



ΑΛΕΞΑΝΔΡΕΙΟ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ
ΙΔΡΥΜΑ ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ



ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΛΑΧΙΣΤΗΣ ΑΝΑΣΤΑΛΤΙΚΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ (MIC) ΣΕ ΣΥΜΠΛΟΚΑ ΜΕΤΑΛΛΩΝ

Πτυχιακή Εργασία

Τασούλα Περσεφόνη

Φρούσιου Ολυμπία

Εισηγητής: Καλογιάννης Σταύρος

ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ, ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΣ 2017

Ευχαριστίες

Θα θέλαμε να ευχαριστήσουμε θερμά τον καθηγητή μας και εισηγητή της παρούσας πτυχιακής εργασίας κ. Καλογιάννη Σταύρο για την πολύτιμη καθοδήγησή του.

Ευχαριστούμε τις συμφοιτήτριές μας Μπαχαρίδου Άννα-Μαρία και Κωνσταντοπούλου Αικατερίνη για την άριστη συνεργασία αλλά και βοήθεια που μας προσέφεραν κατά τη διεξαγωγή του πειράματος, έτσι ώστε να ολοκληρωθεί με επιτυχία.

Ευχαριστούμε την κυρία Βίνου Μαργαρίτα για το χρήσιμο υλικό με το οποίο μας εφοδίασε.

Ευχαριστούμε τον κ. Ψωμά Γιώργο για την ευγενή χορηγία του στα σύμπλοκα μετάλλων.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα μελέτη, αξιοποιήθηκε η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (MIC) , δηλαδή η χαμηλότερη συγκέντρωση ενός φαρμάκου που αναστέλλει την ορατή ανάπτυξη ενός μικροοργανισμού μετά από ολονύκτια επώαση, για τον προσδιορισμό της ευαισθησίας συμπλόκων αντιβιοτικών με μέταλλα έναντι μιας ομάδας μικροοργανισμών. Για τον σχηματισμό των συμπλόκων χρησιμοποιήθηκε η κινολόνη Flumequine και η - 2,2,5,5-τετραμεθυλιμιδαζολιδινο-4-θειόνη με Χαλκό (TmitH-Cu) ως συνδέτης (ligand) και ποικιλία μετάλλων. Τα ίδια τα ligands και τα σύμπλοκα τους, αραιώθηκαν και χορηγήθηκαν σε διαφορετικές συγκεντρώσεις δραστηριότητας στα βακτηριακά στελέχη *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* και *Xanthomonas campestris*. Σκοπός της έρευνας ήταν να προσδιορισθεί η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (MIC) του ίδιου του αντιβιοτικού σε κάθε μικροβιακό στέλεχος και να συγκριθεί με την ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση των συμπλόκων μετάλλων του κάθε φορά. Συμπερασματικά διαπιστώθηκε πως η συμπλοκοποίηση του Flumequine με μέταλλα που μελετήθηκαν δεν παρουσίασαν βελτιωμένη αντιμικροβιακή δράση. Ωστόσο, κάποια από τα σύμπλοκα του L (TmimH_Cu) παρουσίασαν αξιοσημείωτη αντιμικροβιακή δράση.

Λέξεις κλειδιά: MIC, κινολόνες, σύμπλοκα μετάλλων, βακτήρια, Flumequine, TmitH-Cu

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	3
1. Εισαγωγή.....	5
1.1. Ελάχιστες Ανασταλτικές Συγκεντρώσεις (MIC)	5
1.1.1 Ορισμός Ελάχιστης Ανασταλτικής Συγκέντρωσης (MIC)	5
1.2. Μέση Μέγιστη Ανασταλτική Συγκέντρωση (IC50).....	6
1.2.1. Ορισμός Μέσης Μέγιστης Ανασταλτικής Συγκέντρωσης.....	7
1.3 Κινολόνες (Quinolones).....	7
1.4. Σύμπλοκα Μετάλλων (Metal Complexes) – Προσδέτες (Ligands).....	11
1.4.1. Σύμπλοκα Μετάλλων (Metal Complexes).....	11
1.4.2. Προσδέτες (Ligands)	11
1.4.3. Αντιμικροβιακή δράση του συμπλόκου μετάλλου – κινολόνης	12
1.5. TmitH-Cu- 2,2,5,5-τετραμεθυλιμιδαζολιδινο-4-θειόνη με Χαλκό.....	13
1.6 . Βακτηριακά Στελέχη	15
1.6.1. Staphylococcus Aureus	16
1.6.2. Escherichia coli	18
1.6.3. Bacillus subtilis	19
1.6.4. Xanthomonas campestris	20
1.7. Σκοπός της πειραματικής διαδικασίας.....	22
2.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	23
2.1 Μικροβιακά Στελέχη	23
2.2 Θρεπτικά μέσα.....	23
2.2.1. Άλλα θρεπτικά μέσα	24
2.3 Ενοφθαλμισμός του στερεού μέσου ανάπτυξης με το μικροοργανισμό	24
2.4. Συντήρηση μικροοργανισμών.....	26
2.5. Δείγματα για αντιμικροβιακή δράση.....	26
2.6. Όργανα	27
2.7. Προσδιορισμός MIC και διαδικασία του πειράματος	28
3.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ- ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	34
3.1. Ελάχιστες ανασταλτικές συγκεντρώσεις (MICs)	34
3.2. Ενδεικτική απεικόνιση διαγραμμάτων συσχέτισης συγκεντρώσεων- απορροφήσεων συμπλόγων του tmimH_Cu και σχολιασμός	36

3.3. Ενδεικτική απεικόνιση διαγράμματος συσχέτισης συγκεντρώσεων- απορροφήσεων συμπλόκων του Flumequine και σχολιασμός.....	39
3.4. Σύμπλοκα του L.....	41
3.5. Flumequine και σύμπλοκά μετάλλων.....	46
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	52
5.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	54

1. Εισαγωγή

1.1. Ελάχιστες Ανασταλτικές Συγκεντρώσεις (MIC)

Η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (MIC) θεωρείται ο “χρυσός κανόνας” για τον προσδιορισμό της ευαισθησίας των μικροοργανισμών σε αντιβιοτικά και ως εκ τούτου χρησιμοποιούνται για να κρίνουν την απόδοση ευαισθησίας όλων των άλλων μεθόδων δοκιμής. Οι MICs, που χρησιμοποιούνται στα διαγνωστικά εργαστήρια, παρουσιάζουν ασυνήθιστη αντοχή και είναι ικανές να δώσουν μια οριστική απάντηση, όταν ένα οριακό αποτέλεσμα επιτυγχάνεται με άλλες δοκιμές ή όταν όταν οι μέθοδοι διάχυσης δίσκου δεν είναι κατάλληλες. Ωστόσο, το εύρος των συγκεντρώσεων των αντιβιοτικών, που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό της MIC, είναι καθολικά αποδεκτό να είναι σε διπλάσια στάδια αραίωσης πάνω και κάτω από 1mg/L, ανάλογα πάντα με τις ανάγκες της πειραματικής διαδικασίας. (JM 2002)

1.1.1 Ορισμός Ελάχιστης Ανασταλτικής Συγκέντρωσης (MIC)

Ένας σημερινός ορισμός της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (MIC), είναι “η χαμηλότερη συγκέντρωση που οδήγησε σε διατήρηση ή μείωση του εμβολίου βιωσιμότητας (Yoshikazu Asahina 2005). Γενικά, ως MIC ορίζεται η χαμηλότερη συγκέντρωση ενός φαρμάκου, που αναστέλλει την ορατή ανάπτυξη του οργανισμού μετά από ολονύκτια επώαση (αυτή η περίοδος παρατείνεται για οργανισμούς, όπως οι αναερόβιοι, οι οποίοι απαιτούν παρατεταμένη επώαση για την ανάπτυξή τους). Ο προσδιορισμός της MIC περιλαμβάνει μια ημι-ποσοτική διαδικασία δοκιμής, η οποία δίνει μια προσέγγιση προς την ελάχιστη συγκέντρωση αντιμικροβιακού, όπως αυτή απαιτείται για την αποτροπή της μικροβιακής ανάπτυξης.

Στο πρόσφατο παρελθόν, στη μέθοδο χρησιμοποιήθηκαν σωλήνες ζωμού ανάπτυξης, οι οποίοι περιέχουν ελεγχόμενο επίπεδο του συντηρητικού, μέσα στο οποίο προστέθηκε ένα εμβόλιο μικροβίων. Το τελικό αποτέλεσμα της δοκιμής ήταν ο προσδιορισμός της ελάχιστης συγκέντρωσης του αντιμικροβιακού, το οποίο έδωσε ένα διαυγές διάλυμα, δηλαδή, καμία οπτική ανάπτυξη (Barrere 1986)

Επί του παρόντος, οι σωλήνες έχουν αντικατασταθεί από μια ημι-αυτοματοποιημένη μέθοδο μικρό-τιτλοδότησης. Η θολότητα του περιεχομένου του κάθε σωλήνα που παρατηρείται, επηρεάζεται από την δοκιμή και οι δέκτες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον προσδιορισμό του τελικού σημείου.

Ωστόσο, το τελικό σημείο όλων των πειραμάτων εξακολουθεί να είναι η παρατήρηση της μη ανάπτυξης μικροοργανισμού σε ένα από τα φρεάτια και ερμηνεύεται ως MIC (Pearson 2000)

Στο πλαίσιο της παρούσας πειραματικής μελέτης, ο προσδιορισμός της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (MIC) θα γίνει με ένωση αντιβιοτικού και συμπλόκου μετάλλου, σχηματίζοντας τα εν λόγω ligands, για συγκεκριμένα βακτηριακά στελέχη.

1.2. Μέση Μέγιστη Ανασταλτική Συγκέντρωση (IC50)

Η μισή μέγιστη ανασταλτική συγκέντρωση (IC50) είναι ένα μέτρο της αποτελεσματικότητας μιας ουσίας στην αναστολή μιας συγκεκριμένης βιολογικής ή βιοχημικής λειτουργίας. Αυτό το ποσοτικό μέτρο υποδεικνύει πόσο ένα συγκεκριμένο

φάρμακο ή άλλη ουσία (αναστολέας) χρειάζεται για να αναστείλει κατά το ήμισυ τη δεδομένη βιολογική διαδικασία (ή συστατικό μιας μεθόδου, δηλαδή ένα ένζυμο, κύτταρο, υποδοχέα κυττάρου ή μικροοργανισμός). Οι τιμές τυπικά εκφράζονται ως γραμμομοριακή συγκέντρωση.

1.2.1. Ορισμός Μέσης Μέγιστης Ανασταλτικής Συγκέντρωσης

Μέση μέγιστη ανασταλτική συγκέντρωση είναι η μισή ελάχιστη (50%) ανασταλτική συγκέντρωση (IC) μιας ουσίας (50% IC, ή IC50). Χρησιμοποιείται συνήθως ως μέτρο δραστηριότητας φαρμάκου ανταγωνιστή στη φαρμακολογική έρευνα. Μερικές φορές, μετατρέπεται επίσης στην κλίμακα p IC50 ($-\log$ IC50), όπου υψηλότερες τιμές υποδεικνύουν εκθετικά μεγαλύτερη ισχύ. Σύμφωνα με το FDA, η IC50 αντιπροσωπεύει τη συγκέντρωση ενός φαρμάκου που απαιτείται για 50% αναστολή *in vitro*. Είναι συγκρίσιμο με EC50 για φάρμακα αγωνιστή.

1.3 Κινολόνες (Quinolones)

Οι κινολόνες είναι συνθετικά αντιβιοτικά ευρέου φάσματος με καλή απορρόφηση μετά από του στόματος χρήση και εξαιρετική βιοδιαθεσιμότητα. Σε ισχυρά όξινες συνθήκες μόρια κινολόνης, τα οποία διαθέτουν μια βασική πλευρά πυρήνα, είναι πρωτονιωμένα και εμφανίζονται ως κατιόντα, στα ιόντα σύμπλοκα. Η αλληλεπίδραση με τα μεταλλικά ιόντα έχει ορισμένες σημαντικές συνέπειες για τη διαλυτότητα, τη φαρμακοκινητική και τη βιοδιαθεσιμότητα των κινολονών και συμμετέχει επίσης στο μηχανισμό δράσης αυτών των βακτηριοκτόνων παραγόντων. (Hooper 2000)

Οι κινολόνες, ως βακτηριοκτόνοι παράγοντες, αναστέλλουν την αντιγραφή και την μεταγραφή του βακτηριακού DNA, προκαλώντας ταχύ κυτταρικό θάνατο. Συγκεκριμένα, αναστέλλουν δυο αντιβακτηριακά ένζυμα-κλειδιά, τη DNA-γυράση (τοποϊσομεράσης II) και την DNAτοποϊσομεράση IV. (Maxwell A. 1992)

Με βάση το αντιβακτηριακό τους φάσμα καθώς και τις φαρμακοκινητικές τους ιδιότητες, οι κινολόνες κατατάσσονται σε τέσσερις γενιές με τα εξής χαρακτηριστικά:

❖ Κινολόνες πρώτης γενιάς:

- Δραστικές έναντι gram αρνητικών βακτηριδίων.
- Υψηλής πρωτεϊνικής σύνδεσης.
- Βραχεία ημιζωή.
- Χαμηλού ορού και συγκεντρώσεων των ιστών.
- Χρήση ενάντια σε απλές λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος. Από του στόματος χορήγηση.

❖ Κινολόνες δεύτερης γενιάς:

Α ΚΛΑΣΗΣ

- Αυξημένη δραστικότητα έναντι των gram αρνητικών βακτηριδίων.

- Πρωτεϊνική δέσμευση κατά ποσοστό 50%.
- Μεγαλύτερο χρόνο ημίσειας ζωής από ότι η πρώτη γενιά.
- Μετρίου ορού και συγκεντρώσεως των ιστών.
- Χρήση ενάντια σε απλές ή περίπλοκες λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος.
- Από του στόματος χορήγηση.

΄Β ΚΛΑΣΗΣ

- Αυξημένη δραστικότητα έναντι των Gram αρνητικών βακτηριδίων.
- Πρωτεϊνική δέσμευση κατά ποσοστό 20% - 50% .
- Μετρίου έως μακρύ χρόνου ημιζωής.
- Υψηλότερες συγκεντρώσεις στον ορό και στους ιστούς σε σχέση με την Α Κλάση.
- Χρήση ενάντια σε περίπλοκες λοιμώξεις του ουροποιητικού, γαστρεντερίτιδα, προστατίτιδα, νοσοκομειακές λοιμώξεις.
- Από του στόματος και ενδοφλέβια χορήγηση.

❖ Κινολόνες τρίτης γενιάς

- Δραστικές έναντι gram αρνητικών και gram θετικών βακτηρίων.
- Παρόμοιες φαρμακοκινητικές ιδιότητες, όπως της δεύτερης γενιάς (B' κλάσης).
- Παρόμοιες ενδείξεις και τρόποι χορήγησης.

❖ Κινολόνες τέταρτης γενιάς.

- Εκτεταμένη δραστηριότητα ενάντια σε gram θετικά και gram αρνητικά βακτήρια.
- Ενεργείς ενάντια στα αναερόβια και άτυπα βακτήρια.
- Στοματική και ενδοφλέβια χορήγηση.
- Λαμβάνονται υπόψη για τη θεραπεία των ενδοκοιλιακών λοιμώξεων (Oliphant 2002) (King 2000), (George G Zhanel 1999)

Για την πειραματική μας διαδικασία χρησιμοποιήθηκε η κινολόνη Flumequine η οποία είναι κινολόνη πρώτης γενιάς. Είναι ένα συνθετικό αντιβιοτικό, που χρησιμοποιείται για την θεραπεία βακτηριακών λοιμώξεων. Είναι πρώτης γενιάς φθοροκινολόνη που έχει απομακρυνθεί από το την κλινική χρήση και δεν είναι πλέον στο εμπόριο. Η φλουμεκίνη χρησιμοποιήθηκε στην κτηνιατρική ως φάρμακο για την θεραπεία κυρίως λοιμώξεων του εντερικού σωλήνα, αλλά μόνο σε περιορισμένο αριθμό χωρών. Είναι δραστική σε Gram αρνητικά, αλλά και Gram θετικά βακτήρια. Χρησιμοποιήθηκε παροδικά για θεραπεία λοιμώξεων του ουροποιητικού συστήματος μέχρις ότου αναφέρθηκε η οφθαλμική τοξικότητα, καθώς και η ηπατική βλάβη και η αναφυλακτική καταπληξία. (<https://en.wikipedia.org/wiki/Flumequine> n.d.)

1.4. Σύμπλοκα Μετάλλων (Metal Complexes) – Προσδέτες (Ligands)

1.4.1. Σύμπλοκα Μετάλλων (Metal Complexes)

Ένα σύμπλοκο μετάλλου αποτελείται από ένα κεντρικό άτομο ή κατιόν, το οποίο συνήθως είναι μεταλλικό και καλείται κέντρο συντονισμού και από μια ευρύτερη ποικιλία μορίων ή ανιόντων, που είναι με τη σειρά τους γνωστά ως ligands. Οι δεσμοί που σχηματίζονται ονομάζονται δεσμοί συναρμογής και προκύπτουν από την προσφορά ζεύγους ηλεκτρονίων από το ligand προς το μέταλλο. Πολλές ενώσεις που περιέχουν μέταλλο, ιδιαίτερα εκείνες των μετάλλων μεταπτώσεως, είναι σύμπλοκα μετάλλων. (Wilkinson 1997)

Πολλά σύμπλοκα μετάλλων με ίση ή αυξημένη αντιμικροβιακή δράση ελήφθησαν σε σύγκριση με τις μητρικές κινολόνες. Νέες στρατηγικές στο σχεδιασμό των μεταλλικών συμπλόκων των κινολονών έχουν οδηγήσει σε ενώσεις με αντικαρκινική δράση. Αναλυτικά εφαρμογές των ligands με μεταλλικά ιόντα προσανατολίζονται σε δύο κύριες κατευθύνσεις:

- Προσδιορισμός των κινολονών με βάση τα ligands με μεταλλικά ιόντα ή, αντίστροφα ,
- Προσδιορισμός των μεταλλικών ιόντων, που βασίζονται στα ligands με κινολόνες . (Uivarosi 2013)

1.4.2. Προσδέτες (Ligands)

Ένας προσδέτης ή ligand είναι ένα ιόν ή μόριο, που συνδέεται με ένα κεντρικό άτομο μετάλλου για να σχηματίσει ένα σύμπλοκο (εναλλακτικά γνωστή και ως μια οντότητα συντονισμού). Τα ligands είναι άτομα ή μόρια με ζεύγη ηλεκτρονίων

διαθέσιμα, που μπορεί να είναι ουδέτερα ή αρνητικά φορτισμένα. Συνήθως, τα ligands θεωρούνται δότες ηλεκτρονίων, που έλκονται από το μέταλλο (ο αποδέκτης ηλεκτρονίων) στο κέντρο του συγκροτήματος. Ένα ligand παρέχει τα ηλεκτρόνια για τον δεσμό που σχηματίζει μεταξύ του ίδιου και του κεντρικού ατόμου μετάλλου ή ιόντος (Chemicool.com 2014). Τα ligands των κινολονών με τα σύμπλοκα μετάλλων που έλαβαν μέρος στον προσδιορισμό των MIC , απεικονίζονται αναλυτικά σε πίνακες των αποτελεσμάτων.

1.4.3. Αντιμικροβιακή δράση του συμπλόκου μετάλλου – κινολόνης

Από βιολογικής απόψεως, η αλληλεπίδραση των κινολονών με μέταλλα φανερώνει μια πιθανή συνεργική επίδραση του μετάλλου ως προς την αντιμικροβιακή τους δράση. Η αξιολόγηση αυτής της αντιμικροβιακής δράσης των συμπλόκων βασίζεται στα αποτελέσματα των ελάχιστων ανασταλτικών συγκεντρώσεων (MICs) ενάντια των gram θετικών ή των gram αρνητικών μικροοργανισμών.

Κύριοι παράγοντες για την διερεύνηση της αντιμικροβιακής δράσης των συμπλόκων μετάλλων είναι οι εξής έξι:

- η φύση του μετάλλου
- η φύση των ligands
- το χηλικό φαινόμενο
- η φύση του πυρήνα του μετάλλου (μονοπυρηνικό ή διπυρηνικό)
- το συνολικό φορτίο ενός συμπλόκου και,
- η φύση του αντισταθμιστικού ιόντος στην περίπτωση των ιονικών συμπλόκων

1.5. TmitH-Cu- 2,2,5,5-τετραμεθυλιμιδαζολιδινο-4-θειόνη με Χαλκό

Τα ετεροκυκλικά θειόνια αποτελούν μια μεγάλη οικογένεια ευπροσάρμοστων συνδετών (ligands) που συνδυάζουν μαλακές και σκληρές θέσεις συντονισμού, ώστε να μπορούν να συνδέουν επιλεκτικά διάφορα μεταλλικά κέντρα. Ως μαλακοί προσδέτες δ-δότη, έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως κατά τη διάρκεια των τελευταίων τριών δεκαετιών στη σύνθεση συμπλοκών μεταλλικών ιόντων κλειστού κελύφους δ, κυρίως χαλκού (I) και αργύρου (I). Το ενδιαφέρον για τέτοιου είδους συμπλέγματα επικεντρώνεται πρόσφατα σε ορισμένα από τα ειδικά χαρακτηριστικά τους, όπως βιολογικές και φωτοφυσικές ιδιότητες, με στόχο την αναζήτηση αντίστοιχων πιθανών εφαρμογών.

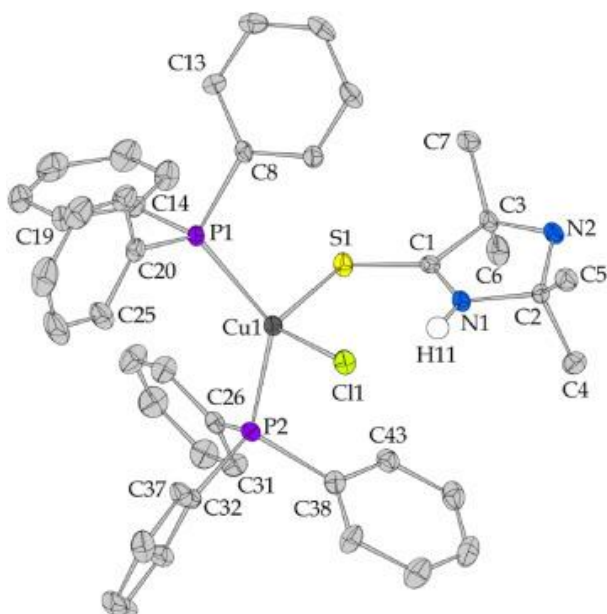
Ο χαλκός είναι ένα απαραίτητο ιχνοστοιχείο που συμμετέχει σε μια σειρά κυτταρικών διεργασιών όπως η ανοσολογική λειτουργία, η αναπνοή και η αγγειογένεση. Λόγω της έντονης οξειδοαναγωγικής του ικανότητας, βρίσκεται στην ενεργό θέση διαφόρων ενζύμων και πρωτεϊνών, αλλά και σε μερικές μεταλλοθειονίνες χαμηλού μοριακού βάρους πλούσιες σε χαλκό, όπου το μέταλλο δεσμεύεται σε κυστεΐνη σε σταθερές συστάδες Cu (I) -θειολικού άλατος. Η κατανόηση της χημείας πίσω από τη λειτουργία φυσιολογικής θειονεΐνης απαιτεί ακριβείς σχετικές δομικές πληροφορίες που θα μπορούσαν να ληφθούν από τη διερεύνηση της συμπεριφοράς συντονισμού του χαλκού σε σχετικά σύνθετα μοντέλα χαμηλής πυρηνικότητας.

Από την άποψη αυτή, οι ετεροκυκλικοί υποκαταστάτες θειόνης θεωρούνται ως ένα χρήσιμο σημείο εκκίνησης για τη μοντελοποίηση της σύνδεσης κυστεΐνης και η

χημεία συντονισμού τους ήταν στο επίκεντρο ενδιαφέροντος τις τελευταίες δεκαετίες.

Οι τρέχουσες τάσεις έρευνας στη βιοχημεία των συμπλόκων χαλκού περιλαμβάνουν την πιθανή χρήση τους ως αντιμικροβιακός, αντιφλεγμονώδης και κατά του όγκου παράγοντας. Κατά τη διάρκεια αυτής της έρευνας, έγινε πρόσφατη αναφορά στα σύμπλοκα αλογονούχου χαλκού και αργύρου (I) *N*-μεθυλοβενζοθειαζολ-2-θειόνης, τα οποία έδειξαν σημαντική αντιβακτηριακή δράση έναντι πολλών Gram-θετικών και Gram-αρνητικών μικροοργανισμών.

Έχουν παρασκευαστεί ουδέτερο μονοπυρηνικά σύμπλοκα χαλκού(I) και αλογόνου που περιέχουν 2,2,5,5-tetramethylimidazolidine-4-θειόνη (tmimdtH) και τριφαινυλοφωσφάνιο (PPh_3) ή έχουν τρι-*o*-tolylphosphane (TOTP) και δομικά χαρακτηρίζονται από X-Ray μονοκρυσταλλική ανάλυση. Τα σύμπλοκα που περιέχουν PPh_3 υιοθετούν τη συνηθισμένη παραμορφωμένη τετραεδρική γεωμετρία, ενώ η παρουσία του ογκώδους στρογγυλεού τροφοδοτεί το σχηματισμό τριγωνικών τριεδρικών ειδών. Η αλληλεπίδραση των ενώσεων με DNA μοσχαριού-θύμου παρακολουθήθηκε απευθείας μέσω φασματοσκοπίας UV-vis, μετρήσεων ιζώδους DNA και έμμεσα μέσω του ανταγωνισμού με βρωμιούχο αιθίδιο. Η παρεμβολή αποκαλύφθηκε ως ο πιο πιθανός τρόπος δέσμησης.



Σχήμα 1.5.1: $[\text{CuCl}(\text{PPh}_3)_2(\text{tmimdtH})]$

Σε ένα πρώτο στάδιο, το αλογονίδιο του χαλκού αφήνεται να αντιδράσει σε OH_3CN με δύο ισοδύναμα PPh_3 , προκειμένου να σχηματιστεί ένα ενδιάμεσο σύμπλοκο, το οποίο στη συνέχεια κατεργάστηκε με ένα μεθανολικό διάλυμα ενός ισοδυνάμου της θειόνης για να δώσει το τελικό προϊόν. Τα σύμπλοκα απομονώθηκαν ως ωχροκίτρινα, διαμαγνητικά και σταθερά σε αέρα κρυσταλλικά στερεά. (Δ. Αναστασιάδου n.d.)

1.6 . Βακτηριακά Στελέχη

Τα βακτηριακά στελέχη, που αποτέλεσαν αντικείμενο έρευνας στο εν λόγω πείραμα, είναι τα εξής:

- Ο *Staphylococcus aureus* της οικογένειας *Staphylococcaceae*.
- Η *Escherichia coli* της οικογένειας *Enterobacteriaceae*.
- Ο *Bacillus subtilis* της οικογένειας *Bacillaceae*.
- Η *Xanthomonas campestris* της οικογένειας *Xanthomonadaceae*.

1.6.1. Staphylococcus Aureus

Οι σταφυλόκοκκοι είναι μικροοργανισμοί και συγκεκριμένα βακτήρια. Κατατάσσονται στα δυνητικά αερόβια καταλάση – θετικά γένη των gram – θετικών κόκκων. Τα βασικά χαρακτηριστικά τους είναι:

- Σχήμα κόκκου.
- Κυτταρικό τοίχωμα κυανό όταν βάφεται με χρώση gram.
- Αναπτύσσεται παρουσία και απουσία οξυγόνου.
- Δίνουν θετική την αντίδραση καταλάσης.

Το όνομα του γένους σταφυλόκοκκου προέρχεται από τον ελληνικό όρο “σταφυλή” που σημαίνει “τσαμπί από σταφύλι” και οφείλεται στο γεγονός ότι οι gram – θετικοί αυτοί κόκκοι αναπτύσσονται με τέτοιο τρόπο που μοιάζουν με τσαμπί από σταφύλι. Εμφανίζονται όμως και ως μεμονωμένα κύτταρα, ζεύγη ή και μικρές αλυσίδες. Οι περισσότεροι σταφυλόκοκκοι έχουν διάμετρο 0,5 – 1,5 μm, είναι ακίνητοι και μπορούν να αναπτυχθούν σε θρεπτικά υλικά με υψηλή συγκέντρωση αλάτων και σε θερμοκρασίες 18 – 40 °C.

Εικόνα 1. Στέλεχος *Staphylococcus Aureus*



Οι σταφυλόκοκκοι απαντώνται στο δέρμα και στους ανθρώπινους βλεννογόνους. Μερικοί από αυτούς απαντώνται σε συγκεκριμένες θέσεις στον ανθρώπινο οργανισμό. Είναι σημαντικά παθογόνα για τον άνθρωπο και προκαλούν ένα ευρύ φάσμα απειλητικών για τη ζωή λοιμώξεων στο δέρμα, στα μαλακά μέρη, στα οστά, στην ουροποιητική οδό καθώς και ευκαιριακές λοιμώξεις. Οι σταφυλόκοκκοι, εκτός του *Staphylococcus aureus*, δεν παράγουν το ένζυμο πηκτάση και χαρακτηρίζονται ως πηκτάση – αρνητικοί.

Οι περισσότερες μολύνσεις από σταφυλόκοκκο είναι ακίνδυνες και θεραπεύονται με αντιβιοτικά, ενώ πολλές φορές οι μολύνσεις αυτές είναι τόσο ήπιες που

μπορούν να θεραπευτούν και χωρίς τη χρήση αντιβιοτικών. Η ανάπτυξή τους ευνοείται από την παρουσία NaCl (7%). Αναπτύσσονται γρήγορα σε μη εκλεκτικά θρεπτικά υλικά που επωάζουν αεροβίως ή αναεροβίως. Εμφανίζουν μεγάλες, λείες αποικίες μέσα σε 24 ώρες. (Kluytmans J 1997)

1.6.2. *Escherichia coli*

Η *E.Coli* είναι ένα gram – αρνητικό, ραβδοειδούς σχήματος κολοβακτήριο (*Enterobacteriaceae*). Συνήθως βρίσκεται στο έντερο ενδόθερμων ζώων. Τα στελέχη του, αποτελούν μέρος της φυσικής χλωρίδας του εντέρου, όντας αβλαβή και μπορούν να ωφελήσουν τους ξενιστές τους παράγοντας βιταμίνη K2 και εμποδίζοντας την εγκατάσταση άλλων παθογόνων βακτηρίων μέσα στο έντερο.

Εικόνα 2. Στέλεχος *Escherichia Coli*



Απαντώνται συχνά στα κόπρανα των ζώων και των ανθρώπων. Επίσης, όταν βρεθεί σε διπλανά όργανα όπως στην ουροδόχο κύστη μπορεί να προκαλέσει ουρολοίμωξη. Το βακτήριο δεν αντέχει σε υψηλές θερμοκρασίες και πεθαίνει όταν ζεσταίνεται στους 70 °C για αρκετό χρονικό διάστημα, ενώ μπορεί να επιβιώσει στο ψυγείο για αρκετές ημέρες υπό κάποιες συνθήκες.

1.6.3. *Bacillus subtilis*

Ο *B.subtilis*, είναι ένα gram – θετικό, καταλάση – θετικό βακτήριο. Μορφολογικά είναι ραβδόμορφο και έχει την ικανότητα να σχηματίζει ένα σκληρό, προστατευτικό ενδοσπόριο, επιτρέποντας στον οργανισμό να ανέχεται ακραίες περιβαλλοντικές συνθήκες. Ο *B.subtilis* ιστορικά έχει χαρακτηριστεί ως υποχρεωτικά αερόβιος μικροοργανισμός, αν και πρόσφατη έρευνα απέδειξε ότι αυτό δεν είναι απόλυτα σωστό.

Εικόνα 3. Στέλεχος *Bacillus Subtilis*



Ο *B.subtilis* είναι μόνο γνωστό, ότι προκαλεί νόσο σε σοβαρά ανοσοανεπαρκής ασθενείς, ενώ μπορεί αντιθέτως να χρησιμοποιηθεί ως προβιοτικό σε υγιή άτομα και σπάνια προκαλεί τροφική δηλητηρίαση. Ορισμένα στελέχη του *B.subtilis* παράγουν το πρωτεολυτικό ένζυμο σουμπτιλίσίνη. Τα σπόρια του μπορούν να επιβιώσουν την υπερβολική ζέστη στην οποία εκτίθενται κατά το μαγείρεμα.

Αν και αυτό το είδος βρίσκεται συνήθως στο έδαφος, περισσότερα στοιχεία δείχνουν ότι ο *B. Subtilis* είναι ένα κανονικό συμβιωτικό εντέρου στον άνθρωπο. Ο αριθμός των σπορίων που βρίσκονται στο ανθρώπινο έντερο είναι πολύ υψηλός, για να αποδοθεί αποκλειστικά στην κατανάλωση μέσω μόλυνσης των τροφίμων. Το έδαφος απλώς χρησιμεύει ως μια δεξαμενή γεγονός που υποδηλώνει ότι ο *B. Subtilis* κατοικεί το έντερο και θα πρέπει να θεωρείται ως κανονικό συμβιωτικό του εντέρου.

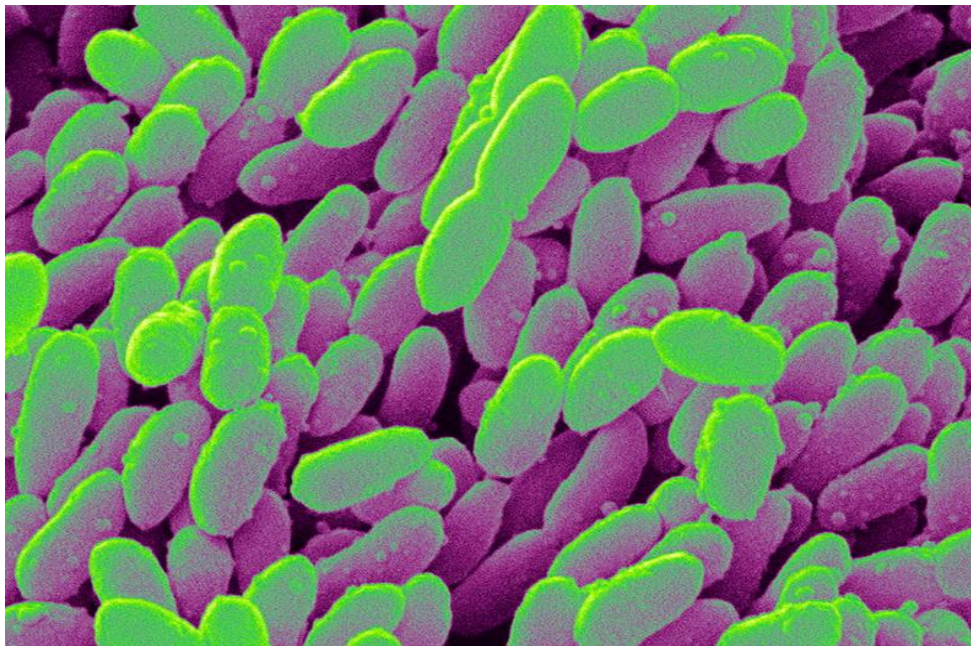
1.6.4. *Xanthomonas campestris*

Η *X. Campestris* είναι ένα gram – αρνητικό, ραβδόμορφο βακτήριο, που προκαλεί μια ποικιλία ασθενειών σε φυτά και εμφανισιακά προκαλεί κηλίδες στο μολυσμένο φυτό. Είναι διαθέσιμα από την NCPPB και άλλες διεθνείς συλλογές καλλιέργειας όπως ICMP, ATOO και LMG σε μια καθαρή μορφή και χρησιμοποιείται στην εμπορική παραγωγή ενός εξωκυτταρικού πολυσακχαρίτη υψηλού μοριακού βάρους που ονομάζεται κόμμι ξανθάνης. (Federico Katzen 1998)

Πιο συγκεκριμένα, η κόμμι ξανθάνης είναι ένας πολυσακχαρίτης, που εκκρίνεται από το βακτήριο *Xanthomonas campestris* και χρησιμοποιείται ως πρόσθετο τροφίμων, τροποποιητής ρεολογίας, ως πυκνωτικό μέσο τροφίμων (σε σάλτσες για

σαλάτες, για παράδειγμα) αλλά και ως σταθεροποιητής (σε καλλυντικά προϊόντα, για παράδειγμα, για την πρόσληψη διαχωρισμού δύο συστατικών). Αποτελείται από επαναλαμβανόμενες μονάδες πεντασακχαρίτη, που περιλαμβάνει γλυκόζη, μαννόζη και γλυκουρονικό οξύ. Αποτεείται από τη ζύμωση της γλυκόζης, σακχαρόζης ή λακτόζης. Μετά από μια περίοδο ζύμωσης, ο πολυσακχαρίτης καταβυθίζεται από ένα μέσο ανάπτυξης με ισοπροπυλική αλκοόλη, ξηραίνεται και αλέθεται με μια λεπτή σκόνη. (Barrere 1986)

Εικόνα 4. Στέλεχος *Xanthomonas campestris*



1.7. Σκοπός της πειραματικής διαδικασίας

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι να προσδιορισθεί η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (MIC) του αντιβιοτικού με σύμπλοκα μετάλλου σε σύγκριση με την ελάχιστη συγκέντρωση αντιβιοτικού και μόνο, η οποία απαιτείται για την πλήρη αναστολή της ανάπτυξης του βακτηριακού στελέχους, που θα εξετάζεται κάθε φορά. Η επιλογή της εν λόγω MIC, θα γίνει ύστερα από ολονύκτια επώαση.

Για την επίτευξη του σκοπού αυτού, απαραίτητος κρίνεται ο προσδιορισμός του τρόπου μεταβολής των τιμών MIC του Flumequine και της 2,2,5,5-τετραμεθυλιμιδαζολιδινο-4-θειόνης με χαλκό (TmimtH-Cu), τα οποία έχουν αντιμικροβιακή δράση, εφόσον αυτοί σχηματίσουν σύμπλοκες ενώσεις με μέταλλα.

Οι MIC θα προσδιοριστούν στους παρακάτω μικροοργανισμούς:

- *S. aureus* (θετικό κατά gram)
- *E. coli* (αρνητικό κατά gram)
- *B. subtilis* (θετικό κατά gram)
- *X.campestris* (αρνητικό κατά gram)

Ως ligand για τον σχηματισμό συμπλόκων ενώσεων χρησιμοποιήθηκε η κινολόνη Flumequine και το 2,2,5,5-τετραμεθυλιμιδαζολιδινο-4-θειόνη με χαλκό.

2.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Μικροβιακά Στελέχη

Προσδιορίστηκαν οι MIC στα εξής μικροβιακά στελέχη:

- *Xanthomonas Campestris*, ATCC 1395
- *Escherichi coli*, NCTC 12900
- *Bacillus subtilis*, ATCC 6633
- *Staphylococcus aureus*, ATCC 6538

2.2 Θρεπτικά μέσα

Για την παρασκευή του θρεπτικού μέσου, μετά τη ζύγιση όλων των ποσοτήτων προστέθηκε νερό σύμφωνα με τις οδηγίες και το μίγμα θερμάνθηκε μέχρι βρασμού με συνεχή ανάδευση. Αμέσως μετά την έναρξη του βρασμού το διάλυμα απομακρύνθηκε από τη θέρμανση, ψύχθηκε και κατανεμήθηκε στους τελικούς περιέκτες για αποστείρωση. Οι συστάσεις των θρεπτικών μέσων αναγράφονται παρακάτω. Για τη παρασκευή των υγρών θρεπτικών μέσων δεν προστέθηκε η συνιστώμενη ποσότητα Άγαρ.

Πίνακας 2.2.1: Σύσταση ανά 100 ml του θρεπτικού μέσου Nutrient-Broth Agar για *Staphylococcus Aureus* και *Bacillus Subtilis*.

Peptone	0.5g
Meat Extract	0.3g
Agar	2g

Πίνακας 2.2.2: Σύσταση ανά 100 ml του θρεπτικού μέσου Luria-Broth Agar για *Escherichia Coli*.

Tryptone	1g
Yeast Extract	0.5g
NaCl	1g
Agar	2g

Πίνακας 2.2.3: Σύσταση ανά 100 ml του θρεπτικού μέσου Yeast and Mold Broth-Agar για *Xanthomonas Camperstis*.

Yeast Extract	0.3g
Malt Extract	0.3g
Peptone	0.5g
Dextrose	1g
Agar	2g

2.2.1. Άλλα θρεπτικά μέσα

Σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστικού οίκου, για τη παρασκευή του Mueller Hinton αρκεί να διαλυθούν 21 g σκόνης σε 1 λίτρο απεσταγμένου νερού με ανάδευση όπως αναγράφεται παραπάνω για τα υπόλοιπα θρεπτικά μέσα.

2.3 Ενοφθαλμισμός του στερεού μέσου ανάπτυξης με το μικροοργανισμό

Όλη η διαδικασία του ενοφθαλμισμού πραγματοποιείται πάντα εντός του biosafety cabinet σε στείρες συνθήκες και για αποφυγή άλλων επιμολύνσεων. Επίσης τα

σωληνάκια που χρησιμοποιούνται καθώς και τα στερεά θρεπτικά μέσα έχουν αποστειρωθεί πρώτα.

Αρχικά αποστειρώνεται ο κρίκος με πυράκτωση στη φλόγα και στη συνέχεια αφού κρυώσει παίρνουμε μία-δύο κρικοίς από την ήδη υπάρχουσα καλλιέργεια μας. Ακολουθεί η σπορά με εγκάρσιες γραμμές στο κεκλιμένο άγαρ με προσοχή την αποφυγή άλλων επιμολύνσεων. Πάντα δουλεύουμε κοντά στην αναμμένη φλόγα. Οι δοκιμαστικοί σωλήνες τοποθετούνται στο κλίβανο επώασης για την ανάπτυξη των αποικιών στην επιφάνεια.

Εναλλακτικά αν η ήδη υπάρχουσα καλλιέργεια είναι αδύναμη παίρνουμε μία-δύο κρικοίς από αυτή, εμβαπτίζουμε σε υγρή καλλιέργεια και αφήνουμε 24 ώρες στο κλίβανο επώασης στην αντίστοιχη θερμοκρασία ανάπτυξης του μικροοργανισμού. Στη συνέχεια αφού έχουμε αποστειρώσει τον κρίκο τον εμβαπτίζουμε στην υγρή καλλιέργεια και ακολουθεί η σπορά με εγκάρσιες γραμμές στο κεκλιμένο άγαρ. Η υπόλοιπη διαδικασία ακολουθείται όπως αναγράφεται παραπάνω.

Πίνακας 2.3.1: Θερμοκρασίες επώασης μικροοργανισμών (24h)

<i>Xanthomonas campestris</i>	27 ⁰ C
<i>Staphylococcus aureus</i>	37 ⁰ C
<i>Bacillus subtilis</i>	37 ⁰ C
<i>Escherichia coli</i>	37 ⁰ C

2.4. Συντήρηση μικροοργανισμών

Όλοι οι μικροοργανισμοί καλλιεργήθηκαν και συντηρήθηκαν σε κεκλιμένες στερεές καλλιέργειες του θρεπτικού μέσου ανάπτυξης του κάθε μικροοργανισμού. Το θρεπτικό μέσο ανάπτυξης καθορίζεται στο παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 2.4.1 : Θρεπτικό μέσο ανάπτυξης ανά μικροοργανισμό

Nutrient-Broth Agar	<i>Bacillus subtilis - Staphylococcus Aureus</i>
YM-Agar	<i>Xanthomonas Campestris</i>
Luria-Broth Agar	<i>Escherichia coli</i>

2.5. Δείγματα για αντιμικροβιακή δράση

Η κινολόνη και τα θειόνια με τα σύμπλοκά τους ήταν ευγενική χορηγία του κ. Γεώργιου Ψωμά, τμήματος Χημείας του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης.

Πίνακας 2.5.1: Κωδικοί συμπλόκων και οι τύποι τους

ΚΩΔΙΚΟΣ	ΤΥΠΟΣ
Flumequine	Hflmq
EB01	[Mn(flmq) ₂ (MeOH) ₂]
EB03	[Mn(flmq) ₂ (phen)]
EB07	[Mn(flmq) ₂ (bipyam)]
L	TmimtH-Cu
12B	[CuCl(PPh ₃) ₂ (tmimtH)]
13A	[CuBr(PPh ₃) ₂ (tmimtH)]
14B	[CuI(PPh ₃) ₂ (tmimtH)]
30.1B	[CuCl(topt)(tmimtH)]
28.1	[CuBr(topt)(tmimtH)]
16.1	[CuCl(μ-dppe)(tmimtH)] ₂
23.1	[CuI(tmimtH)(μ-dppe) ₂ Cu ₂ I ₂ (dppe)]
15.1	
17.1	

Για τη διάλυση των παραπάνω στερεών δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε ως διαλύτης DMSO (Dimethyl sulfoxide).

2.6. Όργανα

Τα όργανα που χρησιμοποιήθηκαν καθ'όλη τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας είναι:

- Φασματοφωτόμετρο στα 600nm
- Κλίβανος αποστείρωσης
- Biosafety cabinet (BSC)

- Επωαστικός κλίβανος
- Συσκευή υπερήχων

2.7. Προσδιορισμός MIC και διαδικασία του πειράματος

Η διαδικασία που ακολουθήσαμε για το προσδιορισμό MIC ήταν όμοια για τα ligand, τα σύμπλοκα και τους μικροοργανισμούς. Αναλυτικότερα ακολουθεί παρακάτω η διαδικασία του πειράματος.

1^η ΗΜΕΡΑ:

Διαλυση - Αραίωση Flumequine

Ξεκινάμε την προετοιμασία για τις επόμενες ημέρες. Αρχικά κάνουμε την αραίωση των συμπλόκων. Τις προηγούμενες ημέρες έχουμε διαλύσει σε δοκιμαστικό σωλήνα με 10 ml DMSO το αρχικό μας ligand η το σύμπλοκο. Αυτό το κάνουμε 2-3 ημέρες πριν την αραίωση ώστε να διαλυθεί όσο το δυνατόν καλύτερα γίνεται πριν αναδευτεί στο vortex. Για την αραίωση χρησιμοποιούμε την πιπέτα του 1 ml. Τα ακροφύσια δεν

χρειάζεται να είναι αποστειρωμένα απλά προσέχουμε πολύ να τα αλλάζουμε σε κάθε erpendorf γιατί πηγαίνουμε από το πυκνό διάλυμα στο πιο αραιό.

Η διαδικασία είναι η εξής : Έχουμε ήδη παρασκευάσει διάλυμα 0.5 mg/ml απο την αρχική διάλυση του στερεού συμπλόκου ή του ligand που έχουν συγκέντρωση 5 mg με την προσθήκη 10 ml DMSO. Στη συνέχεια τοποθετείται μία σειρά απο 9 σωληνάκια erpendorf. Σε κάθε σωληνάκι σημειώνουμε τους αριθμούς απο το 3 μέχρι το 11 και το κωδικό της ουσίας που θα αραιώσουμε. Στο σωληνάκι erpendorf με τον αριθμό 3 προσθέτουμε 1200 μ L από το αρχικό σωλήνα με συγκέντρωση 0,5 mg/ml και 300 μ L DMSO και αναδεύεται με τη συσκευή vortex. Στα σωληνάκια με αριθμό 4 έως 11 τοποθετούνται απο 700 μ L DMSO. Σύμφωνα με τη μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων μεταφέρονται 700 μ L από το ένα σωληνάκι erpendorf στο επόμενο σωληνάκι και αναδεύονται με τη συσκευή vortex.

Πίνακας 2.7.1: Αραιώσεις ligand -συμπλόκων μετάλλων Flumequine

Αρίθμηση δειγμάτων	3	4	5	6	7	8	9	10	11
μ g/ml στο erpendorf	400	200	100	50	25	12,5	6,25	3,125	1,5625
μ g/ml στο δοκιμαστικό σωλήνα	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,0625	0,03125

Διάλυση - Αραίωση L

Τοποθετείται μία σειρά απο 9 σωληνάκια erpendorf. Σε κάθε σωληνάκι σημειώνουμε τους αριθμούς απο το 1 μέχρι το 9 και τον κωδικό της ουσίας που θα αραιώσουμε. Στο σωληνάκι erpendorf με τον αριθμό 1 υπάρχει το σύμπλοκο σε κρυσταλλική μορφή με συγκέντρωση 5 mg/ml και προσθέτουμε 500 μ L DMSO και αναδεύεται με τη συσκευή vortex. Στα σωληνάκια με αριθμό 2 έως 9 τοποθετούνται από 250 μ L

DMSO. Σύμφωνα με τη μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων μεταφέρονται 250 μL από το ένα σωληνάκι erpendorf στο επόμενο σωληνάκι και αναδεύονται με τη συσκευή vortex. Εξαιρέση αποτέλεσαν τα σύμπλοκα με κωδικούς 17,1 A και 16,1 A, στα οποία επειδή ήταν δύσκολο να διαλυθεί ο κρύσταλλος του συμπλόκου προστέθηκε στο σωληνάκι erpendorf με τον αριθμό 1, 1000 μL DMSO αντί για 500. Συνεπώς, στα συγκεκριμένα σύμπλοκα άλλαξαν και οι συγκεντρώσεις του μετάλλου σε κάθε erpendorf.

Πίνακας 2.7.2: Αραιώσεις ligand -συμπλόκων μετάλλων L

Αρίθμηση δειγμάτων	1	2	3	4	5	6	7	8	9
μg/ml στο erpendorf	10	5	2,5	1,25	0.625	0.3125	0.1562	0.0781	0.039
μg/ml στο δοκιμαστικό σωλήνα	200	100	50	25	12,5	6,25	3,125	1,5625	0,7812

Πίνακας 2.7.3: Αραιώσεις ligand -συμπλόκων μετάλλων με κωδικούς 17,1A και 16,1A

Αρίθμηση δειγμάτων	1	2	3	4	5	6	7	8	9
μg/ml στο erpendorf	5	2,5	1,25	0.625	0.3125	0.1562	0.0781	0.039	0,0195
μg/ml στο δοκιμαστικό σωλήνα	100	50	25	12,5	6,25	3,125	1,5625	0,7812	0,3906

Αποστείρωση όργανα

Εφόσον έχουμε χρόνο αποστειρώνουμε όλα τα σωληνάκια που θα χρειαστούμε τις επόμενες μέρες του πειράματος. Μαζί μπορούμε να αποστειρώνουμε και τα ακροφύσια κάθε φορά που θα χρειάζεται. Οτιδήποτε έχει αποστειρωθεί φυλάσσεται μέσα στο biosafety cabinet.

Παρασκευή υγρών θρεπτικών και Muellern Hinton

Παρασκευάζουμε τα υγρά θρεπτικά που θα μας χρειαστούν τις υπόλοιπες μέρες όπως και το Muellern σύμφωνα με τις οδηγίες στη σελ.21-22 και τα βάζουμε να αποστειρωθούν .

- Για τη παρασκευή του Muellern, σε 600 ml απεσταγμένο νερό προσθέτουμε 12,6 gr σκόνη Muellern και το χωρίζουμε σε 3 ογκομετρικές φιάλες από 200 ml
- Για τα υγρά θρεπτικά παρασκευάζουμε 100 ml τα οποία τα χωρίζουμε σε 5 κωνικές φιάλες από 20 ml.

Μεγάλη προσοχή να μην βάλουμε άγαρ στη παρασκευή των υγρών θρεπτικών.

Εμβολιασμός μικροοργανισμού σε υγρό θρεπτικό

Ξεκινάμε το πείραμα με όποιο μικροοργανισμό θέλουμε. Δουλεύουμε πάντα μέσα στο biosafety cabinet και δίπλα σε αναμμένη φλόγα. Αφού πυρακτώσουμε τον κρίκο παίρνουμε μία-δύο κρικιές από το κεκλιμένο σωλήνα και το εμβαπτίζουμε στα 20 ml υγρού θρεπτικού. Τοποθετούμε στο στόμιο της κωνικής φιάλης υδρόφοβο βαμβάκι και την αφήνουμε μέσα στο κλίβανο επώασης στην αντίστοιχη θερμοκρασία επώασης του μικροοργανισμού και σε 200 στροφές για ένα 20λεπτο περίπου μέχρι να γίνει ομοιογενές το διάλυμα.

Στη συνέχεια παίρνουμε 2 ml από αυτή την κωνική και τα τοποθετούμε σε καινούρια κωνική φιάλη με ίδιο θρεπτικό. Τις αφήνουμε και τις 2 μέσα στο κλίβανο επώασης για ένα 24ωρο περίπου .

2η ΗΜΕΡΑ:

Πείραμα

Αρχικά βλέπουμε στις δύο κωνικές που αφήσαμε τη προηγούμενη μέρα στο κλίβανο επώασης αν είναι θολό το διάλυμα. Αν έχει θολώσει και στις δύο σημαίνει ότι αναπτύχθηκε επιτυχώς ο μικροοργανισμός και επιλέγουμε να χρησιμοποιήσουμε στη διαδικασία του πειράματος τη δεύτερη κωνική φιάλη. Αν δεν έχει θολώσει η δεύτερη επιλέγουμε τη πρώτη. Σε πολλές περιπτώσεις η *Escherichia coli* μετά από 24 ώρες στον κλίβανο επώασης εμφάνιζε έλικες και συσσωματώματα. Έτσι, χρειάστηκε να τοποθετηθεί σε μηχανήμα υπερήχων για 5 λεπτά, ώστε να διασπαστούν οι έλικες και να ομογενοποιηθεί το διάλυμα μικροβίου. Στη συνέχεια εξετάζεται η κυτταρική ανάπτυξη των μικροοργανισμών με φωτομέτρηση στα 600 nm. Προκειμένου να χωρομετρηθούν τα διαλύματα αραιώθηκαν με φυσιολογικό ορό σε αναλογία 1:10. Σύμφωνα με το τύπο της αραιώσης υπολογίστηκε η κατάλληλη ποσότητα του βακτηριακού διαλύματος που πρέπει να προστεθεί μέσα στο Mueller Hinton ώστε να φτάσει σε απορρόφηση από 0,08 έως 0,125. Για να το εξακριβώσουμε μετράμε την απορρόφηση του Mueller αφού έχουμε προσθέσει το βακτηριακό διάλυμα στα 600 nm.

Για τη φωτομέτρηση αφού έχουμε μηδενίσει το φωτόμετρο με δύο άδειες κυψελίδες κάνουμε το εξής:

- Στη μπροστά κυψελίδα βάζουμε 1 ml Mueller που έχει προστεθεί η ποσότητα του βακτηριακού διαλύματος.
- Στη πίσω κυψελίδα βάζουμε 1 ml απεσταγμένο νερό και 200 μl Mueller χωρίς την προσθήκη βακτηριακού διαλύματος.

Αφού έχουμε ετοιμάσει το Mueller δηλαδή το έχουμε φτάσει στη απορρόφηση που θέλουμε ξεκινάμε να εμβολιάζουμε γρήγορα τη σειρά από τους δοκιμαστικούς σωλήνες με το αντίστοιχο σύμπλοκο ή ligand. Αντιστοιχίζουμε το νούμερο απο κάθε δοκιμαστικό σωλήνα με το ίδιο νούμερο στη σειρά των erpendorf με τις αραιώσεις. Χρειάζεται προσοχή να ξεκινάμε τον εμβολιασμό από το νούμερο με το πιο αραιό διάλυμα προς το πιο πυκνό ώστε να μην χρειάζεται να αλλάζουμε ακροφύσιο κάθε φορά. Η ποσότητα αντιμικροβιακού που προσθέτουμε στους δοκιμαστικούς σωλήνες είναι 20 μL .

Στη συνέχεια προσθέτουμε σε όλα τα σωληνάκια 980 μL από το Mueller που έχουμε ετοιμάσει. Δουλεύουμε δίπλα σε αναμμένο φλόγιστρο ώστε να καίμε κάθε φορά το στόμιο από το δοκιμαστικό σωλήνα πριν και μετά τον εμβολιασμό. Τέλος εμβολιάζουμε και 3 δοκιμαστικούς σωλήνες μόνο με Mueller που έχει μέσα μικροοργανισμό για να τους χρησιμοποιήσουμε ως λευκό προσδιορισμό. Τοποθετούμε τις σειρές με τα σωληνάκια στη σειρά μέσα στο κλίβανο επώασης στην αντίστοιχη θερμοκρασία για κάθε μικροοργανισμό και σε 200 στροφές και τα αφήνουμε για ένα 24ωρο.

3η ΗΜΕΡΑ:

Μέτρηση Απορρόφησης

Από τις σειρές των δοκιμαστικών σωλήνων εντοπίστηκαν οι σωλήνες με τη μικρότερη συγκέντρωση μικροοργανισμού δηλαδή αυτοί στους οποίους δεν εντοπίστηκε θόλωμα. Για κάθε σειρά επιλέγουμε 3 σωλήνες. Τον αριθμό που αρχίζει και θολώνει, ένα πριν και ένα μετά μαζί με τα αντίστοιχα επαναληπτικά τους . Επίσης παίρνουμε και τους 3 σωλήνες με το σκέτο μικροοργανισμό μέσα. Φωτομετρούμε όσους σωλήνες επιλέξαμε και καταγράφουμε τα αποτελέσματα. Στο φωτόμετρο τοποθετούμε τις κυψελίδες με τον εξής τρόπο:

- Στη πίσω κυψελίδα βάζουμε 1 ml απεσταγμένο νερό και 200 μL Mueller καθαρό.

- Στη μπροστά κυψελίδα βάζουμε 1 ml απεσταγμένο νερό και 200 μL από το αντίστοιχο σωληνάκι που φωτομετρούμε εκείνη τη στιγμή.

Στη φωτομέτρηση χρησιμοποιούμε πιπέτα του 1 ml που κάθε φορά τη ρυθμίζουμε είτε στο 1 ml είτε στα 200 μL . Επίσης κάθε φορά αλλάζουμε ακροφύσιο και χρησιμοποιούμε μόνο αποστειρωμένα. Για τη φωτομέτρηση χρησιμοποιούμε μία κυψελίδα ανά σειρά δοκιμαστικών σωλήνων φωτομετρώντας από το καθαρό σωληνάκι προς αυτό με τον πιο ανεπτυγμένο μικροοργανισμό.

Αφού τελειώσουμε τις μετρήσεις βάζουμε όλα τα σωληνάκια, τις κωνικές και οτιδήποτε έχει μικροοργανισμό μέσα για αποστείρωση ως απόβλητα.

3.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ- ΣΥΖΗΤΗΣΗ

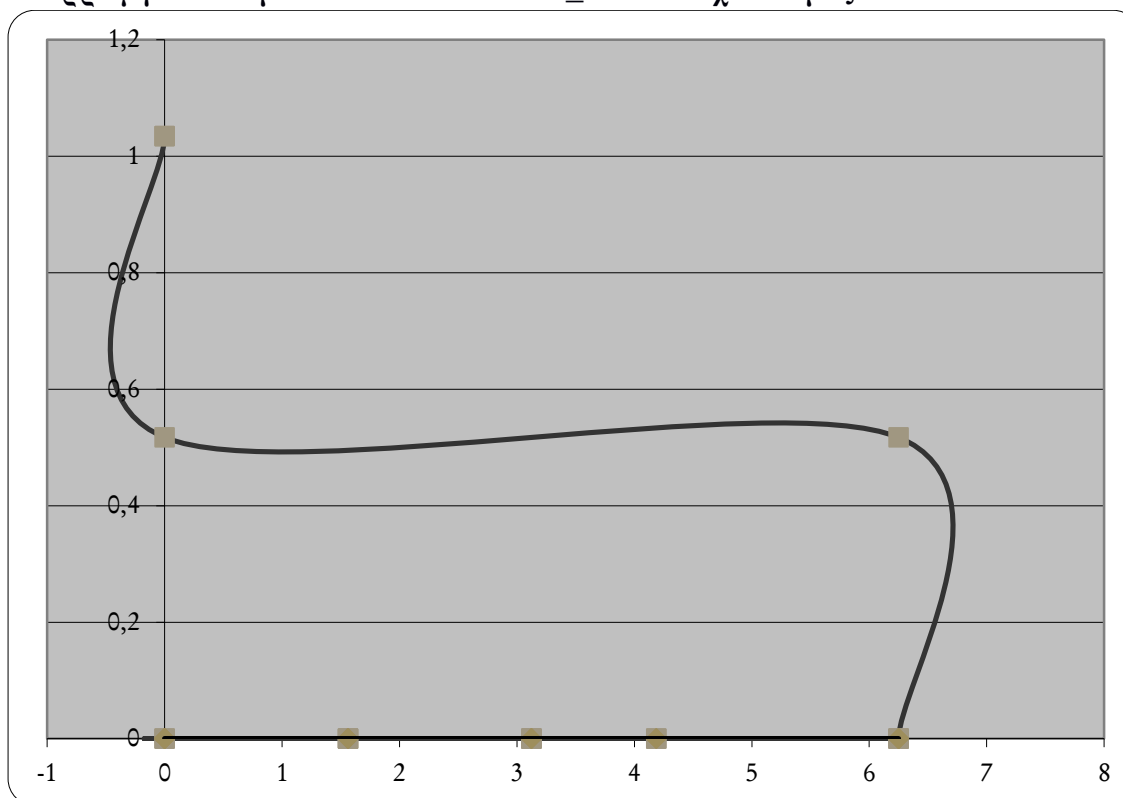
3.1. Ελάχιστες αναλστατικές συγκεντρώσεις (MICs)

Οι ελάχιστες αναλστατικές συγκεντρώσεις (MICs) που σημειώθηκαν στη παρούσα πειραματική μελέτη, για τη κινολόνη, τη θειόνη και για τα ligand τους με τα σύμπλοκα μετάλλων στα εξεταζόμενα βακτηριακά στελέχη παρουσιάζονται στο πίνακα 3.1:

Πίνακας 3.1.: Σύμπλοκα και τιμές MIC

ΚΩΔΙΚΟΣ	ΤΥΠΟΣ	Xanthomonas campestris μg/mL	Staphylococcus aureus μg/mL	Bacillus subtilis μg/mL	E-Coli μg/mL
Flumequine	Hflmq	8	16	2	1
EB01	[Mn(flmq) ₂ (MeOH) ₂]	16	8	4	1
EB03	[Mn(flmq) ₂ (phen)]	32	32	4	2
EB07	[Mn(flmq) ₂ (bipyam)]	16	16	2	1
L	TmimtH-Cu	>200	>200	>200	>200
12B	[CuCl(PPh ₃) ₂ (tmimtH)]	12,5	>200	>200	>100
13A	[CuBr(PPh ₃) ₂ (tmimtH)]	12,5	>200	>200	>100
14B	[CuI(PPh ₃) ₂ (tmimtH)]	12,5	>200	>200	>200
30.1B	[CuCl(topt)(tmimtH)]	>200	>200	>200	>200
28.1	[CuBr(topt)(tmimtH)]	>200	>200	>200	>200
16.1	[CuCl(μ-dppe)(tmimtH)] ₂	>100	>100	>100	>100
23.1	[CuI(tmimtH)(μ-dppe) ₂ Cu ₂ I ₂ (dppe)]	6,25	12,5	6,25	6.25
15.1		1,5625	6,25	6,25	3.125
17.1		3,125	6,25	6,25	6,25

3.2. Ενδεικτική απεικόνιση διαγραμμάτων συσχέτισης συγκεντρώσεων-απορροφήσεων συμπλόκων του tmimtH_Cu και σχολιασμός



ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 3.2.1: Απεικόνιση αποτελεσμάτων προσδιορισμού ελάχιστης-ανασταλτικής συγκέντρωσης – MIC συμπλόκου με κωδικό 15.1 της ομάδας L (tmimtH_Cu)

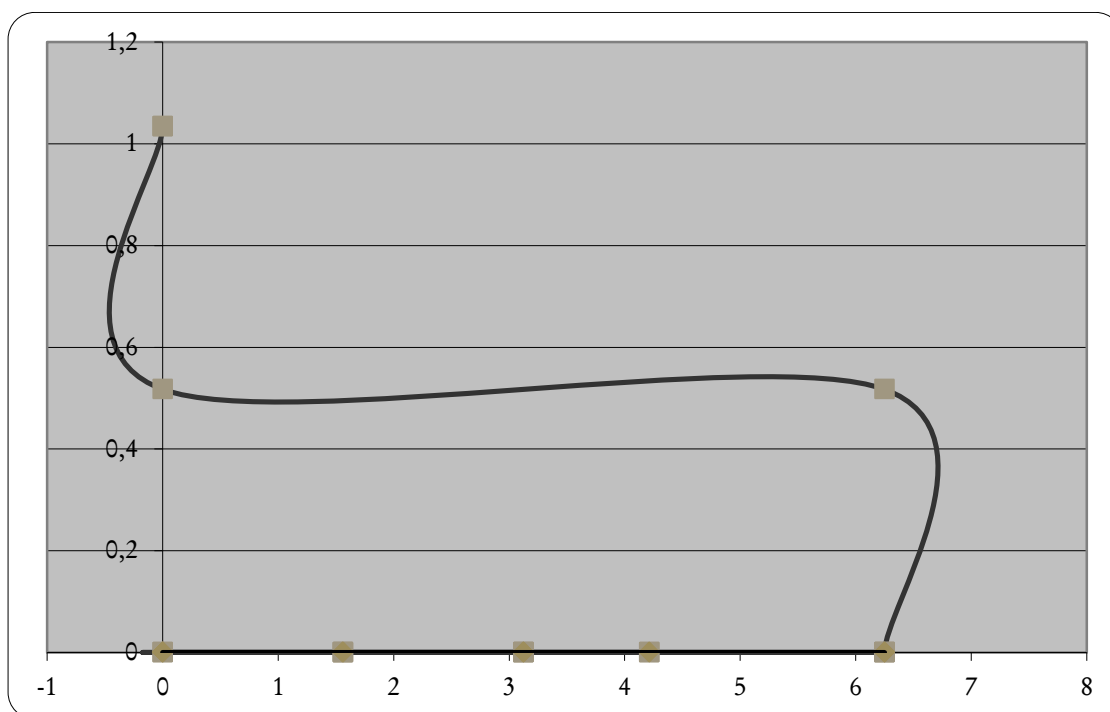
Στον άξονα x απεικονίζονται οι συγκεντρώσεις του συμπλόκου που χρησιμοποιήθηκαν και στον άξονα y οι απορροφήσεις που υπολογίστηκαν μετά την πειραματική διαδικασία και τα αποτελέσματα φαίνονται στο διάγραμμα.

Σύμφωνα με το διάγραμμα βλέπουμε ότι όταν η συγκέντρωση του συμπλόκου είναι 6,25 , η απορρόφηση που προκύπτει κυμαίνεται από 0,018- 0,026. Όταν η συγκέντρωση του συμπλόκου ήταν 3,125 $\mu\text{g}/\text{mL}$, η απορρόφηση που προκύπτει είναι από 0,810 – 0,859. Ενώ αντίστοιχα όταν η συγκέντρωση του συμπλόκου είναι 1,5625 $\mu\text{g}/\text{mL}$, η απορρόφηση που προκύπτει κυμαίνεται από 1,040 – 1,058. Από

αυτά τα στοιχεία υπολογίστηκε το MIC, δηλαδή τη χαμηλότερη συγκέντρωση του συμπλόκου 15.1, που αναστέλλει την ορατή ανάπτυξη του σταφυλόκοκκου μετά από ολονύκτια επώαση του, και είναι **C = 6,25 µg/mL** .

Επιπλέον από το διάγραμμα υπολογίστηκαν με τη βοήθεια εξισώσεων τα εξής στοιχεία : intercept = 1,437 , Slope (κλίση της ευθείας) = -0,219 και το Rsq = 0,971

Το σημείο τομής που φαίνεται ότι προκύπτει από τις δυο καθέτους πάνω στην ευθεία με κλίση= -0,219 , δείχνει το IC50 που είναι = 4,19



ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 3.2.2.: Απεικόνιση αποτελεσμάτων προσδιορισμού ελάχιστης-ανασταλτικής συγκέντρωσης – MIC συμπλόκου με κωδικό 17.1 της ομάδας L (tmimtH_Cu)

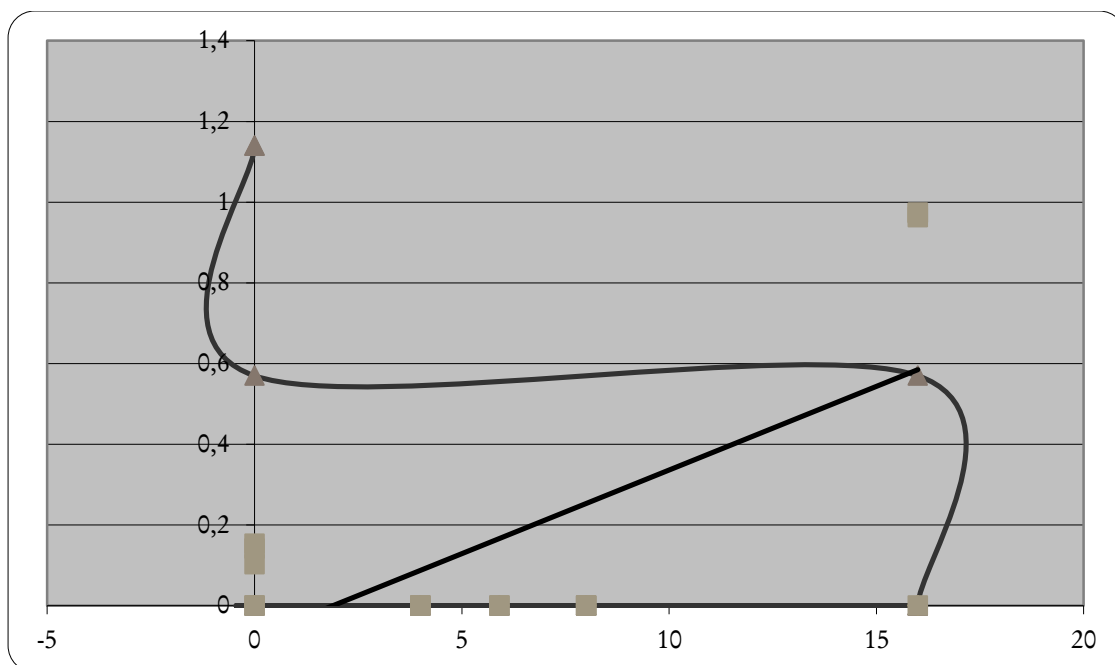
Σύμφωνα με αυτό το διάγραμμα βλέπουμε ότι όταν η συγκέντρωση του συμπλόκου είναι 6,25 , η απορρόφηση που προκύπτει κυμαίνεται από 0,015- 0,024. Όταν η συγκέντρωση του συμπλόκου ήταν 3,125 $\mu\text{g}/\text{mL}$, η απορρόφηση που προκύπτει είναι από 0,851 – 0,864. Ενώ αντίστοιχα όταν η συγκέντρωση του συμπλόκου είναι 1,5625 $\mu\text{g}/\text{mL}$, η απορρόφηση που προκύπτει κυμαίνεται από 1,060 – 1,071. Από αυτά τα στοιχεία υπολογίστηκε το **MIC**, δηλαδή τη χαμηλότερη συγκέντρωση του συμπλόκου 15.1, που αναστέλλει την ορατή ανάπτυξη του σταφυλόκοκκου μετά από ολονύκτια επώαση του, και είναι **C = 6,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$.**

Επιπλέον από το διάγραμμα υπολογίστηκαν με τη βοήθεια εξισώσεων τα εξής στοιχεία : intercept = 1,483 , Slope (κλίση της ευθείας) = -0,229 και το $R_{sq} = 0,978$

Το σημείο τομής που φαίνεται ότι προκύπτει από τις δυο καθέτους πάνω στην ευθεία με κλίση= -0,229 , δείχνει το IC50 που είναι = 4,21

Τα δυο αυτά διαγράμματα που παρατέθηκαν παρουσιάζουν μια αξιοσημείωτη ομοιότητα η οποία μας δείχνει ότι τα σύμπλοκα 15.1 και 17.1 δρουν με πανομοιότυπο τρόπο μόνο όμως στο στέλεχος του σταφυλόκοκκου και παρουσιάζουν ίδιο MIC γεγονός που δείχνει ότι σχεδόν με τον ίδιο τρόπο και ακριβώς με την ίδια ελάχιστη C συμπλόκων = 6,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ εξουδετερώνουμε στις ίδιες συνθήκες το στέλεχος του σταφυλόκοκκου.

3.3. Ενδεικτική απεικόνιση διαγράμματος συσχέτισης συγκεντρώσεων- απορροφήσεων συμπλόκων του Flumequine και σχολιασμός



ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 3.3.1: Απεικόνιση αποτελεσμάτων προσδιορισμού ελάχιστης-ανασταλτικής συγκέντρωσης – MIC συμπλόκου με κωδικό EBO1 της ομάδας Flumequine

Σύμφωνα με αυτό το διάγραμμα βλέπουμε ότι όταν η συγκέντρωση του συμπλόκου είναι 16 µg/mL, η απορρόφηση που προκύπτει κυμαίνεται από 0,006- 0,008. Όταν η συγκέντρωση του συμπλόκου ήταν 8 µg/mL, η απορρόφηση που προκύπτει είναι από 0,102 – 0,153. Ενώ αντίστοιχα όταν η συγκέντρωση του συμπλόκου είναι 4 µg/mL, η απορρόφηση που προκύπτει κυμαίνεται από 0,962 – 0,973. Από αυτά τα στοιχεία υπολογίστηκε το **MIC**, δηλαδή τη χαμηλότερη συγκέντρωση του

συμπλόκου EBO1, που αναστέλλει την ορατή ανάπτυξη του σταφυλόκοκκου μετά από ολονύκτια επώαση του, και είναι **C = 8 µg/mL** .

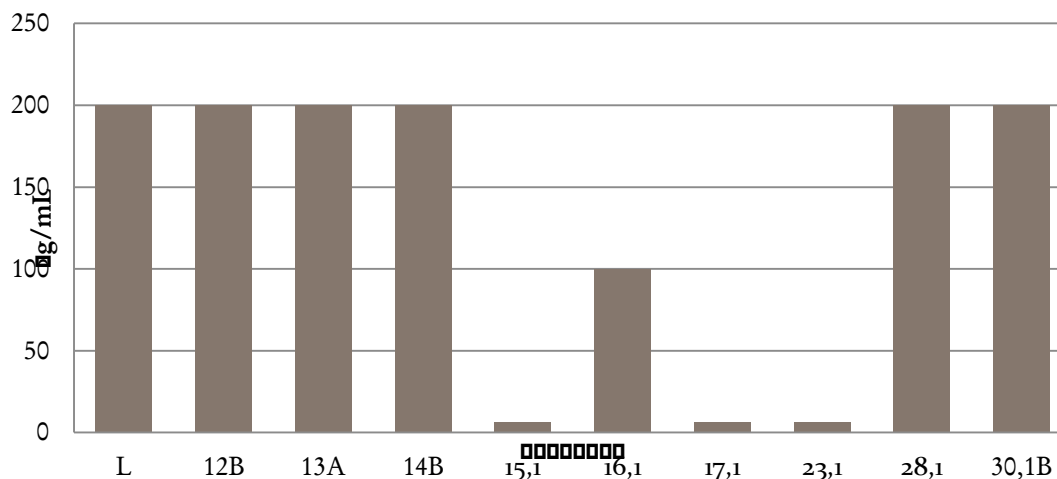
Επιπλέον από το διάγραμμα υπολογίστηκαν με τη βοήθεια εξισώσεων τα εξής στοιχεία : intercept = 1,806 , Slope (κλίση της ευθείας) = -0,209 και το Rsq = 0,998

Το σημείο τομής που φαίνεται ότι προκύπτει από τις δυο καθέτους πάνω στην ευθεία με κλίση= -0,209 , δείχνει το IC50 που είναι = 5,91

Ωστόσο συγκριτικά με τα στοιχεία που έχουμε από το ίδιο το Flumequine παρατηρούμε εύκολα ότι το EBO1 δεν φαίνεται να βελτιώνει την αντιμικροβιακή ικανότητα επομένως η δραστηριότητα του δεν είναι στατιστικά σημαντική.

3.4. Σύμπλοκα του L

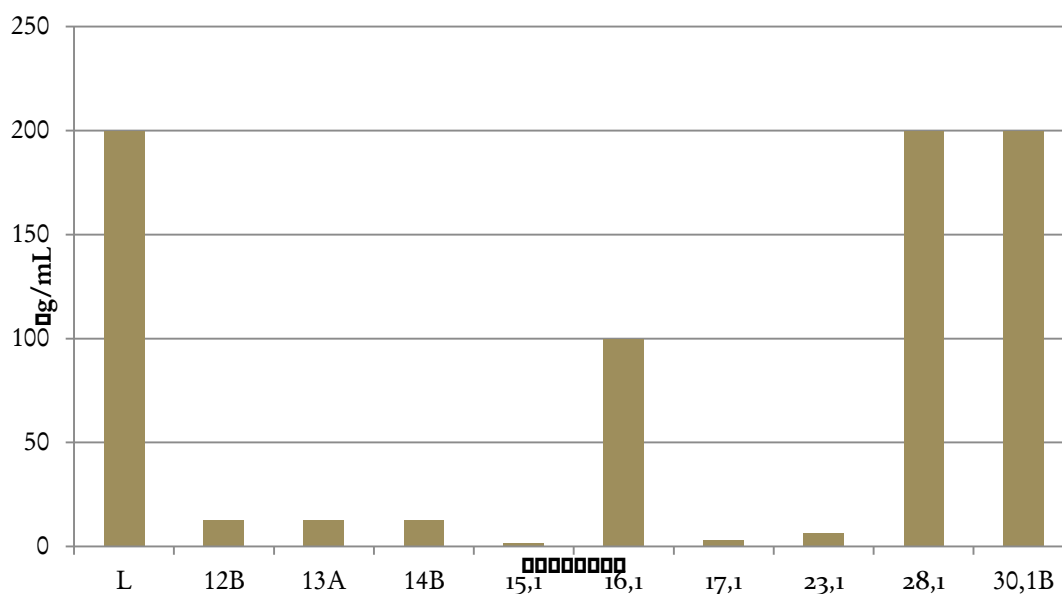
MIC *Bacillus Subtilis*



Διάγραμμα 3.4.1: MIC *Bacillus Subtilis*

Στο διάγραμμα παρατηρούμε τα MIC των συμπλόκων του L (TmimtH-Cu- 2,2,5,5-τετραμεθυλιμιδαζολιδινο-4-θειόνη με Χαλκό) και το πώς αυτά έδρασαν όταν τα χορηγήσαμε σε στέλεχος *Bacillus Subtilis* υπο συνθήκες που αναφέρθηκαν και αναλύθηκαν πιο πάνω. Συγκρίνοντας τη δραστηριότητα των συμπλόκων με το ίδιο το TmimtH_Cu μπορούμε εύκολα να διακρίνουμε πως τα σύμπλοκα με κωδικούς 15,1, 17,1 και 23,1 ($\text{CuI}(\text{tmimtH})(\mu\text{-dprpe})_2\text{Cu}_2\text{I}_2(\text{dprpe})$) παρουσιάζουν πολύ μικρότερο MIC και κατά συνέπεια **είναι πολύ δραστικότερα** του αρχικού (tmimtH_Cu). Τα υπόλοιπα σύμπλοκα παρουσιάζουν το ίδιο MIC = 200 με το αρχικό, με αποτέλεσμα κανένα από τα υπόλοιπα να μην είναι δραστικό έναντι του μικροβιακού στελέχους του *Bacillus Subtilis*.

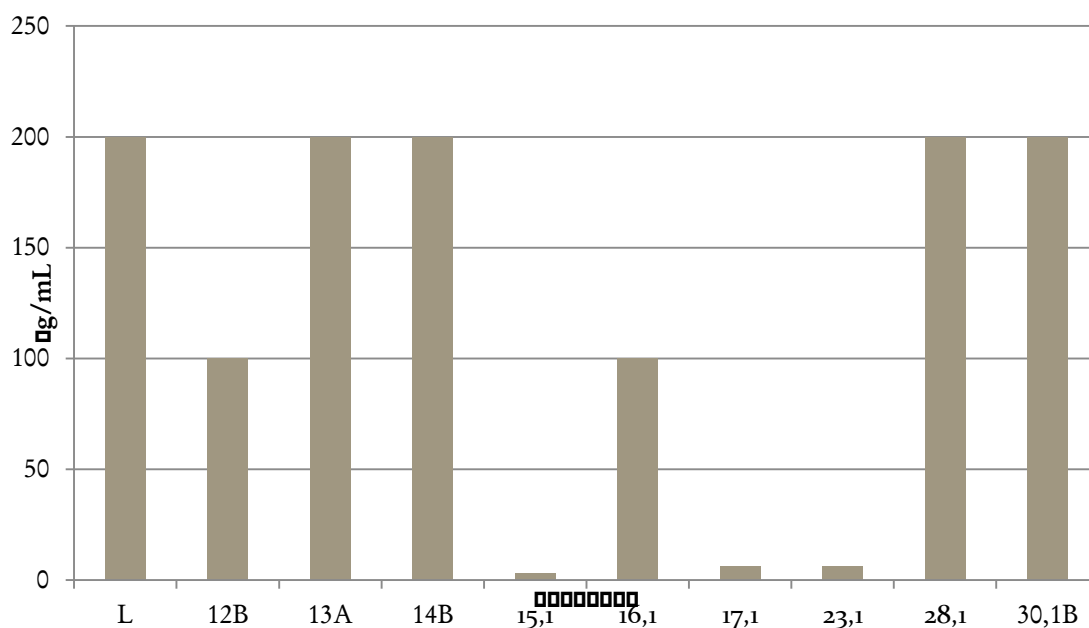
MIC *Xanthomonas Campestris*



Διάγραμμα 3.4.2: MIC *X. Campestris*

Στο διάγραμμα παρατηρούμε τα MIC των συμπλόκων του L (TmimtH-Cu- 2,2,5,5-τετραμεθυλιμιδαζολιδινο-4-θειόνη με Χαλκό) και το πώς αυτά έδρασαν όταν τα χορηγήσαμε σε στέλεχος *Xanthomonas Campestris* υπό συνθήκες που αναφέρθηκαν και αναλύθηκαν πιο πάνω. Συγκρίνοντας τη δραστικότητα των συμπλόκων με το ίδιο το TmimtH_Cu μπορούμε εύκολα να διακρίνουμε πως το σύμπλοκο με κωδικό 15,1 και MIC = 1,56 φαίνεται πως είναι το πιο δραστικό έναντι του μικροβιακού στελέχους *Xanthomonas Campestris* από τα υπόλοιπα σύμπλοκα και φυσικά και από το αρχικό (TmimtH_Cu) με MIC = 200. Ακολουθεί σε δραστικότητα το σύμπλοκο με κωδικό 17,1 και MIC = 3,13 όπου και αυτό είναι πολύ δραστικότερο συγκριτικά με τα υπόλοιπα σύμπλοκα και φυσικά και του αρχικού (TmimtH_Cu). Έπειτα βλέπουμε ότι λιγότερο δραστικό παρουσιάζεται το σύμπλοκο με κωδικό 23,1 και MIC=6,25 ενώ στη συνέχεια ακολουθούν τα σύμπλοκα 12B, 13^A, 14B με MIC = 12,5, το 16,1 με MIC=100 και τέλος τα ασθενέστερα σύμπλοκα που δεν είχαν καμία επίδραση, έναντι του μικροβιακού στελέχους *Xanthomonas Campestris* με κωδικούς L, 28,1 και 30,1B με MIC = 200.

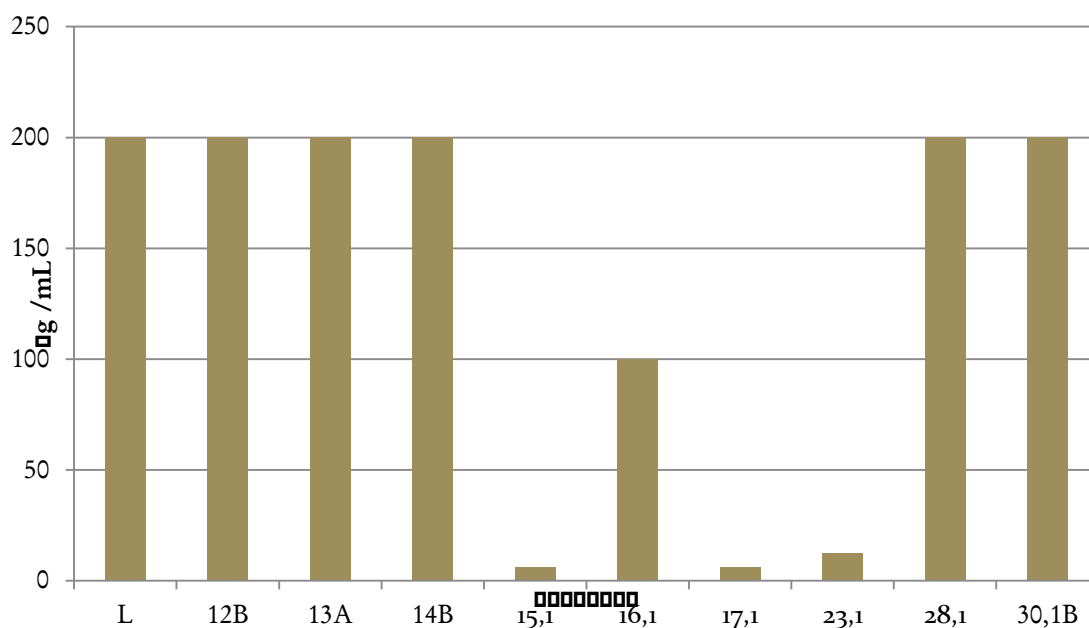
MIC *Escherichia Coli*



Διάγραμμα 3.4.3: MIC *E.Coli*

Στο παραπάνω διάγραμμα παρατηρούμε τα MIC των συμπλόκων του L (TmimtH-Cu-2,2,5,5-τετραμεθυλιμιδαζολιδινο-4-θειόνη με Χαλκό) και το πώς αυτά έδρασαν όταν τα χορηγήσαμε σε στέλεχος *Escherichia Coli* υπό συνθήκες που αναφέρθηκαν και αναλύθηκαν πιο πάνω. Συγκρίνοντας τη δραστικότητα των συμπλόκων με το ίδιο το TmimtH_Cu μπορούμε εύκολα να διακρίνουμε πως το σύμπλοκο με κωδικό 15,1 παρουσιάζει το μικρότερο MIC=3,1 και κατά συνέπεια **είναι το πιο δραστικό** έναντι των υπόλοιπων συμπλόκων σε αυτό το μικροβιακό στέλεχος. Ακολουθως βλέπουμε τα σύμπλοκα με κωδικό 17,1 και 23,1 με MIC= 6,25 να είναι τα αμέσως δραστικότερα. Έπειτα ακολουθούν τα σύμπλοκα με κωδικό 12B και 16,1 με MIC = 100 και ελάχιστη επίδραση έναντι του μικροβίου η οποία ωστόσο δεν είναι η επιθυμητή και τέλος τα σύμπλοκα με κωδικούς L , 13A, 14B, 28,1 και 30,1B με MIC= 200 οπου δεν εμφανίζουν καμία επίδραση έναντι του μικροβιακού στελεχούς *E.Coli*.

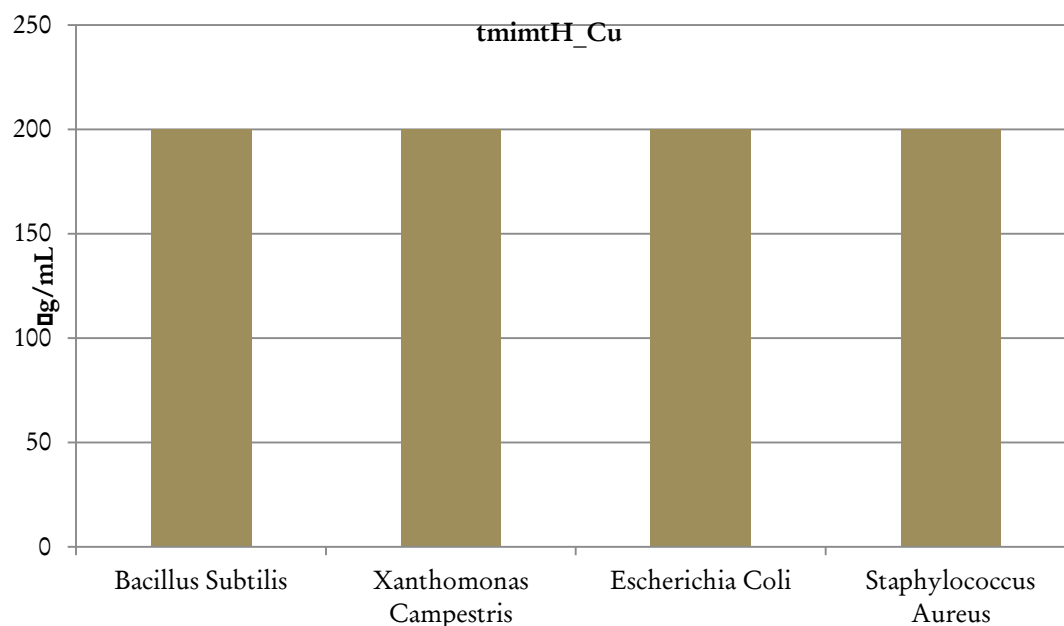
MIC *Staphylococcus Aureus*



Διάγραμμα 3.3.4: MIC *Staphylococcus Aureus*

Στο παραπάνω διάγραμμα παρατηρούμε τα MIC των συμπλόκων του L (TmimtH-Cu-2,2,5,5-τετραμεθυλιμιδαζολιδινο-4-θειόνη με Χαλκό) και το πώς αυτά έδρασαν όταν τα χορηγήσαμε σε στέλεχος *Staphylococcus Aureus* υπο συνθήκες που αναφέρθηκαν και αναλύθηκαν πιο πάνω. Συγκρίνοντας τη δραστικότητα των συμπλόκων με το ίδιο το TmimtH_Cu μπορούμε εύκολα να διακρίνουμε πως το σύμπλοκο με κωδικό 15,1 και 17,1 παρουσιάζουν το μικρότερο MIC=6,25 µg/mL και κατά συνέπεια **είναι τα πιο δραστικά** έναντι των υπόλοιπων συμπλόκων σε αυτό το μικροβιακό στέλεχος. Ακολουθώς βλέπουμε το σύμπλοκο με κωδικό 23,1 με MIC=12,5 µg/mL να είναι το αμέσως δραστικότερο. Έπειτα ακολουθεί το σύμπλοκο με κωδικό 16,1 με MIC = 100 µg/mL και ελάχιστη επίδραση έναντι του μικροβίου η οποία ωστόσο δεν είναι η επιθυμητή και τέλος τα σύμπλοκα με κωδικούς L , 12B,13A, 14B, 28,1 και 30,1B με MIC= 200 µg/mL όπου δεν εμφανίζουν καμία επίδραση έναντι του μικροβιακού στελέχους *Staphylococcus Aureus*.

MIC *L(tmimtH-Cu)*

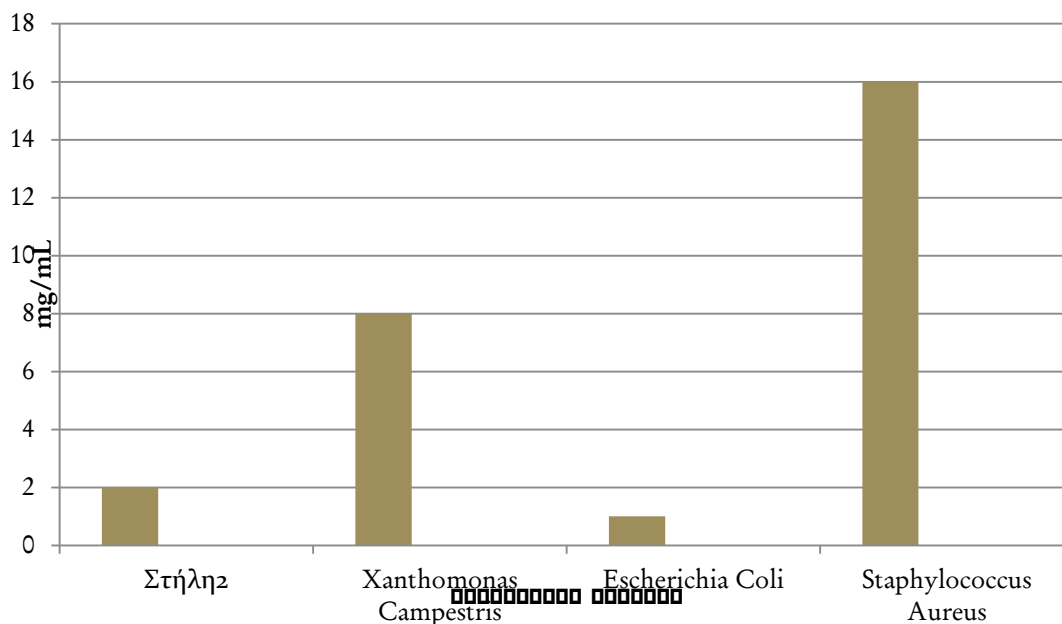


Διάγραμμα 3.4.5.: MIC *L(tmimtH_Cu)*

Το TmimtH-Cu- 2,2,5,5-τετραμεθυλιμιδαζολιδινο-4-θειόνη με Χαλκό ερευνητικά φαίνεται να είναι αντιμικροβιακός, αντιφλεγμονώδης και κατά του όγκου παράγοντας με σημαντική αντιβακτηριακή δράση έναντι πολλών Gram-θετικών και Gram-αρνητικών μικροοργανισμών. Μέσα από το διάγραμμα βλέπουμε πως το tmimtH_Cu δεν παρουσιάζει κάποια δραστηριότητα έναντι των μικροβιακών στελεχών που μελετήσαμε, έχοντας MIC > 200 µg/mL . Ωστόσο παρατηρήσαμε πως κάποια από τα σύμπλοκά του (15.1 , 17.1 , 23.1) φάνηκαν πολύ πιο δραστικά έναντι κάποιων μικροβίων όπως είδαμε και παρουσιάσαμε στα πιο πάνω διαγράμματα.

3.5. Flumequine και σύμπλοκά μετάλλων

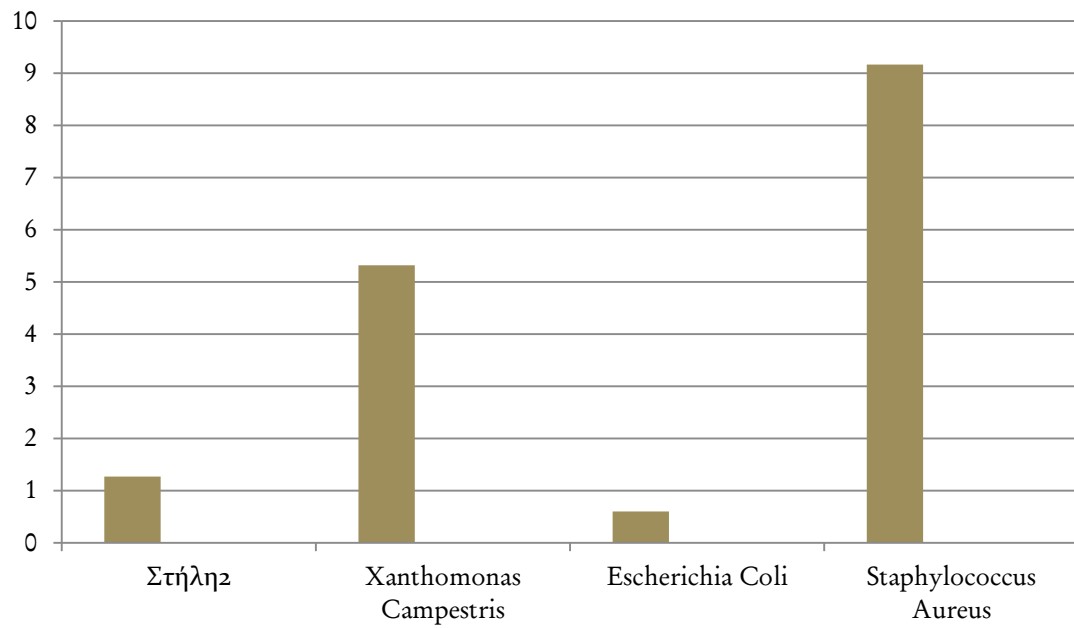
MIC FLUMEQUINE



Διάγραμμα 3.5.1. : Απεικόνιση MIC του flumequine σε όλα τα μικροβιακά στελέχη

Το flumequine είναι ένα συνθετικό αντιβιοτικό, που χρησιμοποιείται για την θεραπεία βακτηριακών λοιμώξεων. Όπως βλέπουμε από το παραπάνω διάγραμμα, το MIC του flumequine διαφέρει σε κάθε μικρόβιο. Φυσικά αυτό συμβαίνει εφόσον το αντιμικροβιακό αυτό δραστικό συστατικό δρα διαφορετικά σε διαφορετικά στελέχη μικροβίων και έτσι η δραστηριότητά του αυξάνεται ή μειώνεται ανάλογα με τον τύπο του μικροβίου στο οποίο χορηγείται. Σύμφωνα με την πειραματική διαδικασία είδαμε πως το flumequine είναι πιο δραστικό στο μικρόβιο *Escherichia Coli*. Αμέσως μετά ακολουθεί στο μικρόβιο *Bacillus Subtilis*, έπειτα στην *Xanthomonas Campestris* και τέλος ασθενέστερη είναι η δράση του flumequine στο στέλεχος του *Staphylococcus Aureus*.

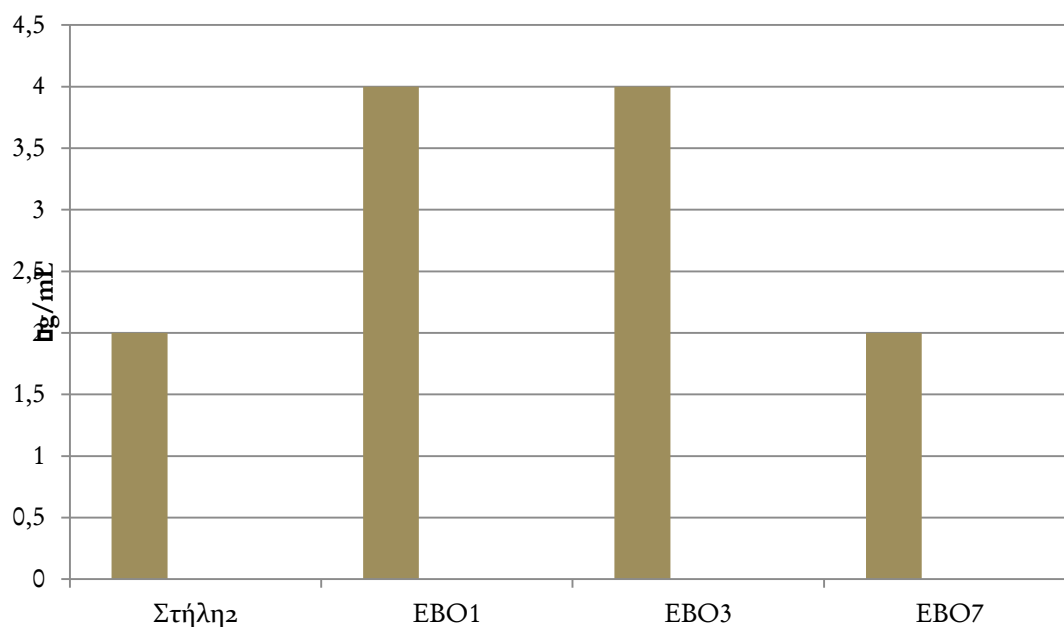
IC50 FLUMEQUINE



Διάγραμμα 3.5.2. : IC50 flumequine για τα μικροβία Bacillus Subtilis, Xanthomonas Campestris, Escherichia Coli, Staphylococcus Aureus

Σύμπλοκα του Flumequine

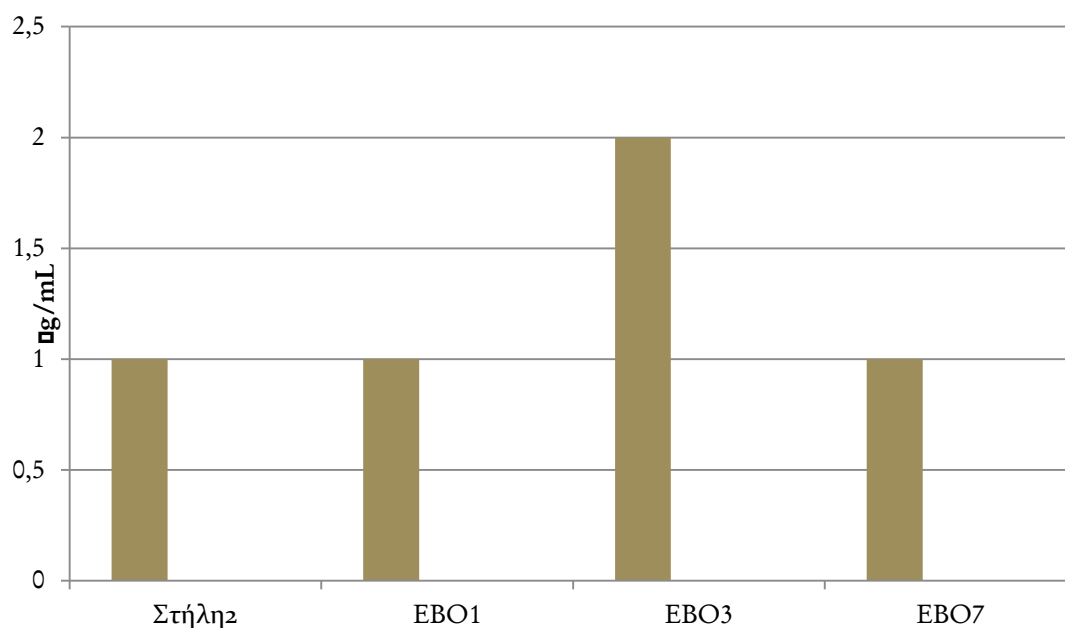
MIC *Bacillus Subtilis*



Διάγραμμα 3.5.3. : MIC *Bacillus Subtilis*

Στο διάγραμμα παρατηρούμε τα MIC των συμπλόκων EBO1 ($[Mn(flmq)_2(MeOH)_2]$), EBO3 ($[Mn(flmq)_2(phen)]$) και EBO7 ($[Mn(flmq)_2(bipyam)]$) του flumequine και το πώς αυτά έδρασαν όταν τα χορηγήσαμε σε στέλεχος *Bacillus Subtilis* υπό συνθήκες που αναφέρθηκαν πιο πάνω. Συγκρίνοντας τη δραστηριότητα των συμπλόκων με το ίδιο το flumequine μπορούμε εύκολα να διακρίνουμε πως το σύμπλοκο με κωδικό EBO7 παρουσιάζει το ίδιο MIC = 2 µg/mL με το flumequine και επομένως την ίδια δραστηριότητα με αυτό στο στέλεχος του *Bacillus Subtilis*. Τα άλλα δυο σύμπλοκα EBO1 και EBO3 με MIC = 4 µg/ ml είναι ασθενέστερα του flumequine όπως και του EBO7.

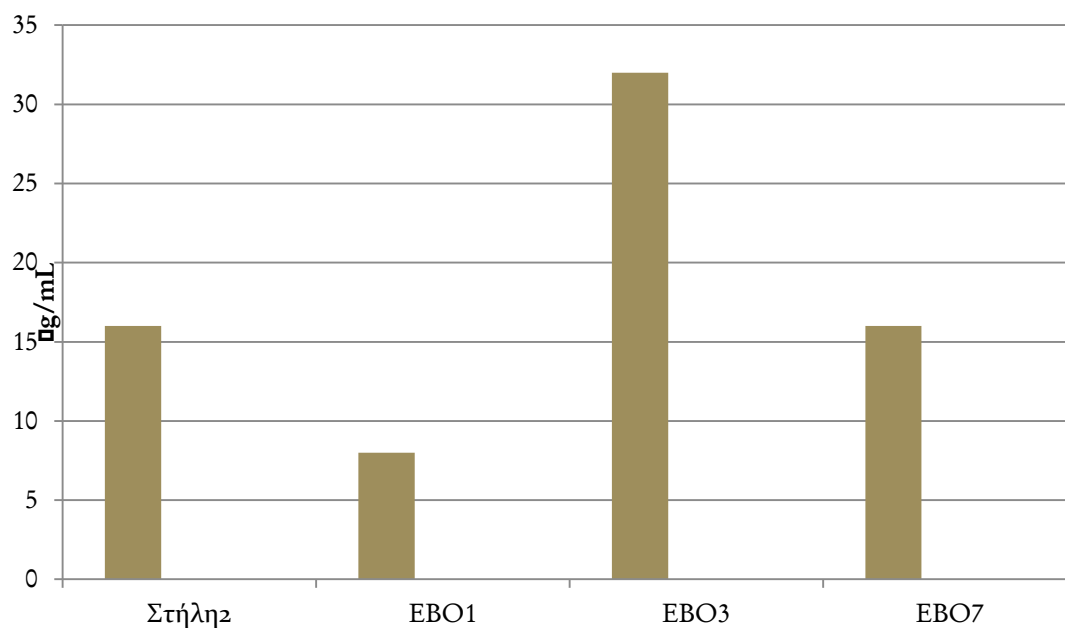
MIC *Escherichia Coli*



Διάγραμμα 3.5.4.: MIC *E. Coli*

Στο διάγραμμα παρατηρούμε τα MIC των συμπλόκων EBO1 ($[Mn(flmq)_2(MeOH)_2]$), EBO3 ($[Mn(flmq)_2(phen)]$) και EBO7 ($[Mn(flmq)_2(bipyam)]$) του Flumequine και το πώς αυτά έδρασαν όταν τα χορηγήσαμε σε στέλεχος *Escherichia Coli* υπο συνθήκες που αναφέρθηκαν πιο πάνω. Συγκρίνοντας τη δραστηριότητα των συμπλόκων με το ίδιο το Flumequine μπορούμε εύκολα να διακρίνουμε πως τα σύμπλοκα EBO1 και EBO7 παρουσιάζουν ίδιο MIC=1 µg/ mL και επομένως βλέπουμε πως επιδρούν με τον ίδιο τρόπο στο στέλεχος της *Escherichia Coli* και έχουν την ίδια δραστηριότητα με το Flumequine σε αυτό το μικρόβιο (το οποίο όμως παρουσιάζει ιδιαιτερότητες όπως έχουμε επισημάνει προς την μελέτη του). Το σύμπλοκο με κωδικό EBO3 φαίνεται ότι είναι ασθενέστερο όλων με MIC = 2 µg/mL.

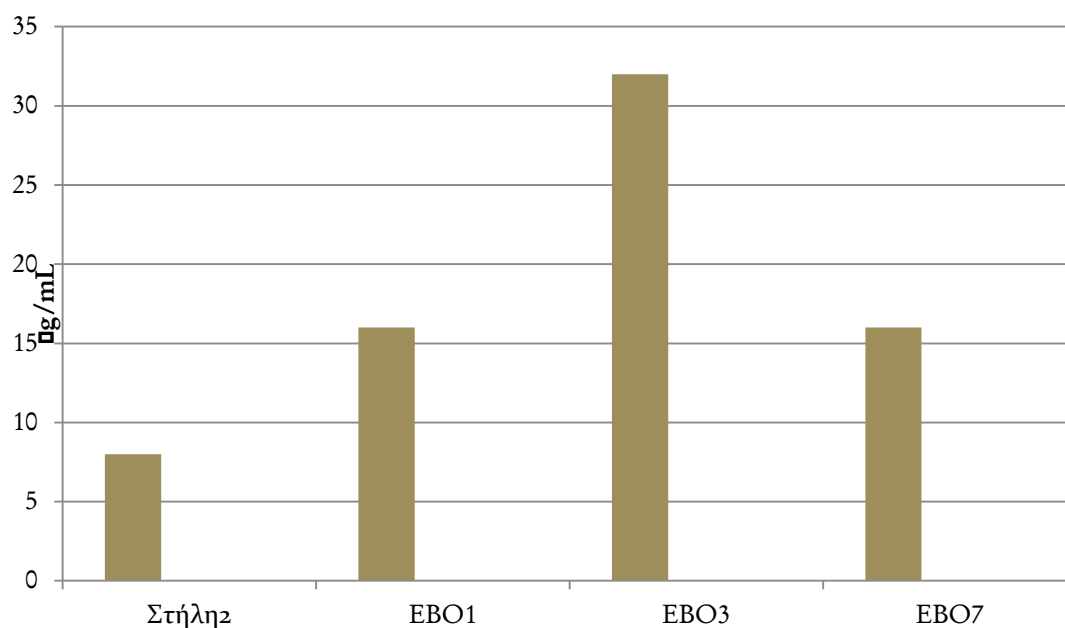
MIC *Staphylococcus Aureus*



Διάγραμμα 3.5.5.: MIC *Staphylococcus Aureus*

Στο διάγραμμα παρατηρούμε τα MIC των συμπλόκων EBO1 ($[Mn(flmq)_2(MeOH)_2]$), EBO3 ($[Mn(flmq)_2(phen)]$) και EBO7 ($[Mn(flmq)_2(bipyam)]$) του Flumequine και το πώς αυτά έδρασαν όταν τα χορηγήσαμε σε στέλεχος *Staphylococcus Aureus* υπο συνθήκες που αναφέρθηκαν πιο πάνω. Συγκρίνοντας τη δραστικότητα των συμπλόκων με το ίδιο το Flumequine μπορούμε εύκολα να διακρίνουμε πως το σύμπλοκο με κωδικό EBO1 παρουσιάζει μικρότερο MIC = 8 µg/mL από τα υπόλοιπα και μάλιστα μικρότερο από του flumequine γεγονός που το κάνει δραστικότερο με πιο ισχυρή αντιμικροβιακή δράση στο στέλεχος του *Staphylococcus Aureus*. Τα άλλα 2 σύμπλοκα EBO3 και EBO7 δεν επέδρασαν δραστικότερα από το flumequine καθώς βλέπουμε ότι τα MIC τους είναι μεγαλύτερα από αυτό του flumequine με ασθενέστερο όλων το EBO3.

MIC *Xanthomonas Campestris*



Διάγραμμα 3.5.6. : MIC *X. Campestris*

Στο διάγραμμα παρατηρούμε τα MIC των συμπλόκων EBO1 ($[Mn(flmq)_2(MeOH)_2]$), EBO3 ($[Mn(flmq)_2(phen)]$) και EBO7 ($[Mn(flmq)_2(bipyam)]$) του Flumequine και το πώς αυτά έδρασαν όταν τα χορηγήσαμε σε στέλεχος *Xanthomonas Campestris* υπό συνθήκες που αναφέρθηκαν πιο πάνω. Συγκρίνοντας τη δραστικότητα των συμπλόκων με το ίδιο το Flumequine μπορούμε εύκολα να διακρίνουμε πως κανένα από τα 3 σύμπλοκα δεν επέδρασε δραστικότερα από το flumequine καθώς βλέπουμε ότι τα MIC όλων των συμπλόκων είναι μεγαλύτερα από αυτό του flumequine με ασθενέστερο όλων το EBO3.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Το Flumequine είναι κινολόνη πρώτης γενιάς. Είναι ένα συνθετικό αντιβιοτικό, που χρησιμοποιείται για την θεραπεία βακτηριακών λοιμώξεων. Η φλουμεκίνη χρησιμοποιήθηκε στην κτηνιατρική ως φάρμακο για την θεραπεία κυρίως λοιμώξεων του εντερικού σωλήνα, αλλά μόνο σε περιορισμένο αριθμό χωρών. Είναι δραστική σε Gram αρνητικά, αλλά και Gram θετικά βακτήρια. Αυτό είναι σύμφωνο με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης όπου παρατηρήθηκε σημαντική αντιμικροβική δράση σε Gram-αρνητικό βακτήριο (*Escherichia Coli*) όσο και σε Gram-θετικό (*Bacillus Subtilis*). Γενικά η συμπλοκοποίηση του Flumequine με μέταλλα που μελετήθηκαν δεν παρουσίασαν βελτιωμένη αντιμικροβιακή δράση με εξαίρεση τη δράση του συμπλόκου EBO1 ($[[Mn(flmq)_2(MeOH)_2]]$) στο μικροβιακό στέλεχος *Staphylococcus Aureus* όπου παρατηρήθηκε μεγαλύτερη δραστικότητα έναντι του μικροβίου συγκριτικά με το Flumequine. Αξίζει να σημειωθεί πως στο μικροβιακό στέλεχος του *Bacillus Stubtilis* το Flumequine παρουσίασε ίδια δραστικότητα με το σύμπλοκο EBO7 ($[[Mn(flmq)_2(bipyam)]]$) ενώ στην *E.coli* το flumequine παρουσίασε την ίδια δραστικότητα με τα σύμπλοκα EBO1 ($[[Mn(flmq)_2(MeOH)_2]]$) και EBO7 ($[[Mn(flmq)_2(bipyam)]]$).

Το L (TmimtH_Cu) ή αλλιώς 2,2,5,5-τετραμεθυλιμιδαζολιδινο-4-θειόνη με Χαλκό έχει φανεί από τρέχουσες τάσεις έρευνας στη βιοχημεία των συμπλόκων χαλκού ότι έχει μια πιθανή χρήση ως αντιμικροβιακός, αντιφλεγμονώδης και κατά του όγκου παράγοντας. Κατά τη διάρκεια ερευνών, έχει γίνει αναφορά στα σύμπλοκα αλογονούχου χαλκού και αργύρου (I) *N*-μεθυλοβενζοθειαζολ-2-θειόνης, τα οποία έδειξαν σημαντική αντιβακτηριακή δράση έναντι πολλών Gram-θετικών και Gram-αρνητικών μικροοργανισμών. Στην παρούσα μελέτη διαπιστώθηκε πως το TmimtH_Cu δεν παρουσίασε καμία αντιμικροβιακή δράση έναντι των βακτηριακών στελεχών που μελετήθηκαν με το MIC να είναι σε όλα τα στελέχη βακτηρίων > 200 μg/mL και να μην παρατηρείται καμία μεταβλητότητα έναντι των βακτηρίων που χρησιμοποιήθηκαν. Ωστόσο ήταν αξιοσημείωτη η αντιμικροβιακή δράση ορισμένων

συμπλόκων του τα οποία φάνηκε πως όταν χορηγήθηκαν στα μικροβιακά στελέχη παρουσίασαν δραστικότητα στατιστικά σημαντική.

Πιο συγκεκριμένα στο βακτηριακό στέλεχος του *Bacillus Subtilis* τα σύμπλοκα με κωδικούς 15,1, 17,1, 23,1 παρουσίασαν MIC = 6,25 µg/mL και εξουδετέρωναν το στέλεχος του *Bacillus Subtilis*. Τα υπόλοιπα σύμπλοκα δεν έδειξαν κάποια δραστικότητα έναντι του μικροβίου. Στο βακτηριακό στέλεχος της *Xanthomonas Campestris* φάνηκε πως MIC του συμπλόκου 12B = MIC 13A = MIC 14B = 12,5 µg/ml > MIC 23,1 = 6,25 µg/mL > MIC 17,1 = 3,13 µg/ml > MIC 15,1 = 3,1 µg/ml. Αυτή η σχέση μεταξύ των MIC των συμπλόκων φανερώνει πως το πιο δραστικό σύμπλοκο έναντι του βακτηριακού στελέχους την *Xanthomonas Campestris* είναι το 15,1 με μεγάλη στατιστική διαφορά συγκριτικά με τα υπόλοιπα σύμπλοκα.

Στο βακτηριακό στέλεχος *Escherichia Coli* βρέθηκε ότι MIC του συμπλόκου 23,1 = MIC 17,1 = 6,25 µg/ml > MIC 15,1 = 3,1 µg/mL. Αυτή η σχέση μεταξύ των MIC των συμπλόκων φανερώνει πως το πιο δραστικό σύμπλοκο έναντι του βακτηριακού στελέχους *Escherichia Coli* είναι το 15,1 με μεγάλη στατιστική διαφορά συγκριτικά με τα υπόλοιπα σύμπλοκα. Εδώ θα πρέπει να επισημανθεί πως το στέλεχος της *E.Coli* δεν ήταν σταθερό ως προς τα αποτελέσματα στην μέτρηση απορρόφησης. Αυτό συνέβη διότι κατά την ανάπτυξή του σχηματίζει έλικες και συσσωματώματα τα οποία καθιζάνουν πολύ γρήγορα. Για να περιοριστεί το πρόβλημα αυτό γίνονταν πάντα ακόμα 2 καλλιέργειες του μικροβίου με μεταφορά από την αρχική (αφού την αφήναμε στον επωαστήρα για 20 min και έπειτα σε υπέρηχους για 15-20 min προκειμένου να προλάβουμε την ανάπτυξη ελίκων) 500 mL στην πρώτη και 200 mL στην δεύτερη δουλεύοντας τελικά με το μίγμα που ήταν πιο ομοιογενές – χωρίς έλικες.

Τέλος στο βακτηριακό στέλεχος *Staphylococcus Aureus* βρέθηκε ότι το MIC του συμπλόκου 23,1 = 12,5 µg/mL > MIC 17,1 = MIC 15,1 = 6,25 µg/mL. Αυτή η σχέση

των MIC φανερώνει πως το πιο δραστικό σύμπλοκο έναντι και αυτού του βακτηριακού στελέχους είναι το 15,1.

5.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Barrere, G.C., C.E. Barber, and M.J. Daniels. «Biological Macromolecules.» 8 (1986): 372-374. *International Journal of Biological Macromolecules*. December 1986.
- *Chemicool.com*. 2014.
- Federico Katzen, Diego U. Ferreira, Cristian G. Oddo, M. Veronica, Ielmini, Anke Becker, Alfred Puhler and Luis Ielpi. «Xanthomonas campestris pv. Campestris gum Mutants: Effects on Xanthan Biosynthesis and Plant Virulence.» *Journal of Bacteriology* 180, αρ. 7 (April 1998): 1607-1617.
- George G Zhanel, PharmD PhD,1,3,5,6 Andrew Walkty, BSc Pharm,6 Lavern Vercaigne, PharmD,4,6 James A Karlowsky, PhD, John Embil, Alfred S Gin, PharmD, and Daryl J Hoban. «The new fluoroquinolones: A critical review.» May - June 1999 : 207–238.
- Hooper, D.C. «Mechanisms of action and resistance of older and newer fluoroquinolones.» *Clin. Infect. Dis.* 31 (2000): S24-S28.
- <https://en.wikipedia.org/wiki/Flumequine>.
- Imran, M. Iqbal, S. Iqbal, N. Ijaz. «In Vitro antibacterial studies of ciprofloxacin-imines and their complexes with Cu(II), Ni(II), and Zn(II).» *Trunk. J. Biol* 31 (2007): 67-72.
- JM, Andrews. «Determination of minimum inhibitory concentrations.» June 2002.
- King, D.E., Malone R., Lilley S.H. «New classification and update on the quinolones antibiotics.» *Am. Fam. Phys* 61 (2000): 2741-1748.
- Kluytmans J, van Belcum A, Verbrugh H. «Nasal carriage of Staphylococcus aureus: epidemiology underlying mechanism, and associated risks.» *Clinic Microbiology Rev*, July 1997: 505-20.

- Oliphant, C.M., Green, G.M. «Quinolones: A comprehensive review.» *Am. Fam. Phys.* 65 (2002).
- Pearson, R.J.W. Lambert and J. «Susceptibility testing: accurate and reproducible minimum.» 2000: 784-790.
- Uivarosi, Valentina. «Metal complexes of quinolone antibiotics and their applications.» September 2013.
- Wilkinson, A. D. McNaught and A. «Compendium of Chemical Terminology.» *IUPAC*, 1997 .
- www.fda.gov.
- Yoshikazu Asahina, *Kazuhiko Iwase, Fujio Inuma, Masaki Hosaka, and Takayoshi Ishizaki. «Synthesis and Antibacterial Activity of 1-(2-Fluorovinyl)-7-substituted-4-quinolone-3-carboxylic Acid Derivatives, Conformationally Restricted Analogues of Fleroxacin.» April 2 2005.
- Zhanel G.G, Walkty A., Vercaigne L, Karlowsky J.A., Embil J, Gin A.S., Hoban D.J. «The new fluoroquinolones: A critical review.» *Can. J. Infect. Dis* 10 (1999): 207-238.
- Δ. Αναστασιάδου, Γ. Ψωμάς, Μ. Λάλια-Καντούρη, ΑΓ Χατζηδημητρίου, Π. Ασλανίδης. «Σύμπλοκα αλογονιδίου χαλκού (I) με 2,2,5,5-τετραμεθυλο-ιμιδαζολιδινο-4-θειόνη: Σύνθεση, δομές, φωταύγεια, θερμική σταθερότητα και αλληλεπίδραση με DNA.»