πίεση γίνει ίση με την ατμοσφαιρική το άνοιγμά του καθίσταται ασφαλές [5].

1.4.2.2 Ακτινοβολήση

Η ακτινοβολήση με υπεριώδεις ακτίνες UV πραγματοποιείται στην περιοχή $\lambda=250-280$ nm προκαλώντας βλάβες ή μεταλλάξεις στο μικροβιακό DNA. Λόγω της μικρής διεισδυτικότητάς της η χρήση της περιορίζεται στον αέρα και σε επιφάνειες εργασίες. Αντίθετα οι ακτίνες γ και X είναι πιο διεισδυτικές δημιουργώντας υπεροξειδία και ελεύθερες ρίζες στο κύτταρο, με αποτέλεσμα την καταστροφή πρωτεϊνών και νουκλεϊκών οξέων. Η χρήση τους αφορά προσυσκευασμένα υλικά όπως τρυβλία και σήριγγες [7].

1.4.2.3 Χημική αποστείρωση

Η μέθοδος αυτή εφαρμόζεται σε θερμο-ευαίσθητα υλικά με τη χρήση αλκυλιωτικών και οξειδωτικών παραγόντων των κυτταρικών πρωτεϊνών. Τέτοιοι παράγοντες είναι χημικές

ουσίες όπως το υπεροξείδιο του υδρογόνου, τα οξείδια του αιθυλενίου και προπυλενίου και η φορμαλδεΐδη [7].

- Υπεροξείδιο υδρογόνου: είναι ισχυρό οξειδωτικό με αποτέλεσμα την καταστροφή σπορίων και βλαστικών κυττάρων. Η δράση του αυξάνεται με την αύξηση της θερμοκρασίας και σε αλκαλικό περιβάλλον. Χρησιμοποιείται κυρίως στη βιομηχανία τροφίμων σε συγκεντρώσεις της τάξης 10-25%.
- Οξείδια αιθυλενίου, προπυλενίου: λόγω της αυξημένης τοξικότητας και της μεγάλης εκρηκτικότητας τους η χρήση τους απαιτεί ειδικές εγκαταστάσεις. Η βέλτιστη δράση τους παρατηρείται σε συγκέντρωση 800-1000 mg l⁻¹ στους 60 °C για 3-4 ώρες και σχετική υγρασία 40-80%.
- Φορμαλδεΐδη: η χρήση της είναι περιορισμένη λόγω του χαμηλού ρυθμού διάχυσης και της μικρής διεισδυτικότητας.

1.4.2.4 Διήθηση

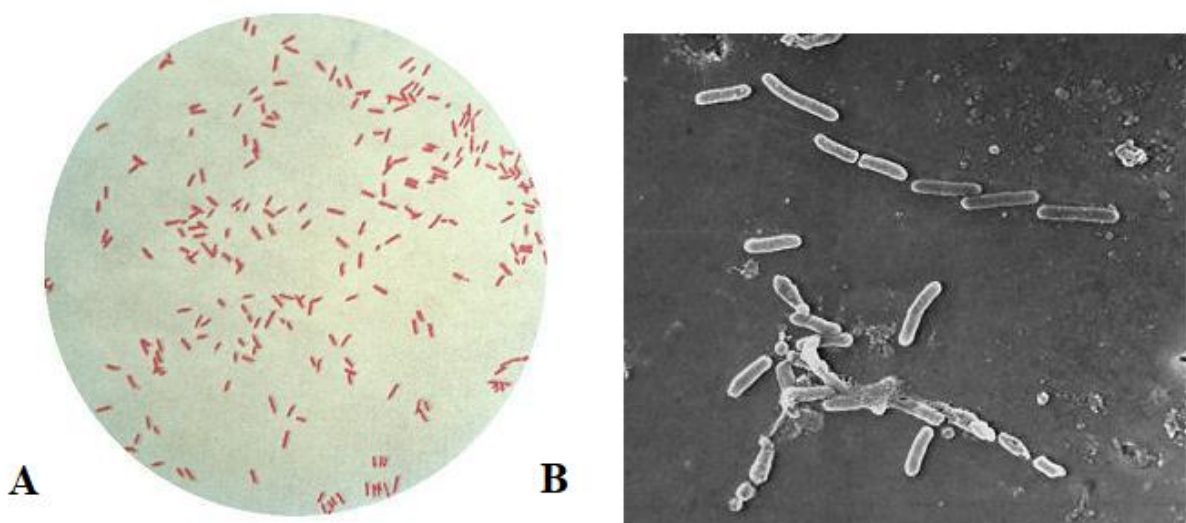
Η χρήση της αφορά την αποστείρωση υγρών θεραπευτικών υλικών σε περιπτώσεις για παράδειγμα που είναι θερμοευαίσθητα. Οι ηθμοί που χρησιμοποιούνται διακρίνονται σε δύο κατηγορίες: τους ηθμούς βάθους και τους ηθμούς επιφάνειας [7].

- Ηθμοί βάθους: τα υλικά κατασκευής τους μπορεί να είναι το βαμβάκι, ο υαλοβάμβακας, οι ίνες κυτταρίνης κ.α. Η αποτελεσματικότητα του αυξάνεται με το βάθος του αλλά παράλληλα απαιτεί μεγάλες πιέσεις λειτουργίας.
- Ηθμοί επιφάνειας: αποτελούνται από μεμβράνες πολυμερών όπως οι εστέρων κυτταρίνης και είναι αποτελεσματικοί στην κατακράτηση μόνο μικροβιακών κυττάρων.

1.5 Βακτήρια

1.5.1 *Pseudomonas aeruginosa*

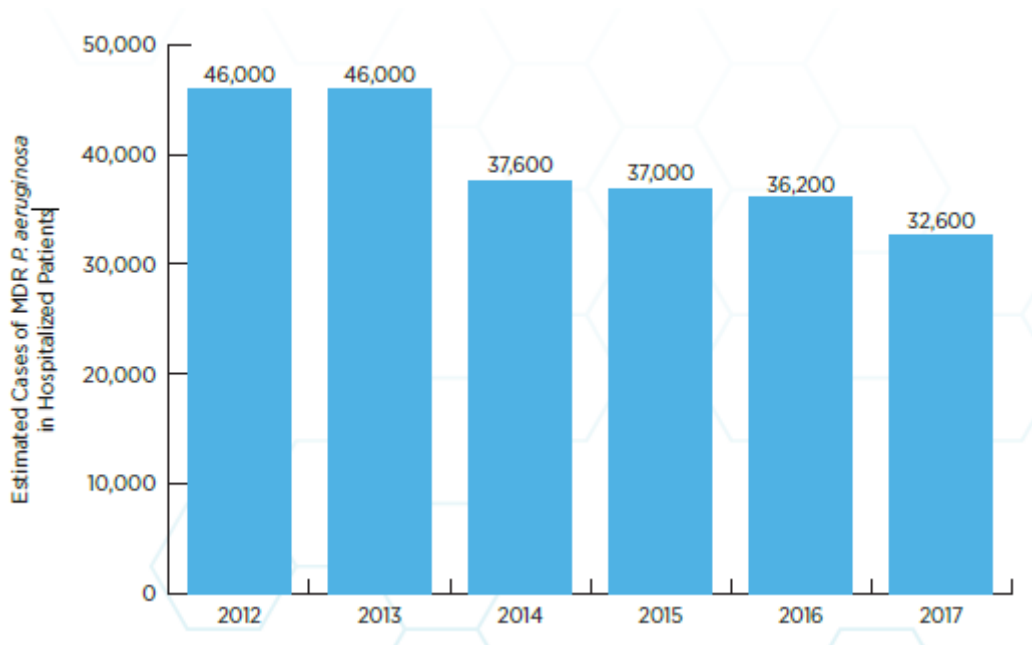
Στο γένος *Pseudomonas* ανήκει μία ομάδα βακτηρίων με περισσότερα από εκατό είδη. Τα βακτήρια αυτά είναι ευθύγραμμα ή κεκαμμένα ραβδόμορφα, αερόβια, μη ζυμωτικά, Gram αρνητικά βακτήρια και συναντώνται κυρίως στο έδαφος και σε υγρά περιβάλλοντα [12]. Ένα ευκαιριακώς παθογόνο μικρόβιο, που συσχετίζεται αρκετά συχνά με λοιμώξεις στο αναπνευστικό και ουροποιητικό σύστημα του ανθρώπου, είναι η *P. aeruginosa* που ανήκει στις φθορίζουσες ψευδομονάδες και αναπτύσσεται μέχρι τους 43 °C [5]. Δεν διαθέτει σπόρια, έλυτρο και η κίνησή της επιτυγχάνεται με ένα ή δύο πολικά μαστίγια. Παρόλο που είναι αερόβιο μικρόβιο, η ανάπτυξή του είναι δυνατή σε αναερόβιες συνθήκες, εάν στο περιβάλλον του υπάρχουν νιτρικά που λειτουργούν ως τελικός αποδέκτης ηλεκτρονίων [2]. Η διαδικασία αυτή συμβάλει στην απονίτρωση του εδάφους καθιστώντας την μεγάλης σημασίας. Η *P. aeruginosa* παράγει μία γαλαζοπράσινη χρωστική που ανήκει στις φαιναζίνες την πυοκιανίνη καθώς και άλλες χρωστικές όπως η πυοβερτίνη που είναι μία κιτρινοπράσινη φθορίζουσα χρωστική που δρα ως σιδηροφόρο. Οι χρωστικές της είναι ορατές με ακτίνες UV ($\lambda=254\text{ nm}$)



Εικόνα 1.7: Κύτταρα *P. aeruginosa* (A) σε κοινό μικροσκόπιο (B) σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο.

[5]. Οι αποικίες της είναι βλεννώδης, με ανώμαλη επιφάνεια και το μέγεθός τους ποικίλει. Η ενέργεια της πηγάει από τους υδατάνθρακες με οξειδωτικό μεταβολισμό όχι ζυμωτικό και χρησιμοποιεί μόνο τη γλυκόζη [5].

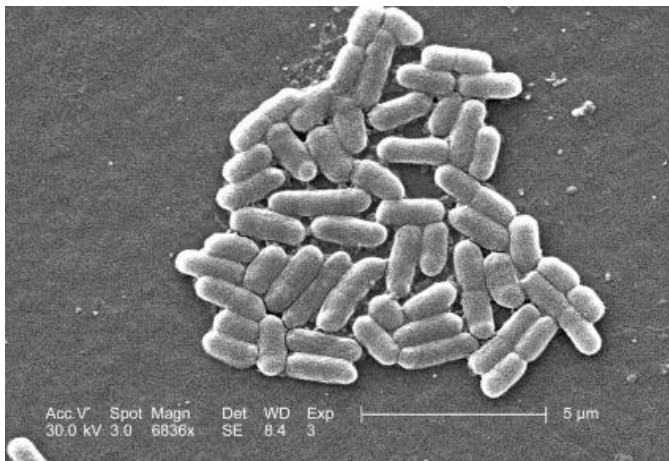
Η *P. aeruginosa* μπορεί να προσβάλει σχεδόν οποιοδήποτε όργανο του σώματος ή εξωτερική θέση. Οι λοιμώξεις της συνήθως χαρακτηρίζονται ήπιες και επιφανειακές, σε αντίθεση με τις νοσοκομειακές λοιμώξεις που είναι ιδιαίτερα σοβαρές. Οι νοσοκομειακές λοιμώξεις αφορούν συνήθως ουρολοιμώξεις από μολύνσεις από καθετήρα, λοιμώξεις του αναπνευστικού από τραχειοστομίες [12]. Μπορεί επίσης να μολύνει ασθενείς που ακολουθούν μακροχρόνια θεραπεία με ανοσοκατασταλικά φάρμακα, κορτικοστεροειδή και αντιβιοτικά. Μεγάλο κίνδυνο διατρέχουν ασθενείς με κυστική ίνωση, σοβαρά εγκαύματα και τραυματισμούς στο θώρακα. Επιπλέον οι λοιμώξεις του κερατοειδούς, από μολυσμένους φακούς επαφής, βιομηχανικούς τραυματισμούς ή χρήση μολυσμένων φαρμάκων είναι ιδιαίτερα επώδυνες και μπορούν να προκαλέσουν ταχύτατη καταστροφή των ιστών [2].



Εικόνα 1.8: Εκτιμώμενες νοσοκομειακές λοιμώξεις από το βακτήριο *P. aeruginosa* [12].

Από τη φύση του το συγκεκριμένο βακτήριο παρουσιάζει ανθεκτικότητα σε πολλά ευρέως χρησιμοποιούμενα αντιβιοτικά. Για αυτή τους την ιδιότητα, υπεύθυνο είναι το πλασμίδιο R, που συναντάται και ως πλασμίδιο μεταφοράς ανθεκτικότητας [5]. Αυτό το πλασμίδιο διαθέτει γονίδια τα οποία κωδικοεύουν την αδρανοποίηση της τοξικότητας διαφόρων αντιβιοτικών.

1.5.2 Escherichia coli



Εικόνα 1.9: Στελέχη *E.coli* στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο.

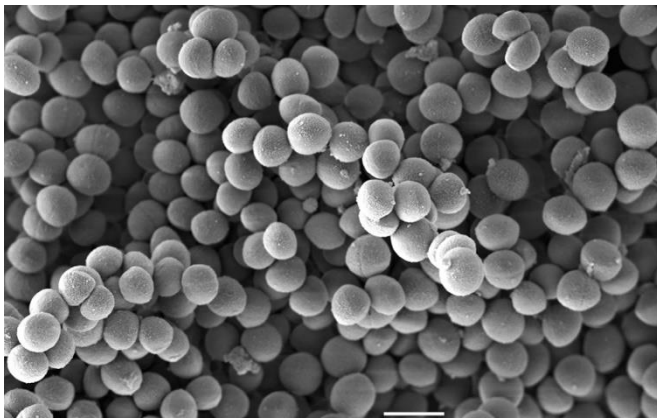
Τα βακτήρια του γένους *Escherichia coli* επικρατούν στην χλωρίδα του εντέρου του ανθρώπου και των ζώων και συνήθως συναντώνται σε επιμολύνσεις με κοπρανώδες υλικό [2]. Είναι προαιρετικά αερόβια, Gram αρνητικά, κινητά βακτήρια. Συνήθως διαθέτουν μαστίγια, ινίδια και ορισμένα

από αυτά έλυτρο. Τα περισσότερα διαθέτουν ευρύ φάσμα θερμοκρασιών ανάπτυξης (15-43 °C) ενώ άλλα χαρακτηρίζονται ως θερμοανθεκτικά και αναπτύσσονται στους 55-60 °C [5]. Συμμετέχουν σε πολλές βιοχημικές διεργασίες όπως η σύνθεση βιταμινών, όπως η βιταμίνη K και η παραγωγή ινδόλης. Διαθέτουν πλήθος αντιγόνων όπως τα λιποπολυσακχαριδικά (LPS) ή σωματικά αντιγόνα (O), αντιγόνα μαστιγίων ή βλεφαριδικά (H), αντιγόνα ελύτρου ή καψιδικά (K) και αντιγόνα ινιδίων [2].

Απουσία ειδικών αντισωμάτων, οι πολυσακχαρίτες που διαθέτουν τα αντιγόνα O και K λειτουργούν προστατευτικά έναντι της βακτηριοκτόνου δράσης του συμπληρώματος και της φαγοκυττάρωσης. Σε περίπτωση παρουσίας αντισωμάτων για τα K και O παρατηρείται οψωνινοποίηση των βακτηρίων. Στους παθογενετικούς μηχανισμούς ορισμένων στελεχών *E.*

coli ανήκει και η παραγωγή αιμολυσίνης που έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση σιδήρου από την αιμοσφαιρίνη [2]. Πολλά στελέχη E. coli έχουν τη δυνατότητα έκφρασης σιδηροφόρων όπως η εντερομπακτήνη και η αερομπακτήνη με την τελευταία να συνδέεται με σηψαιμικά περιστατικά [5]. Επιπλέον είναι υπεύθυνα για ουρολοιμώξεις και γαστρεντερικές νόσους. Η E. coli είναι ευαίσθητη σε πολλά αντιβιοτικά όπως οι τετρακυκλίνες, σουλφοναμίδες κ.α. Ωστόσο κάποια στελέχη έχουν αποκτήσει πλασμίδια που τους προσδίδουν αντοχή σε πολλά αντιβιοτικά και επομένως χρειάζεται στοχευμένη θεραπεία [5].

1.5.3 Staphylococcus



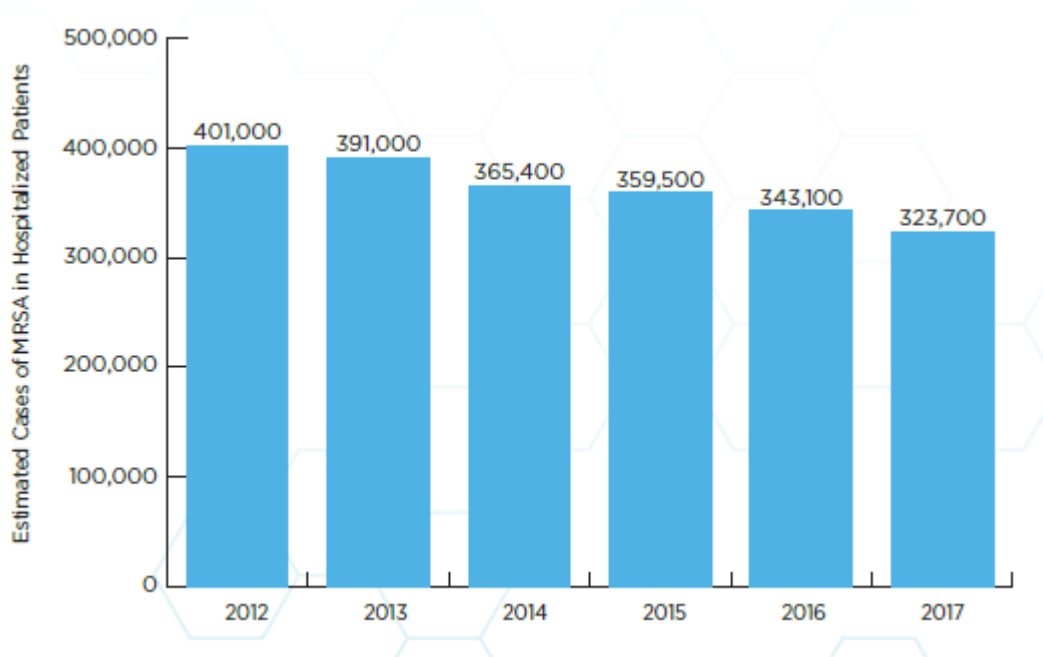
Εικόνα 1.10: S. aureus σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο.

Οι σταφυλόκοκκοι είναι παρασιτικοί, Gram θετικοί μικροοργανισμοί, τόσο του ανθρώπου όσο και άλλων θηλαστικών, προκαλώντας περιστασιακά σοβαρές μολύνσεις. Παρουσιάζουν αντοχή σε ξηρασία και υψηλές συγκεντρώσεις

NaCl και μεγάλο εύρος θερμοκρασιών

ανάπτυξης (7-47.8 °C) [5]. Δύο είναι τα κύρια είδη που συναντώνται στον άνθρωπο: ο *Staphylococcus aureus* και ο *Staphylococcus epidermidis*. Ο πρώτος παράγει μία κίτρινη-χρυσή χρωστική και συσχετίζεται με παθολογικές καταστάσεις όπως η πνευμονία, η μηνιγγίτιδα, οι φλύκταινες, η σηψαιμία κ.α [13]. Ο *S. epidermidis* από την άλλη δεν παράγει κάποια χρωστική, συνήθως εντοπίζεται στο δέρμα ή σε βλεννώδεις μεμβράνες και χαρακτηρίζεται ως μη παθογόνος [2].

Ο *S. aureus* είναι ένα ακίνητο βακτήριο που δεν διαθέτει σπόρια και έλυτρο και το μέγεθός του είναι περίπου 1 μm [5]. Χαρακτηρίζεται ως προαιρετικώς αναερόβιο μικρόβιο, αφού δεν χρειάζεται απαραίτητα οξυγόνο για την ανάπτυξή του. Όμως σε αναερόβιες συνθήκες ο ρυθμός ανάπτυξής του ελαττώνεται [5]. Οι αποικίες του έχουν ομαλή γυαλιστερή επιφάνεια, διάμετρο περίπου 2-3 mm και συχνά εμφανίζουν χρυσό-κίτρινο χρώμα, για αυτό το λόγο καλείται και σταφυλόκοκκος χρυσίζων [5].



Εικόνα 1.11: Εκτιμώμενες νοσοκομειακές μολύνσεις από τον *S. aureus* (MRSA) [13].

Διαθέτει πολυάριθμες τοξίνες και ένζυμα που είναι υπεύθυνα για τη λοιμογονικότητά του και το προστατεύουν από τους διάφορους αμυντικούς μηχανισμούς του σώματος. Σε αντίθεση με τα υπόλοιπα είδη του γένους του, παράγει ένα εξωκυττάριο ένζυμο το οποίο συνδέεται με το ινωδογόνο και προκαλεί πήξη του πλάσματος. Το ένζυμο αυτό είναι γνωστό ως κοαγκουλάση [5]. Παράγει επίσης θερμοσταθερές νουκλεάσες που διασπούν το DNA, διάφορες εντεροτοξίνες που συναντώνται σε τροφικές δηλητηριάσεις και είναι υπεύθυνες για συμπτώματα όπως ο εμετός, η διάρροια και η ναυτία. Οι εντεροτοξίνες μαζί με την τοξίνη

τοξικού σοκ (TSST-1) χαρακτηρίζονται ως υπεραντιγόνα καθώς ενεργοποιούν τα T-λεμφοκύτταρα και αυτά με τη σειρά τους κυταροκίνες, όπως ο παράγοντας νέκρωσης όγκου. Επιπλέον συνδέονται με υψηλή συγγένεια με μονοπύρρηνα κύτταρα. Άλλες τοξίνες όπως η επιδερμολυτική είναι υπεύθυνες για τη δημιουργία φυσαλίδων στο εσωτερικό της επιφάνειας του δέρματος [2].

Ο σταφυλόκοκκος μεταδίδεται κυρίως με την άμεση επαφή ειδικά στα νοσοκομεία, αλλά μπορεί και μέσω του αέρα. Έχει τη δυνατότητα αποικισμού στη ρινική κοιλότητα υγιών ατόμων και από εκεί με τα χέρια, τα ρούχα, τη σκόνη να επιτευχθεί η διασπορά του στο περιβάλλον. Θέλει ιδιαίτερη προσοχή στα νοσοκομεία, διότι η διασπορά του μεταξύ ασθενών είναι πολύ εύκολη, αντίθετα με τις λοιμώξεις που προκαλούνται από αυτό, λόγω ανθεκτικότητας σε πολλά αντιβιοτικά όπως η μεθικιλίνη [13]. Η αδρανοποίηση αυτής της κατηγορίας αντιβιοτικών οφείλεται σε ένα ένζυμο β-λακταμάσης, την πενικινιλλάση που διασπά το β-λακταμικό δακτύλιο [2].

Ο *S. epidermidis* ταξινομείται στους αρνητικούς σταφυλόκοκκους διότι δεν παράγει κοαγουλάση και υπερέχει αριθμητικά έναντι του *S. aureus* στη χλωρίδα του δέρματος. Είναι υπεύθυνοι για λοιμώξεις κατά κύριο λόγο σε πρόωρα νεογνά, ασθενείς με νεοπλάσματα ή ανοσοκατασταλαμένους, γιατί συνήθως αποικίζουν σε ιατρικές συσκευές όπως καθετήρες και προσθετικές βαλβίδες [2].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

2.1 Ιστορική αναδρομή αντιβιοτικών

Ως αντιβιοτικά ορίζονται χημικές ουσίες παραγόμενες από μικροοργανισμούς, που έχουν την ικανότητα αναστολής της ανάπτυξης άλλων μικροοργανισμών ή τη θανάτωσή τους [14]. Διακρίνονται λόγω της φυσικής τους προέλευσης από συνθετικά παράγωγα όπως οι σουλφοναμίδες, ιμιδαζόλες και κινολόνες που ορίζονται ως χημειοθεραπευτικά [15]. Όμως επειδή ορισμένα αντιβιοτικά συντίθενται εξ'ολοκλήρου στο εργαστήριο και πολλά τροποποιούνται εργαστηριακά (ημισυνθετικά) για την αύξηση της αποτελεσματικότητάς τους, η διάκριση δεν είναι σαφής. Σήμερα, ο όρος αντιβιοτικό χρησιμοποιείται για την περιγραφή φαρμάκων έναντι συστηματικών λοιμώξεων [16].

Παρόλο που αντιβιοτικά έναντι ασθενειών σαν τη φυματίωση ή τη βουβωνική πανώλη δεν είχαν ανακαλυφθεί μέχρι τον 20^ο αιώνα, η χρήση τους ήταν γνωστή από την αρχαιότητα. Αρχαίοι πολιτισμοί όπως της Αιγύπτου, της Κίνας της Ρώμης και της Ελλάδας χρησιμοποιούσαν φυτά ή μύκητες, παραδείγματος χάριν το μουχλιασμένο ψωμί για την αντιμετώπιση μολύνσεων [17]. Εντυπωσιακή είναι η εύρεση ιχνών ενός σύγχρονου αντιβιοτικού, της τετρακυκλίνης σε ανθρώπινους σκελετούς στην Αίγυπτο κατά τη ρωμαϊκή κατοχή, με την προέλευσή της να παραμένει άγνωστη [17,18].

Αν και ιστορικά έχει επικρατήσει πως ο A. Fleming ανακάλυψε την πενικιλίνη, το πρώτο αντιβιοτικό το 1928 [17,19] πιθανώς είχαν προηγηθεί άλλοι. Ο Sir J.S. Burdon-Sanderson (1828-1905) το 1870 παρατήρησε πως σε υγρή καλλιέργεια καλυμμένη με μούχλα αναστάλθηκε η ανάπτυξη βακτηρίων. Ένα χρόνο αργότερα ο J. Lister (1827-1912), μετά από πειράματα που πραγματοποίησε με το *Penicillium glaucium*, έδειξε την αντιβακτηριακή του δράση στους ανθρώπινους ιστούς [16,19] και το 1875 στην βασιλική κοινωνία

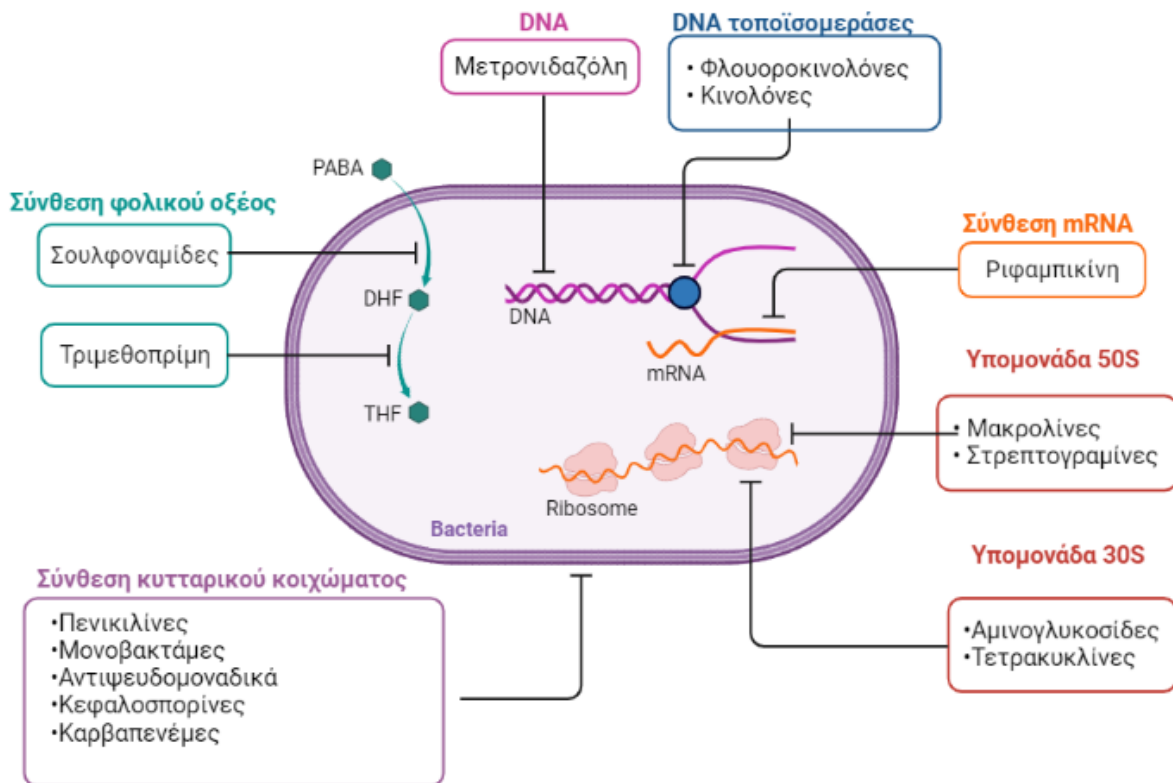
παρουσιάστηκαν από τον Dr. J. Tyndall (1820-1893) τα πειράματά του με το *Penicillium notatum* [17]. Το *Penicillium notatum* χρησιμοποιήθηκε και από τον E. Duchesne (1874-1912) το 1897 για την θεραπεία του τύφου σε ινδικά χοιρίδια [16]. Ωστόσο ο πρώτος άνθρωπος που χρησιμοποίησε τη μούχλα για τις θεραπευτικές της ιδιότητες ήταν ο J. Parkinson (1567–1650) [16,21].

Η ανακάλυψη των αντιβιοτικών έφερε την επανάσταση στην σύγχρονη ιατρική. Έδωσε τη δυνατότητα θεραπείας ασθενειών όπως η φυματίωση, η σύφιλη και ο τύφος. Επιπλέον χειρουργικές επεμβάσεις όπως καισαρικές τομές, επεμβάσεις ρουτίνας γνώρισαν μεγάλη πρόοδο καθώς με τη χρήση αντιβιοτικών, το επιστημονικό προσωπικό κατάφερε να περιορίσει τις μολύνσεις. Τέλος, μειώθηκε η θνησιμότητα.

2.2 Κατηγοριοποίηση αντιβιοτικών

Η κατηγοριοποίηση των αντιβιοτικών μπορεί να γίνει με πολλούς διαφορετικούς τρόπους, αναλόγως κάθε φορά το κριτήριο που χρησιμοποιείται. Έτσι μπορούν να διακριθούν σε βακτηριοκτόνα και βακτηριοστατικά ανάλογα με το αν θανατώνουν τα βακτήρια ή αναστέλλουν την ανάπτυξή τους αντίστοιχα [16]. Ένας άλλος διαχωρισμός αφορά την εκλεκτικότητά τους. Έτσι, αντιβιοτικά που δρουν έναντι πολλών διαφορετικών ειδών βακτηρίων χαρακτηρίζονται ευρέος φάσματος (τετρακυκλίνες, πενικιλίνες) ενώ αντιβιοτικά που δρουν έναντι ενός μόνο είδους βακτηρίων (ισονιαζίδη δρα μόνο έναντι του μυκοβακτηρίου της φυματίωσης), χαρακτηρίζονται στενού φάσματος. Τέλος, σημαντικό κριτήριο για την ταξινόμηση των αντιβιοτικών αποτελεί ο μηχανισμός δράσης τους. Υπάρχουν αντιβιοτικά που αναστέλλουν τη σύνθεση κυτταρικού τοιχώματος των βακτηρίων (β-λακτάμης) [17,23]

αντιβιοτικά που εμποδίζουν τη σύνθεση πρωτεϊνών (τετρακυκλίνες) και αντιβιοτικά που δρουν αναστέλλοντας τη σύνθεση νουκλεϊκών οξέων των βακτηρίων (σουλφοναμίδια, κινολόνες).



Εικόνα 2.1: Διαγραμματική απεικόνιση στρατηγικών αντιμικροβιακής θεραπείας.

2.3 Τετρακυκλίνες

2.3.1 Ιστορικά στοιχεία

Οι τετρακυκλίνες ανακαλύφθηκαν την δεκαετία του 1940 και αποτέλεσαν τα πρώτα αντιβιοτικά ευρέος φάσματος λόγω της μεγάλης δραστηρότητάς τους σχεδόν σε όλα τα θετικά και αρνητικά κατά Gram βακτήρια, αλλά και σε μυκοπλάσματα, χλαμύδια, ρικέτσια και στο πλασμάδιο της ελονοσίας [24, 26, 27, 28]. Συγκεκριμένα το 1948 ο B.M. Duggar ανακάλυψε το πρώτο αντιβιοτικό αυτής της ομάδας την χλωροτετρακυκλίνη, την οποία απομόνωσε από δείγματα του εδάφους [25, 15]. Το βακτήριο από το οποίο απομονώθηκε ονομάστηκε

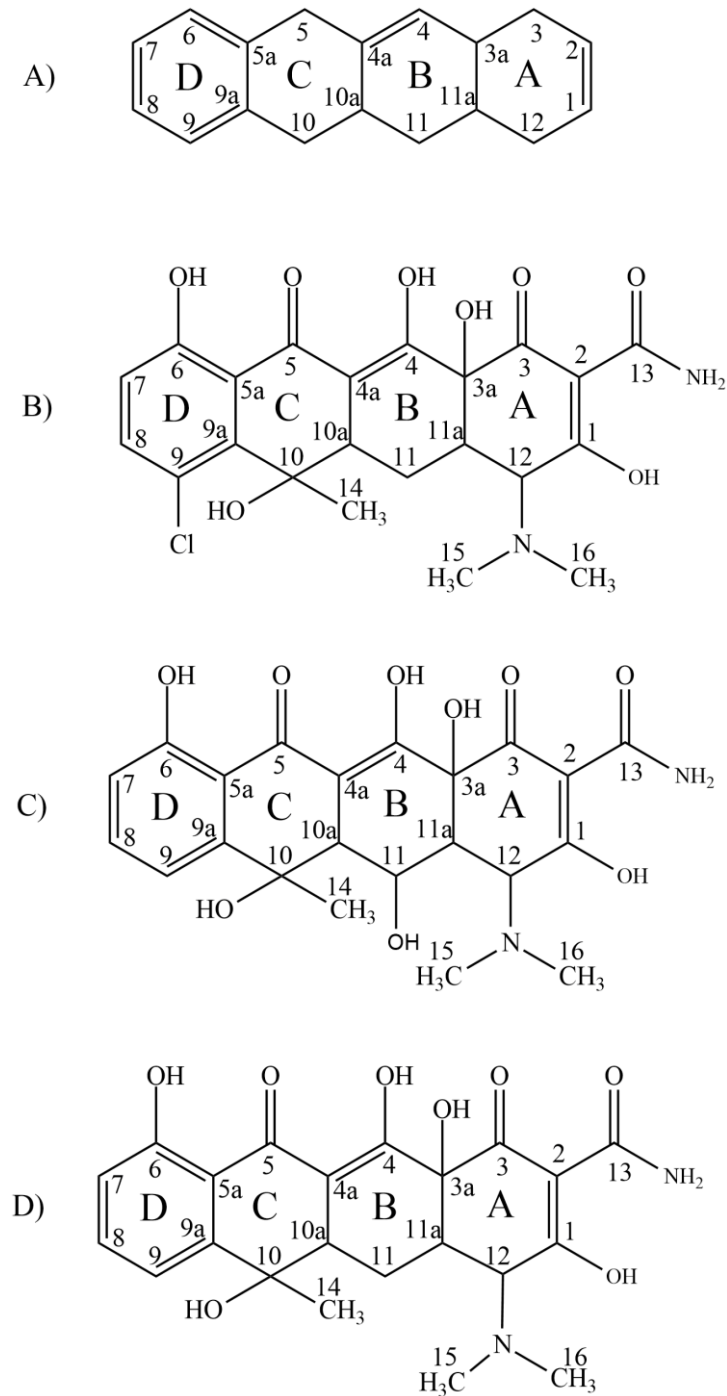
Streptomyces aureofaciens και έτσι το αντιβιοτικό κυκλοφόρησε στην αγορά με την ονομασία Aureomycin [15]. Μερικά χρόνια αργότερα ο A. Finlay και η ομάδα του ανακάλυψαν και απομόνωσαν από δείγματα του εδάφους, ένα άλλο αντιβιοτικό η οξυτετρακυκλίνη από την οικογένεια των στρεπτομυκήτων το *Streptomyces rimosus*, που ονομάστηκε Terramycin [29, 30]. Οι δομές και των δύο αντιβιοτικών λύθηκαν σε συνεργασία με την Pfizer από τις ομάδες των K. Brunings και R. Woodward [30, 31, 32].

Εκείνη την εποχή η πλειοψηφία της επιστημονικής κοινότητας πίστευε πως η τροποποίηση των αντιβιοτικών μείωνε την δραστικότητά τους. Όμως ο L. Conover είχε αντίθετη άποψη και συγκεκριμένα πίστευε πως το χλώριο του C9 στην Aeromycin (Εικόνα 2.2) δεν ήταν υπεύθυνο για την δραστικότητα του επομένως μπορούσε να αφαιρεθεί ή να τροποποιηθεί [32]. Με καταλυτική υδρογόνωση και την χρήση παλλαδίου και υδρογόνου αφαίρεσε το χλώριο και συντέθηκε το πρώτο ημισυνθετικό αντιβιοτικό [32]. Το νέο αυτό φάρμακο παρουσίασε μεγαλύτερη φαρμακευτική δράση, καλύτερο προφίλ διαλυτότητας και μετά από έγκριση του FDA κυκλοφόρησε στην αγορά [32]. Τα αντιβιοτικά αυτά χαρακτηρίστηκαν ως αντιβιοτικά πρώτης γενιάς [33]. Επιπλέον, ημι-συνθετικά αντιβιοτικά της ίδια ομάδας αποτελούν

Πίνακας 2.1: Κατηγοριοποίηση τετρακυκλινών βάση γενιάς.

| Γενιά | Μέθοδος απόκτησης | Κύριοι εκπρόσωποι |
|----------------|------------------------------|---|
| 1 ^η | Βιοσύνθεση | Chlortetracycline, oxytetracycline, tetracycline, demeclocycline |
| 2 ^η | Ήμι-σύνθεση | Doxycycline, minocycline, lymecycline, meclocycline, methacycline, rolitetracycline |
| 3 ^η | Ήμι-σύνθεση Ολική σύνθεση | Tigecycline, omadacycline, sarecycline Eravacycline |

η Doxycycline και η Minocycline και χαρακτηρίζονται ως αντιβιοτικά δεύτερης γενιάς ενώ αντιβιοτικά που είναι πλήρως συνθετικά όπως Tigecycline η κύρια εκπρόσωπος της ομάδας των γλυκυλοκυκλινών, παραγώγων της Minocycline αποτελούν την τρίτη γενιά αντιβιοτικών [33]. Από τις πιο πρόσφατες είναι οι Eranacycline [34] Sarecycline [35] και Omadacycline [36].



Εικόνα 2.2: A) Σύστημα ναφθακενίου B) chlortetracycline (Aeromycin 1948), G) oxytetracycline (Terramycin 1951), D) tetracycline (Tetracyclin 1953).

2.3.2 Εφαρμογές-πιθανές παρενέργειες

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, οι τετρακυκλίνες είναι βακτηριοστατικές και είναι αποτελεσματικές σε Gram θετικά και αρνητικά βακτήρια καθώς και σε άλλους μικροοργανισμούς. Αυτός είναι ο λόγος για τον οποίο σε πολλές χώρες χρησιμοποιούνται ευρύτατα για την πρόληψη και την θεραπεία ασθενειών σε ζώα όπως πουλερικά, χοίρους βοοειδή και πρόβατα.

Οι εφαρμογές τους στην κτηνιατρική αφορούν γαστρεντερικές και δερματικές βακτηριακές λοιμώξεις, λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος και σε περιπτώσεις σήψης [32]. Στον άνθρωπο έχουν χρησιμοποιηθεί κυρίως σε λοιμώξεις του αναπνευστικού ενώ πιστεύεται πως θα ήταν αποτελεσματικές και σε λοιμώξεις από παρασιτικούς οργανισμούς [32]. Πέρα όμως από τις αντιβακτηριακές ιδιότητες αυτής της ομάδας φαρμάκων, οι τετρακυκλίνες διαθέτουν και μη-αντιβακτηριακές ιδιότητες, με τα αποτελέσματά τους να είναι ενθαρρυντικά για μελλοντικές χρήσεις [32, 37, 38]. Μερικές από αυτές είναι η αντικαρκινική, η αντιφλεγμονώδης [32, 37 38] και αντιαγγειογενετική δράση [37, 38] και η θεραπεία δερματικών παθήσεων [32, 37]. Επίσης μπορεί να είναι αποτελεσματικές στην θεραπεία της οστεοπόρωσης, αυτοάνοσων νοσημάτων όπως η ρευματοειδής αρθρίτιδα [37, 38] ή νευροεκφυλιστικών ασθενειών όπως η νόσος Huntington [37]. Χρησιμοποιείται επίσης, για την θεραπεία ή την αναστολή του έλκους του κερατοειδούς [39] και πρόσφατα κατοχυρώθηκε με δίπλωμα ευρεσιτεχνίας ένα οφθαλμικό διάλυμα που περιέχει τετρακυκλίνη κατά της φλεγμονής της επιφάνειας των ματιών [40].

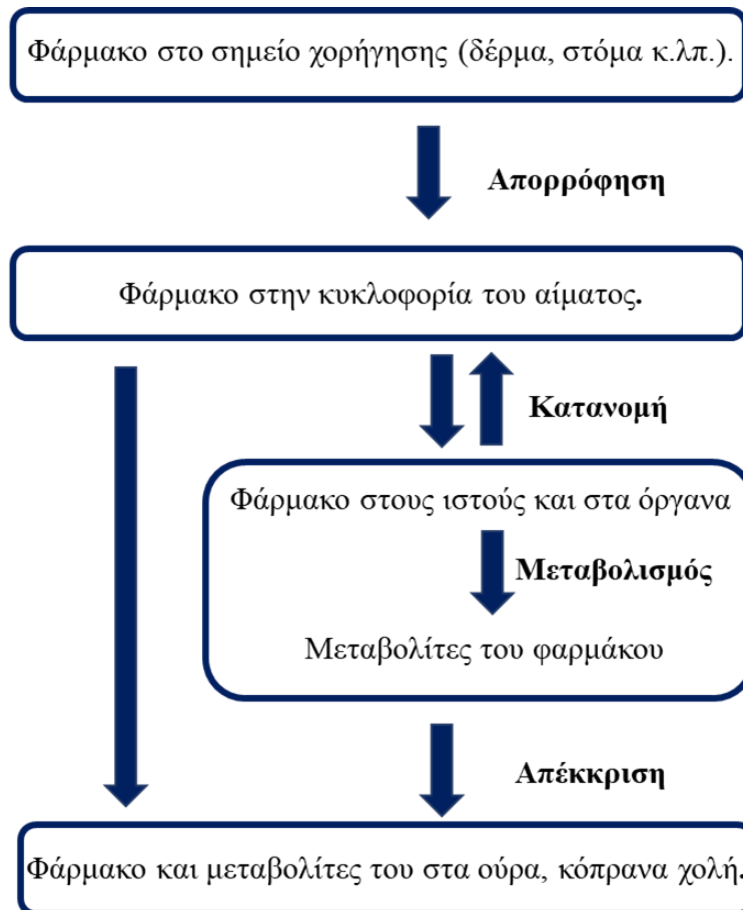
Όπως όλα τα φάρμακα μπορούν να παρουσιάσουν ανεπιθύμητες ενέργειες, με τις πιο συχνές να είναι η ναυτία, ο εμετός και η διάρροια [41]. Ωστόσο μπορεί να παρατηρηθούν αλλεργικές αντιδράσεις (πχ αναφυλαξία, εξανθήματα), φωτοευαισθησία [42] ίλιγγος, ζάλη

[41], οξεία παγκρεατίτιδα [44], αιμολυτική αναιμία, αιμόλυση σε έλλειψη G6PD [45]. Δεν συνίσταται η χορήγησή τους σε παιδιά κάτω των 8 ετών διότι μπορούν να προκαλέσουν οδοντικές βλάβες όπως δυσχρωματισμός των αναπτυσσόμενων δοντιών [46].

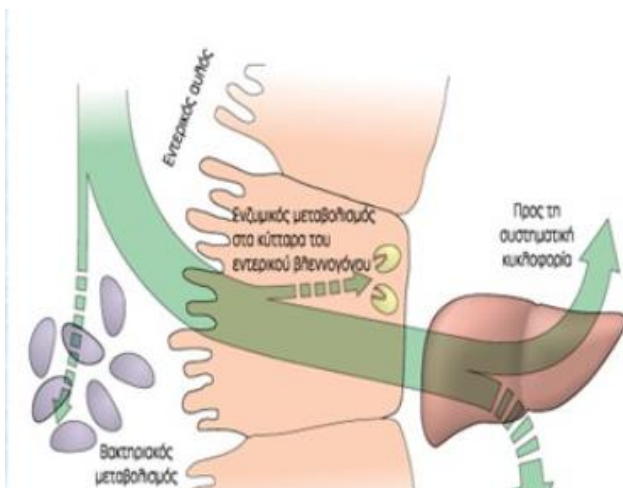
2.3.3. Διαλυτότητα-Χορήγηση

Η χορήγηση ενός φαρμάκου μπορεί να γίνει με διάφορους τρόπους: από το στόμα, παρεντερικά, ενδοφλέβια, εισπνεόμενα [47]. Κάθε τρόπος έχει τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματά του. Αναλόγως τον τρόπο χορήγησης επηρεάζονται παράγοντες όπως η βιοδιαθεσιμότητα του αντιβιοτικού, η μεταφορά της στον βιολογικό στόχο, η αποβολή της κ.α [47]. Για παράδειγμα, ενδοφλέβια επιτυγχάνεται η μέγιστη βιοδιαθεσιμότητα. Ως βιοδιαθεσιμότητα ορίζεται η ποσότητα του φαρμάκου που εισέρχεται στο αίμα, προς την χορηγούμενη ποσότητα [47].

Κατά την χορήγηση ενός φαρμάκου παρατηρούνται τρεις βασικές φάσεις. Στην πρώτη (φαρμακευτική φάση) απελευθερώνεται η δραστική ουσία ενός σκευάσματος. Παραδείγματος χάριν μία κάψουλα αποσυντίθεται στον γαστρεντερικό σωλήνα, απελευθερώνεται η δραστική ουσία και διαλύεται. Κατά την δεύτερη φάση (φαρμακοκινητική φάση), το φάρμακο απορροφάται στην κυκλοφορία του αίματος, κατανέμεται στους ιστούς μεταβολίζεται και απεκκρίνεται (Σχήμα 2.1). Στην τρίτη και τελευταία φάση (φαρμακοδυναμική), το φάρμακο αλληλοεπιδρά με τον βιολογικό στόχο [47].



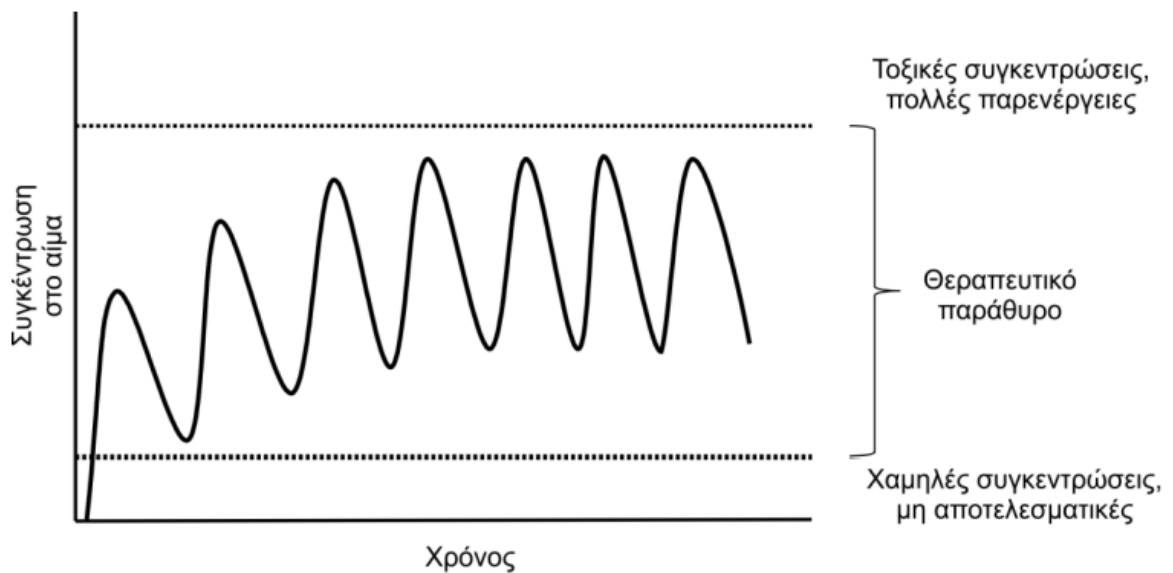
Σχήμα 2.1: Διαγραμματική απεικόνιση φαρμακοκινητικής των φαρμάκων



Εικόνα 2.2 : Φαινόμενο 1^{ης} διόδου. Μετά την απορρόφηση μέσω του εντερικού τοιχώματος, η πηλαία κυκλοφορία αποδίδει το φάρμακο στο ήπαρ πριν την είσοδο στη συστηματική κυκλοφορία.

Κατά την χορήγηση ενός φαρμάκου από το στόμα, παρατηρείται το φαινόμενο της πρώτης διόδου. Το φάρμακο ταξιδεύει από το στόμα στον οισοφάγο, το στομάχι, το λεπτό έντερο και το ήπαρ. Στην πορεία αυτή μία ποσότητα του φαρμάκου εξουδετερώνεται από ένζυμα του στομάχου και του εντέρου, βακτηρίδια και ηπατικά κύτταρα [48, 49]. Προκύπτει λοιπόν η ανάγκη χορήγησης

μεγαλύτερης δόσης από το συγκεκριμένο φάρμακο που όμως δεν μπορεί να ξεπεράσει τα όρια των τοξικών συγκεντρώσεων [47]. Η καμπύλη της δραστικής συγκέντρωσης ενός φαρμάκου παρουσιάζεται στο Σχήμα 2.2. Επομένως, χρειάζεται η εύρεση νέων μεταφορέων-φαρμάκων.



Εικόνα 2.3: Καμπύλη δραστικής συγκέντρωσης ενός φαρμάκου συναρτήσει του χρόνου. Τα ελάχιστα σημεία της καμπύλης αντιστοιχούν στην στιγμή χορήγησης του φαρμάκου. Με την αύξηση της συγκέντρωσης πραγματοποιείται απορρόφηση του από το γαστρεντερικό σύστημα. Κατά τη μείωση του ρυθμού απορρόφησης ξεκινάει ο μεταβολισμός και η απέκκριση του φαρμάκου και οι συγκεντρώσεις φτάνουν στο ελάχιστο, μέχρι τη χορήγηση της επόμενης δόσης. Ιδανικά η καμπύλη θα πρέπει να είναι εντός των ορίων τοξικών και χαμηλών συγκεντρώσεων [50].

Ανάλογα με την φαρμακοκινητική αυτών των φαρμάκων μπορούν τα ταξινομηθούν σε τρεις ομάδες. Στην 1^η ομάδα ανήκουν οι τετρακυκλίνη, γλωροτετρακυκλίνη, οξυτετρακυκλίνη, λυμεκυκλίνη μεθακυκλίνη και η ρολιτετρακυκλίνη. Εκτός από την ρολιτετρακυκλίνη που χορηγείται ενδοφλέβια οι υπόλοιποι παράγοντες χορηγούνται από το στόμα και η απορρόφησή τους είναι της τάξης του 25-60% [51,52,57]. Μετά από την από του στόματος χορήγηση, η συγκέντρωση στον ορό αυξάνεται περιοδικά με την απορρόφηση να γίνεται στο στομάχι, το λεπτό έντερο και τον δωδεκάδακτυλο [57]. Μετά τον σχηματισμό αδιάλυτων συμπλόκων με μεταλλικά κατιόντα (βλ.2.3.4) όπως ασβέστιο, μαγνήσιο ή σίδηρο, η απορρόφηση του

φαρμάκου μειώνεται. Το ίδιο συμβαίνει με την κατανάλωση γευμάτων πλούσιων σε πρωτεΐνες, λίπη και υδατάνθρακες με την μείωση να αγγίζει το 50% [51,52, 57]. Ως συνέπεια, η διείσδυση στους ιστούς μειώνεται και η κατανομή του φαρμάκου σε αυτούς καθίσταται δύσκολη. Οι ενώσεις αυτές δεν μεταβολίζονται, με εξαίρεση την τετρακυκλίνη και η σύνδεση με τις πρωτεΐνες είναι μεταβλητή [57]. Η αποβολή των περισσότερων γίνεται μέσω των νεφρών ή των χοληφόρων οδών. Το υψηλότερο ποσοστό αποβολής το έχει η ρολιτετρακυκλίνη. Η ποσότητα των παραγόντων που απεκκρίνονται στα κόπρανα μέσω της χολικής αποβολής είναι μεγαλύτερη από 40% [52,57].

Οι ενώσεις της 2^{ης} ομάδας (δοξυκυκλίνη και μινοκυκλίνη) χορηγούνται από το στόμα. Η δοξυκυκλίνη απορροφάται πλήρως με βιοδιαθεσιμότητα μεγαλύτερη από 80% [57]. Οι τροφές δεν επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό την απορρόφησή της, οπότε απορροφάται περισσότερη στον δωδεκαδάκτυλο [52,53, 54]. Υπάρχει μικρή διείσδυση στους ιστούς καλής ποιότητας, με δέσμευση πρωτεΐνης στο 82-93% και η αποβολή της μέσω των ούρων είναι περίπου 35-60%, με το υπόλοιπο ποσοστό να απεκκρίνεται από τα κόπρανα [57]. Η μινοκυκλίνη απορροφάται σε ποσοστό 95-100% κυρίως στον δωδεκαδάκτυλο και το στομάχι. Ιόντα όπως ο σίδηρος, το ασβέστιο και το μαγνήσιο επηρεάζουν την απορρόφησή της, μειώνοντάς την βιοδιαθεσιμότητά της. Η πρωτεϊνική δέσμευση της μινοκυκλίνης είναι 76% [57]. Λόγω κάποιων μεταβολιτών ένα πολύ μικρό ποσοστό της ανακτάται στα ούρα. Το 20-35% αποβάλλεται με τα κόπρανα [52,57].

Στην ομάδα 3, περιλαμβάνονται δύο ενώσεις οι: γλυκυλοκυκλίνη και αμινομεθυλοκυκλίνη. Η αμινομεθυλοκυκλίνη βρίσκεται σε προκλινική ανάπτυξη, ενώ λίγα φαρμακοκινητικά δεδομένα είναι διαθέσιμα για την τιγκεκυκλίνη [52,55]. Δεν υπάρχουν δεδομένα για την απορρόφηση της τιγκεκυκλίνης, με περιορισμένα δεδομένα για τη λήψη από το στόμα. Η δέσμευση της πρωτεΐνης τιγκεκυκλίνης κυμαίνεται από 73% έως 79% [57]. Η

ποσότητα της τετρακυκλίνης που απεκκρίνεται στα ούρα είναι μικρότερη από 15% και η νεφρική κάθαρση είναι σχεδόν μεγαλύτερη από 20% [55,57].

Πίνακας 2.2: Ταξινόμηση τετρακυκλινών με βάση την φαρμακοκινητική τους δράσης.

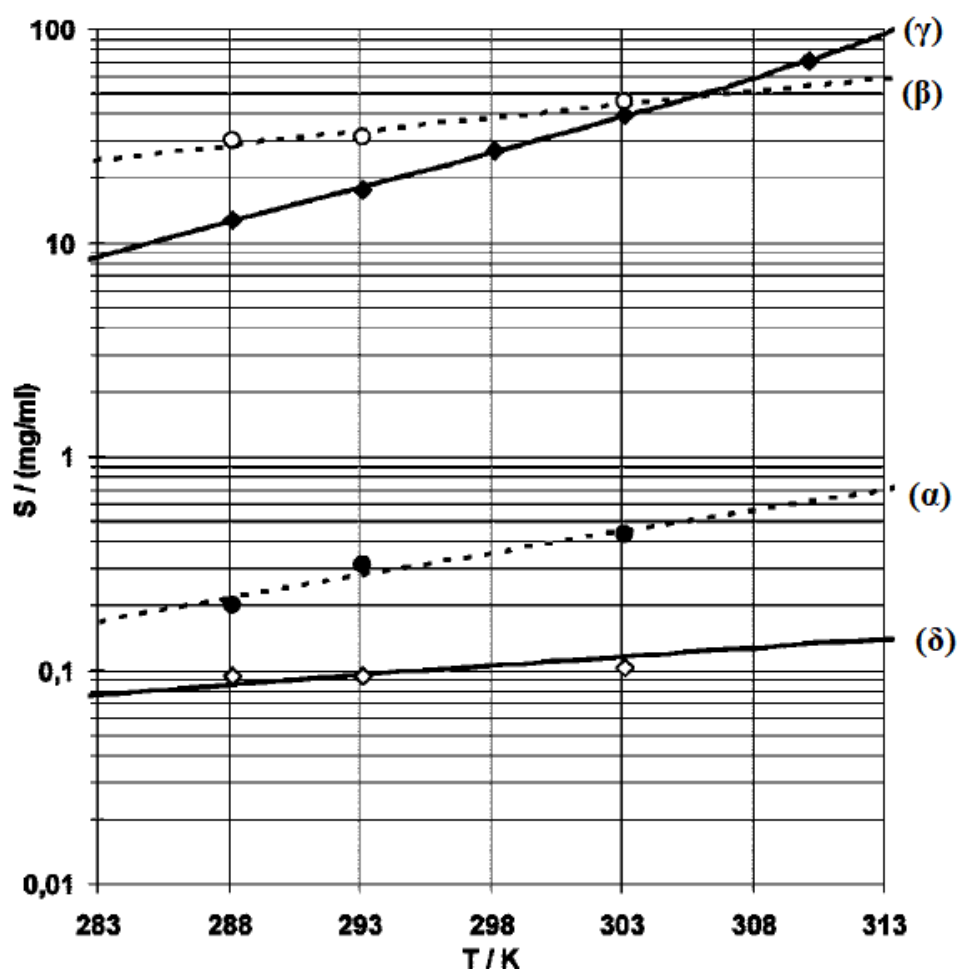
| ΤΕΤΡΑΚΥΚΛΙΝΕΣ | | |
|---|--|---|
| Ομάδα 1 | Ομάδα 2 | Ομάδα 3 |
| Τετρακυκλίνη, Χλωροτετρακυκλίνη Οξυτετρακυκλίνη, Ρολιτετρακυκλίνη, Μεθακυκλίνη | Δοξυκυκλίνη Μινοκυκλίνη | Αμινομεθυκυκλίνη Γλυκοκυκλίνες |
| <ul style="list-style-type: none"> • Μικρή απορρόφηση • Μικρή λιποφιλία • Χορήγηση από το στόμα εκτός από την ρολιτετρακυκλίνη | <ul style="list-style-type: none"> • Μερική ή πλήρης απορρόφηση • 3-5 φορές μεγαλύτερη λιποφιλία από την ομάδα 1 • Ενδοφλέβια και από του στόματος χορήγηση | <ul style="list-style-type: none"> • Μερική ή πλήρης απορρόφηση • Μεγάλη λιποφιλία • Ενδοφλέβια χορήγηση |

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, τα αντιβιοτικά της τάξης των τετρακυκλινών χορηγούνται κυρίως από το στόμα, όμως η χαμηλή υδροφιλία τους οδηγεί σε μειωμένη απορρόφηση. Η παρουσία καρβοξυλικών και αμινικών ομάδων στο μόριο της τετρακυκλίνης έχει σαν αποτέλεσμα να επηρεάζεται η οξεο-βασική τους συμπεριφορά από τις φυσικοχημικές ιδιότητες του διαλύτη.

Παράλληλα, η διαλυτότητα ενός φαρμάκου στα υγρά του σώματος έχει σημαντική επίδραση στη βιοδιαθεσιμότητά του. Για τον λόγο αυτό, πολλές φορές προστίθεται μία ομάδα HCl για την ενίσχυση της διαλυτότητας του φαρμάκου. Η σειρά διαλυτότητας της τετρακυκλίνης σε νερό, ακετόνη, 2-προπανόλη και αιθανόλη, είναι η εξής:

νερό < 2 – προπανόλη < αιθανόλη < ακετόνη

Η διαλυτότητα σε ακετόνη κι αιθανόλη είναι δύο τάξεις μεγαλύτερη από αυτή του νερού [56]. Η συμπεριφορά αυτή διαφέρει αρκετά σε σχέση με την υδροχλωριωμένη μορφή της τετρακυκλίνης, όπου η διαλυτότητα στο νερό είναι περίπου τρεις τάξεις μεγαλύτερη από ότι στην ακετόνη, για μία δεδομένη θερμοκρασία. Αυτό οφείλεται στην παρουσία του HCl που οδηγεί στο σχηματισμό ιοντικών ειδών και στην πρωτονίωση της ομάδας αμίνης, για το

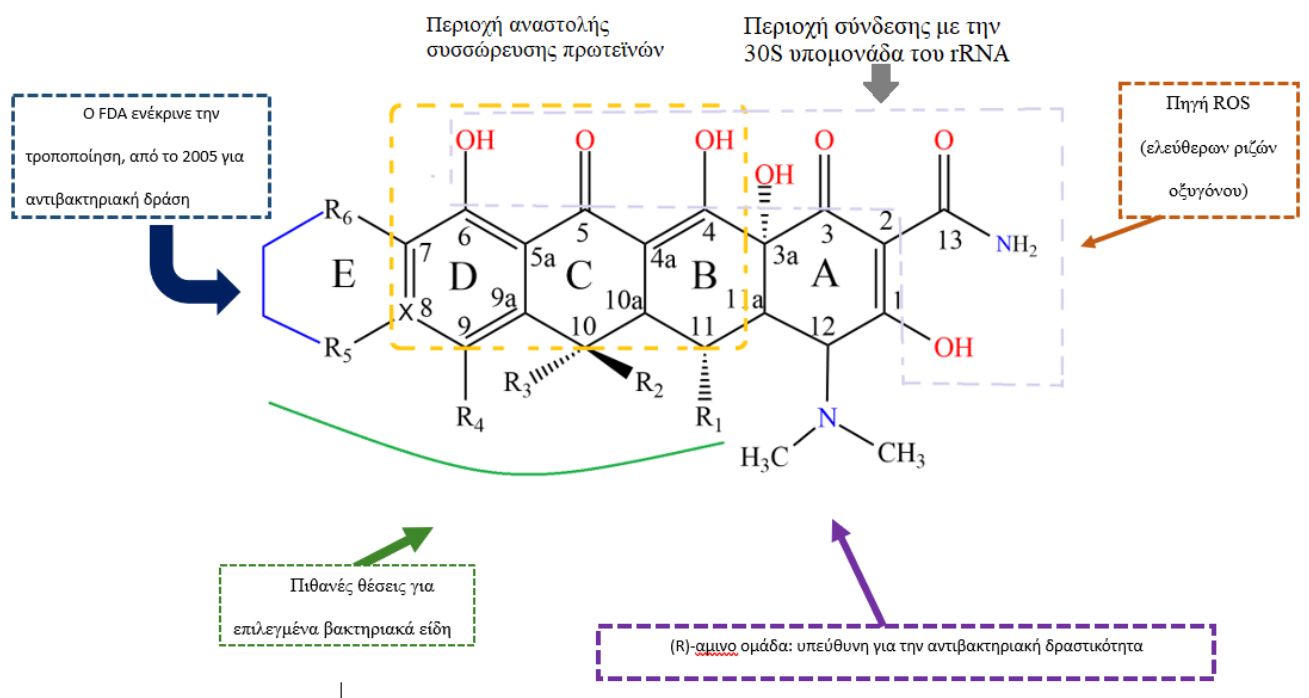


Εικόνα 2.4 : Καμπύλες διαλυτότητας της μη υδροχλωριωμένης τετρακυκλίνης και της υδροχλωριωμένης της μορφής συναρτήσει της θερμοκρασίας. Η διαλυτότητα της μη υδροχλωριωμένης μορφής (α) στο νερό και (β) στην ακετόνη και της υδροχλωριωμένης μορφής (γ) στο νερό και στην ακετόνη (δ)[56].

αντιβιοτικό της τετρακυκλίνης που αλληλεπιδρά με το νερό μέσω δυνάμεων ιόντος-διπόλου αυξάνοντας έτσι την υδατική διαλυτότητα [56].

2.3.4 Σχέση δομής και δράσης

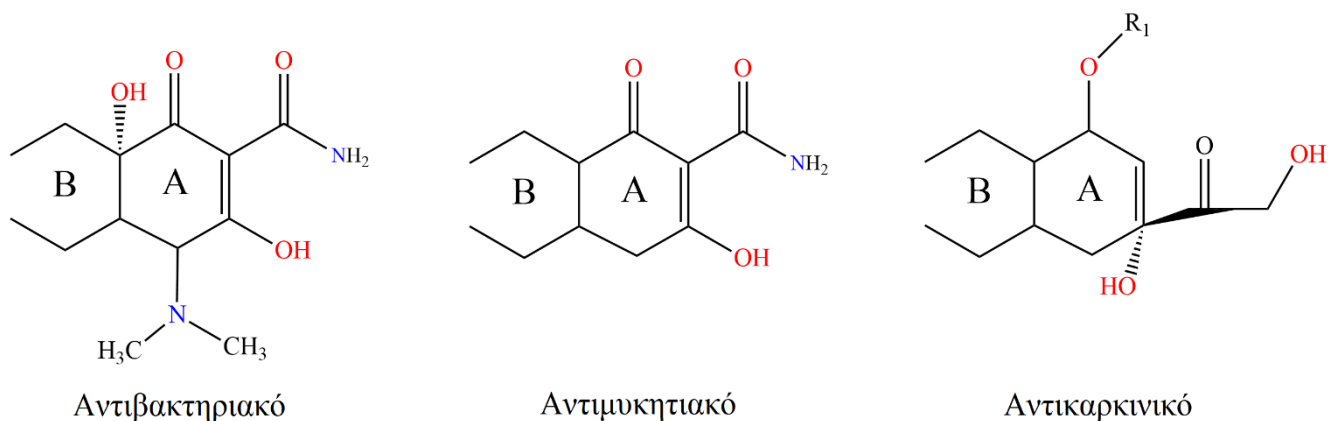
Τα αντιβιοτικά της ομάδας αυτής είναι κρυσταλλικές κίτρινες ενώσεις που στο φως ή σε μεγάλες θερμοκρασίες (>180°C) αποσυντίθενται και σκουραίνουν. Αποτελούνται από ένα σύστημα τετρακυκλικού δακτυλίου ναφθακενίου, δηλαδή από τέσσερις εξαμελείς δακτυλίους στους οποίους προσαρμόζονται διάφοροι υποκαταστάτες όπως φαίνεται στην **Εικόνα 2.5**.



Εικόνα 2.5: Διαγραμματική απεικόνιση της σχέσης δομής-δραστηριότητας στην οικογένεια των τετρακυκλινών.

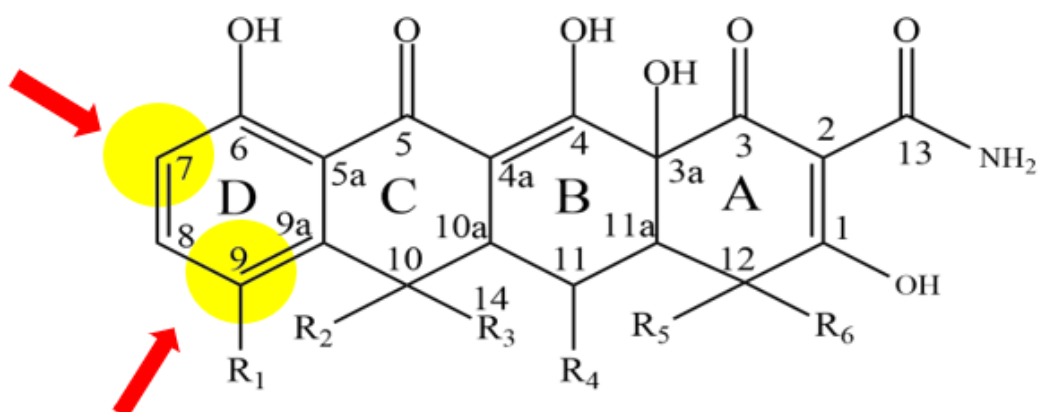
Οι τετρακυκλίνες με αντιβιοτική δράση έχουν στον C12 του δακτυλίου A μία ομάδα διμεθυλαμίνης. Η αφαίρεση της ομάδας αυτή αν και συνεπάγεται μείωση των αντιβιοτικών ιδιοτήτων του φαρμάκου, αποτέλεσε την βάση για την ανάπτυξη νέων τροποποιημένων τετρακυκλινών [57, 58, 59]. Η δομή του δακτυλίου που έχουν όλα τα αντιβιοτικά που ανήκουν σε αυτή την ομάδα περιβάλλεται από περιφερειακές ζώνες (άνω και κάτω) στις οποίες περιέχονται διάφορες λειτουργικές ομάδες. Οι χημικές τροποποιήσεις στις άνω και κάτω

περιοχές της δομής της τετρακυκλίνης παράγουν μεταβλητά δραστικές και ανενεργές ενώσεις πρώτης και δεύτερης γενιάς.



Εικόνα 2.6: Οι υποκαταστάτες και η διαμόρφωση του δακτυλίου A είναι τα πιο σημαντικά στοιχεία για τον προσδιορισμό σωστής θεραπείας.

Οι ενεργές ενώσεις τετρακυκλινών με αντιβακτηριακή δράση απαιτείται να έχουν στο μόριο τους τα κετο-ενολικά ταυτομερή στις θέσεις C1 και C3 και μία εξωκυκλική ομάδα καρβονυλίου ή αμιδίου στην θέση C2 του A δακτυλίου [57]. Για ενίσχυση της αντιβακτηριακής δράσης είναι απαραίτητη η παρουσία αμινικής ομάδας στην θέση C12. Χρειάζεται επίσης μία φαινόλη (C6) σε συνδυασμό με κέτο-ενόλη (C5-C4) και μία υδροξυλομάδα (C3a) [57]. Όλοι αυτοί οι υποκαταστάτες μαζί με την αντίστοιχη ταυτομερή ισορροπία απαιτούνται για την αναγνώριση και σύνδεση των ενώσεων στις ριβοσωμικές υπομονάδες [57].



Εικόνα 2.7: βασική δομή τετρακυκλινών. Επισημασμένες θέσεις κλειδιά για την ανάπτυξη φαρμάκων.

Τροποποίηση της κάτω περιφερειακή ζώνης (*Εικόνα 2.7*) και ιδιαίτερα των C7 και C9 του D δακτυλίου ενίσχυσε την επίθεση στους βιολογικούς στόχους, όπως συνέβη για παράδειγμα με την doxycycline [60]. Πρόσθετα οι τροποποιήσεις της κάτω περιφερειακή ζώνης είχαν σαν αποτέλεσμα τη σύνθεση νέων τετρακυκλινών με την ικανότητα αναστολής της ανάπτυξης ανθεκτικών βακτηρίων, μπλοκάροντας τις πρωτεΐνες βακτηριακής αντίστασης που λειτουργούν ως «αντλίες» εκροής για την απομάκρυνση των αντιβιοτικών [60].

2.3.5 Μηχανισμός δράσης

Οι τετρακυκλίνες διαθέτουν ποικίλους μηχανισμούς δράσης, ενάντια σε πολλαπλούς στόχους είτε μέσω ριβοσωμικών είτε μέσω κυτταρικών μεμβρανών. Ένας από αυτούς αφορά την προσκόλληση διαφορετικών ομάδων στον σκελετό, όπως υδρόξυλο-ομάδες ή αμινο-ομάδες. Οι υδρόξυλο-ομάδες αποτελούν πηγή ελευθέρων ριζών οξυγόνου (ROS) που διασπών μακρομόρια όπως το DNA, το RNA και οι πρωτεΐνες [57]. Από την διάσπαση προκαλείται οξειδωτικό στρες και τελικά επέρχεται βακτηριακός θάνατος. Οι τετρακυκλίνες δρουν με διαφορετικό μηχανισμό ανάλογα με την ιδιότητά τους (αντιβκτηριακή, αντιμυκητιακή, αντικαρκινική) [60].

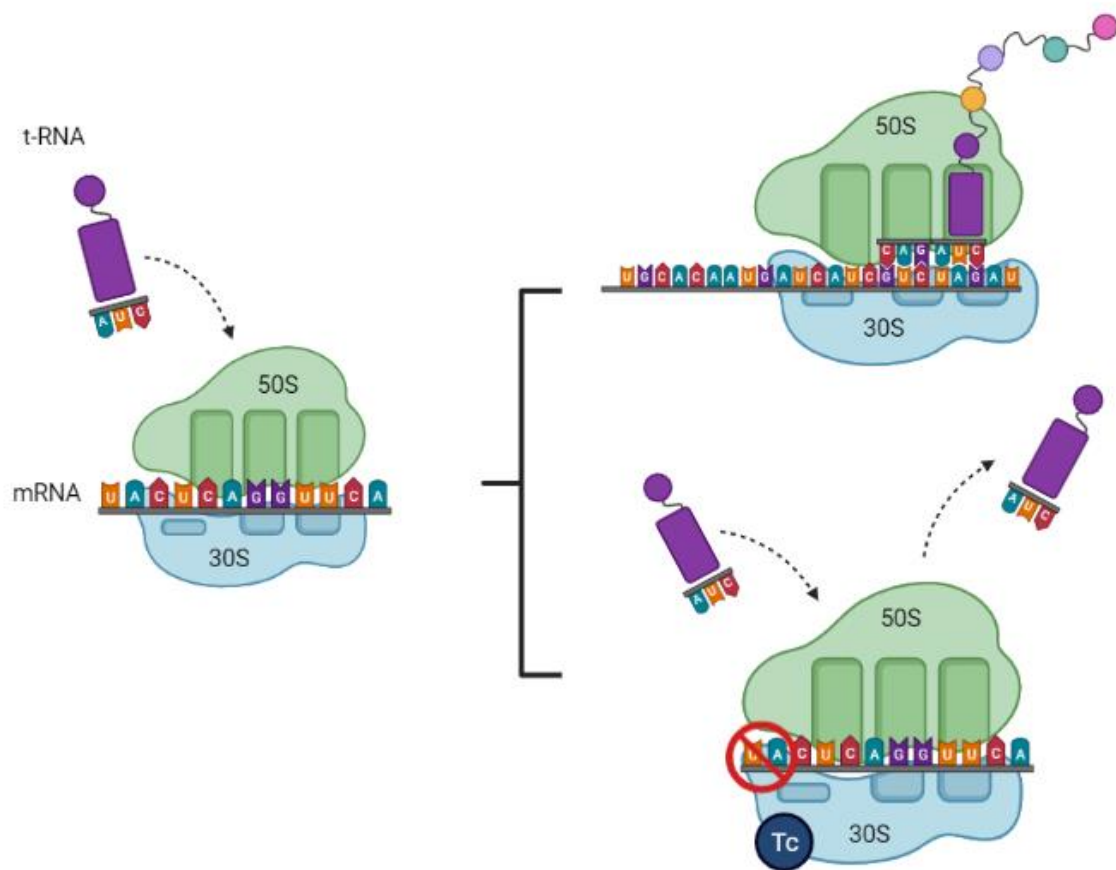
Μία σημαντική ιδιότητα για την κατανόηση των μηχανισμών δράσης των τετρακυκλινών, είναι η ικανότητα τους να σχηματίζουν λιποδιαλυτά σύμπλοκα με μεταλλικά κατιόντα όπως Mg^{2+} και Ca^{2+} [60, 61, 62] Μετά την δέσμευση των ιόντων κατά μήκος της πάνω περιφερειακής ζώνης, κυκλοφορούν ως χηλικές ενώσεις των αντίστοιχών κατιόντων. Συγκεκριμένα στα Gram αρνητικά βακτήρια το θετικά φορτισμένο σύμπλοκο τετρακυκλίνης-μετάλλου (κυρίως Mg^{2+}) διασχίζει την εξωτερική τους μεμβράνη χρησιμοποιώντας πορίνες OmpF και OmpC [60]. Στη συνέχεια λόγω του δυναμικού Donnan που δημιουργείται κατά μήκος της εξωτερικής μεμβράνης, το σύμπλοκο συσσωρεύεται στον περιπλασματικό χώρο και

πιθανώς διασπάται. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την απελευθέρωση ενός αφόρτιστου μορίου τετρακυκλίνης, η οποία λόγω του λιπόφιλου χαρακτήρα της διαχέεται μέσω της φωσφολιπιδικής διπλοστιβάδας στο κυτταρόπλασμα [60, 63]. Η πρόληψη των τετρακυκλινών είναι μερικώς εξαρτώμενη ενεργειακά, καθώς εκτός από την παθητική διάχυση περιλαμβάνει και την υδρόλυση φωσφορικών δεσμών. Στα Gram θετικά η πρόληψη μπορεί να γίνει είτε με παθητική διάχυση, είτε με ενεργό μεταφορά, είτε και με τα δύο [64]. Ως εκ τούτου, τα δισθενή ιόντα έχουν σημαντικό ρόλο στην μεταφορά και την αποτελεσματικότητα των ενώσεων αυτών. Για παράδειγμα, η μεταφορά του ασβεστίου με φορέα την τετρακυκλίνη έχει σοβαρές βιολογικές επιπτώσεις, καθώς το ασβέστιο με τη σειρά του θα δράσει ως αγγελιοφόρος επηρεάζοντας μονοπάτια όπως μεταβολικές αντιδράσεις και ενεργοποίηση ή αναστολή διάφορων υποδοχέων [60].

Σε επόμενο βήμα, οι τετρακυκλίνες είτε δεσμεύονται στις ριβοσωμικές υπομονάδες για αναστολή της πρωτεϊνοσύνθεσης, είτε θανατώνουν τα βακτήρια. Μετά από την ανάπτυξη τροποποιημένων τετρακυκλινών, αποδείχθηκε *in vitro* πως εκτός από βακτηριοστατική δράση είναι και βακτηριοκτόνες με μηχανισμό δράσης την πρόκληση βλαβών στις μεμβράνες [60].

Οι «τυπικές» τετρακυκλίνες στις οποίες περιλαμβάνονται οι: χλωροτετρακυκλίνη, μινοκυκλίνη και δοξυκυκλίνη, δρουν αναστέλλοντας την σύνθεση των πρωτεϊνών των βακτηριακών κυττάρων. Αυτό επιτυγχάνεται με τη σύνδεσή τους στην 30S υπομονάδα του ριβοσώματος, εμποδίζοντας την προσκόλληση του αμυνοακυλο-tRNA στον υποδοχέα του ριβοσώματος, με ανατρέψιμο τρόπο [52, 60]. Ο ακριβής μηχανισμός δεν είναι πλήρως κατανοητός, ωστόσο πιθανολογείται πως με την δέσμευση της τετρακυκλίνης στο ριβόσωμα, αλλάζει η αντιδραστικότητα εντός του ριβοσώματος και παύει πλέον να λειτουργεί σωστά. Μία άλλη πρόταση θεωρεί πως με την δέσμευση της τετρακυκλίνης μπορεί να προκληθεί παραμόρφωση της τρισδιάστατης δομής του ριβοσώματος και να επιφέρει αλλαγές στην

προσβασιμότητα των βάσεων εντός του 16S rRNA. Μια ακόμη πιθανότητα είναι πως με την δέσμευση της τετρακυκλίνης μπορεί να εμποδίζεται η είσοδος των αμινοακυλο-tRNA στο ριβόσωμα. Στις σημαντικότερες πρωτεΐνες της υπομονάδας 30S του ριβοσώματος περιλαμβάνονται οι S3, S7, S14, S19 με στοιχεία να δείχνουν πως η δέσμευση της τετρακυκλίνης γίνεται απευθείας στην S7 [64]. Στο 16S rRNA η περιοχή των νουκλεοτιδίων από το 892 έως το 1054 νουκλεοτίδιο μπορεί να εμπλέκεται στην αντιβιοτική δέσμευση της τετρακυκλίνης και τα νουκλεοτίδια 1052-1054 έχουν προταθεί ως τα πιο πιθανά για την αναστολή της πρωτεϊνικής σύνθεσης [60, 64].



Εικόνα 2.8: Μηχανισμός δράσης TC: σύνδεση στην υπομονάδα 30S του ριβοσώματος και αναστολή της πρωτεϊνοσύνθεσης.

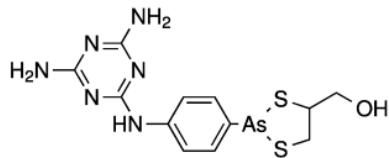
Οι «άτυπες» τετρακυκλίνες στις οποίες ανήκουν οι: ανυδροχλωροτετρακυκλίνη, χελοκαρδίνη, ανυδροτετρακυκλίνη και 6-θειατετρακυκλίνη, χαρακτηρίζονται ως βακτηριοκτόνες. Δρουν παρεμβαίνοντας στην κυτταρική μεμβράνη την οποία διαπερνούν, οδηγώντας σε βλάβη στο κύτταρο και κατ'επέκταση κυτταρική λύση και θάνατο *in vitro* [60,64].

2.4 Μεταλλοφάρμακα

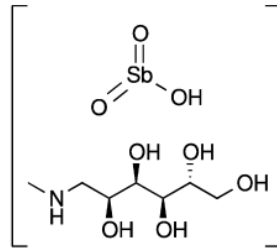
Τα μεταλλικά ιόντα διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στις βιολογικές διεργασίες και η φαρμακευτική τους χρήση είναι γνωστή από τους αρχαίους πολιτισμούς της Μεσοποταμίας, της Ινδίας, της Κίνας και της Αιγύπτου [66-69]. Η εισαγωγή τους στον ανθρώπινο οργανισμό είναι ιδιαίτερα χρήσιμη στη διάγνωση και θεραπεία ασθενειών. Ένα παράδειγμα διαγνωστικής εφαρμογής αποτελεί η μαγνητική τομογραφία (MRI), στην οποία χρησιμοποιούνται μεταλλικά ιόντα Gd^{3+} . [66]. Το πιο γνωστό μεταλλοφάρμακο σήμερα είναι η σισπλατίνη που χρησιμοποιείται στην αντικαρκινική θεραπεία [66].

Το πρώτο θεραπευτικό μεταλλοφάρμακο με αντιμικροβιακές ιδιότητες ήταν το salvarsan. Αναπτύχθηκε από τον P.Ehrlich με βάση το αρσενικό για την θεραπεία της σύφιλης. Με την προσθήκη υδραργύρου και βισμούθιου παρέμεινε το κύριο φάρμακο αντιμετώπισης της σύφιλης μέχρι τον Β' Παγκόσμιο πόλεμο [66,70]. Το 1907 οι Breinl και Todd μελέτησαν τη δράση του αρσενικού για την θεραπεία της τρυπανοσωμίας. Το αρσενικό συνέχισε να αποτελεί κύρια βάση για την ανάπτυξη αντιμικροβιακών και αντιπαρασιτικών φαρμάκων μέχρι τις αρχές του 20^{ου} αιώνα. Τα περισσότερα από αυτά τα φάρμακα σήμερα έχουν αντικατασταθεί με λιγότερο τοξικά. Άλλα μεταλλικά ιόντα που έχουν χρησιμοποιηθεί ενάντια στα μικρόβια είναι αυτά του νατρίου, του αντιμονίου, του αργύρου και του βισμούθιου [66].

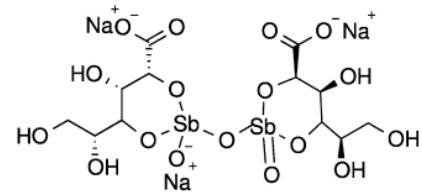
Approved



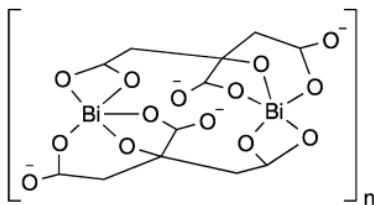
melarsoprol



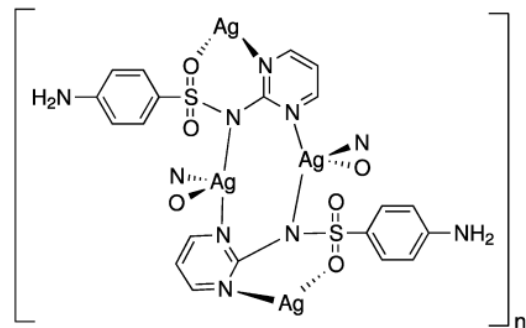
meglumine antimoniate



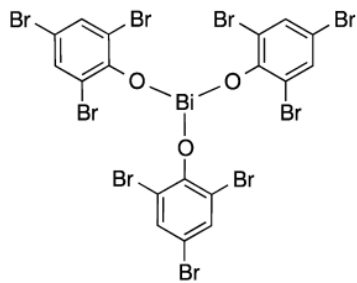
sodium stibugluconate



CBS

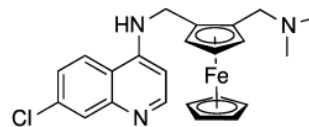


silver sulphadiazine



xeroform

Clinical trials



ferroquine

Εικόνα 2.9: Μεταλλοφάρμακα με αντιμικροβιακή, αντιπαρασιτική δράση.

2.5 Νάτριο



Εικόνα 2.10: Νάτριο σε κανονικές συνθήκες.

Το νάτριο συμβολίζεται με Na, έχει ατομικό αριθμό 11 και ατομικό βάρος 22.9898. Ανήκει στην 1^η ομάδα και είναι μέλος των αλκαλιμετάλλων. Σε φυσιολογικές συνθήκες (25°C, 1atm) είναι μαλακό μέταλλο, αργυρόλευκου χρώματος, με μεγάλη δραστικότητα. Μέχρι σήμερα είναι γνωστά 20

ισότοπα με το ^{23}Na να είναι το μόνο σταθερό. Πρώτη φορά απομονώθηκε το 1807 από τον H. Davy με ηλεκτρόλυση τήγματος υδροξειδίου του νατρίου. Είναι το 6^ο πιο άφθονο στοιχείο της λιθόσφαιρας της Γης και διαδραματίζει σπουδαίο ρόλο στους ζωντανούς οργανισμούς.

Συγκεκριμένα κάποιοι από τους ρόλους του είναι η διατήρηση της οσμωτικής πίεσης και η κατανομή του νερού σε διάφορα διαμερίσματα σωματικών υγρών, η διατήρηση του σωστού pH, η ρύθμιση της σωστής λειτουργίας της καρδιάς και άλλων μυών, η συμμετοχή σε αντιδράσεις οξειδωσης και η συμμετοχή στην κατάλυση ως συμπαραγοντες για ένζυμα. Στα νευρικά κύτταρα, η ροή νατρίου-καλίου δημιουργεί το ηλεκτρικό δυναμικό που βοηθά την αγωγή των νευρικών ερεθισμάτων. Όταν το κάλιο φεύγει από το κύτταρο, αλλάζει το δυναμικό της μεμβράνης και επιτρέπει στη νευρική ώθηση να προχωρήσει. Αυτή η διαβάθμιση ηλεκτρικού δυναμικού, που δημιουργείται από την «αντλία νατρίου-καλίου», βοηθά στη δημιουργία μυϊκών συσπάσεων και ρυθμίζει τον καρδιακό παλμό. Μια άλλη από τις πιο σημαντικές λειτουργίες της αντλίας είναι η πρόληψη της διόγκωσης των κυττάρων. Εάν το νάτριο δεν αντλείται έξω, το νερό συσσωρεύεται μέσα στο κύτταρο προκαλώντας το να διογκωθεί και τελικά να σκάσει [71].

Τα φυσιολογικά επίπεδα του νατρίου στο πλάσμα στους ενήλικες κυμαίνονται από 136 έως 146 mEq/L και αυτή η ισορροπία διατηρείται κανονικά με μια μέση διατροφική πρόσληψη 90 έως 250 mEq την ημέρα. Η απέκκριση νατρίου τείνει να αντανακλά την πρόσληψη νατρίου και σε μια μέση δίαιτα, η απέκκριση νατρίου στα ούρα κυμαίνεται μεταξύ 80 και 180 mEq την ημέρα.

2.6 Μικροβιακή αντοχή

2.6.1 Γενικά στοιχεία

Οι μολυσματικές ασθένειες αποτελούν συνεχή απειλή για την ανθρώπινη υγεία. Ωστόσο τις τελευταίες δεκαετίες, η εκτεταμένη χρήση αντιβιοτικών για την αντιμετώπισή τους, έφερε στην επιφάνεια ένα από τα σοβαρότερα προβλήματα του 21ου αιώνα, αυτό της αντιμικροβιακής αντοχής (AMR) [72]. Ως AMR ορίζεται η ικανότητα των μικροβίων να επιβιώνουν μετά την έκθεσή τους, σε φάρμακα που συνήθως είτε θα τα σκότωναν είτε θα σταματούσαν τον πολλαπλασιασμό τους [73]. Η έλλειψη ανταγωνισμού από άλλα στελέχη, επιτρέπει στα στελέχη που έχουν την δυνατότητα να αποτρέπουν ένα αντιμικροβιακό να δράσει εναντίον τους, να ευδοκιμήσουν και να εξαπλωθούν. Αποτέλεσμα αυτού, η εμφάνιση υπερβακτηριδίων (superbugs). Τέτοιο παράδειγμα αποτελεί ο χρυσίζων σταφυλόκοκκος (MRSA), που παρουσιάζει ανθεκτικότητα στη μεθικιλίνη [74]. Η παρατήρηση της αντιμικροβιακής αντοχής, συμπίπτει χρονολογικά με την πρώτη ανακάλυψη των αντιβιοτικών και θεωρείται φυσικό φαινόμενο. Βέβαια τα γονίδια που προσδίδουν ανθεκτικότητα σε ορισμένα στελέχη βακτηρίων, προηγούνται των αντιβιοτικών κατά εκατομμύρια χρόνια [79]. Ακόμη, η εμφάνισή της μπορεί να οφείλεται σε δύο επιπλέον λόγους, της γενετικής μετάλλαξης και της απόκτησης μέσω άλλου μικροβίου. Η εξάπλωσή της γίνεται μέσω ανθρώπων, ζώων και περιβάλλοντος. Καταλύτης στην ταχεία εξάπλωση μεταξύ ατόμων, είναι οι ανθυγιεινές συνθήκες διαβίωσης [74]

Παλαιότερα η εμφάνιση της είχε συνδεθεί κυρίως με τις μονάδες φροντίδας και τα νοσοκομεία. Πλέον όμως, παρατηρείται στην ευρύτερη κοινωνία. Κύριος λόγος για τον αυξανόμενο ρυθμό ανάπτυξης της AMR είναι η υπερβολική χρήση αντιβιοτικών. Σύμμαχος σε αυτό, η έλλειψη νέων φαρμάκων για την αντιμετώπιση των superbugs καθώς και η έλλειψη γρήγορων διαγνωστικών test, για την σωστή καθοδήγηση των γιατρών προκειμένου να επιλεγεί η κατάλληλη συνταγή για την αντιμετώπιση της εκάστοτε λοίμωξης. Με την AMR σε ανάπτυξη χωρίς τα απαραίτητα όπλα, η ανθρωπότητα πρόκειται να χάσει το σπουδαίο έδαφος που κέρδισε τον προηγούμενο αιώνα [75,76,77] Σε αυτό περιλαμβάνονται :

1. Η μάχη εναντίον απειλητικών για την ζωή μολυσματικών ασθενειών (HIV, TB (Φυματίωση), ελονοσία (malaria), πνευμονία), καθώς και περιπτώσεων καρκίνου όπου για τους ασθενείς, τα αντιβιοτικά είναι ζωτικής σημασίας.
2. Η μεγάλη πρόοδος χειρουργικών επεμβάσεων, όπως οι καισαρικές τομές, οι μεταμοσχεύσεις οργάνων. Επεμβάσεις ρουτίνας πλέον, χάρη στην ικανότητα της επιστημονικής κοινότητας για αποτροπή και αποτελεσματική αντιμετώπιση οξείων λοιμώξεων με τη χρήση αντιβιοτικών.
3. Διασωλήνωση ασθενών στις μονάδες εντατικής θεραπείας, που ήδη αντιμετωπίζουν υψηλά ποσοστά μολύνσεων.



Εικόνα 2.9: Πορεία ανάπτυξης ανθεκτικότητας βακτηρίων στα αντιβιοτικά.

Οι επιπτώσεις της AMR σε παγκόσμιο επίπεδο αποδεικνύονται και από τα στατιστικά στοιχεία του Παγκόσμιου και του Ευρωπαϊκού Οργανισμού υγείας . Σύμφωνα με αυτά περίπου 700.000 θάνατοι/έτος στον κόσμο οφείλονται σε ανθεκτικά στελέχη κοινών βακτηριακών λοιμώξεων. 60.000 θάνατοι νεογνών/έτος στην Ινδία, 33.000 θάνατοι/έτος στην Ευρώπη. Όσο για τις λοιμώξεις των ανθεκτικών στα αντιβιοτικά βακτηρίων, στην Ευρώπη το 75% σχετίζεται με δομές περίθαλψης ,ενώ το 39% της επιβάρυνσης οφείλεται στην αντοχή των μικροοργανισμών σε αντιβιοτικά τελευταίας γραμμής. Στην Ινδία το 70% των τουριστών επιστρέφουν με ανθεκτικά στελέχη βακτηρίων στις αποσκευές τους , ενώ σε Βραζιλία Ινδονησία και Ρωσία το 40-60% των μολύνσεων είναι ήδη ανθεκτικό στα αντιβιοτικά [75,76,77].

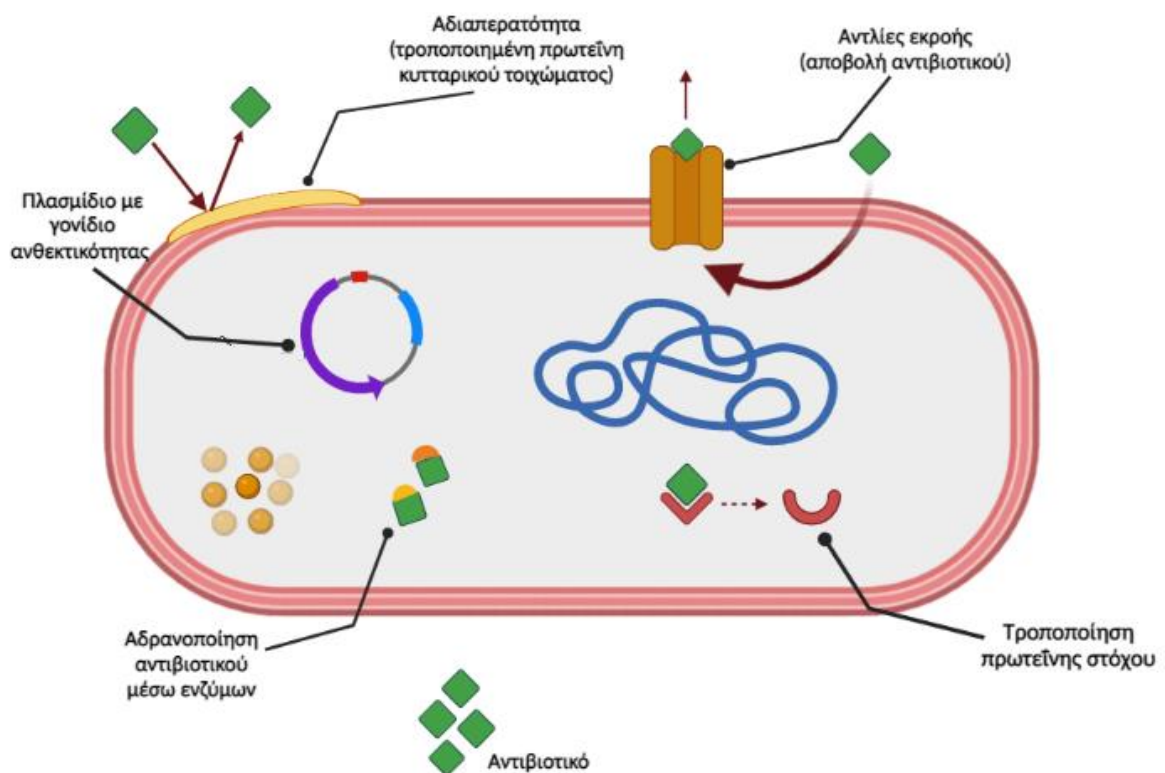
Τέλος εκτιμάται πως έως το 2050 ο αριθμός θανάτων ανά έτος θα φτάσει τα δέκα εκατομμύρια, με τις Αφρική και Ασία να πλήττονται περισσότερο. Δηλαδή κάθε τρία δευτερόλεπτα ένας άνθρωπος θα πεθαίνει. Σε οικονομικό επίπεδο αυτό μεταφράζεται σε 100 trillion USD, με βάση ότι ένας άνθρωπος σήμερα κοστίζει 10.000 USD. Ωστόσο αυτοί οι αριθμοί δεν πρέπει να θεωρηθούν απόλυτοι καθώς είναι αδύνατον να εκτιμηθεί η ακριβής πορεία της AMR. Εξαρτάται φυσικά από το σχέδιο μέτρων που θα ακολουθηθεί σε παγκόσμιο επίπεδο αλλά και από την παραγωγή δεδομένων και στοιχείων, των πληροφοριακών συστημάτων υγείας κάθε χώρας, χρήσιμων για την μέτρηση της προόδου της [75, 76, 77].

2.6.2 Μηχανισμοί αντοχής στις τετρακυκλίνες

Για την απόκτηση αντοχής στις τετρακυκλίνες τα βακτήρια διαθέτουν τέσσερις βασικούς μηχανισμούς. Επιπλέον, ορισμένα βακτήρια λόγω δομής είναι πιο ανθεκτικά σε αυτή την ομάδα αντιβιοτικών, οπότε διαθέτουν και έμφυτους μηχανισμούς ανοσίας. Τέτοιο παράδειγμα αποτελούν τα Gram-αρνητικά βακτήρια που από την φύση τους είναι ανθεκτικά σε πολλά αντιβιοτικά λόγω της ύπαρξης ενός λιποσακχαρίτη στην εξωτερική στοιβάδα.

Πρόσθετα,, μόρια μεταφορείς, αναλόγως το φάρμακο και το είδος του βακτηρίου προσδίδουν αντοχή μέσω άντλησης των φαρμάκων εξωτερικά του κυττάρου.

Ο πιο διαδεδομένος μηχανισμός αντίστασης είναι αυτός της εκροής, όπου μέχρι στιγμής έχουν εντοπιστεί 28 διαφορετικές ομάδες αντλιών εκροής. Ο επόμενος είναι οι πρωτεΐνες προστασίας του ριβοσώματος, των οποίων η σύνδεση στο ριβόσωμα οδηγεί στην απομάκρυνση του φαρμάκου από τη θέση δέσμευσης. Σε αυτόν τον μηχανισμό έχουν βρεθεί 12 ομάδες. Τέλος, δύο λιγότερο διαδεδομένοι μηχανισμοί περιλαμβάνουν δύο διαφορετικά γονίδια που κωδικοποιούν μονοοξυγενάσες που τροποποιούν τις τετρακυκλίνες με αποτέλεσμα την αποδόμηση τους ή προκαλούν μεταλλάξεις στο 16S rRNA, μειώνοντας τη συγγένεια δέσμευσης του φαρμάκου στο ριβόσωμα [79].



Εικόνα 2.10: Μηχανισμοί ανθεκτικότητας των βακτηρίων στα αντιβιοτικά.

2.7 Μικροβιακή κερατίτιδα

Η βακτηριακή κερατίτιδα είναι μια σοβαρή οφθαλμική μολυσματική ασθένεια που μπορεί να οδηγήσει σε σοβαρή οπτική αναπηρία. [80]. Η σοβαρότητα της μόλυνσης του κερατοειδούς εξαρτάται συνήθως από την υποκείμενη κατάσταση του κερατοειδούς και την παθογένεια των μολυσματικών βακτηρίων [81]. Η κλινική έκβαση των ασθενών εξαρτάται από την έγκαιρη και στοχευμένη θεραπεία [81]. Το σύνολο των βακτηριακής κερατίτιδας σχετίζεται με οφθαλμικό τραύμα ή ασθένειες της οφθαλμικής επιφάνειας. Ωστόσο, η ευρεία χρήση των φακών επαφής έχει αυξήσει δραματικά τη συχνότητα εμφάνισης κερατίτιδας που σχετίζεται με φακούς επαφής [81, 82, 83, 84]. Χαρακτηρίζεται από φλεγμονή και διόγκωση του ιστού του επιπεφυκότα, που συνοδεύεται από οίδημα των αιμοφόρων αγγείων, οφθαλμικές εκκρίσεις και πόνο [85]. Τα κύρια είδη βακτηρίων που ευθύνονται για την βακτηριακή κερατίτιδα είναι τα είδη σταφυλόκοκκου, *Haemophilus influenzae*, είδη στρεπτόκοκκου, *Moraxella catarrhalis* και Gram αρνητικά εντερικά βακτήρια [85, 86]. Υπάρχουν πολλά συστήματα χορήγησης οφθαλμικών φαρμάκων, τα πιο συνηθισμένα είναι οι σταγόνες και οι αλοιφές. Αυτά τα συστήματα, ωστόσο, παρουσιάζουν μικρή βιοδιαθεσιμότητα επειδή ο χρόνος παραμονής τους και κατ' επέκταση ο χρόνος παραμονής του φαρμάκου στην κοιλότητα του ματιού, είναι σύντομος λόγω της ροής των δακρύων και του συστήματος παροχέτευσης δακρύων [87]. Ως εκ τούτου, είναι απαραίτητος ο σχεδιασμός και η ανάπτυξη νέων συστημάτων χορήγησης φαρμάκων. Η χρήση μη μολυσματικών φακών επαφής θα μπορούσε να είναι ένα πολλά υποσχόμενο όπλο χαμηλού κόστους για τη θεραπεία βακτηριακών λοιμώξεων.

B. ΣΚΟΠΟΣ

Η μικροβιακή αντοχή στα αντιβιοτικά είναι ένα από τα πιο σημαντικά προβλήματα για την αντιμετώπιση μολυσματικών ασθενειών. Ένα από τα μέτρα για την καταπολέμησή της, είναι η ανάπτυξη νέων αντιβιοτικών φαρμάκων και αντιμικροβιακών υλικών.

Οι τετρακυκλίνες θεωρούνται ιδανικά αντιβιοτικά λόγω του ευρέους φάσματος δράσης που διαθέτουν, της μικρής τοξικότητάς και των ελάχιστων παρενεργειών της. Όμως η χρήση τους πλέον έχει περιοριστεί σε λοιμώξεις με επιβεβαιωμένη ευαισθησία λόγω της ανάπτυξης και εξάπλωσης μηχανισμών ανθεκτικών στην TC. Επιπλέον, η δραστηριότητά της μειώνεται συνεχώς, καθώς ένα μέρος του αντιβιοτικού κατά τη διέλευσή του από το γαστρεντερικό σωλήνα εξουδετερώνεται κάθε φορά, από τα ένζυμα του στομάχου, βακτήρια και ένζυμα του εντέρου και από τα ηπατικά κύτταρα.

Επομένως, σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η ανάπτυξη ενός νέου υδατοδιαλυτού, μη τοξικού, δραστηρότερου συμπλόκου TC, ο χαρακτηρισμός του και η ενσωμάτωσή του σε υδρογέλη pHEMA, καθώς επίσης και η βιολογική μελέτη της αντιμικροβιακής του δράσης σε βακτηριακά στελέχη μέσω προσδιορισμού της ζώνης αναστολής (IZ), της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (MIC) και της ελάχιστης βακτηριοκτόνου συγκέντρωσης (MBC) στα βακτήρια *P. aeruginosa*, *E.coli*, *S. epidermidis* και *S. aureus*. Τέλος ο έλεγχος *in vivo* τοξικότητας στο ζωντανό οργανισμό μοντέλο *Artemia Salina* και της *in vitro* τοξικότητας έναντι φυσιολογικών ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων του κερατοειδούς (HCEC).

Γ. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

3.1. Χημικό μέρος

3.1.1. Χημικά αντιδραστήρια και διαλύτες

Οι διαλύτες και τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται είναι κατάλληλα για χρήση χωρίς περαιτέρω καθαρισμό. Το αντιδραστήριο της tetracycline hydrochloride 95% αγοράστηκε από την εταιρεία Sigma-Aldrich, όπως και το diphenyl(2,4,6-trimethyl benzoyl)phosphine oxide (TPO 97%), ενώ τα carbon disulfide (CS₂), 2-Hydroxyethyl methacrylate (pHEMA), ethylene-glycole dimethacrylate (EGDMA), sodium hydroxide (NaOH), sodium chloride (NaCl) hydrochloride acid (HCl) από την MERCK. Τέλος τα potassium hydroxide (KOH), dimethyl sulfoxide (DMSO) και methanol (MeOH) αγοράστηκαν από τη Riedel-de Haën.

3.1.2. Όργανα και σκεύη

Για τη σύνθεση και τον χαρακτηρισμό χρησιμοποιούνται τα εξής σκεύη: ποτήρια ζέσεως 25, 50 ml σφαιρική φιάλη 50 ml, ευρύλαιμη κωνική φιάλη 50 ml, δοκιμαστικοί σωλήνες 15ml, τριχοειδή σωληνάκια. Η μέτρηση του σημείου τήξεως πραγματοποιείται μέσω της συσκευής STUART SCIENTIFIC SMP30, ενώ ο προσδιορισμός του μοριακού βάρους με το οσμόμετρο σημείου πήξης Osmomat 3000 basic. Στην φασματοσκοπία υπερύθρου (4000-400 cm⁻¹), η καταγραφή των φασμάτων γίνεται από το φασματοφωτόμετρο ATR-FT-IR (Cary 630 FTIR) της εταιρείας Agilent Technologies. Τα φάσματα απορρόφησης UV/Vis λαμβάνονται από το φασματοφωτόμετρο UV/Vis σειράς PC UV-1600 της εταιρείας VWR και τα φάσματα

των $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ από το όργανο Bruker AC 400 MHz FT-NMR. Επιπλέον όργανα που χρειάζονται κατά τη διάρκεια των πειραμάτων : θερμαινόμενος μαγνητικός αναδευτήρας, αναλυτικός ζυγός της εταιρείας Scatec, πιπέτες ακριβείας (1000, 100 και 10 μL), Vortex από την Sanichem.

3.1.3. Σύνθεση

Για την αντίδραση σύνθεσης του TCNa αρχικά ζυγίζονται 0.240 g (0.5 mmol) tetracycline hydrochloride 95% (TC), διαλύονται σε 10 ml ddH₂O υπό συνεχή ανάδευση. Μετά την πλήρη διαλυτοποίηση, προστίθεται 0.5 ml διαλύματος KOH 1 M και παρατηρείται η καταβύθιση κίτρινου ιζήματος, το οποίο στη συνέχεια διηθείται και ξηραίνεται. Το προϊόν σκόνης που παραλαμβάνεται, δηλαδή η μη υδροχλωριωμένη μορφή τετρακυκλίνης (0.5mmol) μεταφέρεται σε σφαιρική φιάλη των 50 ml μαζί με 1.5 mmol NaOH και 1.5mmol CS₂ σε 20 ml MeOH. Το διάλυμα αναδεύεται στους 0 °C για 3 ώρες και στη συνέχεια διηθείται σε ευρύλαιμη κωνική φιάλη των 50 ml. Με το πέρας ενός ή δύο ημερών παρατηρείται ο σχηματισμός κρυστάλλων. Οι κρύσταλλοι ξηραίνονται σε θερμοκρασία δωματίου, συλλέγονται σε erpendorf και αποθηκεύονται στην κατάψυξη.

3.1.4. Διαλυτότητα

Για την μελέτη της διαλυτότητας του συμπλόκου TCNa, κατανέμεται ισόποσα ορισμένη ποσότητα ουσίας σε 9 δοκιμαστικούς σωλήνες που περιέχουν την ίδια ποσότητα διαλύτη. Ακολουθεί έντονη ανάδευση και ήπια θέρμανση. Κατάλληλος θεωρείται ο διαλύτης που μπορεί να διαλύσει πλήρως την προς μελέτη ουσία, με αποτέλεσμα ένα διαυγές διάλυμα. Οι διαλύτες που χρησιμοποιούνται είναι οι εξής: μεθανόλη (MeOH), εξάνιο (n-hexane), τολουόλιο (tolouene), διχλωρομεθάνιο (CH₂Cl₂), χλωροφόρμιο (CHCl₃), ακετόνη (acetone),

ακετονιτρίλιο (MeCN), διμέθυλο-σουλφοξείδιο (DMSO), διμέθυλο-φορμαμίδιο (DMF), δις απεσταγμένο νερό (ddH₂O).

3.1.5. Σημείο τήξης

Για τη μέτρηση του σημείου τήξεως χρησιμοποιούνται ανοιχτά τριχοειδή σωληνάκια BRIS micro haematocrit tubes (Soda Lime Glass, Vitrex Medical A/S), τα οποία τροποποιούνται με χρήση φλόγας, για το κλείσιμο της μίας πλευράς ώστε να συγκρατηθεί το δείγμα. Τα τριχοειδή τοποθετούνται στη συσκευή STUART SCIENTIFIC SMP30, όπου παρατηρείται η τήξη των δειγμάτων με ταυτόχρονη καταγραφή αύξησης της θερμοκρασίας, προκειμένου να προσδιοριστεί η θερμοκρασία τήξης (T_m).

3.1.6. Κρυοσκοπία

Ο προσδιορισμός της σχετικής μοριακής μάζας, με τη μέθοδο της κρυοσκοπίας βασίζεται στην πειραματική μέτρηση της ταπείνωσης του σημείου πήξης (ΔT_f) του διαλύματος, με την εφαρμογή του νόμου: $\Delta T_f = K_f \times m = K_f \frac{m_{ουσίας} \times 1000}{Mr_{ουσίας} \times m_{διαλύτη}}$ [1], όπου K_f : σταθερά ταπείνωσης σημείου πήξης, m : κατά βάρος μοριακότητα του διαλύματος.

Το όργανο της κρυοσκοπίας προσδιορίζει τη συνολική οσμωτικότητα ενός υδατικού διαλύματος. Ως οσμωτικότητα ορίζεται η ποσότητα ουσίας ή ο αριθμός των οσμωτικά ενεργών σωματιδίων ανά κιλό διαλύτη (νερό). Μετριέται σε Osmol/kg ή mOsmol/Kg και είναι ανάλογη της πίεσης του σημείου πήξης, όπως φαίνεται από τον παρακάτω τύπο: $C_{osm} = \frac{\Delta T_f}{K_f}$ [2], όπου

C_{osm} η οσμωτικότητα. Από το μαθηματικό συνδυασμό των σχέσεων [1], [2] προσδιορίζεται η σχετική μοριακή μάζα.

Πειραματικά, λαμβάνεται 1μL από διάλυμα συγκέντρωσης 10mg/ml DMSO και αραιώνεται σε 49μL ddH₂O. Το διάλυμα που προκύπτει μεταφέρεται σε erpendorf και έπειτα τοποθετείται στο όργανο, Osmomat 3000 basic της Gonotec.

3.1.7. Φασματοσκοπία Υπέρυθρου Μετασχηματισμού Fourier με την τεχνική της Αποσβένουσας Ολικής Ανάκλασης (ATR-FTIR).

Η φασματοσκοπία περιλαμβάνει την αλληλεπίδραση της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας με την ύλη. Η επικρατούσα βαθμονόμηση των φασμάτων απορρόφησης υπέρυθρου γίνεται σε κυματαριθμούς (cm^{-1}) για κοινά όργανα. Η περιοχή αυτή ονομάζεται μέσο υπέρυθρο (MIR) και σε αυτή παρατηρούνται βασικές μεταβολές στη δόνηση των μορίων. Υπάρχουν δύο ακόμα περιοχές το άπω υπέρυθρο (FIR) και το εγγύς υπέρυθρο (NIR) που αντιστοιχούν σε $400-10\ cm^{-1}$ και $14000-4000\ cm^{-1}$ αντίστοιχα. Στο άπω υπέρυθρο φάσμα παρέχονται πληροφορίες για τις δονήσεις υποκαταστάτη-μετάλλου καθώς και για τις μοριακές περιστροφές, ενώ στο εγγύς υπέρυθρο για τις υπερτονικές και αρμονικές δονήσεις ή δονήσεις συνδυασμού. Τα φάσματα απορρόφησης δύναται να βαθμονομηθούν και σε μήκη κύματος εκφρασμένα σε μm. Οπότε οι περιοχές που αναφέρθηκαν παραπάνω κυμαίνονται σε ένα εύρος μηκών κύματος. Συγκεκριμένα το MIR κυμαίνεται μεταξύ 2.5 μm έως 25 μm, το FIR από 25 μm έως 300 μm και το NIR μεταξύ 0.8 μm έως 2.5 μm. Οι κυματαριθμοί είναι αντιστρόφως ανάλογοι των μηκών κύματος και συνδέονται με την παρακάτω σχέση:

$$\text{κυματαριθμός } \tilde{\nu} \text{ (} cm^{-1} \text{)} = \frac{1 \times 10^4}{\text{μήκος κύματος σε } \mu m}.$$

Οι μεταπτώσεις που είναι υπεύθυνες για τις ταινίες στο IR οφείλονται σε μεταβολή της διπολικής ροπής του μορίου, ειδικότερα σε περιοδικές κινήσεις που αφορούν την κάμψη ή την τάση των δεσμών. Όλα τα μόρια διαθέτουν συγκεκριμένο ποσό ενέργειας (κβαντισμένη ενέργεια) κατανομημένο σε όλη τη δομή τους, προκαλώντας στους δεσμούς επιμηκύνσεις και κάμψεις αλλάζοντας έτσι το μήκος τους. Παράλληλα, εξαιτίας αυτής της ενέργειας τα άτομα περιστρέφονται και πάλλονται. Επειδή ακριβώς η ενέργεια είναι κβαντισμένη, ένα μόριο έχει τη δυνατότητα να κάμπτεται, να επιμηκύνεται ή να πάλλεται σε συγκεκριμένες συχνότητες. Έτσι από τη μελέτη ενός φάσματος IR μπορεί να διαπιστωθούν οι κινήσεις ενός μορίου και κατ' επέκταση το είδος των δεσμών και επομένως των λειτουργικών ομάδων.

Στη φασματοσκοπία υπέρυθρου (IR) δε γίνεται να προσδιοριστεί με ακρίβεια η συγκέντρωση C της ουσίας, επομένως είναι αδύνατος ο υπολογισμός του συντελεστή μοριακής απορρόφησης. Για το λόγο αυτό η έκφραση της έντασης των απορροφήσεων στο υπέρυθρο είναι προσεγγιστική. Η ταξινόμησή τους στηρίζεται στην περιγραφή με τα αρχικά των αγγλικών λέξεων που σημαίνουν «ισχυρή» (strong, s), «μέτρια» (medium, m), «ασθενής» (weak, w). Ανάλογα με το εύρος που παρουσιάζουν οι ταινίες απορρόφησης, διακρίνονται σε ευρείες ή πλατιές (broad) και στενές (narrow).

Υπάρχουν δύο βασικές κατηγορίες φασματοφωτόμετρων υπέρυθρης ακτινοβολίας:

- i. Τα συμβατικά φασματοφωτόμετρα διασποράς (classical dispersive IR spectrometers).
- ii. Τα φασματοφωτόμετρα υπέρυθρου μετασχηματισμού Fourier (Fourier transform IR spectrometers).

Τα φασματοφωτόμετρα FTIR υπερτερούν σε σχέση με τα συμβατικά, λόγω της υψηλής ευαισθησίας και ταχύτητας που παρουσιάζουν. Ο μετασχηματισμός Fourier επιτρέπει τη μετατροπή των πρωταρχικών δεδομένων σε φάσματα υψηλής ποιότητας με τη βοήθεια

μιγαδικών εκθετικών συναρτήσεων μέσω λογισμικού. Η τεχνική που χρησιμοποιείται είναι αυτή της Αποσβένουσας Ολικής Ανάκλασης (Attenuated Total Reflection, ATR). Στην ATR το φως υπέρυθρου ταξιδεύει μέσω ενός κρυστάλλου, ανακλάται πλήρως εσωτερικά-τουλάχιστον μία φορά- στη διεπαφή κρυστάλλου- δείγματος και στη συνέχεια κατευθύνεται στον ανιχνευτή FTIR. Κατά την εσωτερική ανάκλαση ένα μέρος της ακτινοβολίας διέρχεται από το δείγμα, από το οποίο απορροφάται. Το μέρος αυτό της ακτινοβολίας ορίζεται ως κύμα που φθίνει και εξασθενεί στα μήκη κύματος που το δείγμα απορροφά ενέργεια. Η διαφορά μεταξύ δεικτών διάθλασης δείγματος-κρυστάλλου καθορίζει το βάθος διείσδυσης του κύματος στο δείγμα, το οποίο με τη σειρά του επηρεάζει την ένταση των ταινιών απορρόφησης καθώς εξαρτάται από το μήκος κύματος. Τα δείγματα που μπορούν να μελετηθούν είναι στερεά ή υγρά.

Για τη λήψη φασμάτων υπέρυθρου χρησιμοποιείται το φασματοφωτόμετρο Cary 670 FTIR (Agilent Technologies), στον κρύσταλλο του οποίου τοποθετείται μικρή ποσότητα δείγματος. Τα φάσματα που λαμβάνονται είναι της TC και του TCNa στους 4000-400 cm^{-1} , με την εφαρμογή του προγράμματος Microlab Expert.

3.1.8. Φασματοσκοπία Υπεριώδους-Ορατού (UV/Vis)

Η φασματοσκοπία υπέρυθρου-ορατού (UltraViolet/Visible, UV/Vis), στηρίζεται στο ότι όταν η ακτινοβολία διέρχεται από ένα διάλυμα, ένα μέρος αυτής απορροφάται από την προς μελέτη ουσία με αποτέλεσμα η εξερχόμενη ακτινοβολία να είναι χαμηλότερης έντασης. Προκαλούνται έτσι ηλεκτρονιακές μεταπτώσεις σε υψηλότερης ενέργειας μοριακά τροχιακά.

Η απορρόφηση είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της ουσίας που περιέχεται στο διάλυμα και περιγράφεται από το νόμο Lambert-Beer: $A = -\log T = \log \frac{I_0}{I} = \epsilon \times l \times c$ όπου

A : απορρόφηση, T : διαπερατότητα, I_0 : ισχύς προσπίπτουσας ακτινοβολίας, I : ισχύς εξερχόμενης ακτινοβολίας, ϵ : συντελεστής μοριακής απορροφητικότητας, c : συγκέντρωση, l : μήκος διαδρομής (πάχος κυψελίδας).

Κατά τη μέτρηση ενός δείγματος, απαιτείται προηγουμένως ο μηδενισμός του οργάνου. Είναι απαραίτητο διότι η εξερχόμενη ακτινοβολία είναι πάντα μικρότερης ισχύος από την προσπίπτουσα, όχι όμως μόνο λόγω απορρόφησης από το διάλυμα. Ένα ποσοστό «χάνεται» λόγω φαινομένων σκέδασης στο διάλυμα και ανάκλασης. Η βασική οργανολογία στη φασματοσκοπία UV/Vis αποτελείται από μία πηγή ακτινοβολίας, σταθερής ισχύος, την κυψελίδα, τον μονοχρωμάτορα, τον ανιχνευτή για τη μετατροπή του οπτικού σήματος σε ηλεκτρικό και τον καταγραφέα για τη λήψη του σήματος και την εμφάνιση του αποτελέσματος της μέτρησης. Ως πηγή ακτινοβολίας στην περιοχή υπεριώδους (160-340 nm) χρησιμοποιείται λυχνία εκκενώσεως δευτερίου, ενώ στην ορατή περιοχή (340-800 nm) λυχνία πυρακτώσεως βολφραμίου. Ο μονοχρωμάτορας ως διάταξη «φιλτράρει» την ακτινοβολία της πηγής επιτρέποντας τη διέλευση μόνο της επιθυμητής μονοχρωματικής ακτινοβολίας συγκεκριμένου μήκους κύματος. Ο θάλαμος κυψελίδας ανάλογα με τον αριθμό θέσεων που έχει, διακρίνεται σε μονής και διπλής δέσμης. Τα φασματοφωτόμετρα διπλής δέσμης δίνουν την δυνατότητα ταυτόχρονης τοποθέτησης δείγματος και τυφλού, απεικονίζοντας τη διαφορά απορρόφησης μεταξύ των δύο. Το μήκος κύματος στο οποίο εμφανίζεται μέγιστη απορρόφηση ονομάζεται μέγιστο μήκος κύματος λ_{\max} . Το λ_{\max} είναι χαρακτηριστικό για κάθε ένωση και χρησιμοποιείται για τον ποσοτικό της προσδιορισμό. Με την φασματοσκοπία UV/Vis μελετάται και η σταθερότητα των ενώσεων.

Για τη λήψη φασμάτων UV / Vis, παρασκευάζονται πρότυπα διαλύματα συγκέντρωσης 10^{-2} M, TC και TCNa. Για το μηδενισμό του οργάνου τοποθετούνται 2ml DMSO στην κυψελίδα. Στη συνέχεια το διάλυμα TC αραιώνεται σε συγκέντρωση 10^{-4} M ενώ το TCNa σε

10^{-3}M και τα δύο σε τελικό όγκο 2ml. Τα διαλύματα μετρούνται σε διάστημα 0 hrs, 24 hrs και 48hrs. Τα φάσματα λαμβάνονται από το φασματοφωτόμετρο UV/Vis σειράς PC UV 1600 της VWR και του προγράμματος M. Wave professional.

3.1.9. Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού ($^1\text{H-NMR}$)

Οι πυρήνες των στοιχείων αποτελούνται από πρωτόνια και νετρόνια τα οποία εμφανίζουν ιδιοπεριστροφή ή spin όπως τα ηλεκτρόνια. Πυρήνες με περιττό αριθμό πρωτονίων και νετρονίων δηλαδή πυρήνες που οι ιδιοπεριστροφές πρωτονίων και νετρονίων δεν είναι συζευγμένες, έχουν ολικό spin διάφορο του μηδενός. Δημιουργείται έτσι, ένα μαγνητικό δίπολο η λεγόμενη πυρηνική μαγνητική ροπή. Εάν το μαγνητικό δίπολο βρεθεί σε ένα μεγαλύτερο εξωτερικό μαγνητικό πεδίο B_0 , θα περιστραφεί και θα ευθυγραμμιστεί με το B_0 . Υπάρχουν $2I+1$ τρόποι προσανατολισμού της μαγνητικής ροπής, όπου I το spin του πυρήνα. Ο ομόρροπος προτιμάται ενεργειακά καθώς οδηγεί σε χαμηλότερη ενέργεια. Αφού προσανατολιστεί, στη συνέχεια εάν ακτινοβοληθεί ο πυρήνας, μπορεί να απορροφήσει ενέργεια ίση με τη διαφορά ΔE και να μεταπέσει στην αντιπαράλληλη κατεύθυνση. Τότε ο πυρήνας βρίσκεται σε συντονισμό, δηλαδή υφίσταται το σωστό συνδυασμό B_0 και ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας για μεταβολή του spin. Η συχνότητα της ακτινοβολίας που προκαλεί τη μετάπτωση λέγεται συχνότητα συντονισμού και περιγράφεται από τη σχέση: $\nu_0 = \frac{\gamma B_0}{2\pi}$, όπου γ ο γυρομαγνητικός λόγος, χαρακτηριστικό κάθε πυρήνα.

Για τη λήψη σήματος εφαρμόζεται ραδιοπαλμός 90° στον άξονα z με αποτέλεσμα η μαγνήτιση M_0 να αποκλίνει και σιγά σιγά να πέφτει στο επίπεδο XY , όπου τοποθετείται το πηνίο. Ο όρος μαγνήτιση αναφέρεται στον ολικό προσανατολισμό spin και είναι άνυσμα M_0 στον άξονα z . Τη στιγμή που η μαγνήτιση M_0 προβάλλεται στο επίπεδο XY λαμβάνεται το μέγιστο σήμα. Μετά τον παλμό, όταν σταματήσει η ακτινοβολία, η M_0 φθίνει χρονικά. Το

σήμα που ανιχνεύεται, δηλαδή η αποσβένουσα M_0 του πυρήνα συναρτήσει του χρόνου καλείται ελεύθερη επαγωγική απόσβεση (Free Induction Decay, FID). Στη συνέχεια το φάσμα συναρτήσει του χρόνου $f(t)$ υπόκειται σε μετασχηματισμό κατά Fourier και μετατρέπεται σε φάσμα συναρτήσει συχνότητας $f(\nu)$.

Για την ταυτοποίηση των δειγμάτων και τη μελέτη της σταθερότητας σε διάστημα 0 hrs και 48 hrs, λαμβάνονται φάσματα $^1\text{H-NMR}$ για την TC και το TCNa. Αρχικά ζυγίζονται 10 mg δείγματος και διαλύονται σε 400 μL δευτεριωμένου DMSO (DMSO-d_6) και αντίστοιχη ποσότητα σε 400 μL δευτεριωμένης MeOH (MeOH-d_4). Τα διαλύματα μεταφέρονται σε λεπτούς σωλήνες από ειδικό γυαλί οι οποίοι σφραγίζονται με καπάκια και πάραφιλμ. Τέλος τοποθετούνται στο ομογενές μαγνητικό πεδίο του οργάνου. Το όργανο που χρησιμοποιείται για τις μετρήσεις είναι το Bruker AC 400 MHz FT-NMR και το πρόγραμμα για τη λήψη των φασμάτων το Topspin 2.1.

3.1.10. XRD

Για την επίλυση της δομής (ατομικής-μοριακής) των κρυστάλλων του TCNa χρησιμοποιείται η μέθοδος XRD (X-Ray Diffraction). Δέσμη ακτινοβολίας προσπίπτει στον κρύσταλλο με αποτέλεσμα την περίθλαση ακτίνων X, των οποίων οι γωνίες και οι εντάσεις οδηγούν στην απεικόνιση της τρισδιάστατης ηλεκτρονιακής πυκνότητας του κρυστάλλου. Αποτέλεσμα της απεικόνισης του κρυστάλλου είναι ο ακριβής προσδιορισμός των ατόμων και των χημικών δεσμών μεταξύ αυτών.

3.1.11. Σύνθεση μη μολυσματικής υδρογέλης pHEMA

Για την ενσωμάτωση του συμπλόκου TCNa και της TC σε υδρογέλη pHEMA, αρχικά αναμιγνύονται 2 ml δις απεσταγμένου νερού που περιέχει 2 mM TCNa και 10 μL EGDMA με

2.7 ml HEMA. Γίνεται απαέρωση με N₂ για 15 min και έπειτα προστίθενται 6 mg TPO. Το διάλυμα αναδεύεται για 5 min στις 800 rpm. Με το πέρας των 5 min, γίνεται μεταφορά του διαλύματος στο καλούπι με υάλινη πιπέτα Pasteur και τοποθέτηση του κάτω από λυχνία υδραργύρου UV (λ_{\max} = 280 nm) 15 Watt, όπου γίνεται φωτοπολυμερισμός για 40 min. Για την απομάκρυνση των μονομερών που δεν αντέδρασαν, η υδρογέλη που προκύπτει μετά τον φωτοπολυμερισμό, εμβαπτίζεται σε ddH₂O για 15 min. Στη συνέχεια εμβαπτίζεται σε NaCl 0.9%, HCl 0.1M και ξανά σε H₂O. Κόβονται δίσκοι διαμέτρου 10 mm και ξηραίνονται στους 40 °C έως ότου δεν επέλθει αλλαγή βάρους [88].

3.2.2. Αντιμικροβιακή μελέτη

Για τη μελέτη της αντιμικροβιακής δράσης του TCNa και της TC καθώς επίσης των υδρογελών pHEMA@TCNa και pHEMA@TC πραγματοποιούνται πειράματα για την εύρεση των ζωνών αναστολής (Inhibitorion Zone IZ), της ελάχιστης βακτηριοκτόνου συγκέντρωσης (Minimum Bactericidal Concentration, MBC) και της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) και του ποσοστού επιβίωσης (περίπτωση υδρογελών). Επίσης πραγματοποιούνται πειράματα για την καταπολέμηση του βιοφίλμ, δηλαδή πειράματα προσδιορισμού της ελάχιστης συγκέντρωσης εξάλειψης βιοφίλμ (BEC) και του ποσοστού βιωσιμότητας του βιοφίλμ παρουσία των υδρογελών. Για την πραγματοποίηση των πειραμάτων χρησιμοποιούνται δύο αρνητικά κατά Gram βακτήρια *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*), *Escherichia coli* (*E. coli*) καθώς και δύο θετικά κατά Gram βακτήρια *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*).

Η διατήρηση των βακτηρίων γίνεται στους -80 °C ενώ η ανάπτυξή τους στους 37 °C. Η παρασκευή θρεπτικών υλικών πραγματοποιείται σύμφωνα με την American Type Culture Collection (ATCC) και διαφέρει για κάθε βακτήριο. Συγκεκριμένα για τους *S. aureus* και *S.*

epidermidis ζυγίζονται K_2HPO_4 (0.25% , 2.5 g/L), NaCl (0.5% 5 g/L), dextrose (0.25%, 2.5g/l), soytone (0.3%, 3 g/L), tryptone (1.7%, 17 g/L), για την *P. aeruginosa* ζυγίζονται NaCl (1%, 10 g/L), yeast extract (0.5% , 5 g/L), tryptone (1%, 10 g/L), και για την *E.coli* χρειάζονται soytone (1% 10 g/L), yeast extract (0.5%, 5 g/L) και NaCl (1%, 10 g/L). Στην περίπτωση των υγρών θρεπτικών υλικών προστίθεται ddH₂O ενώ στα στερεά θρεπτικά υλικά μέσα προστίθεται επιπλέον άγαρ (1.5%, 15 g/L).

Όλα τα απαραίτητα σκεύη για τη διεξαγωγή των πειραμάτων (θρεπτικά υλικά, τρυβλία, δοκιμαστικοί σωλήνες, υάλινα μπουκάλια, tips, βαμβακοφόροι στείλεοί, χάρτινα δισκία διαμέτρου 9 mm) αποστειρώνονται σε εργαστηριακό κλίβανο πριν από τη χρήση. Για την εξασφάλιση στείρων συνθηκών και για τον περιορισμό των πιθανών επιμολύνσεων, τα πειράματα διεξάγονται υπό την παρουσία φλόγας ή σε hood με laminar air flow. Όλα τα βιολογικά πειράματα επαναλαμβάνονται τρεις φορές για τη λήψη επαναλήψιμων αποτελεσμάτων.

3.2.2.1 Ζώνες αναστολής (IZ)

Σκοπός του συγκεκριμένου πειράματος είναι η μέτρηση της διαμέτρου της ζώνης που σχηματίζεται καθώς αναστέλλεται η ανάπτυξη του βακτηρίου λόγω προσθήκης αντιβιοτικού. Αρχικά σε δοκιμαστικό σωλήνα προστίθενται 2ml NaCl 0.9% και τοποθετείται στο UV για μηδενισμό του οργάνου. Στη συνέχεια, λαμβάνονται με στείλεό μικρή ποσότητα βακτηρίων (10^8 cfu/ml βακτήρια) του μικροβιακού παράγοντα που μελετάται, για την παρασκευή μικροβιακού εναιωρήματος. Αυτή η ποσότητα των βακτηρίων αντιστοιχεί σε απορρόφηση 0.1 στα 620 nm. Στην περίπτωση που η απορρόφηση είναι μεγαλύτερη από 0.1 το εναιώρημα θεωρείται πυκνό κι αραιώνεται με NaCl 0.9%. Στην αντίθετη περίπτωση προστίθεται επιπλέον ποσότητα βακτηρίων. Μετά τον έλεγχο της απορρόφησης, αποστειρωμένος βαμβακοφόρος

στειλός εμβαπτίζεται με περιστροφικές κινήσεις στο μικροβιακό εναιώρημα για 20 sec. , έπειτα απλώνεται σε τρυβλίο των 20 ml περιστρέφοντάς το κατά 60°, τουλάχιστον τρεις φορές. Με την ολοκλήρωση αυτού του σταδίου, χάρτινα δισκία διαμέτρου 9 mm, εμβαπτίζονται για 20 sec. σε διάλυμα συγκέντρωσης 10^{-3} M της υπό μελέτη ένωσης και σε ddH₂O που αποτελεί το control. Τα δισκία με λαβίδα τοποθετούνται στις θέσεις που έχουν σημειωθεί και αφήνονται για επώαση στους 37 °C για 20 hrs. Τέλος με χρήση χάρακα καταγράφεται η διάμετρος των ζωνών και τα τρυβλία σκανάρονται.

Η ίδια διαδικασία επαναλαμβάνεται για τις υδρογέλες με τη διαφορά πως οι ίδιες με τη χρήση λαβίδας τοποθετούνται στο στερεό θρεπτικό υλικό και αφήνονται για επώαση. Ως control χρησιμοποιείται υδρογέλη pHEMA.

3.2.2.2 Ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (MIC)

Για τη μέτρηση της αντιμικροβιακής δράσης ενός αντιβιοτικού κρίνεται απαραίτητος ο προσδιορισμός της ελάχιστης ποσότητας του για την αναστολή της ανάπτυξης ενός συγκεκριμένου μικροβίου. Η τιμή αυτής της ποσότητας ορίζεται ως ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (Minimum Inhibitory Concentration, MIC). Εξαρτάται από το μικροοργανισμό καθώς και από το ίδιο το αντιβιοτικό. Αρχικά, για τον προσδιορισμό της MIC, προετοιμάζονται δοκιμαστικοί σωλήνες καλλιέργειας. Σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα εκτός από το θρεπτικό υλικό προστίθενται αυξανόμενες συγκεντρώσεις αντιβιοτικού σε τελικό όγκο 2 ml. Χρησιμοποιούνται stock διαλύματα συγκέντρωσης 10^{-2} M, 10^{-3} M, 10^{-4} M και 10^{-5} M. Από την προσθήκη συμπλόκου TDTCNa εξαιρούνται οι δοκιμαστικοί σωλήνες του θετικού και αρνητικού control. Στη συνέχεια, σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα εκτός από αυτόν του αρνητικού control πραγματοποιείται ενοφθαλμισμός (10 µL) του υπό μελέτη μικροβιακού παράγοντα. Επωάζονται για 20 hrs στους 37 °C.

Ομοίως, προετοιμάζονται δοκιμαστικοί σωλήνες με 1990 μL θρεπτικού υλικού, υδρογέλη συγκέντρωσης $2 \times 10^{-2}\text{M}$ (pHEMA@TCNa, pHEMA@TCH₂) και 10 μL βακτηρίου. Εκτός από τα control +, control – χρησιμοποιείται ένα επιπλέον control (control pHEMA) για να εξασφαλιστεί η στειρότητα των υδρογελών καθιστώντας τες κατάλληλες για την πραγματοποίηση των πειραμάτων. Στην περίπτωση των υδρογελών ακολουθώντας την ίδια πειραματική πορεία με αυτή του προσδιορισμού της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης, προσδιορίζεται το ποσοστό επιβίωσης των βακτηρίων παρουσία των φακών.

Στα δύο αυτά πειράματα παρατηρείται η ανάπτυξη (θολερότητα) των μικροοργανισμών και μετριέται η οπτική τους απορρόφησή στα 620 nm. Στους σωλήνες όπου η συγκέντρωση του φαρμάκου είναι μικρότερης της MIC εμφανίζεται ανάπτυξη.

3.2.2.3 Ελάχιστη βακτηριοκτόνος συγκέντρωση (MBC) και ποσοστό επιβίωσης παρουσία υδρογελών.

Η ελάχιστη βακτηριοκτόνος συγκέντρωση (Minimum Bactericidal Concentration, MBC), θεωρείται η μικρότερη δυνατή συγκέντρωση ενός αντιβιοτικού που επιτρέπει την επιβίωση του 0.01% ενός πληθυσμού βακτηρίων. Για τον προσδιορισμό της MBC λαμβάνονται από τον ζωμό του πειράματος προσδιορισμού της MIC, ο οποίος έχει επωαστεί, 3 μL για τον εμβολιασμό των τρυβλίων. Τα τρυβλία περιέχουν 10 ml θρεπτικού υλικού. Μετά τον εμβολιασμό τα τρυβλία αφήνονται για επώαση για 20 hrs στους 37 °C. Τέλος λαμβάνονται τα αποτελέσματα και τα τρυβλία σκανάρονται.

Η διαδικασία επαναλαμβάνεται για τον προσδιορισμό της βακτηριοκτόνου δράσης των υδρογελών.

3.2.2.4 Ελάχιστη συγκέντρωσης εξάλειψης βιοφίλμ (BEC) και ποσοστό βιωσιμότητας παρουσία υδρογελών

Η ανάπτυξη μικροοργανισμών σε επιφάνειες οδηγεί στο σχηματισμό βιοφίλμ. Αυτές οι μικροαποικίες βακτηριακών κυττάρων κατά την προσκόλληση τους σε μία επιφάνεια, εκκρίνουν κολλώδεις πολυσακχαρίτες με αποτέλεσμα το σχηματισμό βλέννας, η οποία περικλείει το μεγαλύτερο μέρος των κυττάρων της αποικίας. Όσο εξαπλώνεται το βιοφίλμ η έκκριση πολυσακχαριτών γίνεται εντονότερη. Η μάζα που δημιουργείται, στο εσωτερικό της είναι αναερόβια και έχει την ικανότητα να παγιδεύει τα απαραίτητα για την ανάπτυξη ενός βακτηριακού πληθυσμού, θρεπτικά συστατικά. Παράλληλα στην περίπτωση που η μάζα έχει σχηματιστεί σε περιβάλλον ροής, εμποδίζει την αποκόλληση των κυττάρων. Αφότου ένα κύτταρο προσκολληθεί σε μία επιφάνεια, εκφράζονται ειδικά γονίδια για τον σχηματισμό βιοφίλμ. Έπειτα μέσω της κωδίκευσης πρωτεϊνών παράγονται διακυτταρικά σηματοδοτικά μόρια τα οποία επάγουν την έκκριση πολυσακχαριτών.

Στο εργαστήριο μελετώνται ένα θετικό κατά Gram βακτήριο, ο *S. aureus* και ένα αρνητικό κατά Gram βακτήριο, η *P. aeruginosa*, για τον προσδιορισμό της ελάχιστης συγκέντρωσης εξάλειψης βιοφίλμ του TCNa. Για τα pHEMA@TCNA και pHEMA@TCH₂ προσδιορίζεται το ποσοστό βιωσιμότητας του βιοφίλμ κατά την παρουσία τους.

Αρχικά σε δοκιμαστικούς σωλήνες με θρεπτικό υλικό γίνεται εμβολιασμός με 10 μL του μικροβιακού παράγοντα που εξετάζεται και επωάζονται για 20 hrs στους 37 °C ώστε να αρχίσει η ανάπτυξη του βιοφίλμ. Εξαιρείται το αρνητικό control (control -), στο οποίο προστίθεται μόνο θρεπτικό υλικό. Μετά την επώαση το περιεχόμενο των σωλήνων αποχύνεται και στη συνέχεια εκπλένονται με 1 ml NaCl 0.9%. Στη συνέχεια στους δοκιμαστικούς σωλήνες προστίθεται ξανά θρεπτικό υλικό και αυξανόμενες συγκεντρώσεις αντιβιοτικού, σε τελικό όγκο

2ml και τα βακτήρια επωάζονται σε κατάλληλες συνθήκες. Στο θετικό control (control +) προστίθεται μόνο θρεπτικό υλικό. Γίνεται ξανά απόχυση του περιεχομένου και έκπλυση με 2 ml ddH₂O και 1 ml MeOH, με σκοπό την απομάκρυνση των πλακτονικών κυττάρων (κυττάρων που δεν έχουν προσκολληθεί στην επιφάνεια του βιοφίλμ). Μεταφέρονται 3 ml διαλύματος crystal violet 0.1 % για την χρώση του βιοφίλμ και επωάζονται για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου. Εκπλένονται με 3 ml ddH₂O και αφήνονται να στεγνώσουν. Τέλος σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα προστίθεται 3 ml ακετικού οξέος 30%, παραμένουν στον απαγωγό για επώαση για 15 min καταγράφεται η οπτική τους απορρόφησή στα 550 nm.

Στην περίπτωση των υδρογελών δεν προστίθενται αυξανόμενες συγκεντρώσεις αντιβιοτικού αλλά υδρογέλη συγκεκριμένης συγκέντρωσης και ως επιπλέον control χρησιμοποιείται υδρογέλη pHEMA.

3.3 Μελέτη της *in vivo* τοξικότητας με τη μέθοδο γαρίδας άλμης (*Artemia salina* assay)

Η *Artemia salina* είναι είδος γαρίδας και τα ενήλικα άτομα διαθέτουν 11 ζεύγη ποδιών, 3 μάτια και μπορούν να φτάσουν έως 15 mm σε μήκος. Η διάκριση μεταξύ αρσενικών και θηλυκών στηρίζεται στην ύπαρξη επιπλέον κεραιών στα αρσενικά, απαραίτητων για το ζευγάρισμα. Οι προνύμφες είναι ιδιαίτερα ανθεκτικές με μικρό κύκλο ζωής, χαρακτηριστικά που τις καθιστούν το ιδανικό πειραματόζωο για πειράματα αξιολόγησης τοξικότητας. Επιπλέον τα αποτελέσματα της είναι συγκρίσιμα με άλλων θηλαστικών και θεωρούνται αρκετά οικονομικές καθώς τα αυγά τους επιβιώνουν για χρόνια με αποτέλεσμα η εκκόλαψη τους να γίνεται οποιαδήποτε στιγμή.

Πειραματικά, 1 gr αυγών μεταφέρεται σε διαχωριστική χοάνη για ενυδάτωση για 1h σε φυσικό μεταλλικό νερό. Παρασκευάζεται διάλυμα θαλασσινού νερού με τη διάλυση 17g θαλασσινού αλατιού σε 500 ml απεσταγμένου H₂O. Η καλλιέργεια τους πραγματοποιείται σε θερμοκρασία δωματίου με συνεχή ανάδευση παρέχοντας αέρα και υπό φωτισμό για 48 hrs. Μετά την εκκόλαψη των αυγών, με χρήση πιπέτας Pasteur λαμβάνεται μικρός αριθμός προνυμφών ο οποίος μεταφέρεται σε σκαφάκι. Στη συνέχεια περίπου 20 προνύμφες μεταφέρονται σε πηγαδάκια τρυβλίου 24 θέσεων και προστίθενται αυξανόμενες συγκεντρώσεις (0.5, 150, 300 μM) TCNa και TC. Συμπληρώνονται με NaCl 0.9% για τελικό όγκο 1 ml. Τα τρυβλία τοποθετούνται στον επωαστή. Μετά από 24 hrs παρατηρούνται με χρήση στερεοσκοπίου. Οι προνύμφες θεωρούνται νεκρές στην περίπτωση που δεν παρατηρείται κίνηση σε διάστημα 20 sec [89].

Αντί για αυξανόμενες συγκεντρώσεις αντιβιοτικού, για τον προσδιορισμό τοξικότητας των υδρογελών στα πηγαδάκια εμβαπτίζονται pHEMA@TCNa, pHEMA@TCH₂ και pHEMA που αποτελεί το control του πειράματος.

3.4 Μελέτη της *in vitro* τοξικότητα σε κύτταρα HCEC

Τα πειράματα για την μελέτη της τοξικότητα με ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα του κερατοειδούς (HCEC) πραγματοποιήθηκαν σε διαλύματα ddH₂O. Τα κύτταρα τοποθετούνται σε πηγαδάκια (100 μL ανά πηγαδάκι), σε τρυβλίο με επίπεδο πυθμένα που φέρει 96 πηγαδάκια. Τα κύτταρα επωάζονται σε κλίβανο για 24h στους 37°C με 5% CO₂. Παράλληλα το μητρικό διάλυμα του συμπλόκου παρασκευάζεται σε ddH₂O, αραιώνεται στις επιθυμητές συγκεντρώσεις (50 – 300 μM) και προστίθεται στα πηγαδάκια. Μετά την επώαση το θρεπτικό μέσο αναρροφάται και προστίθενται 50 μL διαλύματος τριχλωρικού οξέος (TCA) 10%. Τα τρυβλία αφήνονται για 30 λεπτά στους 4 °C προκειμένου να μονιμοποιηθούν και ξεπλένονται

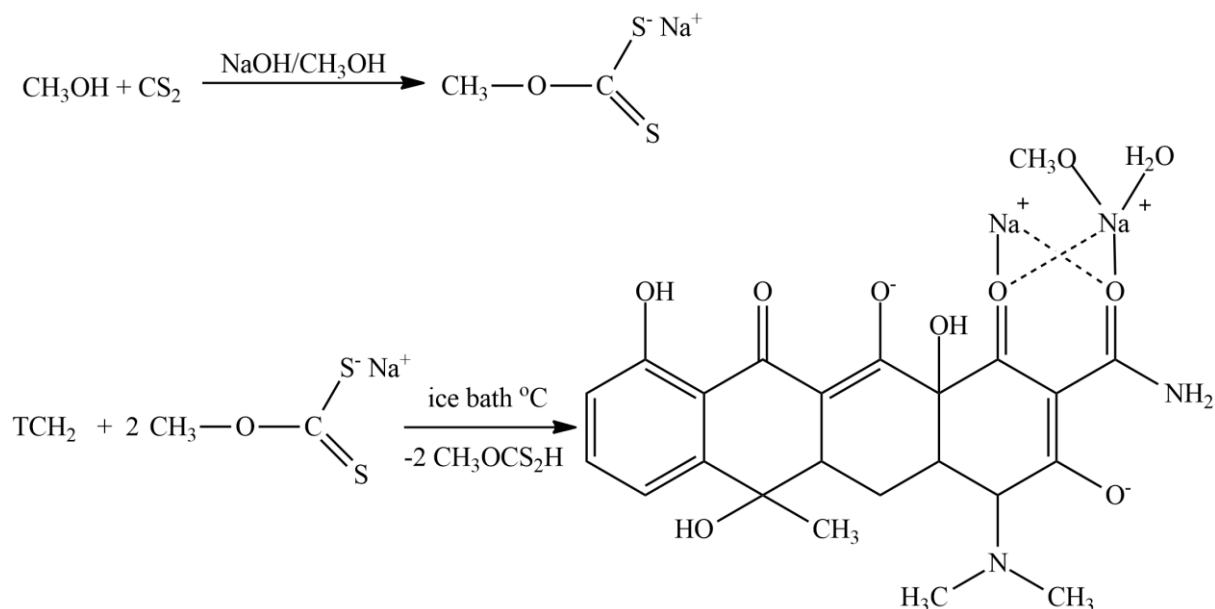
5 φορές με απιονισμένο νερό. Στη συνέχεια τοποθετούνται ανάποδα για 24 h σε θερμοκρασία δωματίου για να στεγνώσουν. Αφού στεγνώσουν προστίθενται 70 μL σουλφοροδαμίνης B (SRB) 0.4 (w/v) διαλυμένη σε διάλυμα 1% οξικού οξέος. Γίνεται επώαση των τρυβλίων σε θερμοκρασία δωματίου για μισή ώρα και αμέσως μετά η χρωστική αναρροφάται και πραγματοποιείται έκπλυση 5 φορές με διάλυμα οξικού οξέος 1%. Τέλος, πραγματοποιείται διαλυτοποίηση της χρωστικής με 200 μL unbuffered Tris-Base (10mM) και μετριέται η απορρόφηση στο όργανο Microplate photometer HiPo MPP-96 (Biosan) σε μήκος κύματος $\lambda = 560 \text{ nm}$, προκειμένου να υπολογιστεί το ποσοστό των επιζώντων κυττάρων προς τα κύτταρα που δε φέρουν ουσία (control). Η έκφραση των αποτελεσμάτων πραγματοποιείται με τις τιμές IC_{50} (συγκέντρωση που απαιτείται για την αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης κατά 50% , συγκριτικά με το control).

Δ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

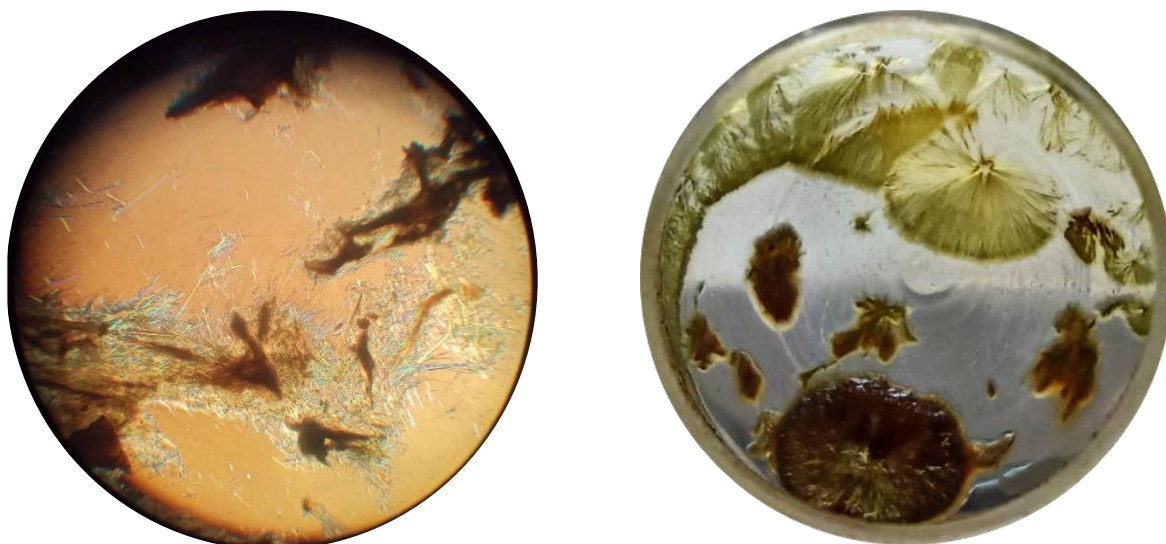
4.1. Χημικό μέρος

4.1.2. Σύνθεση TCNa

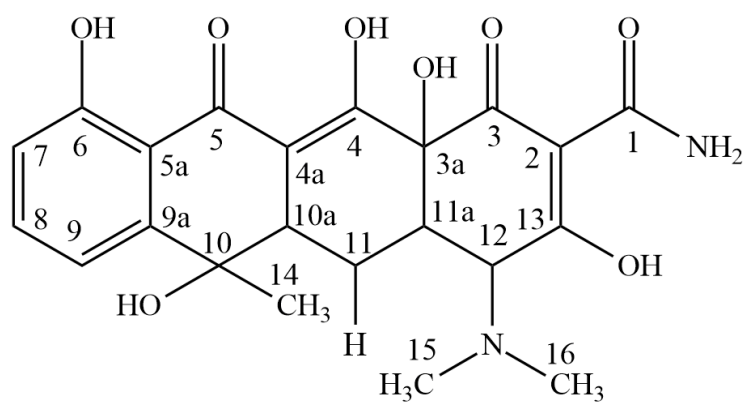
Το TCNa λαμβάνεται από την αντίδραση της μη υδροχλωριωμένης τετρακυκλίνης με υδροξείδιο του νατρίου (NaOH) και διθειάνθρακα (CS₂) σε αναλογία 1:3:3 σε διάλυμα MeOH υπό συνεχή ανάδευση σε παγόλουτρο για 3hrs. Το κίτρινο ίζημα κρυσταλλώθηκε με αργή εξάτμιση του διαλύματος MeOH. Το TCNa είναι σταθερό όταν αποθηκεύεται σε συνθήκες περιβάλλοντος στο σκοτάδι.



Σχήμα 4.1.1: Συνθετική πορεία TCNa.



Εικόνα 4.1.2: Κρύσταλλοι TCNa.



Σχήμα 4.1.3: Δομή τετρακυκλίνης.

4.1.3. Διαλυτότητα

Για την διεξαγωγή των βιολογικών πειραμάτων απαιτείται μελέτη της διαλυτότητας των κρυστάλλων ώστε να επιλεγεί ο καταλληλότερος διαλύτης. Στον Πίνακα 4.1 φαίνεται πως οι κρύσταλλοι διαλυτοποιούνται πλήρως σε ddH₂O και DMSO, μερικώς σε MeCN, MeOH και Acetone.

Πίνακας 4.1: Διαλυτότητα TCNa. Πλήρως διαλυτό ++ Μερικώς διαλυτό + Μη διαλυτό -

| Διαλύτες | TDTCNa |
|---------------------------------|--------|
| ddH ₂ O | ++ |
| DMSO | ++ |
| MeCN | + |
| MeOH | + |
| Acetone | + |
| CHCl ₃ | - |
| CH ₂ Cl ₂ | - |
| Toluene | - |
| n-hexane | - |

4.1.4. Σημείο τήξης

Πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός των σημείων τήξης των TCNa, TC υπό αυξανόμενη θερμοκρασία. Οι μετρήσεις δεν υποβλήθηκαν σε κάποια διόρθωση. Κατά την αύξηση της θερμοκρασίας για το TCNa παρατηρείται αλλαγή χρώματος από κίτρινο σε καφέ, στους 100 °C αλλά όχι τήξη του μέχρι τους 250 °C. Οι διαφορετικές θερμοκρασίες τήξης T_m (Πίνακας 3) υποδηλώνουν τον σχηματισμό του του TCNa.

Πίνακας 4.2 : Σημείο τήξης TCNa και υποκαταστάτη TC.

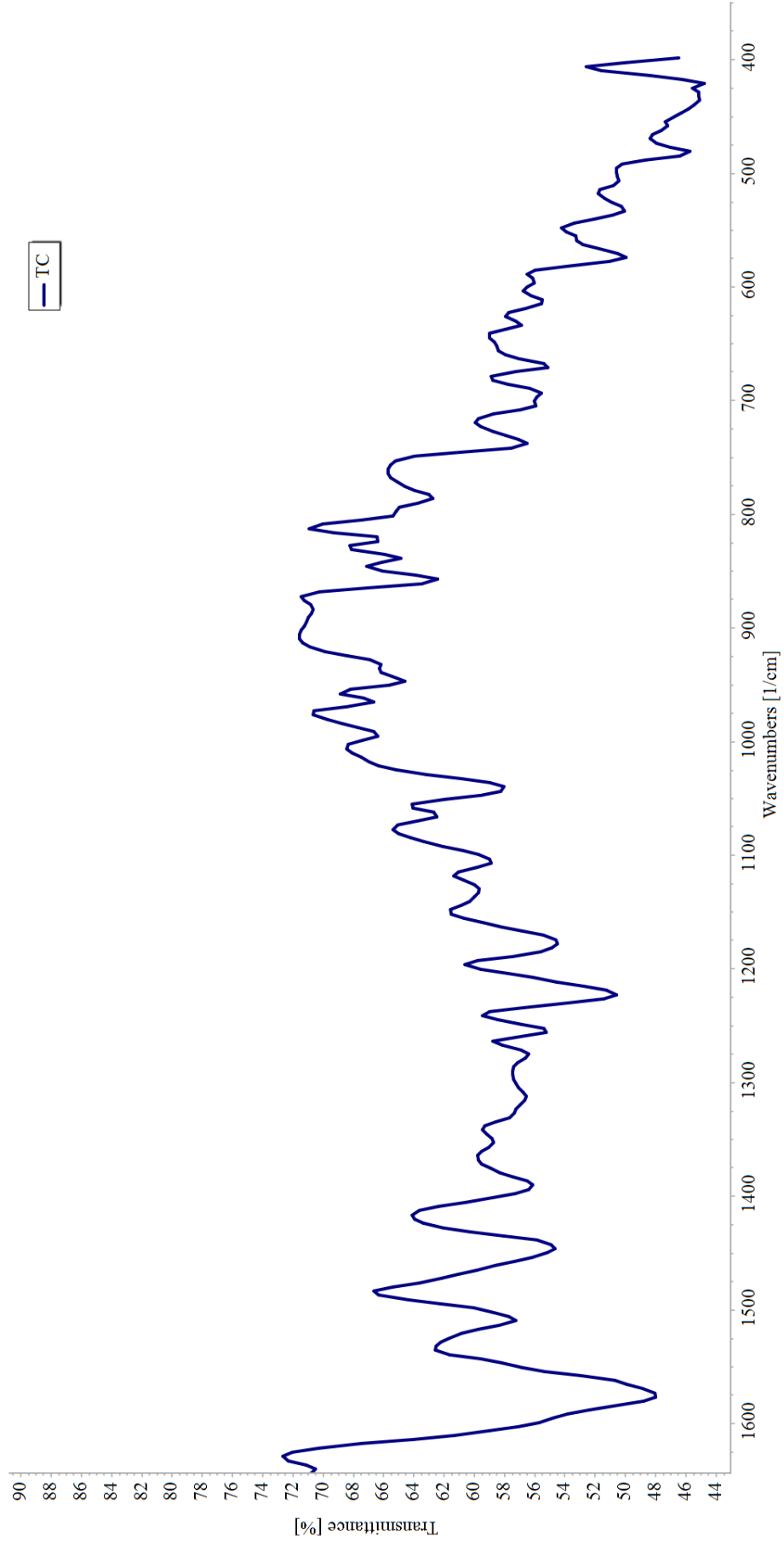
| Compound | T_m |
|----------|------------|
| TDTCNa | >250 °C |
| TC | 171-174 °C |

4.1.5. Κρυοσκοπία

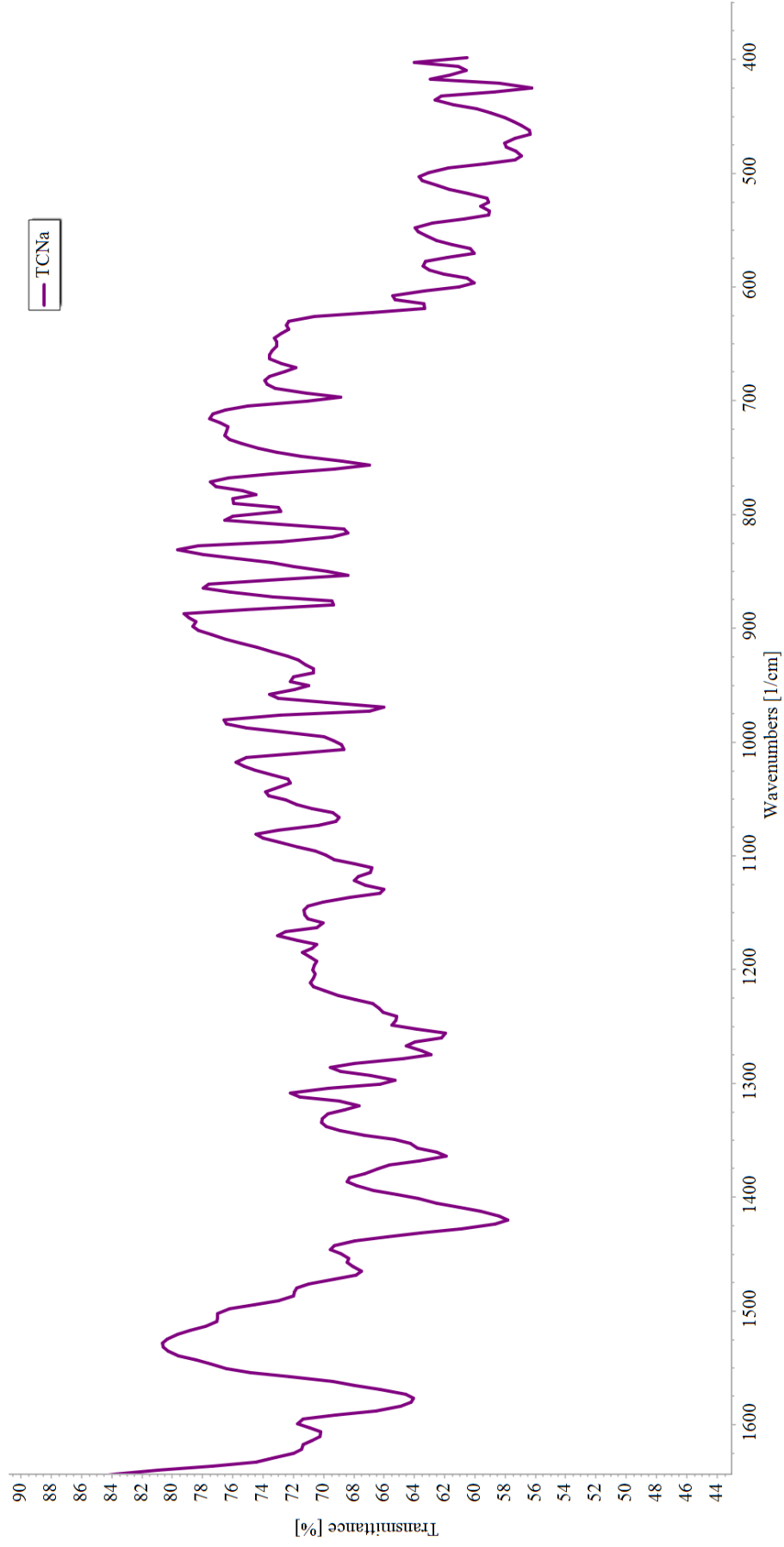
Το MW του TCNa προσδιορίστηκε με τη μέθοδο της κρυοσκοπίας σε διάλυμα DMSO/ddH₂O αναλογίας 1:49 με τη χρήση οσμόμετρου σημείου πήξης. Βρέθηκε πως το MW αντιστοιχεί σε 568.4 g/mol με το θεωρητικό να υπολογίζεται 556.35 g/mol. Το MW βάρους της μη υδροχλωριωμένης TC ισούται με 443.44 g/mol και του νατρίου με 22.98 g/mol.

4.1.6. Φασματοσκοπία ATR-FTIR.

Οι δονήσεις των δεσμών $\nu_{(\text{H-Caromatic})}$ και $\nu_{(\text{H-Caliphatic})}$ στο φάσμα FTIR των TCH₂ και TCNa παρατηρούνται στα 3050 και 2958 cm⁻¹, αντίστοιχα, [90] (Εικόνες 4.2, 4.3). Η δόνηση στα 1640 cm⁻¹ στο φάσμα FTIR της τετρακυκλίνης αποδίδεται στο $\nu_{(\text{C}=\text{O})}$ (Σχήμα 1) [90]. Αυτή η ζώνη μετατοπίζεται στα 1608 cm⁻¹ στο φάσμα του TCNa. Οι δονητικές ζώνες στα 1443 και στα 1389 cm⁻¹ στο φάσμα IR της TCH₂ αποδίδονται στις δονήσεις $\nu_{(\text{O}=\text{C}(4), \text{O}-\text{C}(5))}$ και $\nu_{(\text{H}-\text{OC}(3a))}$ (Σχήμα 4.2) [90]. Αυτές οι δονήσεις παρατηρούνται στα 1420 και 1369 cm⁻¹ στο φάσμα του TCNa που συνεπάγεται τον συντονισμό του TCH₂ προς το Na μέσω του ατόμου δότη καρβονυλίου O(C5), O(C4) και O(C3a). Οι δονήσεις στα 1004, 423 και 406 cm⁻¹ αντιστοιχούν στη δόνηση $\nu_{(\text{Na}-\text{O})}$ [91].

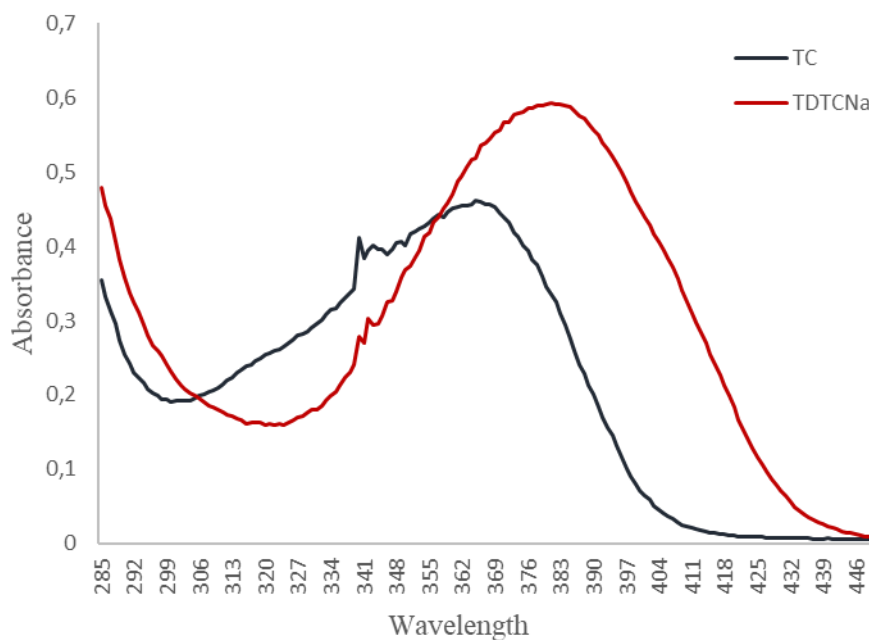


Εικόνα 4.2.1: Φάσμα ATR-FTIR της τετροκκλίνης (TC).



Εικόνα 4.2.2: Φάσμα ATR-FTIR του συμπλόκου TCNa.

4.1.7. Φασματοσκοπία UV/Vis



Εικόνα 4.3 : Φάσμα UV/Vis των TCNa, TC.

Στην Εικόνα 4.3 παρουσιάζονται τα φάσματα υπεριώδους-ορατού σε διάλυμα DMSO του TCNa (10^{-3}M) και της TCH₂ (10^{-4}M). Από τα φάσματα των δύο ενώσεων βρέθηκαν τα λ_{max} και υπολογίστηκαν οι συντελεστές μοριακής απορροφητικότητας (ϵ) από το νόμο Lambert Beer:

$A = \epsilon \times l \times c$, όπου A : απορρόφηση, ϵ : συντελεστής μοριακής απορροφητικότητας, c: συγκέντρωση, l: μήκος διαδρομής (πάχος κυψελίδας).

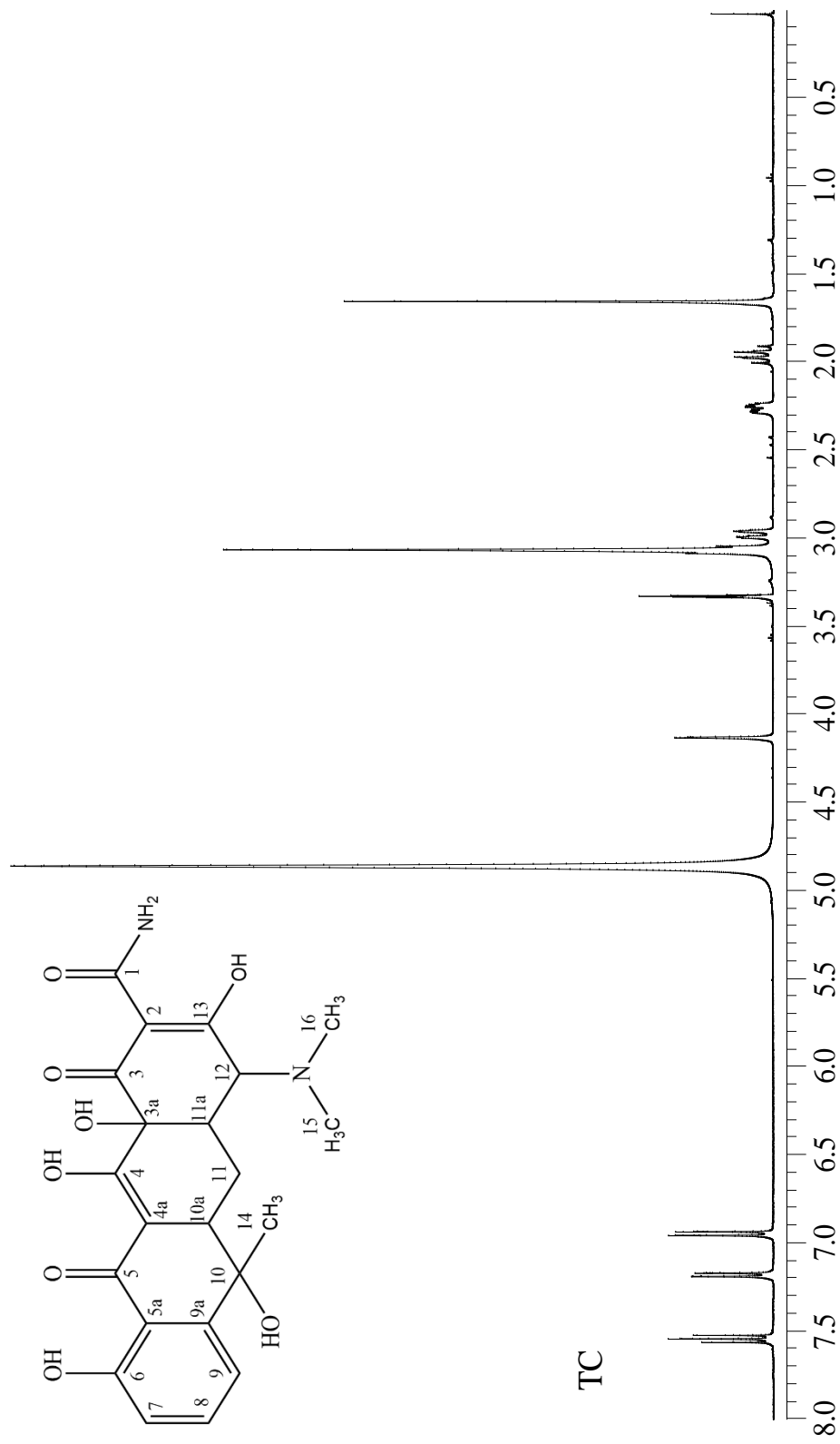
Στο φάσμα της TCH₂ παρατηρείται μέγιστη απορρόφηση στο $\lambda_{\text{max}} = 365 \text{ nm}$ ($\epsilon = 4607 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$). Η ταινία απορρόφησης αποδίδεται σε μεταβάσεις $\pi^* \leftarrow \pi$. Στο φάσμα του TCNa η ταινία απορρόφησης είναι εμφανώς μετατοπισμένη, με μέγιστη απορρόφηση σε $\lambda_{\text{max}} = 381 \text{ nm}$ ($\epsilon = 592.7 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$). Η διαφορές που εντοπίζονται στα ϵ και στις μετατοπίσεις των λ_{max} αποτελούν ενδείξεις για την ένταξη του υποκαταστάτη στο μέταλλο.

Πίνακας 4.3: Συντελεστές μοριακής απορροφητικότητας των ενώσεων TCNa, TC.

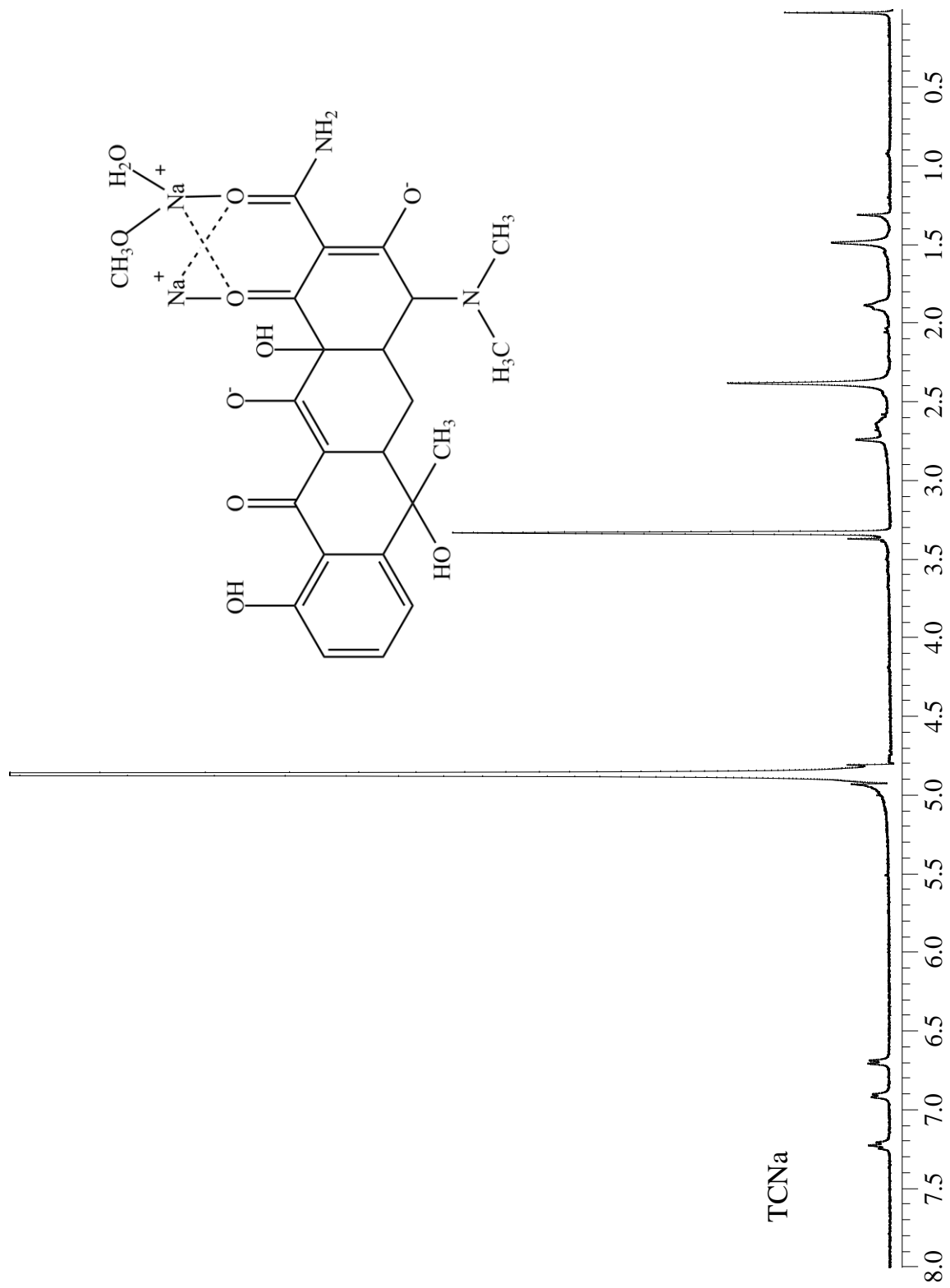
| Compound | λ_{\max} (nm) | Absorbance | Concentration (M) | l (cm) | ϵ ($\text{cm}^{-1} \text{M}^{-1}$) |
|----------|-----------------------|------------|-------------------|--------|---|
| TC | 365 | 0.4607 | 10^{-4} | 1 | 4607 |
| TCNa | 381 | 0.5927 | 10^{-3} | 1 | 592.7 |

4.1.9. Φασματοσκοπία $^1\text{H-NMR}$

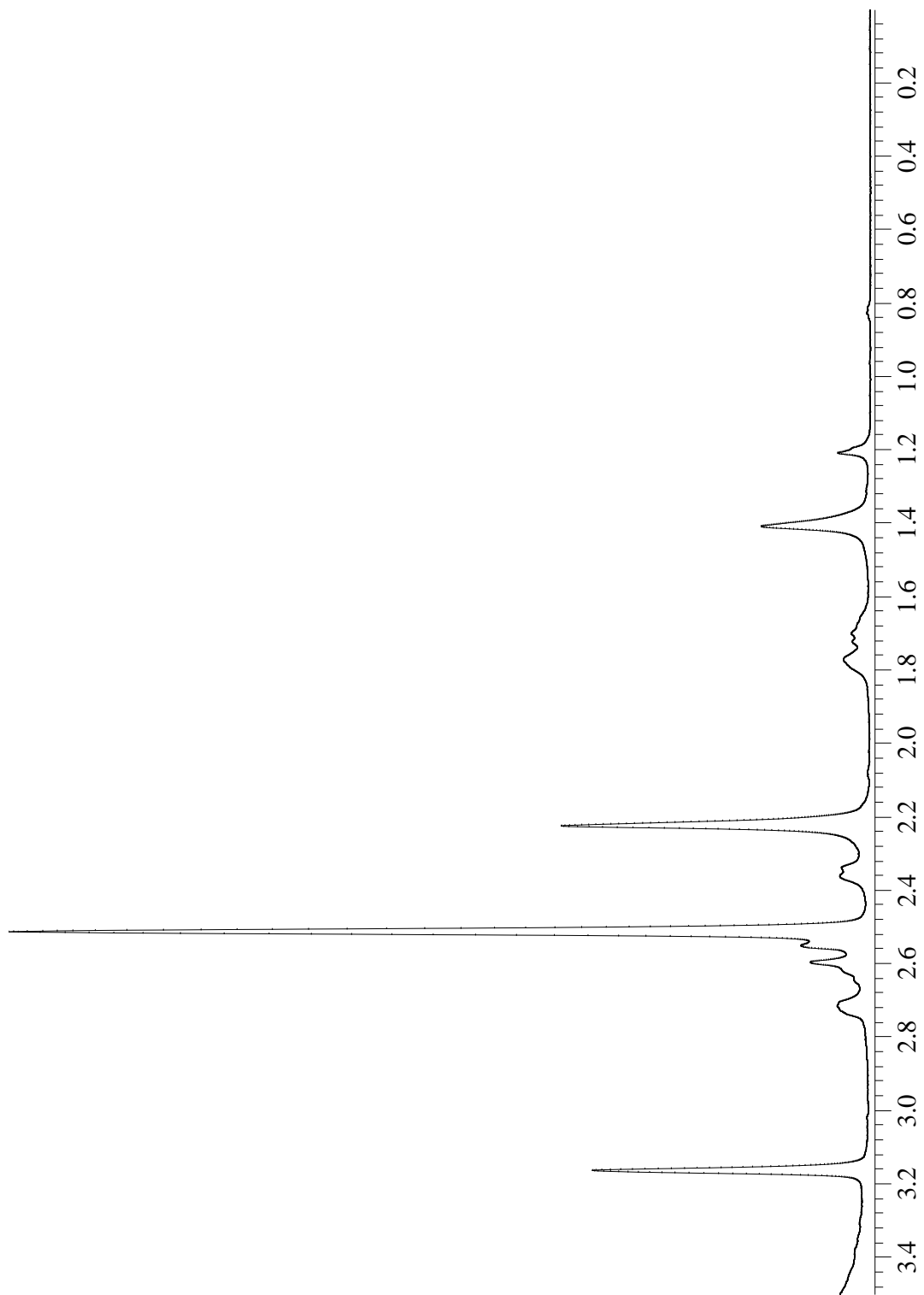
Τα φάσματα $^1\text{H-NMR}$ της TC και του συμπλόκου TCNa σε MeOH-d_4 απεικονίζονται στις Εικόνες 4.4-4.5. Επιπλέον, στην Εικόνα 4.6 φαίνεται το φάσμα $^1\text{H-NMR}$ του συμπλόκου TCNa σε DMSO-d_6 . Τα σήματα συντονισμού στα 7.56-7.52 ppm στο φάσμα της TC αποδίδονται στο $\text{H}[\text{C}(8)\text{αρωτικό}]$, στα 7.19-7.17 ppm αποδίδονται στο $\text{H}[\text{C}(9)\text{αρωματικό}]$ και το σήμα στα 6.96-6.94 ppm στο $\text{H}[\text{C}(7)\text{αρωματικό}]$ (Σχήμα 4.2) [92]. Κατά τη σύνδεση της TC με το ιόν Na στο TCNa, αυτά τα σήματα μετατοπίζονται στα 7.24-7.20 ppm ($\text{H}[\text{C}(8)\text{αρωματικό}]$), 6.92-6.90 ppm ($\text{H}[\text{C}(9)\text{αρωματικό}]$), and 6.70-6.69 ppm ($\text{H}[\text{C}(7)\text{αρωματικό}]$), αντίστοιχα. Το ευρύ σήμα στα 4.13 ppm αποδίδεται στο $\text{H}[\text{O}-\text{C}(4)]$ [92], πρωτόνιο που απουσιάζει από το φάσμα του TCNa, αποδεικνύοντας την ένταξη του Na. Τα σήματα στα 3.09-2.96 ppm στο φάσμα της TC αποδίδονται στα πρωτόνια $\text{H}[\text{C}(5a)]$ και $\text{H}[\text{C}(4a)]$ [92] και μετατοπίζονται στα 2.75-2.60 ppm στην περίπτωση του TCNa. Το σήμα στα 2.43 ppm στο φάσμα της TC αποδίδονται στα μεθυλικά πρωτόνια των $\text{H}[\text{H3C}(15)]$ και $\text{H}[\text{H3C}(16)]$ [92] και στην περίπτωση του TCNa είναι μετατοπισμένα στα 2.38 ppm. Το σήμα στα 2.00-1.90 ppm αποδίδεται στο πρωτόνιο $\text{H}[\text{C}(11)]$ στο φάσμα της TC [92] και μετατοπίζεται στα 1.90-1.86 ppm στο φάσμα του TCNa. Το σήμα στα 1.65 ppm στην TC αποδίδεται στα μεθυλικά πρωτόνια του $\text{H}[\text{H3C}(14)]$ [92] και μετατοπίζονται στα 1.49 ppm στην περίπτωση του TCNa. Προκειμένου να επιβεβαιωθεί η ένταξη του Na, το φάσμα του TCNa λήφθηκε σε DMSO-d_6 , επομένως το σήμα στα 3.16 ppm αποδίδεται στα μεθυλικά πρωτόνια του MeONa .



Εικόνα 4.4 : Φάσμα 1H-NMR του TCNa σε MeOH-d₄



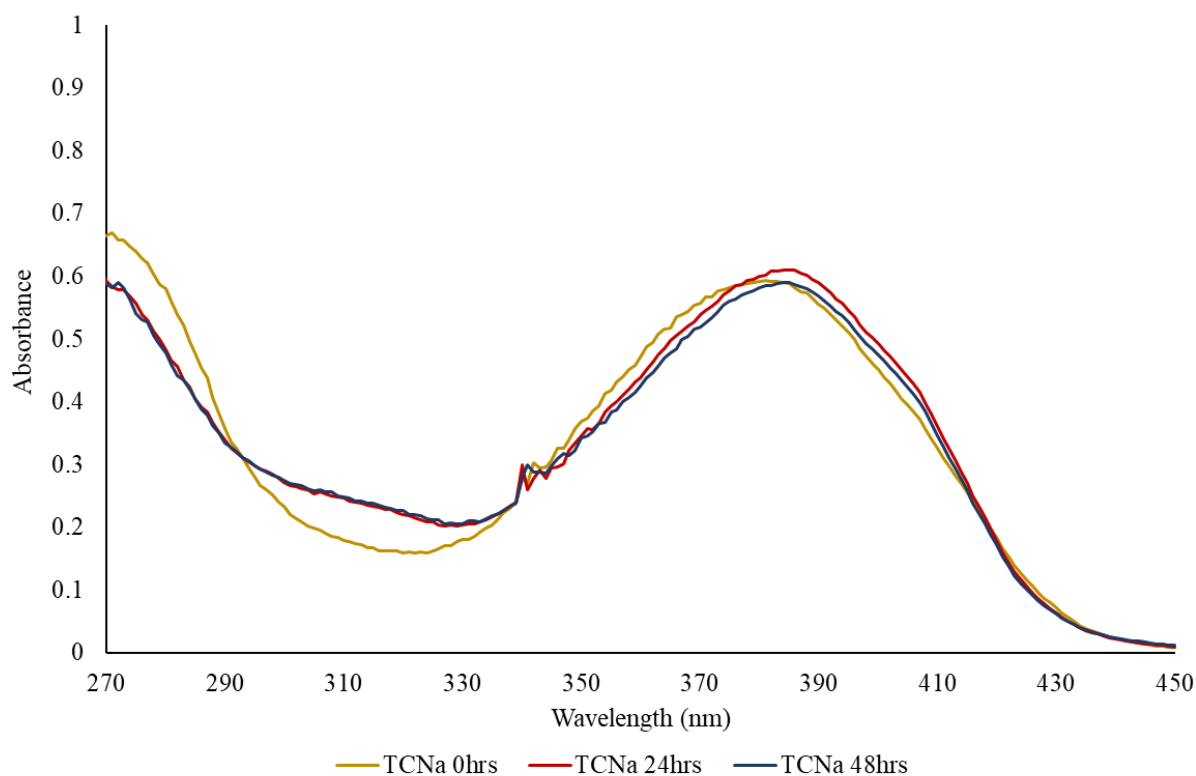
Εικόνα 4.5 : Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ του TCNa σε MeOH-d_4



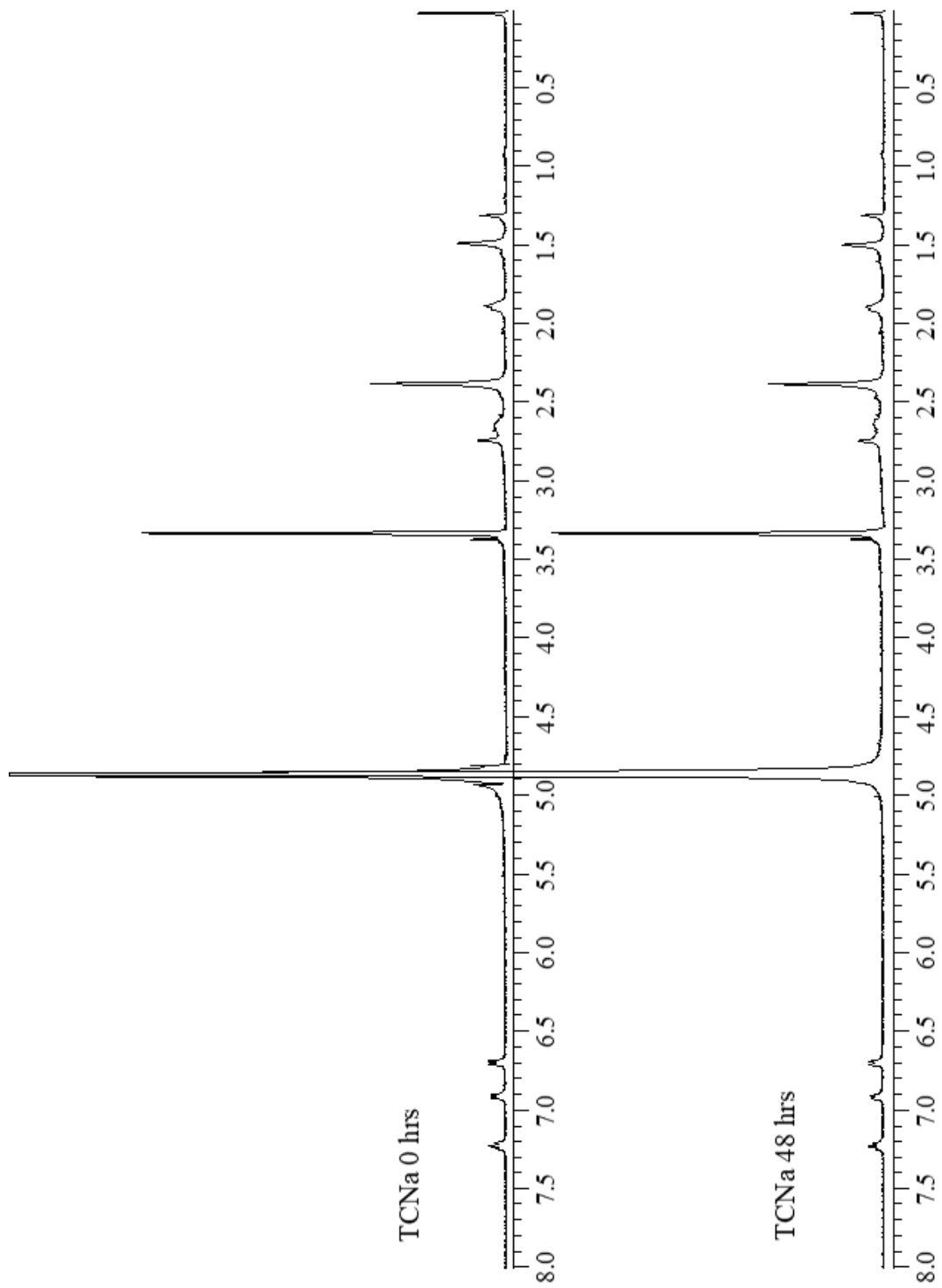
Εικόνα 4.6: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ του TCNa σε $\text{DMSO-}d_4$.

4.1.10. Σταθερότητα μέσω UV/Vis και $^1\text{H-NMR}$

Η σταθερότητα του TCNa εξετάζεται με φασματοσκοπία UV/Vis και $^1\text{H-NMR}$ σε διάλυμα DMSO και δευτεριωμένη μεθανόλη (Methanol-d₄) αντίστοιχα. Μετά τη λήψη φασμάτων σε διάστημα 0 και 48 hrs, στο φάσμα UV-Vis δεν παρατηρείται σημαντική μεταβολή απορρόφησης στο $\lambda_{\text{max}}=381$ nm, οπότε το TCNa παραμένει σταθερό (Εικόνα 4.7). Η σταθερότητα του συμπλόκου επιβεβαιώνεται από τα φάσματα $^1\text{H-NMR}$ που καταγράφηκαν το ίδιο χρονικό διάστημα και στα οποία δεν παρατηρούνται μεταβολές στις μετατοπίσεις (δ , ppm) καθώς και στα σήματα συντονισμού πρωτονίων (Εικόνα 4.8).



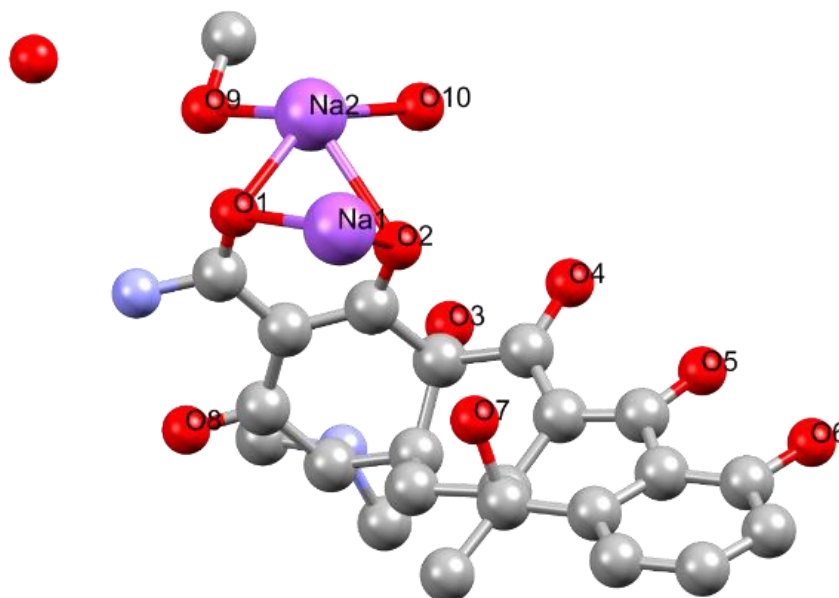
Εικόνα 4.7: Φάσμα UV-Vis του TCNa στις 0, 24 και 48 ώρες.



Εικόνα 3.8: Φάσμα ¹H-NMR του TCNa σε MeOH-d₄ στις 0 και 48 ώρες.

4.1.11. XRD

Για τον προσδιορισμό της δομής του $\{[TC]^{2-}[Na^+(MeOH)(H_2O)] [Na^+]\cdot(H_2O)\}$ (Εικόνα 4.9) χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της περίθλασης ακτίνων Χ. Στον Πίνακα 4.4 αναγράφονται τα κρυσταλλογραφικά δεδομένα του πειράματος. Όπως φαίνεται από την κρυσταλλική δομή



Εικόνα 4.9: Κρυσταλλική δομή του TCNa.

του TCNa, τα Na1 και Na2 εντάσσονται στα οξυγόνα O9, O10 και O1, O2. Στην σφαίρα ένταξης υπάρχει ένα μόριο H₂O και ένα MeOH. Επειδή τα O1 και O2 είναι ουδέτερα και τα νάτρια έχουν θετικό φορτίο, τα O4 και O8 ιονίζονται αποκτώντας αρνητικό φορτίο.

Πίνακας 4.4: Κρυσταλλογραφικά δεδομένα

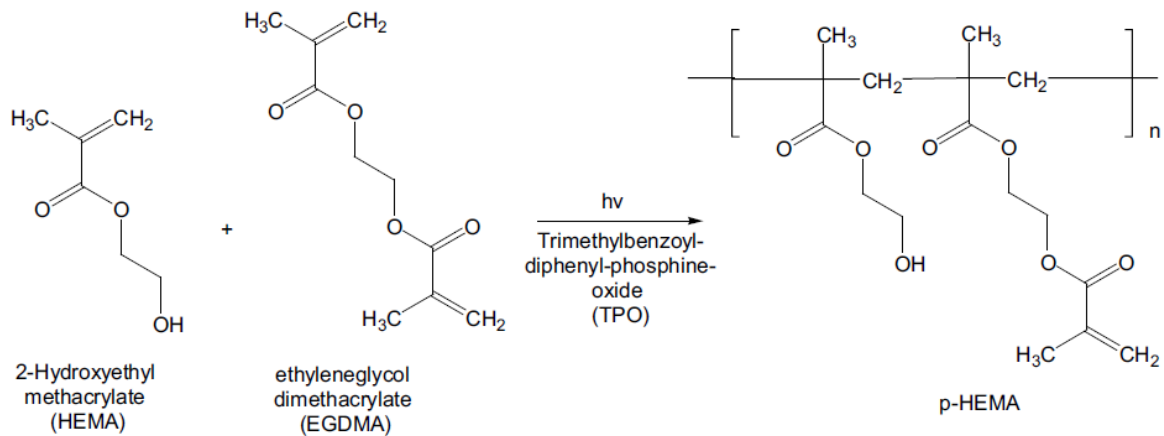
| | |
|---------------|--|
| Formula | C ₂₃ H ₃₀ N ₂ Na ₂ O ₁₁ |
| Space Group | P 2 ₁ |
| Cell Lengths | a 13.701(7) b 6.178(3) c 14.782(8) |
| Cell Angles | a 90 b 111.527(12) g 90 |
| Cell Volume | 1163.94 |
| Z, Z' | Z : 2 Z' : 1 |
| R- Factor (%) | 3.79 |

Πίνακας 4.6: Επιλεγμένα μήκη δεσμών [\AA] και γωνίες [$^\circ$] του συμπλόκου TCNa.

| Επιλεγμένα μήκη δεσμών [\AA] | Επιλεγμένες γωνίες [$^\circ$] |
|---|---------------------------------|
| Na1-O1= 2.444(3) | O1-Na1-O2= 65.03(7) |
| Na1-O2= 2.462(3) | O1-Na2-O2= 66.58(7) |
| Na2-O1= 2.256(2) | Na2-O9= 93.29(8) |
| Na2-O2= 2.530(3) | O1-Na2-O10= 140.71(8) |
| Na2-O9= 2.464(3) | O2-Na2-O9= 125.98(8) |
| Na2-O10= 2.306(3) | O2-Na2-O10= 80.33(7) |
| O9-C23= 1.428(4) | O9-Na2-O10= 89.35(8) |
| O1-C1= 1.236(3) | |
| O2-C7= 1.235(3) | |
| O3-C6= 1.401(3) | |
| O4-C8= 1.285(3) | |
| O5-C12= 1.259(3) | |
| O6-C16= 1.340(3) | |
| O7-C15= 1.449(3) | |

4.1.12 Σύνθεση μη μολυσματικής υδρογέλης

Για την παραγωγή μη μολυσματικών μαλακών φακών επαφής σε υδρογέλη pHEMA ενσωματώθηκε το σύμπλοκο TCNa και στη συνέχεια μελετήθηκε η αντιβακτηριακή του δράση και τοξικότητα.



Εικόνα 4.10: Αντίδραση σχηματισμού pHEMA.



Εικόνα 4.11: pHEMA@TCNa

4.2 Αντιμικροβιακή μελέτη

4.2.1 Προσδιορισμός ζώνης αναστολής (IZ)

Προκειμένου να επιβεβαιωθεί η αντιβακτηριακή δράση του συμπλόκου, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος διάχυσης σε δισκίο με άγαρ έναντι των *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. epidermidis* και *S. aureus*. Από τα αποτελέσματα συμπεραίνεται πως το TCNa εμφανίζει υψηλότερες IZ από αυτές του TCH₂. Το εύρος των IZs του TCNa κυμαίνεται μεταξύ 12.6 και 35.0 για τα Gram + και από 15.5 έως 26 για τα Gram-. Για την TCH₂ το εύρος των IZs κυμαίνεται από 11.5 έως 33.0 mm για τα Gram + και από 13.8 έως 25 για τα Gram - (Πίνακας 4.7, Εικόνα 4.12). Τα βακτήρια ανάλογα με τη διάμετρο της αναπτυγμένης ζώνης αναστολής ταξινομούνται σε τρεις κατηγορίες [93]. Συγκεκριμένα, χαρακτηρίζονται ως ευαίσθητα όταν $IZ \geq 17$ mm, ως ενδιάμεσα όταν $13 \text{ mm} \leq IZ \leq 16 \text{ mm}$ και ως ανθεκτικά όταν το IZ είναι ≤ 12 mm [93]. Επομένως, το *E. coli* και ο *S. aureus* ταξινομούνται ως ευαίσθητα σε TCNa και TCH₂, η *P. aeruginosa* ως ενδιάμεσο ενώ ο *S. epidermidis* ως ανθεκτικό τόσο για το TCNa όσο και για την TCH₂.

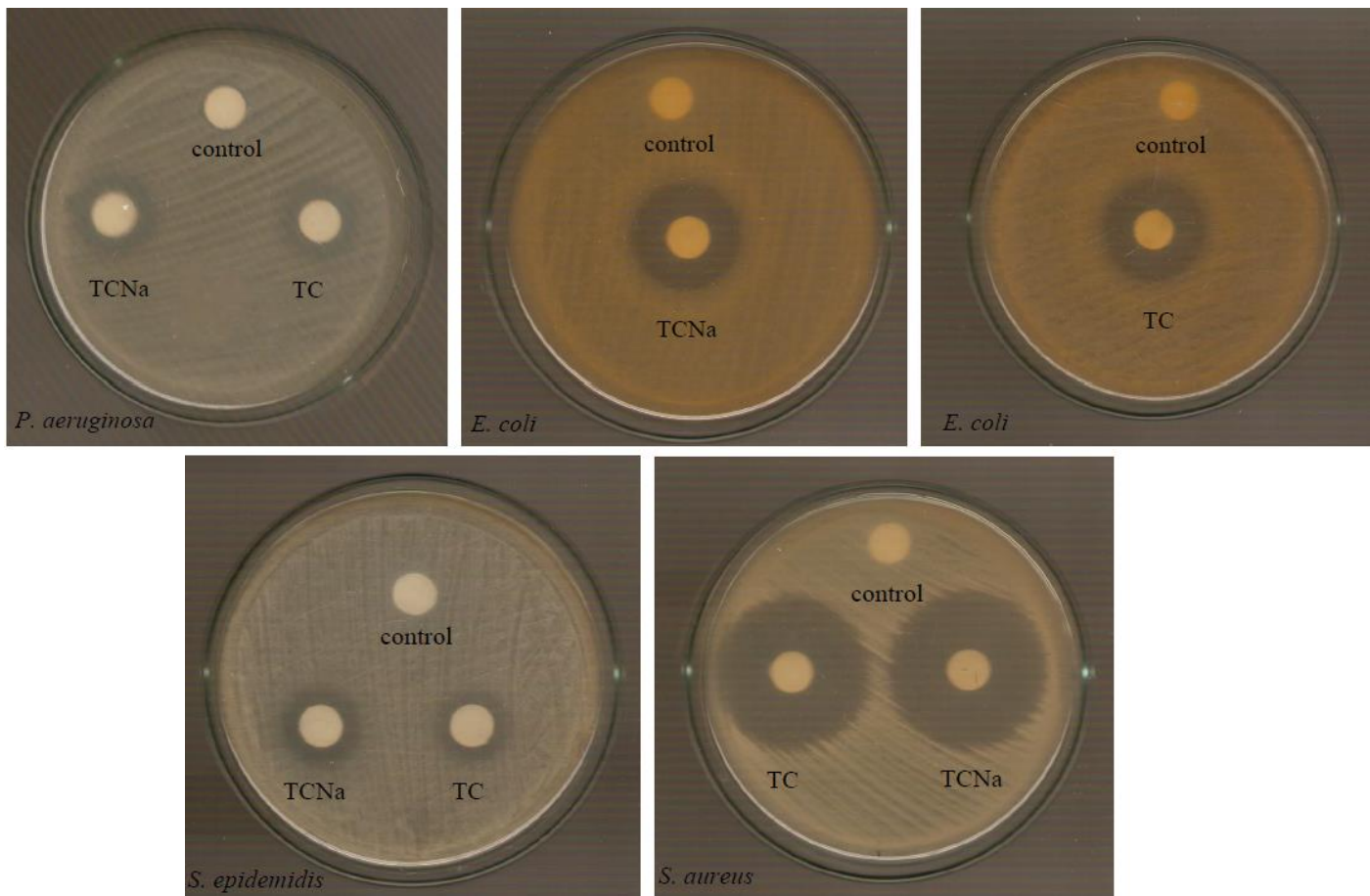
Στην περίπτωση των υδρογελών, το εύρος του IZs των pHEMA@TCNa κυμαίνεται από 12-23.75 mm για τα Gram – και από 9-31.75 για τα Gram + . Το εύρος του pHEMA@TCH₂ κυμαίνεται από 11-22.67 mm για τα Gram – και από 9-31.33 για τα Gram + . Το *E. coli* και ο *S. aureus* ταξινομούνται ως ευαίσθητα σε TCNa και TCH₂, ενώ η *P. aeruginosa* και ο *S. epidermidis* ως ανθεκτικά τόσο για το pHEMA@TCNa όσο και για το pHEMA@TCH₂ (Πίνακας 4.8, Εικόνα 4.13)

Πίνακας 4.7: Ζώνες αναστολής (IZ) για το TCNa και την TCH₂.

| Ένωση | Gram negative | | Gram positive | | Ref |
|------------------------|----------------------|---------------|-----------------------|------------------|-----|
| | <i>P. aeruginosa</i> | <i>E.coli</i> | <i>S. epidermidis</i> | <i>S. aureus</i> | |
| IZ (mm) | | | | | |
| TCNa | 15.5±0.9 | 26.0±3.4 | 12.6±1.2 | 35.0±2.4 | * |
| TCH₂ | 13.8±2.0 | 25.0±4.5 | 11.5±0.6 | 33.0±1.1 | * |

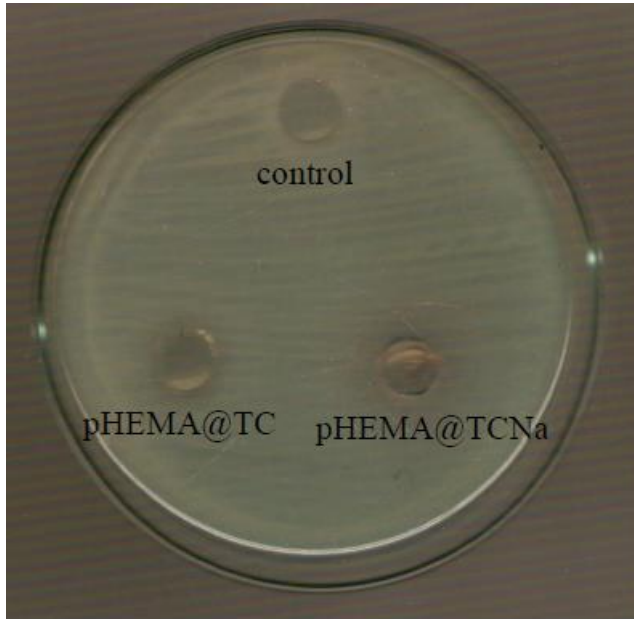
Πίνακας 4.8: Ζώνες αναστολής (IZ) για το pHEMA@TCNa και το pHEMA@TCH₂.

| Ένωση | Gram negative | | Gram positive | | Ref |
|------------------------------|----------------------|---------------|-----------------------|------------------|-----|
| | <i>P. aeruginosa</i> | <i>E.coli</i> | <i>S. epidermidis</i> | <i>S. aureus</i> | |
| IZ (mm) | | | | | |
| pHEMA@TCNa | 12 ± 1.39 | 23.75 ± 1.23 | 9 | 31.75± 0.49 | * |
| pHEMA@TCH₂ | 11.00 ± 0.00 | 22.67± 1.73 | 9 | 31.33± 1.31 | * |



Εικόνα 4.12: Ζώνες αναστολής (IZ) για το TCNa και την TCH₂.

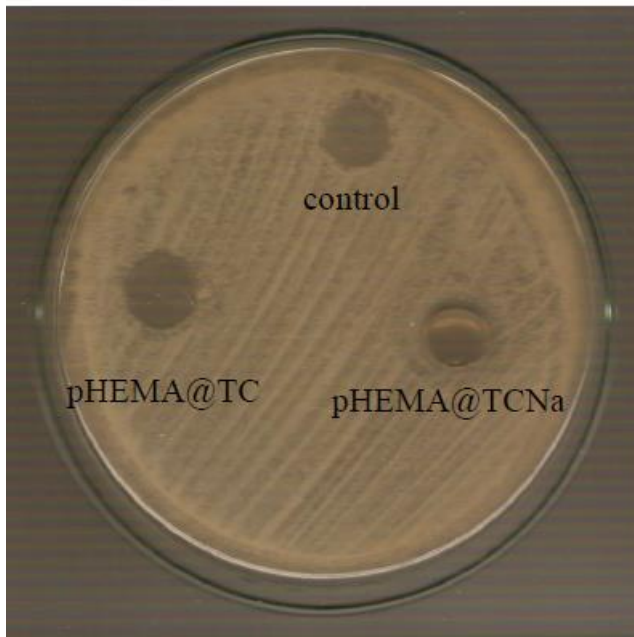
P. aeruginosa



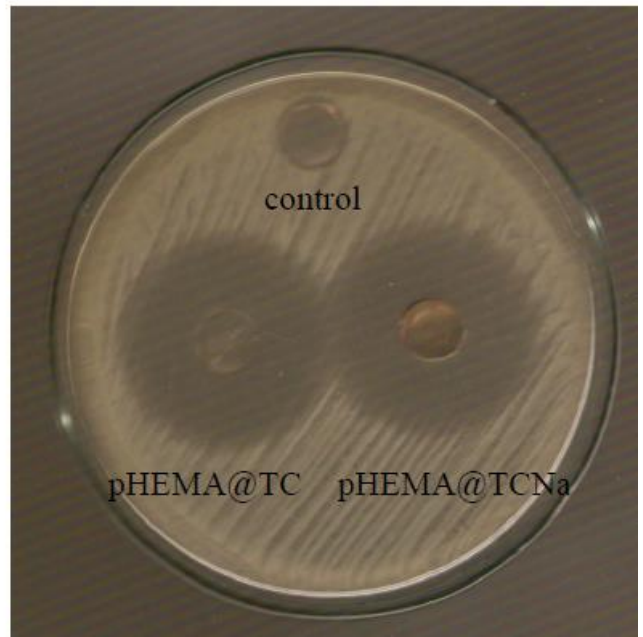
E. coli



S. epidermidis



S. aureus



Εικόνα 4.13: Ζώνες αναστολής (IZ) για το pHEMA@TCNa και το pHEMA@TCH₂.

4.2.2 Προσδιορισμός ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (MIC) και ποσοστού επιβίωσης παρουσία υδρογελών

Η αντιβακτηριακή αποτελεσματικότητα του TCNa αξιολογήθηκε επίσης από τις τιμές ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (MIC) έναντι των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων *E. coli* και *P. aeruginosa* και των θετικών κατά Gram βακτηρίων *S. epidermidis* και *S. aureus* κατά την επώασή τους για 20 ώρες. Το TCNa εμφανίζει υψηλότερη αντιμικροβιακή δράση από το TCH₂, ένα αντιβιοτικό φάρμακο σε κλινική χρήση, η οποία αυξάνεται έως και 3.2, 14.0 και 1.4 φορές έναντι των *P. aeruginosa*, *E. coli* και *S. aureus* αντίστοιχα (Πίνακας 4.9, Εικόνα 4.14). Οι τιμές MIC του TCNa κυμαίνονται στην περιοχή από 0.4 έως 8.92 για τα Gram - και από 0.96 έως 138.7 μM για τα Gram + σε αντίθεση με την TCH₂ με εύρος τιμής MIC μεταξύ 5.60 έως 28.60 για τα Gram - και από 1.32 έως 37.8 μM. Γενικά, η ένωση TCNa εμφανίζει υψηλότερη αντιβακτηριακή δράση (χαμηλότερες τιμές MIC) στην περίπτωση αρνητικών κατά Gram βακτηρίων έναντι TCH₂.

Στην περίπτωση των υδρογελών το ποσοστό επιβίωσης για τα Gram- παρουσία του pHEMA@TCNa κυμαίνεται από 0.8 έως 1.0 και από 0.1 έως 59.3 για τα Gram + . Παρουσία του pHEMA@TCH₂ το ποσοστό επιβίωσης κυμαίνεται από 0.3 έως 1.4 για τα Gram - και από 0.4 έως 74.2 για τα Gram + (Πίνακας 4.10, Σχήμα 4.2.1, Εικόνα 4.15).

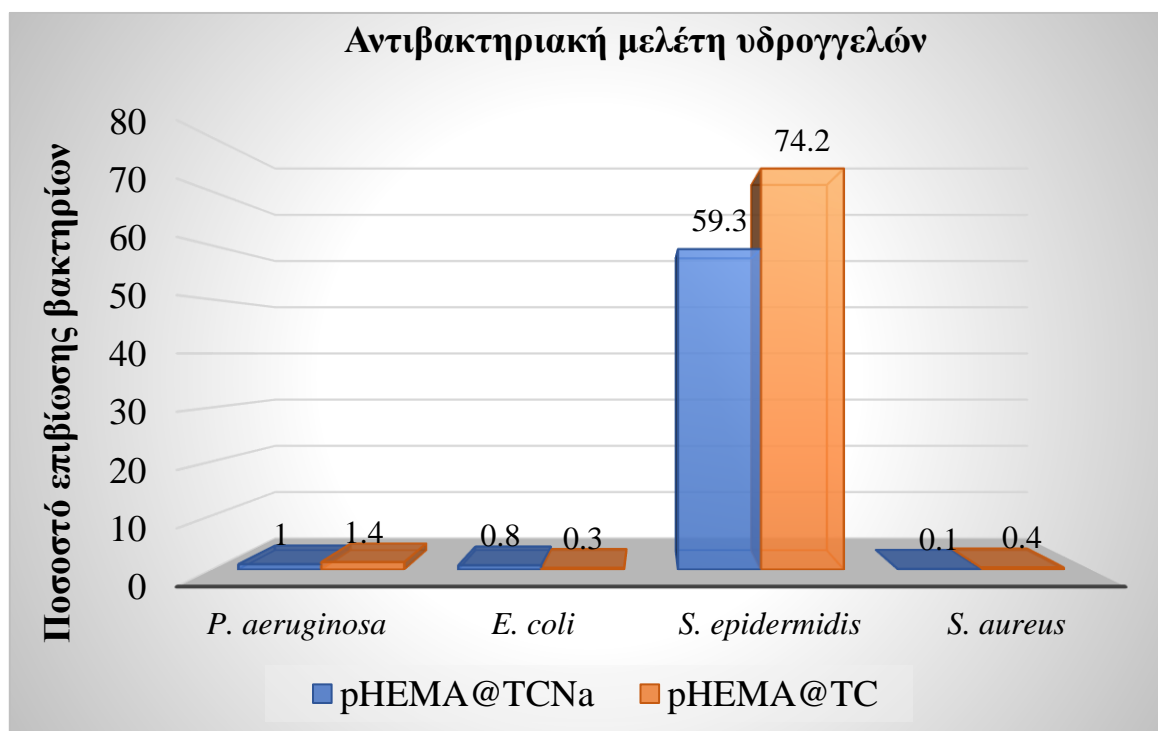
Τα μικρόβια ταξινομούνται σε ευαίσθητα (MIC <50 μM) ή ανθεκτικά (MIC >100 μM) σε έναν αντιμικροβιακό παράγοντα με βάση τις τιμές MIC [94]. Επομένως, τα *P. aeruginosa*, *E. coli* και *S. aureus* είναι ευαίσθητα σε TCNa και TCH₂. Στην περίπτωση του *S. epidermidis*, το μικρόβιο μπορεί να ταξινομηθεί σε ανθεκτικό για το TCNa.

Πίνακας 4.9: Ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (MIC) των TCNa και TCH₂.

| Ένωση | Gram negative | | Gram positive | | Ref. |
|-----------------|----------------------|----------------|-----------------------|------------------|------|
| | <i>P. aeruginosa</i> | <i>E. coli</i> | <i>S. epidermidis</i> | <i>S. aureus</i> | |
| MIC (μM) | | | | | |
| TCNa | 8.92 ± 1.78 | 0.40 ± 0.07 | 138.67 ± 10.58 | 0.96 ± 0.03 | * |
| TC | 28.60 ± 4.90 | 5.60 ± 1.33 | 37.80 ± 14.06 | 1.32 ± 0.34 | [48] |

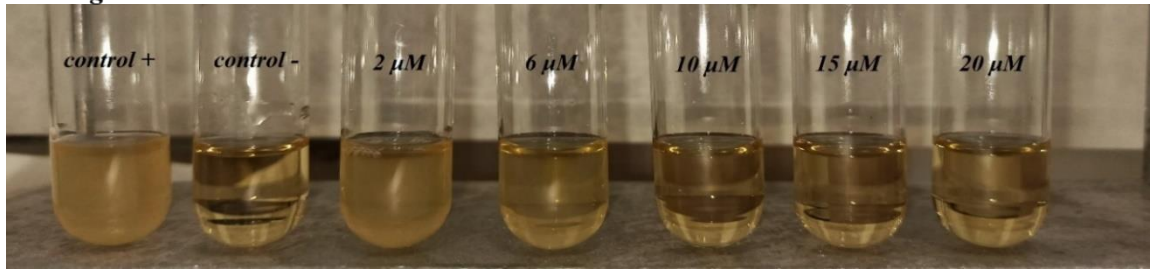
Πίνακας 4.10: Ποσοστό επιβίωσης βακτηρίων παρουσία των pHEMA@TCNa και pHEMA@TCH₂.

| Ένωση | Gram negative | | Gram positive | | Ref. |
|------------------------------|----------------------|----------------|-----------------------|------------------|------|
| | <i>P. aeruginosa</i> | <i>E. coli</i> | <i>S. epidermidis</i> | <i>S. aureus</i> | |
| Ποσοστό επιβίωσης % | | | | | |
| pHEMA@TCNa | 1.0 ± 0.9 | 0.8 ± 0.8 | 59.3 ± 9.8 | 0.1 ± 0.2 | * |
| pHEMA@TCH₂ | 1.4 ± 1.8 | 0.3 ± 0.5 | 74.2 ± 6.8 | 0.4 ± 0.6 | * |

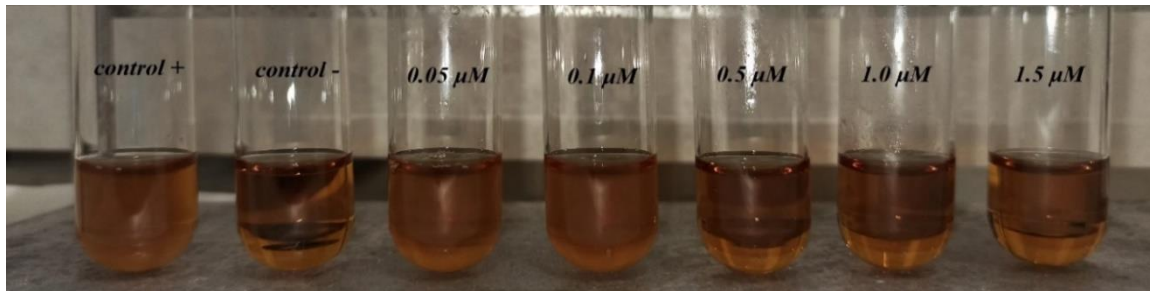


Σχήμα 4.2.1: Γραφική απεικόνιση ποσοστού επιβίωσης βακτηρίων παρουσία υδρογελών pHEMA@TCNa και pHEMA@TC

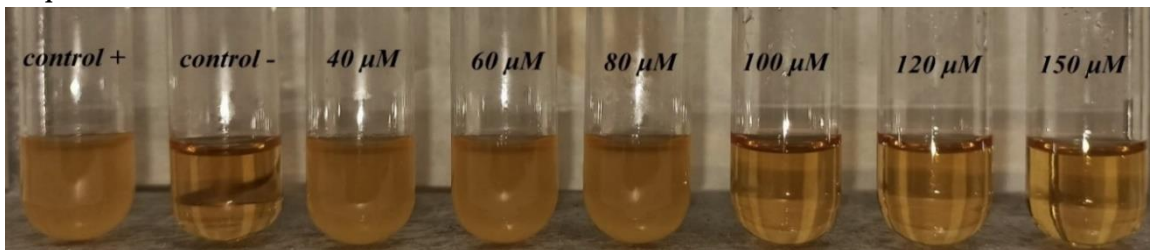
P. aeruginosa



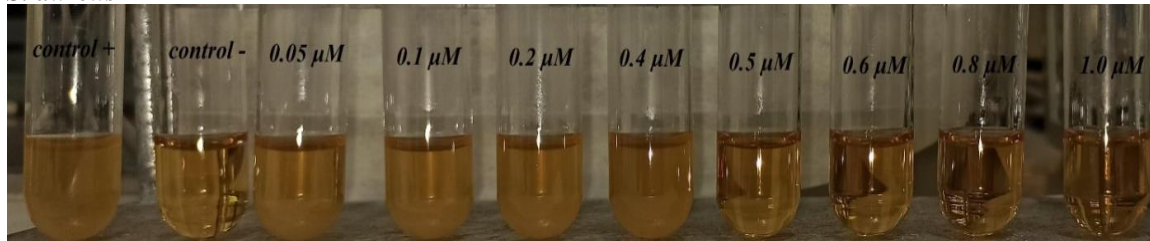
E. coli



S. epidermidis

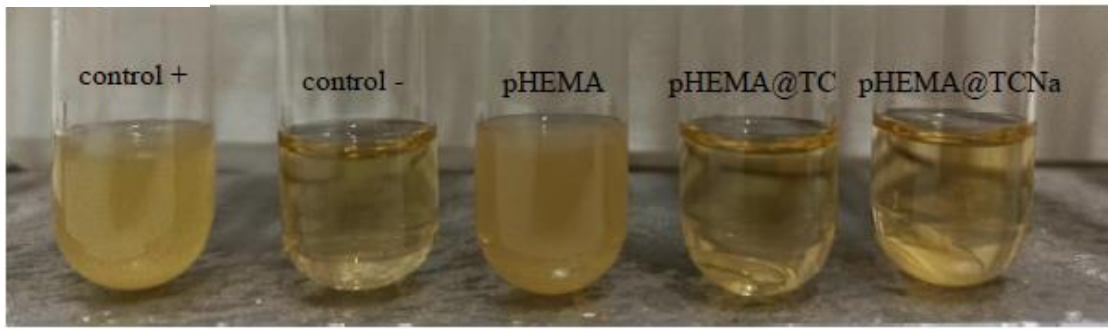


S. aureus

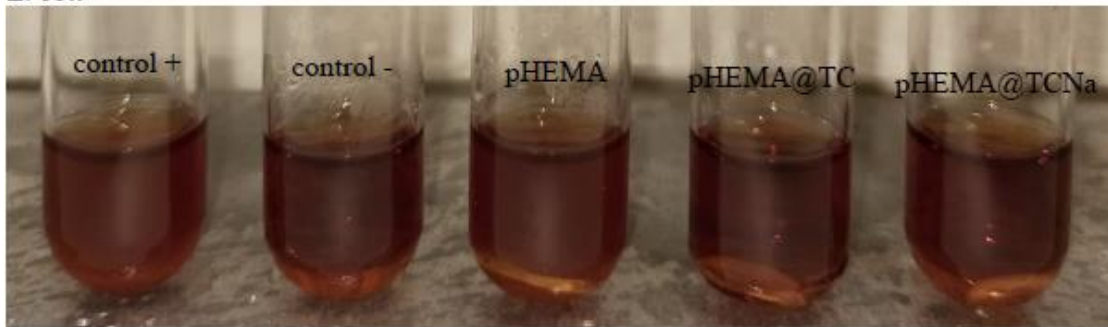


Εικόνα 4.14: Ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (MIC) των TCNa και TCH₂.

P. aeruginosa



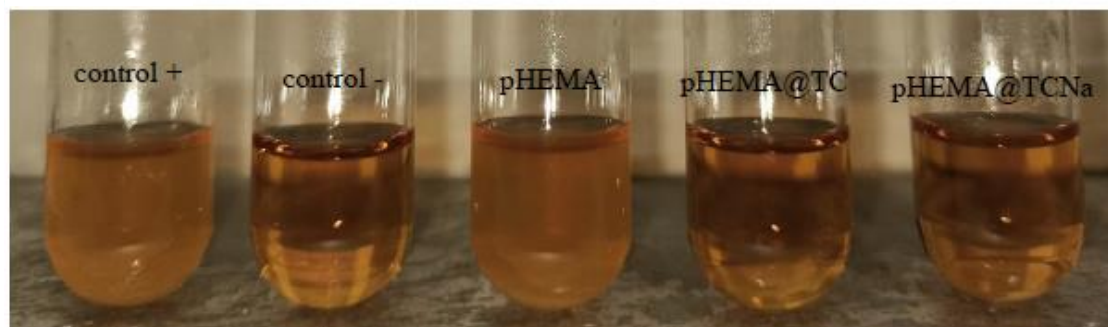
E. coli



S. epidermidis



S. aureus



Εικόνα 4.15: Ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (MIC) των TCNa και TCH₂.

4.2.3 Προσδιορισμός ελάχιστης βακτηριοκτόνου συγκέντρωση (MBC)

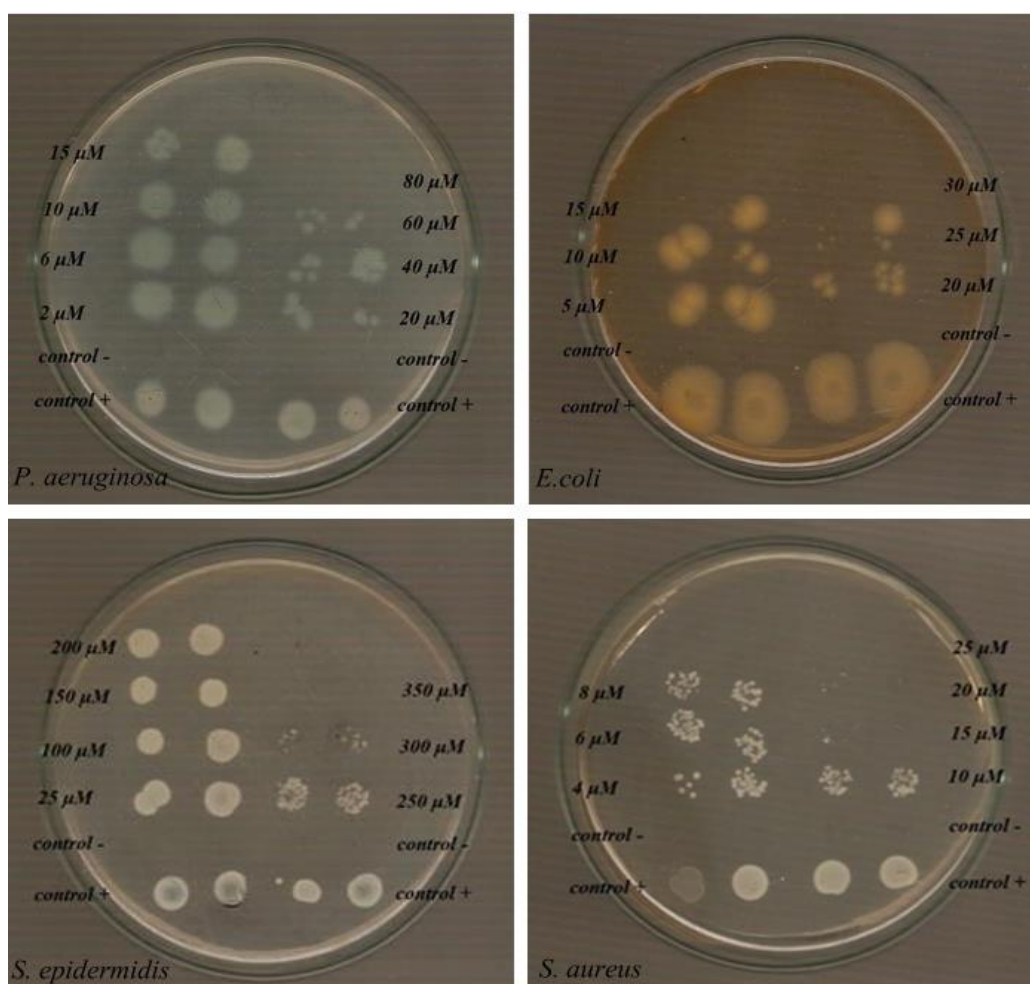
Προσδιορίστηκε η ελάχιστη βακτηριοκτόνος συγκέντρωση (MBC) του TCNa, προκειμένου να υπολογιστεί η χαμηλότερη συγκέντρωση TCNa που σκοτώνει το 99,9% των αρχικών βακτηριακών αποικιών. Οι τιμές MBC του TCNa κυμαίνονται στην περιοχή από 26 έως 80 μM για τα Gram - και από 19 έως 330 μM για τα Gram + σε αντίθεση με την TCH₂ που κυμαίνονται από 92-150 μM για τα Gram - και από 10-171 μM για τα Gram + (Πίνακας 11, Εικόνα 4.16). Γενικά, παρατηρείται η ίδια τάση όπως στις τιμές MIC, η ένωση TCNa εμφανίζει υψηλότερες τιμές MBC στην περίπτωση των Gram αρνητικών βακτηρίων έναντι της TCH₂.

Η αναλογία MBC/MIC χρησιμοποιείται για να κατηγοριοποιήσει έναν παράγοντα σε βακτηριοστατικός ($\text{MBC/MIC} \geq 4$, ο οργανισμός αναστέλλεται και δεν θανατώνεται) και σε βακτηριοκτόνος ($\text{MBC/MIC} \leq 2$, το 99,9% των μικροοργανισμών σκοτώνεται) [95]. Οι αναλογίες MBC/MIC των TCNa και TC TCH₂ είναι ≥ 4 , υποδεικνύοντας ότι και οι δύο παράγοντες μπορούν να θεωρηθούν βακτηριοστατικοί καθώς αναστέλλουν μόνο την ανάπτυξη των ελεγχόμενων βακτηρίων (Gram αρνητικά και θετικά) και δεν τα σκοτώνουν (Πίνακας 4.11).

Στην περίπτωση των υδρογελών δεν προσδιορίζεται η ελάχιστη βακτηριοκτόνος συγκέντρωση καθώς οι φακοί επαφής έχουν συγκέντρωση $2 \times 10^{-2}\text{M}$. Επομένως τα συμπεράσματα εξάγονται μόνο για αυτή την συγκέντρωση. Από την εικόνα 4.17 παρατηρούμε πως μόνο στην περίπτωση του *S.aureus* τα pHEMA@TCNa και pHEMA@TCH₂ δρουν βακτηριοκτόνα.

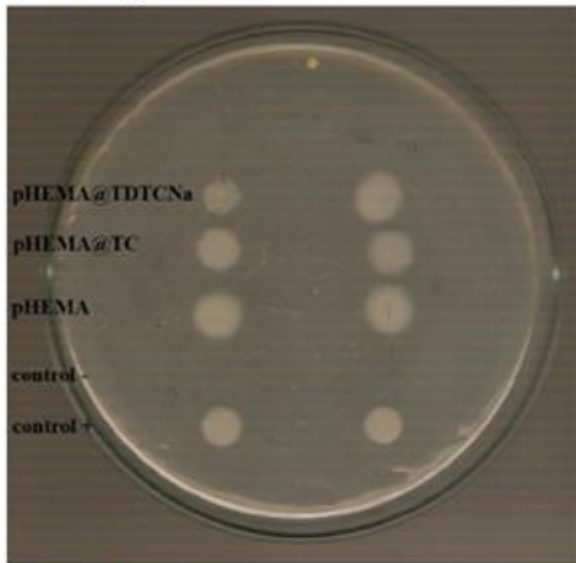
Πίνακας 4.11: Ελάχιστη βακτηριοκτόνος συγκέντρωση (MBC) του TCNa και της TCH₂.

| Ένωση | Gram negative | | Gram positive | | Ref. |
|-----------------|----------------------|----------------|-----------------------|------------------|------|
| | <i>P. aeruginosa</i> | <i>E. coli</i> | <i>S. epidermidis</i> | <i>S. aureus</i> | |
| MBC (μM) | | | | | |
| TCNa | 80.0 ± 0.0 | 26.00 ± 3.7 | 330.0 ± 24.0 | 19.0 ± 3.7 | * |
| TC | 92.0 ± 18.0 | 150.0 ± 25.3 | 171.4 ± 29.1 | 10.0 ± 0.0 | * |
| MBC/MIC | | | | | |
| TCNa | 9.0 | 65.0 | 2.4 | 19.8 | * |
| TC | 3.2 | 26.8 | 4.5 | 7.6 | * |

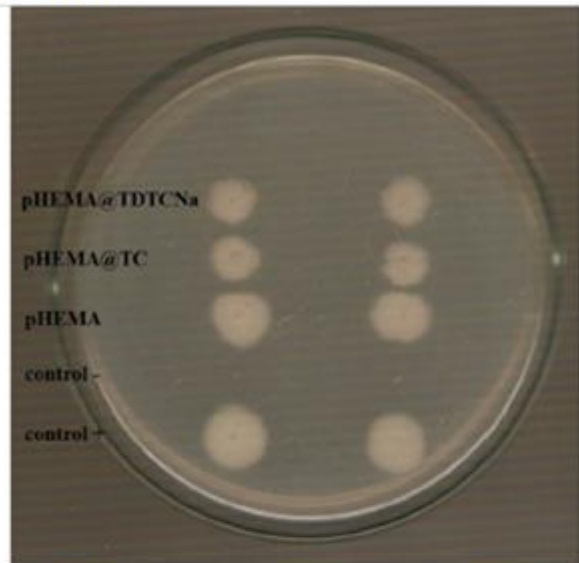


Εικόνα 4.16: Ελάχιστη βακτηριοκτόνος συγκέντρωση (MBC) του TCNa και της TCH₂

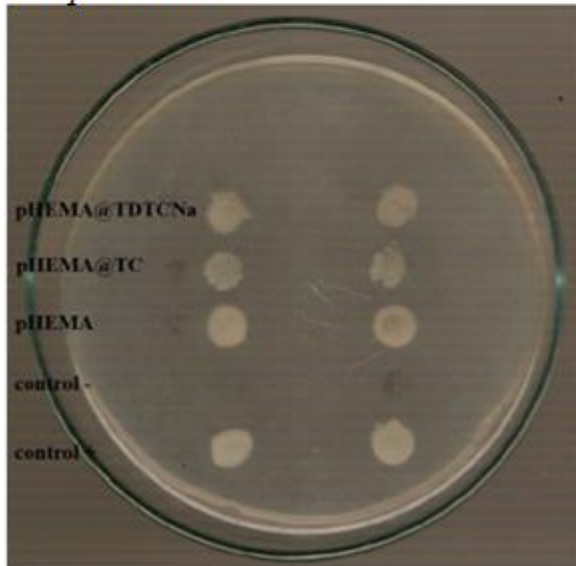
P. aeruginosa



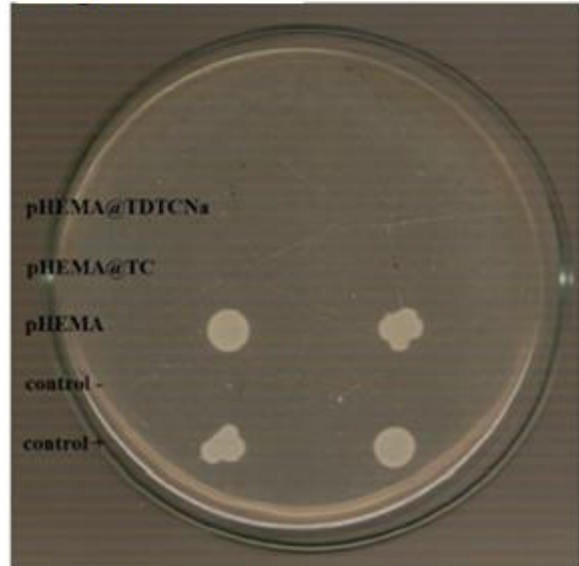
E. coli



S. epidermidis



S. aureus



Εικόνα 4.17: Προσδιορισμός βακτηριοκτόνου δράσης των pHEMA@TCNa και της pHEMA@TCH₂.

4.2.4 Προσδιορισμός Ελάχιστη συγκέντρωσης εξάλειψης βιοφίλμ (BEC) και ποσοστού βιωσιμότητας βιοφίλμ, παρουσία υδρογελών.

Η τιμή BEC ορίζεται ως η απαιτούμενη συγκέντρωση για την επίτευξη τουλάχιστον 99,9% μείωσης της βιωσιμότητας των βακτηρίων βιοφίλμ. Οι τιμές BEC του TCNa είναι 540.2 και 1135.6 μM , αντίστοιχα, έναντι των *P. aeruginosa* και *S. aureus* (Πίνακας 4.13, Εικόνα 4.18). Έτσι, το μεταλλοφάρμακο TCNa είναι πιο αποτελεσματικό (έως και 2 φορές) από αυτό της TCH₂ έναντι του βιοφίλμ του *S. aureus*, ενώ το TCNa εξαλείφει το βιοφίλμ της *P. aeruginosa* με τον ίδιο τρόπο με την TCH₂.

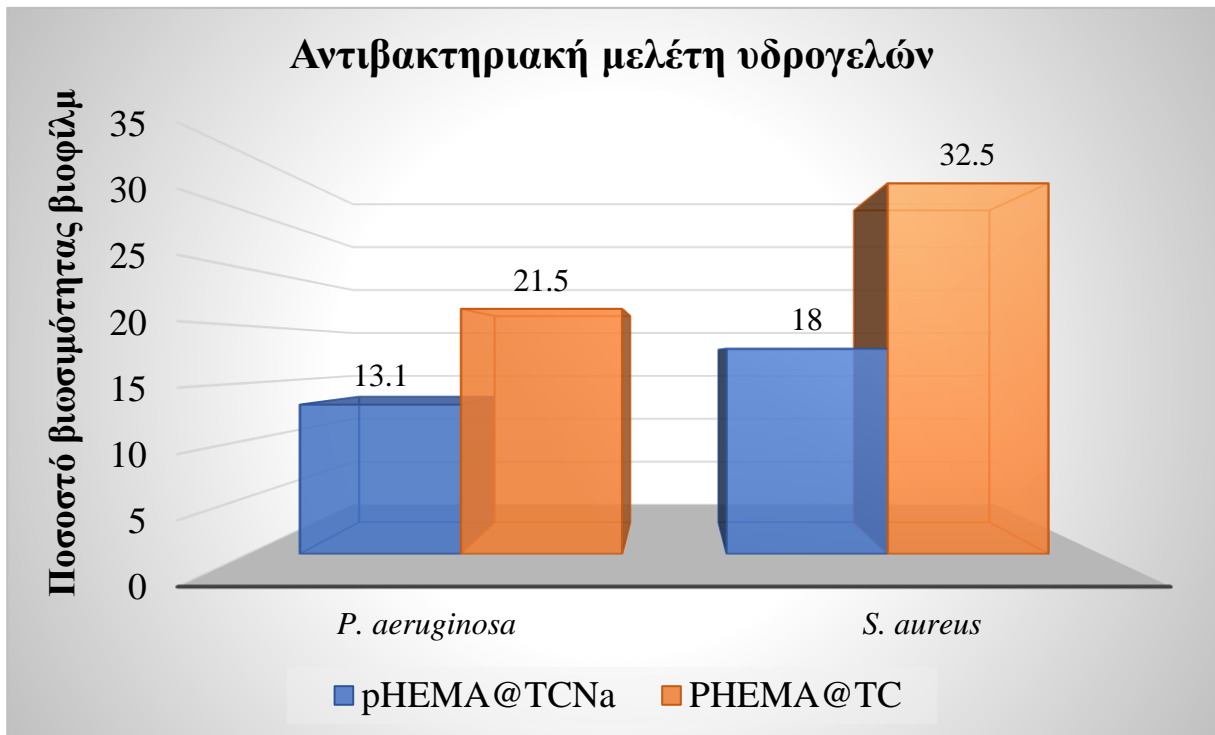
Από τον προσδιορισμό του ποσοστού βιωσιμότητας του βιοφίλμ παρουσία φακών επαφής, το TCNa εμφανίζεται πιο αποτελεσματικό τόσο για τον *S. aureus* όσο και για την *P. aeruginosa*. (Πίνακας 4.14, Σχήμα 4.2.2, Εικόνα 4.19).

Πίνακας 4.13: Ελάχιστη συγκέντρωση εξάλειψης βιοφίλμ (BEC) των TCNa και TCH₂.

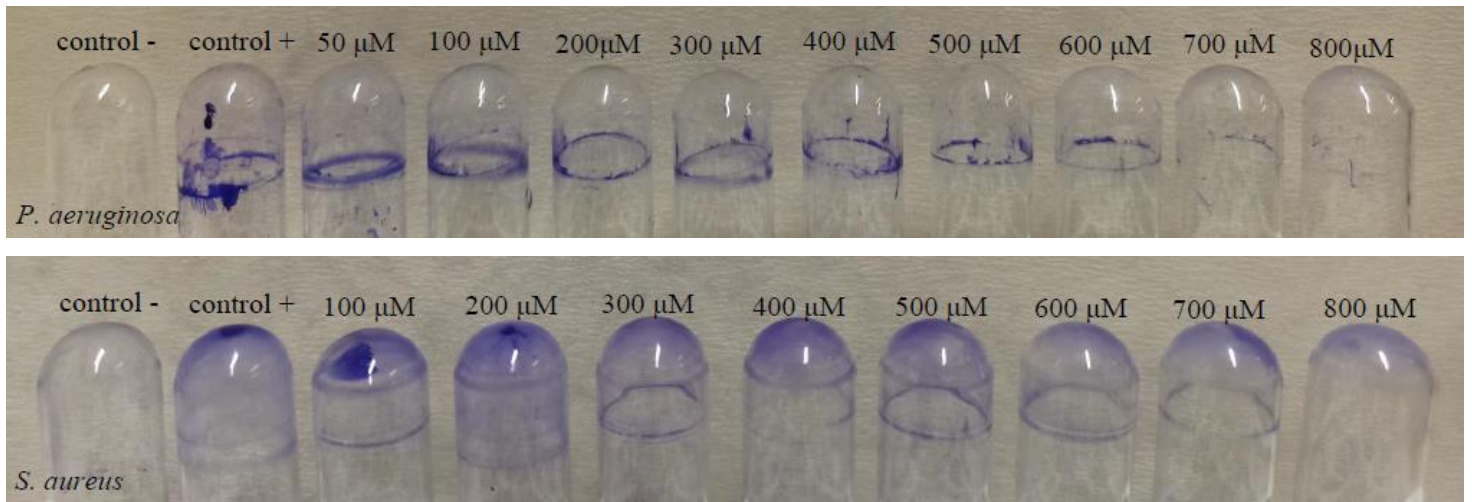
| Ένωση | Gram negative | | Gram positive | | Ref |
|---------------------------------------|----------------------|----------------|-----------------------|--------------------|-----|
| | <i>P. aeruginosa</i> | <i>E. coli</i> | <i>S. epidermidis</i> | <i>S. aureus</i> | |
| BEC (μM) | | | | | |
| TCNa | 540.2 \pm 93.4 | - | - | 1,135.6 \pm 57.7 | * |
| TC | 427 \pm 84 | - | - | >2304 | * |

Πίνακας 4.14: Ποσοστό βιωσιμότητας βιοφίλμ παρουσία των pHEMA@TCNa και pHEMA@TCH₂.

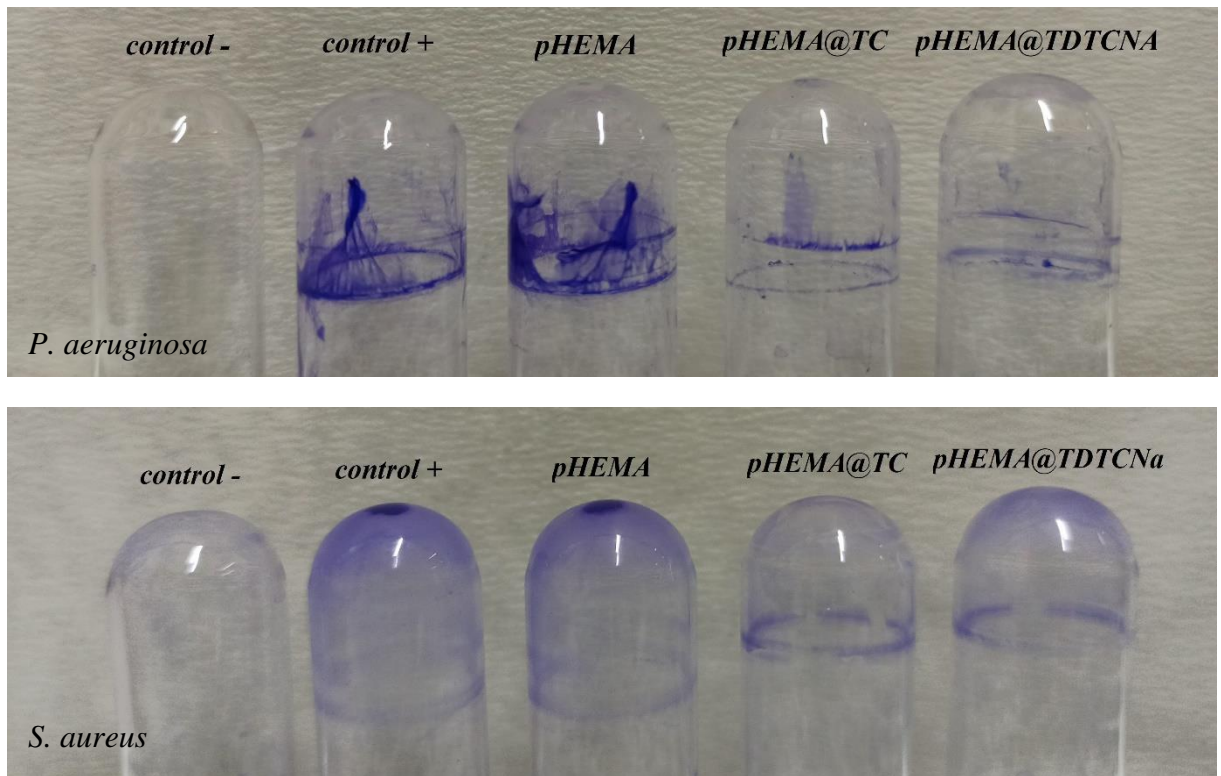
| Ένωση | Gram negative | | Gram positive | | Ref. |
|-------------------------------|----------------------|----------------|-----------------------|------------------|------|
| | <i>P. aeruginosa</i> | <i>E. coli</i> | <i>S. epidermidis</i> | <i>S. aureus</i> | |
| Ποσοστό βιωσιμότητας % | | | | | |
| pHEMA@TCNa | 13.1 \pm 6.8 | - | - | 18.00 \pm 3.4 | * |
| pHEMA@TCH₂ | 21.5 \pm 7.7 | - | - | 32.5 \pm 9.7 | * |



Σχήμα 4.2.2: Γραφική απεικόνιση ποσοτού βιωσιμότητας βιοφίλμ παρουσία υδρογελών pHEMA@TCNa και pHEMA@TC



Εικόνα 4.18: Ελάχιστη συγκέντρωση εξάλειψης βιοφίλ (BEC) των TCNa και TCH₂



Εικόνα 4.19: Προσδιορισμός ποσοστού βιωσιμότητας του βιοφίλμ παρουσία των pHEMA@TCNa και pHEMA@TCH₂.

4.3 Μελέτη της *in vivo* τοξικότητας με τη μέθοδο γαρίδας άλμης (*Artemia salina assay*)

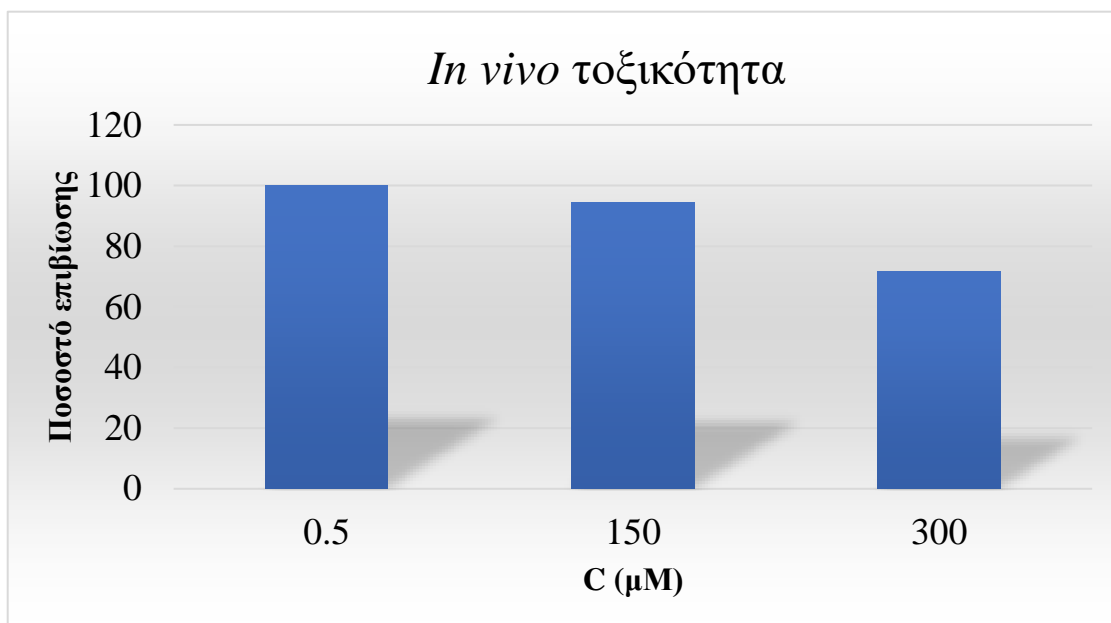
Από την *in vivo* μελέτη της τοξικότητας του συμπλόκου TCNa στην *Artemia salina*, εξάγονται συμπεράσματα σχετικά με το ποσοστό βιωσιμότητάς της μετά την έκθεση στο συγκεκριμένο αντιβιοτικό. Οι συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν ήταν 0.5, 150, 300 μM . Το TCNa δεν φαίνεται να είναι τοξικό σε συγκεντρώσεις 0.5 μM και 150 μM , αφού σχεδόν το 100% των προνυμφών επιβιώνει. Το ίδιο ισχύει στην περίπτωση των υδρογελών (Πίνακας 4.16). Ωστόσο, δεν συμβαίνει το ίδιο για τη συγκέντρωση των 300 μM αφού το ποσοστό βιωσιμότητας πέφτει στο 71.8%. Τα αποτελέσματα ελήφθησαν μετά από 24 ώρες και παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.15.

Πίνακας 4.15: Ποσοστό βιωσιμότητας *Artemia salina* μετά από έκθεση 24 ωρών στο σύμπλοκο TCNa.

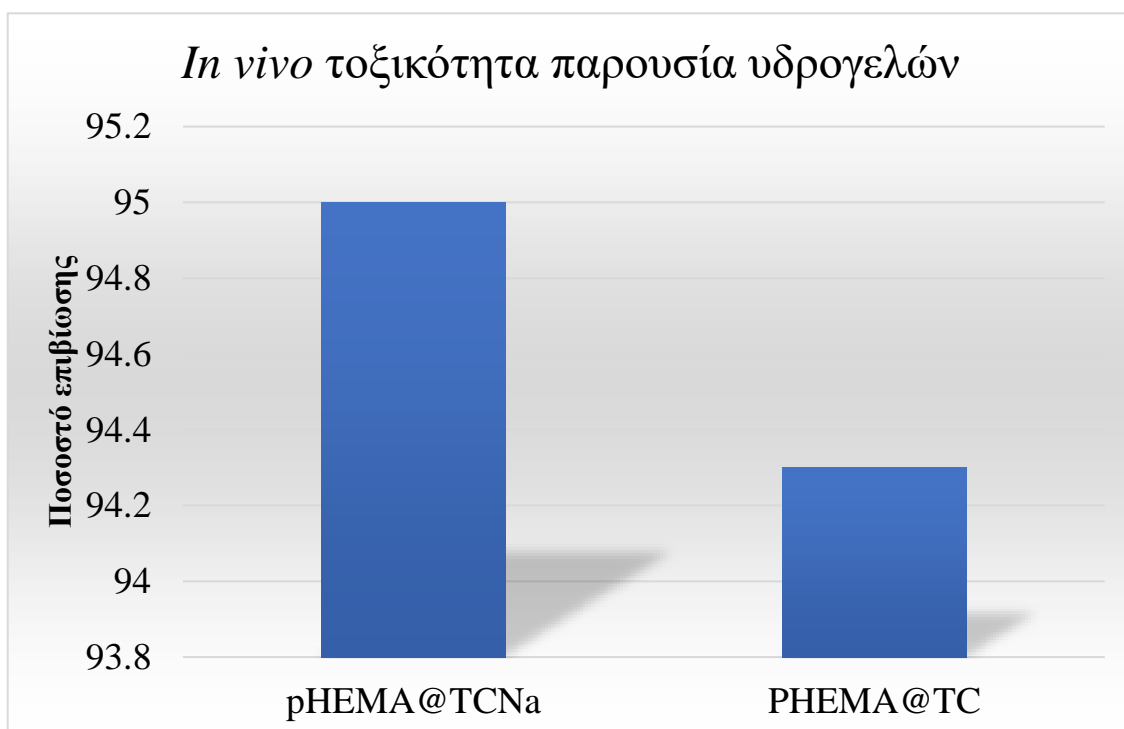
| Compound | 0.5 μM MIC^{min} | 150 μM MIC^{max} | 300 μM $2 \times \text{MIC}^{\text{max}}$ |
|----------|--|--|---|
| TCNa | 100.0 \pm 0.0 | 94.4 \pm 6.89 | 71.8 \pm 7.02 |

Πίνακας 4.16: Ποσοστό βιωσιμότητας *Artemia salina* μετά από έκθεση 24 ωρών των pHEMA@TCNa και pHEMA@TCH₂.

| Compound | 2×10^{-2} M |
|------------|----------------------|
| pHEMA@TCNa | 95.0 \pm 4.93 |
| pHEMA@TC | 94.3 \pm 5.68 |



Σχήμα 4.3.1: Γραφική απεικόνιση ποσοστού επιβίωσης προνυμφών *Artemia Salina* κατά την μελέτη της in vivo τοξικότητας



Εικόνα 4.3.2: Γραφική απεικόνιση ποσοστού επιβίωσης προνυμφών *Artemia Salina* κατά την μελέτη της in vivo τοξικότητας παρουσία υδρογελών.

4.4 Μελέτη της *in vitro* τοξικότητας σε HCECs

Η τοξικότητα του συμπλόκου TCNa για τα φυσιολογικά HCECs μελετήθηκε για τις συγκεντρώσεις 50 έως 300 μM . Βρέθηκε πως για το TCNa το είναι $\text{IC}_{50}(\mu\text{M}) > 300 \mu\text{M}$ ενώ για την τετρακυκλίνη $\text{IC}_{50}(\mu\text{M}) > 60$ οπότε το TCNa θα εμφανίζει είτε παρόμοια τοξικότητα με την τετρακυκλίνη ένα εμπορικά διαθέσιμο φάρμακο είτε θα εμφανίζει μεγαλύτερη τοξικότητα.

Ε. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στη παρούσα διατριβή πραγματοποιήθηκε η τροποποίηση ενός εμπορικά διαθέσιμου αντιβιοτικού, της τετρακυκλίνης με την σύζευξη του νατρίου. Το νέο σύμπλοκο (TCNa) χαρακτηρίστηκε με διάφορες φασματοσκοπικές μεθόδους, ώστε να συλλεχθούν τα φασματοσκοπικά του δεδομένα και να διαπιστωθεί ο επιτυχημένος σχηματισμός του και παράλληλα μελετήθηκε η σταθερότητά του σε διάλυμα εντός 48 ωρών.

Συγκεκριμένα, το σύμπλοκο χαρακτηρίστηκε με σημείο τήξης, διαλυτότητα, φασματοσκοπίες FT-IR, UV-Vis, $^1\text{H-NMR}$, XRF, κρυσκοπία και η σταθερότητα σε διάλυμα μελετήθηκε με φασματοσκοπία UV-Vis και $^1\text{H-NMR}$. Ο προσδιορισμός της δομής έγινε με περίθλαση μονοκρυστάλλου με ακτίνες X και βρέθηκε πως έχει τύπο $\{[\text{TC}]^{2-} [\text{Na}^+(\text{MeOH})(\text{H}_2\text{O})] [\text{Na}^+(\text{H}_2\text{O})]\}$ και ανήκει στην P2_1 ομάδα. Έτσι επαληθεύτηκε η επιτυχής σύνθεση του καθώς και η σταθερότητά του σε διάλυμα.

Στη συνέχεια διαπιστώθηκε η αντιμικροβιακή δράση του TCNa έναντι δύο αρνητικών κατά Gram βακτηρίων των *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*), *Escherichia coli* (*E. coli*) καθώς και δύο θετικών κατά Gram βακτηρίων *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*). Από τις ζώνες αναστολής και τις MIC αποδείχθηκε πως το TCNa είναι πιο δραστικό από την TCH_2 για τα στελέχη βακτηρίων που μελετήθηκαν εκτός από την περίπτωση του *S. epidermidis* που βάση αποτελεσμάτων χαρακτηρίστηκε ανθεκτικό και για τα δύο αντιβιοτικά (TCNa, TCH_2). Επίσης από το λόγο MBC/MIC που βρέθηκε να είναι μεγαλύτερος του 4 επιβεβαιώθηκε πως το TCNa δρά βακτηριοστατικά. Κατά τον προσδιορισμό της BEC διαπιστώθηκε πως το TCNa είναι πιο αποτελεσματικό (έως και 2 φορές) από αυτό της TCH_2 έναντι του βιοφίλμ του *S. aureus*, ενώ το TCNa εξαλείφει το βιοφίλμ της *P. aeruginosa* με τον ίδιο τρόπο με την TCH_2 .

Για τον προσδιορισμό της τοξικότητας *in vivo*, χρησιμοποιήθηκε και ο ζωντανός οργανισμός-μοντέλο *Artemia salina*. Το TCNa αποδείχθηκε πως δεν είναι τοξικό *in vivo* στις συγκεντρώσεις 0.5μM και 150μM καθώς επιβίωσε το 100% και 94% των προνυμφών, αντίστοιχα. Τέλος, μη τοξικό χαρακτηρίστηκε το TCNa και για τα ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα του κερατοειδούς (HCEC) για συγκεντρώσεις μέχρι 300μM.

Βιβλιογραφία

[1]: Pelczar, Michael J., Chan, E.C.S., Reid, Roger D. (1978), Microbiology. 4th edition, New Delhi: Tata McGraw-Hill Publishing Company Ltd.

[2]: D. Greenwood, Richard C. B. Slack & John F. Peutherer (2002), Medical microbiology—a guide to microbial infections, pathogenesis, immunity, laboratory diagnosis and control: 16th edition, Edinburgh: Churchill Livingstone.

[3]: P. Collard, (1976), The development of Microbiology. Cambridge University Press, Cambridge.

[4]: W.D. Foster (1970), A History of Medical Bacteriology and Immunology. 1st edition, Cox and Wyman, London

[5]: M. T. Madigan, J. M. Martinko, J. Parker, (2003), Brock biology of microorganisms. 10th edition, Prentice Hall/Pearson Education, Upper Saddle River, NJ.

[6]: <https://biologydictionary.net>

[7]: Γ. Αγγέλης, (2017), Μικροβιολογία και μικροβιακή τεχνολογία. Β Έκδοση, UNIBOOKS IKE

[8]: <https://jackwestin.com/resources/mcat-content/plasma-membrane/membrane-dynamics>

[9]: <https://www.ukessays.com>

[10]: A.G. Moat, J.W. Foster, (2002), Microbial Physiology. 4th edition, Willey-Liss, New York.

[11]: <https://sciencenotes.org/>

[12]: <https://www.cdc.gov/hai/organisms/pseudomonas.html>

[13]: CDC Vital Signs: Staph Infections Can Kill
www.cdc.gov/vitalsigns/staph/index.html

[14]: S.A Waksman, (1947), What is an antibiotic or an antibiotic substance?. Mycologia 39(5), 565-569.

[15]: R. Aminov (2017), History of antimicrobial drug discovery: Major classes and health impact. Biochemical pharmacology, 133, 4–19.

[16]: K. I. Mohr (2016), History of Antibiotics Research. Current topics in microbiology and immunology, 398, 237–272.

[17]: K. Gould, (2016), Antibiotics from prehistory to the present day. The Journal of antimicrobial chemotherapy, 71(3), 572-575.

[18]: Bassett, E. J., Keith, M. S., Armelagos, G. J., Martin, D. L., & Villanueva, A. R. (1980). Tetracycline-labeled human bone from ancient Sudanese Nubia (A.D. 350). *Science* (New York, N.Y.), 209(4464), 1532–1534.

[19]: De la Bédoyère G (2005) *The discovery of penicillin (milestones in modern science)*. Evans Brothers Ltd

[20]: R. P. Rubin (2007). A brief history of great discoveries in pharmacology: in celebration of the centennial anniversary of the founding of the American Society of Pharmacology and Experimental Therapeutics. *Pharmacological reviews*, 59(4), 289–359.

[21]: R.L Zimdahl (2015) *Six chemicals that changed agriculture*. 1st edn. Academic Press Elsevier

[22]: S. M. Drawz & R.A. Bonomo (2010), Three decades of beta-lactamase inhibitors. *Clinical microbiology reviews*, 23(1), 160-201.

[23]: Nelson, M. L., & Levy, S. B. (2011). The history of the tetracyclines. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1241(1), 17-32.

[24]: B.M. Duggar, Aureomycin: a product of the continuing search for new antibiotics, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 51 (1948) 177–181.

[25]: Cunha, B. A. (1985). Clinical uses of the tetracyclines. In *The Tetracyclines* (Hlavka, J. J. & Boothe, J. H., Eds), pp. 393-404. Springer-Verlag, Berlin.

[26]: Edlind, T. D. (1989). Tetracyclines as antiparasitic agents: lipophilic derivatives are highly active against *Giardia lamblia* in vitro. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 33, 2144-5.

[27]: Chopra, I., Hawkey, P. M., & Hinton, M. (1992). Tetracyclines, molecular and clinical aspects. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 29(3), 245–277.

[28]: Finlay, A.C., Hobby, G.L., P'an, S.Y., Regna, P.P., Routien, J.B., Seeley, D.B., Shull, G.M., Sobin, B.A., Solomons, I.A., Vinson, J.W., et al. (1950). Terramycin, a new antibiotic. *Science* 111, 85.

[29]: Nguyen, F., Starosta, A. L., Arenz, S., Sohmen, D., Dönhöfer, A., & Wilson, D. N. (2014). Tetracycline antibiotics and resistance mechanisms. *Biological chemistry*, 395(5), 559–575.

[31]: Stephens, C.R., Conover, L.H., Hochstein, F.A., Regna, P.P., Pilgrim, F.J., Brunings, K.J., and Woodward, R.B. (1952). Terramycin. VIII. Structure of aureomycin and terramycin. *J. Am. Chem. Soc.* 74, 4976–4977.

[32]: Stephens, C.R., Conover, L.H., Pasternack, R., Hochstein, F.A., Moreland, W.T., Regna, P.P., Pilgrim, F.J., Brunings, K.J., and Woodward, R.B. (1954). The structure of Aureomycin1. *J. Am. Chem. Soc.* 76, 3568–3575.

[33]: Fuoco D. (2012). Classification Framework and Chemical Biology of Tetracycline-Structure-Based Drugs. *Antibiotics* (Basel, Switzerland), 1(1), 1–13.

[34]: Grossman, T.H., Starosta, A.L., Fyfe, C., O'Brien, W., Rothstein, D.M., Mikolajka, A., Wilson, D.N., and Sutcliffe, J.A. (2012). Target and resistance-based mechanistic studies with TP-434, a novel fluorocycline antibiotic. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56, 2559–2564.

[35]: Haidari, W., Bruinsma, R., Cardenas-de la Garza, J. A., & Feldman, S. R. (2020). Sarecycline Review. *The Annals of pharmacotherapy*, 54(2), 164–170.

[36]: Rodvold, K. A., Burgos, R. M., Tan, X., & Pai, M. P. (2020). Omadacycline: A Review of the Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics.

[37]: R. Daghbir, P. Drogui, Tetracycline antibiotics in the environment: a review, *Environ Chem Lett*, Volume 11, Pages 209–227, 2013.

[38]: Sapadin A. N. and Fleischmajer R. ,Tetracyclines: Nonantibiotic properties and their clinical implications, *J. Am. Acad. Dermatol.*, Volume 54, Issue 2, 2006.

[39]: Ralph, R.A. Tetracyclines and the treatment of corneal stromal ulceration: A review. *Cornea* 2000, 19, 274–277.

[40]: Jeffrey P. Gilbard, Ophthalmic solution with tetracycline for topical treatment of dry eye disease, Patent CA2339792C.

[41]: Fanning, W. L., & Gump, D. W. (1976). Distressing side-effects of minocycline hydrochloride. *Archives of internal medicine*,

[42]: Kim, W. B., Shelley, A. J., Novice, K., Joo, J., Lim, H. W., & Glassman, S. J. (2018). Drug-induced phototoxicity: A systematic review. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 79(6), 1069–1075.

[43]: Sloan, B., & Scheinfeld, N. (2008). The use and safety of doxycycline hyclate and other second-generation tetracyclines. *Expert opinion on drug safety*, 7(5), 571–577.

[44]: Trivedi, C. D., & Pitchumoni, C. S. (2005). Drug-induced pancreatitis: an update. *Journal of clinical gastroenterology*, 39(8), 709–716.

[45]: Takahashi, R., Tsukada, T., & Hasegawa, M. (1963). tetracycline-Induced Hemolytic Anemia. *The Keio journal of medicine*, 12, 161–168. <https://doi.org/10.2302/kjm.12.161>

[46]: Sánchez, A. R., Rogers III, R. S., & Sheridan, P. J. (2004). Tetracycline and other tetracycline-derivative staining of the teeth and oral cavity. *International journal of dermatology*, 43(10), 709-715.

[47]: Μαρσέλος, Μ., Λεονταρίτης, Γ., Αντωνίου, Α., Κωνσταντή, Μ., Μανωλόπουλος, Ε., Παππάς, Π., & Χαρκίτης, Π. (2015). Βιοχημική φαρμακολογία [Προπτυχιακό εγχειρίδιο]. Κάλλιπος, Ανοικτές Ακαδημαϊκές Εκδόσεις. <https://hdl.handle.net/11419/4252>

[48]: Meretoudi, A., Banti, C. N., Siafarika, P., Kalampounias, A. G., & Hadjikakou, S. K. (2020). Tetracycline Water Soluble Formulations with Enhanced Antimicrobial Activity. *Antibiotics* (Basel, Switzerland), 9(12), 845.

[49]: Pond, S. M., & Tozer, T. N. (1984). First-pass elimination. Basic concepts and clinical consequences. *Clinical pharmacokinetics*, 9(1), 1–25.

[50]: Κόκοτος, Γ., & Μαγκριώτη, Β. (2015). *Φαρμακοχημεία* [Προπτυχιακό εγχειρίδιο]. Κάλλιπος, Ανοικτές Ακαδημαϊκές Εκδόσεις.

[51]: Fabre J, Milek E, Kalpopoulos et al. La Cinetique des tetracyclines chez l'homme. *Schweiz med Wschr* 1977; 101, 573–8.

[52]: Agwuh, K. N., & MacGowan, A. (2006). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the tetracyclines including glycylicyclines. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 58(2), 256–265.

[53]: PubChem Doxycycline Available online: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/54671203> (accessed on 6 October 2021).

[54]: PubChem Minocycline Available online: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/54675783> (accessed on 6 October 2021).

[55]: <https://go.drugbank.com>

[56]: Ana I. Caço, Fátima Varanda, Maria J. Pratas de Melo, Ana M. A. Dias, Ralf Dohrn, and Isabel M. Marrucho Solubility of Antibiotics in Different Solvents. Part II. Non-Hydrochloride Forms of Tetracycline and Ciprofloxacin *Industrial & Engineering Chemistry Research* 2008 47 (21), 8083-8089.

[57]: Tariq, S., Rizvi, S. F. A., & Anwar, U. (2018). Tetracycline: classification, structure activity relationship and mechanism of action as a theranostic agent for infectious lesions-a mini review. *Biomedical Journal of Scientific & Technical Research*, 7(2), 5787-5796.

[58]: Nelson M (1998) Chemical and biological dynamics of tetracyclines, *Advances in dental research* 12: 5-11.

[59]: Golub L, Suomalainen K, Sorsa T (1992) Host modulation with tetracyclines and their chemically modified analogues. *Current opinion in dentistry* 2: 80-90.

[60]: Rusu, A., & Buta, E. L. (2021). The development of third-generation tetracycline antibiotics and new perspectives. *Pharmaceutics*, 13(12), 2085.

[61]: Zhanel, G.G.; Esquivel, J.; Zelenitsky, S.; Lawrence, C.K.; Adam, H.J.; Golden, A.; Hink, R.; Berry, L.; Schweizer, F.; Zhanel, M.A.; et al. Omadacycline: A Novel Oral and Intravenous Aminomethylcycline Antibiotic Agent. *Drugs* 2020, 80, 285–313.

[62]: Thaker, M.; Spanogiannopoulos, P.; Wright, G.D. The tetracycline resistome. *Cell. Mol. Life Sci.* 2009, 67, 419–431.

[63]: Schnappinger, D.; Hillen, W. Tetracyclines: Antibiotic action, uptake, and resistance mechanisms. *Arch. Microbiol.* 1996, 165, 359–369.

[64]: Chopra, I.; Roberts, M. Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2001, 65, 232–260.

[65]: Tessier, P.R.; Nicolau, D.P. Tigecycline Displays In Vivo Bactericidal Activity against Extended-Spectrum-Lactamase-Producing Enterobacteriaceae after 72-Hour Exposure Period. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2012, 57, 640–642.

[66]: Mjos, K. D., & Orvig, C. (2014). Metallodrugs in medicinal inorganic chemistry. *Chemical reviews*, 114(8), 4540-4563.

[67]: Magner, L. N. *A History of Medicine*, 2nd ed.; Taylor & Francis Group, LLC: Boca Raton, FL, 2005.

[68]: Orvig, C.; Abrams, M. J. *Chem. Rev.* 1999, 99, 2201.

[69]: Thompson, K. H.; Orvig, C. In *Concepts and Models in Bioinorganic Chemistry*; Kraatz, H.-B., Metzler-Nolte, N., Eds.; Wiley-VCH: Weinheim, Germany, 2006; Chapter 2, pp 25–46.

[70]: Ehrlich, P.; Bertheim, A. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* 1912, 45, 756.

[71]: Pohl, H. R., Wheeler, J. S., & Murray, H. E. (2013). Sodium and potassium in health and disease. *Interrelations between essential metal ions and human diseases*, 29-47.

[72]: Antimicrobial Resistance Collaborators (2022). Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *Lancet* (London, England), 399(10325), 629–655.

[73]: World Health Organization. (2018). Tackling antimicrobial resistance (AMR) together: working paper 5.0: enhancing the focus on gender and equity (No. WHO/WSI/AMR/2018.3). World Health Organization.

[74]: Iramiot, J. S., Kajumbula, H., Bazira, J., Kansiime, C., & Asiimwe, B. B. (2020). Antimicrobial resistance at the human-animal interface in the Pastoralist Communities of Kasese District, South Western Uganda. *Scientific reports*, 10(1), 14737. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-70517-w>

[75]: O'Neill, J. (2016). Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations.

[76]: World Health Organization. (2015). State of inequality: reproductive, maternal, newborn and child health. World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/164590>

[77]: de Kraker, M. E., Stewardson, A. J., & Harbarth, S. (2016). Will 10 million people die a year due to antimicrobial resistance by 2050?. *PLoS medicine*, 13(11), e1002184.

[78]: No time to wait: Securing the future from drug-resistant infections. In: World Health Organization. <https://www.who.int/publications-detail-redirect/no-time-to-wait-securing-the-future-from-drug-resistant-infections>.

[79]: Roberts, M. C. (1996). Tetracycline resistance determinants: mechanisms of action, regulation of expression, genetic mobility, and distribution. *FEMS microbiology reviews*, 19(1), 1-24.

[80]: McLeod SD, LaBree LD, Tayyanipour R, et al. The importance of initial management in the treatment of severe infectious corneal ulcers. *Ophthalmology* 1995;102:1943–8.

[81]: Bourcier, T., Thomas, F., Borderie, V., Chaumeil, C., & Laroche, L. (2003). Bacterial keratitis: predisposing factors, clinical and microbiological review of 300 cases. *British Journal of Ophthalmology*, 87(7), 834-838.

[82]: Dart JK. Predisposing factors in microbial keratitis: the significance of contact lens wear. *Br J Ophthalmol* 1988;72:926–30.

[83]: Liesegang TJ. Contact lens-related microbial keratitis: Part I: Epidemiology. *Cornea* 1997;16:125–31.

[84]: Schaefer F, Bruttin O, Zografos L, et al. Bacterial keratitis: a prospective clinical and microbiological study. *Br J Ophthalmol* 2001;85:842–7.

[85]: Azari, A. A., & Arabi, A. (2020). Conjunctivitis: A Systematic Review. *Journal of ophthalmic & vision research*, 15(3), 372–395.

[86]: Hovding G. Acute bacterial conjunctivitis. *Acta Ophthalmol* 2008;86:5–17.

[87]: Tangri, P., & Khurana, S. (2011). Basics of ocular drug delivery systems. *International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences*, 2(4), 1541-1552.

[88]: Banti, C. N., Kapetana, M., Papachristodoulou, C., Raptopoulou, C. P., Psycharis, V., Zoumpoulakis, P., & Hadjikakou, S. K. (2021). Hydrogels containing water soluble conjugates of silver (I) ions with amino acids, metabolites or natural products for non infectious contact lenses. *Dalton Transactions*, 50(39), 13712-13727.

[89]: Banti, C. N., & Hadjikakou, S. K. (2021). Evaluation of toxicity with brine shrimp assay. *Bio-protocol*, 11(2), e3895-e3895.

[90]: Leypold, C. F., Reiher, M., Brehm, G., Schmitt, M. O., Schneider, S., Matousek, P., & Towrie, M. (2003). Tetracycline and derivatives—assignment of IR and Raman spectra via DFT calculations. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 5(6), 1149-1157.

[91]: Nakamoto, K. (2009). *Infrared and Raman spectra of inorganic and coordination compounds, part B: applications in coordination, organometallic, and bioinorganic chemistry*. John Wiley & Sons.

[92]: Williamson, D. E., & Everett Jr, G. W. (1975). Proton nuclear magnetic resonance study of the site of metal binding in tetracycline. *Journal of the American Chemical Society*, 97(9), 2397-2405.

[93]: Danguy Cavassin E, Francisco L, de Figueiredo P, Pinhata Otoch J, Martins Seckler M, Angelo de Oliveira R, Fantinelli Franco F, Spolon Marangoni V, Zucolotto V, Sara Shaferman Levin A, Figueiredo Costa S (2015) Comparison of methods to detect the in vitro activity of silver nanoparticles (AgNP) against multidrug resistant bacteria. *J Nanobiotechnol* 13:64–80

[94]: Shungu DL, Weinberg E, Gadebusch HH (1983) Tentative interpretive standards for disk diffusion susceptibility testing with norfoxacin (MK-0366, AM-715). *Antimicrob Agents Chemother* 23:256–260

[95]: Motyl M, Dorso K, Barrett J, Giacobbe R (2005) Basic microbiological techniques used in antibacterial drug discovery. In: *Current protocols in pharmacology unit 13A.3.1–13A.3.22*. Wiley, New York

Δημοσιεύσεις

- ◆ Aphrodite S. Tsigara, Christina N. Banti and Sotiris K. Hadjikakou, Tetracycline modification as a new antimicrobial formulation., "Athens Conference on Advances in Chemistry - acac2022".
- ◆ Afroditi S. Tsigara, Christina N. Banti, Antonios Hatzidimitriou, Sotiris K. Hadjikakou, Tetracycline modification as a new antimicrobial formulation., 19th Hellenic Symposium on Medicinal Chemistry (HSMC-19), at the University of Patras, Conference and Cultural Centre
- ◆ Afroditi S. Tsigara, Christina N. Banti, Antonios Hatzidimitriou, Sotiris K. Hadjikakou, Tetracycline; Structural characterization and antimicrobial properties of its water-soluble di-anionic bi-sodium salt, Journal of the American Chemical Society (προς δημοσίευση).

