



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

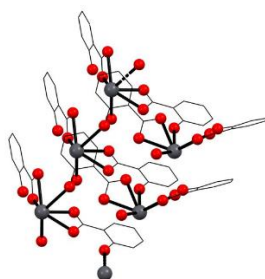
ΔΙ-ΙΔΡΥΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ (Δ.Π.Μ.Σ.)

«ΑΝΟΡΓΑΝΗ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ»

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

SaIK: ένα πιθανό αντίδοτο για την καταπολέμηση της δηλητηρίασης

από μόλυβδο



της Χρυσούλας Τζήμα (Βιολόγος MSc)

Επιβλέπων Καθηγητής: Δρ. Σωτήριος Χατζηκακού

Ιωάννινα 2022



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

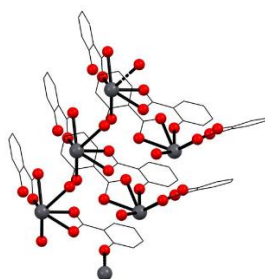
ΔΙ-ΙΔΡΥΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ (Δ.Π.Μ.Σ.)

«ΑΝΟΡΓΑΝΗ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ»

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Salk: ένα πιθανό αντίδοτο για την καταπολέμηση της δηλητηρίασης

από μόλυβδο



της Χρυσούλας Τζήμα (Βιολόγος MSc)

Επιβλέπων Καθηγητής: Δρ Σωτήριος Χατζηκακού

Ιωάννινα 2022

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

Της κ. Χρυσούλας Τζήμα

Επιβλέπων μέλος ΔΕΠ: Δρ Σωτήριος Χατζηκακού

Θέμα: «SalK: ένα πιθανό αντίδοτο για την καταπολέμηση της δηλητηρίασης από
μόλυβδο»

ΟΡΙΣΜΟΣ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ από την Ε.Δ.Ε.:.....^A/...-...-.....

1. Χατζηκακού Σωτήριος, Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων,
(Επιβλέπων)
2. Μπούμπα Βασιλική, Καθηγήτρια, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων
(Μέλος)
3. Μιχαηλίδης Θεολόγος, Καθηγητής, Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών και
Τεχνολογιών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων (Μέλος)

Έγκριση Μεταπτυχιακής Διπλωματικής Εργασίας στις

Ο Διευθυντής του Δ.Π.Μ.Σ.

Ο/Η Γραμματέας

Καθηγητής Σωτήριος Χατζηκακού

Ευχαριστίες

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω το Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Ειδίκευσης «Ανόργανη Βιολογική Χημεία» του τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, καθώς μέσα απ' αυτό μου δόθηκε η ευκαιρία να εντρυφήσω στη γνώση μου γύρω από το αντικείμενο της Χημείας, αλλά και να το συσχετίσω άμεσα με τη Βιολογία. Επιπλέον, μου δόθηκε η ευκαιρία να εργαστώ σε ένα πεδίο στο οποίο η Ανόργανη Χημεία και η Βιολογία αλληλεπικαλύπτονται και να εκπονήσω τη παρούσα διπλωματική εργασία στο Εργαστήριο Βιολογικής Ανόργανης Χημείας υπό την επίβλεψη του Καθηγητή, κ. Χατζηκακού Κ. Σωτήριου.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ολόθερμα τον επιβλέποντα καθηγητή μου, κ. Χατζηκακού Κ. Σωτήριο, Καθηγητή του τμήματος Χημείας και Διευθυντή του διδρυματικού μεταπτυχιακού προγράμματος της «Ανόργανης Βιολογικής Χημείας», για την καθοδήγησή του, τόσο επιστημονικά, όσο και ακαδημαϊκά, για την προθυμία του και την στήριξή του καθ' όλη τη διάρκεια της μεταπτυχιακής μου πορείας.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την κα Μπαντή Ν. Χριστίνα, Μεταδιδάκτορα του Εργαστηρίου Βιολογικής Ανόργανης Χημείας και Διδάσκουσα Βιολογίας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, για την πολύτιμη βοήθεια, την καθοδήγησή της, αλλά και τη συμβολή της στα βιολογικά ερευνητικά πειράματα που πραγματοποιήθηκαν.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κα Μπούμπα Βασιλική, καθηγήτρια του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, και τον κ. Μιχαηλίδη Θεολόγο, καθηγητή του τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών του Πανεπιστημίου

Ιωαννίνων, που συμφώνησαν να αποτελέσουν μέλη της τριμελούς επιτροπής αξιολόγησης της μεταπτυχιακής διπλωματικής μου εργασίας.

Ακολούθως, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Χατζηδημητρίου Αντώνιο, καθηγητή του τμήματος Χημείας του Αριστοτέλειου Πανεπιστήμιου Θεσσαλονίκης, για την επίλυση της κρυσταλλικής δομής της ένωσης με ανάλυση Περίθλασης Ακτινών Χ (XRD), καθώς και τον κ. Βαγενά Γεώργιο, υποψήφιο διδάκτορα του Εργαστηρίου Βιολογικής Ανόργανης Χημείας, για την βοήθειά του κατά την έναρξη της διατριβής μου.

Θα ήθελα, επίσης, να ευχαριστήσω πάρα πολύ τους φίλους και συναδέλφους μου στο Εργαστήριο Ανόργανης Βιολογικής Χημείας για τη συνεργασία, τη βοήθεια και το ιδανικό κλίμα που επικρατούσε στο εργαστήριο καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της μεταπτυχιακής διατριβής μου.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω ολόψυχα τους γονείς μου για την ατελείωτη υποστήριξη και εμπιστοσύνη που μου έδειξαν και μου δείχνουν καθ' όλη την διάρκεια των ακαδημαϊκών σπουδών μου. Θερμές ευχαριστίες και στους υπόλοιπους δικούς μου ανθρώπους και φίλους που στάθηκαν δίπλα μου όλα αυτά τα χρόνια.

Περίληψη

Από τις αρχές της βιομηχανικής επανάστασης μέχρι και σήμερα, οι ανθρωπογενείς δραστηριότητες έχουν εντείνει την εξόρυξη και απελευθέρωση του μόλυβδου στο περιβάλλον. Η συσσώρευσή του στο περιβάλλον αποτελεί σοβαρή απειλή για την υγεία του ανθρώπου, των ζώων και των φυτών. Αν και έχουν εγκαθιδρυθεί νομοθεσίες σχετικά με τον περιορισμό του, η έκθεση σε αυτόν τον τοξικό παράγοντα είναι ακόμα πιθανή.

Η αντιμετώπιση της δηλητηρίασης από μόλυβδο πραγματοποιείται κυρίως μέσω της θεραπείας με χηλίωση. Στα πλαίσια του σχεδιασμού ενός νέου, λιγότερο τοξικού παράγοντα χηλίωσης, πέρα από τους ήδη υπάρχοντες, αξιοποιήθηκε το SalH. Στην παρούσα διπλωματική εργασία, προτείνεται η χρήση του **SalK** ως πιθανό αντίδοτο για την δηλητηρίαση από μόλυβδο και συντέθηκε ένα σύμπλοκο του SalH με Pb, το **SaLead**. Συγκεκριμένα, το πολυμερές $\{[Pb(Sal)_2(H_2O)]_n\}$ (**SaLead**) συντέθηκε κατά την αντίδραση νιτρικού μόλυβδου(II) με σαλικυλικό κάλιο σε υδατικό διάλυμα.

Ο χαρακτηρισμός του συμπλόκου πραγματοποιήθηκε με τις εξής τεχνικές: προσδιορισμός του σημείου τήξεως, προσδιορισμός διαλυτότητας, φθορισμός ακτίνων X (XRF), υπέρυθη φασματοσκοπία μετασχηματισμού Fourier με αποσβένουσα ολική ανάκλαση (ATR-FTIR), φασματοσκοπία υπεριώδους-ορατού (UV-Vis), φασματοσκοπία φθορισμού και φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού πρωτονίου (1H -NMR). Η κρυσταλλική δομή επιλύθηκε με Περίθλαση Ακτίνων X μονοκρυστάλλου (XRD).

Επίσης, έγινε προσδιορισμός της σταθεράς πρόσδεσης του μόλυβδου στο SalH. Κατά τη βιολογική μελέτη ελέγχθηκε η *in vitro* κυτταροτοξική και γενετοξική δράση των συμπλόκων **SalK** και **SaLead** έναντι υγιών κυττάρων πνεύμονα (MRC-5) μέσω της δοκιμής με σουλφοροδαμίνη Β και της δοκιμής των μικροπυρηνίσκων. Επιπλέον, ερευνήθηκε η *in vivo* τοξικότητά τους έναντι του φυτικού οργανισμού *Allium cepa* και του ζωοπλαγκτού *Artemia salina*. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι δύο παράγοντες δεν είναι τοξικοί προς τα κύτταρα και τους οργανισμούς, ούτε προκαλούν γενετικές βλάβες σε αυτά. Συνεπώς, το **SalK** θα μπορούσε να αξιοποιηθεί στην δηλητηρίαση από μόλυβδο ως πιθανό αντίδοτο.

Abstract

From the beginning of the industrial revolution to the present day, anthropogenic activities have intensified the extraction and release of lead into the environment. Its accumulation in the environment poses a serious threat to human, animal and plant health. Although legislation has already been established to limit its release in the environment, the exposure to this toxic agent is still a severe problem.

Treatment of lead poisoning is mainly carried out through chelation therapy. In order to design a new, less toxic chelation agent, the possible role of SalH was examined. In this thesis, the use of **SalK** is proposed as a potential antidote for lead poisoning and a complex of SalH with Pb, **SaLead**, was synthesized.

The new water-soluble complex, **SaLead**, with the formula $\{[\text{Pb}(\text{Sal})_2(\text{H}_2\text{O})]_n\}$, was obtained from the reaction between $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ and the potassium salt of salicylic acid (SalH). SalH is an anti-inflammatory drug, widely used in medicine, as food preservation, in cosmetics etc. The compound was characterized by melting point, Attenuated Total Reflectance-Fourier Transform Infra-Red (ATR-FTIR), in solid state and in solution by Ultra Violet (UV) and Nuclear Magnetic Resonance ($^1\text{H-NMR}$) spectroscopies and X-ray diffraction crystallography (XRD).

The binding Affinity of Pb to SalH was also determined in order to examine its possible implementation in lead detoxification. In the biological study, the *in vitro* cytotoxic and genotoxic activity of **SalK** and **SaLead** complexes against normal human fetal lung fibroblast cells (MRC-5) was tested by the Sulforhodamine B assay and the micronucleus assay (MN). In addition, the *in vivo* toxicity of the two compounds was

investigated against *Allium cepa* and the zooplankton *Artemia salina*. The results showed that the two agents are not cytotoxic, nor genotoxic. Therefore, **SaIK** could be exploited in lead poisoning as a potential antidote.

Περιεχόμενα

Ευχαριστίες.....	6
Περίληψη.....	8
Abstract.....	10
Συντομογραφίες.....	16
A. Θεωρητικό μέρος.....	19
Μόλυβδος.....	19
Ρύπανση με μόλυβδο και πηγές έκθεσης.....	22
Πηγές έκθεσης στον μόλυβδο σε διάφορες περιοχές.....	24
Χώρες χαμηλού εισοδήματος.....	25
Χώρες υψηλού εισοδήματος.....	26
Δηλητηρίαση από μόλυβδο.....	28
Απορρόφηση μόλυβδου.....	28
Όρια μόλυβδου στο αίμα.....	30
Τοξικότητα μόλυβδου σε κυτταρικό επίπεδο.....	32
Τοξικότητα μόλυβδου σε επίπεδο οργάνων και συστημάτων.....	38
Διάγνωση και συμπτώματα δηλητηρίασης από μόλυβδο.....	40
Πρόληψη και αντιμετώπιση δηλητηριάσεων.....	42
Θεραπεία.....	43
Περιγραφή υπαρχόντων αντιδότηων.....	47

Πενικιλλαμίνη (penicillamine)	47
Διμερκαπρόλη (Dimercaprol, BAL).....	48
DMSA (2,3-Dimercaptosuccinic acid) και DMPS (2,3-dimercaptopropane-1-sulfonic acid)	50
EDTA ή CaNa ₂ EDTA	53
Σαλικυλικό οξύ	56
Χρήσεις σαλικυλικού οξέος στον άνθρωπο	57
Τοξικότητα βαρέων μετάλλων στα φυτά.....	59
Σύνθεση σαλικυλικού οξέος στα φυτά	62
Ο ρόλος του σαλικυλικού οξέος στην τοξικότητα των φυτών από βαρέα μέταλλα	64
Η περίπτωση του μόλυβδου	67
B. Σκοπός.....	70
Γ. Πειραματικό μέρος.....	71
Υλικά και μέθοδοι	71
Σύνθεση και χαρακτηρισμός της ένωσης	73
Σύνθεση και κρυστάλλωση	73
Σημείο τήξης.....	74
Διαλυτότητα	75
Φασματοσκοπία XRF	75
Κρυσκοπία.....	77

XRD.....	78
Φασματοσκοπία ATR-FTIR.....	80
Φασματοσκοπία UV-Vis	80
Φασματοσκοπία Φθορισμού.....	81
Φασματοσκοπία ¹ H-NMR	82
Εύρεση σταθεράς πρόσδεσης	84
Βιολογικές μελέτες.....	85
Μελέτη της in vitro τοξικότητας	85
IC ₅₀ έναντι MRC-5 κυττάρων	85
Μικροπυρήνες	86
Μελέτη της in vivo τοξικότητας.....	87
Δοκιμή Allium cepa.....	87
Δοκιμή Artemia salina.....	88
Δ. Αποτελέσματα – Συζήτηση.....	89
Σύνθεση και χαρακτηρισμός της ένωσης	89
Σύνθεση και κρυστάλλωση	89
Σημείο τήξης.....	91
Διαλυτότητα	92
Φασματοσκοπία XRF	93
Κρυσκοπία.....	93
XRD.....	95

Φασματοσκοπία ATR-FTIR.....	98
Σταθερότητα μέσω φασματοσκοπιών	100
Φασματοσκοπία UV-Vis	100
Φασματοσκοπία Φθορισμού.....	104
Φασματοσκοπία ¹ H-NMR	104
Εύρεση σταθεράς πρόσδεσης	107
Βιολογικές μελέτες.....	110
Μελέτη της in vitro τοξικότητας	110
IC ₅₀ έναντι MRC-5 κυττάρων	110
Μικροπυρήνες	111
Μελέτη της in vivo τοξικότητας.....	113
Δοκιμή Allium cepa.....	113
Δοκιμή Artemia salina.....	117
Ε. Συμπεράσματα	119
ΣΤ. Βιβλιογραφία	122
Παράρτημα	135
Πίνακας εικόνων.....	135

Συντομογραφίες

ALAD	deltaaminolevulinic acid dehydratase (αφυδρατάση του αμινολεβουλινικού οξέος)
BAL	Dimercaptopropanol (διμερκαπρόλη)
CA	Chromosomal Aberration (χρωμοσωμικές ανωμαλίες)
CaNa ₂ EDTA	calcium disodium erthylene diamine tetraacetic acid
CHCl ₃	Chloroform (χλωροφόρμιο)
CH ₂ Cl ₂	Dichloromethane (διχλωρομεθάνιο)
COX	cyclooxygenase (κυκλοοξυγενάση)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMF	Dimethylformamide (διμέθυλ-φορμαμίδιο)
DMSA	2,3-Dimercaptosuccinic acid (2,3-διμερκαπτοσουκκινικό οξύ)
DMSO	dimethyl sulfoxide (διμεθυλ σουλφοξείδιο)
ddH ₂ O	double distilled water (διπλά απεσταγμένο νερό)
GSH	Glutathione (γλουταθειόνη)
H ₂ O ₂	Hydrogen peroxide (υπεροξείδιο του υδρογόνου)
ICS	Isochorismate synthase (συνθάση ισοχωρισμικού)
MeCN	Acetonitrile (ακετονιτρίλιο)
MeOH	Methanol (μεθανόλη)
MI	Mitotic Index (μιτωτικός δείκτης)

MIA	Mitotic Index Alteration (μεταβολή του μιτωτικού δείκτη)
NA	Nuclear Abnormalities (πυρηνικές ανωμαλίες)
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (φωσφορικό δινουκλεοτίδιο νικοτιναμίδης αδενίνης)
NADS	nicotinamide adenine dinucleotide synthetase (συνθετάση του νικοτιδάμινου αδένινο δινουκλεοτιδίου)
NMR	Nuclear Magnetic Resonance (πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός)
PAL	phenylalanine ammonia-lyase (λύαση αμμωνίας φαινυλαλανίνης)
Pb(NO ₃) ₂	Lead nitrate (νιτρικός μόλυβδος)
PBS	Phosphate buffer saline (αλατούχο διάλυμα ρυθμισμένο με φωσφορικά)
PKC	Protein kinase C (πρωτεϊνική κινάση C)
ROS	Reactive oxygen species (δραστικές ρίζες οξυγόνου)
SalH	Salicylic acid (σαλικυλικό οξύ)
SalK	Salicylic potassium (σαλικυλικό κάλιο)
SOD	Superoxide dismutase (δισμουτάση του υπεροξειδίου του υδρογόνου)
SRB	Sulforhodamine B (σουλφοροδαμίνη B)
TEL	Tetraethyllead (τετρααιθυλομόλυβδος)
UV (radiation)	Ultraviolet (radiation) (Υπεριώδης ακτινοβολία)

UV-Vis	Ultraviolet-visible spectroscopy (φασματοφωτομετρία υπεριώδους)
XRD	X-ray diffraction (περίθλαση ακτίνων X)
XRF	X-ray fluorescence (φθορισμός ακτίνων X)

Α. Θεωρητικό μέρος

Μόλυβδος

Ο μόλυβδος είναι ένα σύννηθες στοιχείο, το οποίο βρίσκεται σε μικρές ποσότητες στον φλοιό της Γης (εικόνα 1) [1]. Οι ανόργανες ενώσεις του συνήθως είναι ανοιχτόχρωμες και χρησιμοποιούνταν ως χρωστικές [2]. Ήδη από την αρχαιότητα, εξορύσσεται και κατεργάζεται, ενώ χρησιμοποιούνταν ακόμα και στην Ιατρική ή ως καλλυντικό προϊόν [3]. Σε αυτές τις χρήσεις, όπως και στη χρήση του σε εργαλεία, συμβάλει το χαμηλό σημείο τήξεως και η ευπλαστότητά του [2]. Η τοξική του φύση και η πρόκληση ασθενειών είχε αναφερθεί από τον Ιπποκράτη το 370 π.Χ. («lead colic») [2], όπως και από τον Έλληνα φυσιολόγο Νίκανδρο τον 2 αιώνα π.Χ. [3]. Αργότερα, στην Ρώμη, ο μόλυβδος χρησιμοποιούνταν ως συντηρητικό για το κρασί και στα συστήματα ύδρευσης της πόλης (εικόνα 2) [2].



Εικόνα 1: Μόλυβδος (τροποποιημένη εικόνα από Carsten Niehaus, Public domain, via Wikimedia Commons)

Κατά τη βιομηχανική επανάσταση οι συγκεντρώσεις του μόλυβδου αυξήθηκαν σε μεγάλο βαθμό [4], εξαιτίας της ευρείας χρήσης του ως μετάλλευμα, αλλά και στο πετρέλαιο κατά την εμφάνιση των μηχανοκίνητων οχημάτων [5]. Τον 19^ο αιώνα μ.Χ. περιεγράφηκαν οι επιπτώσεις της δηλητηρίασης από μόλυβδο σε ενήλικες και παιδιά [3]. Εκείνη την περίοδο ήταν πολύ συνηθισμένη η δηλητηρίαση από μόλυβδο στους εργάτες που απασχολούνται με μπογιές, σωληνώσεις, ή σε μεταλλουργεία και άλλες βιομηχανικές δραστηριότητες [5]. Αξίζει να σημειωθεί πως η μέγιστη χρήση του μόλυβδου πραγματοποιήθηκε από το 1924, όταν και ανακαλύφθηκε η χρήση του τετρααιθυλομόλυβδου (TEL) στην βενζίνη, έως και τη δεκαετία του '70, όταν και απαγορεύτηκε εξαιτίας των προβλημάτων υγείας που προκαλούσε [2].



Εικόνα 2: Ρωμαϊκό υδραυλικό κατασκεύασμα από μόλυβδο (τροποποιημένη εικόνα από G._Dall'Ortoderivative work: F. Lamiot, CC BY-SA 2.5 <<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/2.5>>, via Wikimedia Commons)

Ο μόλυβδος στις μέρες μας χρησιμοποιείται κυρίως στην κατασκευή μπαταριών, στα πυρομαχικά, σε μεταλλικά προϊόντα, όπως σωλήνες και συγκολλήσεις, και συσκευές, όπως ασπίδες για την προστασία από ακτίνες X [4]. Έχει, επίσης, πλέον απαγορευτεί η χρήση του σε μπογιές, κεραμικά, σωληνώσεις νερού και στη βενζίνη, λόγω των σοβαρών επιπτώσεων στην υγεία του ανθρώπου [4].

Η έκθεση σε μόλυβδο λόγω επαγγελματικής απασχόλησης (κυρίως στους εργάτες) και η εμφάνιση συμπτωμάτων δηλητηρίασης είναι ακόμα και σήμερα ένα συχνό φαινόμενο [5]. Τα σύγχρονα επαγγέλματα, τα οποία ενέχουν αυτόν τον κίνδυνο, είναι τα επαγγέλματα που εμπλέκονται με την συναρμολόγηση μηχανοκίνητων οχημάτων, κατασκευή μπαταριών, κατασκευή πυρομαχικών, εξόρυξη και μεταλλουργεία του μόλυβδου, κατασκευή κραμάτων μόλυβδου και σε βιομηχανίες γυαλιού, πλαστικών, κεραμικών και μπογιάς [5].

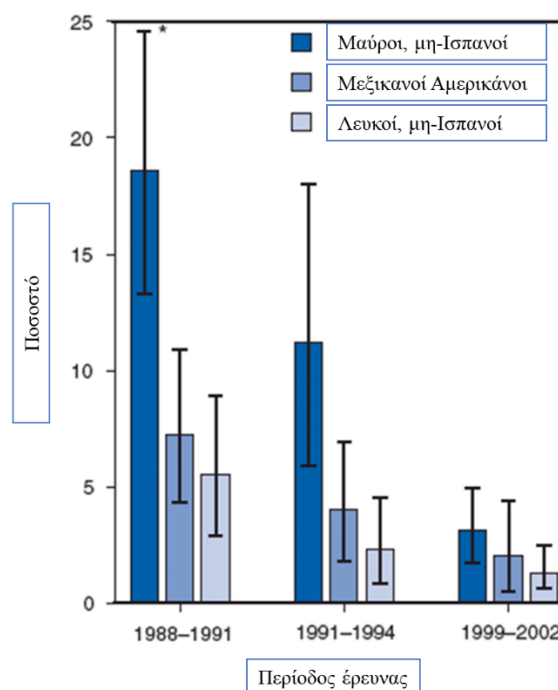
Ρύπανση με μόλυβδο και πηγές έκθεσης

Ο ανόργανος μόλυβδος θεωρείται ένας από τους αρχαιότερους παράγοντες δηλητηρίασης και καταλογίζεται ως τοξίνη [6]. Ο μόλυβδος μπορεί να βρεθεί σε κάθε περιβάλλον και προέρχεται κυρίως από την ανθρώπινη δραστηριότητα, όπως την βιομηχανία, την εκμετάλλευση ορυχείων, τα ορυκτά καύσιμα, την μεταλλουργία και την απόρριψη ρυπαντικών ουσιών, όπως μπογιές, αμόλυβδη βενζίνη και εντομοκτόνα [6], καθώς χρησιμοποιείται ευρέως σε οικοδομικά υλικά, στις μπογιές, στις μπαταρίες και στις σωληνώσεις [1]. Επιπλέον, σχεδόν όλες οι ηλεκτρονικές συσκευές περιέχουν μόλυβδο, ο οποίος, μετά την απόρριψή τους, καταλήγει στο περιβάλλον και στον υδροφόρο ορίζοντα [3].

Η έκθεση στον μόλυβδο πραγματοποιείται κυρίως μέσω της επαγγελματικής δραστηριότητας των ανθρώπων [6]. Ιδιαίτερα οι εργάτες σε ορυχεία επηρεάζονται κάθε χρόνο από την έκθεση σε καυσαέρια, σκόνη και ομίχλη, τα οποία μεταφέρουν ενώσεις ή ουσίες που περιέχουν μόλυβδο [6]. Κυριότερες πηγές έκθεσης πλέον αποτελεί η καύση ορυκτών καυσίμων, η αποτέφρωση αποβλήτων και οι εκπομπές από ορυχεία ή μεταλλουργία [3]. Από αυτές τις πηγές προκύπτουν πολλά παράγωγα ή σύμπλοκα με δισθενή μόλυβδο, τα οποία παραμένουν στο περιβάλλον και είναι δύσκολη ή πολύ ακριβή η διαδικασία απομάκρυνσής τους [7].

Παγκοσμίως, ένα μεγάλο μέρος του πληθυσμού εκτίθεται σε τοξικά επίπεδα μόλυβδου, ειδικά στις αναπτυσσόμενες χώρες [3]. Οι άνθρωποι χαμηλότερων οικονομικών και κοινωνικών στρωμάτων απειλούνται σε μεγαλύτερο βαθμό από την δηλητηρίαση από μόλυβδο, καθώς είθισται να μένουν σε βιομηχανικές περιοχές ή περιοχές με αυξημένη κίνηση και, ως συνέπεια, να εκτίθενται σε μεγαλύτερα ποσοστά

μόλυβδου καθημερινά (εικόνα 3) [5]. Ακόμα και η κακή διατροφή ή η πιθανή έλλειψη θρεπτικών ουσιών τους καθιστά πιο ευάλωτους [5]. Αξίζει να αναφερθεί ότι ένα μέρος του πληθυσμού εκτίθεται σε μόλυβδο ακόμα και εξαιτίας παραδοσιακών θεραπειών και φαρμάκων, όπου χρησιμοποιείται το συγκεκριμένο μέταλλο [3].



Εικόνα 3: Διάγραμμα για το ποσοστό των παιδιών ηλικίας 1-5 ετών με επίπεδο μόλυβδου στο αίμα πάνω από 10 µg/dL βάσει εθνικότητας (τροποποιημένη εικόνα από CDC, Public domain, via Wikimedia Commons)

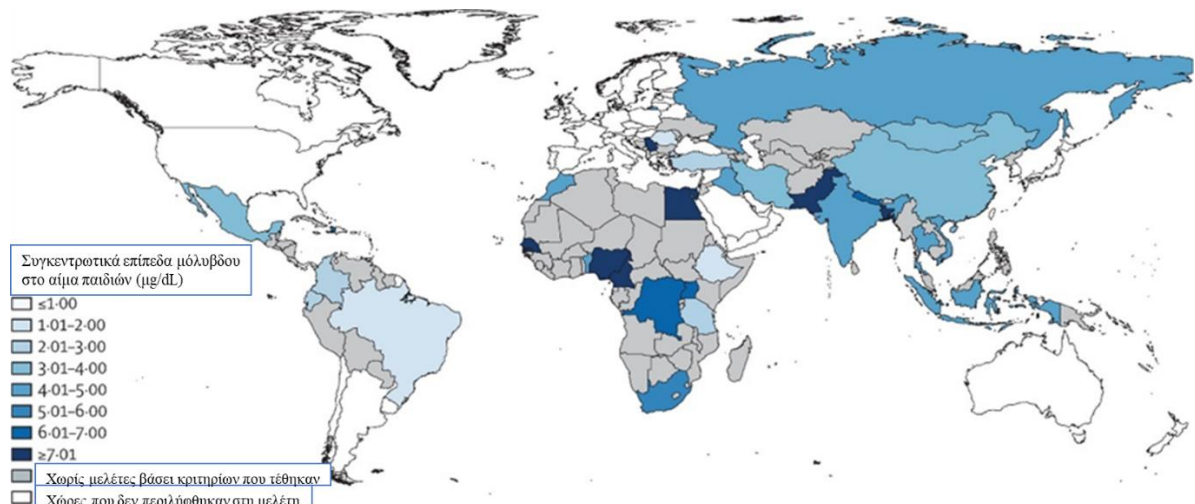
Άλλες δευτερεύουσες πηγές έκθεσης αποτελούν τα παιχνίδια, τα ψεύτικα κοσμήματα και κάποια οικιακά σκευή [3]. Ειδικά τα έτη 2007 και 2008, εκατοντάδες αντικείμενα κατασκευασμένα κυρίως στην Κίνα ανακλήθηκαν από το εμπόριο, εξαιτίας

της ύπαρξης μόλυβδου στα υλικά κατασκευής τους [3]. Για παράδειγμα, σε πολλά παιχνίδια, εντοπίστηκε μόλυβδος στη βαφή τους [3]. Εντοπίστηκαν, επίσης, τμήματα των παιχνιδιών ή και ολόκληρα παιχνίδια που περιείχαν μόλυβδο [3]. Ακόμα και στα παιδικά, ψεύτικα κοσμήματα υπήρξαν πολλές καταγραφές για υψηλή περιεκτικότητα σε μόλυβδο [3].

Σημαντική επίδραση στην τοξικότητα του μόλυβδου έχει ο χρόνος της έκθεσης [6]. Η χρόνια έκθεση στον μόλυβδο προκαλεί τη βιοσυσσωρεύσή του στο σώμα με σοβαρές επιπτώσεις στην υγεία του ανθρώπου [6]. Οι επιπτώσεις επηρεάζονται, επίσης, από την ηλικία και τις προσωπικές συνήθειες του εκτιθέμενου ατόμου, όπως π.χ. το κάπνισμα [6].

Πηγές έκθεσης στον μόλυβδο σε διάφορες περιοχές

Στην εικόνα 4 παρουσιάζεται ένας παγκόσμιος χάρτης στον οποίο φαίνονται τα επίπεδα μόλυβδου στο αίμα παιδιών ηλικίας 0 με 14 ετών σε 34 χώρες χαμηλού ή μέσου εισοδήματος [8]. Οι χώρες επιλέχθηκαν βάσει εισοδήματος και διαθέσιμων δεδομένων σχετικά με τα επίπεδα μόλυβδου σε ενήλικες και παιδιά και συνεπώς στην μελέτη συμμετείχαν μόνο οι 34 από τις 137 αναπτυσσόμενες χώρες [8]. Ακόμα και από αυτό τον περιορισμένο αριθμό δεδομένων, προέκυψε ότι στις χώρες χαμηλού εισοδήματος παρατηρούνται υψηλότερες μέσες τιμές μόλυβδου στο αίμα ενήλικων και παιδιών σε σύγκριση με τις χώρες υψηλού εισοδήματος [8].



Εικόνα 4: Χάρτης ανάγνωσης μόλυβδου στο αίμα παιδιών ηλικίας 0 – 14 ετών σε 34 χώρες χαμηλού ή μέσου εισοδήματος (τροποποιημένη εικόνα από [8])

Χώρες χαμηλού εισοδήματος

Η κύρια πηγή έκθεσης στην Κίνα είναι η βιομηχανία [9]. Οι εκπομπές (παλαιότερες, αλλά και πρόσφατες) από τα εργοστάσια, τα καυσαέρια από τα αυτοκίνητα, τα ηλεκτρονικά απόβλητα, η χρήση του σε μπογιές αλλά και σε παραδοσιακές θεραπείες συμβάλουν στα αυξημένα επίπεδα μόλυβδου στο αίμα ενός στα τρία παιδιών [9]. Παρόμοια κατάσταση επικρατεί και στην Ινδία όπου ακόμα υπάρχουν επιπτώσεις από τη χρήση βενζίνης με μόλυβδο μέχρι και το 2001, με τη χρήση του στις μπογιές να συνεχίζεται σε ένα μεγάλο βαθμό [9]. Στις προαναφερθείσες πηγές έκθεσης προστίθενται και οι βιομηχανίες κατασκευής μπαταριών και ασημένιων κοσμημάτων [9].

Στην Νιγηρία υπάρχει μεγάλη περιβαλλοντική ρύπανση σχετικά με τον μόλυβδο από προηγούμενες χρήσεις του στη βενζίνη, στις μπογιές, σε εισαγόμενα κεραμικά, σε παλιά εξαρτήματα και τμήματα αυτοκινήτων, καθώς και εξαιτίας της φτωχής διαχείρισης των ηλεκτρονικών αποβλήτων και μπαταριών [9]. Ομοίως, στο Μεξικό τα αυξημένα επίπεδα μόλυβδου στο αίμα παιδιών και ενηλίκων οφείλονται στα καυσαέρια

αυτοκινήτων και μεταλλουργείων και στην οικιακή χρήση κεραμικών συσκευών που περιέχουν μόλυβδο [9].

Χώρες υψηλού εισοδήματος

Ακόμα και σε χώρες υψηλού εισοδήματος παρατηρούνται επιπτώσεις εξαιτίας της έκθεσης του πληθυσμού σε διάφορες πηγές μόλυβδου [9]. Στην Γαλλία οι κυριότερες πηγές μόλυβδου αφορούν παλιά οικοδομήματα με μπογιά που περιέχουν μόλυβδο και σωληνώσεις μόλυβδου (άρα και μολυσμένο νερό), εισαγόμενα κεραμικά και καλλυντικά, καθώς και βιομηχανικές εκπομπές (π.χ. από εργοστάσια μεταλλουργίας) [9].

Ομοίως, στην Αυστραλία, οι μπογιές με μόλυβδο, τα εισαγόμενα παιχνίδια και παραδοσιακά φάρμακα, σε συνδυασμό με τη σκόνη, προκαλούν την ρύπανση του περιβάλλοντος με μόλυβδο [9]. Μάλιστα, μία μελέτη που πραγματοποιήθηκε το 2013 στο Κουίνσλαντ (Queensland) της Αυστραλίας έδειξε ότι η πηγή μόλυνσης με μόλυβδο είναι η ατμοσφαιρική ρύπανση από τις εκπομπές των ορυχείων και των μεταλλουργείων της περιοχής [10]. Αντίστοιχη μελέτη στην περιοχή του Σίδνεϋ από το 2010 μέχρι το 2012 απέδειξε ότι το μολυσμένο με μόλυβδο χώμα σε εξωτερικούς χώρους εισέρχεται σε αστικά σπίτια και αποτελεί την κύρια πηγή μόλυβδου, ενώ παράλληλα προτείνει την αποκατάσταση του εδάφους της περιοχής [11].

Η Αμερική δεν αποτελεί εξαίρεση αναφορικά με τις πηγές μόλυβδου [9]. Αξίζει να σημειωθεί πως λόγω του έντονα βιομηχανικού χαρακτήρα της, έχει παρατηρηθεί υψηλή επιβάρυνση στο περιβάλλον, το οποίο αποτελεί πλέον και πηγή έκθεσης [9]. Οι μπογιές, τα εισαγόμενα κεραμικά και οι μπαταρίες συμπληρώνουν την τετράδα των σημαντικότερων πηγών έκθεσης στην Αμερική [9].

Στον πίνακα 1 παρουσιάζονται συνοπτικά οι κυριότερες πηγές έκθεσης στο μόλυβδο τα τελευταία χρόνια, αφού δηλαδή εγκαθιδρύθηκαν οι σχετικές νομοθεσίες για την απαγόρευση της χρήσης του [9].

Πίνακας 1: Παρουσίαση των συνηθέστερων πηγών έκθεσης που καταγράφονται παγκοσμίως

Συνηθέστερες πηγές έκθεσης στο μόλυβδο παγκοσμίως	
Βιομηχανικές εκπομπές	Απόβλητα από μπαταρίες
Μπογιές που περιέχουν μόλυβδο	Απόρριψη ηλεκτρονικών συσκευών
Εισαγόμενα καλλυντικά	Εισαγόμενα παιχνίδια
Παραδοσιακά φάρμακα και θεραπείες	Εισαγόμενα κεραμικά

Δηλητηρίαση από μόλυβδο

Απορρόφηση μόλυβδου

Η απορρόφηση, αλλά και η επίδραση του μόλυβδου, εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την ηλικία, την κατάσταση της υγείας και την διατροφική κατάσταση του εκτιθέμενου [2]. Τα παιδιά απορροφούν 5 έως 10 φορές περισσότερο μόλυβδο σε σχέση με τους ενήλικες και γι' αυτό θεωρούνται και πιο ευαίσθητα στην έκθεση σε μόλυβδο [2].

Πιο συγκεκριμένα, τα παιδιά, οι εγκυμονούσες γυναίκες και τα άτομα με ελλείψεις σε βασικές θρεπτικές ουσίες και κακή διατροφική κατάσταση απορροφούν το 40 – 70% του μόλυβδου που προσλαμβάνουν [2]. Οι διατροφικές ελλείψεις σε σίδηρο, ασβέστιο, ψευδάργυρο και ασκορβικό οξύ αυξάνουν την απορρόφηση του μόλυβδου από την γαστρεντερική κοιλότητα [2]. Τα ενήλικα άτομα απορροφούν το 20% της ποσότητας του μόλυβδου που προσλαμβάνουν με την τροφή και το 100% που προσλαμβάνουν με την εισπνοή μέσω του αέρα [2]. Επιπλέον, οι ενήλικες τείνουν να αποβάλλουν την πλειονότητα του μόλυβδου μέσα σε λίγες εβδομάδες έπειτα από οξεία έκθεση, ενώ τα παιδιά χρειάζονται παραπάνω χρόνο για την ίδια διαδικασία [2].

Όπως προαναφέρθηκε, ο μόλυβδος είναι μία επίμονη νευροτοξίνη [3]. Η είσοδος του στον οργανισμό πραγματοποιείται κυρίως μέσω κατάποσης ή εισπνοής [2,3]. Η κατάποση αφορά κυρίως τα παιδιά, ενώ η εισπνοή τους ενήλικες [2]. Οι οδοί μεταφοράς του μόλυβδου είναι κυρίως ο αέρας, το νερό και η τροφή, αλλά απορροφάται και μέσω της σκόνης και του χώματος στο έδαφος [5]. Η μεταφορά του μόλυβδου σε όλο το σώμα πραγματοποιείται μέσω της σύνδεσής του στα ερυθροκύτταρα (εικόνα 5) [3]. Μέσω του

αίματος μεταφέρεται σε όλους τους μαλακούς ιστούς στο σώμα, όπως το συκώτι, τα νεφρά, τους πνεύμονες, τον σπλήνα, την καρδιά και τους μύες [3]. Το συκώτι αποτελεί τη μεγαλύτερη αποθήκη μόλυβδου αναφορικά με τους μαλακούς ιστούς, αποθηκεύοντας το 33% του μόλυβδου που κυκλοφορεί στο αίμα [1].



Εικόνα 5: Ερυθροκύτταρα εκτεθειμένα σε μόλυβδο (τροποποιημένη εικόνα από Herbert L. Fred, MD and Hendrik A. van Dijk, CC BY 2.0 <<https://creativecommons.org/licenses/by/2.0/>>, via Wikimedia Commons)

Ο χρόνος ημιζωής του μόλυβδου στον ορό του αίματος εξαρτάται από την διάρκεια της έκθεσης, αλλά ένας μέσος χρόνος ημιζωής θεωρούνται οι 30 μέρες, μέσα στις οποίες μέρος του αποβάλλεται μέσω της χολής και των ούρων [2]. Αντίστοιχα, στους μαλακούς ιστούς, ο χρόνος ημιζωής του μόλυβδου ανέρχεται στις 40 ημέρες [2].

Με την πάροδο του χρόνου ο μόλυβδος συσσωρεύεται στους πιο σκληρούς ιστούς, όπως τα οστά και τα δόντια [3]. Η κατανομή του διαφοροποιείται σε ενήλικες και

παιδιά [3]. Στους ενήλικες το 94% της συνολικής ποσότητας του μόλυβδου στο σώμα βρίσκεται στα οστά και τα δόντια [3]. Στα παιδιά το 73% του μόλυβδου εντοπίζεται στα οστά τους [3]. Ο μόλυβδος δύναται να αποθηκευτεί στα οστά για ολόκληρες δεκαετίες [3].

Από τα οστά ο μόλυβδος μπορεί να ανακατανεμηθεί στο αίμα [1]. Οι μελέτες δείχνουν ότι το 40 – 70% του μόλυβδου στο αίμα των ενηλίκων προέρχεται από τα οστά [1]. Αξίζει να σημειωθεί ότι η κατανομή και η απελευθέρωση του μόλυβδου συμβαδίζει με αυτή του ασβεστίου [2]. Συνεπώς, σε περιόδους αυξημένης χρήσης του ασβεστίου, όπως κατά την εγκυμοσύνη, την εμμηνόπαυση, την επούλωση σπασμένων οστών και τις χρόνιες ασθένειες, αυξάνεται και η ανακατανομή του μόλυβδου από τα οστά στο υπόλοιπο σώμα [2].

Επιπλέον, ο μόλυβδος μπορεί να περάσει διαμέσου του πλακούντα και ως αποτέλεσμα, το βρέφος έχει παρόμοια συγκέντρωση μόλυβδου στο αίμα με τη μητέρα του [12]. Η πηγή της συγκεκριμένης ποσότητας μόλυβδου φαίνεται να προέρχεται κυρίως (κατά 66%) από τη διατροφή της μητέρας, αλλά και από την απελευθέρωση μόλυβδου από τα οστά της (κατά 33%) [12].

Όρια μόλυβδου στο αίμα

Τα επίπεδα μόλυβδου στο αίμα αποτελούν μία εύκολη μέθοδο καταγραφής της έκθεσης και αντανακλούν άμεσα στην οξεία έκθεση σε αυτόν τον τοξικό παράγοντα, αλλά δεν αντανακλούν την ζημιά που ίσως προκλήθηκε από την έκθεση στα όργανα [2].

Επίσης, πιθανή παρατηρούμενη μείωση των επιπέδων του μόλυβδου στο αίμα οφείλεται και στην ανακατανομή τους στους ιστούς και στα οστά [2]. Συνεπώς, και η χρόνια έκθεση σε μόλυβδο δεν θα αντανακλάται στα αντίστοιχα επίπεδα στο αίμα, αλλά σε αυξημένη συγκέντρωσή του στο σώμα [2].

Η μέση συγκέντρωση μόλυβδου στο αίμα των ανθρώπων στην προ-βιομηχανική εποχή υπολογίζεται στα περίπου 0.016 $\mu\text{g}/\text{dL}$. Αυτή η τιμή είναι 50 με 200 περίπου φορές χαμηλότερη από τα χαμηλότερα καταγεγραμμένα επίπεδα σε ανθρώπους απομακρυσμένων περιοχών στο νότιο (0.78 $\mu\text{g}/\text{dL}$) και το βόρειο ημισφαίριο (3.20 $\mu\text{g}/\text{dL}$) σήμερα [5]. Ο μόλυβδος που είχε συσσωρευτεί σε απομεινάρια οστών από την προ-βιομηχανική εποχή υποδεικνύει ότι το επίπεδο μόλυβδου στο σώμα των ανθρώπων σήμερα είναι 500 με 1000 φορές υψηλότερο σε σχέση με τότε [5].

Πλέον, το όριο του μόλυβδου στο αίμα ενός υγιούς ενήλικα είναι μέχρι 25 $\mu\text{g}/\text{dL}$, ενώ στα παιδιά το ίδιο όριο είναι στα 10 $\mu\text{g}/\text{dL}$ [1]. Στους ενήλικες τα συμπτώματα της δηλητηρίασης από μόλυβδο εμφανίζονται όταν το επίπεδο μόλυβδου στο αίμα ξεπεράσει τα 40 $\mu\text{g}/\text{dL}$, ενώ στα παιδιά όταν ξεπεράσει τα 60 $\mu\text{g}/\text{dL}$ [1]. Τα όρια αυτά μεταβάλλονται και βάσει των χαρακτηριστικών κάθε ατόμου [1]. Επίσης, η από του στόματος θανατηφόρος δόση του μόλυβδου ανέρχεται στα 450 mg Pb/kg (body weight, b.w.), σύμφωνα με τα Κέντρα Ελέγχου και Πρόληψης Ασθενειών (Centers for Disease Control and Prevention, CDC) [13].

Τα πρώτα νευρολογικά προβλήματα, όπως πονοκέφαλοι, μειωμένη συγκέντρωση, κ.α., εμφανίζονται σε επίπεδα μόλυβδου 25-60 $\mu\text{g}/\text{dL}$ στους ενήλικες και 70 $\mu\text{g}/\text{dL}$ στα παιδιά [1]. Έχει βρεθεί ότι τα παιδιά με επίπεδα μόλυβδου στο αίμα πάνω από 10 $\mu\text{g}/\text{dL}$ παρουσιάζουν μειωμένο δείκτη νοημοσύνης (IQ) και ακαδημαϊκές

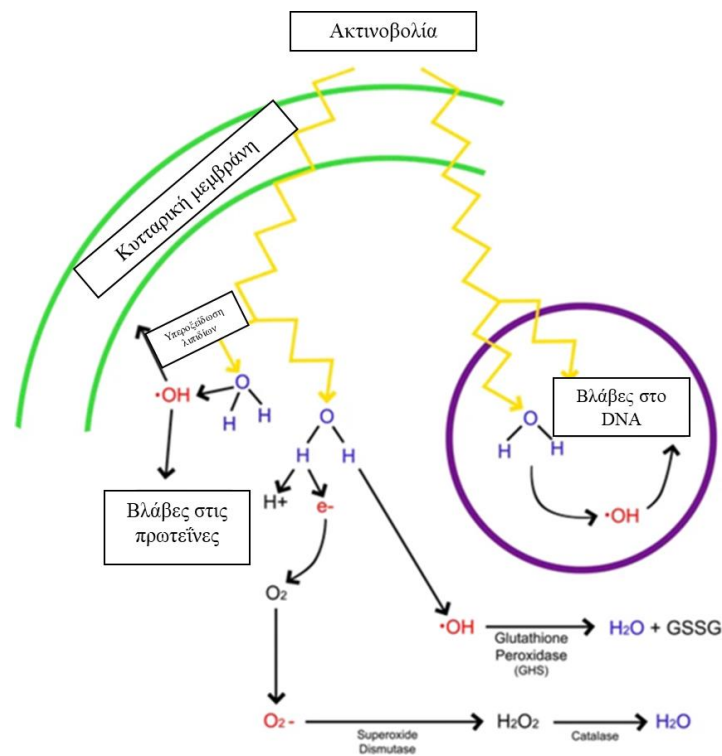
επιδόσεις, όπως επίσης και κοινωνικά προβλήματα προσαρμογής [10]. Αναιμία εμφανίζεται στα 50 µg/dL και κολλικοί πόνοι στα 80 µg/dL [1]. Τέλος, υπέρταση, παραλήρημα και εγκεφαλοπάθειες εμφανίζονται σε συγκεντρώσεις πάνω από 100 µg/dL [1].

Τα παιδιά θεωρούνται πιο ευάλωτα από τους ενήλικες ως προς τις επιδράσεις του μόλυβδου, εξ ου και το χαμηλότερο όριο μόλυβδου στο αίμα τους (10 µg/dL) [5]. Οι λόγοι της μεγαλύτερης ευαισθησίας τους είναι οι εξής: αρχικά, τα παιδιά προσλαμβάνουν μεγαλύτερη ποσότητα μόλυβδου ανά μονάδα βάρους σώματος [5]. Ακόμα και ο ρυθμός πρόσληψης του μόλυβδου είναι μεγαλύτερος στα παιδιά συγκριτικά με τους ενήλικες [5]. Επιπλέον, ειδικά τα μικρά παιδιά παρουσιάζουν συμπεριφορές, οι οποίες αυξάνουν την πρόσληψη μόλυβδου, όπως η τοποθέτηση σκονισμένων και βρώμικων αντικειμένων στο στόμα τους [5]. Τέλος, καθώς τα παιδιά βρίσκονται σε φάση ανάπτυξης, τα συστήματα οργάνων τους καθίστανται πιο ευάλωτα [5].

Τοξικότητα μόλυβδου σε κυτταρικό επίπεδο

Ο μόλυβδος φαίνεται να επιδρά έντονα στο μοριακό και στο κυτταρικό επίπεδο των οργανισμών [6]. Η τοξικότητα που επάγεται από μόλυβδο εκδηλώνεται κυρίως μέσω οξειδωτικού στρες [1]. Πιο συγκεκριμένα, αφορά την μείωση των αντιοξειδωτικών παραγόντων και την αύξηση των δραστικών ριζών οξυγόνου (ROS), όπως τα υπεροξειδία [1]. Βασικός αντιοξειδωτικός παράγοντας στο κύτταρο είναι η γλουταθειόνη (GSH), το 10% μόνο της οποίας είναι σε ενεργή, οξειδωτική μορφή [1]. Η δράση της έγκειται στην

αντίδραση με τις ROS, την σταθεροποίησή τους και την μετέπειτα μετατροπή της σε δισουλφίδιο της γλουταθειόνης (GSSG) [1]. Τέλος, ανάγεται και πάλι σε γλουταθειόνη από την αναγωγή της γλουταθειόνης (εικόνα 6) [1].



Εικόνα 6: Παραγωγή ROS από ιονίζουσα ακτινοβολία (τροποποιημένη εικόνα από Smith, T.A., Kirkpatrick, D.R., Smith, S. et al., CC BY-SA 4.0 <<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>>, via Wikimedia Commons)

Ο μόλυβδος αδρανοποιεί την γλουταθειόνη, καθώς μπορεί να δεσμευτεί στις θειολικές ομάδες της, και αυξάνει με τον τρόπο αυτό το οξειδωτικό στρες [1]. Ταυτόχρονα, ο μόλυβδος απενεργοποιεί ένζυμα που σχετίζονται με την αναγέννηση της γλουταθειόνης, όπως η αφυδρατάση του αμινολεβουλινικού οξέος (ALAD), η αναγωγή της γλουταθειόνης, η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης και η S-τρανσφεράση

της γλουταθειόνης [1]. Τέλος, ο μόλυβδος αποσταθεροποιεί την κυτταρική μεμβράνη, μέσω υπεροξειδωσής των λιπιδίων [1]. Όλα τα παραπάνω καθιστούν το κύτταρο ευάλωτο και οδηγούν σε κυτταρικό θάνατο [1].

Επίσης, υψηλά επίπεδα μόλυβδου στο σώμα μπορεί να προκαλέσουν μη αντιστρεπτές βλάβες σε γενετικό επίπεδο [6]. Ήδη από τις αρχές του αιώνα άρχισε να κατηγορείται ο μόλυβδος για καρκινογόνο και μεταλλαξιγόνο δράση στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς [6]. Τα ευρήματα, όμως, ήταν αμφισβητούμενα. Πλέον, είναι γνωστό ότι ο μόλυβδος προκαλεί γενετικές βλάβες στα κύτταρα των οργανισμών που εκτίθενται σε αυτόν τον ρυπαντή [6]. Συνεπώς, έχει πλέον σημανθεί ως πιθανή καρκινογόνος ουσία για τον άνθρωπο (Group 2A) από τον Διεθνή Οργανισμό για την Έρευνα του Καρκίνου (IARC) [1]. Οι άμεσοι και έμμεσοι, όμως, μηχανισμοί της καρκινογόνου δράσης του παραμένουν αδιευκρίνιστοι [6].

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, ο κυριότερος βιοδείκτης της έκθεσης σε μόλυβδο είναι η συγκέντρωση του μόλυβδου στο αίμα (blood lead, Pb – B) [14]. Αντίστοιχος βιοδείκτης είναι και η συγκέντρωση του μόλυβδου στο πλάσμα (Plasma lead, Pb – P) [14]. Συνδεδεμένος στο αίμα, ο μόλυβδος μεταφέρεται σε ολόκληρο το σώμα και προκαλεί τοξικότητα σε διάφορους μαλακούς ιστούς [14]. Άλλος βιοδείκτης είναι ο μόλυβδος προσδεδεμένος στα ούρα (urine lead, Pb – U), καθώς μέρος του μόλυβδου απομακρύνεται με τα ούρα, μέσω των νεφρών [14]. Αυτοί οι τρεις δείκτες είναι οι πιο αξιόπιστοι για την αξιολόγηση της έκθεσης σε μόλυβδο [14].

Η πρόσδεση του μόλυβδου σε ερυθροκύτταρα επάγει την μεταβολή της δράσης κάποιων ενζύμων, όπως η Na,K-ATPάση, η ALAD και την συνθετάση του νικοτιδάμινου αδένινο δινουκλεοτιδίου (NADS) [14]. Καθώς πάνω από το 85% του μόλυβδου

ενσωματώνεται στην κυτταρική μεμβράνη και στα συστατικά του κυτταροπλάσματος των ερυθροκυττάρων, φαίνεται να επηρεάζει τη λειτουργία των μεμβρανικών ΑΤΡασών Na και K [14]. Αντίστοιχα, ο μόλυβδος έχει μεγάλη συγγένεια προς ένζυμα όπως η ALAD [14].

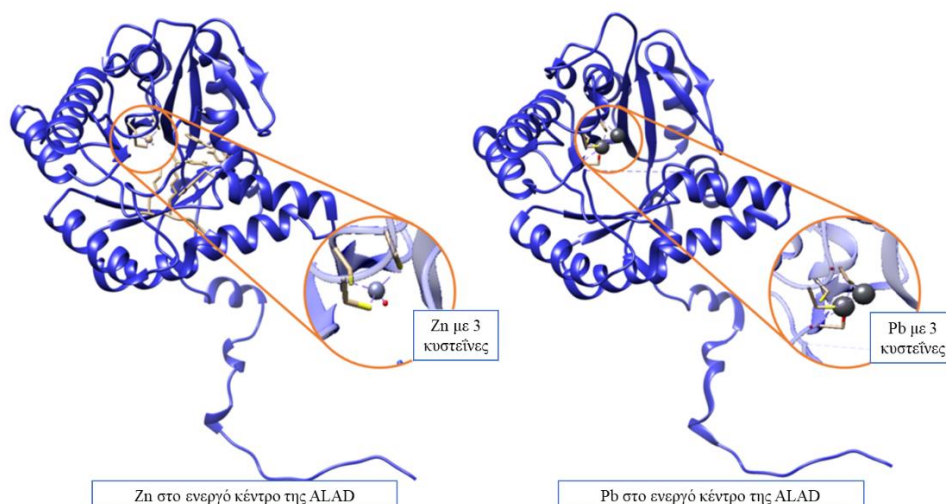
Ο μόλυβδος, καθώς έχει την ικανότητα να δεσμεύεται στις θειολικές και αμιδικές ομάδες των ενζύμων, μπορεί να αλλάζει την διαμόρφωσή τους στο χώρο και να μειώνει τη δραστικότητα τους [15]. Επίσης, ανταγωνίζεται απαραίτητα μεταλλικά ιόντα στο ενεργό κέντρο των ενζύμων ή επηρεάζει την μεταφορά τους [15]. Ένας από τους κυριότερους μηχανισμούς τοξικότητας του μόλυβδου σχετίζεται με την ικανότητά του να παρεμποδίζει ή να μιμείται τη δράση του ασβεστίου και να παρεμβαίνει στη λειτουργία των πρωτεϊνών [3]. Το πιο γνωστό και καλά μελετημένο παράδειγμα είναι η παρεμπόδιση της βιοσύνθεσης της αίμης [3]. Επίσης, ο μόλυβδος αντικαθιστά δισθενή μεταλλικά κατιόντα, τα οποία είναι απαραίτητα για την κυτταρική δραστηριότητα [1].

Ο βαθμός των διαταραχών στη βιοσύνθεση της αίμης και στον μεταβολισμό των νουκλεοτιδίων επηρεάζονται σε μεγάλο βαθμό από την υψηλή συγκέντρωση μόλυβδου στο σώμα [14]. Τα κυριότερα ένζυμα που επηρεάζονται είναι η ALAD, όπως προαναφέρθηκε, η κοπροκορφυρίνη (Coproporphyrin) και πρωτοπορφυρίνη ψευδαργύρου (Zinc protoporphyrin), τα οποία συμμετέχουν στη βιοσύνθεση της αίμης και η 5'-νουκλεοτιδάση της πυριμιδίνης (Pyrimidine 5'-nucleotidase) και η NAD, που συμμετέχουν στην βιοσύνθεση των νουκλεοτιδίων [14]. Συνεπώς, η αναστολή της δράσης των παραπάνω ενζύμων παρεμποδίζουν την βιοσύνθεση της αίμης και των νουκλεοτιδίων [14].

Οι μοριακοί στόχοι του μόλυβδου σε κυτταρικό επίπεδο είναι οι πρωτεΐνες με ψευδάργυρο (zinc, Zn) στο μεταλλικό τους κέντρο και οι αντίστοιχες πρωτεΐνες που προσδένουν ασβέστιο (calcium, Ca) [7]. Η διαθεσιμότητα του μόλυβδου σε συγκεκριμένους τύπους κυττάρων δεν μπορεί να προσδιοριστεί με ακρίβεια [7]. Όμως, είναι γνωστό ότι λιγότερο από το 5% της συνολικής ποσότητας του μόλυβδου στο αίμα είναι συνδεδεμένο με πρωτεΐνες του πλάσματος, ενώ μόνο το 0.01% του μόλυβδου στο πλάσμα είναι ελεύθερο [7].

Η αλληλεπίδραση του μόλυβδου με πρωτεΐνες που περιέχουν Zn έχει μελετηθεί εκτενέστατα με το ένζυμο αφυδρατάση του αμινολεβουλινικού οξέος (δ -aminolevulinic acid dehydratase, ALAD) [7]. Η ALAD καταλύει την δεύτερη αντίδραση στο μονοπάτι της βιοσύνθεσης της αίμης. Η πρόσδεση του Pb αντί του Zn στο ενεργό της κέντρο παρεμποδίζει τη λειτουργία του ενζύμου και κατ' επέκτασιν την βιοσύνθεση της αίμης (εικόνα 7) [7]. Αυτή η παρατήρηση επεξηγεί την εμφάνιση αναιμίας σε παιδιά και ενήλικες με υψηλά επίπεδα μόλυβδου στο αίμα ($\geq 40 \mu\text{g/dL}$) [7].

Η προτίμηση του Pb στα ένζυμα με Zn στο μεταλλικό τους κέντρο έγκειται στην παρουσία τριών καταλοίπων κυστεΐνης στο συγκεκριμένο σημείο [7]. Ακόμα και πρωτεΐνες, οι οποίες περιέχουν αυτά τα τρία κατάλοιπα σε δομικά τους σημεία, ενδείκνυται για την πρόσδεση του Pb [7]. Τέτοιες πρωτεΐνες, όπως οι υποδοχείς στεροειδών και η retroviral nucleocapsid protein, δρουν κυρίως ως μεταγραφικοί παράγοντες και παίζουν ρόλο στις αναπτυξιακές διαδικασίες [7]. Η παρεμπόδισή τους οδηγεί στα αναπτυξιακά προβλήματα που παρουσιάζονται στα παιδιά μετά τη δηλητηρίασή τους από μόλυβδο [7].



Εικόνα 7: Φυσιολογική δομή ενεργού κέντρου του ενζύμου ALAD και δομή ενεργού κέντρου παρουσία μόλυβδου (τροποποιημένη εικόνα από Honestbean, CC BY 4.0 <<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0>>, via Wikimedia Commons)

Άλλη μία πρωτεΐνη με Zn, η οποία παρεμποδίζεται παρουσία Pb, είναι η zinc protein human protamine 2 (HP2) [7]. Αυτή η πρωτεΐνη συμμετέχει στη διαδικασία της σπερματογένεσης και η πρόσδεση του Pb στις θειολικές της ομάδες προκαλεί την αλλαγή της δομής της [7]. Τα προβλήματα στειρότητας που παρατηρούνται στους άνδρες που εκτίθενται σε μόλυβδο ίσως οφείλονται σε αυτήν την αλληλεπίδραση μεταξύ του Pb και της HP2 [7]. Τέλος, υψηλές ποσότητες Pb επηρεάζουν και τη δραστηριότητα των πρωτεϊνών με Zn που προσδένονται στα DNA, όπως οι zinc fingers [7].

Πέρα από τα αναπτυξιακά προβλήματα, ο μόλυβδος προκαλεί και νευρολογικές διαταραχές, καθώς στοχεύει πρωτεΐνες, οι οποίες λαμβάνουν μέρος στην σηματοδότηση μέσω Ca [7]. Πιο συγκεκριμένα, ο Pb παρεμποδίζει το Ca να προκαλέσει την εξωκυττάρωση των σηματοδοτικών μορίων στα νευρικά κύτταρα [7], αφού ο ίδιος μπορεί να διαπεράσει τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό [1]. Αντίθετα, μικρές συγκεντρώσεις Pb φαίνεται να ενεργοποιούν πρωτεΐνες που εξαρτώνται από Ca, όπως η

πρωτεϊνική κινάση C (PKC) και η καλμοδουλίνη, και συμμετέχουν στο μονοπάτι της κυτταρικής σηματοδότησης [7].

Τοξικότητα μόλυβδου σε επίπεδο οργάνων και συστημάτων

Η τοξικότητα του μόλυβδου εντοπίζεται κυρίως σε όργανα όπως τα νεφρά, το συκώτι, το αιμοποιητικό σύστημα και το νευρικό σύστημα [1]. Σε περίπτωση έκθεσης σε υψηλά επίπεδα μόλυβδου, προκαλείται βλάβη σε σχεδόν όλα τα όργανα και τα συστήματα οργάνων στο σώμα ενός ανθρώπου και μπορεί να οδηγήσει και μέχρι και στον θάνατο [5].

Αν και περιβαλλοντικοί ρύποι, όπως ο μόλυβδος, έχουν συσχετιστεί με τις ασθένειες του καρδιαγγειακού συστήματος και πιο συγκεκριμένα με την πίεση του αίματος και την υπέρταση, η ακριβής συμβολή του στις ασθένειες αυτές δεν έχει διευκρινιστεί [16]. Η έκθεση σε μόλυβδο έχει επίσης συσχετιστεί με τη στεφανιαία αρτηριακή νόσο, την περιφερειακή αρτηριακή νόσο, την υπερτροφία της αριστερής κοιλίας και αλλαγές στον καρδιακό ρυθμό [16].

Στην υπάρχουσα βιβλιογραφία εντοπίζονται, επίσης, προβλήματα στο αναπαραγωγικό σύστημα που προκαλούνται από τη δηλητηρίαση από μόλυβδο [1]. Στους άνδρες, ο μόλυβδος προκαλεί μειωμένη λίμπιντο και στειρότητα, ενώ στις γυναίκες αυξάνει την πιθανότητα αποβολής και αποτυχίας της κύησης [1]. Αναφορικά με την νεφρική λειτουργία, η έκθεση σε υψηλή συγκέντρωση μόλυβδου προκαλεί βλάβες στα σωληνοειδή των νεφρών [17]. Επίσης, μελέτες με ζώα, έδειξαν ότι ο μόλυβδος

μειώνει την άμυνα του οργανισμού, καθώς παρεμποδίζει την παραγωγή αντισωμάτων [17].

Το νευρικό σύστημα αποτελεί το πιο ευάλωτο στον μόλυβδο σύστημα στον άνθρωπο [1]. Το περιφερικό νευρικό σύστημα επηρεάζεται κυρίως στους ενήλικες, ενώ τα παιδιά είναι πιο ευαίσθητα στο κεντρικό νευρικό σύστημα [1]. Εκτεταμένες βλάβες στο κεντρικό νευρικό σύστημα οδηγούν σε εγκεφαλοπάθειες, σπασμούς, παραλήρημα και κόμα, ενώ μικρότερες σε πονοκεφάλους, μυϊκό τρόμο, ευερεθιστότητα και απώλεια μνήμης [1].

Τα κυριότερα συμπτώματα της εκτεταμένης δηλητηρίασης από μόλυβδο εντοπίζονται στο κεντρικό νευρικό σύστημα και έχουν συνδεθεί με την παρεμπόδιση της γνωστικής λειτουργίας του εγκεφάλου, ειδικά στα παιδιά που είναι πιο ευάλωτα, καθώς το νευρικό τους σύστημα βρίσκεται υπό ανάπτυξη [1,12]. Η επίδραση αυτή αξιολογείται κυρίως με τα τεστ ευφυίας (IQ tests) [12]. Λειτουργίες που σχετίζονται με την εγκεφαλική λειτουργία, όπως η ακοή και η ισορροπία, επίσης φαίνεται να επηρεάζονται από τα υψηλά επίπεδα μόλυβδου στο αίμα [12].

Αντίστοιχες επιδράσεις εμφανίζονται και στην συμπεριφορά [12]. Έχει διαπιστωθεί ότι οι μαθητές με υψηλή συγκέντρωση μόλυβδου στα δόντια παρουσιάζουν μια πιο υπερκινητική, ανοργάνωτη και απρόσεκτη συμπεριφορά και δυσκολεύονται να ακολουθήσουν οδηγίες [12]. Η παρατήρηση των συγκεκριμένων παιδιών στη μετέπειτα εκπαιδευτική τους πορεία επιδεικνύει την δυσκολία που βιώνουν για να αποφοιτήσουν από το σχολείο, στην ανάγνωση, αλλά και στην συνεπή παρακολούθηση των μαθημάτων κατά το τελευταίο έτος [12]. Γενικότερα, η υψηλή συγκέντρωση μόλυβδου στα οστά έχει

συσχετιστεί με διάσπαση προσοχής, επιθετική συμπεριφορά και ήπιες παραβατικές συμπεριφορές [12].

Οι παραπάνω παρατηρήσεις οδηγούν στο συμπέρασμα ότι οι επιδράσεις της τοξικότητας του μόλυβδου διαρκούν και ίσως είναι μόνιμες στην περίπτωση έκθεσης από νεαρή ηλικία [12]. Παρότι είναι γνωστές αυτές οι επιδράσεις, οι μηχανισμοί που εμπλέκονται δεν έχουν διασαφηνιστεί πλήρως [12]. Ο μόλυβδος, όπως προαναφέρθηκε, επηρεάζει βασικές λειτουργίες μέσω της παρέμβασής του στο σύστημα σηματοδότησης με το Ca ακόμα και σε μικρές συγκεντρώσεις, αλλά δεν είναι γνωστό αν αυτή του η παρέμβαση είναι η κρισιμότερη για την εμφάνιση των παραπάνω κλινικών συμπτωμάτων [12].

Διάγνωση και συμπτώματα δηλητηρίασης από μόλυβδο

Η διάγνωση της δηλητηρίασης από μόλυβδο δεν πραγματοποιείται εύκολα, καθώς τα συμπτώματα δεν εμφανίζονται αμέσως μετά την έκθεση [1]. Όταν υπάρχει υποψία για δηλητηρίαση, λαμβάνονται βασικές πληροφορίες για τον πάσχον μέσω συνέντευξης με το αρμόδιο ιατρικό προσωπικό [1]. Οι πληροφορίες αυτές αφορούν τα συμπτώματα του πάσχοντα, το ιατρικό ιστορικό του, το περιβάλλον και τη διατροφή του, ώστε να ταυτοποιηθούν πιθανές πηγές έκθεσης σε μόλυβδο [1].

Στην περίπτωση που ο ασθενής είναι παιδί, η κλινική του αξιολόγηση για την έκθεση σε μόλυβδο περιλαμβάνει αρχικά ερωτήσεις σχετικά με το ιατρικό του ιστορικό, όπως π.χ. τα συμπτώματα που εμφανίζει, και το ιστορικό του περιβάλλοντός του και της

πιθανής έκθεσης σε μόλυβδο από μπογιά ή το χώμα [12]. Ακολουθούν ερωτήσεις σχετικά με τα συμπεριφορικά χαρακτηριστικά ή τις συνήθειες του παιδιού, όπως και ερωτήσεις σχετικά με την έκθεση και τις συνήθειες των μελών της οικογένειας [12]. Τέλος, η συνέντευξη ολοκληρώνεται με ερωτήσεις σχετικά με τη διατροφή και τις διατροφικές συνήθειες και την πιθανή κατανάλωση τροφών που περιέχουν μόλυβδο [12]. Επίσης, πραγματοποιείται και εξέταση σχετικά με την νευρολογική αξιολόγηση του παιδιού [12].

Ακολουθεί η μέτρηση των επιπέδων μόλυβδου στο αίμα, στις τρίχες, στα ούρα και στον σίελο [1]. Πέρα από τον μόλυβδο και άλλοι βιοδείκτες στο αίμα καταγράφονται [1]. Με αυτόν τον τρόπο, επιβεβαιώνεται ή όχι η δηλητηρίαση από τον συγκεκριμένο τοξικό παράγοντα [1].

Η επίδραση του μόλυβδου στην υγεία του ανθρώπου διαφοροποιείται αναλογικά με την εκάστοτε έκθεση [6]. Ο μόλυβδος μπορεί να προκαλέσει ήπια συμπτώματα, τα οποία περιλαμβάνουν ερεθισμό, κάψιμο στα μάτια, έμεση, διάρροια, πνευμονικό ερεθισμό, πονοκέφαλο, ζαλάδα, ναυτία και κόπωση [6].

Σε περίπτωση εντονότερης έκθεσης σε μόλυβδο, τα συμπτώματα είναι πιο σοβαρά και μπορεί να περιλαμβάνουν αλλεργική δερματίτιδα, άσθμα, το σύνδρομο Painters, καρκίνο των πνευμόνων, προβλήματα στο αναπαραγωγικό σύστημα, καταστροφή στο συκώτι και τα νεφρά [6].

Αυτά τα συμπτώματα μπορούν να εμφανιστούν τόσο στους ενήλικες, όσο και στα παιδιά [6]. Ιδιαίτερα τα παιδιά καθίστανται πιο ευάλωτα στην επίδραση του μόλυβδου, καθώς ακόμα και σε μικρές συγκεντρώσεις έκθεσης δύναται να εμφανίσουν προβλήματα σε νοητικές και συμπεριφορικές λειτουργίες τους [1].

Πρόληψη και αντιμετώπιση δηλητηριάσεων

Ήδη από τη δεκαετία του '70 άρχισαν να προκαλούνται ανησυχίες σχετικά με τα προβλήματα υγείας που σχετίζονταν με τον μόλυβδο [1]. Αυτές οι ανησυχίες οδήγησαν στην εγκαθίδρυση νομοθεσιών και ρυθμίσεων, έτσι ώστε να περιοριστεί η έκθεση του κοινού στη συγκεκριμένη τοξίνη [1].

Τέτοιου είδους νομοθεσίες περιλάμβαναν την εισαγωγή της αμόλυβδης βενζίνης ως καύσιμο και την απαγόρευση μπογιάς με βάση τον μόλυβδο [1]. Αυτές οι αλλαγές περιόρισαν ως ένα βαθμό τα επίπεδα μόλυβδου στο περιβάλλον και κατ' επέκτασιν και στο σώμα των πολιτών [1], μιας και μέχρι τότε το 80-90% του αερομεταφερόμενου μόλυβδου στις μεγάλες πόλεις προερχόταν από τη βενζίνη με μόλυβδο [3]. Άλλα μέτρα που λήφθηκαν για την αντιμετώπιση του προβλήματος από τον US Environmental Protection Agency (US EPA) και την Ευρωπαϊκή ένωση αφορούσαν την ορθή απόρριψη ηλεκτρονικών συσκευών, καθώς αποδείχθηκε ότι απελευθέρωναν υψηλές, τοξικές συγκεντρώσεις μόλυβδου στο περιβάλλον, καθιστώντας τα επικίνδυνα απόβλητα [3].

Αν και τα προβλήματα υγείας που προκαλούνται από την έκθεση σε μόλυβδο είναι ευρέως γνωστά, φαίνεται πως ακόμα δεν υπάρχουν επαρκείς κανονισμοί και νομοθεσίες σχετικά με την παρακολούθηση της περιβαλλοντικής έκθεσης σε μόλυβδο σε όλες τις χώρες [6]. Για παράδειγμα, στην Ινδία δεν υπάρχει ακόμα νομοθεσία σχετικά με την καταγραφή των επικίνδυνων ουσιών, όπως ο μόλυβδος, στις μπογιές [6]. Συνεπώς, δημογραφικές διαφοροποιήσεις, καθώς και πολιτισμικές συνήθειες δυσχεραίνουν την ελάττωση της έκθεσης και κατ' επέκτασιν της τοξικότητας του μόλυβδου [6].

Η πρόληψη της δηλητηρίασης από μόλυβδο περιλαμβάνει κυρίως την θεραπεία μετά την έκθεση [3]. Η μοναδική θεραπεία που είναι διαθέσιμη είναι η χηλίωση

(chelation therapy) [3]. Καθώς, όμως, υπάρχουν περιπτώσεις στις οποίες η χηλίωση δεν έχει τα επιθυμητά αποτελέσματα (π.χ. σε πολύ μικρά παιδιά), ή δεν είναι δυνατή η θεραπεία (π.χ. σε αναπτυσσόμενες χώρες), κρίνεται αναγκαίος ο έλεγχος των πηγών μόλυβδου σε παγκόσμιο επίπεδο [3]. Έχουν προταθεί τρεις στρατηγικές προς αυτήν την κατεύθυνση: η ταυτοποίηση των πηγών, η εξάλειψη ή ο περιορισμός των πηγών και η παρακολούθηση των περιβαλλοντικών εκπομπών και κινδύνων [3].

Περαιτέρω μέτρα που λαμβάνονται από διάφορες χώρες σχετικά με τον περιορισμό της έκθεσης στον μόλυβδο πέρα από τη μείωση ή την απαγόρευση της χρήσης του σε βενζίνη, πετρέλαιο και μπογιές, είναι η βελτίωση των μέτρων ελέγχου της εκπομπής του στον χώρο εργασίας [5]. Επιπλέον, κρίνεται αναγκαία η εξάλειψη των παραδοσιακών φαρμάκων και καλλυντικών που περιέχουν μόλυβδο [5]. Τέλος, αναγκαίο βήμα αποτελεί και η ορθή ενημέρωση των πολιτών τόσο για τον κίνδυνο, όσο και για τη σπουδαιότητα της σωστής διατροφής και της πρόληψης [5].

Θεραπεία

Στην ανακούφιση των συμπτωμάτων της δηλητηρίασης από μόλυβδο συμβάλλει και η διατροφή [1]. Τα αντιοξειδωτικά, όπως οι βιταμίνες, τα φλαβονοειδή και τα βότανα μπορούν να μειώσουν τις επιπτώσεις των ROS, καθώς δεσμεύουν τα ιόντα μόλυβδου και αποτρέπουν την δημιουργία των ROS [1].

Πιο συγκεκριμένα, οι βιταμίνες B6 (πυριδοξίνη) και B1 (θειαμίνη) είναι πολύ αποτελεσματικές στη θεραπεία της δηλητηρίασης από μόλυβδο [1]. Η πρώτη εμπλέκεται

στην αναγέννηση της γλουταθειόνης (GSH), ένα από τα πιο γνωστά αντιοξειδωτικά μόρια, ενώ η δεύτερη περιορίζει την υπεροξείδωση των λιπιδίων που προκαλείται από τον μόλυβδο [1]. Αντίστοιχα, η βιταμίνη C ή ασκορβικό οξύ έχει την ικανότητα να δεσμεύει και να απομακρύνει τον μόλυβδο από το σώμα, ενώ η βιταμίνη E (α-τοκοφερόλη) έχει ισχυρή προστατευτική δράση στους νευρώνες και βελτιώνει τα νοητικά προβλήματα [1].

Τα φλαβονοειδή είναι φυσικές πολυφαινολικές ενώσεις που βρίσκονται στα φρούτα και τα λαχανικά [1]. Μπορούν και αυτές να δεσμεύσουν ιόντα βαρέων μετάλλων και να αποτρέψουν τις αλυσιδωτές αντιδράσεις των ελεύθερων ριζών [1]. Για παράδειγμα, η κουερσετίνη ή κερκετίνη ή κβερκετίνη ή βαλανοκετόνη είναι ένα φλαβονοειδές που μπορεί να διαπεράσει τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό και να περιορίσει την τοξικότητα του μόλυβδου στον εγκέφαλο και ειδικότερα στον υποθάλαμο, δεσμεύοντάς τον [1]. Επίσης, το α-λιποϊκό οξύ, αν και δεν δεσμεύει τον μόλυβδο, μπορεί να μπλοκάρει την εκδήλωση οξειδωτικού στρες και χρησιμοποιείται κυρίως μαζί με χηλικούς παράγοντες [1].

Τέλος, τα βότανα προτιμώνται εξαιτίας του χαμηλού κόστους τους και των περιορισμένων έως μηδαμινών παρενεργειών [1]. Για παράδειγμα, το σκόρδο είναι αποτελεσματικό έναντι της τοξικότητας που προκαλείται από μόλυβδο στο συκώτι και στα αναπαραγωγικά όργανα [1]. Επίσης, η κουρκουμίνη φαίνεται να αποτρέπει την νευροτοξικότητα που προκαλείται από μόλυβδο [1].

Η αντιμετώπιση της έκθεσης σε μόλυβδο πραγματοποιείται κυρίως με την χηλίωση, όπως προαναφέρθηκε [1]. Οι χηλικοί παράγοντες δεσμεύουν τα βαρέα μέταλλα κυρίως σε εξωκυτταρικά υγρά, καθώς δεν περνάνε στην κυτταρική μεμβράνη [1].

Δεσμεύουν ανεξαιρέτως μέταλλα και μπορεί να προκαλέσουν σημαντική τοξικότητα στο ήπαρ και στα νεφρά, οπότε δεν ενδείκνυται η χρήση τους για χρόνια δηλητηρίαση, αλλά μόνο για οξεία έκθεση σε μόλυβδο [1]. Επίσης, η θεραπεία με χηλίωση δεν ενδείκνυται για περιπτώσεις όπου τα επίπεδα μόλυβδου στο αίμα είναι κάτω από 45 $\mu\text{g}/\text{dL}$ στους ενήλικες [1]. Συνήθως η θεραπεία ξεκινάει όταν τα επίπεδα στο αίμα φτάσουν τα 50 – 60 $\mu\text{g}/\text{dL}$ [15].

Ένας παράγοντας θα πρέπει να έχει κάποια συγκεκριμένα χαρακτηριστικά, έτσι ώστε να μπορεί να αξιοποιηθεί ως χηλικός παράγοντας και άρα ως αντίδοτο για την δηλητηρίαση από μόλυβδο [18]. Αρχικά, θα πρέπει να παρουσιάζει καλή συγγένεια ως προς το επιθυμητό μέταλλο – στόχο, η οποία εκφράζεται μέσω της σταθεράς ισορροπίας (stability constant) [18]. Η χαμηλή τοξικότητα τόσο του ιδίου, όσο και του συμπλόκου που δημιουργείται είναι απαραίτητη προϋπόθεση για την ευρεία κλινική του χρήση στις απαιτούμενες συγκεντρώσεις [18]. Επιπλέον, ο χηλικός παράγοντας θα πρέπει να διαπερνάει τον ιστό στον οποίο εναποτίθεται το μεταλλικό ιόν (το οποίο απαιτεί μία λιποφιλική ικανότητα), να το δεσμεύει και να υπάρχει μία άμεση και γρήγορη οδός αποβολής του, όπως π.χ. μέσω των ούρων, ιδιότητα που απαιτεί και την υδατοδιαλυτή φύση του μορίου [18]. Συνεπώς, οι δύο αυτές ιδιότητες είναι αντικρουόμενες [18].

Μερικά από τα μειονεκτήματα της χηλίωσης είναι η ανακατανομή του τοξικού μετάλλου στο σώμα και η πιθανή απομάκρυνση και απέκκριση απαραίτητων μεταλλικών ιχνοστοιχείων [15]. Όπως, επίσης, προαναφέρθηκε, οι χηλικοί παράγοντες δεν μπορούν να απομακρύνουν βαρέα μέταλλα από ενδοκυττάριους χώρους, καθώς δεν μπορούν να διαπεράσουν την κυτταρική μεμβράνη [15]. Επιπλέον, προκαλούν τοξικότητα στο ήπαρ και στους νεφρούς και οι ασθενείς παρουσιάζουν χαμηλή κλινική ανάρρωση [15]. Τέλος,

κάθε ηλικικός παράγοντας έχει και διαφορετικές παρενέργειες, όπως πονοκέφαλος, ναυτία και αυξημένη πίεση [15].

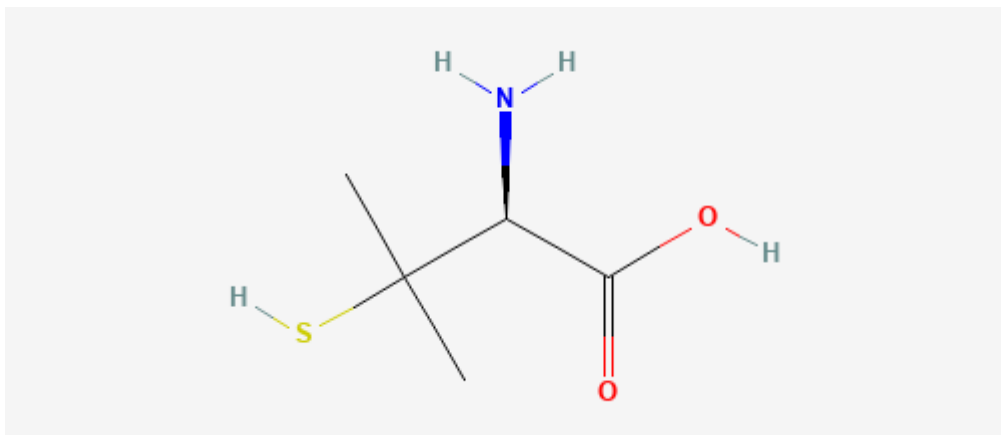
Η αντιμετώπιση κάποιων από αυτά τα μειονεκτήματα πραγματοποιείται με την συνδυασμένη ηλικική θεραπεία, δηλαδή τη χορήγηση δύο διαφορετικών δομικά ηλικικών παραγόντων [15,19]. Έτσι, κάθε παράγοντας θα δράσει με διαφορετικό μηχανισμό, επιτυγχάνοντας μία συνεργιστική δράση [15]. Για παράδειγμα, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ταυτόχρονα δύο ηλικικοί παράγοντες, ένας λιπόφιλος (π.χ, DMSA) και ένας λιπόφοβος (π.χ, CaNa_2EDTA), έτσι ώστε ο πρώτος να στοχεύσει τα μέταλλα στο εσωτερικό των κυττάρων, καθώς θα μπορεί να διαπεράσει την κυτταρική μεμβράνη, και ο δεύτερος τα μέταλλα στους εξωκυττάριους χώρους [15]. Έτσι, επιτυγχάνεται καλύτερη δέσμευση και απομάκρυνση και μικρότερη ανακατανομή του μετάλλου [15].

Περιγραφή υπαρχόντων αντιδότηων

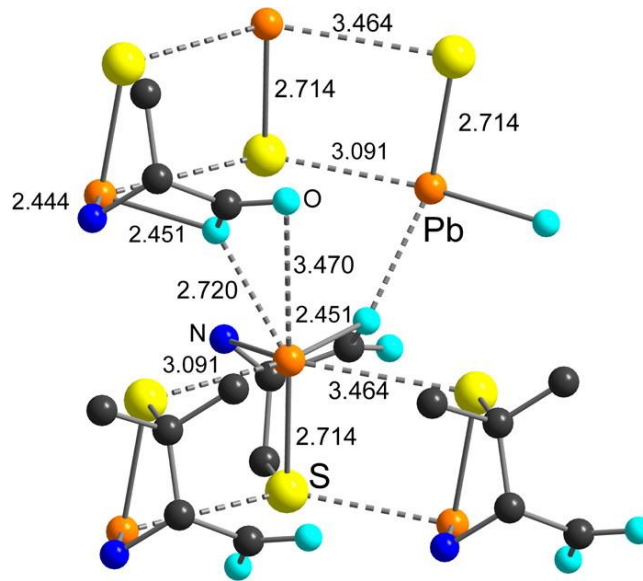
Πενικιλλαμίνη (penicillamine)

Η πενικιλλαμίνη (εικόνες 8 και 9) ήταν ο πρώτος χηλικός παράγοντας που χρησιμοποιήθηκε στην αντιμετώπιση της δηλητηρίασης από μόλυβδο [1]. Χορηγείται από το στόμα και μέσα σε μία με τέσσερις ώρες έχει πλήρη δραστικότητα [1]. Το μειονέκτημά της είναι πως η απορρόφησή της επηρεάζεται από την τροφή, τα αντιοξειδωτικά και τα συμπληρώματα σιδήρου [1].

Οι παρενέργειες της πενικιλλαμίνης είναι η νεφρίτιδα, οι αντιδράσεις υπερευαισθησίας, οι διαταραχές στον γαστρεντερικό σωλήνα, η λευκοπενία και η θρομβοκυτοπενία (thrombocytopenia) [1].



Εικόνα 8: Δομή πενικιλλαμίνης (retrieved from PubChem, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5852>)

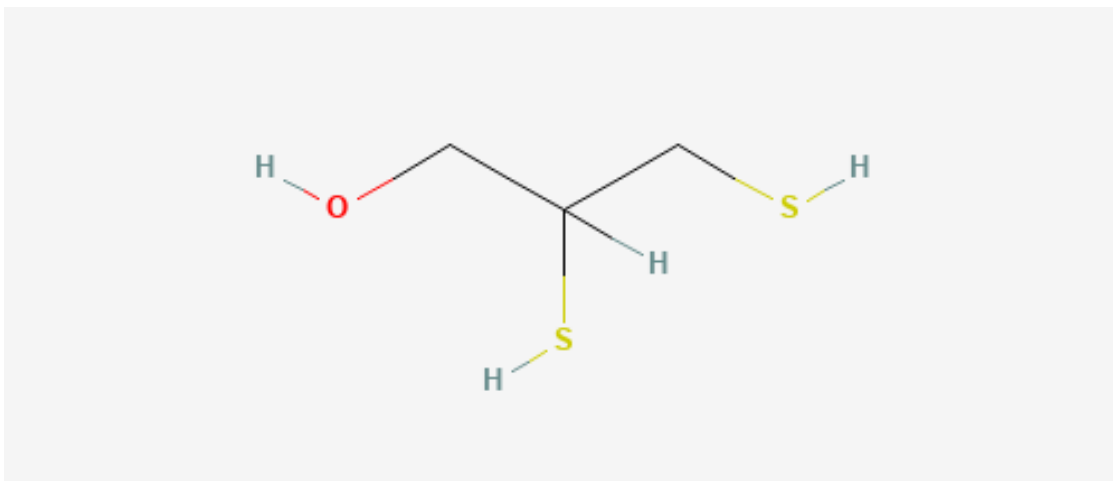


Εικόνα 9: Δομή πενικιλίνης κατά τη δέσμευση μόλυβδου [20]

Διμερκαπρόλη (Dimercaprol, BAL)

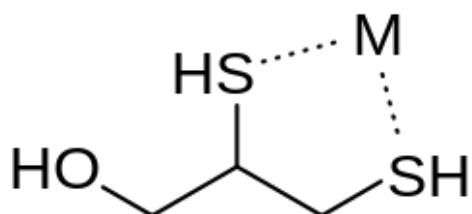
Η διμερκαπρόλη (εικόνες 10 και 11) είναι ένας διθειολικός παράγοντας που χρησιμοποιείται ως χηλικός παράγοντας για την καταπολέμηση της δηλητηρίασης από τοξικά μέταλλα, όπως ο υδράργυρος (Hg), το αρσενικό (As) και ο μόλυβδος [21]. Αναπτύχθηκε κατά τον Δεύτερο Παγκόσμιο Πόλεμο ως αντίδοτο έναντι στις επιθέσεις με δηλητηριώδες αέριο που περιείχε αρσενικό [15]. Το πλεονέκτημα αυτού του παράγοντα είναι πως μπορεί να διαπερνάει τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό, καθώς είναι λιποδιαλυτός [18].

Το μειονέκτημά του είναι η ικανότητα ακινητοποίησης του τοξικού παράγοντα στο κεντρικό νευρικό σύστημα [21]. Επίσης, το BAL παρεμποδίζει τη δράση της ALAD και κατ' επέκτασιν την βιοσύνθεση της αίμης [21]. Επιπλέον, η χρήση του απαιτεί την ενδομυϊκή χορήγησή του [18]. Τέλος, η θεραπευτική του απόδοση είναι μικρή και για τους λόγους αυτούς δεν προτιμάται πλέον στη θεραπεία της δηλητηρίασης [21].



Εικόνα 10: Δομή διμερκαπρόλης (retrieved from PubChem, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3080>)

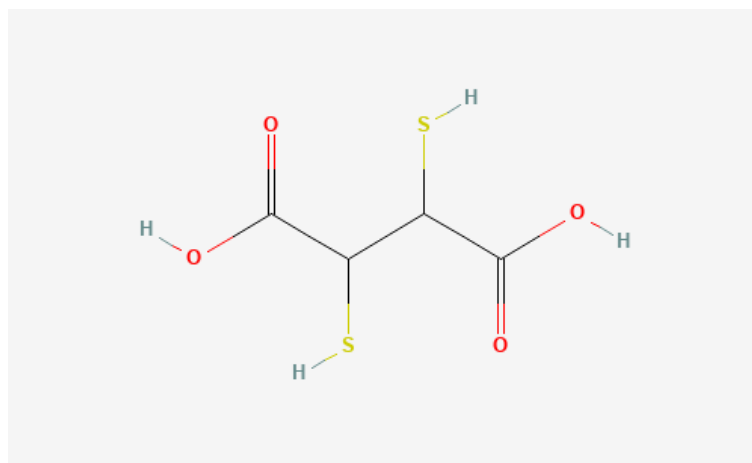
Σε πολλές περιπτώσεις, όπως κατά την σοβαρή έκθεση σε μόλυβδο, το BAL χορηγείται σε συνδυασμό με το CaNa₂EDTA για να αντιμετωπιστούν τα συμπτώματα [15]. Οι παρενέργειες της λήψης BAL περιλαμβάνουν την πρόκληση αλλεργιών, γαστρεντερικά συμπτώματα, την ταχυκαρδία, τον πυρετό και την αυξημένη λειτουργία στο συκώτι [1].



Εικόνα 11: Δομή BAL κατά την δέσμευση μετάλλου (M) (User:Innerstream, Public domain, via Wikimedia Commons)

DMSA (2,3-Dimercaptosuccinic acid) και DMPS (2,3-dimercaptopropane-1-sulfonic acid)

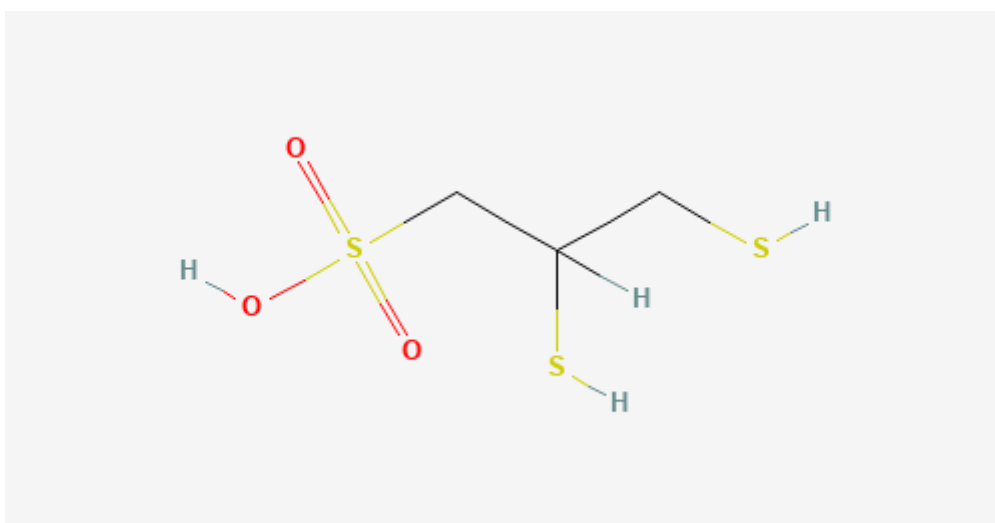
Άλλοι δύο χημικοί παράγοντες που, επίσης, χρησιμοποιούνται στην δηλητηρίαση από μόλυβδο είναι το 2,3-διμερκαπτοσουλφονικό οξύ (DMSA) (εικόνες 12 και 14) και το 2,3-διμερκαπτοπροπανικό-1-σουλφονικό οξύ (DMPS) (εικόνες 13 και 15) [21]. Αυτοί οι παράγοντες προέκυψαν από την τροποποίηση του BAL, με στόχο τις λιγότερες τοξικές παρενέργειες [15].



Εικόνα 12: Δομή DMSA (retrieved from PubChem, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/9354>)

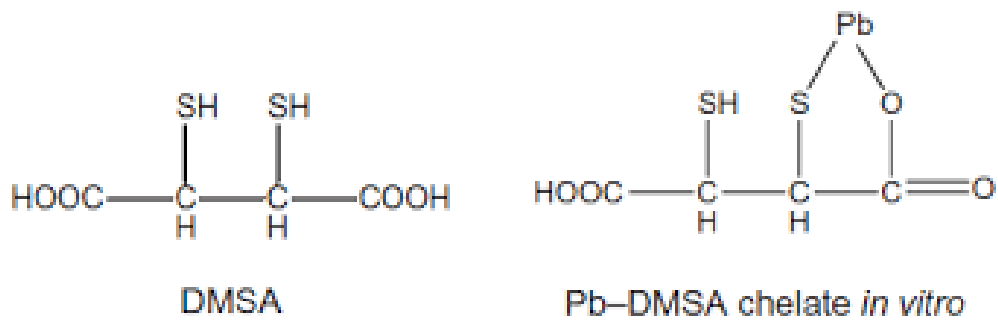
Διαθέτουν δύο θειολικές ομάδες και καλή θεραπευτική απόδοση [1]. Οι παραπάνω ενώσεις έχουν δράση και έναντι στον υδράργυρο, το αρσενικό και το κάδμιο (Cd) [21]. Ένα βασικό πλεονέκτημα του DMSA είναι η μη απομάκρυνση σημαντικών μετάλλων από το σώμα, όπως ο ψευδάργυρος, ο σίδηρος, το ασβέστιο και το μαγνήσιο

[1]. Το DMPS είναι ανάλογο της διμερκαπρόλης, δεν είναι τόσο αποδοτικό όσο το DMSA ή το EDTA και χρησιμοποιείται κυρίως έναντι του As και του Hg και όχι του Pb [1].

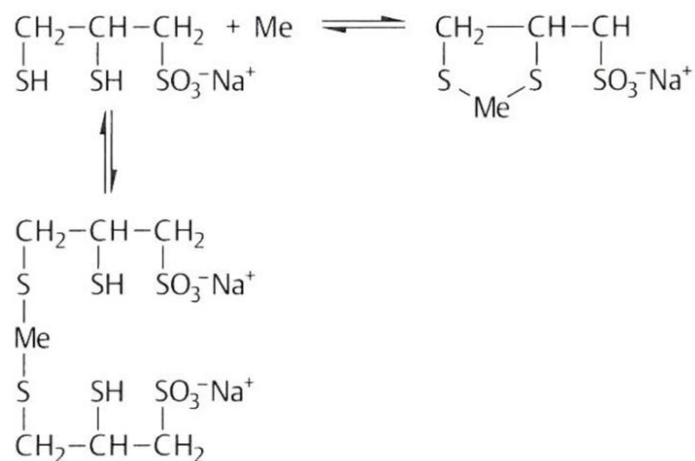


Εικόνα 13: Δομή DMPS (retrieved from PubChem, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6321>)

Το DMSA και το DMPS είναι λιγότερο τοξικά και πιο υδατοδιαλυτά σε σύγκριση με το BAL [21]. Επιπλέον, δεν ακινητοποιούν τα μέταλλα στον εγκέφαλο [21]. Όσον αφορά τη βιοσύνθεση της αίμης, οι δύο αυτοί παράγοντες, επίσης, παρεμβαίνουν στο μονοπάτι με μηχανισμούς που δεν έχουν πλήρως διευκρινιστεί [21]. Αξίζει, επίσης, να σημειωθεί ότι το DMPS δεν δημιουργεί τόσο σταθερά σύμπλοκα με τον Pb, όσο με τον Hg και το Cd [21]. Όμως, τα σύμπλοκα αυτά παρεμποδίζουν σε μεγαλύτερο βαθμό την δραστηριότητα της ALAD σε σχέση με τον μόλυβδο ή τους χηλικούς παράγοντες αντίστοιχα [21].



Εικόνα 14: Δομή DMSA κατά την δέσμευση μολύβδου (Pb) [22]



Εικόνα 15: Μεταλλικά σύμπλοκα με DMPS σε δύο αναλογίες – DMPS:Me 1:1 (πάνω) και 2:1 (κάτω) [23]

Το DMSA αποτελεί τον πιο αποδοτικό και ασφαλές χηλικό παράγοντα για την απομάκρυνση του μολύβδου [1]. Χορηγείται ενδοφλεβίως ή από το στόμα και παρουσιάζει την μικρότερη τοξικότητα από όλα τα υπόλοιπα αντίδοτα [18].

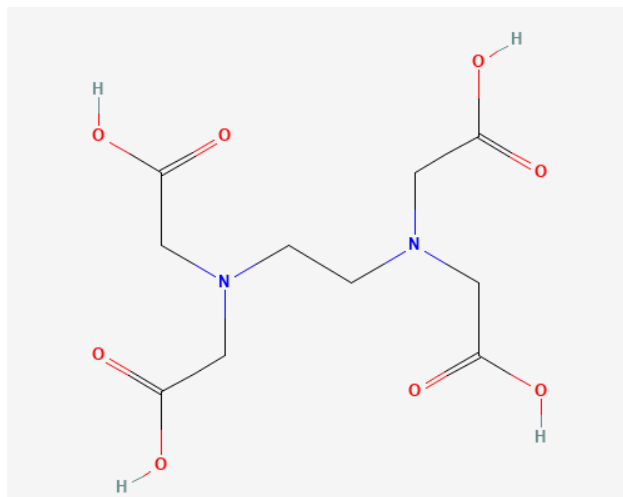
Οι παρατηρούμενες παρενέργειες του DMSA είναι οι διαταραχές στο γαστρεντερικό σωλήνα και η ελαφριά αύξηση της τρανσαμινάσης στον ορό του αίματος

[1]. Αντίστοιχα, κατά την πρόσληψη DMPS παρατηρούνται πόνοι χαμηλά στη μέση (νεφρά), εξανθήματα, κόπωση, αντιδράσεις υπερευαισθησίας και διαταραχές στον γαστρεντερικό σωλήνα [1].

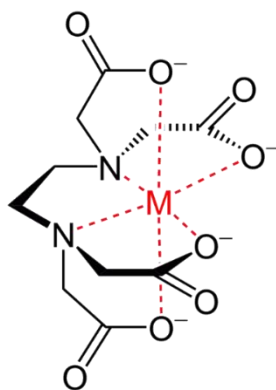
EDTA ή CaNa_2EDTA

Το EDTA (Ethylene diamine tetraacetic acid) (εικόνα 16 και 17) και αντίστοιχα το CaNa_2EDTA (calcium disodium Ethylene diamine tetraacetic acid) (εικόνα 18) είναι από τα πιο γνωστά και ευρέως χρησιμοποιούμενα αντίδοτα για την δηλητηρίαση από μόλυβδο [15]. Αρχικά, το EDTA χρησιμοποιούνταν ως άλας νατρίου (NaEDTA), αλλά παρατηρήθηκε ότι αύξανε την απέκκριση του ασβεστίου μέσω ούρων [15]. Έτσι, προτάθηκε η χρήση του CaNa_2EDTA , το οποίο δεσμεύει τον Pb και απεκκρίνεται με τη μορφή PbNa_2EDTA , αφήνοντας στο σώμα το ασβέστιο [15].

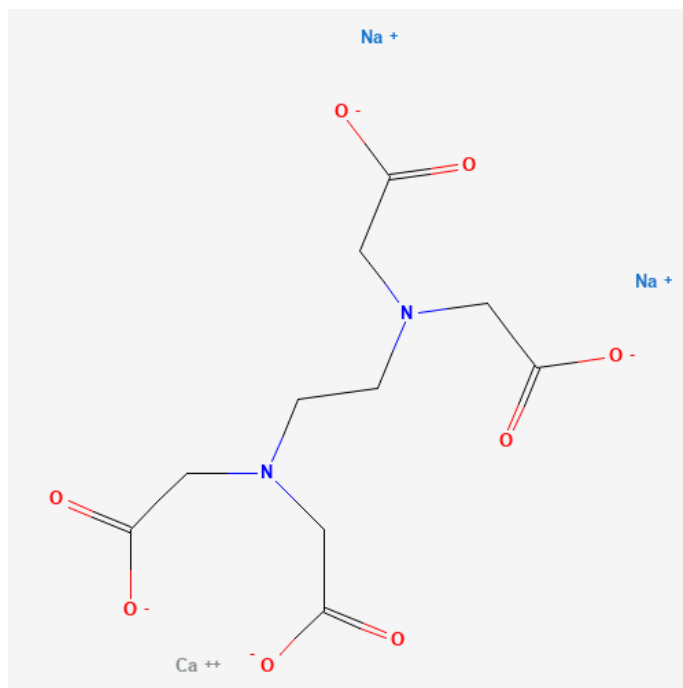
Ο συγκεκριμένος παράγοντας στοχεύει τον μόλυβδο στην κυκλοφορία του αίματος, τον οποίο δεσμεύει και αποβάλλει μέσω των ούρων [18]. Αυτή η προτίμηση για το αίμα προκύπτει από το γεγονός πως δεν απορροφάται από τον γαστρεντερικό σωλήνα, οπότε χορηγείται ενδοφλεβίως [15]. Επίσης, το CaNa_2EDTA κατανέμεται κυρίως στα εξωκυττάρια υγρά του σώματος και αυτή η ιδιότητά του μειώνει την ικανότητα δέσμευσης μόλυβδου στο εσωτερικό των κυττάρων [15].



Εικόνα 16: Δομή EDTA (retrieved from PubChem, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6049>)



Εικόνα 17: Δομή EDTA κατά την δέσμευση μετάλλου (M) (No machine-readable author provided. Shaddack assumed (based on copyright claims)., Public domain, via Wikimedia Commons)



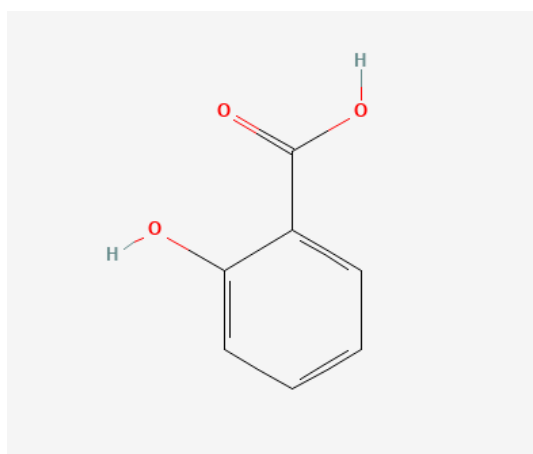
Εικόνα 18: Δομή CaNa₂EDTA (retrieved from PubChem, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6093170>)

Ακόμα και το EDTA, όμως, παρεμποδίζει την βιοσύνθεση της αίμης, κυρίως μέσω της απομάκρυνσης του ψευδαργύρου από το σώμα [21]. Επίσης, συμβάλει στην μεγάλη απώλεια βασικών μεταλλικών ιόντων και αναδιανέμει τον μόλυβδο στον εγκέφαλο [1]. Τέλος, έχει βρεθεί ότι το EDTA συμβάλει στην ανακατανομή του μόλυβδου από τα οστά στους μαλακούς ιστούς, όπως ο εγκέφαλος και τα νεφρά [18]. Η μόνη παρατηρούμενη παρενέργεια αυτού του αντιδότη είναι η νεφρική τοξικότητα [1], η οποία εξαρτάται και από τη χορηγούμενη δόση του αντιδότη και είναι αντιστρεπτή [15]. Όμως, σε καθημερινές δόσεις του φαρμάκου που ξεπερνούν τα 75 mg/kg μπορεί να αποβεί μοιραία [15].

Μελέτες με παιδιά ηλικίας 1 έως 7 ετών με επίπεδα μόλυβδου στο αίμα μεταξύ 25 και 55 µg/dL απέδειξαν ότι η εξάμηνη θεραπεία τους με EDTA και σίδηρο οδήγησε στην βελτίωση των αποτελεσμάτων των γνωστικών τεστ στα οποία υποβλήθηκαν [12].

Σαλικυλικό οξύ

Το σαλικυλικό οξύ (salicylic acid ή 2-hydroxybenzoic acid) είναι ένα μη στεροειδές, αντιφλεγμονώδες φάρμακο και αποτελεί την πρόδρομη ένωση της ασπιρίνης [24]. Πρόκειται για μία πολυφαινόλη που βρίσκεται φυσικά στα φυτά και συμβάλλει στην προστασία τους από παθογόνους μικροοργανισμούς [25]. Βρίσκεται στον φλοιό του κορμού της ιτιάς [26]. Το σαλικυλικό οξύ μπορεί να βρεθεί και σε φυσιολογικές συνθήκες στο αίμα, χωρίς να έχει προηγηθεί η χορήγηση κάποιου ανάλογού του, υποστηρίζοντας την προέλευσή του από τα φυτά που καταναλώνονται ως τροφή [25]. Η δράση του ήταν γνωστή από την Αρχαιότητα, καθώς ο Ιπποκράτης ήταν ο πρώτος που τη περιέγραψε, και την χρησιμοποιούσαν για να γιατρέψουν τον πόνο [25]. Η ελεύθερη μορφή της είναι μια κρυσταλλική σκόνη, η οποία έχει σημείο τήξεως 157 – 159 °C και είναι σχετικά διαλυτή στο νερό και πολύ διαλυτή σε οργανικούς διαλύτες [27].



Εικόνα 19: Δομή σαλικυλικού οξέος (retrieved from PubChem, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/338>)

Χρήσεις σαλικυλικού οξέος στον άνθρωπο

Όπως προαναφέρθηκε, το σαλικυλικό οξύ και τα παράγωγά του έχουν αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες [25]. Το σαλικυλικό οξύ και τα παράγωγά του χρησιμοποιούνται ευρέως για τη θεραπεία πολλών ασθενειών [27]. Το ακετυλοσαλικυλικό οξύ ή αλλιώς η ασπιρίνη είναι το πιο πολυχρησιμοποιούμενο φάρμακο παγκοσμίως [27]. Δρα έναντι της φλεγμονής, για την ανακούφιση του πόνου, αποτρέπει την θρόμβωση του αίματος και μειώνει τον πυρετό [27].

Ο μηχανισμός της δράσης της έχει συσχετιστεί με τη μείωση της παραγωγής προσταγλανδινών και θρομβοξανών, καθώς δύναται να απενεργοποιήσει μη αντιστρεπτά τη δράση της κυκλοοξυγενάσης (cyclooxygenase, COX), του ενζύμου που είναι υπεύθυνο για την παραγωγή τους [27]. Επίσης, φαίνεται να παρεμποδίζει και τη δράση κινασών, όπως του πρωτεϊνικού παράγοντα κB (nuclear factor kappa b, NF-κB) που σχετίζεται με την κυτταρική απόκριση σε φλεγμονώδης αντίδραση [25].

Το σαλικυλικό οξύ παρουσιάζει, επίσης, και αντιοξειδωτική δράση [25]. Δρα κατά των ριζών οξυγόνου δεσμευόντάς τες και προστατεύει τους ιστούς από βλάβες που προκαλούνται από την υποξία [25]. Επιπλέον, το σαλικυλικό οξύ παρεμποδίζει την εκδήλωση οξειδωτικού στρες, καθώς μειώνει τις ρίζες σουπεροξειδικών ανιόντων μέσω της συμβολής του στη δράση του φωσφορικού δινουκλεοτιδίου νικοτιναμίδης αδενίνης (NADPH), το οποίο μειώνει τις ROS στα κύτταρα [25].

Η μακροχρόνια χρήση του σαλικυλικού οξέος συντελεί στη μείωση της πιθανότητας εμφάνισης καρκίνου του παχέος εντέρου κατά 40-50% και δρα αποτρεπτικά κατά της εμφάνισης καρκίνων των πνευμόνων, του οισοφάγου και του στομάχου [24].

Το σαλικυλικό οξύ χρησιμοποιείται επίσης και στην βιομηχανία των τροφίμων και πιο συγκεκριμένα ως οργανικό συντηρητικό στα συσκευασμένα τρόφιμα [28]. Εξαιτίας της αυξημένης παραγωγής τροφίμων, τα συντηρητικά βρίσκουν όλο και περισσότερες εφαρμογές για την προστασία τους από τους μικροοργανισμούς [29]. Πλέον, χρησιμοποιούνται και ως προσθετικά για τη βελτίωση της υφής, της γεύσης, της οσμής και του χρώματος του τροφίμου [29].

Το επίπεδο χρήσης του σαλικυλικού οξέος και των παραγώγων του στα τρόφιμα εξαρτάται από διάφορους παράγοντες, όπως την τεχνολογία που αξιοποιείται για την παραγωγή του τροφίμου, την γεωγραφική προέλευση, την εποχικότητα του προϊόντος, τον χρόνο αποθήκευσής του και την διαδικασία επεξεργασίας ή μαγειρέματός του [30]. Αν πρόκειται για φυτό, η χρησιμοποίηση του συγκεκριμένου συντηρητικού εξαρτάται και από την κατάσταση της καλλιέργειας του φυτού, τις ποικιλίες, την ηλικία και τα τμήματα του φυτού που θα χρησιμοποιηθούν [30].

Στον πίνακα 2 παρουσιάζονται κάποιοι τύποι προϊόντων που περιέχουν σαλικυλικό οξύ ή παράγωγά του [30]. Παρατηρείται ότι χρησιμοποιούνται κυρίως σε συσκευασμένα φρούτα, λαχανικά, κρέας, δημητριακά, ποτά, γλυκίσματα και γαλακτοκομικά προϊόντα [30].

Μία ακόμα χρήση του σαλικυλικού οξέος είναι στην βιομηχανία των καλλυντικών [26]. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιείται ως παράγοντας σε προϊόντα περιποίησης μαλλιών και δέρματος, όπως σαμπουάν, πούδρα προσώπου, ενυδατικές κρέμες, αντηλιακές κρέμες κ.α. [26]. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε συγκεντρώσεις από 0.0008% έως και 3% σε αυτά τα προϊόντα [26]. Αν και το σαλικυλικό κάλιο δεν χρησιμοποιείται πλέον, το σαλικυλικό νάτριο χρησιμοποιείται ως συντηρητικό [26].

Αξίζει να αναφερθεί ότι έχει εγκριθεί και η χρήση του ως παράγοντα για την αποτροπή του ερεθισμού του δέρματος από τον ήλιο [26]. Στον πίνακα 3 παρουσιάζονται κάποιες από τις λειτουργίες είτε του σαλικυλικού οξέος, είτε κάποιου παραγώγου του στα προϊόντα περιποίησης [26].

Πίνακας 2: Προϊόντα στα οποία χρησιμοποιούνται το σαλικυλικό οξύ και τα παράγωγά του ως συντηρητικά

Λαχανικά		Φρούτα	Κρέας και γαλακτοκομικά προϊόντα	Δημητριακά	Ποτά και άλλα τρόφιμα
Φασόλια	Πατάτες	Λεμόνια	Χοιρινό	Καλαμπόκι	Κόκα κόλα
Μπρόκολο	Σπανάκι	Πορτοκάλια	Μοσχάρι	Ρύζι	Τσάι
Λάχανο	Τομάτες	Βερίκοκα	Γαλοπούλα	Σόγια	Χυμός πορτοκάλι
Αγγούρι	Μανιτάρια	Κεράσια	Σκόνη γάλακτος	Σιτάρι	Μέλι
Ελιές	Μαρούλι	Βατόμουρα	Γιαούρτι	Βρώμη	Μπαλσάμικο
Κρεμμύδι	Σέλινο	Σταφύλια	Τυρί cottage	Αλεύρι	ξύδι

Τοξικότητα βαρέων μετάλλων στα φυτά

Οι φυτικοί οργανισμοί, επίσης, αναπτύσσονται παρουσία σημαντικών ποσοτήτων μόλυβδου στο χώμα [31]. Αυτές οι ποσότητες μπορούν να προέλθουν από πηγές που

έχουν ήδη αναφερθεί, όπως οι εκπομπές, αλλά και από εντομοκτόνα και λιπάσματα [31]. Ο μόλυβδος και άλλα βαρέα μέταλλα καταλήγουν και συσσωρεύονται στον αέρα, στο νερό και στο χώμα [32].

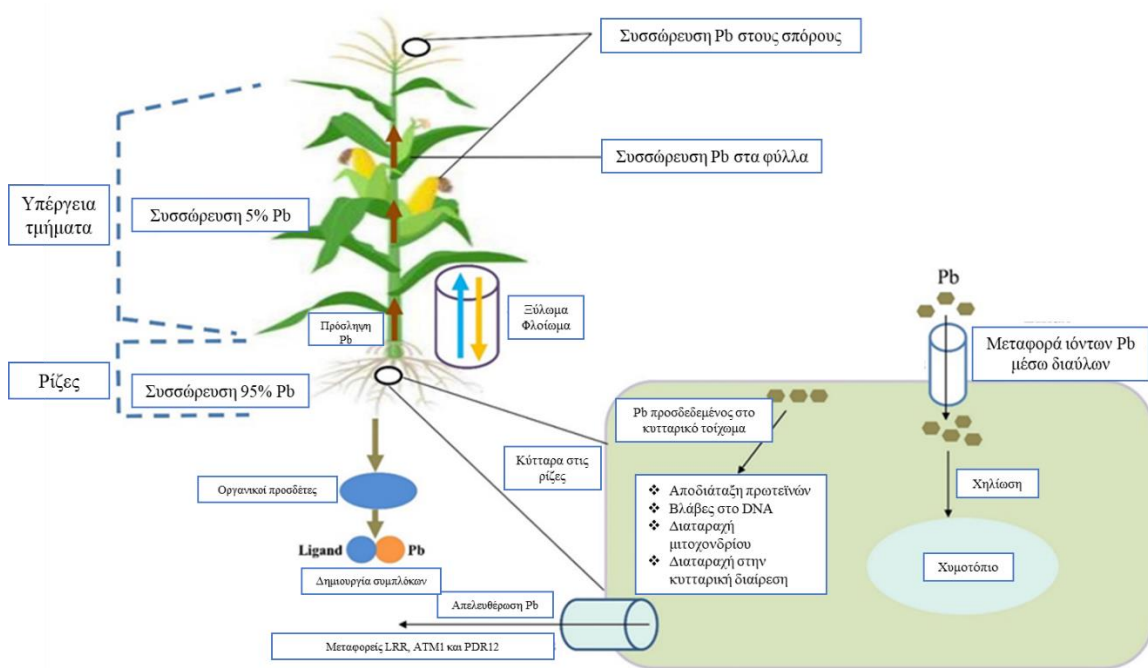
Πίνακας 3: Λειτουργίες σαλικυλικού οξέος και παραγόντων του στα καλλυντικά προϊόντα

Λειτουργίες στα καλλυντικά προϊόντα	
Παράγοντας κατά την ακμής	Hair-conditioning
Παράγοντας κατά την πιτυρίδας	Skin-conditioning
Παράγοντας για γεύση	Συντηρητικό
Αντηλιακός παράγοντας	Αρωματικός παράγοντας
Παράγοντας που απορροφά το UV φως	Denaturant

Η όλο και αυξανόμενη συγκέντρωσή του στο χώμα προκαλεί σοβαρές συνέπειες και στα φυτά, με τελικό αποδέκτη στην τροφική αλυσίδα τον άνθρωπο [31]. Μία ακόμα συνέπεια του μόλυβδου στα φυτά που επηρεάζει τον άνθρωπο, είναι η κατά 42% μείωση της παραγωγής των σιτηρών, για την οποία ευθύνεται, παγκοσμίως [33]. Στους φυτικούς οργανισμούς ο μόλυβδος συσσωρεύεται κυρίως στις ρίζες, αλλά και στα υπέργεια μέρη του φυτού (φύλλα, άνθη, καρποί, κ.τ.λ.) (εικόνα 20) [32].

Οι επιδράσεις του μόλυβδου σχετίζονται και πάλι με την δραστικότητα των ενζύμων σε διάφορα μεταβολικά μονοπάτια [31], καθώς, όπως και στον άνθρωπο, ο μόλυβδος έχει συγγένεια με τα κατάλοιπα ιστιδίνης, τις θειολικές ομάδες και τις καρβοξυτελικές ομάδες των ενζύμων [33]. Μάλιστα, σε συγκεντρώσεις

10^{-5} - 20×10^{-5} mol/L ο μόλυβδος προκαλεί την αναστολή κατά 50% της δραστηριότητας πολλών ενζύμων [31]. Άλλες βλάβες που προκαλεί αφορούν την αναστολή της ανάπτυξης των φυτών, την αποδόμηση πρωτεϊνών, την παρεμπόδιση του μεταβολισμού του αζώτου, την διαταραχή της φωτοσύνθεσης και την καταστροφή του ισοζυγίου του νερού [32].



Εικόνα 20: Τοξικότητα μόλυβδου στα δημητριακά – κατανομή Pb και βλάβες που προκαλεί (τροποποιημένη εικόνα από [34])

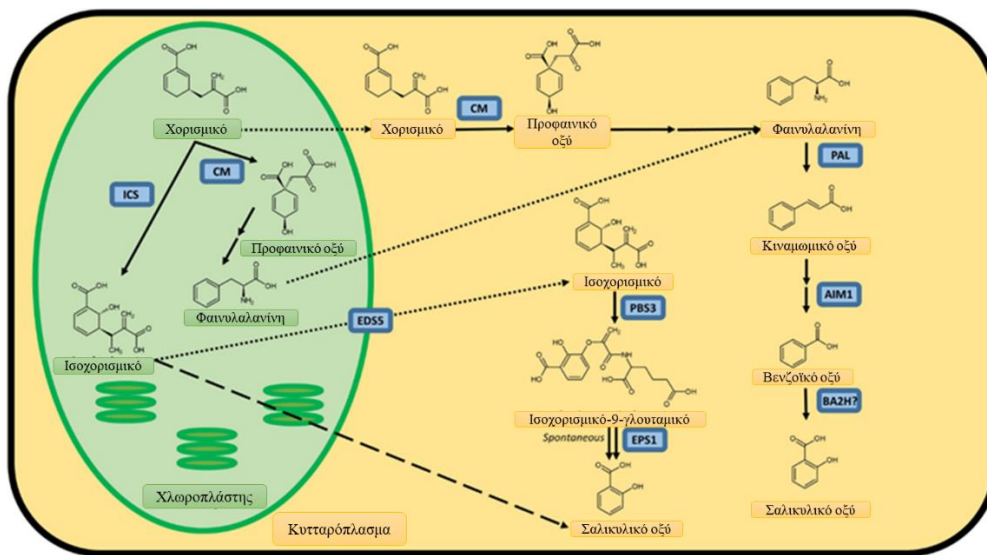
Επίσης, όπως και στον άνθρωπο, η παρουσία μόλυβδου σε ένα φυτικό είδος σχετίζεται με την παραγωγή των ROS [33]. Ομοίως, συμμετέχει και πάλι στην απομάκρυνση χρήσιμων και απαραίτητων μεταλλικών κατιόντων, τα οποία συμμετέχουν στο ενεργό κέντρο πολλών ενζύμων [33].

Επιπλέον, ο μόλυβδος προκαλεί την αύξηση των αμινοξέων στο φυτό [32]. Τα αμινοξέα παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανοχή των καταπονημένων φυτών, καθώς συμβάλουν στην ωσμωτική ρύθμιση, στη ρύθμιση του pH, στην ανταλλαγή ιόντων, στην ομοιόσταση, στην μείωση των ROS και στην χηλίωση βαρέων μετάλλων και ξενοβιοτικών [32].

Επιπλέον, ο μόλυβδος προκαλεί και πιο έντονα συμπτώματα στα φυτά, όπως νέκρωση, μείωση της χλωροφύλλης, αλλαγές στη μορφολογία και τον μεταβολισμό. Έχει βρεθεί ότι στο σιτάρι ο μόλυβδος, εκτός από την μείωση του μήκους της ρίζας, προκαλεί την παραγωγή ROS και καταστρέφει τη μιτοχονδριακή και πυρηνική δομή των κυττάρων [35].

Σύνθεση σαλικυλικού οξέος στα φυτά

Η βιοσύνθεση του σαλικυλικού οξέος στα φυτά ξεκινάει από τους χλωροπλάστες και ολοκληρώνεται στο κυτταρόπλασμα [36]. Το αρχικό μόριο της σύνθεσης είναι το χορισμικό οξύ, το οποίο βρίσκεται στους χλωροπλάστες [36]. Δύο συνθετικά μονοπάτια ξεκινάνε από το χορισμικό οξύ και είτε με την συνθάση ισοχορισμικού (isochorismate synthase, ICS) και το μονοπάτι του ισοχορισμικού που πραγματοποιείται στους χλωροπλάστες, είτε με την λύση αμμωνίας φαινυλαλανίνης (phenylalanine ammonia-lyase, PAL) και το μονοπάτι της φαινυλαλανίνης που διενεργείται στο κυτταρόπλασμα, καταλήγουν στο μόριο του σαλικυλικού οξέος (εικόνα 21) [35,36].



Εικόνα 21: Μονοπάτια βιοσύνθεσης σαλικυλικού οξέος στα φυτά (τροποποιημένη εικόνα από [36])

Αξίζει να σημειωθεί ότι δεν έχουν διευκρινιστεί και χαρακτηριστεί πλήρως όλα τα ένζυμα που παίρνουν μέρος στα μονοπάτια βιοσύνθεσης του σαλικυλικού οξέος [36]. Επιπλέον, το προτιμώμενο μονοπάτι διαφοροποιείται ανάλογα με το φυτικό είδος [36]. Για παράδειγμα, στο *Arabidopsis thaliana* το κυρίαρχο μονοπάτι είναι αυτό με το ένζυμο ICS, ενώ στο *Oryza sativa* είναι το μονοπάτι με το ένζυμο PAL [36].

Το σαλικυλικό οξύ μετά τη σύνθεσή του τροποποιείται στο φυτό. Οι περισσότερες τροποποιήσεις του το καθιστούν αδρανές [36]. Μερικές από αυτές τις τροποποιήσεις είναι η γλυκοσυλίωσή του προς παραγωγή ενός σακχάρου με σαλικυλικό οξύ, η μεθυλίωσή του προς παραγωγή ενός πτητικού μορίου που διαπερνάει τη μεμβράνη και δρα σαν σήμα για τις αλληλεπιδράσεις φυτού και εντόμων και η αμινοξική του τροποποίηση, η οποία πιθανώς συμμετέχει στον καταβολισμό του [36].

Ο ρόλος του σαλικυλικού οξέος στην τοξικότητα των φυτών από βαρέα μέταλλα

Το σαλικυλικό οξύ φαίνεται να συμμετέχει σε πολλές βιολογικές διαδικασίες στα φυτά [37]. Καθώς, όπως προαναφέρθηκε, προέρχεται από τα φυτά, ο ρόλος του στην ρύθμιση της ανάπτυξης του φυτικού οργανισμού, όπως στις διαδικασίες της βλάστησης σπόρου, της άνθισης και της ωρίμανσης του καρπού, καθίσταται κομβικός [31]. Επιπλέον, έχει ρόλο στην αναπνοή των φυτών και το άνοιγμα των στομάτων τους, στη ρύθμιση της θερμοκρασίας, στην παραγωγικότητα του φυτού, στην επαγωγή γονιδίων που σχετίζονται με το γήρας, κ.α. [33].

Ως φυτο-ορμόνη, έχει βρεθεί ότι αυξάνει το μήκος της ρίζας στα βλαστάρια [31,37]. Στους ρόλους της ως ορμόνη, συγκαταλέγεται και η ικανότητά της να επάγει τον συντονισμό και επικοινωνία μεταξύ των κυττάρων, καθώς συμμετέχει σε μονοπάτια επικοινωνίας μαζί με ορμόνες, όπως οι αυξίνες, γιββεριλλίνες, το αιθυλένιο, κ.α. [33]. Επίσης, έχει βρεθεί ότι το σαλικυλικό οξύ συμμετέχει στους μηχανισμούς για την αντιμετώπιση παραγόντων που προκαλούν στρες στον φυτικό οργανισμό, όπως το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) [31].

Το σαλικυλικό οξύ αποτελεί σημαντικό σηματοδοτικό μόριο στα φυτά σε μονοπάτια που ρυθμίζουν την αντοχή σε ασθένειες [31]. Αναφορικά με την δράση του στην άμυνα του φυτικού οργανισμού, αξίζει να αναφερθεί ότι η εξωγενής χορήγηση σαλικυλικού οξέος προάγει την έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με την παθογένεια [33]. Ως αποτέλεσμα, υποστηρίζει την άμυνα του οργανισμού έναντι παθογόνων, όπως βακτήρια, ιούς, μύκητες, κ.α. σε πολλά φυτικά είδη [33]. Πιο συγκεκριμένα, το

σαλικυλικό οξύ ενεργοποιεί έναν καταρράκτη αντιδράσεων στα κύτταρα που έχει ως συνέπεια την παρεμπόδιση της αντιγραφής του ιού και την μετάδοση μηνυμάτων διαμέσου των κυττάρων σε μεγάλη απόσταση [33]. Στον πίνακα 4 παρουσιάζονται κάποιες ασθένειες φυτών που αντιμετωπίζονται με την χορήγηση σαλικυλικού οξέος.

Τέλος, παράγωγα του σαλικυλικού οξέος είναι υπεύθυνα για την προστασία των φυτικών ειδών και έναντι των φυτοφάγων ζώων [33]. Τα παράγωγα προκαλούν το επιτιθέμενο από έντομα φυτό να παράγει σε μεγαλύτερο βαθμό πτητικές ουσίες, οι οποίες είναι υπεύθυνες για την προσέλκυση ζώων μη φυτοφάγων [33].

Αν και η έρευνα σχετικά με την καταπόνηση των φυτικών οργανισμών και τη συμβολή του σαλικυλικού οξέος έχει στραφεί προς τους βιοτικούς παράγοντες στρες, τα τελευταία χρόνια έχουν εντοπιστεί αποκρίσεις του έναντι και σε αβιοτικούς παράγοντες, όπως η UV ακτινοβολία, η ζέστη, το κρύο, η ξηρασία, κ.α. [31].

Αντίστοιχες αποκρίσεις έχουν βρεθεί και παρουσία τοξικών βαρέων μετάλλων [31]. Για παράδειγμα, η παρουσία σαλικυλικού οξέος έδρασε προστατευτικά έναντι της τοξικότητας από κάδμιο σε νεαρά φυτά *Hordeum vulgare* (κριθάρι) και περιόρισε την καταστροφή των κυτταρικών μεμβρανών που προκαλούσε ο τοξικός παράγοντας στα νεαρά φυτά *Oryza sativa* (ρύζι) [31]. Παρομοίως, το σαλικυλικό οξύ προστατεύει τις άκρες της ρίζας των φυτών από οξειδωτικές βλάβες εξαιτίας της παρουσίας αλουμινίου [31].

Βέβαια, σε μεγάλες συγκεντρώσεις (πάνω από 1 mmol/L), το σαλικυλικό οξύ δρα ως τοξίνη στα φυτά, καθώς αυξάνει την παραγωγή των ROS σε περιβάλλοντα έντονης τοξικότητας και ωσμωτικού στρες [31].

Πίνακας 4: Παρουσίαση των ασθενειών των φυτών που καταπολεμούνται με εξωγενή χορήγηση σαλικυλικού οξέος [33]

Κατηγορία μόλυνσης	Ασθένεια / Οργανισμός	Φυτό
Μόλυνση από μύκητα	Έλκος ρυζιού (Sheath blight)	Ρύζι
	Ωίδιο (Powdery mildew)	Αγγούρι
	Σκωρίαση (Rust)	Κουκιά
	Μούχλα (Blue mold)	Ροδάκινο
	Μαράζωμα / <i>Fusarium oxysporum</i>	Ρεβύθι
	Σάπισμα / <i>Rhizoctonia solani</i>	Πατάτα
Μόλυνση από βακτήρια	Κηλίδες / <i>Xanthomonas campestris</i>	Τομάτα
	Καρκίνος των εσπεριδοειδών / <i>Xanthomonas axonopodis</i>	Πορτοκάλι
	Όγκος / <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	<i>Nicotiana benthamiana</i> (είδος καπνού)
Μόλυνση από ιό	Ιός της κηλίδας των φιστικιών	Φυστίκι
	Potato tuber necrotic ring spot disease	Πατάτα
	Turnip mosaic virus	Κινέζικο λάχανο
	Mungbean yellow mosaic disease	Φασόλι μούνγκο
	Ιός του κίτρινου μωσαϊκού της κολοκυθιάς	Κολοκύθα

Η περίπτωση του μόλυβδου

Πολλές μελέτες έχουν υποστηρίξει την ανάμειξη του σαλικυλικού οξέος στους μηχανισμούς αντιμετώπισης της τοξικότητας στους φυτικούς οργανισμούς [38]. Μάλιστα, η έκθεση σε βαρέα μέταλλα αυξάνει την ενδογενή παραγωγή σαλικυλικού οξέος στο φυτό, ενώ η εξωγενής χορήγησή του βελτιώνει την ανεκτικότητα του φυτού σε αυτά [38].

Αξίζει να σημειωθεί ότι το ενδογενές σαλικυλικό οξύ συμμετέχει σε μηχανισμό ανοχής του βαρέος μετάλλου και όχι σε μηχανισμό αποφυγής της πρόσληψής του [38]. Αντίθετα, η χορήγηση εξωγενούς σαλικυλικού οξέος στα φυτά φαίνεται να μειώνει την πρόσληψη βαρέων μετάλλων, όπως ο μόλυβδος, και να περιορίζει τις βλάβες που προκαλεί [32]. Επίσης, η αυξημένη ποσότητα σαλικυλικού οξέος, όχι μόνο δεν βοηθάει το φυτό, αλλά εντείνει και την τοξικότητα που προκαλείται από τον μόλυβδο [38]. Συνεπώς, μόνο μικρές συγκεντρώσεις του απαιτούνται για την αντιμετώπιση της δηλητηρίασης με μόλυβδο [38].

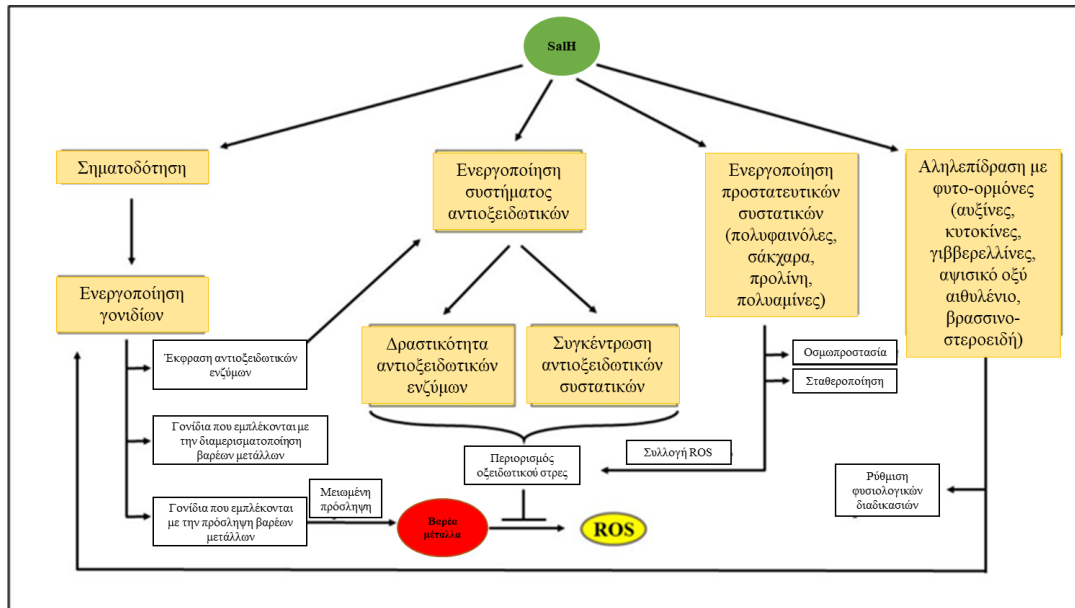
Η φωτοσύνθεση είναι μία από τις πιο ευάλωτες σε βαρέα μέταλλα διαδικασίες των φυτικών οργανισμών [35]. Καθώς τα βαρέα μέταλλα συσσωρεύονται σε διάφορα όργανα του φυτού, επηρεάζουν τις χρωστικές της φωτοσύνθεσης, όπως τα καροτενοειδή και τη χλωροφύλλη, αλλάζουν την δομή των μεμβρανικών δομών του χλωροπλάστη και παρεμποδίζουν την μεταφορά ηλεκτρονίων στις φωτεινές αντιδράσεις [35]. Η κατεργασία με σαλικυλικό οξύ βελτιώνει την περιεκτικότητα του κυττάρου σε χρωστικές και μπλοκάρει τους δίαυλους Ca, αποκλείοντας την μετακίνηση του μόλυβδου στα υπέργεια, φωτοσυνθετικά τμήματα του φυτού και τον περιορισμό του μόνο στις ρίζες [35].

Επίσης, το σαλικυλικό οξύ συμμετέχει στη ρύθμιση αντιοξειδωτικών μεταβολιτών, όπως η προλίνη, η γλυκίνη, τα πολυαμίδια, τα σάκχαρα και οι πολυφαινόλες, οι οποίοι διατηρούν το ισοζύγιο των ROS στον φυτικό οργανισμό, όταν αυτός στρεσάρεται εξαιτίας της παρουσίας βαρέων μετάλλων [35].

Σε μία μελέτη όπου φυτά *Oryza sativa* εκτέθηκαν σε χαμηλή συγκέντρωση (0.05 mmol/L) και μέση συγκέντρωση μόλυβδου (0.25 mmol/L) και τους χορηγήθηκε εξωγενώς σαλικυλικό οξύ 0.1 mmol/L, βελτιώθηκε η παραγωγή χλωροφύλλης, ο μεταβολισμός του H₂O₂ και η δραστικότητα του ενζύμου δισμουτάση του υπεροξειδίου του υδρογόνου (Superoxide dismutase, SOD) [31].

Επίσης, η προ-κατεργασία διαφόρων φυτών με σαλικυλικό οξύ τα προστατεύει από πολλά βαρέα μέταλλα, συμπεριλαμβανομένου και του μόλυβδου [35]. Μία ακόμα δράση του συγκεκριμένου μορίου είναι η ενίσχυση του αντιοξειδωτικού συστήματος του φυτού και η βελτίωση της παραγωγής, όπως παρατηρήθηκε στο φυτό *B. campestris* [35].

Στην εικόνα 22 παρουσιάζονται οι δράσεις του σαλικυλικού οξέος στα φυτά που σχετίζονται και με την παρουσία βαρέων μετάλλων [35].



Εικόνα 22: Παρουσίαση λειτουργιών σαλικυλικού οξέος έναντι βαρέων μετάλλων στα φυτά (τροποποιημένη εικόνα από [35])

B. Σκοπός

Σκοπός της παρούσας διατριβής είναι η αναζήτηση και ο χαρακτηρισμός ενός νέου, λιγότερο τοξικού, υδατοδιαλυτού και ευρέως διαθέσιμου αντιδότη που μπορεί να χρησιμοποιηθεί κατά της δηλητηρίασης από το μόλυβδο. Θεωρώντας την αποτοξίνωση του οργανισμού από βαρέα μέταλλα ως ένα από τα πλέον κρίσιμα ζητήματα στην Ιατρική και την Υγεία του ανθρώπου, η μελέτη κατευθύνθηκε στην αναζήτηση ενός παράγοντα ο οποίος θα μπορούσε να δράσει έναντι αυτών των τοξικών ουσιών.

Δεδομένων των εξαιρετικών ιδιοτήτων του σαλικυλικού οξέος και της μελετημένης δράσης του έναντι της τοξικότητας στα φυτά, καθώς επίσης και της ύπαρξής του σε πολλές τροφές ως συντηρητικό, προτείνεται η χρήση του άλατός του με κάλιο (**SalK**) ως χηλικό παράγοντα έναντι του μόλυβδου. Το προϊόν της χηλίωσης είναι ένα πολυμερές με μοριακό τύπο $\{[\text{Pb}(\text{Sal})_2(\text{H}_2\text{O})]_n\}$ (**SaLead**). Το αντίδοτο **SalK**, καθώς και το σύμπλοκο **SalK** - Pb, **SaLead**, χαρακτηρίστηκαν χημικά και προσδιορίστηκε η τοξικότητά τους *in vitro* και *in vivo*.

Γ. Πειραματικό μέρος

Υλικά και μέθοδοι

Όλοι οι διαλύτες και τα αντιδραστήρια χρησιμοποιήθηκαν χωρίς περαιτέρω καθαρισμό. Ο νιτρικός μόλυβδος, το σαλικυλικό οξύ, η ακετόνη και το τολουόλιο προμηθεύτηκαν από την εταιρία Merck. Το υδροξείδιο του καλίου, η μεθανόλη και το n-εξάνιο ήταν από την εταιρία Riedel-de Haën, ενώ το διχλωρομεθάνιο και το διμεθυλφορμαμίδιο από την Panreac. Τέλος, το διμεθυσουλφοξείδιο προμηθεύτηκε από την Honeywell, το χλωροφόρμιο από την Normapur και το ακετονιτρίλιο, καθώς και το Phosphate buffer saline (PBS) από την Sigma-Aldrich. Οι βολβοί *Allium cepa* αγοράστηκαν από την τοπική αγορά. Τα αυγά της Αρτέμια (brine shrimp eggs) αγοράστηκαν από την Ocean Nutrition, ενώ το θαλασσινό αλάτι από την Tropic Marin.

Η μέτρηση του σημείου τήξεως πραγματοποιήθηκε στη συσκευή Stuart Scientific. Η λήψη των φασμάτων XRF πραγματοποιήθηκε στον αναλυτή Rigaku NEX QC EDXRF. Για τον προσδιορισμό του μοριακού βάρους του συμπλόκου χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της κρυσκοπίας μέσω ενός οσμόμετρου σημείου πήξης Osmomat 3000 basic. Τα δεδομένα περίθλασης ακτίνων X μονοκρυστάλλου της ένωσης συλλέχθηκαν σε διαθλασίμετρο Bruker Kappa APEX2 με μονοχρωματική ακτινοβολία MoK α . Το φάσμα υπερόθρου (Infrared spectroscopy, IR) παραλήφθηκε με το φασματοφωτόμετρο ATR-FT-IR (Cary 630 FTIR) της εταιρείας Agilent Technologies στην περιοχή του φάσματος μεταξύ 4000-370 cm^{-1} . Για την καταγραφή των φασμάτων $^1\text{H-NMR}$ χρησιμοποιήθηκε το όργανο Bruker AC 400 MHz FT-NMR, σε διάλυμα D_2O . Τα UV-Vis φάσματα λήφθηκαν σε φασματοφωτόμετρο UV/Vis σειράς PC UV-1600 της

εταιρείας VWR, ενώ τα φάσματα φθορισμού σε φασματοφθορισμόμετρο σειράς FP-8200 της εταιρείας JASCO. Ένα φωτόμετρο με microplate (HiPo, MPP-96) από την εταιρία biosan χρησιμοποιήθηκε για την μέτρηση της απορρόφησης στα βιολογικά πειράματα με κύτταρα. Περαιτέρω εξοπλισμός και όργανα που χρησιμοποιήθηκαν για τη διεξαγωγή των πειραμάτων ήταν οι θερμαινόμενοι μαγνητικοί αναδευτήρες, ο περιστροφικός εξατμιστήρας, αναλυτικός ζυγός της εταιρείας Scatec, πιπέτες ακριβείας (1000, 100 και 10 μ L), Vortex από την Sanichem, πεχάμετρο (pH meter Basic 20) από την CRISON και μια ειδική πρέσα για παστίλιες.

Σύνθεση και χαρακτηρισμός της ένωσης

Σύνθεση και κρυστάλλωση

Η σύνθεση του **SalK** πραγματοποιήθηκε σε ποτήρι ζέσεως με την εξουδετέρωση 0.138 g σαλικυλικού οξέος (SalH) σε υδατικό διάλυμα 5 mL με 1.5 mL διαλύματος υδροξειδίου του καλίου (KOH) 1 M (1.5 mmol). Το διάλυμα αναδεύτηκε για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (25°C). Όταν έγινε διαυγές, το διάλυμα συμπυκνώθηκε στον περιστροφικό εξατμιστήρα μέχρι ξηρού. Έπειτα το λευκό ίζημα που προέκυψε, δηλαδή το **SalK**, συλλέχθηκε και ανακρυσταλλώθηκε. Η διαδικασία της ανακρυστάλλωσης περιελάμβανε την επαναδιάλυση του ιζήματος σε 5 mL ddH₂O υπό ανάδευση στους 100°C για 5-10 λεπτά. Το προκύπτον διαυγές διάλυμα διηθήθηκε με διηθητικό χαρτί παρουσία πάγου, έτσι ώστε να απομακρυνθούν οι προσμίξεις. Το καθαρό διάλυμα αφέθηκε προς δημιουργία διαφανών κρυστάλλων στους 25°C.

Η σύνθεση του **SaLead** περιελάμβανε την εξουδετέρωση 0.138g SalH (0.5 mmol) σε 5 ml υδατικού διαλύματος με 1 mL διαλύματος KOH 1 M. Έπειτα, 0.5 mmol Pb(NO₃)₂ σε 5 mL υδατικού διαλύματος προστέθηκαν στο παραπάνω διάλυμα. Το διάλυμα αναδεύτηκε στους 25°C μέχρι να παρατηρηθεί ο σχηματισμός ενός λευκού εναιωρήματος. Το διήθημα διηθήθηκε και ξηράνθηκε. Το λευκό ίζημα που προέκυψε ανακρυσταλλώθηκε σε 20 mL ddH₂O με την ίδια διαδικασία. Το καθαρό διαυγές διάλυμα αφέθηκε προς σχηματισμό διαφανών κρυστάλλων στους 25°C.

Αναλυτικά στοιχεία **SalK**: άχρωμοι κρύσταλλοι; σημείο τήξεως: 232-237 °C; MW= 176.21 g·mol⁻¹; IR (cm⁻¹): 1631 (m), 1580 (vs), 1486 (vs), 1458 (vs), 1386 (vs), 1333

(m), 1300 (m), 1250 (s), 1142 (s), 1035 (m), 858 (s), 808 (s), 743 (vs), 700 (s), 666 (s), 567 (m), 546 (m), 529 (m), 456 (m); ^1H NMR (ppm) in D_2O : 7.82-7.79 (d, $\text{H}[\text{dC}]$), 7.47-7.43 (t, $\text{H}[\text{fC}]$), 6.95-6.90 (m, $\text{H}[\text{e.gC}]$); UV-Vis (H_2O): $\lambda=295$ nm ($\log\epsilon=3.64$), $\lambda=230$ nm ($\log\epsilon=3.93$).

Αναλυτικά στοιχεία **SaLead**: άχρωμοι κρύσταλλοι; σημείο τήξεως: $> 250^\circ\text{C}$; $\text{MW}=499.442$ $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$. Στοιχειακή ανάλυση: C: 36.75, H: 2.12 %; υπολογισμένο για $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{O}_7\text{Pb}$: C: 36.67, H: 2.43 %; IR (cm^{-1}): 1591 (m), 1539 (m), 1483 (m) 1444 (m), 1380 (m), 1324 (m), 1258 (m), 1234 (m), 1208 (m), 1150 (s), 1090 (m), 1028 (s), 983 (m), 865 (s), 816 (s), 784 (s), 754 (vs), 699 (m), 660 (s), 566 (m), 530 (s), 462 (s); ^1H NMR (ppm) σε D_2O : 7.77-7.75 (d, $\text{H}[\text{dC}]$), 7.43-7.39 (t, $\text{H}[\text{fC}]$), 6.93-6.87 (m, $\text{H}[\text{e.gC}]$); UV-Vis (H_2O): $\lambda=295$ nm ($\log\epsilon=3.76$), $\lambda=230$ nm ($\log\epsilon=4.04$).

Σημείο τήξης

Για τη μέτρηση του σημείου τήξεως χρησιμοποιήθηκε ανοικτό τριχοειδές σωληνάκι BRIS, στο οποίο προστέθηκε ελάχιστη ποσότητα από τις υπό εξέταση ουσίες (**SaK** και **SaLead**). Η θερμοκρασία τήξης (T_m) των ουσιών καταγράφηκε στη συσκευή Stuart scientific.

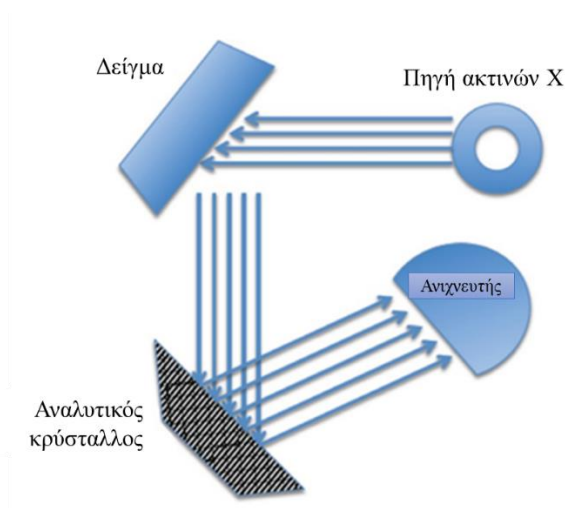
Διαλυτότητα

Ορισμένη ποσότητα των δύο ουσιών (**SaIK** και **SaLead**) μοιράστηκε σε 12 δοκιμαστικούς σωλήνες. Η διαλυτότητα των ουσιών εξετάστηκε παρουσία 800 μL των ακόλουθων διαλυτών: εξάνιο, τολουόλιο, αιθανόλη (EtOH), διχλωρομεθάνιο (CH_2Cl_2), διαιθυλαιθέρας (Et_2O), χλωροφόρμιο (CHCl_3), ακετόνη (CH_3COCH_3), μεθανόλη (MeOH), ακετονιτρίλιο (MeCN), διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF), διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO) και ddH_2O . Η διαλυτότητα ελέγχθηκε και έπειτα από ήπια ανάδευση και ήπια θέρμανση των διαλυμάτων.

Φασματοσκοπία XRF

Η φασματοσκοπία XRF είναι μία αναλυτική τεχνική μεγάλης ακρίβειας [39]. Παρέχει ποσοτικά στοιχεία σχετικά με τη χημική σύσταση ενός δείγματος [39]. Στην φασματοσκοπία XRF, ένα ηλεκτρόνιο απορροφάει ενέργεια από την πηγή του οργάνου και μεταπηδά σε διαφορετική ενεργειακή κατάσταση [40]. Η ενέργεια αυτή θα πρέπει να είναι μεγαλύτερη από την ενέργεια με την οποία ο πυρήνας συγκρατεί το ηλεκτρόνιο στη συγκεκριμένη στοιβάδα [40]. Όταν ένα ηλεκτρόνιο εσωτερικού τροχιακού φεύγει από ένα άτομο, ένα ηλεκτρόνιο από μία κατάσταση υψηλότερης ενεργειακής στάθμης θα μεταφερθεί στο μια κατάσταση χαμηλότερης ενεργειακής στάθμης που έμεινε κενό [40]. Κατά τη διάρκεια αυτής της μετάβασης ένα φωτόνιο μπορεί να εκπέμπεται από το άτομο [40]. Αυτό το φθορίζον φως αποτελεί την χαρακτηριστική ακτίνα X του στοιχείου [40].

Επειδή η διαφορά ενέργειας μεταξύ δύο συγκεκριμένων τροχιακών, σε ένα δεδομένο στοιχείο, είναι πάντα η ίδια (δηλαδή χαρακτηριστική ενός συγκεκριμένου στοιχείου), το φωτόνιο που εκπέμπεται όταν ένα ηλεκτρόνιο μετακινείται μεταξύ αυτών των δύο τροχιακών, θα έχει πάντα την ίδια ενέργεια [40]. Επομένως, προσδιορίζοντας την ενέργεια (μήκος κύματος) του φωτός ακτίνων X (φωτονίου) που εκπέμπεται από ένα συγκεκριμένο στοιχείο, είναι δυνατόν να προσδιοριστεί η ταυτότητα του στοιχείου αυτού [40].



Εικόνα 23: Απλοποιημένο διάγραμμα ανάλυση XRF (επεξεργασμένη εικόνα από [39])

Πειραματικά, κατασκευάστηκε η πρότυπη καμπύλη του νιτρικού μόλυβδου $[Pb(NO_3)_2]$ για τον προσδιορισμό του Pb στο **SaLead**. Η μέτρηση XRF του **SaLead** πραγματοποιήθηκε σε μορφή παστίλιων, οι οποίες περιείχαν συγκεκριμένη ποσότητα του εκάστοτε συμπλόκου και βορικού οξέος (H_3BO_3) (πίνακας 5). Οι παστίλιες δημιουργήθηκαν μετά την κονιορτοποίηση των ουσιών σε γουδί και την συμπίεση του

κονιορτοποιήματος σε ειδική πρέσα (Scatec). Ο αναλυτής που χρησιμοποιήθηκε ήταν ο Rigaku NEX QC EDXRF.

Πίνακας 5: Ποσότητες Pb και βορικού οξέος που περιείχαν οι παστίλες για την φασματοσκοπία XRF

Μάζα Pb	Μάζα H ₃ BO ₃	Μάζα που χάθηκε
0.00605	0.54521	0.01297
0.00684	0.50293	0.01318
0.00822	0.49085	0.01412

Κρυοσκοπία

Ο προσδιορισμός της μοριακής μάζας των δύο συμπλόκων (**SaLead** και **SaIK**) πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της κρυοσκοπίας. Οι πειραματικές μετρήσεις βασίζονται στην παρακάτω εξίσωση:

$$\Delta T_f = K_f m = K_f \frac{m_{\text{διαλυμένης ουσίας}} \cdot 1000}{M_r \text{ διαλυμένης ουσίας} \cdot m_{\text{διαλύτη}}} \quad (\text{εξίσωση 2})$$

όπου ΔT_f είναι η ταπείνωση του σημείου πήξης του εκάστοτε διαλύτη (σημείο πήξης διαλύτη – σημείο πήξης διαλύματος), m είναι η μοριακότητα κατά βάρος του διαλύματος,

K_f είναι η μοριακή ταπείνωση σημείου πήξης του διαλύτη και αντιστοιχεί στην ταπείνωση που προκαλείται από τη διάλυση 1 mole διαλυμένης ουσίας σε 1000 g διαλύτη [41].

Η ταπείνωση του σημείου πήξης εξαρτάται από τη συγκέντρωση τους διαλύματος. Παρασκευάστηκε πρότυπο διάλυμα συγκέντρωσης 10 mg/mL σε διαλύτη DMSO. Ακολούθησε αραιώση 1 μ L του συμπυκνωμένου δείγματος σε 49 μ L ddH₂O. Η οσμωτικότητα του διαλύματος μετρήθηκε στη συσκευή OSMOMAT 3000 Freezing Point Osmometer της Gonotec και καταγράφηκαν 6 τιμές εκφρασμένες σε mOsmol/kg.

XRD

Η επίλυση της ατομικής και μοριακής δομής του **SaLead** πραγματοποιήθηκε μέσω της κρυσταλλογραφίας ακτινών X, κατά την οποία τα κρυσταλλικά άτομα προκαλούν την περίθλαση προς πολλές κατευθύνσεις μιας δέσμης προσπιπτουσών ακτινών X. Μονοκρύσταλλοι του συμπλόκου, κατάλληλοι για κρυσταλλική ανάλυση πάρθηκαν μέσω αργής εξάτμισης του διαλύτη σε θερμοκρασία δωματίου και τοποθετήθηκαν στο διαθλασίμετρο Bruker Kappa APEX2. Οι διαστάσεις της κυψελίδας καθορίστηκαν μετά από 200 υψηλής έντασης ανακλάσεις ($> 10 \sigma(I)$) εύρους $2.9 < 2\theta < 27.2^\circ$.

Κανένας κρύσταλλος δεν καταστράφηκε κατά την συλλογή δεδομένων. Οι πόζες (frames) που συλλέχθηκαν για κάθε κρύσταλλο αναλύθηκαν μέσω του Bruker SAINT Software package [42]. Τα δεδομένα διορθώθηκαν μέσω αριθμητικής μεθόδου

(SADABS), βάσει των διαστάσεων του κρυστάλλου [43]. Η δομή λύθηκε με το πρόγραμμα SUPERFLIP [44]. Η βελτιστοποίηση των δεδομένων (full-matrix least-squares methods on F^2) και όλοι οι υπόλοιποι υπολογισμοί πραγματοποιήθηκαν μέσω του προγράμματος Crystals version 14.40b. Όλα τα μη υδρογονικά άτομα βελτιώθηκαν ανισοτροπικά. Τα άτομα υδρογόνου τοποθετήθηκαν βάσει της αναμενόμενης θέσης τους, η οποία βελτιώθηκε μέσω ήπιων περιορισμών. 5306 ανακλάσεις μετρήθηκαν, από τις οποίες οι 2450 ήταν μοναδικές.

Στον πίνακα 6 παρουσιάζονται τα πειραματικά δεδομένα της λύσης της δομής του **SaLead**.

Πίνακας 6: Κρυσταλλικά δεδομένα του SaLead

Μοριακός Τύπος	C ₁₄ H ₁₂ O ₇ Pb
Μοριακό Βάρος (g/mol)	499.44
Κρυσταλλικό σύστημα	monoclinic
Space Group	P21
a (Å)	11.1499(9)
b (Å)	4.8612(4)
c (Å)	14.1814(11)
Volume (Å³)	723.55(10)
Z	2
P_{calc} (mg/m³)	2.292
F (000)	468

Φασματοσκοπία ATR-FTIR

Η Φασματοσκοπία Υπερύθρου Μετασχηματισμού Fourier με Αποσβένουσα Ολική Ανάκλαση (ATR-FTIR) στηρίζεται στην απορρόφηση υπέρυθρης ακτινοβολίας από τα μόρια μιας ένωσης τα οποία διεγείρονται σε υψηλότερες στάθμες δόνησης ή περιστροφής [45]. Οι απορροφήσεις στο IR φάσμα προέρχονται από την αλληλεπίδραση της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας με το ηλεκτρικό δίπολο ενός μορίου [45]. Οι δονήσεις είναι χαρακτηριστικές για την αλληλεπίδραση της κάθε ουσίας και, συνεπώς, το φάσμα δονήσεων που λαμβάνεται είναι χαρακτηριστικό των χημικών στοιχείων που υπάρχουν στο δείγμα. Τα φάσματα υπέρυθρου λαμβάνονται σε βελτιωμένη μορφή μετά από μετασχηματισμό Fourier των πρωταρχικών δεδομένων.

Μικρή ποσότητα των κρυστάλλων **SaLead** αλλά και **SaIK** και των αντίστοιχων ligand [(PbNO₃)₂, SaH] τοποθετήθηκαν κάτω από τον διαφανή κρύσταλλο (με υψηλό δείκτη διάθλασης) του οργάνου. Τα φάσματα λήφθηκαν από το φασματοφωτόμετρο FTIR της εταιρείας Agilent, εφαρμόζοντας το πρόγραμμα MicroLab Expert.

Φασματοσκοπία UV-Vis

Η φασματοφωτομετρία μοριακής απορρόφησης UV-Vis αναφέρεται στην απορρόφηση μονοχρωματικής ακτινοβολίας από το δείγμα προκαλώντας ηλεκτρονιακές μεταπτώσεις σε υψηλότερης ενέργειας μοριακά τροχιακά [46]. Η απορρόφηση του φωτός από το δείγμα μετράται μέσω του φασματοφωτόμετρου και καταγράφεται το φάσμα της

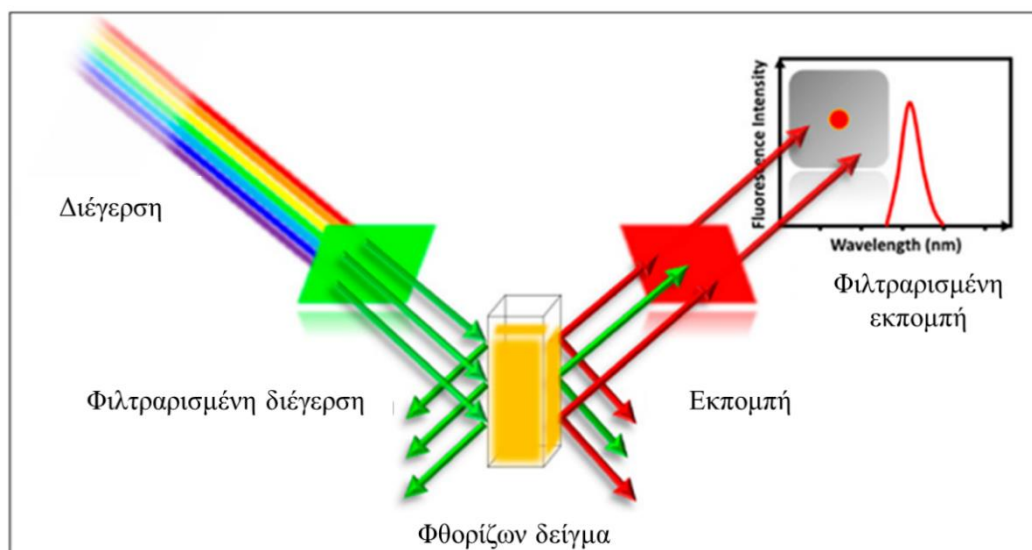
απορρόφησής του [46]. Η υπεριώδης (UV) περιοχή αναφέρεται σε μήκη κύματος 185-380 nm, ενώ η ορατή (Vis) περιοχή αναφέρεται σε μήκη κύματος 380-780 nm [46].

Η τεχνική αυτή χρησιμοποιήθηκε για την ταυτοποίηση και τον έλεγχο της σταθερότητας (0 h, 24 h, 48 h, 1 week) των **SaLead** και **SaIK**, καθώς και των ligands **SalH** και $(\text{PbNO}_3)_2$. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε αραιωμένα υδατικά διαλύματα συγκέντρωσης $5 * 10^{-5}$ M σε κυψελίδα των 2 mL, αφού πρώτα το όργανο μηδενίστηκε με τον διαλύτη, δηλαδή το ddH₂O. Η λήψη των φασμάτων πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα M. Wave Professional 1.0 στο UV-Vis φασματοφωτόμετρο σειράς PC UV 1600 της εταιρείας VWR.

Φασματοσκοπία Φθορισμού

Ο φθορισμός είναι μια φυσικοχημική ανταλλαγή ενέργειας, όπου τα φωτόνια μικρού μήκους κύματος απορροφώνται από ένα μόριο και επανεκπέμπονται ως φωτόνια μεγαλύτερου μήκους κύματος [47]. Η επανεκπομπή φωτός μεγαλύτερου μήκους κύματος καλείται φθορισμός [47].

Η μέτρηση του φθορισμού που παρατηρείται στις δύο ουσίες (**SaLead** και **SaIK**) πραγματοποιήθηκε σε κυψελίδα των 2 mL. Ο φθορισμός τους καταγράφηκε σε διάφορες συγκεντρώσεις, ενώ συγκρίθηκε και με τον παρατηρούμενο φθορισμό του διαλύτη (ddH₂O) και των ligands (**SalH** και $(\text{PbNO}_3)_2$). Τα φάσματα καταγράφηκαν σε φασματοφθορισμόμετρο σειράς FP-8200 της εταιρείας Jasco.



Εικόνα 24: Σχηματική αναπαράσταση φθορισμού (επεξεργασμένη εικόνα από [48])

Φασματοσκοπία $^1\text{H-NMR}$

Το NMR (πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός) είναι η μελέτη των μαγνητικών ιδιοτήτων και των αντίστοιχων ενεργειών του πυρήνα [49]. Όταν ένας πυρήνας τοποθετείται μέσα σε ισχυρό, εξωτερικό, μαγνητικό πεδίο, παρατηρείται απορρόφηση ενέργειας ραδιοσυχνότητας [49]. Οι πυρήνες απορροφούν ενέργεια, δηλαδή συντονίζονται σε διαφορετικά μήκη κύματος ο καθένας [49]. Αυτό το γεγονός αξιοποιείται στη φασματοσκοπία NMR για την ανάλυση της δομής μιας ουσίας. Επίσης, η φασματοσκοπία NMR αξιοποιείται και για την μελέτη της σταθερότητας μιας ουσίας.

Τα δείγματα που μελετήθηκαν μέσω φασματοσκοπίας NMR ήταν το **SaLead** και το **SaIK** σε δευτεριωμένο νερό (D_2O). Περίπου 10 mg της κάθε ουσίας ζυγίστηκε και διαλύθηκε στο D_2O και λήφθηκαν τα φάσματά της στις 0 h, 48 h και 1 week στο όργανο

AC 400 MHz FT-NMR της εταιρείας Bruker. Τα παραπάνω φάσματα συγκρίθηκαν με φάσματα του SalH που βρέθηκαν βιβλιογραφικά.

Εύρεση σταθεράς πρόσδεσης

Η μελέτη της σταθεράς πρόσδεσης (K_f) πραγματοποιήθηκε με την καταγραφή της απορρόφησης εννιά υδατικών διαλυμάτων **SalK** (10^{-5} to $9 \cdot 10^{-5}$ M) και $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ ($9 \cdot 10^{-5}$ to 10^{-5} M), στα οποία η αναλογία $\text{Sal}^-/\text{Pb}^{2+}$ μεταβάλλονταν από 0.1 σε 0.9 σε κάθε διάλυμα, ενώ η συνολική συγκέντρωση των δύο αντιδρώντων παρέμενε σταθερή και ίση με 10^{-4} M. Παράλληλα, λήφθηκαν και τα αντίστοιχα φάσματα του **SalK** (10^{-5} to $9 \cdot 10^{-5}$ M) και του $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ ($9 \cdot 10^{-5}$ to 10^{-5} M) στα 190-450 nm.

Η σταθερά πρόσδεσης υπολογίστηκε από την παρατηρούμενη απορρόφηση στα 230 nm. Θεωρείται ότι κατά την αντίδραση παράγεται το $[\text{Pb}(\text{Sal})_2(\text{H}_2\text{O})]$ ως μοναδικό προϊόν. Οι απορροφήσεις των **SalK** και $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ αφαιρέθηκαν από την αντίστοιχη απορρόφηση στα δείγματα όπου *in situ* δημιουργείται το σύμπλοκο. Ο συντελεστής μοριακής απορρόφησης (molecular extinction coefficient (ϵ)) του **SaLead** βρέθηκε ίσος με $10870.2 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ στα 230 nm. Η σταθερά πρόσδεσης (K_f) προκύπτει από την αντίδραση της εξίσωσης (βλέπε «Αποτελέσματα. 2. Εύρεση σταθεράς πρόσδεσης») και υπολογίζεται από τον Νόμο των Beer-Lambert. Ο Νόμος Beer-Lambert συνοψίζεται στην εξής εξίσωση:

$$A = -\log T = -\log(I/I_0) = \epsilon dC \text{ (εξίσωση 3)}$$

όπου A η απορρόφηση που μετράται, T η διαπερατότητα, d το πάχος της κυψελίδας, C η συγκέντρωση του διαλύματος και ϵ ο συντελεστής μοριακής απορρόφησης [46].

Βιολογικές μελέτες

Μελέτη της *in vitro* τοξικότητας

IC₅₀ έναντι MRC-5 κυττάρων

Για την εκτέλεση των πειραμάτων εύρεσης της τιμής του IC_{50} , δηλαδή της μισής μέγιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης μιας ουσίας, προετοιμάστηκαν stock, υδατικά διαλύματα των **SaLead** και **SaIK** και αραιώθηκαν σε υγρό θρεπτικό καλλιέργειας των φυσιολογικών, ανθρώπινων, εμβρυικών ινοβλαστών πνεύμονα (normal human fetal lung fibroblast cells, MRC-5) στις επιθυμητές συγκεντρώσεις, καλύπτοντας το εύρος 50-500 μM για το **SaLead** και 400-1600 μM για το **SaIK**.

Τα κύτταρα επώαστηκαν παρουσία των διαφόρων συγκεντρώσεων των ουσιών για 48 h και το ποσοστό επιβίωσης των κυττάρων καθορίστηκε από την δοκιμή της Σουλφοροδαμίνης Β (Sulforhodamine B assay, SRB) [50]. Πιο συγκεκριμένα, 100 μL των κυττάρων σε θρεπτικό υλικό DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) τοποθετήθηκαν σε κάθε πηγάδι (well) ενός microplate 96 θέσεων. Η πυκνότητα των κυττάρων ήταν 2000 κύτταρα ανά πηγάδι και αφέθηκαν να πολλαπλασιαστούν για 24 h σε θερμοκρασία 37°C. Μετά το πέρας των 24 h, τα κύτταρα επώαστηκαν για 48 h παρουσία των διαφόρων συγκεντρώσεων των δύο ουσιών σε τελικό όγκο 200 μL . Η μέθοδος SRB, η οποία προκαλεί τον χρωματισμό των ζωντανών κυττάρων με την χρωστική ουσία σουλφοροδαμίνη Β, επιτρέπει την καταγραφή του ποσοστού των κυττάρων που επιβίωσαν παρουσία των ουσιών σε σχέση με το control, μέσω της αντίστοιχης απορρόφησής τους [50].

Μικροπυρήνες

Ο προσδιορισμός της γενοτοξικότητας του **SaLead** πραγματοποιήθηκε μέσω της δομικής των μικροπυρήνων (MN assay) [51]. Τα κύτταρα MRC-5 καλλιεργήθηκαν σε πυκνότητα 2×10^4 κύτταρα ανά πηγάδι πάνω σε αποστειρωμένες καλυπτρίδες, οι οποίες τοποθετήθηκαν μέσα σε plate με 6 πηγάδια. Κάθε πηγάδι περιείχε 3 mL του μέσου καλλιέργειας. Τα κύτταρα επώαστηκαν στο θρεπτικό μέσο DMEM για 24 h. Έπειτα, επώαστηκαν για 48 h παρουσία της τιμής IC₅₀ του **SaLead**, δηλαδή παρουσία 260 μM **SaLead**. Μετά το πέρας των 48 h, οι καλυπτρίδες πλύθηκαν 3 φορές με Phosphate buffer saline (PBS) και μετά επώαστηκαν σε υποτονικό διάλυμα KCl 75 mM για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Τα υποτονικά κύτταρα μονιμοποιήθηκαν μέσω τριπλής πλύσης με διάλυμα 1/3 ακετικό οξύ/μεθανόλη (v/v). Ακολούθησε περαιτέρω πλύση με κρύα μεθανόλη που περιείχε 1% ακετικό οξύ. Τέλος, η χρώση των κυττάρων στις καλυπτρίδες πραγματοποιήθηκε μέσω επώασης με τη χρωστική πορτοκαλόχρουν της ακριδίνης (50 μg/mL) για 15 min στους 37°C. Το υπόλοιπο της χρωστικής απομακρύνθηκε με το ξέπλυμα των καλυπτρίδων και κατ' επέκτασιν των κυττάρων με PBS 3 φορές. Ο αριθμός των κυττάρων με μικροπυρήνες καθορίστηκε από την παρατήρηση 450 κυττάρων. Το πείραμα εκτελέστηκε δύο φορές [51].

Μελέτη της in vivo τοξικότητας

Δοκιμή Allium cepa

Η δοκιμή *Allium cepa* απαιτεί την προμήθεια μικρών βολβών από την τοπική αγορά. Οι βολβοί αυτοί επωάζονται σε δοκιμαστικούς σωλήνες των 16 mL με απεσταγμένο νερό στους 25°C για 48 h, σε επωαστήρα όπου διατηρείται σταθερή η υγρασία μεταξύ 50-60% και τηρείται 12ωρη εναλλαγή φωτός και σκοταδιού. Οι βολβοί θεωρούνταν έτοιμοι για επώαση με 3.5 μM, 80 μM και 152 μM **SaIK** (50, 1100 και 2100 μg/dL) ή **SaLead** (70, 1650 και 3120 μg/dL), όταν το μέγεθος της ρίζας τους ήταν μεγαλύτερο από περίπου 0.5 cm. Η επώαση διήρκησε 48 h. Το απεσταγμένο νερό χρησιμοποιήθηκε ως control.

Η παρατήρηση των κυττάρων της ρίζας πραγματοποιήθηκε με περαιτέρω κατεργασία των ριζών κάθε βολβού. Πιο συγκεκριμένα, ολόκληρες οι ρίζες επώαστηκαν για 10 min στους 37 °C παρουσία 1 mL HCl 6 N. Έπειτα, η περίσσεια HCl απομακρύνθηκε με πλύση των ριζών με ddH₂O. Προστίθενται στις ρίζες 1 mL Schiff reagent και επωάζονται για 40 min στους 37 °C. Ομοίως, απομακρύνεται η χρωστική και προστίθενται 0.5 mL οξικού οξέος 45% για 1 min. Αμέσως μετά επιλέγονται 6 ρίζες, οι άκρες των οποίων παρατηρούνται στο μικροσκόπιο, σε αντικειμενοφόρο πλάκα.

Τα ποσοστά των mitotic index, των χρωμοσωμικών ανωμαλιών (CA), των ανωμαλιών στη μορφολογία του πυρήνα (NA) και της εμφάνισης μικροπυρήνων (MN) προέκυψε από την μικροσκοπική παρατήρηση 1800 κυττάρων ανά συγκέντρωση, δηλαδή 300 κυττάρων ανά καλυπτρίδα και 6 καλυπτρίδες ανά συγκέντρωση [52].

Δοκιμή Artemia salina

Η δοκιμή *Artemia salina* (ή Brine shrimp) απαιτεί την καλλιέργεια του μικρού καρκινοειδούς *Artemia salina* από αυγά του συγκεκριμένου είδους. Τα αυγά, και συγκεκριμένα 1 g αυτών, ενυδατώνονται σε 500 mL εμφιαλωμένου νερού για 1 h σε μία 2-λιτρη διαχωριστική χοάνη. Μετά το πέρας της μίας ώρας, 17 g θαλασσινό αλάτι διαλύθηκε στην χοάνη. Ο αερισμός των αυγών επιτεύχθηκε με τη χρήση μιας αντλίας αέρα. Τα αυγά επώαστηκαν σε θερμοκρασία δωματίου υπό συνεχή φωτισμό και αερισμό για 48 h.

Όταν τα αυγά εκκολάφθηκαν, συλλέχθηκαν μικρές προνύμφες *Artemia salina*, οι οποίες επώαστηκαν παρουσία 3.5 μM , 80 μM και 152 μM **SaIK** (50, 1100 και 2100 $\mu\text{g/dL}$, αντίστοιχα) or **SaLead** (70, 1650 και 3120 $\mu\text{g/dL}$, αντίστοιχα) σε τελικό όγκο 1 mL NaCl 0.9%, για 24 h σε θερμοκρασία 25°C. Μετά τις 24 h, οι νύμφες παρατηρήθηκαν στο στερεοσκόπιο. Ο θάνατος μιας νύμφης συμπεραίνεται όταν σε 10 s παρατήρησής της δεν καταγράφεται καμία εσωτερική ή εξωτερική κίνηση. Κάθε πείραμα επαναλήφθηκε 3 φορές [53].

Δ. Αποτελέσματα – Συζήτηση

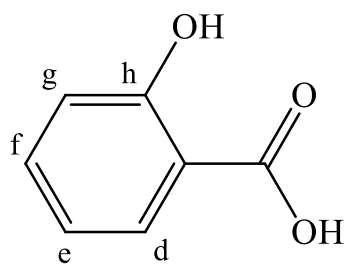
Σύνθεση και χαρακτηρισμός της ένωσης

Σύνθεση και κρυστάλλωση

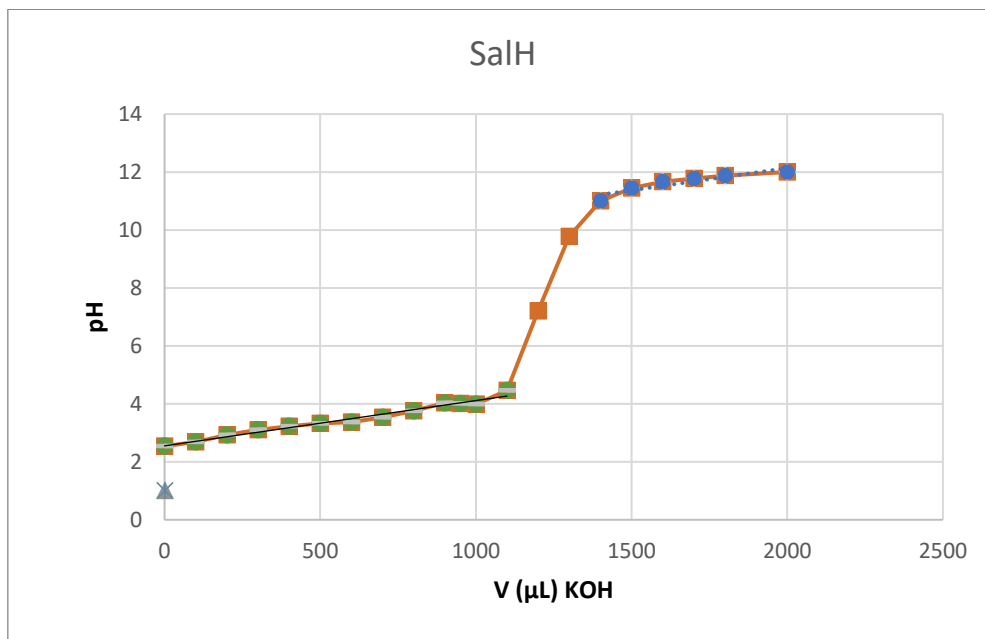
Αρχικά, η στοιχειομετρία της αντίδρασης του **SalK** και του **SaLead** καθορίστηκαν μέσω τιτλοδότησης (pH) των διαλυμάτων SalH και SalH/Pb(NO₃)₂, αντίστοιχα. Η δομή του σαλικυλικού οξέος (SalH), δηλαδή του ligand στα δύο συντιθέμενα μόρια, παρουσιάζεται στην εικόνα 25. Στην εικόνα 26, παρουσιάζονται τα διαγράμματα που προέκυψαν από την τιτλοδότηση. Στην περίπτωση του **SalK** (εικόνα 26 A), φαίνεται ότι το SalH εξουδετερώνεται με περίπου 1,2 mL KOH 1 M. Αντίθετα, όταν στην αντίδραση του SalH με το KOH υπάρχει και νιτρικός μόλυβδος [Pb(NO₃)₂] (εικόνα 26 B), απαιτούνται 1 mL KOH 1 M για την εξουδετέρωση του SalH.

Η σύνθεση του **SalK** πραγματοποιήθηκε μέσω της ανάμειξης σαλικυλικού οξέος με περίσσεια υδροξειδίου του καλίου (KOH) (εικόνα 27, reaction 1). Η σύνθεση του **SaLead** πραγματοποιήθηκε με την αντίδραση του νιτρικού μόλυβδου με σαλικυλικό κάλιο (**SalK**) (εικόνα 27, reaction 2). Τα λευκά προϊόντα των παραπάνω αντιδράσεων ανακρυσταλλώθηκαν και άχρωμοι κρύσταλλοι προέκυψαν από την αργή εξάτμιση του διαλύτη τους (ddH₂O). Ο μοριακός τύπος του **SaLead** καθορίστηκε αρχικά μέσω φασματοσκοπικών μεθόδων. Η δομή του αναλύθηκε με Περίθλαση Ακτινών X μονοκρυστάλλου (single crystal X-ray diffraction analysis). Οι κρύσταλλοι είναι

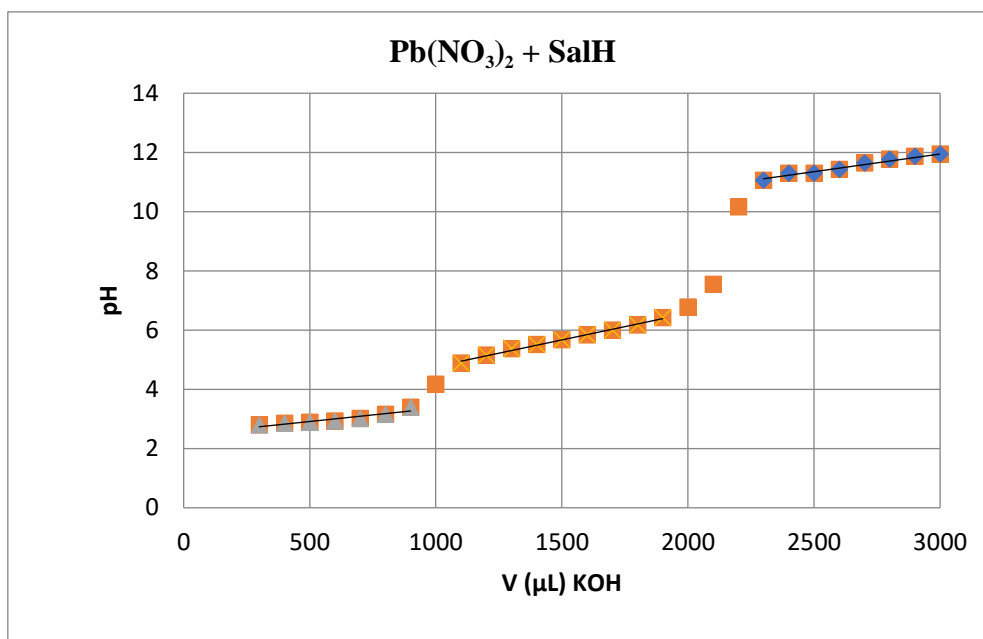
σταθεροί όταν διατηρούνται σε θερμοκρασία δωματίου και στο σκοτάδι, σε φυσιολογική ατμόσφαιρα.



Εικόνα 25: Δομή σαλικυλικού οξέος (SalH) (ligand) [54]



(A)

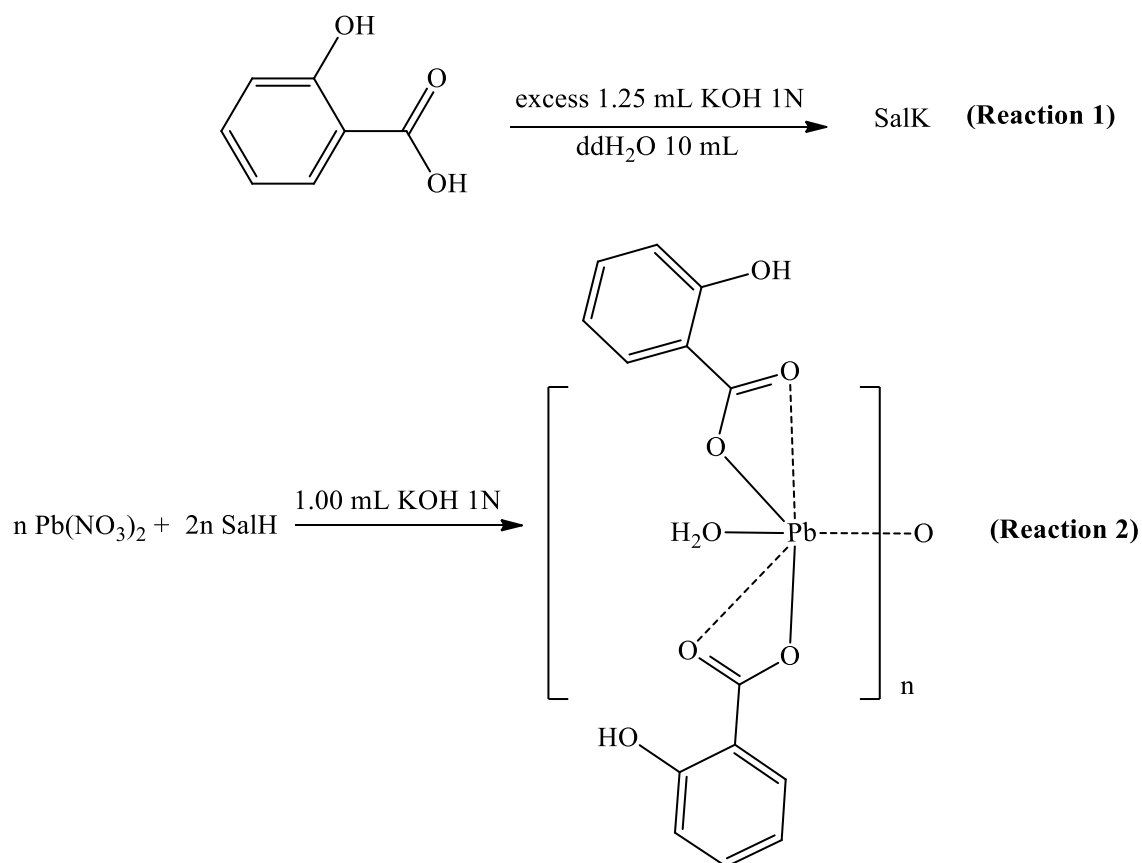


(B)

Εικόνα 26: V(μL) KOH και τιμή pH των διαλυμάτων SalH (A) και Pb(NO₃)₂ + SalH (B) [54]

Σημείο τήξης

Κατά τη μελέτη των **SaLead** και **SaIk** πραγματοποιήθηκε ο προσδιορισμός των σημείων τήξεώς τους. Η σταδιακή αύξηση της θερμοκρασίας προκάλεσε την αλλαγή του χρώματος του **SaIk** στους 240 °C και την ολική τήξη του στους 241-243 °C. Βιβλιογραφικά, το σημείο τήξεως του **SaIk** βρίσκεται μεταξύ 249-255 °C. Αντιθέτως, η αύξηση της θερμοκρασίας μέχρι τους 250 °C δεν προκάλεσε την τήξη του **SaLead**. Το σημείο τήξεως του σαλικυλικού οξέος (SalH) βρέθηκε στους 154 °C, το οποίο συνάδει με την υπάρχουσα βιβλιογραφία (158 °C) [55] και αποτελεί ένδειξη της δημιουργίας των δύο νέων συμπλόκων.



Εικόνα 27: Η πορεία αντίδρασης για τη σύνθεση του SaLead [54]

Διαλυτότητα

Από τον έλεγχο της διαλυτότητας των δύο συμπλόκων, συμπεραίνεται ότι το **SalK** και το **SaLead** είναι διαλυτά στην ακετόνη, τη μεθανόλη, το διμεθυλομεθαναμίδιο (DMF), το διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO) και το νερό. Το **SaLead** είναι, επίσης, διαλυτό στο τολουένιο, το εξάνιο, το χλωροφόρμιο (CHCl_3), το διχλωρομεθάνιο (CH_2Cl_2) και το ακετονιτρίλιο (MeCN) (Πίνακας 6).

Πίνακας 7: Διαλυτότητα SaLead και SaIK σε διάφορους διαλύτες

Solubility	SaLead	SaIK	Solubility	SaLead	SaIK
Toluene	+	-	MeOH	+	+
Et ₂ O	-	-	EtOH	-	-
Hexane	+	-	MeCN	+	-
CHCl ₃	+	-	DMF	+	+
CH ₂ Cl ₂	+	-	DMSO	+	+
Acetone	+	+	H ₂ O	+	+

Φασματοσκοπία XRF

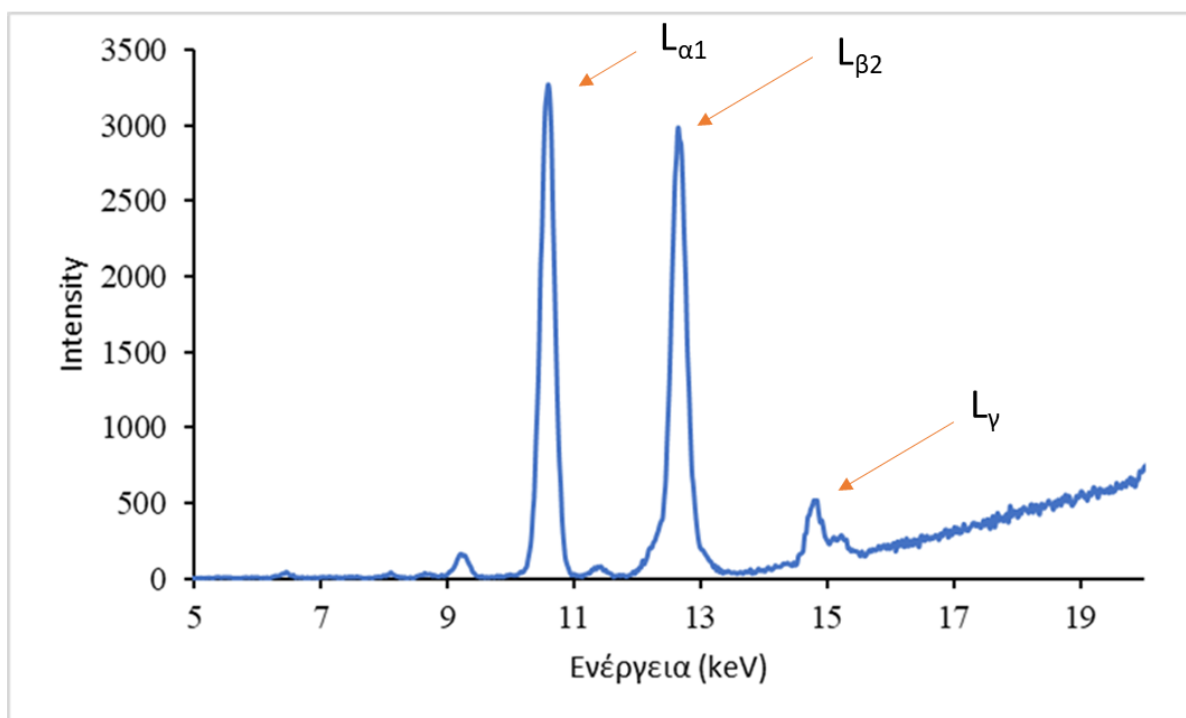
Η παρουσία του Pb στο **SaLead** επιβεβαιώνεται από τις χαρακτηριστικές ενέργειες των φασματικών γραμμών στο φάσμα που είναι ανάλογες με τις αντίστοιχες θεωρητικές (πίνακας 7, εικόνα 28). Επιπλέον, η περιεκτικότητα του Pb είναι $51.04 \pm 0.73\%$ w/w, η οποία, όμως, δεν συμφωνεί με την θεωρητικά υπολογιζόμενη (41.52% w/w). Αυτό ίσως συμβαίνει γιατί το **SaLead** είναι πολυμερές και μέσα σε διάλυμα μπορεί να διασπάται σε μονομερή που ακόμα δεν έχουν εντοπιστεί.

Κρυοσκοπία

Το μοριακό βάρος (MW) του **SaLead** και του **SaIK** προσδιορίστηκε μέσω της κρυοσκοπίας, η οποία, όπως αναφέρθηκε, βασίζεται στην ταπείνωση του σημείου πήξεως

Πίνακας 8: Χαρακτηριστικές ενέργειες (keV) φασματικών γραμμών Pb

Φασματικές γραμμές Pb	Πειραματική ενέργεια Pb (keV)	Θεωρητική ενέργεια Pb (keV)
$L_{\alpha 1}$	10.55	10.58
$L_{\alpha 2}$	10.45	-
$L_{\beta 1}$	12.61	-
$L_{\beta 2}$	12.62	12.64
L_{γ}	14.76	14.83



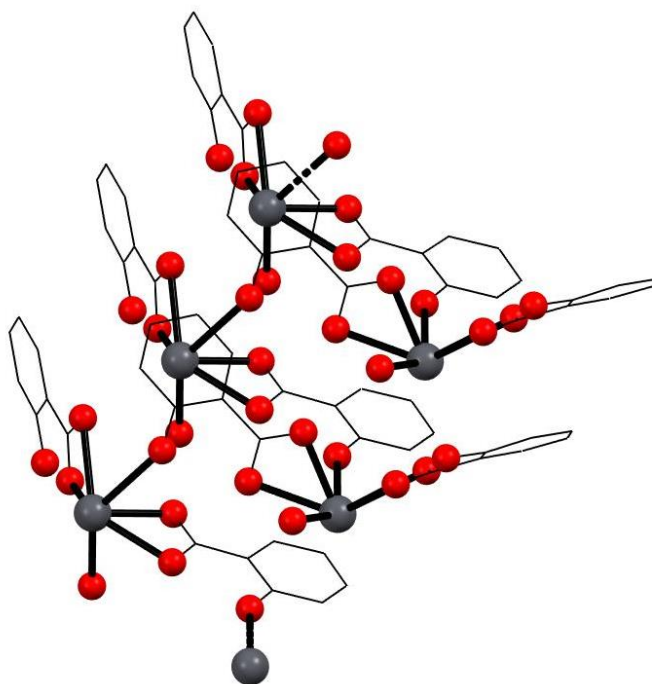
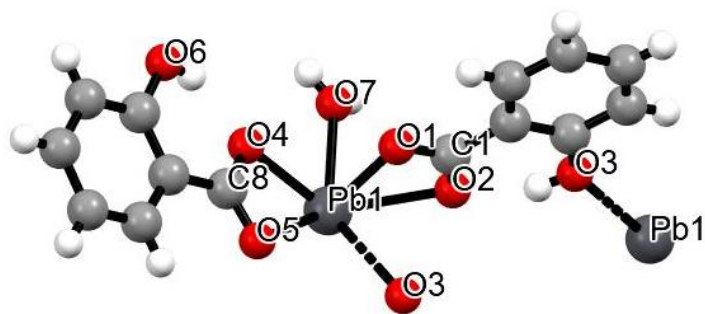
Εικόνα 28: Φάσμα XRF του SaLead

της διαλυμένης ουσίας στον διαλύτη (DMSO). Το MW του **SaLead** βρέθηκε 685.2169 g/mol, ενώ το MW του **SaIk** βρέθηκε 593.0770 g/mol. Και τα δύο MW δεν

αντιστοιχούν στις θεωρητικές τιμές μοριακού βάρους (499 και 177 g/mol, αντίστοιχα). Συνεπώς, συμπεραίνουμε ότι τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με τα αποτελέσματα της φασματοσκοπίας XRF, υποδηλώνοντας τον σχηματισμό πολυμερών μορίων, τα οποία διασπώνται σε μονομερή στο διάλυμα.

XRD

Η κρυσταλλογραφία ακτίνων X μονοκρυστάλλου του **SaLead** απέδωσε την κρυσταλλική δομή του (Εικόνα 28). Πρόκειται για ένα πολυμερές με διαμόρφωση μαιάνδρου και δομή $[\text{Pb}(\text{Sal})_2(\text{H}_2\text{O})]$ (Εικόνα 28). Κάθε μεταλλικό κέντρο είναι εξαενταγμένο. Η ένταξη του Pb πραγματοποιείται μέσω τεσσάρων καρβοξυλικών ατόμων O από τα δύο μόρια SalH και ενός ατόμου O από το νερό. Δύο συνεχόμενα μόρια SaLead γεφυρώνονται μέσω ενός υδροξυλικού μορίου O ($\mu_2\text{-OH}$) του δεύτερου μορίου (Εικόνα 28). Οι δύο δεσμοί Pb-O μεταξύ του μετάλλου και των SalH είναι άνισοι σε μήκος (Pb1-O1= 2.400 Å, Pb1-O2= 2.602 Å and Pb1-O4= 2.424 Å, Pb1-O5= 2.667 Å), γεγονός το οποίο συνιστά ένδειξη ασύμμετρης διδοντικής ένταξης των δύο μορίων SalH.



Εικόνα 29: Διάγραμμα Ortep για το SaLead. Διαμόρφωση μαιάνδρου κατά τον πολυμερισμό του [54]

Στον πίνακα 9 παρατίθενται κάποια επιλεγμένα μήκη δεσμών και γωνίες του συμπλόκου.

Οι αντίστοιχοι δεσμοί που παρατηρούνται στο σύμπλοκο $[\text{Pb}(\text{C}_7\text{H}_5\text{O}_3)_2(\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{N}_2)]_n$ ($\text{C}_7\text{H}_5\text{O}_3 = \text{SalH}$ and $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{N}_2 = 2,9\text{-διμέθυλ-1,10-φενανθρολίνη}$) είναι Pb1-O1 and $\text{Pb-O1}^i = 2.656 \text{ \AA}$ and Pb1-O2 and $\text{Pb1-O2}^i = 2.695 \text{ \AA}$ [56], υποδεικνύοντας συμμετρική διδοντική ένταξη. Αντίθετα, στην περίπτωση του

Πίνακας 9: Παρουσίαση επιλεγμένων μήκων δεσμών και γωνιών στο σύμπλοκο SaLead

Δεσμός	Μήκος (Å)	Γωνίες	[°]
Pb-O1	2.400(5)	O3 ⁱ -Pb1-O5 ⁱⁱ	139.19(17)
Pb-O2	2.602(5)	O3 ⁱ -Pb1-O1	69.95(19)
Pb1-O3ⁱ	2.911(6)	O5 ⁱⁱ -Pb1-O1	145.60(18)
Pb-O4	2.424(5)	O3 ⁱ -Pb1-O2	68.28(19)
Pb-O5	2.666 (9)	O5 ⁱⁱ -Pb1-O2	113.41(19)
Pb1-O5ⁱⁱ	3.056(10)	O1-Pb1-O2	52.04(18)
Pb-O7	2.438(6)	O3 ⁱ -Pb1-O4	114.58(19)
		O5 ⁱⁱ -Pb1-O4	95.79(18)
		O1-Pb1-O4	80.18(19)
		O2-Pb1-O4	129.2(2)
		O3 ⁱ -Pb1-O5	70.41(19)
		O5 ⁱⁱ -Pb1-O5	116.15(19)
		O1-Pb1-O5	88.0(2)
		O2-Pb1-O5	130.0(2)
		O4-Pb1-O5	51.26(18)
		O3 ⁱ -Pb1-O7	140.55(19)
		O5 ⁱⁱ -Pb1-O7	71.28(18)
		O1-Pb1-O7	74.7(2)
		O2-Pb1-O7	76.5(2)
		O4-Pb1-O7	75.02(18)
		O5-Pb1-O7	125.76(18)
		Pb1 ^{iv} -O5-C8	108.7(6)

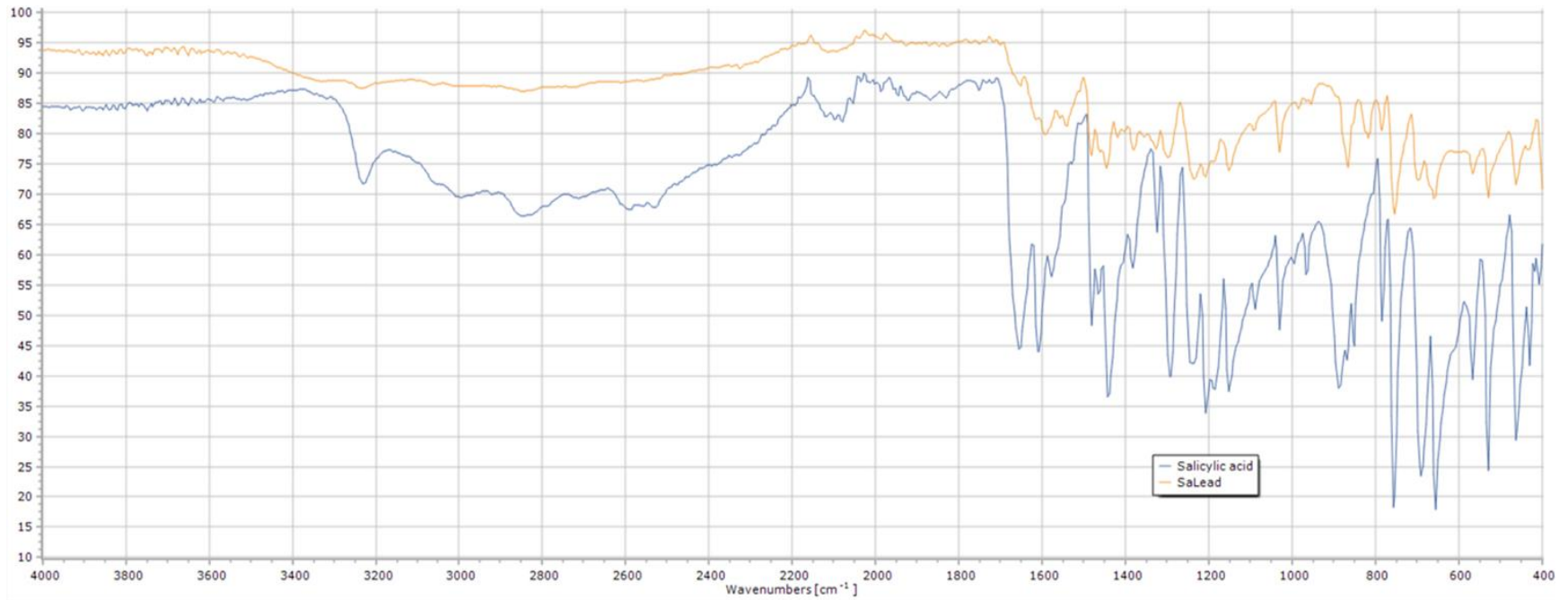
$[\text{Pb}(\text{C}_7\text{H}_4\text{ClO}_3)_2(\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2)]_n$ ($\text{C}_7\text{H}_4\text{ClO}_3 = 5\text{-}\gamma\text{-}\text{χλώροσαλικυλικό}$ and $\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2 = 1,10\text{-}\text{φενανθρολίνη}$) φαίνεται η ένταξη να είναι ασύμμετρη διδοντική ($\text{Pb1-O1} = 2.785 \text{ \AA}$, $\text{Pb1-O2} = 2.458 \text{ \AA}$ and $\text{Pb1-O4} = 2.734 \text{ \AA}$, $\text{Pb1-O5} = 2.703 \text{ \AA}$) [57].

Φασματοσκοπία ATR-FTIR

Το φάσμα υπερύθρου του SaLead παρουσιάζεται στην Εικόνα 31. Η τάση δόνησης του δεσμού O-H στο φάσμα του SaH εντοπίζεται στα 3282 cm^{-1} [58]. Η συγκεκριμένη δόνηση απουσιάζει στο φάσμα του **SaLead** εξαιτίας της εμπλοκής του στον ισχυρό ενδομοριακό δεσμό υδρογόνου $\text{O2}\cdots\text{H31}[\text{O3}]$ με παράλληλη ισχυρή συμμετοχή στον δεσμό μεταξύ O3 και Pb, γεγονός που υποδεικνύει στην δημιουργία του συμπλόκου [58].

Η ασύμμετρη δόνηση τάσης (ν_{as}) της αποπρωτονιωμένης καρβοξυλικής ομάδας $-(\text{COO}^-)$ εντοπίζεται στα 1656 cm^{-1} στο φάσμα του SaH, ενώ η συμμετρική δόνηση τάσης (ν_{s}) της αποπρωτονιωμένης καρβοξυλικής ομάδας $-(\text{COO}^-)$ στα 1324 cm^{-1} [58]. Οι αντίστοιχες δονήσεις τάσης του **SaLead** εμφανίζονται στα 1615 και 1354 cm^{-1} , αντίστοιχα. Η διαφορά των τιμών των δονήσεων τάσης ($\Delta\nu[\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)-\nu_{\text{s}}(\text{COO}^-)]$) στο SaH ισούται με 332 cm^{-1} . Αντίστοιχα, στο **SaLead**, η διαφορά ισούται με 261 cm^{-1} , υποστηρίζοντας τον σχηματισμό του συμπλόκου [58].

Η μονοδοντική ένταξη της καρβοξυλικής ομάδας $-\text{COO}^-$ του SaH σε μεταλλικό ιόν οδηγεί σε σημαντικά υψηλότερες τιμές $\Delta\nu$ σε σχέση με αυτές που παρατηρούνται στα ιοντικά σύμπλοκα του SaH [58]. Αντίστοιχα, όταν το SaH δημιουργεί χηλική ένωση, το



Εικόνα 30: Φάσμα FT-IR των SaH και SaLead [54]

$\Delta\nu$ είναι σημαντικά μικρότερο από αυτό των ιοντικών συμπλόκων του [58]. Τέλος, για την ασύμμετρη διδοντική ένταξη, οι τιμές του $\Delta\nu$ είναι παρόμοιες με της μονοδοντικής ένταξης [58]. Στην περίπτωση που η $-\text{COO}-$ ομάδα δημιουργεί γέφυρα με το μεταλλικό ιόν, οι τιμές $\Delta\nu$ θα είναι μεγαλύτερες από αυτές των χηλικών ενώσεων και σχετικά όμοιες με αυτές στα ιοντικά σύμπλοκα, που είναι δηλαδή κοντά στα 205 cm^{-1} για το SaNa [58].

Βάσει των προαναφερθέντων και δεδομένου ότι η τιμή του $\Delta\nu$ στο **SaLead** είναι 261 cm^{-1} , αναμένεται ασύμμετρη διδοντική ένταξη του SaH στο ιόν Pb , συμπέρασμα που έρχεται σε συμφωνία και με τη κρυσταλλογραφία ακτινών X (βλέπε XRD).

Σταθερότητα μέσω φασματοσκοπιών

Η σταθερότητα των **SaLead** και **SaK** σε διαλύματα (ddH_2O) ελέγχθηκε μέσω των φασματοσκοπιών υπεριώδους-ορατού (UV-Vis) και πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού ($^1\text{H-NMR}$) σε D_2O για μία εβδομάδα. Δεν παρατηρήθηκαν αλλαγές μεταξύ των αρχικών φασμάτων και των φασμάτων που πάρθηκαν μια εβδομάδα μετά, επιβεβαιώνοντας την διατήρηση των δομών και των δύο συμπλόκων σε υδατικό διάλυμα.

Φασματοσκοπία UV-Vis

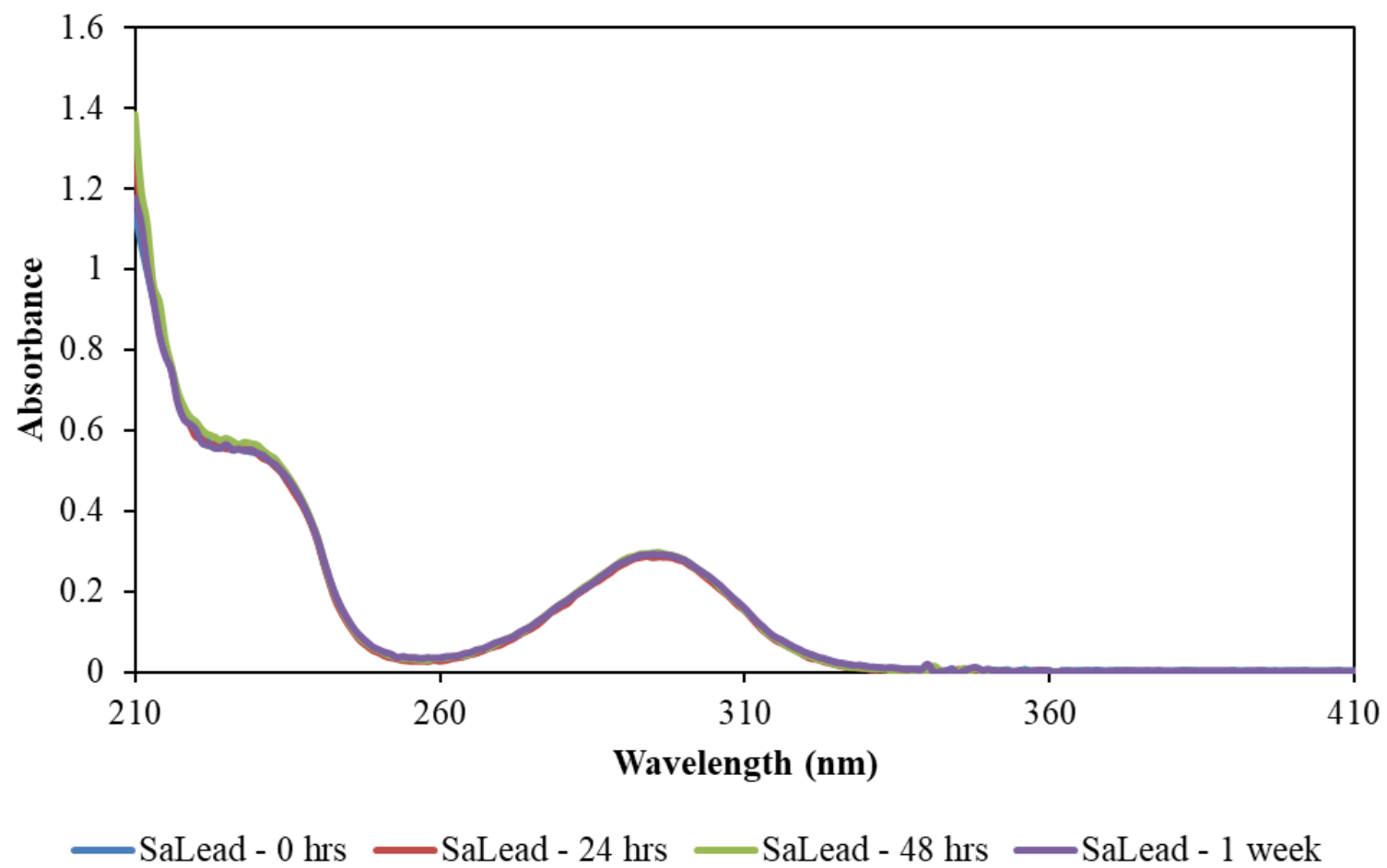
Τα φάσματα υπεριώδους-ορατού των **SaH**, **SaK** και **SaLead** πάρθηκαν σε διάλυμα ddH_2O ίδιας συγκέντρωσης ($5 \times 10^{-5}\text{ M}$) (εικόνες 32 και 33). Στο φάσμα του

SalH κυριαρχούν δύο μέγιστα απορρόφησης στα 235 και 295 nm, τα οποία οφείλονται σε $\pi^* \leftarrow \pi$ διέγερση ηλεκτρονίων [59], με τιμές μοριακού συντελεστή απορρόφησης (ϵ) $6181.42 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ (235 nm) και $3670.18 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ (295 nm) αντίστοιχα.

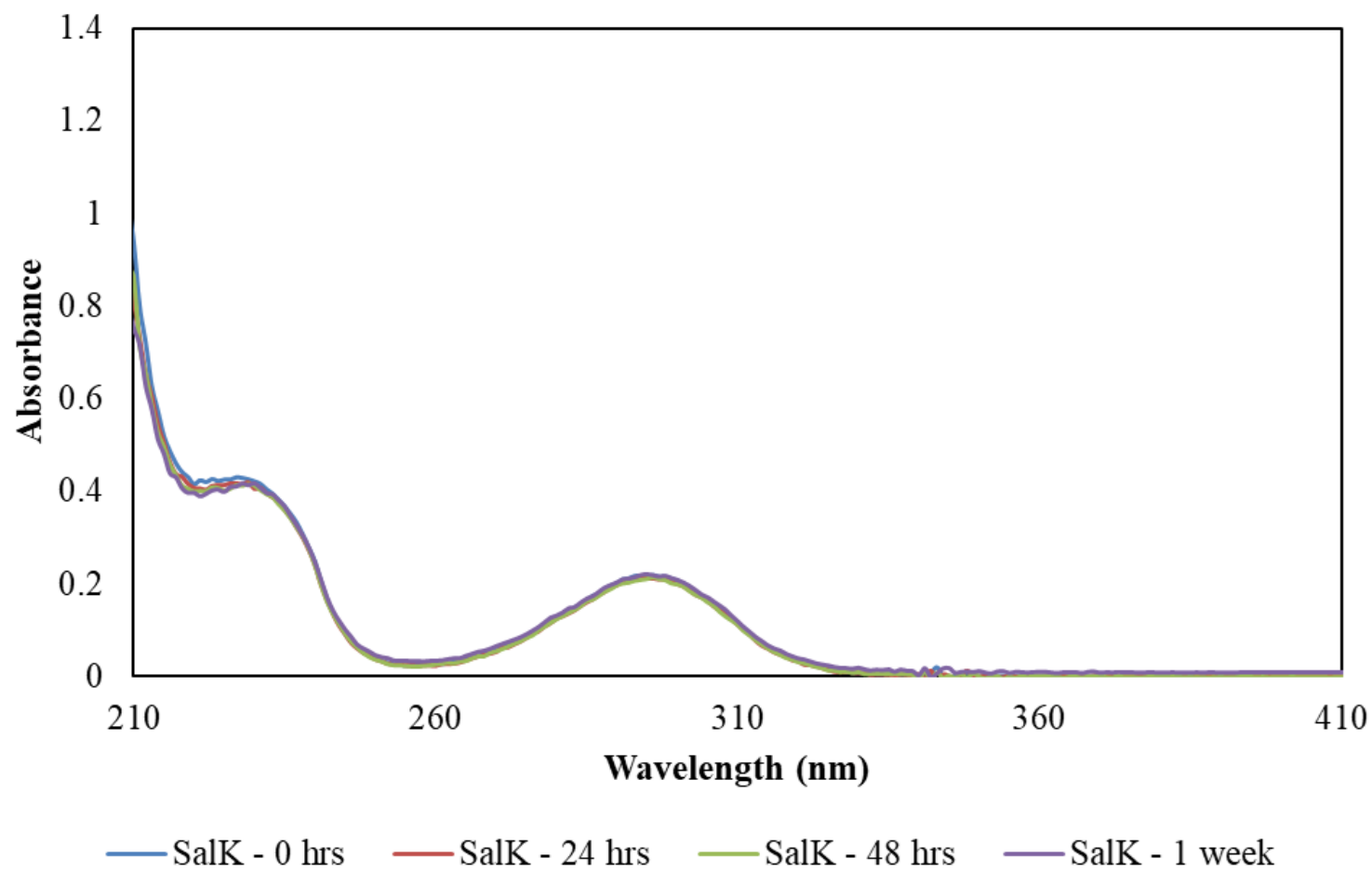
Στα αντίστοιχα φάσματα των **SalK** και **SaLead** εντοπίζονται, επίσης, τα μέγιστα απορρόφησης στα 235 nm και 295 nm, τα οποία οφείλονται σε μεταπτώσεις ηλεκτρονίων εντός του ligand. Οι τιμές του μοριακού συντελεστή απορρόφησης (ϵ) είναι $9428.72 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ (235 nm) και $5777.02 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ (295 nm) για το **SaLead** και $8644.74 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ (235 nm) και $5254.5 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ (295 nm) για το **SalK**. Η παρατηρούμενη αύξηση του ϵ στο **SaLead** και το **SalK** σε σχέση με το SalH (πίνακας 10), επιβεβαιώνει για μια ακόμα φορά τον σχηματισμό των συμπλόκων και την διατήρηση των δομών τους σε υδατικό διάλυμα.

Πίνακας 10: Τιμές μοριακού συντελεστή απορρόφησης (ϵ) $\text{cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ σε δύο μήκη κύματος των SalH, SalK και SaLead

nm	SalH	SalK	SaLead
235	6181.42	8644.74	9428.72
295	3670.18	5254.50	5777.02



Εικόνα 31: Φάσμα UV του SaLead συγκέντρωσης $5 \times 10^{-5} \text{ M}$ σε H_2O σε 0, 24, 48 h και 1 εβδομάδα [54]



Εικόνα 32: Φάσμα UV του SalK συγκέντρωσης 5×10^{-5} M σε H_2O σε 0, 24, 48 h και 1 εβδομάδα [54]

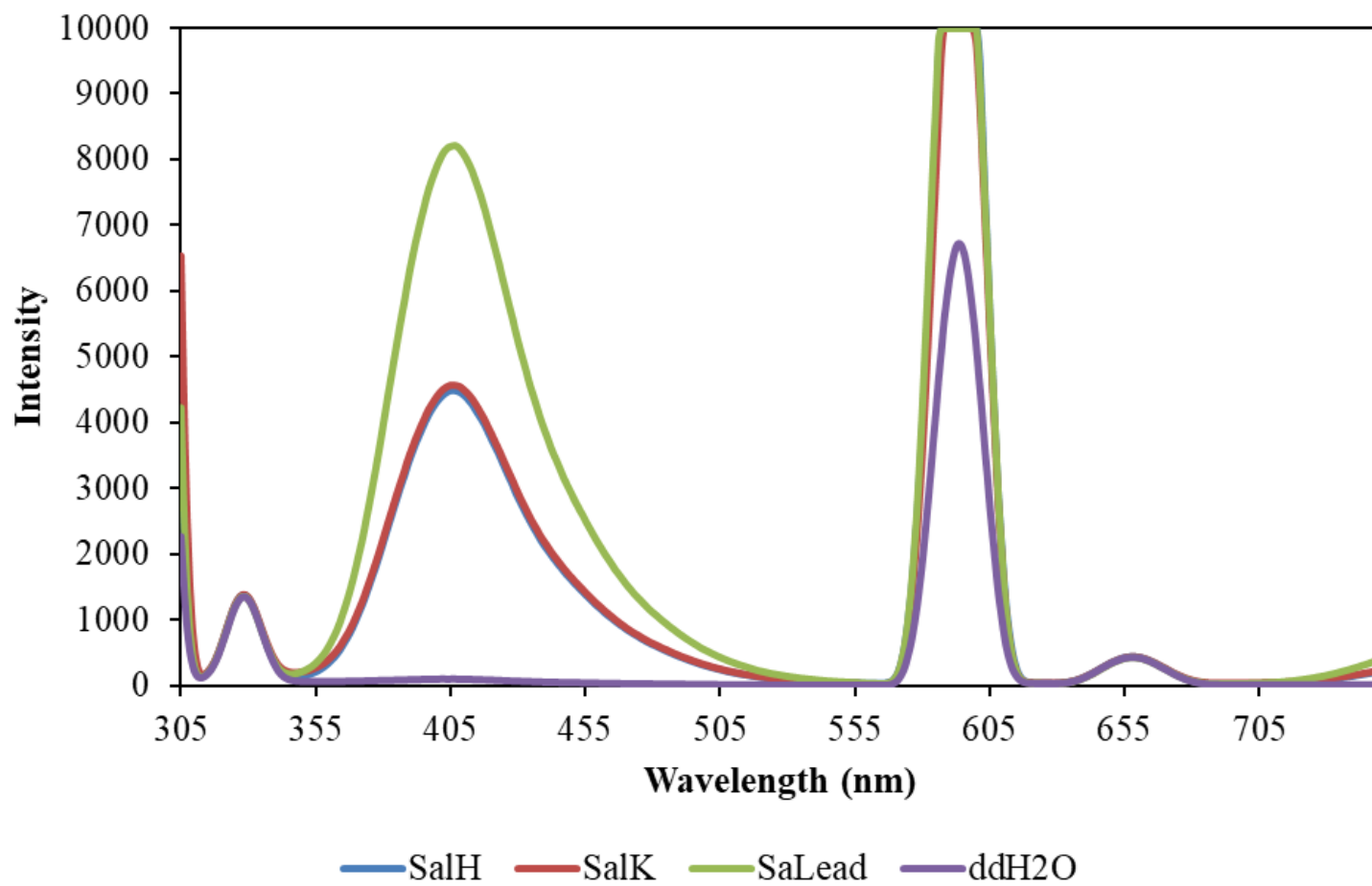
Φασματοσκοπία Φθορισμού

Ο φθορισμός που εκπέμπεται από υδατικά διαλύματα **SaLead**, **SaIK** και **SaIH** ίδιας συγκέντρωσης (10^{-7} M) μετά από την διέγερσή τους στα 295 nm παρουσιάζεται στην εικόνα 34. Και τα τρία υδατικά διαλύματα εκπέμπουν φθορισμό στα 406 nm.

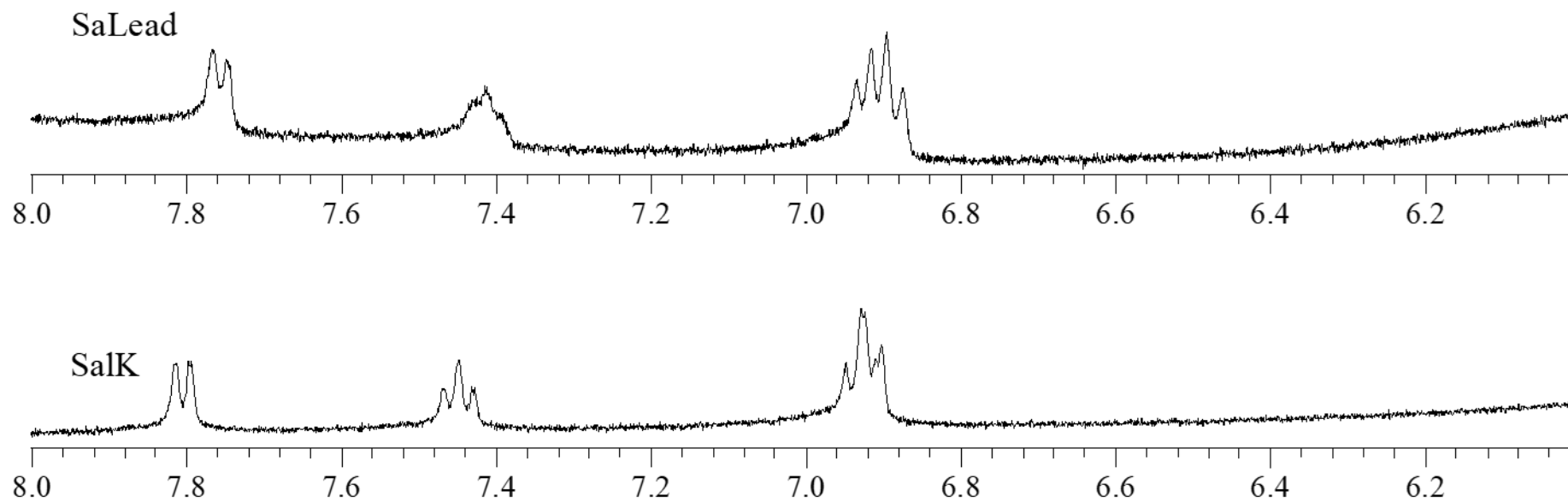
Φασματοσκοπία $^1\text{H-NMR}$

Το φάσμα πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού πρωτονίου ($^1\text{H-NMR}$) του **SaLead** λήφθηκε σε D_2O (εικόνα 35). Στο φάσμα του **SaLead**, το διπλό σήμα στα 7.77-7.74 ppm και το τριπλό σήμα στα 7.43-7.39 ppm, οφείλονται στα πρωτόνια H^d και H^f της φαινυλικής ομάδας του **SaIH**, αντίστοιχα (εικόνες 25 και 35) [60]. Τα πρωτόνια H^e , H^g εμφανίζονται ως τετραπλό σήμα στα 6.93-6.87 ppm στο φάσμα του **SaLead** (εικόνες 25 και 35) [60].

Ομοίως, στο φάσμα του **SaIK**, το διπλό σήμα στα 7.82-7.79 ppm και το τριπλό σήμα στα 7.6-7.43 ppm αντιστοιχούν στα πρωτόνια H^d και H^f της φαινυλικής ομάδας του **SaIH**, αντίστοιχα (εικόνες 25 και 35) [60]. Τα πρωτόνια H^e , H^g εμφανίζονται ως τετραπλό σήμα στα 6.95-6.90 ppm στο φάσμα του **SaIK** (εικόνες 25 και 35) [60].



Εικόνα 33: Φάσματα εκπομπής φθορισμού υδατικών διαλυμάτων 10^{-7} M των SalH, SalK και SaLead μετά από διέγερση στα 295 nm [54]

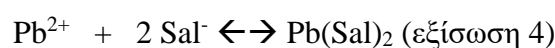


Εικόνα 34: Φάσματα $^1\text{H-NMR}$ του SaLead και SaIK σε D_2O [54]

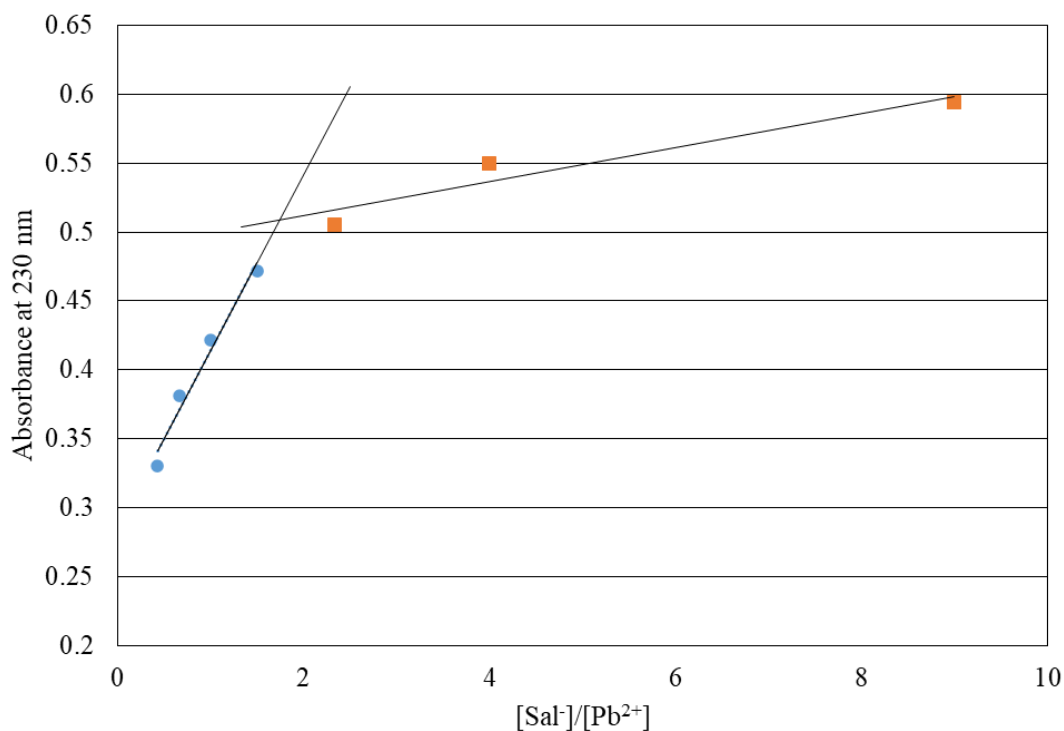
Εύρεση σταθεράς πρόσδεσης

Δεδομένου ότι η συγγένεια δέσμευσης (binding affinity) ενός χηλικού παράγοντα για μεταλλικά ιόντα είναι κρίσιμη για την ανάπτυξη νέων αντιδότην [18], προσδιορίστηκε η σταθερά σχηματισμού του **SaLead**. Η σταθερά σχηματισμού του συμπλόκου προσδιορίστηκε χρησιμοποιώντας φασματοσκοπία UV-Vis. Εννέα δείγματα SalK και Pb(NO₃)₂ παρασκευάστηκαν σε ddH₂O. Η αναλογία των δύο αντιδρώντων (ligand mole fraction), δηλαδή η αναλογία [Sal⁻]/[Pb²⁺], κυμάνθηκε από 0.1 έως 0.9 και καταγράφηκαν τα φάσματα UV τους. Η στοιχειομετρία των [Sal⁻]/[Pb²⁺] προσδιορίστηκε με την μέθοδο του Job's [61]. Η κλίση της καμπύλης μεταβάλλεται όταν τα δύο αντιδρώντα βρίσκονται σε αναλογία 1:2 ([Sal⁻]/[Pb²⁺] = 2), υποστηρίζοντας την δημιουργία του συμπλόκου του Pb με τη συγκεκριμένη αναλογία (εικόνα 36).

Η σταθερά σχηματισμού (K_f) του **SaLead** προσδιορίστηκε από την αντίδραση σχηματισμού:

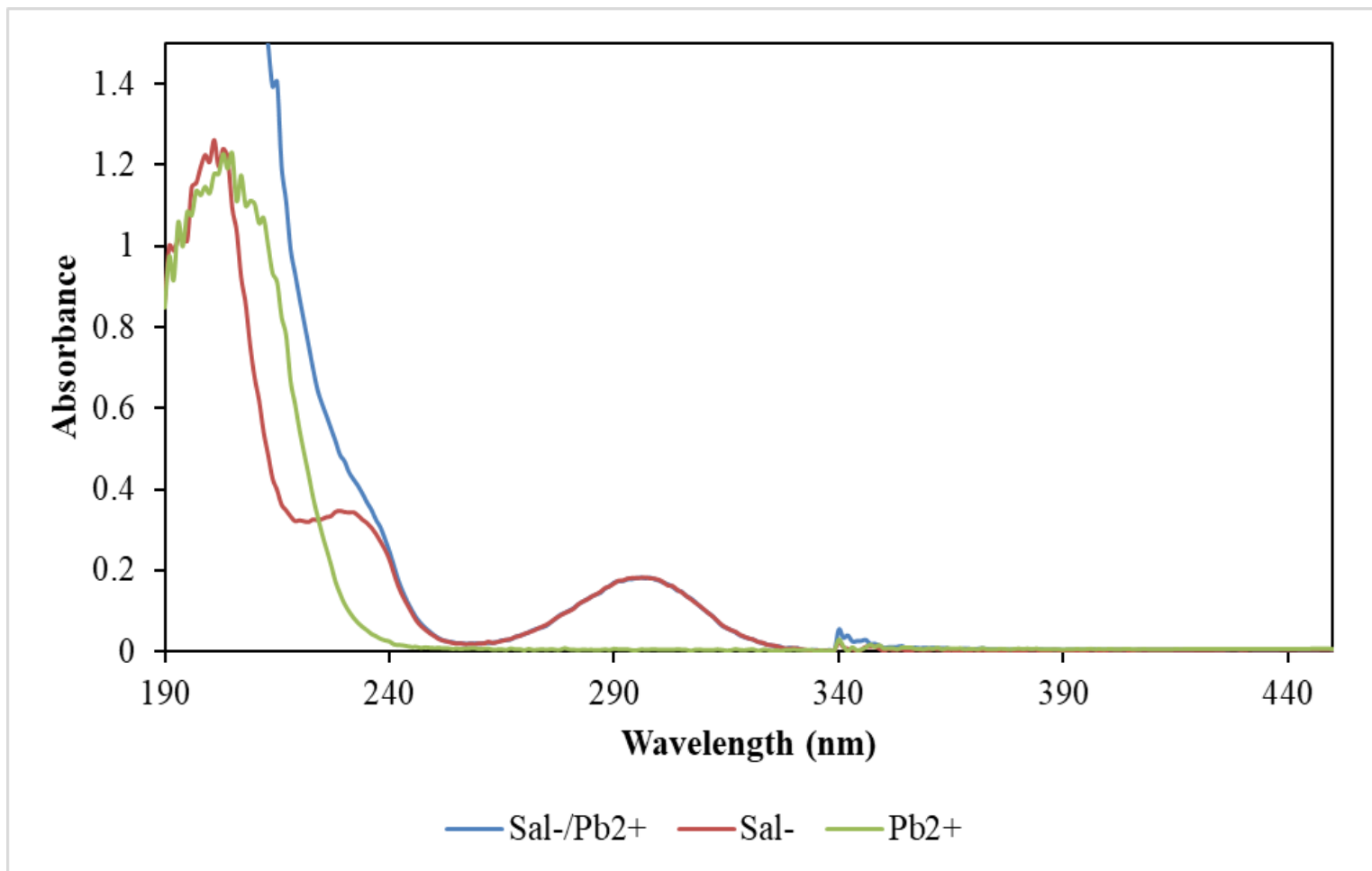


Συνεπώς, η K_f υπολογίζεται από την σχέση $K_f = [\text{SaLead}] / ([\text{Pb}^{2+}] * [\text{Sal}^{-}]^2)$. Βάσει των φασμάτων UV (εικόνα 37), βρέθηκε ότι η τιμή της K_f κυμαίνεται μεταξύ $5.41 \times 10^6 \text{ M}^{-2}$ και $15.02 \times 10^6 \text{ M}^{-2}$, ενώ η pK_f (= -logK_f) κυμαίνεται μεταξύ -6.7 και -7.2. Όσο πιο χαμηλή είναι η τιμή της pK_f, τόσο μεγαλύτερη είναι η συγγένεια δέσμευσης μεταξύ του συμπλόκου και του μετάλλου. Συνεπώς, είναι και μεγαλύτερη η ικανότητα του αντιδότη για αποτοξίνωση του συγκεκριμένου μεταλλικού ιόντος.



Εικόνα 35: Η στοιχειομετρική αναλογία των Sal⁻ / Pb²⁺ στο διάλυμα [54]

Έχει ήδη αναφερθεί βιβλιογραφικά ότι το SalH λειτουργεί σαν χηλικός παράγοντας προς τα μεταλλικά ιόντα Ni²⁺, Cu²⁺, Zn²⁺, Cd²⁺, κ.α. [62]. Πιο συγκεκριμένα, οι τιμές pK του SalH με Zn²⁺ και Cd²⁺ είναι -6.85 και -5.55, αντίστοιχα [62]. Η τιμή pK του CaNa₂EDTA, του αντιδότη που χρησιμοποιείται ευρέως στην αποτοξίνωση των ιόντων μόλυβδου, βρίσκεται μεταξύ των τιμών -10.7 και -11.3 [19], ενώ η αντίστοιχη τιμή για το σύμπλοκο του EDTA με Pb²⁺ είναι μεταξύ -19 και -18.2 [63–66]. Όσον αφορά το τρίτο αντίδοτο που χρησιμοποιείται κατά την δηλητηρίαση από μόλυβδο, το DMSA, η τιμή pK του έναντι του Pb είναι -17.4 [18].



Εικόνα 36: UV φάσμα των Sal⁻/Pb²⁺, Sal⁻ και Pb²⁺ (5×10^{-5} M) σε ddH₂O για τον προσδιορισμό της σταθεράς πρόσδεσης [54]

Βιολογικές μελέτες

Μελέτη της *in vitro* τοξικότητας

IC₅₀ έναντι MRC-5 κυττάρων

Η κυτοτοξική δραστηριότητα του **SaLead** και του **SalK** μελετήθηκε έναντι των κυττάρων MRC-5. Η δραστηριότητα των ουσιών σχετικά με τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων MRC-5 παρουσία τους αξιολογήθηκε μέσω της δοκιμής SRB για 48 ώρες. Η επιλογή της συγκεκριμένης κυτταρικής σειράς πραγματοποιήθηκε δεδομένου ότι είναι πολύ ευαίσθητη στην τοξικότητα εξωγενών χημικών, τα οποία μεταφέρονται μέσω του αέρα [50].

Η τιμή IC_{50} του **SaLead** υπολογίστηκε ίση με $260 \pm 13 \mu\text{M}$ έναντι των MRC-5 κυττάρων, το οποίο αντιστοιχεί σε $5408 \mu\text{g/dL Pb(II)}$, ενώ οι τιμές των **SalK** και **SalH** ήταν >1600 ($>22080 \mu\text{g/dL}$) και $>400 \mu\text{M}$, αντίστοιχα [67]. Συνεπώς, στην περίπτωση μόλυνσης με Pb στην μέγιστη επιτρεπόμενη συγκέντρωσή του στο αίμα, δηλαδή $40 \mu\text{g/dL Pb(II)}$ στους ενήλικες, θα σχηματιστούν $40 \mu\text{g/dL}$ του συμπλόκου **SaLead** μετά την χορήγηση **Sal**. Όμως, ο **Pb(II)** στην μορφή του **SaLead** δεν είναι τοξικός, αφού η τιμή του IC_{50} ($5408 \mu\text{g/dL Pb(II)}$) είναι 135 φορές υψηλότερη από τα σχηματιζόμενα $40 \mu\text{g/dL}$.

Στην περίπτωση του οξειδίου του μόλυβδου (**PbO**) παρατηρήθηκε έντονη τοξικότητα έναντι των MRC-5 κύτταρων που επώαστηκαν με 50 ppm Pb (ή $0.24 \mu\text{M Pb}$) [68]. Επίσης, ο χλωριούχος μόλυβδος (**PbCl₂**) μειώνει το ποσοστό επιβίωσης των καρκινικών ανθρώπινων κυττάρων πνεύμονα (A549) και παρουσιάζει τιμή EC_{50} , δηλαδή μισή μέγιστη αποτελεσματική συγκέντρωση (half maximal effective concentration), ίση

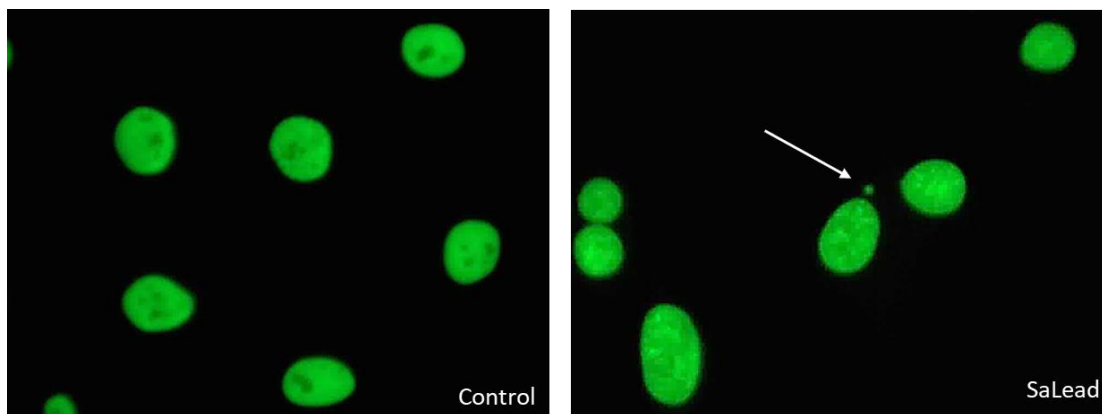
με 3.34 μM [69]. Συνεπώς, τα οξείδια και τα άλατα του μόλυβδου μπορούν να θεωρηθούν πιο τοξικά από ότι το **SaLead**, στο οποίο ο μόλυβδος εντάσσεται στο **SalH**.

Μικροπυρήνες

Η *in vitro* γενετοξικότητα του **SaLead** έναντι των κυττάρων MRC-5 μελετήθηκε μέσω της δοκιμής μικροπυρήνων (MN) (micronucleus assay), μία δοκιμή η οποία χρησιμοποιείται ευρύτατα για την παρακολούθηση της γενετικής βλάβης που μπορεί να προκαλέσει ένας παράγοντας [51]. Τα κύτταρα επώαστηκαν παρουσία της τιμής IC_{50} του **SaLead** (5408 $\mu\text{g}/\text{dL}$ $\text{Pb}(\text{II})$). Η επίδραση του **SalK** ως προς την γενετοξικότητα δεν προσδιορίστηκε, καθώς ο παράγοντας αυτός δεν παρουσίασε τοξικότητα έναντι των κυττάρων MRC-5 μέχρι τα 1600 μM (22080 $\mu\text{g}/\text{dL}$).

Ο σχηματισμός μικροπυρήνων σε ένα κύτταρο μετά από επώασή του με έναν χημικό παράγοντα αποτελεί ένδειξη μεταλλαξογόνου δράσης, γενετοξικής επίδρασης ή τερατογένεσης [70]. Οι μικροπυρήνες δημιουργούνται κατά την μεταβίβαση από την φάση της μετάφασης στη φάση της ανάφασης κατά τη μίτωση και αποτελούν μικρά θραύσματα του DNA στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων της μεσόφασης [51]. Δεδομένου ότι οι μικροπυρήνες δεν ενσωματώνονται στα παραγόμενα νέα κύτταρα μετά την κυτταρική διαίρεση του αρχικού κυττάρου, ο σχηματισμός τους προκαλεί απώλεια της γενετικής πληροφορίας [51].

Η συχνότητα των μικροπυρήνων στα control κύτταρα βρέθηκε ίση με 3.3%, ενώ η συχνότητα στα κύτταρα που επώαστηκαν παρουσία 260 mM **SaLead** ήταν ίση με 2.7%. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι τα κύτταρα που αναπτύχθηκαν παρουσία του **SaLead** δεν παρουσίασαν γενετική βλάβη (εικόνα 38).



Εικόνα 37: Φωτογραφίες των MRC-5 κυττάρων (control και κύτταρα επωασμένα με την IC₅₀ τιμή του SaLead με μικροπυρήνες. Το βέλος υποδεικνύει τον μικροπυρήνα στα κύτταρα επωασμένα με SaLead [54]

Η γενετοξική και καρκινογόνος επίδραση του μόλυβδου στη μορφή του $Pb(C_2H_3O_2)_4$ (οξικός μόλυβδος(IV)) προσδιορίστηκε στην συγκέντρωση των 100 μM , όπου και παρατηρήθηκε μια σημαντική αύξηση της συχνότητας των μικροπυρήνων μέχρι και 23.65 % σε αντίθεση με την συχνότητα που παρατηρήθηκε στο control (1.1 %) έναντι των ανθρώπινων B λεμφοκυττάρων (Human B lymphocyte cells, WIL2-NS) [71]. Συνεπώς, το ιόν του Pb στην μορφή του οξικού μόλυβδου προκαλεί την αύξηση των μικροπυρήνων, ενώ το ιόν του Pb που έχει ενταχθεί στο SaH δεν παρουσιάζει γενετοξικότητα ή μεταλλαξογόνο δράση.

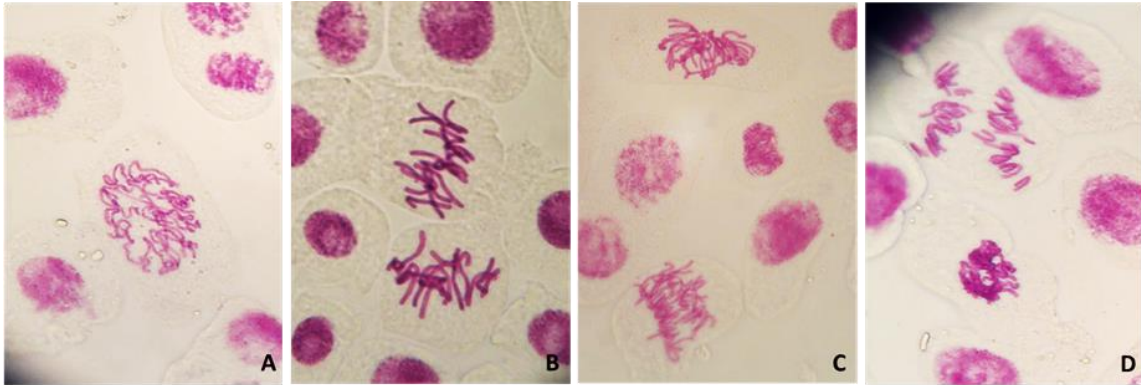
Μελέτη της *in vivo* τοξικότητας

Δοκιμή Allium cepa

Το φυτό *Allium cepa* χρησιμοποιείται ευρύτατα ως βιοδείκτης και έχει καθιερωθεί από το περιβαλλοντικό πρόγραμμα των Ηνωμένων Εθνών (United Nations Environment Program and the Environmental Protection Agency, EPA) [72,73].

Η αξιολόγηση της *in vivo* γενετοξικότητας των **SaLead** και **SaK** πραγματοποιήθηκε μέσω του προσδιορισμού των δεικτών Mitotic Index (MI %), δηλαδή το ποσοστό των κυττάρων που βρίσκονται σε φάση κυτταρικής διαίρεσης προς τα συνολικά κύτταρα που παρατηρούνται, % Mitotic Index Alteration (% MIA(C)) [72] και του προσδιορισμού της βλάβης στο DNA μέσω των χρωμοσωμικών ανωμαλιών (chromosomal aberrations, CA), των ανωμαλιών στη μορφολογία του πυρήνα (nuclear abnormalities, NA) και της εμφάνισης μικροπυρηνίσκων (micronucleus frequency), στα 50, 1100 και 2100 μg/dL **SaK** και 70, 1650 και 3120 μg/dL **SaLead** (εικόνες 39 και 40).

Η συγκέντρωση των 70 μg/dL είναι κοντά στη συγκέντρωση των 80 μg/dL μόλυβδου. Αυτή η συγκέντρωση μόλυβδου στο αίμα προκαλεί την εμφάνιση συμπτωμάτων δηλητηρίασης από μόλυβδο και συνίσταται θεραπεία (chelation therapy) [74]. Η συγκέντρωση των 3120 μg/dL αντιστοιχεί στην 80 φορές υψηλότερη συγκέντρωση από την επιτρεπόμενη συγκέντρωση μόλυβδου στο αίμα [1].



Εικόνα 38: Παρουσίαση των χρωμοσωμικών ανωμαλιών που παρατηρούνται στα κύτταρα της ρίζας του *Allium cepa* στην πρόφαση (A, D), την μετάφαση (B) και την ανάφαση (C, D) [54]

Ο όρος %MIA(C) προτάθηκε με στόχο την σύγκριση των δεικτών του Mitotic Index (MI%) των κυττάρων της ρίζας του *A. cepa* μετά την έκθεσή τους σε διαφορετικές συγκεντρώσεις ενός παράγοντα, έτσι ώστε να λαμβάνεται υπόψιν η επίδραση των δειγμάτων control, τα οποία μπορεί να διαφέρουν [72]. Πιο συγκεκριμένα, ο όρος αυτός υποδεικνύει το ποσοστό των κυττάρων τα οποία βρίσκονται σε φάση κυτταρικής διαίρεσης κατόπιν έκθεσής τους σε μια συγκεκριμένη συγκέντρωση ενός παράγοντα σε σχέση με το αντίστοιχο ποσοστό που παρατηρείται στο δείγμα control [72]. Συνεπώς, ο δείκτης % MIA(C) αναπαριστά την συγκεκριμένη τιμή MI % μιας συγκεκριμένης συγκέντρωσης ως προς αυτής του control [72].

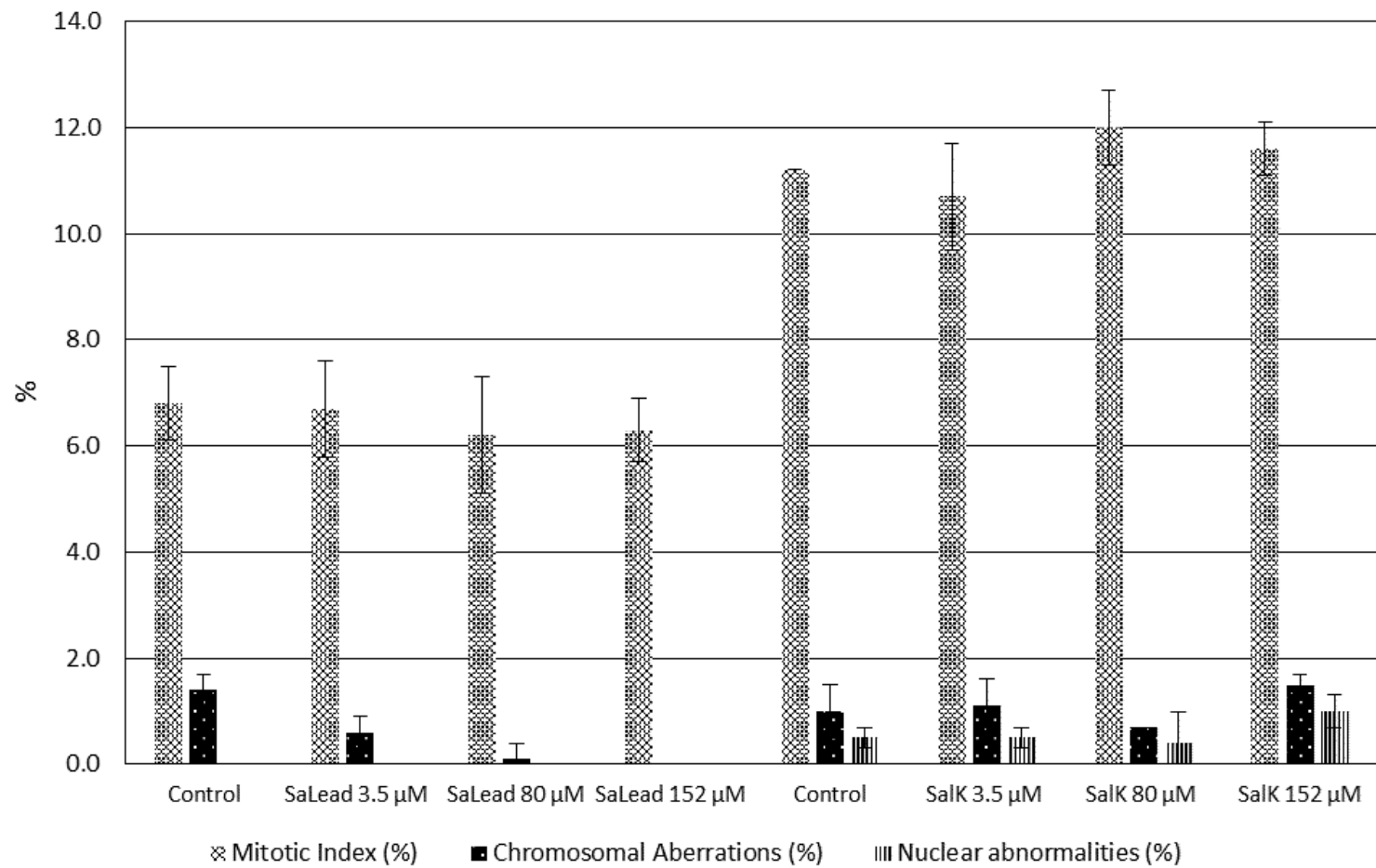
$$\% MIA(C) = \frac{100 \times MI\%(C)_{sample}}{MI\%_{control}} \text{ (εξίσωση 5)}$$

Καθώς μια μείωση της τιμής του % MIA(C) υποδηλώνει τη μείωση του αριθμού των κυττάρων που βρίσκονται σε φάση κυτταρικής διαίρεσης, προτάθηκε ότι αν ένας

παράγοντας εμφανίζει δείκτη $\% \text{MIA(C)} \geq 70\%$, τότε θεωρείται μη τοξικός, σύμφωνα με το ISO 10993-5:2009 [72,75].

Ο δείκτης $\% \text{MIA(C)}$ του **SaLead** στα 3120 $\mu\text{g/dL Pb(II)}$ και του **SaK** στα 2100 $\mu\text{g/dL}$ ήταν 85 και 93%, αντίστοιχα, ποσοστά τα οποία έρχονται σε συμφωνία με την μη παρατήρηση αύξησης των ποσοστών σε χρωμοσωμικές ανωμαλίες και ανωμαλίες στον πυρήνα (εικόνα 40). Αυτά τα ποσοστά μετά από την έκθεση του *A. cera* σε διάφορες συγκεντρώσεις των υπό εξέταση παραγόντων ήταν παρόμοια με αυτά που παρατηρήθηκαν στα control δείγματα. Επίσης, δεν παρατηρήθηκε πουθενά στατιστικά σημαντική παρουσία μικροπυρηνίσκων. Ο δείκτης $\% \text{MIA(C)}$ σε όλες της συγκεντρώσεις των **SaLead** και **SaK** που εξετάστηκαν ήταν $\geq 70\%$, γεγονός που υποδεικνύει ότι δεν παρουσιάζουν *in vivo* τοξικότητα μέχρι και την συγκέντρωση που είναι 80 φορές πάνω από το επιτρεπτό όριο του μόλυβδου στο αίμα ενός ατόμου.

Η *in vivo* τοξικότητα του μόλυβδου (στην μορφή του νιτρικού μόλυβδου, $\text{Pb(NO}_3)_2$) έναντι του *A. cera* είναι ισχυρότερη, καθώς η συγκέντρωση των 2.4 $\mu\text{M Pb(NO}_3)_2$ (ή 50 $\mu\text{g/dL Pb(II)}$) εμφάνισε τιμή $\% \text{MIA}$ ίση με 36% [72] και προκάλεσε πολλαπλά βιοχημικά προβλήματα και προβλήματα που σχετίζονται με τη φυσιολογία του φυτού, όπως η ανάπτυξή του [33]. Όμως, ο συντονισμός του μόλυβδου με το SalH δεν φαίνεται να προκάλεσε κάποιο πρόβλημα σχετικά με την ανάπτυξη του φυτού, καθώς σε 60 φορές μεγαλύτερη συγκέντρωση του Pb στη μορφή του **SaLead** δεν παρατηρήθηκαν τοξικές επιδράσεις, υποδεικνύοντας την πιθανή χρήση του **SaK** στην αντιμετώπιση της δηλητηρίασης από μόλυβδο.



Εικόνα 39: Ο δείκτης Mitotic Index (%) και τα ποσοστά των χρωμοσωμικών ανωμαλιών και ανωμαλιών του πυρήνα που παρατηρούνται στο *Allium cepa* μετά από την επώασή του με το SaLead και το SaIK [54]

Το EDTA, ένα από τα αντίδοτα που χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπιση της δηλητηρίασης από μόλυβδο, φαίνεται να προκαλεί φυτοτοξικά συμπτώματα, όπως την εμφάνιση νεκρωτικού ιστού στα φύλλα του φυτού, όπως αποδείχθηκε στην περίπτωση των φυτών *Brassica rapa* και *Trifolium pratense*, τα οποία εκτέθηκαν στον συγκεκριμένο παράγοντα, έχοντας αρνητική επίδραση στην ανάπτυξή τους [76]. Όταν το φυτό *Medicago sativa L.* εκτέθηκε σε ισομοριακή ποσότητα EDTA για την αντιμετώπιση της παρουσίας μόλυβδου σε αυτό, η δραστηριότητα της αμυλάσης, ενός ενζύμου που χρησιμοποιείται για τη μελέτη των αλληλεπιδράσεων φυτών και μεταλλικών ιόντων, μειώθηκε. Οι συγγραφείς συμπεραίνουν ότι το σύμπλοκο EDTA/Pb είναι λιγότερο τοξικό από τον Pb μόνο του [77]. Επιπλέον, στο φυτό *Phaseolus vulgaris* ο αριθμός των ελεύθερων ιόντων Pb^{2+} ίσως μπορεί να αυξηθεί εξαιτίας της διάσπασης του συμπλόκου EDTA/Pb μέσα στο φυτό, γεγονός που μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένη τοξικότητα [78].

Είναι ήδη γνωστό το θετικό αντίκτυπο του SalH στην τοξικότητα που παρατηρείται στα φυτά εξαιτίας της παρουσία μετάλλων. Η κατεργασία του φυτού *Oryza sativa L.* με SalH αμβλύνει την επίδραση της τοξικότητας του μολύβδου [31]. Στο *Zygophyllum fabago* παρατηρήθηκε η μείωση της συσσώρευσης Pb στις ρίζες του μετά την έκθεσή του σε SalH [33].

Δοκιμή Artemia salina

Η *in vivo* τοξικότητα των **SaLead** και **SaK** αξιολογήθηκε και με την δοκιμή του *Artemia salina* [53]. Η δοκιμή της Αρτέμια είναι ένα αρχικό τεστ τοξικότητας [79], το οποίο βασίζεται στην υψηλή ευαισθησία που παρουσιάζει το συγκεκριμένο ζωοπλαγκτονικό καρκινοειδές [72]. Το ποσοστό επιβίωσης των προνυμφών Αρτέμια

μετρήθηκε από τον αριθμό των νεκρών ατόμων μετά από 24 ώρες έκθεσή τους στις ίδιες συγκεντρώσεις των **SaLead** και **SaIk**, όπως και στη δοκιμή της γενοτοξικότητας. Το ποσοστό επιβίωσης των προνυμφών βρέθηκε ίσο με 100% σε όλες τις συγκεντρώσεις των **SaLead** και **SaIk** που μελετήθηκαν. Συνεπώς, δεν παρατηρείται τοξικότητα των παραπάνω παραγόντων στις συγκεντρώσεις των 3120 $\mu\text{g/dL}$ Pb(II) στην περίπτωση του **SaLead** και των 2100 $\mu\text{g/dL}$ στην περίπτωση του **SaIk**, οι οποίες, όπως προαναφέρθηκε, αντιστοιχούν σε συγκέντρωση μόλυβδου 80 φορές πάνω από το όριο δηλητηρίασης, δηλαδή την συγκέντρωση στην οποία απαιτείται θεραπεία [1].

E. Συμπεράσματα

Η πιθανή, περιστασιακή έκθεση σε μόλυβδο μέσω εισπνοής σκόνης και αερίων επηρεάζει ετησίως ένα μεγάλο αριθμό ατόμων και κυρίως εργατών σε ορυχεία μόλυβδου ή σε εργοστάσια κατασκευής μπαταριών [6]. Συνεπώς, η ανάπτυξη νέων, αποδοτικών και μη τοξικών χημικών παραγόντων ως αντίδοτα για τη θεραπεία της δηλητηρίασης από μόλυβδο είναι αναγκαία. Όπως προαναφέρθηκε, τα βασικά χαρακτηριστικά αυτών των αντιδότην είναι η υψηλή συγγένειά τους ως προς το μεταλλικό ιόν, η χαμηλή τους τοξικότητα, η χαμηλή τοξικότητα των προϊόντων μετά τη σύνδεση του ligand με το μεταλλικό ιόν και η διαλυτότητά του στο νερό [18].

Όπως φαίνεται από τη βιβλιογραφία, το SalH περιορίζει την τοξική επίδραση του Pb στα φυτά μέσω της συμμετοχής του στη ρύθμιση της πρόσληψης του Pb [33]. Επίσης, το SalH μπορεί να συμπλοκοποιηθεί με πολλά μεταλλικά ιόντα, σχηματίζοντας ενώσεις όπως το $\text{Cu}(\text{SalH})_2$ [80,81], το $\text{Cu}(\text{salH})_2(\text{H}_2\text{O})$ [80,81], το $\{[\text{Ph}_3\text{Sb}(\text{SalH})]_2\text{O}\}$ [82], το $[\text{Ag}(\text{SalH})]_2$ [60], το $(n\text{-Bu})_2\text{Sn}(\text{Sal}_2)$ [58], το $\text{Me}_2\text{Sn}(\text{Sal}_2)$ [58], το $(n\text{-Bu})_3\text{SnSal}$ [58] και το Ph_3SnSal [23]. Με βάση τις παραπάνω παρατηρήσεις, ελέγχθηκε η πιθανή εφαρμογή του **SalK** στην αποτοξίνωση του μόλυβδου.

Το **SalK** παρουσίασε υψηλή συγγένεια προς τον Pb ($\text{pK}_f = -7.2$). Επίσης, είναι υδατοδιαλυτό, όπως και το προϊόν του μετά την σύνδεση με τον Pb, δηλαδή το **SaLead**. Επιπλέον, και το **SalK** και το **SaLead** δεν παρουσιάζουν *in vitro* τοξικότητα έναντι των MRC-5 κυττάρων. Το *in vitro* τεστ γενοτοξικότητας μέσω των μικροπυρηνίσκων, ομοίως, υποστηρίζει την μη γενοτοξική ή μεταλλαξογόνο δράση τους. Τα *in vivo* τεστ αποδεικνύουν περαιτέρω την απουσία τοξικότητας των υπό εξέταση παραγόντων, καθώς

παρουσία τους η τιμή %MIA(C) ήταν $\geq 70\%$ σε κάθε εξεταζόμενη συγκέντρωση στο *Allium cepa*, ενώ δεν παρατηρήθηκε θνησιμότητα σε καμία συγκέντρωση κανενός παράγοντα στην *Artemia salina*. Συνεπώς, δεν παρατηρήθηκε ούτε *in vitro* ούτε *in vivo* τοξικότητα στο **Salk** και στο **SaLead**.

Τα παραπάνω αποτελέσματα οδηγούν στο συμπέρασμα πως το **Salk** μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην θεραπεία για τη δηλητηρίαση από μόλυβδο, ειδικά όταν απαιτείται μακροχρόνια θεραπεία. Παρά τη μικρότερη συγγένεια του **Salk** για τον μόλυβδο σε σχέση με το EDTA, ένα αντίδοτο εγκεκριμένο από τον FDA για την θεραπεία της δηλητηρίασης από μόλυβδο σε παιδιά και ενήλικες, αξίζει να σημειωθεί ότι το **Salk** φαίνεται να παρουσιάζει μικρότερη τοξικότητα μέσα από αυτά τα πρωταρχικά πειράματα. Εν κατακλείδι, το **Salk** είναι ένας μη τοξικός, υδατοδιαλυτός παράγοντας που μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην αποτοξίνωση του μόλυβδου, καθώς δημιουργεί ένα μη τοξικό, υδατοδιαλυτό σύμπλοκο, το **SaLead**.

Πιθανά μελλοντικά πειράματα για την περαιτέρω μελέτη των συγκεκριμένων ουσιών θα μπορούσαν να σχετίζονται με την ικανότητά τους να διαπεράσουν την κυτταρική μεμβράνη, αλλά και τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό, την κατανομή τους στο σώμα και την απέκκρισή τους.

ΣΤ. Βιβλιογραφία

- [1] H.-C. Kim, T.-W. Jang, H.-J. Chae, W.-J. Choi, M.-N. Ha, B.-J. Ye, B.-G. Kim, M.-J. Jeon, S.-Y. Kim, Y.-S. Hong, Evaluation and management of lead exposure, *J. Occup. Environ. Med.* 27 (2015) 30. <https://doi.org/10.1186/s40557-015-0085-9>.
- [2] R.C. Gracia, W.R. Snodgrass, Lead toxicity and chelation therapy, *Am J Health Syst Pharm.* 64 (2007) 45–53. <https://doi.org/10.2146/ajhp060175>.
- [3] P.A. Meyer, M.J. Brown, H. Falk, Global approach to reducing lead exposure and poisoning, *Mutat Res Rev Mutat R.* 659 (2008) 166–175. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2008.03.003>.
- [4] R.K. Ahmed, Estimation of some metals in worker of dyes industry, *ANJS.* 12 (2009) 9–13. <https://doi.org/10.22401/JNUS.12.1.02>.
- [5] S. Tong, Y.E. von Schirnding, T. Prapamontol, Environmental lead exposure: a public health problem of global dimensions., *Bull World Health Organ.* 78 (2000) 1068–1077.
- [6] B. Balasubramanian, A. Meyyazhagan, A.J. Chinnappan, K.K. Alagamuthu, S. Shanmugam, N.A. Al-Dhabi, A.K. Mohammed Ghilan, V. Duraipandiyam, M. Valan Arasu, Occupational health hazards on workers exposure to lead (Pb): A genotoxicity analysis, *J. Infect. Public Health.* 13 (2020) 527–531. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2019.10.005>.
- [7] H.A. Godwin, The biological chemistry of lead, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 5 (2001) 223–227. [https://doi.org/10.1016/S1367-5931\(00\)00194-0](https://doi.org/10.1016/S1367-5931(00)00194-0).

- [8] B. Ericson, H. Hu, E. Nash, G. Ferraro, J. Sinitsky, M.P. Taylor, Blood lead levels in low-income and middle-income countries: a systematic review, *Lancet Planet. Health*. 5 (2021) e145–e153. [https://doi.org/10.1016/S2542-5196\(20\)30278-3](https://doi.org/10.1016/S2542-5196(20)30278-3).
- [9] E. Obeng-Gyasi, Sources of lead exposure in various countries, *Environ. Health Rev.* 34 (2019) 25–34. <https://doi.org/10.1515/reveh-2018-0037>.
- [10] A.K. Mackay, M.P. Taylor, N.C. Munksgaard, K.A. Hudson-Edwards, L. Burn-Nunes, Identification of environmental lead sources and pathways in a mining and smelting town: Mount Isa, Australia, *Environ. Pollut.* 180 (2013) 304–311. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.05.007>.
- [11] M.A.S. Laidlaw, S. Zahran, N. Pingitore, J. Clague, G. Devlin, M.P. Taylor, Identification of lead sources in residential environments: Sydney Australia, *Environ. Pollut.* 184 (2014) 238–246. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.09.003>.
- [12] American Academy of Pediatrics Committee on Environmental Health, Lead exposure in children: prevention, detection, and management, *Pediatrics*. 116 (2005) 1036–1046. <https://doi.org/10.1542/peds.2005-1947>.
- [13] CDC - Immediately Dangerous to Life or Health Concentrations (IDLH): Lead compounds (as Pb) - NIOSH Publications and Products, (2018). <https://www.cdc.gov/niosh/idlh/7439921.html> (accessed September 20, 2022).
- [14] T. Sakai, Biomarkers of lead exposure, *Ind. Health*. 38 (2000) 127–142. <https://doi.org/10.2486/indhealth.38.127>.
- [15] S.J.S. Flora, V. Pachauri, Chelation in Metal Intoxication, *Int J Environ Res Public Health*. 7 (2010) 2745–2788. <https://doi.org/10.3390/ijerph7072745>.

- [16] A. Navas-Acien, E. Guallar, E.K. Silbergeld, S.J. Rothenberg, Lead Exposure and Cardiovascular Disease—A Systematic Review, *Environ. Health Perspect.* 115 (2007) 472–482. <https://doi.org/10.1289/ehp.9785>.
- [17] D.A. Gidlow, Lead toxicity, *Occup. Med.* 54 (2004) 76–81. <https://doi.org/10.1093/occmed/kqh019>.
- [18] J. Aaseth, O.P. Ajsuvakova, A.V. Skalny, M.G. Skalnaya, A.A. Tinkov, Chelator combination as therapeutic strategy in mercury and lead poisonings, *Coord. Chem. Rev.* 358 (2018) 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2017.12.011>.
- [19] S.K. Tandon, S. Singh, V.K. Jain, Efficacy of Combined Chelation in Lead Intoxication, *Chem. Res. Toxicol.* 7 (1994) 585–589. <https://doi.org/10.1021/tx00041a001>.
- [20] N.S. Sisombath, F. Jalilehvand, A.C. Schell, Q. Wu, Lead(II) Binding to the Chelating Agent d-Penicillamine in Aqueous Solution, *Inorg. Chem.* 53 (2014) 12459–12468. <https://doi.org/10.1021/ic5018714>.
- [21] C.W. Nogueira, F.A. Soares, P.C. Nascimento, D. Muller, J.B.T. Rocha, 2,3-Dimercaptopropane-1-sulfonic acid and meso-2,3-dimercaptosuccinic acid increase mercury- and cadmium-induced inhibition of δ -aminolevulinic acid dehydratase, *Toxicology.* 184 (2003) 85–95. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(02\)00575-9](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(02)00575-9).
- [22] N. Corominas, Utilizacion de DMSA y DMPS, (2017). <http://www.acmcb.es/files/425-12239-DOCUMENT/Corominas5515Jun17.pdf>.
- [23] A. Habekost, The Inhibition and Reactivation of Enzymatic Processes, *World J. Chem.* 5 (2017) 102–106. <https://doi.org/10.12691/wjce-5-3-4>.

- [24] C.N. Banti, A.D. Giannoulis, N. Kourkoumelis, A.M. Owczarzak, M. Kubicki, S.K. Hadjikakou, Silver(I) compounds of the anti-inflammatory agents salicylic acid and p-hydroxyl-benzoic acid which modulate cell function, *J. Inorg. Biochem.* 142 (2015) 132–144. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2014.10.005>.
- [25] P. Randjelović, S. Veljković, N. Stojilković, D. Sokolović, I. Ilić, D. Laketić, D. Randjelović, N. Randjelović, The Beneficial Biological Properties of Salicylic Acid, *Acta Fac. Med.* 32 (2015) 259–265. <https://doi.org/10.1515/afmnai-2015-0026>.
- [26] Cosmetic Ingredient Review Expert Panel, Safety assessment of Salicylic Acid, Butyloctyl Salicylate, Calcium Salicylate, C12-15 Alkyl Salicylate, Capryloyl Salicylic Acid, Hexyldodecyl Salicylate, Isocetyl Salicylate, Isodecyl Salicylate, Magnesium Salicylate, MEA-Salicylate, Ethylhexyl Salicylate, Potassium Salicylate, Methyl Salicylate, Myristyl Salicylate, Sodium Salicylate, TEA-Salicylate, and Tridecyl Salicylate, *Int J Toxicol.* 22 Suppl 3 (2003) 1–108. <https://doi.org/10.1080/10915810390239487>.
- [27] D. Ekinçi, M. Şentürk, Ö.İ. Küfrevioğlu, Salicylic acid derivatives: synthesis, features and usage as therapeutic tools, *Expert Opin Ther Pat.* 21 (2011) 1831–1841. <https://doi.org/10.1517/13543776.2011.636354>.
- [28] B. Prakash, P. Singh, A. Kedia, N.K. Dubey, Assessment of some essential oils as food preservatives based on antifungal, antiaflatoxin, antioxidant activities and in vivo efficacy in food system, *Int. Food Res. J.* 49 (2012) 201–208. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.08.020>.

- [29] M.A. Shad, Z.I. Zafar, H. Nawaz, F. Anwar, Effect of sorbic acid and some other food preservatives on human serum cholinesterase activity, *Afr. J. Biotechnol.* 11 (2012) 11280–11286. <https://doi.org/10.4314/ajb.v11i51>.
- [30] P.K. Kęszycka, M. Szkop, D. Gajewska, Overall Content of Salicylic Acid and Salicylates in Food Available on the European Market, *J. Agric. Food Chem.* 65 (2017) 11085–11091. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b04313>.
- [31] J. Chen, C. Zhu, L. Li, Z. Sun, X. Pan, Effects of exogenous salicylic acid on growth and H₂O₂-metabolizing enzymes in rice seedlings under lead stress, *J. Environ. Sci.* 19 (2007) 44–49. [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(07\)60007-2](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(07)60007-2).
- [32] R. Zanganeh, R. Jamei, F. Rahmani, Role of salicylic acid and hydrogen sulfide in promoting lead stress tolerance and regulating free amino acid composition in *Zea mays* L., *Acta Physiol Plant.* 41 (2019) 94. <https://doi.org/10.1007/s11738-019-2892-z>.
- [33] A.B. Wani, H. Chadar, A.H. Wani, S. Singh, N. Upadhyay, Salicylic acid to decrease plant stress, *Environ Chem Lett.* 15 (2017) 101–123. <https://doi.org/10.1007/s10311-016-0584-0>.
- [34] M. Aslam, A. Aslam, M. Sheraz, B. Ali, Z. Ulhassan, U. Najeeb, W. Zhou, R.A. Gill, Lead Toxicity in Cereals: Mechanistic Insight Into Toxicity, Mode of Action, and Management, *Front. Plant Sci.* 11 (2021). <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2020.587785> (accessed February 27, 2023).
- [35] A. Sharma, G.P.S. Sidhu, F. Araniti, A.S. Bali, B. Shahzad, D.K. Tripathi, M. Brestic, M. Skalicky, M. Landi, The Role of Salicylic Acid in Plants Exposed to

- Heavy Metals, *Molecules*. 25 (2020) 540.
<https://doi.org/10.3390/molecules25030540>.
- [36] H. Lefevere, L. Bauters, G. Gheysen, Salicylic Acid Biosynthesis in Plants, *Front. Plant Sci.* 11 (2020). <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00338>.
- [37] M.A. Gutiérrez-Coronado, C. Trejo-López, A. Larqué-Saavedra, Effects of salicylic acid on the growth of roots and shoots in soybean, *Plant Physiol. Biochem.* 36 (1998) 563–565. [https://doi.org/10.1016/S0981-9428\(98\)80003-X](https://doi.org/10.1016/S0981-9428(98)80003-X).
- [38] S. Tao, L. Sun, C. Ma, L. Li, G. Li, L. Hao, Reducing basal salicylic acid enhances *Arabidopsis* tolerance to lead or cadmium, *Plant Soil.* 372 (2013) 309–318. <https://doi.org/10.1007/s11104-013-1749-2>.
- [39] S. Nasrazadani, S. Hassani, Chapter 2 - Modern analytical techniques in failure analysis of aerospace, chemical, and oil and gas industries, in: A.S.H. Makhlof, M. Aliofkhaezai (Eds.), *Handbook of Materials Failure Analysis with Case Studies from the Oil and Gas Industry*, Butterworth-Heinemann, 2016: pp. 39–54.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100117-2.00010-8>.
- [40] P.J. Potts, X-RAY FLUORESCENCE AND EMISSION | X-Ray Fluorescence Theory, in: P. Worsfold, A. Townshend, C. Poole (Eds.), *Encyclopedia of Analytical Science (Second Edition)*, Elsevier, Oxford, 2005: pp. 408–418.
<https://doi.org/10.1016/B0-12-369397-7/00673-7>.
- [41] Gonotec User guide for OSMOMAT 3000basic, (2016).
https://www.wolflabs.co.uk/document/Gonotec_Osmometer_osmomat_3000_manual.pdf.

- [42] Bruker Analytical X-ray Systems, Inc., Apex2, Version 2 User Manual, M86–E01078, Madison WI, 2006.
- [43] Siemens Industrial Automation, Inc., SADABS: Area–Detector Absorption Correction, Madison, WI, 1996.
- [44] L. Palatinus, G. Chapuis, SUPERFLIP – a computer program for the solution of crystal structures by charge flipping in arbitrary dimensions, *J Appl Cryst.* 40 (2007) 786–790. <https://doi.org/10.1107/S0021889807029238>.
- [45] Μ. Κουή, Ν. Αβδελίδης, Π. Θεοδωρακέας, Ε. Χειλάκου, Φασματοσκοπία Υπερύθρου Μετασχηματισμού Fourier με Αποσβένουσα Ολική Ανάκλαση, in: Μη καταστρεπτικές και φασματοσκοπικές μέθοδοι εξέτασης των υλικών [Προπτυχιακό εγχειρίδιο], Κάλλιπος, Ανοικτές Ακαδημαϊκές Εκδόσεις, 2015.
<http://repository.kallipos.gr/handle/11419/6175> (accessed February 8, 2023).
- [46] Π. Καρκαλούσος, Ζ. Γεωργίου, Χ. Κρούπης, Α. Παπαϊωάννου, Π. Πλαγεράς, Β. Σπυρόπουλος, Γ.Ε. Τσότσου, Χ. Φούντζουλα, Βασικές αρχές φωτομετρίας και χρωματομετρικών αναλύσεων., in: Εργαστηριακές ασκήσεις κλινικής χημείας [Εργαστηριακός Οδηγός], Κάλλιπος, Ανοικτές Ακαδημαϊκές Εκδόσεις, 2015.
<http://repository.kallipos.gr/handle/11419/5383> (accessed February 8, 2023).
- [47] J. Marshall, S. Johnsen, Fluorescence as a means of colour signal enhancement, *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences.* 372 (2017) 20160335. <https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0335>.
- [48] N. Siraj, B. El-Zahab, S. Hamdan, T.E. Karam, L.H. Haber, M. Li, S.O. Fakayode, S. Das, B. Valle, R.M. Strongin, G. Patonay, H.O. Sintim, G.A. Baker, A. Powe, M. Lowry, J.O. Karolin, C.D. Geddes, I.M. Warner, Fluorescence,

- Phosphorescence, and Chemiluminescence, *Anal. Chem.* 88 (2016) 170–202.
<https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b04109>.
- [49] R.A. de Graaf, *In Vivo NMR Spectroscopy: Principles and Techniques*, 3rd ed., John Wiley & Sons, 2019.
- [50] O.S. Urgut, I.I. Ozturk, C.N. Banti, N. Kourkoumelis, M. Manoli, A.J. Tasiopoulos, S.K. Hadjikakou, New antimony(III) halide complexes with dithiocarbamate ligands derived from thiuram degradation: The effect of the molecule's close contacts on in vitro cytotoxic activity, *Mater. Sci. Eng. C* 58 (2016) 396–408. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.08.030>.
- [51] C.N. Banti, C. Papatriantafyllopoulou, M. Manoli, A.J. Tasiopoulos, S.K. Hadjikakou, Nimesulide Silver Metallodrugs, Containing the Mitochondriotropic, Triaryl Derivatives of Pnictogen; Anticancer Activity against Human Breast Cancer Cells, *Inorg. Chem.* 55 (2016) 8681–8696.
<https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.6b01241>.
- [52] C.N. Banti, S.K. Hadjikakou, Evaluation of Genotoxicity by Micronucleus Assay in vitro and by *Allium cepa* Test in vivo, *Bio-Protoc.* 9 (2019) e3311–e3311.
- [53] C.N. Banti, S.K. Hadjikakou, Evaluation of Toxicity with Brine Shrimp Assay, *Bio-Protoc.* 11 (2021) e3895–e3895.
- [54] C. Tzima, C. Banti, A. Hatzidimitriou, S. Hadjikakou, Possible implementation of salicylic acid in lead detoxification, *J. Inorg. Biochem.* (2023) under revision.
- [55] F.L. Nordström, Å.C. Rasmuson, Solubility and Melting Properties of Salicylic Acid, *J. Chem. Eng. Data.* 51 (2006) 1668–1671. <https://doi.org/10.1021/je060134d>.

- [56] X.-P. Xuan, P.-Z. Zhao, catena-Poly[[[(2,9-dimethyl-1,10-phenanthroline- κ^2 N,N')lead(II)]-di- μ -2-hydroxy-benzoato- κ^3 O1,O1':O2; κ^3 O2:O1,O1'], Acta Cryst E. 63 (2007) m2678–m2678. <https://doi.org/10.1107/S1600536807045941>.
- [57] L. Yang, B. Li, Q. Xue, Y. Huo, G. Wang, catena-Poly[[[(1,10-phenanthroline)lead(II)]bis-(μ -5-chloro-2-hydroxy-benzoato)], Acta Crystallogr Sect E Struct Rep Online. 66 (2010) m987. <https://doi.org/10.1107/S1600536810023561>.
- [58] M.A. Abdellah, S.K. Hadjikakou, N. Hadjiliadis, M. Kubicki, T. Bakas, N. Kourkoumelis, Y.V. Simos, S. Karkabounas, M.M. Barsan, I.S. Butler, Synthesis, Characterization, and Biological Studies of Organotin(IV) Derivatives with o- or p-hydroxybenzoic Acids, Bioinorg. Chem. Appl. 2009 (2009) e542979. <https://doi.org/10.1155/2009/542979>.
- [59] G. Sharma, A.K. Narula, Eu³⁺-doped CaF₂ nanoparticles functionalized by salicylic acid: synthesis, structural, optical and morphological studies, J Mater Sci: Mater Electron. 27 (2016) 4928–4934. <https://doi.org/10.1007/s10854-016-4377-9>.
- [60] M.-E.K. Stathopoulou, C.N. Banti, N. Kourkoumelis, A.G. Hatzidimitriou, A.G. Kalampounias, S.K. Hadjikakou, Silver complex of salicylic acid and its hydrogel-cream in wound healing chemotherapy, J. Inorg. Biochem. 181 (2018) 41–55. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2018.01.004>.
- [61] Z.D. Hill, P. MacCarthy, Novel approach to Job's method: An undergraduate experiment, J. Chem. Educ. 63 (1986) 162. <https://doi.org/10.1021/ed063p162>.
- [62] D.D. Perrin, Stability of Metal Complexes with Salicylic Acid and Related Substances, Nature. 182 (1958) 741–742. <https://doi.org/10.1038/182741a0>.

- [63] M. Jalali, Z.V. Khanlari, Redistribution of Fractions of Zinc, Cadmium, Nickel, Copper, and Lead in Contaminated Calcareous Soils Treated with EDTA, *Arch Environ Contam Toxicol.* 53 (2007) 519–532. <https://doi.org/10.1007/s00244-006-0252-7>.
- [64] B. Sun, F.J. Zhao, E. Lombi, S.P. McGrath, Leaching of heavy metals from contaminated soils using EDTA, *Environ. Pollut.* 113 (2001) 111–120. [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(00\)00176-7](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(00)00176-7).
- [65] M. Pocięcha, D. Kastelec, D. Lestan, Electrochemical EDTA recycling after soil washing of Pb, Zn and Cd contaminated soil, *J. Hazard. Mater.* 192 (2011) 714–721. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2011.05.077>.
- [66] H.V. Aposhian, R.M. Maiorino, D. Gonzalez-Ramirez, M. Zuniga-Charles, Z. Xu, K.M. Hurlbut, P. Junco-Munoz, R.C. Dart, Mary.M. Aposhian, Mobilization of heavy metals by newer, therapeutically useful chelating agents, *Toxicology.* 97 (1995) 23–38. [https://doi.org/10.1016/0300-483X\(95\)02965-B](https://doi.org/10.1016/0300-483X(95)02965-B).
- [67] M. Poyraz, S. Demirayak, C.N. Banti, M.J. Manos, N. Kourkoumelis, S.K. Hadjikakou, Platinum(II)-thiosemicarbazone drugs override the cell resistance due to glutathione; assessment of their activity against human adenocarcinoma cells, *J Coord Chem.* 69 (2016) 3560–3579. <https://doi.org/10.1080/00958972.2016.1241394>.
- [68] N. Pattnaik, A.M. DiLorenzo, Comparison of World Trade Center dust with zinc acetate and lead oxide combinations to determine damage to human lung cells, *J. Toxicol. Environ. Health Sci.* 5 (2013) 60–65. <https://doi.org/10.5897/JTEHS2012.0001>.

- [69] Y. Yuan, Y. Wu, X. Ge, D. Nie, M. Wang, H. Zhou, M. Chen, In vitro toxicity evaluation of heavy metals in urban air particulate matter on human lung epithelial cells, *Sci. Total Environ.* 678 (2019) 301–308.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.04.431>.
- [70] C.N. Banti, A.G. Hatzidimitriou, N. Kourkoumelis, S.K. Hadjikakou, Diclofenac conjugates with biocides through silver(I) ions (CoMeD's); Development of a reliable model for the prediction of anti-proliferation of NSAID's-silver formulations., *J. Inorg. Biochem.* 194 (2019) 7–18.
<https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2019.01.020>.
- [71] C.G. Alimba, V. Dhillon, A.A. Bakare, M. Fenech, Genotoxicity and cytotoxicity of chromium, copper, manganese and lead, and their mixture in WIL2-NS human B lymphoblastoid cells is enhanced by folate depletion, *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen.* 798–799 (2016) 35–47.
<https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2016.02.002>.
- [72] C.S. Tzima, C.N. Banti, S.K. Hadjikakou, Assessment of the biological effect of metal ions and their complexes using *Allium cepa* and *Artemia salina* assays: a possible environmental implementation of biological inorganic chemistry, *J Biol Inorg Chem.* 27 (2022) 611–629. <https://doi.org/10.1007/s00775-022-01963-2>.
- [73] C. N. Banti, M. Kapetana, C. Papachristodoulou, C. P. Raptopoulou, V. Psycharis, P. Zoumpoulakis, T. Mavromoustakos, S. K. Hadjikakou, Hydrogels containing water soluble conjugates of silver(i) ions with amino acids, metabolites or natural products for non infectious contact lenses, *Dalton Trans.* 50 (2021) 13712–13727. <https://doi.org/10.1039/D1DT02158C>.

- [74] ABLES - Reference Blood Lead Levels (BLLs) for Adults in the U. S. | NIOSH | CDC, Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2022).
<https://www.cdc.gov/niosh/topics/ables/ReferenceBloodLevelsforAdults.html>
(accessed November 29, 2022).
- [75] International Organization for Standardization, ISO 10993-5:2009: Biological evaluation of medical devices — Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity, ISO. (2009).
<https://www.iso.org/cms/render/live/en/sites/isoorg/contents/data/standard/03/64/36406.html> (accessed April 5, 2022).
- [76] H. Grčman, Š. Velikonja-Bolta, D. Vodnik, B. Kos, D. Leštan, EDTA enhanced heavy metal phytoextraction: metal accumulation, leaching and toxicity, *Plant Soil*. 235 (2001) 105–114. <https://doi.org/10.1023/A:1011857303823>.
- [77] M.L. López, J.R. Peralta-Videa, H. Castillo-Michel, A. Martinez-Martinez, M. Duarte-Gardea, J.L. Gardea-Torresdey, Lead toxicity in alfalfa plants exposed to phytohormones and ethylenediaminetetraacetic acid monitored by peroxidase, catalase, and amylase activities, *Environ. Toxicol. Chem.* 26 (2007) 2717–2723.
<https://doi.org/10.1897/07-302.1>.
- [78] M. Shahid, E. Pinelli, C. Dumat, Review of Pb availability and toxicity to plants in relation with metal speciation; role of synthetic and natural organic ligands, *J. Hazard. Mater.* 219–220 (2012) 1–12.
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2012.01.060>.
- [79] I. Ketikidis, C.N. Banti, N. Kourkoumelis, C.G. Tsiafoulis, C. Papachristodoulou, A.G. Kalampounias, S.K. Hadjidakou, Conjugation of Penicillin-G with Silver(I) Ions Expands Its Antimicrobial Activity against Gram

- Negative Bacteria, *J. Antibiot.* 9 (2020) 25.
<https://doi.org/10.3390/antibiotics9010025>.
- [80] U.P. Ogado, O.O. Abosedo, Synthesis and characterization of Cu (II) complexes of salicylate ligands, *J. Appl. SCI. Environ. Manag.* 22 (2018) 1961–1964.
<https://doi.org/10.4314/jasem.v22i12.15>.
- [81] C. Auclair, H. Gautero, P. Boivin, Effects of salicylate-copper complex on the metabolic activation in phagocytizing granulocytes, *Biochem. Pharmacol.* 29 (1980) 3105–3109. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(80\)90454-2](https://doi.org/10.1016/0006-2952(80)90454-2).
- [82] N.M. Polychronis, C.N. Banti, C.P. Raptopoulou, V. Psycharis, N. Kourkoumelis, S.K. Hadjikakou, Non steroidal anti-inflammatory drug (NSAIDs) in breast cancer chemotherapy; antimony(V) salicylate a DNA binder, *Inorganica Chim. Acta.* 489 (2019) 39–47. <https://doi.org/10.1016/j.ica.2019.02.004>.

Παράρτημα

Πίνακας εικόνων

Εικόνα 1: Μόλυβδος (τροποποιημένη εικόνα από Carsten Niehaus, Public domain, via Wikimedia Commons).....	19
Εικόνα 2: Ρωμαϊκό υδραυλικό κατασκεύασμα από μόλυβδο (τροποποιημένη εικόνα από G._Dall'Orto derivative work: F. Lamiot, CC BY-SA 2.5 < https://creativecommons.org/licenses/by-sa/2.5 >, via Wikimedia Commons).....	20
Εικόνα 3: Διάγραμμα για το ποσοστό των παιδιών ηλικίας 1-5 ετών με επίπεδο μόλυβδου στο αίμα πάνω από 10 µg/dL βάσει εθνικότητας (τροποποιημένη εικόνα από CDC, Public domain, via Wikimedia Commons)	23
Εικόνα 4: Χάρτης ανίχνευσης μόλυβδου στο αίμα παιδιών ηλικίας 0 – 14 ετών σε 34 χώρες χαμηλού ή μέσου εισοδήματος (τροποποιημένη εικόνα από [8])	25
Εικόνα 5: Ερυθροκύτταρα εκτεθειμένα σε μόλυβδο (τροποποιημένη εικόνα από Herbert L. Fred, MD and Hendrik A. van Dijk, CC BY 2.0 < https://creativecommons.org/licenses/by/2.0 >, via Wikimedia Commons).....	29
Εικόνα 6: Παραγωγή ROS από ιονίζουσα ακτινοβολία (τροποποιημένη εικόνα από Smith, T.A., Kirkpatrick, D.R., Smith, S. et al., CC BY-SA 4.0 < https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0 >, via Wikimedia Commons).....	33

Εικόνα 7: Φυσιολογική δομή ενεργού κέντρου του ενζύμου ALAD και δομή ενεργού κέντρου παρουσία μόλυβδου (τροποποιημένη εικόνα από Honestbean, CC BY 4.0 < https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/ >, via Wikimedia Commons).....	37
Εικόνα 8: Δομή πενικιλλαμίνης (retrieved from PubChem, https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5852).....	47
Εικόνα 9: Δομή πενικιλίνης κατά τη δέσμευση μόλυβδου [20].....	48
Εικόνα 10: Δομή διμερκαπρόλης (retrieved from PubChem, https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3080).....	49
Εικόνα 11: Δομή BAL κατά την δέσμευση μετάλλου (M) (User:Innerstream, Public domain, via Wikimedia Commons).....	49
Εικόνα 12: Δομή DMSA (retrieved from PubChem, https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/9354).....	50
Εικόνα 13: Δομή DMPS (retrieved from PubChem, https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6321).....	51
Εικόνα 14: Δομή DMSA κατά την δέσμευση μόλυβδου (Pb) [22].....	52
Εικόνα 15: Μεταλλικά σύμπλοκα με DMPS σε δύο αναλογίες – DMPS:Me 1:1 (πάνω) και 2:1 (κάτω) [23]	52
Εικόνα 16: Δομή EDTA (retrieved from PubChem, https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6049).....	54

Εικόνα 17: Δομή EDTA κατά την δέσμευση μετάλλου (M) (No machine-readable author provided. Shaddack assumed (based on copyright claims)., Public domain, via Wikimedia Commons).....	54
Εικόνα 18: Δομή CaNa_2EDTA (retrieved from PubChem, https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6093170).....	55
Εικόνα 19: Δομή σαλικυλικού οξέος (retrieved from PubChem, https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/338).....	56
Εικόνα 20: Τοξικότητα μόλυβδου στα δημητριακά – κατανομή Pb και βλάβες που προκαλεί (τροποποιημένη εικόνα από [34]).....	61
Εικόνα 21: Μονοπάτια βιοσύνθεσης σαλικυλικού οξέος στα φυτά (τροποποιημένη εικόνα από [36])	63
Εικόνα 22: Παρουσίαση λειτουργιών σαλικυλικού οξέος έναντι βαρέων μετάλλων στα φυτά (τροποποιημένη εικόνα από [35]).....	69
Εικόνα 23: Απλοποιημένο διάγραμμα ανάλυση XRF (επεξεργασμένη εικόνα από [39])	76
Εικόνα 24: Σχηματική αναπαράσταση φθορισμού (επεξεργασμένη εικόνα από [48])..	82
Εικόνα 25: Δομή σαλικυλικού οξέος (SalH) (ligand) [54]	90
Εικόνα 25: V(μL) KOH και τιμή pH των διαλυμάτων SalH (A) και $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2 + \text{SalH}$ (B) [54]	91
Εικόνα 27: Η πορεία αντίδρασης για τη σύνθεση του SaLead [54].....	92
Εικόνα 28: Φάσμα XRF του SaLead.....	94

Εικόνα 30: Διάγραμμα Ortep για το SaLead. Διαμόρφωση μαιάνδρου κατά τον πολυμερισμό του [54].....	96
Εικόνα 31: Φάσμα FT-IR των SalH και SaLead [54]	99
Εικόνα 32: Φάσμα UV του SaLead συγκέντρωσης $5 \cdot 10^{-5}$ M σε H ₂ O σε 0, 24, 48 h και 1 εβδομάδα [54].....	102
Εικόνα 33: Φάσμα UV του SalK συγκέντρωσης $5 \cdot 10^{-5}$ M σε H ₂ O σε 0, 24, 48 h και 1 εβδομάδα [54].....	103
Εικόνα 34: Φάσματα εκπομπής φθορισμού υδατικών διαλυμάτων 10^{-7} M των SalH, SalK και SaLead μετά από διέγερση στα 295 nm [54]	105
Εικόνα 35: Φάσματα ¹ H-NMR του SaLead και SalK σε D ₂ O [54]	106
Εικόνα 36: Η στοιχειομετρική αναλογία των Sal ⁻ / Pb ²⁺ στο διάλυμα [54].....	108
Εικόνα 37: UV φάσμα των Sal ⁻ /Pb ²⁺ , Sal ⁻ και Pb ²⁺ (5×10^{-5} M) σε ddH ₂ O για τον προσδιορισμό της σταθεράς πρόσδεσης [54].....	109
Εικόνα 38: Φωτογραφίες των MRC-5 κυττάρων (control και κύτταρα επωασμένα με την IC ₅₀ τιμή του SaLead με μικροπυρήνες. Το βέλος υποδεικνύει τον μικροπυρήνα στα κύτταρα επωασμένα με SaLead [54].....	112
Εικόνα 39: Παρουσίαση των χρωμοσωμικών ανωμαλιών που παρατηρούνται στα κύτταρα της ρίζας του Allium cepa στην πρόφαση (A, D), την μετάφαση (B) και την ανάφαση (C, D) [54].....	114

Εικόνα 40: Ο δείκτης Mitotic Index (%) και τα ποσοστά των χρωμοσωμικών
ανωμαλιών και ανωμαλιών του πυρήνα που παρατηρούνται στο *Allium cepa* μετά από
την επώασή του με το SaLead και το SaK [54]..... 116