



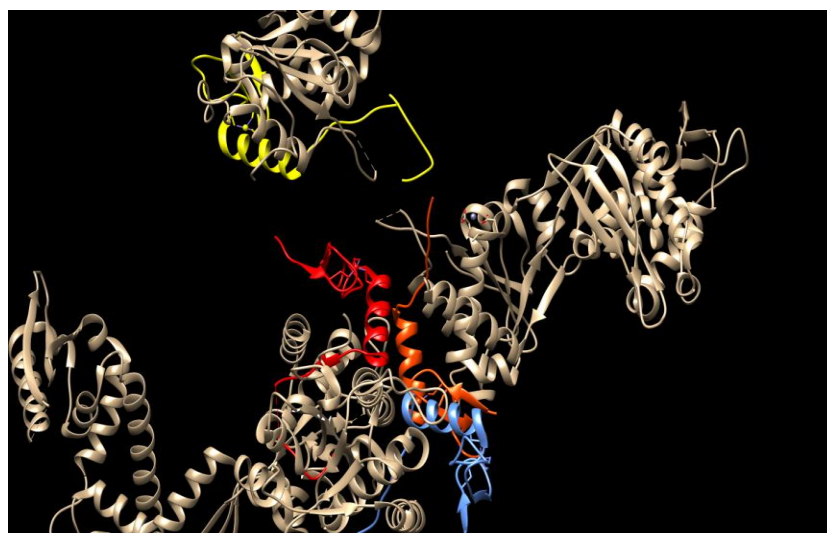
ΑΛΕΞΑΝΔΡΕΙΟ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ
ΙΔΡΥΜΑ ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΠΡΟΝΟΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΩΝ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΩΝ

**ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ-ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ.
ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΙΚΗ ΠΡΟΒΛΕΨΗ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ
ΤΗΣ DNA ΓΥΡΑΣΗΣ ΤΟΥ E. COLI
ΑΠΟ ΝΕΕΣ ΧΗΜΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ
ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ DOCKING**

Πτυχιακή Εργασία

Του

Αθανάσιου Τσαγκαδούρα



Επιβλέπουσα: Ελευθερίου Φαίδρα, αναπληρώτρια καθηγήτρια
Βιοχημείας-Κλινικής Χημείας

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

<i>ΠΡΟΛΟΓΟΣ</i>	4
<i>ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ</i>	6

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΤΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ: ΜΙΑ ΣΥΝΟΛΙΚΗ ΜΑΤΙΑ	8
1.1 ΠΟΙΕΣ ΟΥΣΙΕΣ ΘΕΩΡΟΥΝΤΑΙ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ	8
1.2 ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΩΝ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ	9
1.3 ΕΙΔΗ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ ΠΟΥ ΠΑΡΑΓΟΥΝ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ	9
1.4 ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΒΙΟΣΥΝΘΕΤΙΚΑ ΜΟΝΟΠΑΤΙΑ	10
1.5 Η ΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ ΚΑΙ Η ΕΚΦΡΑΣΗ ΑΝΤΟΧΗΣ ΣΕ ΑΥΤΑ	12
1.5.1 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ	13
1.6 Η ΧΡΗΣΗ ΤΩΝ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ ΣΤΗΝ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ	15
1.7 ΤΥΠΟΙ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ	16
2. ΑΝΟΧΗ ΣΤΗΝ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ	31
2.1 ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΩΝ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΩΝ ΕΠΟΠΤΕΙΑΣ ΤΩΝ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ	32
2.2 ΕΠΙΠΤΩΣΕΙΣ ΤΗΣ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΑΝΤΟΧΗΣ	33
2.3 ΤΡΟΠΟΣ ΔΙΑΣΠΟΡΑΣ ΤΗΣ ΑΝΤΟΧΗΣ ΣΤΗΝ ΑΝΤΙ-ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΣΕ ΣΤΕΛΕΧΗ ΜΙΚΡΟΒΙΩΝ – ΤΙ ΙΣΧΥΕΙ ΗΔΗ	35
2.4 ΠΡΟΣΠΑΘΕΙΑ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΝΕΩΝ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ ΣΗΜΕΡΑ – ΠΟΙΑ ΕΙΝΑΙ Η ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ	39
3. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ	42
3.1 ΕΓΓΕΝΗΣ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΝΕΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ ΑΝΤΟΧΗΣ	42
3.2 ΣΗΜΑΣΙΑ ΑΝΤΛΙΩΝ ΕΚΡΟΗΣ ΤΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ	45
3.3 ΑΛΛΑΓΗ ΔΟΜΗΣ ΣΕ ΣΤΟΧΟΥΣ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ ΜΕΣΩ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ – ΓΕΝΕΤΙΚΑ ΜΕΤΑΘΕΤΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ	48
3.4 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΕΝΖΥΜΩΝ, ΡΙΒΟΣΩΜΑΤΩΝ, ΦΑΓΩΝ ΚΑΙ ΤΟΥ ΜΙΚΡΟΒΙΩΜΑΤΟΣ ΣΤΗΝ ΕΜΦΑΝΙΣΗ ΠΟΛΥΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ	54
4. ΟΙ ΤΟΠΟΪΣΟΜΕΡΑΣΕΣ ΩΣ ΕΝΔΙΑΦΕΡΟΝΤΕΣ ΣΤΟΧΟΙ	61
5. ΔΟΜΗ DNA ΓΥΡΑΣΗΣ ΤΟΥ E. COLI	73
5.1 ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΚΡΥΣΤΑΛΛΟΓΡΑΦΙΚΩΝ ΔΟΜΩΝ ΤΗΣ DNA ΓΥΡΑΣΗΣ ΜΕ ΓΝΩΣΤΟΥΣ ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ	74
6. ΤΕΧΝΙΚΗ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΠΡΟΣΔΕΣΗΣ – ΕΝΑ ΕΡΓΑΛΕΙΟ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΕΥΡΕΣΗ ΝΕΩΝ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ ΕΝΖΥΜΩΝ	81
6.1 ΕΙΔΗ ΜΕΘΟΛΟΓΙΩΝ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΠΡΟΣΔΕΣΗΣ	81

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΣΚΟΠΟΣ	84
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	84
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ	88
4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	96

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	98
ABSTRACT	99
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	101

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η τεράστια ανάγκη της ανακάλυψης νέων συνθετικών ενώσεων που μπορούν να δώσουν νέα πνοή στο χώρο των ήδη υπάρχοντων αντιβιοτικών, με το να συγκαταλεχθούν σε αυτά, γίνεται όλο και περισσότερη φανερή όχι μόνο στην επιστημονική κοινότητα αλλά και στους ίδιους τους πολίτες. Η διασπορά πολυανθεκτικών - στα αντιβιοτικά - στελεχών σε όλο τον πλανήτη έχει “ταρακουνήσει” τους ειδικούς στους πρωτογενείς τομείς περίθαλψης όπως είναι το νοσοκομειακό περιβάλλον, θέτοντας σε κατάσταση συναγερμού τους αρμόδιους φορείς της πολιτείας για την κατάσταση που επικρατεί. Τα μέτρα που πρέπει να ληφθούν είναι πολλά, με το πρωταρχικό όμως να είναι η καθολική εποπτεία των αντιβιοτικών που δίδονται σε ανθρώπους και ζώα, τα οποία δυστυχώς σύμφωνα με την πιο επίκαιρη βιβλιογραφία αναφέρεται το αδιάγνωστο γεγονός της αλόγιστης χρήσης τους, για τους πιο λάθος λόγους τις περισσότερες φορές, η οποία θεωρείται και το πιο χαρακτηριστικό αίτιο της εξέλιξης και ανάπτυξης βακτηριακής αντοχής μέχρι και από στελέχη βακτηρίων που δεν είχαν μέχρι πρότινος δείξει τέτοιου είδους φαινότυπο.

Ωστόσο, είναι θετικό πως πλήθος ερευνητικών ομάδων παγκοσμίως ερευνούν - και θα συνεχίζουν να ερευνούν όπως αφήνεται να εννοηθεί - τις αιτίες που επιδεινώνουν την επικρατούσα κατάσταση, κυρίως στο επίπεδο της βασικής έρευνας στα πεδία της Βιολογίας και Επιστήμης Υπολογιστών. Τα δύο αυτά πεδία, στην παρούσα περίπτωση, καταφέρνουν και αλληλεπιδρούν με τον καλύτερο τρόπο δίνοντας την ευκαιρία σε όσους επιθυμούν να ασχοληθούν με το πεδίο έρευνας ανακάλυψης νέων ενώσεων που δείχνουν αντιμικροβιακή δράση να το κάνουν απτή πραγματικότητα.

Η παρούσα εργασία διακρίνεται σε δύο μέρη, το Θεωρητικό και Πειραματικό. Στο Θεωρητικό μέρος περιγράφεται η προέλευση, δράση και οι περιπτώσεις χρήσεως των αντιβιοτικών, καθώς επίσης, και οι επιπτώσεις που έχει αντιμικροβιακή σήμερα, συμπεριλαμβανομένων των τρόπων που μεταδίδεται ή μεταφέρεται η ανθεκτικότητα. Κατόπιν, περιγράφονται τα διάφορα είδη τοποϊσομερασών με αναφορά της λειτουργίας τους μέσα στο κύτταρο, της σημαντικότητας που παρουσιάζουν πολύ θεμιτούς ένζυμα-στόχους για τα αντιβιοτικά και των ενώσεων που ήδη δείχνουν πολλά υποσχόμενη δράση προς αυτές. Τέλος, περιγράφεται η δομή της DNA γυράσης του E.coli και ο τρόπος σύνδεσης των αναστολέων, με αναφορές σε διάφορες πρωτεϊνικές δομές αυτής στο Pubmed Structure και

παρατίθενται πρόσφατα δεδομένα για την χρήση της τεχνικής εικονικής Μοριακής Πρόσδεσης (Molecular Docking - MD) για την ανακάλυψη νέων αναστολέων ενζύμων.

Στο Πειραματικό μέρος αναφέρονται ο σκοπός της ερευνητικής μελέτης, τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και οι μέθοδοι που εφαρμόστηκαν. Τέλος, γίνεται προσπάθεια παράθεσης των δεδομένων της μελέτης και τα συμπεράσματα από τα αποτελέσματα.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Σημαντικό και ως καθήκον θεωρώ την έκφραση των θερμών μου ευχαριστιών στην υπεύθυνη επιβλέπουσα καθηγήτρια μου, την κα. Ελευθερίου Φαίδρα, αναπληρώτρια καθηγήτρια Κλινικής Χημείας-Βιοχημείας, που δέχτηκε να αναλάβει την επίβλεψη της πτυχιακής μου εργασίας, όπως επίσης για την υποστήριξη, τις συμβουλές και την γενικότερη βοήθεια στην ολοκλήρωση της συγγραφής και εκπόνησης της.

Επίσης, ευχαριστώ θερμά τους φίλους μου και ήδη απόφοιτους της Σχολής Τεχνολόγων Ιατρικών Εργαστηρίων του Α.Τ.Ε.Ι Θεσσαλονίκης Άννα Πέκου, Ασημούλα Καβαδά, Κωνσταντίνο Ελευθεριάδη και Κωνσταντίνα Εκλεμέ, όπως και τον παιδικό μου φίλο Παναγιώτη, που μου δίνανε κουράγιο και ψυχολογική υποστήριξη καθ' όλη τη διάρκεια της ολοκλήρωσης αυτού του πονήματος.

Ιδιαίτερος θα ήθελα να εκφράσω την αμέριστη αγάπη, τον θαυμασμό και σεβασμό προς το πρόσωπο της αρραβωνιαστικιάς μου Κατερίνας, η οποία όλο αυτό το καιρό ήταν μία ασταμάτητη πηγή κουράγιου και ενθάρρυνσης, η οποία δε με άφησε ποτέ να “λυγίσω” σε οποιαδήποτε σημαντική δυσκολία βρισκόταν κατά τη διάρκεια αυτού του ταξιδιού, και φυσικά το ίδιο ισχύει και για τους αξιαγάπητους γονείς μου που με κόπους και με δυσκολίες στη ζωή τους έδωσαν ότι είχαν “ψυχή τε και σώματι” για να υποβοηθήσουν την συνολική περίοδο των σπουδών μου, γεγονός που μου δημιουργεί δυσκολία να εκφράσω με λόγια το πόσο εκτιμώ όσα έπραξαν για εμένα.

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΤΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ: ΜΙΑ ΣΥΝΟΛΙΚΗ ΜΑΤΙΑ

Τα αντιβιοτικά είναι μικρού μοριακού βάρους μόρια τα οποία σε μικρές συγκεντρώσεις αναστέλλουν την ανάπτυξη μικροοργανισμών.

1.1 ΠΟΙΕΣ ΟΥΣΙΕΣ ΘΕΩΡΟΥΝΤΑΙ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ

Τα πρώτα αντιβιοτικά που ανακαλύφθηκαν ήταν μικροβιακοί μεταβολίτες που ανέστειλαν την ανάπτυξη άλλων μικροοργανισμών. Ωστόσο, τώρα συμπεριλαμβάνουμε στη κατηγορία αυτή συνθετικές και ημισυνθετικές ενώσεις με αντιβιοτική δράση.

1. Προϊόντα που προέρχονται από χημική μετατροπή φυσικών αντιβιοτικών ουσιών ή άλλων προϊόντων του μικροβιακού μεταβολισμού
2. Προϊόντα που προέρχονται από μικροβιακό μετασχηματισμό συνθετικών χημικών ενώσεων.
3. Εξ' ολοκλήρου συνθετικές ενώσεις.

Όταν αναφερόμαστε στην αναστολή ανάπτυξης άλλων μικροοργανισμών από ένα αντιβιοτικό, εννοούμε την προσωρινή ή μόνιμη αναστολή της ικανότητας του μικροοργανισμού να αναπαραχθεί και, συνεπώς, την αναστολή ανάπτυξης του βακτηριακού πληθυσμού.

Όταν η αναστολή είναι μόνιμη, η αντιβιοτική δράση ορίζεται ως βακτηριοκτόνος. Εάν από την άλλη η αναστολή χαθεί όταν το αντιβιοτικό απομακρυνθεί από το θρεπτικό υπόστρωμα, το αντιβιοτικό θεωρείται ότι έχει βακτηριοστατική δράση. Η περιοριστική φράση “σε μικρή συγκέντρωση” προστίθεται στον ορισμό επειδή, προφανώς, ακόμη και αδρανή συστατικά θα μπορούσαν να προκαλέσουν βλάβη σε

πλεονάζουσες συγκεντρώσεις, ακολουθούμενα όμως από βλάβες και σε υγιή κύτταρα και συστήματα του οργανισμού με ανάλογες παρενέργειες [1].

1.2 ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΩΝ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ[1]

Μέχρι σήμερα, περίπου 10,000 αντιβιοτικές ενώσεις έχουν συντεθεί ή απομονωθεί και οι χημικές τους δομές στην πλειοψηφία τους έχουν καθοριστεί

1. Ως μία ομάδα, τα αντιβιοτικά περιλαμβάνουν ουσίες μοριακού βάρους από 150 μέχρι 5000.
2. Τα μόρια τους ίσως περιέχουν μόνο άνθρακα και υδρογόνο, ή, πιο συχνά, άνθρακα, υδρογόνο, οξυγόνο, και άζωτο, όπως επίσης θείο, φώσφορο, ή άτομα αλογόνων.

Οι ενώσεις με αντιβιοτική δράση μπορεί να περιλαμβάνουν αλιφατικές αλυσίδες, αλκυκλικές αλυσίδες, αρωματικούς δακτυλίους, ετεροκυκλικούς δακτυλίους, υδατάνθρακικές ομάδες, πολυπεπτιδικές αλυσίδες, ενώ στις λειτουργικές ομάδες περιλαμβάνονται υδροξύλια, καρβοξύλια, αζωτούχες ομάδες, κλπ. Επομένως, είναι ξεκάθαρο ότι τα αντιβιοτικά δεν είναι μία ομοιογενής κατηγορία από χημικές ουσίες.

Η μόνη ιδιότητα που όλα τα αντιβιοτικά έχουν από κοινού είναι ότι είναι οργανικά μόρια.

1.3 ΕΙΔΗ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ ΠΟΥ ΠΑΡΑΓΟΥΝ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ

Μία μεγάλη ποικιλία μορίων με αντιβιοτική δράση παράγεται από ένα εκτεταμένο ευρύ φάσμα μικροοργανισμών. Περισσότερο από το 50% των αντιβιοτικών στην

πραγματικότητα παράγονται από μέλη μίας και μόνο τάξης βακτηρίων, αυτής των Ακτινομυκήτων, και συγκεκριμένα από ένα γένος αυτής της τάξης, των Στρεπτομυκήτων. Τα ευβακτήρια σπάνια παράγουν αντιβιοτικά, εκτός από τους σπορογενείς Βάκιλλους που παράγουν μία ιδιαίτερη κατηγορία αντιβιοτικών, τα πεπτίδια, και ορισμένα είδη του γένους Ψευδομονάδα. Μόνο δύο γένη μυκήτων, ο Ασπέργιλλος και το Πενικίλλιο, παράγουν έναν σχετικά αυξημένο αριθμό αντιβιοτικών.

Η παραγωγή αντιβιοτικών δεν είναι σχολαστικά ειδική ανάλογα με το είδος: το ίδιο αντιβιοτικό μπορεί να παράγεται από οργανισμούς που ανήκουν σε διαφορετικά είδη ή γένη ή ακόμη και τάξεις. Και το αντίθετο είναι επίσης σωστό: δηλαδή, στελέχη που είναι ταξινομικά κατηγοριοποιημένα ως μέλη των ίδιων ειδών, μπορούν να παράγουν διαφορετικά αντιβιοτικά. Ωστόσο, ως γενικός κανόνας μπορεί να θεωρηθεί ότι, όσο περισσότερο απομακρυσμένοι είναι οι μικροοργανισμοί στην ταξινομική κλίμακα, τόσο λιγότερο πιθανό είναι να παράγουν το ίδιο αντιβιοτικό[2].

1.4 ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΒΙΟΣΥΝΘΕΤΙΚΑ ΜΟΝΟΠΑΤΙΑ

Σε αντίθεση με τη μεγάλη ποικιλία χημικών δομών, οι βιολογικές αντιδράσεις που συμμετέχουν στη σύνθεση αντιβιοτικών μπορούν να ομαδοποιηθούν σε λίγα θεμελιώδη βιοσυνθετικά μονοπάτια. Είναι σημαντικό να αναγνωρίσουμε ότι αυτά τα μονοπάτια είναι απλές παραλλαγές των βιοσυνθετικών μονοπατιών του φυσιολογικού κυτταρικού μεταβολισμού. Ένα κοινό γνώρισμα των αντιδράσεων που συμμετέχουν στην βιοσύνθεση αντιβιοτικών, και πιο γενικά δευτερογενών μεταβολιτών [3], είναι ότι η εξειδίκευση ενζύμου-υποστρώματος συχνά φαίνεται να είναι λιγότερο αυστηρή από ότι σε αντιδράσεις που συμμετέχουν στη βιοσύνθεση πρωτογενών μεταβολιτών. Στη βιοσύνθεση δευτερογενών μεταβολιτών, ένα καθορισμένο ένζυμο ίσως καταλύει την ίδια αντίδραση παρουσία διάφορων ελάχιστα διαφορετικών υποστρωμάτων. Από την άλλη, ένας και μόνος μεταβολίτης μπορεί να μετατραπεί σε διαφορετικά προϊόντα

μέσω αντιδράσεων καταλυόμενων από ποικίλα ένζυμα. Η μερική έλλειψη εξειδίκευσης έχει ως αποτέλεσμα τη σύνθεση προϊόντων με μία κοινή βασική δομή αλλά με διαφορές, για παράδειγμα, στο βαθμό οξειδωσης ή μεθυλίωσης. Για αυτό το λόγο, τα αντιβιοτικά κατατάσσονται σε οικογένειες, π.χ το ίδιο στέλεχος παράγει δύο ή περισσότερα αντιβιοτικά τα οποία σχετίζονται δομικά.

Στη βάση των βιοσυνθετικών μονοπατιών, τα αντιβιοτικά μπορούν να ομαδοποιηθούν όπως φαίνεται παρακάτω:

I. Δομικά ανάλογα πρωτογενών μεταβολιτών (δομικά ανάλογα αμινοξέων, νουκλεοσιδίων, συνενζύμων κλπ.). Αυτά είναι μικρά μόρια τα οποία βιοσυντίθενται με τρόπο παρόμοιο με αυτό των πρωτογενών μεταβολιτών και μοιάζουν με αυτά δομικά.

II. Αντιβιοτικά προερχόμενα από πολυμερισμό.

Αυτά περιλαμβάνουν:

1. Πεπτιδικά αντιβιοτικά και τα παράγωγα τους, παραγόμενα από την σύνδεση αμινοξέων ώστε να σχηματίσουν μία πολυπεπτιδική αλυσίδα που μπορεί να τροποποιηθεί με περαιτέρω αντιδράσεις.
2. Αντιβιοτικά που αποτελούν προϊόντα μεταβολισμού με πολλές οξικές και προπιονικές μονάδες.

Υπάρχει μία ευρεία ποικιλία από χημικές δομές που προέρχονται από αντιδράσεις που ακολουθούν τα βιοσυνθετικά μονοπάτια των λιπιδίων, όπως:

1. Τερπενοειδή αντιβιοτικά προερχόμενα από το μεταβολισμό ισοπρενίου. Αυτά παράγονται από μύκητες και μόνο κατ'εξάιρεση από ακτινομύκητες.
2. Αμινογλυκοσιδικά αντιβιοτικά, που αποτελούνται από μόρια σακχάρων, συνήθως αμινοσάκχαρα, και μία κυκλική αμινο-αλκοόλη (αμινοκυκλιτόλη).

Ωστόσο, το βιοσυνθετικό μονοπάτι που έχει περιγραφεί για κάποια αντιβιοτικά δεν είναι εύκολα κατηγοριοποιήσιμο, και υπάρχουν γνωστά αντιβιοτικά τα οποία

προέρχονται από συνδιασμό υποομάδων που προέρχονται από περισσότερα από ένα από τα προαναφερόμενα μονοπάτια.

1.5 Η ΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ ΚΑΙ Η ΕΚΦΡΑΣΗ ΑΝΤΟΧΗΣ ΣΕ ΑΥΤΑ

Τα αντιβιοτικά είναι συχνά ομαδοποιημένα σύμφωνα με το φάσμα της δράσης τους, σύμφωνα δηλαδή με της τάξεις των μικροοργανισμών που αναστέλλουν. Υπάρχουν, λοιπόν, αντιϊικά, αντιβακτηριακά, αντιμυκητιακά, και αντιπρωτοζωϊκά αντιβιοτικά, σύμφωνα με τις κύριες ομάδες ευαίσθητων μικροοργανισμών. Κάποιος μπορεί να μιλήσει, επίσης, για ογκοκατασταλτικά αντιβιοτικά, τα οποία είναι προϊόντα μικροβιακής προέλευσης και μπορούν να αναστείλουν την ανάπτυξη καρκινικών κυττάρων. Η χρήση του όρου “αντιβιοτικό” για αυτά τα προϊόντα είναι δικαιολογημένη από το γεγονός πως αυτά συχνά απομονώνονταν με βάση τις αντιβακτηριακές τους ιδιότητες.

Η ευαισθησία διαφόρων βακτηρίων στα αντιβιοτικά εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τη δομή του κυτταρικού τους τοιχώματος, διότι αυτό καθορίζει την ικανότητα του αντιβιοτικού να διαπεράσει το κυτταρικό τοίχωμα. Έτσι, τα αντιβακτηριακά αντιβιοτικά μπορούν να διαχωριστούν ανάλογα με την δράση τους ενάντια στα Gram-θετικά ή στα Gram-αρνητικά βακτήρια ή στα μυκοβακτηρίδια. Υπάρχουν πολλά περισσότερα αποτελεσματικά αντιβιοτικά έναντι των Gram-θετικών βακτηρίων, τα οποία είναι εύκολα διαπερατά. Τα αντιβιοτικά που δρουν αποκλειστικά σε Gram-θετικά βακτήρια λέμε ότι έχουν στενό φάσμα δράσης. Εάν είναι ενεργά έναντι και των Gram-θετικών αλλά και των Gram-αρνητικών αντιβιοτικών, λέγεται πως έχουν ευρύ φάσμα δράσης. Σε ένα καθορισμένο πληθυσμό, μεμονωμένοι μικροοργανισμοί ίσως είναι παρόντες δεδομένου ότι δεν αναστέλλεται η ανάπτυξη τους σε συγκεντρώσεις αντιβιοτικού που αναστέλλουν την πλειοψηφία των κυττάρων. Αυτοί οι μεμονωμένοι μικροοργανισμοί ονομάζονται μεταλλάκτες.

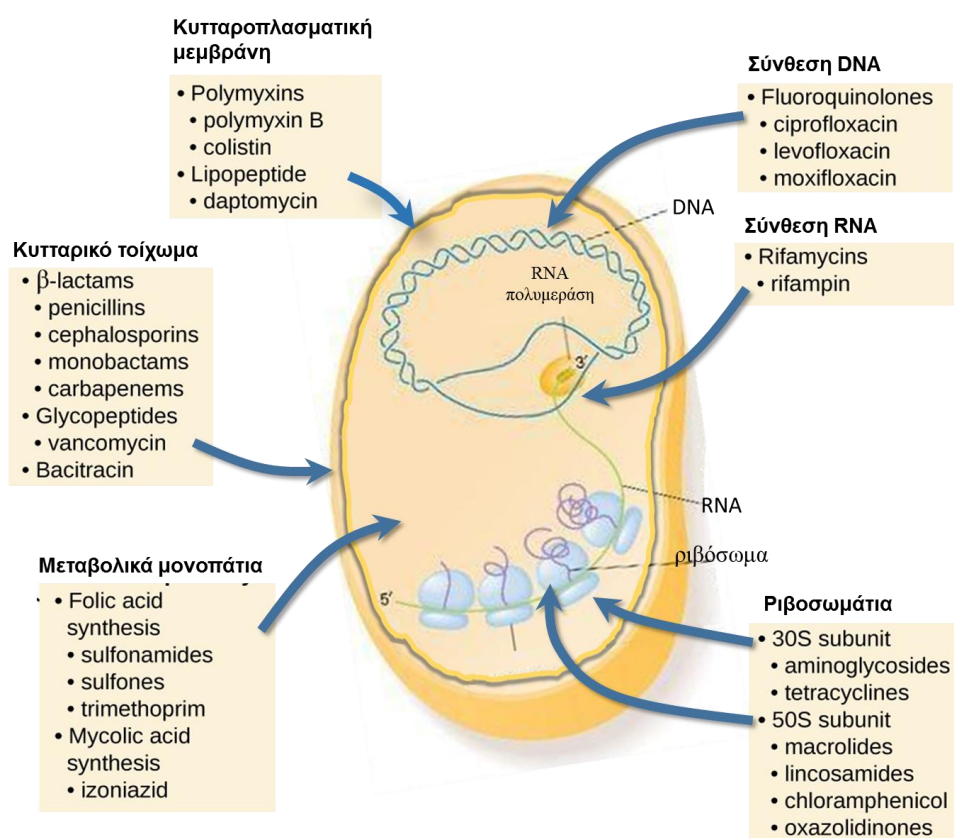
Η συχνότητα τους σε έναν ως επί τω πλείστο ευαίσθητο πληθυσμό είναι διαφορετική για διαφορετικά είδη και διαφορετικά αντιβιοτικά και κυμαίνεται μεταξύ 1 σε 10^7 έως 10^{10} ευαίσθητα κύτταρα. Εάν ένας μικροβιακός πληθυσμός που περιλαμβάνει ανθεκτικούς μεταλλάκτες εκτεθεί σε ανασταλτικές συγκεντρώσεις ενός αντιβιοτικού, η ανάπτυξη των ευαίσθητων κυττάρων σταματά ενώ οι ανθεκτικοί μεταλλάκτες συνεχίζουν να πολλαπλασιάζονται τόσο ώστε τελικώς όλος ο πληθυσμός να αποτελείται από ανθεκτικά κύτταρα. Έτσι, το αντιβιοτικό μπορεί να δράσει αποτελεσματικά ώστε να επιλέξει ανθεκτικούς μεταλλάκτες και να προωθήσει την ανάπτυξη ενός εξολοκλήρου ανθεκτικού πληθυσμού. Αυτό το φαινόμενο, το οποίο μπορεί εύκολα να παρατηρηθεί στο εργαστήριο, συμβαίνει επίσης και στο περιβάλλον. Σε ένα πληθυσμό από ανθεκτικούς μεταλλάκτες ο σχηματισμός ευαίσθητων κυττάρων μπορεί να συμβεί με «αντιστροφή» της μετάλλαξης και επαναφορά σε φυσιολογικά ευαίσθητα στελέχη. Συχνά, απουσία αντιβιοτικού, ο ρυθμός της ανάπτυξης ευαίσθητων κυττάρων είναι μεγαλύτερος από εκείνον των ανθεκτικών μεταλλακτών και, έτσι, μακροχρόνια, απουσία του αντιβιοτικού, ο πληθυσμός επιστρέφει πίσω στην κατάσταση ευαισθησίας.

Όταν ένας μικροοργανισμός είναι ανθεκτικός σε ένα ή περισσότερα αντιβιοτικά (συνήθως σχετιζόμενα δομικά), λέγεται πως έχει διασταυρούμενη αντίσταση σε αυτά. Έχει διαπιστωθεί ότι τα βακτήρια είναι ικανά να μεταφέρουν την ιδιότητα της ανοχής σε ορισμένα αντιβιοτικά σε άλλα βακτήρια του ίδιου είδους και ακόμη και διαφορετικού είδους. Αυτή η μεταφορά είναι μέρος του πιο γενικού φαινομένου της ανταλλαγής γονιδιακού υλικού από έναν μικροοργανισμό στον άλλο. Ως αποτέλεσμα, με την παρουσία ενός ανθεκτικού κυττάρου, ένας μικροβιακός πληθυσμός μπορεί να γίνει γρηγορότερα ανθεκτικός σε ένα αντιβιοτικό. Αυτό είναι γνωστό ως μεταδιδόμενη αντίσταση.

1.5.1 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ

Τα αντιβιοτικά σταματούν την ανάπτυξη ευαίσθητων μικροοργανισμών μπλοκάροντας τον λειτουργικό ρόλο ενός βιομορίου, όπως ενός ενζύμου ή ενός

νουκλεϊκού οξέος, απαραίτητου για τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Σε μοριακό επίπεδο σημαίνει ότι το αντιβιοτικό μόριο είναι ικανό να συνδεθεί σε ένα συγκεκριμένο σημείο του μακρομορίου-στόχου, σχηματίζοντας ένα μοριακό σύμπλοκο, το οποίο δεν είναι πια ικανό να επιτύχει την αρχική του λειτουργία. Για να καθορίσει κάποιος τον μηχανισμό δράσης ενός αντιβιοτικού, πρέπει να καθορίσει τον μακρομόριο-στόχο και την λειτουργικότητά του. Είναι συνήθως ευκολότερο να αναγνωρίσεις βιοχημικό μονοπάτι που παρεμποδίζεται, απ'ότι το συγκεκριμένο μακρομόριο που συμμετέχει στο μονοπάτι αυτό και αποτελεί το φαρμακευτικό στόχο του αντιβιοτικού. Γιαυτό το λόγο μιλάμε για αντιβιοτικά που επιδρούν στο κυτταρικό τοίχωμα ή την κυτταρική μεμβράνη, την σύνθεση του RNA και τον πολλαπλασιασμό του DNA [Εικόνα 1]. Για παράδειγμα, αντιβιοτικά που δρουν ως αντιμεταβολίτες είναι δομικά όμοια με του φυσικούς μεταβολίτες, όπως αμινοξέα ή συνένζυμα και μπορούν να προσδεθούν στο ένζυμο για το οποίο ο μεταβολίτης αποτελεί υπόστρωμα ή συνένζυμο προκαλώντας την απενεργοποίησή του.



Εικόνα 1. Κατηγορίες αντιβιοτικών ανάλογα με το μηχανισμό δράσης

1.6 Η ΧΡΗΣΗ ΤΩΝ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ ΣΤΗΝ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ

Η χημειοθεραπεία, ή αλλιώς η φαρμακευτική θεραπεία των λοιμωδών ασθενειών, στηρίζεται στην ικανότητα των αντιβιοτικών να αναστείλουν τον πολλαπλασιασμό του λοιμογόνου μικροοργανισμού. Αυτή η αναστολή διευκολύνει τη δράση του ανοσοποιητικού συστήματος του ασθενούς να αντιμετωπίσει τη λοίμωξη. Παρά το γεγονός ότι υπάρχει πλειάδα ουσιών που φέρουν αντιβιοτική δράση, μόνο λίγες από αυτές έχουν τα απαραίτητα χαρακτηριστικά που επιτρέπουν την κλινική χρήση, τα οποία είναι τα παρακάτω:

1. *Δράση έναντι ενός ή περισσότερων παθογόνων μικροοργανισμών.* Είναι γενικά επιθυμητό ένα αντιβιοτικό ευρέως ή περιορισμένου φάσματος να έχει μικρή τάση να προκαλέσει αντίσταση. Επιθυμητό, αν και όχι απαραίτητο, είναι να έχει βακτηριοκτόνο δράση.
2. *Καλή απορρόφηση και διανομή.* Για να είναι αποτελεσματικό, ένα αντιβιοτικό πρέπει να απορροφάται, να φτάνει στο σημείο της λοίμωξης, και να παραμένει σε ανασταλτικές συγκεντρώσεις για επαρκή χρόνο. Πρέπει να απομακρύνεται από το σώμα σε λογικό χρονικό διάστημα ώστε να αποφεύγεται η συγκέντρωσή του και η πρόκληση πιθανών τοξικών συνεπειών.
3. *Έλλειψη τοξικότητας.* Το αντιβιοτικό πρέπει να μην εμφανίζει τοξικότητα. Σοβαρές δυσμενείς αντιδράσεις είναι ανεκτές μόνο εάν το αντιβιοτικό χρησιμοποιηθεί σε ασθένειες που είναι πολύ σοβαρές ή πιθανώς θανατηφόρες.

Σε σχετικά περίπλοκα μόρια όπως τα αντιβιοτικά, κάποια δομικά συστατικά ή χημικές ομάδες συμμετέχουν άμεσα στον σχηματισμό του συμπλόκου με τον μακρομοριακό στόχο, ενώ άλλα δομικά συστατικά ή ομάδες δε συμμετέχουν άμεσα στο σχηματισμό του συμπλόκου, και για αυτό, μπορούν να τροποποιηθούν χημικά χωρίς να τροποποιηθεί ουσιαστικά η δράση του αντιβιοτικού. Μέσω τέτοιων αλλαγών, κάποιος δύναται να τροποποιήσει φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του μορίου, όπως την υδατοδιαλυτότητα ή λιποδιαλυτότητά του. Τα χαρακτηριστικά αυτά επηρεάζουν την απορροφησιμότητα, το μεταβολισμό και γενικά τη φαρμακοκινητική του μορίου. Αυτές ή παρόμοιες ιδιότητες μπορούν επίσης να επηρεάσουν το φάσμα

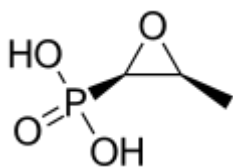
δράσης του μορίου, λόγω του ότι επηρεάζουν την ικανότητα του αντιβιοτικού να εισχωρήσει μέσα στο κύτταρο. Μέσω της χημικής τροποποίησης, μπορούν να παραχθούν προϊόντα που είναι δραστικά ενάντια σε μεταλλάκτες με αντίσταση στα αντιβιοτικά[4].

1.7 ΤΥΠΟΙ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ

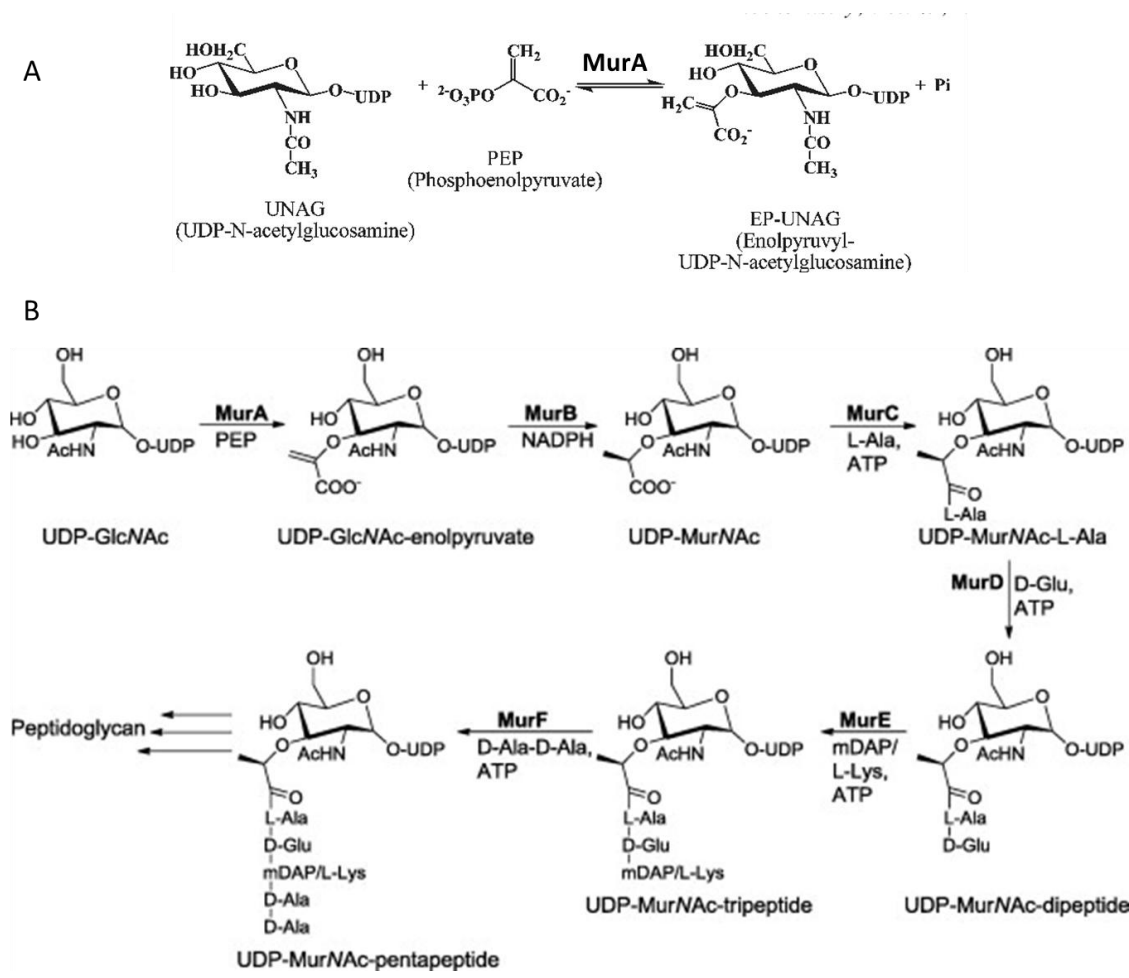
I. Αντιβιοτικά που αναστέλλουν τη βιοσύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος.

Η σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος πραγματοποιείται σε 3 στάδια: το κυτταροπλασματικό στάδιο, το μεμβρανικό στάδιο και αυτό του κυτταρικού τοιχώματος. Έτσι, υπάρχουν αντιβιοτικά που στοχεύουν το κάθε ένα από αυτά τα στάδια της σύνθεσης του κυτταρικού τοιχώματος:

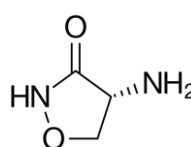
Παράδειγμα αντιβιοτικού που στοχεύει στην κυτταροπλασματική φάση είναι η φωσφομυκίνη, ένα αντιβιοτικό ευρέως φάσματος το οποίο παράγεται από κάποιους Στρεπτομύκητες.



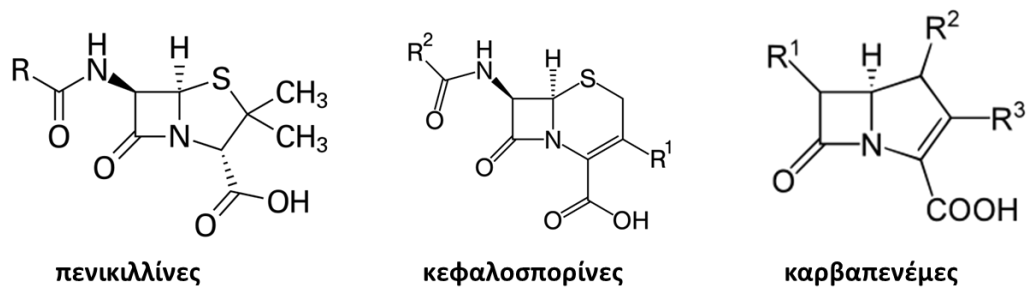
Η φωσφομυκίνη αναστέλλει τη δημιουργία του βακτηριακού τοιχώματος απενεργοποιώντας το ένζυμο UDP-N-ακετυλγλυκοσαμινο-3-ενολπυρουβυλο-τρανσφεράση (UDP-N-acetylglucosamine-3-enolpyruvyl transferase, MurA) [Εικόνα 2]. Με τη δράση του ενζύμου γίνεται η σύνδεση στη γλυκοζαμίνη ενός μορίου πυρουβικού που θα αποτελέσει τη γέφυρα για τη σύνδεση στη συνέχεια του πεπτιδικού τμήματος της πεπτιδογλυκάνης[5]. Η φωσφομυκίνη αναστέλει MurA προκαλώντας την ακυλώση της κυστεΐνης του ενεργού κέντρου του ενζύμου (Cys 115 στη MurA του E.Coli) .



Εικόνα 2. Α. Αντίδραση που καταλύεται από την MurA. Β. Αντιδράσεις που καταλύονται από τα ένζυμα MurA έως MurF και αποτελούν τμήμα του μηχανισμού βιοσύνθεσης των πρωτεογλυκανών του κυτταρικού τοιχώματος.

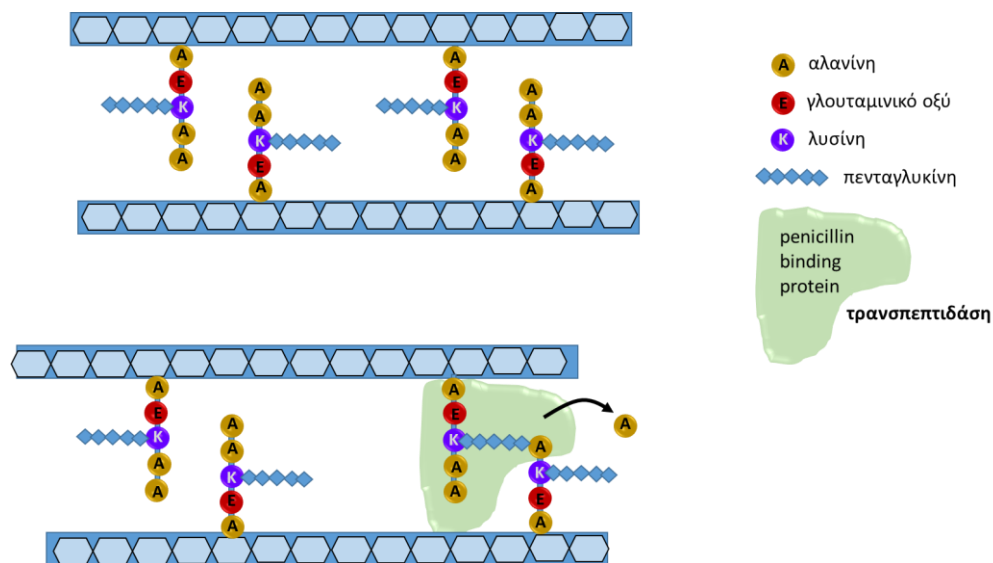

 Η D-Κυκλοσερίνη είναι ένα αντιβιοτικό το οποίο αναστέλλει την δράση δύο ενζύμων, της ρακεμάσης αλανίνης [6] και την D-ala-D-ala συνθετάσης [7], δρώντας και πάλι στην κυτταροπλασματική φάση της βιοσύνθεσης του βακτηριακού τοιχώματος. Σημειώνεται ότι το πεπτιδικό μέρος των πεπτιδογλυκανών του βακτηριακού τοιχώματος αποτελείται από συνδυασμό L και D αμινοξέων όπως η D-αλανίνη που αποτελεί το ακραίο αμινοξύ του πεπτιδίου. Επομένως, η μετατροπή της L-αλανίνης σε D-αλανίνη και η σύνδεση της D-αλανίνης με τη δράση κατάλληλων ενζύμων είναι ζωτικής σημασίας για τα βακτήρια.

Στα αντιβιοτικά που στοχεύουν στη φάση σύνθεσης/ανασύνθεσης του κυτταρικού τοιχώματος ανήκουν τα λακταμικά αντιβιοτικά [Σχήμα 3].



Σχήμα 3. Βασική δομή β-λακταμικών αντιβιοτικών

Η πενικιλίνη G είναι το πρώτο αντιβιοτικό αυτής της κατηγορίας που ανακαλύφθηκε. Η πενικιλίνη αναστέλλει τη δράση του ενζύμου τρανσπεπτιδάση, το οποίο παίζει σημαντικό ρόλο στην δημιουργία διασταυρούμενων συνδέσεων μεταξύ σειρών πεπτιδογλυκανών [Σχήμα 4].



Σχήμα 4. Δημιουργία συνδέσεων μεταξύ πεπτιδογλυκανών με τη δράση της τρανσπεπτιδάσης, γνωστής αλλιώς και ως penicillin binding protein.

Η αναδόμηση του κυτταρικού τοιχώματος είναι μια συνεχής διαδικασία που πραγματοποιούν τα βακτήρια κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης και της διαίρεσής τους. Η αναστολή του ενζύμου τρανσπεπτιδάση [8] από τα β-λακταμικά αντιβιοτικά όπως η πενικιλίνη έχει ως αποτέλεσμα την διαταραχή της ισορροπίας των δράσεων

σύνθεσης – διάσπασης του κυτταρικού τοιχώματος υπέρ της διάσπασης με αποτέλεσμα την εξασθένιση του κυτταρικού τοιχώματος και την λύση του βακτηρίου.

Στις πενικιλίνες ανήκουν **φυσικές πενικιλίνες** όπως η **πενικιλίνη G** (ενδοφλέβια, ενδομυϊκή χρήση) και **πενικιλίνη V** (από του στόματος χρήση) που διαφέρουν μεταξύ άλλων στην καταλληλότητά τους για ενδοφλέβια ή από του στόματος χρήση αλλά και συνθετικά ή ημισυνθετικά μόρια.

Στις κατηγορίες των πενικιλινών ανήκουν **καρβοξυπενικιλίνες** όπως οι **καρβενικιλίνη** και **τιρκακιλίνη** στο μόριο των οποίων περιέχεται καρβοξυλική ομάδα και οι **αμινοπενικιλίνες** όπως η **αμπικιλίνη**, **αμοξικιλίνη** κλπ. που στο μόριό τους περιέχεται αμινομάδα. Η αμινομάδα πιστεύεται ότι βοηθάει στην εισαγωγή των αντιβιοτικών διαμέσω των πόρων της εξωτερικής μεμβράνης των gram-αρνητικών μικροοργανισμών.

Σημαντική κατηγορία πενικιλινών αποτελούν αυτά που παρουσιάζουν **αντίσταση στη β-λακταμάση**. Η β-λακταμάση είναι ένα ένζυμο που παράγεται από μικροοργανισμούς που παρουσιάζουν αντίσταση στα λακταμικά αντιβιοτικά. Η β-λακταμάση καταλύει τη διάσπαση του λακταμικού δακτυλίου και την απενεργοποίηση των λακταμικών αντιβιοτικών. Στα λακταμικά αντιβιοτικά με αντίσταση στη β-λακταμάση ανήκουν η οξακιλίνη (bactocill), κλοξακιλίνη (Cloxapen), φλουκλοξακιλίνη κλπ.

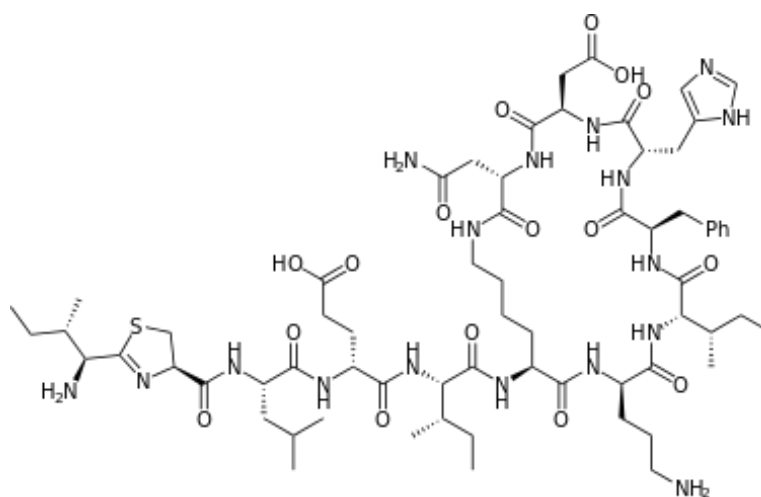
Στην κατηγορία των λακταμικών αντιβιοτικών με ανάλογο μηχανισμό δράσης με τις πενικιλίνες ανήκουν οι **κεφαλοσπορίνες**[9] που μπορούν να χορηγηθούν σε άτομα ανθεκτικά στις πενικιλίνες και οι **καρβαπενέμες**[10]

Για την χρήση β-λακταμικών αντιβιοτικών σε στελέχη που παράγουν την β-λακταμάση, έχουν αναπτυχθεί **αναστολείς β-λακταμασών** όπως το **κλαβουλινικό οξύ**, η **σουλβακτάμη** και η **ταζοβακτάμη** που χορηγούνται μαζί με τα λακταμικά αντιβιοτικά.

Στην **αναστολή της δημιουργίας διαμοριακών συνδέσεων μεταξύ των πεπτιδογλυκανών** στοχεύει επίσης η **βανκομυκίνη**. Πρόκειται για κυκλικό

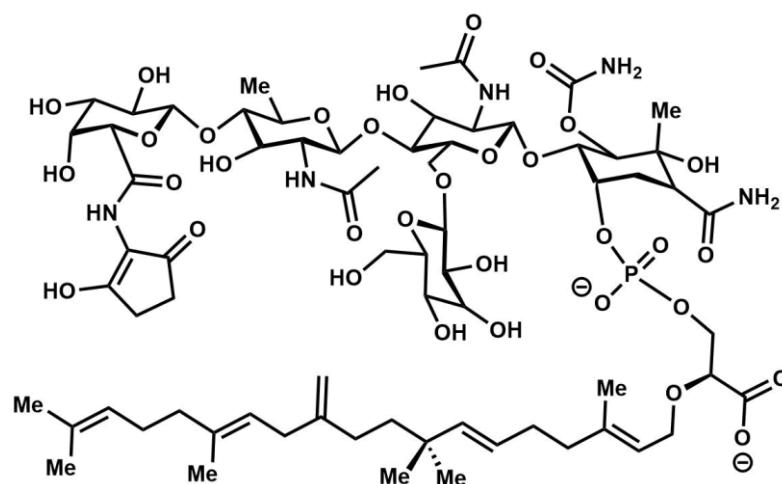
πολυπεπτίδιο που συμπλέκεται με τα ολιγοπεπτιδια των πεπτιδογλυκανών εμποδίζοντας τη μεταξύ τους σύνδεση. Τα ανθεκτικά στο αντιβιοτικό στελέχη αντικαθιστούν την τελική αλανίνη με γαλακτικό εμποδίζοντας τη συμπλοκοποίηση με το αντιβιοτικό [11].

Μεταξύ των **αντιβιοτικών που στοχεύουν στο κυτταρικό τοίχωμα** είναι και η **βακιτρακίνη**. Πρόκειται για μίγμα κυκλικών πολυπεπτιδίων που παράγονται από τον την ομάδα licheniformis του μικροοργανισμού *Bacillus subtilis var*Tracy. **Διακόπτει τη μεταφορά πρωτεογλυκανών που είναι απαραίτητες για το σχηματισμό του κυτταρικού τοιχώματος έξω από την κυτταρική μεμβράνη** εμποδίζοντας την αποφωσφορύλωση του C₅₅-isoprenyl pyrophosphate ανάλογων μορίων που γενικά είναι γνωστά ως βακτοφαινολπυροφωσφορικά [12].



Σχήμα 5. Βακιτρακίνη

Τα αντιβιοτικά της οικογένειας της **μενομοκίνης** στοχεύουν επίσης στην **αναστολή σχηματισμού του κυτταρικού τοιχώματος** [13][Σχήμα 6] αν και η δομή τους διαφέρει σημαντικά από των προηγούμενων. Τα ένζυμα στόχοι των ενώσεων αυτών είναι οι γλυκοζυλτρανσφεράσες των πεπτιδογλυκανών.

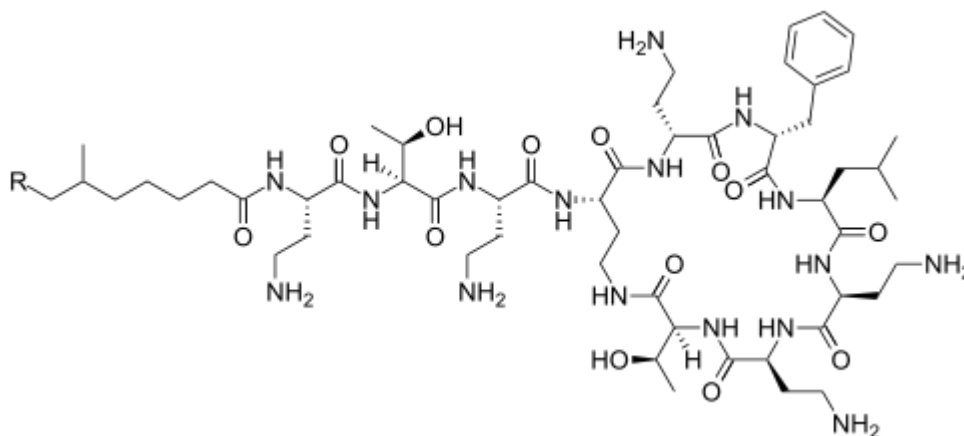


Σχήμα 6. Δομή της moenomycin A

II. Αντιβιοτικά που στοχεύουν στην αποδιάταξη της εξωτερικής και εσωτερικής κυτταρικής μεμβράνης.

Στα αντιβιοτικά που στοχεύουν στην αποδιάταξη της εξωτερικής και εσωτερικής κυτταρικής μεμβράνης ανήκουν πεπτίδια (AMPs) [14,15], Βακτρακίνη, Γραμισιδίνη (A, B και C), Γραμισιδίνη S, Τυροσιδίνη, Πολυμυξίνη (A-E) [Σχήμα 7], Κολιστίνη, Δαπτομυκίνη, Ντεφενσίνες, Μαγενίνες, Βακτηριοκίνες (κολισίνη), Νισίνη (λαντιβιοτικό - κλάσης I βακτηριοκίνη).

Οι πολυμυξίνες πιστεύεται ότι εισέρχονται μεταξύ των φωσφολιπιδίων της μεμβράνης προκαλώντας την αποδιάταξή τους.

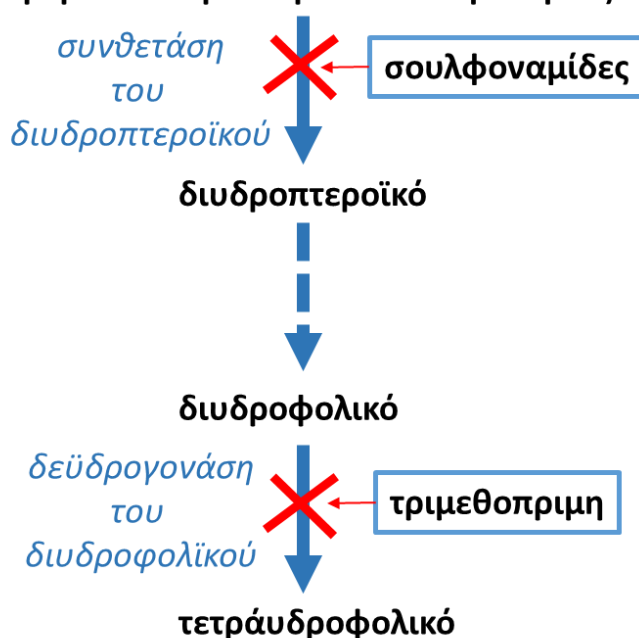


Σχήμα 7. Polymyxin B[16]

III. Αντιμεταβολίτες

Ως αντιμεταβολίτες θεωρούνται τα αντιβιοτικά που **αναστέλουν τη σύνθεση του τετραϋδροφολικού** [Σχήμα 8] ή του **μουκολικού οξέος**. Το δετραϋδροφολικό είναι απαραίτητο για τη σύνθεση του θυμιδικού που είναι απαραίτητο για τη σύνθεση νουκλεϊνικού οξέος. Οι σουλφοναμίδες αναστέλουν τη συνθετάση του διϋδροπτεροϊκού ενώ η τριμεθοπρίμη και η μεθοτρεξάτη αναστέλουν την δεϋδρογονάση του διϋδροφολικού, δύο από τα ένζυμα του μηχανισμού βιοσύνθεσης του φολικού οξέος [17,18].

Διφωσφορικό διϋδροπτεροϊκό + π-αμινο βενζοϊκό οξύ (PABA)

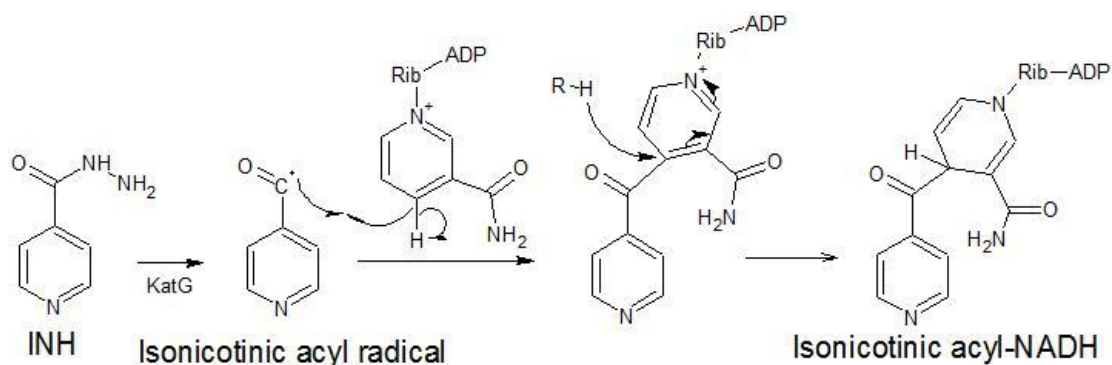


Σχήμα 8. Αντιβιοτικά που δρουν ως αναστολείς της βιοσύνθεσης του τετραϋδροφολικού.

Άλλα αντιβιοτικά που δρουν ως αναστολείς της σύνθεσης του φολικού είναι η τριμετρεξάτη, κυκλογουανίλη, πυριμεθαμίνη, διαμινοδιφαινυλοσουλφόνη, παρα-αμινοσαλκυλικό οξύ κλπ.

Το μυκολικό οξύ είναι συστατικό του κυτταρικού τοιχώματος μιας ομάδας βακτηριδίων της *mycolata taxon* στα οποία ανήκει και το μυκοβακτηρίδιο της φοιματίωσης.

Το **ισονιαζίδιο**, που χρησιμοποιείται για την αντιμετώπιση της φοιματώσης είναι ένα προφάρμακο [19]. Στο εσωτερικό του μυκοβακτηριδίου μετατρέπεται από μια καταλάση του βακτηριδίου σε ελεύθερη ρίζα η οποία ορισμένες φορές αντιδρά με NADH για να δώσει σε νικοτινούλο-NAD. Το μόριο αυτό συμπλέκεται με το ένζυμο αναγωγή της ενοΐλ-ακυλοφέρουσας πρωτεΐνης που είναι βασικό ένζυμο για τη βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων του μυκοβακτηριδίου, μεταξύ των οποίων και του μυκολικού οξέος.



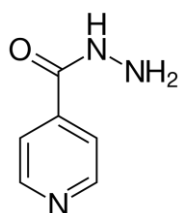
IV. Αντιβιοτικά που δρουν στο DNA

Υπάρχουν διάφορα αρωματικά μόρια που μπορούν να εισχωρήσουν ανάμεσα στις δύο έλικες του DNA, στο σημείο που γίνεται η σύνδεση των βάσεων, και είναι γνωστά ως “ παρεμβολητές “. Η δομή τους είναι τέτοια που αποτελούνται από επίπεδα αρωματικά μόρια και περιέχουν τρεις δακτυλίους. Αυτά είναι:

1. Ακριδίνη
2. Προφλαβίνη
3. Ακριφλαβίνη

Ακόμη, έχουν δημιουργηθεί νιτροετεροκυκλικές αρωματικές ενώσεις οι οποίες ανοίγουν το DNA αποτρέποντας την αντιγραφή και κατά συνέπεια την σύνθεση νέου DNA.

Δύο τύποι αντιβιοτικών που ανήκουν σε αυτήν την κατηγορία είναι οι νιτροϊμιδαζόλες και τα νιτροφουράνια:



1. Νιτροϊμιδαζόλες:

- Αζομυκίνη
- Μετρονιδαζόλη

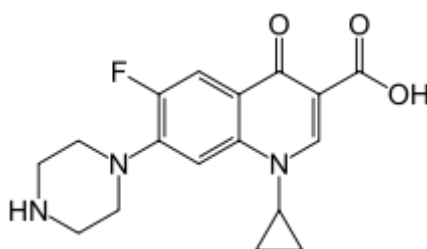
- Τινιδαζόλη
- Νιμοραζόλη

2. Νιτροφουράνια:

- Νιτροφουραντοΐνη
- Νιτροφουραζόνη
- Φουραλταδόνη
- Φουραζολιδόνη

Στα αντιβιοτικά που δρουν στο DNA ανήκουν οι **κινολόνες**. Οι κινολόνες **αναστέλουν τη γυράση και την τοποϊσομεράση IV**, εμποδίζοντας έτσι τις **διαδικασίες αντιγραφής και μεταγραφής** [20].

Στις κινολόνες ανήκουν οι εξής: 1^{ης} γενιάς: flumequine (Flubactin) (veterinary use), oxolinic acid (Uroxin), rosoxacin (Eradacil), 2^{ης} γενιάς (ευρύτερου φάσματος): ciprofloxacin (Zoxan, Ciprobay, Cipro, Ciproxin), fleroxacin (Megalone, Roquinol), lomefloxacin (Maxaquin), nadifloxacin (Acuatim, Nadoxin, Nadixa), norfloxacin (Lexinor, Noroxin, Quinabic, Janacin), ofloxacin (Floxin, Oxaldin, Tarivid), pefloxacin (Peflacin), rufloxacin (Uroflox), 3^{ης} γενιάς (δραστικά έναντι στρεπτόκοκκων) balofloxacin (Baloxin), grepafloxacin (Raxar), levofloxacin (Cravit, Levaquin, pazufloxacin (Pasil, Pazucross), sparfloxacin (Zagam), temafloxacin (Omniflox) κλπ.



Σχήμα 9 . Δομή ciprofloxacin

Αναστολείς σύνθεσης RNA

Αντιβιοτικά με στόχο την αναστολή της σύνθεσης του RNA είναι και οι ριφαμυκίνες που αποτελούν μία ομάδα χημικών ενώσεων οι οποίες αποτρέπουν την

σύνθεση RNA μέσω σύνδεσης με την RNA πολυμεράση, δηλαδή το ένζυμο το οποίο καταλύει την διαδικασία της μεταγραφής. Καταφέρνουν, έτσι, με την άμεση παρεμπόδιση της β-υποομάδας της RNA πολυμεράσης να αναστέλλουν την σύνθεση του RNA, φράζοντας το πέρασμα του καθώς επιμηκύνεται, όταν φτάσει να είναι από δύο με τρία νουκλεοτίδια σε μήκος. Τέτοια αντιβιοτικά είναι οι εξής:

1. Ακτινομυκίνη D (Δακτινομυκίνη)
2. Ριφαμικίνη (Ριφαμπίνη)
3. Φιδαξομικίνη

Αναστολείς πρωτεϊνοσύνθεσης

Στους αναστολείς πρωτεϊνοσύνθεσης ανήκουν αντιβιοτικά που συνδέονται με την 30S υπομονάδα των ριβοσωματίων όπως οι αμινογλυκοσίδες και οι τετρακυκλίνες και μόρια τα οποία συνδέονται με την 50S υπομονάδα όπως η χλωραμφενικόλη, τα μακρολίδια, οι οξαζολιδινόνες, λινκοζαμίδια κλπ:

1. Αμινογλυκοσίδες:

- Καναμυκίνη
- Γενταμυκίνη
- Αμικασίνη
- Τοβραμυκίνη
- Παρομομυκίνη
- Νεομυκίνη

2. Τετρακυκλίνες:

- Οξυτετρακυκλίνη
- Δοξυκυκλίνη
- Τιγηκυκλίνη

2. Χλωραμφενικόλη

3. Μακρολίδια

4. Οξαζολιδινόνες

5. Λινκοζαμίδια

Συχνά επειδή οι τύποι αντιβιοτικών των μακρολιδών, λινκοσαμιδίων και σπρεπτογραμμινών έχουν κοινή δράση αναστολής της πρωτεϊνοσύνθεσης με πρόσδεση στο 50S ριβόσωμα, αυτό έχει ως συνέπεια να ομαδοποιούνται και να χρησιμοποιούνται μαζί.

Άλλοι αναστολείς της πρωτεϊνοσύνθεσης με ασυνήθιστο μηχανισμό δράσης είναι οι παρακάτω:

- Θερμορουμπίνη
- Φουσιδικό οξύ
- Μουπιροσίνη
- Ακτινονίνη
- Αναστολείς της αμινοπεπτιδάσης μεθειονίνης (φουμαγγιλίνη, TNP-470 και Beloranib)

Διάφοροι χημικοί παράγοντες που επηρεάζουν την κυτταρική μεμβράνη

Η διατήρηση της σωστής δομής της κυτταρικής μεμβράνης είναι ζωτικής σημασίας για την επιβίωση των μικροοργανισμών. Οποιαδήποτε παρέμβαση από χημικούς παράγοντες που διαταράσσει τη δομή της μεμβράνης μπορεί να είναι τοξική για το κύτταρο. Ακόμη και η πιο μικρή διαταραχή μπορεί να κάνει τη μεμβράνη πιο διαπερατή και κατά συνέπεια να διαταράξει τις ποικίλες διαβαθμίσεις συγκεντρώσεων ουσιών που διέρχονται και εξέρχονται μέσω των πόρων της μεμβράνης, και κυρίως τη διαβάθμιση πρωτονίων που χωρίς την εύρυθμη λειτουργία της τα κύτταρα αδυνατούν να παράγουν ATP, με αποτέλεσμα να πεθάνουν. Βάση του τρόπου που χρησιμοποιούνται αυτοί οι χημικοί παράγοντες μπορούν να κατηγοριοποιηθούν είτε ως αντισηπτικά και απολυμαντικά είτε ως αντιβιοτικά.

Μερικά από αυτά τα αντισηπτικά και απολυμαντικά είναι τα εξής:

- Ισοπροπανόλη
- Αιθανόλη
- Φαινόλη

- Εξαγλωροφαίνη
- Τρικλοσάν
- Χλωρεξιδίνη

Αντιμυκητιακά

Η κύρια διαφορά των κυτταρικών μεμβρανών των μυκήτων σε σύγκριση με αυτή των θηλαστικών είναι η ύπαρξη χοληστερόλης σε αυτές των θηλαστικών και εργοστερόλης σε αυτές των μυκήτων. Επομένως, η εργοστερόλη αποτελεί φαρμακευτικό στόχο των αντιβιοτικών με αντιμυκητιασική δράση.

Υπάρχουν διάφορες κλάσεις αντιμυκητιασικών φαρμάκων με πιο κύρια τα **πολυένια** (αμφοτερικίνη Β και νυστατίνη) που προσδένονται στην εργοστερόλη, τα **αζόλια** (αζόλες) που χωρίζονται στις **ιμιδαζόλια** (ιμιδαζόλες: μικοναζόλη, κετοконаζόλη και κλοτριμαζόλη) και στις **τριαζόλια** (τριαζόλες: ιτρακοναζόλη και φλουκοναζόλη) που λειτουργούν αναστέλλοντας το ένζυμο 14-α διμεθυλάση του κυτοχρώματος P-450 παρεμβαίνοντας έτσι στη βιοσύνθεση της εργοστερόλης. Ακόμη έχουμε τις **αλλυλαμίνες** (τερβιναφίνη και ναφτιφίνη) οι οποίες αναστέλλουν την μονοοξυγενάση του σκουαλενίου και κατ'επέκταση τη σύνθεση της εργοστερόλης, μα και την **αμορολφίνη** η οποία υπάγεται στην κλάση των μορφολινών που παρεμβαίνουν και αναστέλλουν το ίδιο μεταβολικό μονοπάτι όπως οι αλλυλαμίνες αλλά σε μετέπειτα στάδιο.

Μία άλλη αντιβιοτική, αντιμυκητιασική ουσία η οποία έχει ως στόχο το κυτταρικό τοίχωμα είναι η **εχινοκανδίνη** που έχει ως ικανότητα να αναστέλλει το ένζυμο β-(1→3) συνθετάση της γλυκάνης, ένζυμο που θεωρείται ως εξαιρετικά απαραίτητο για την σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος. Τέλος, υπάρχει και η **φλουκυτοσίνη**, η οποία συγκαταλέγεται ανάμεσα στους πιο παλιούς αντιμυκητικούς παράγοντες. Η φλουκυτοσίδη μεταβολίζεται σε 5-φθοριοουρακίλη και δρά ως αντιμεταβολίτης, αποτρέποντας την πρόσληψη πουρινών και πυριμιδινών κατά τη βιοσύνθεση του DNA και RNA.

Αντι-ικα

Οι ιοί δεν θεωρούνται ζωντανοί οργανισμοί, αλλά εκμεταλλεύονται τα ένζυμα και τους μεταβολίτες που υπάρχουν στα κύτταρα-ξενιστές ώστε να πολλαπλασιαστούν.

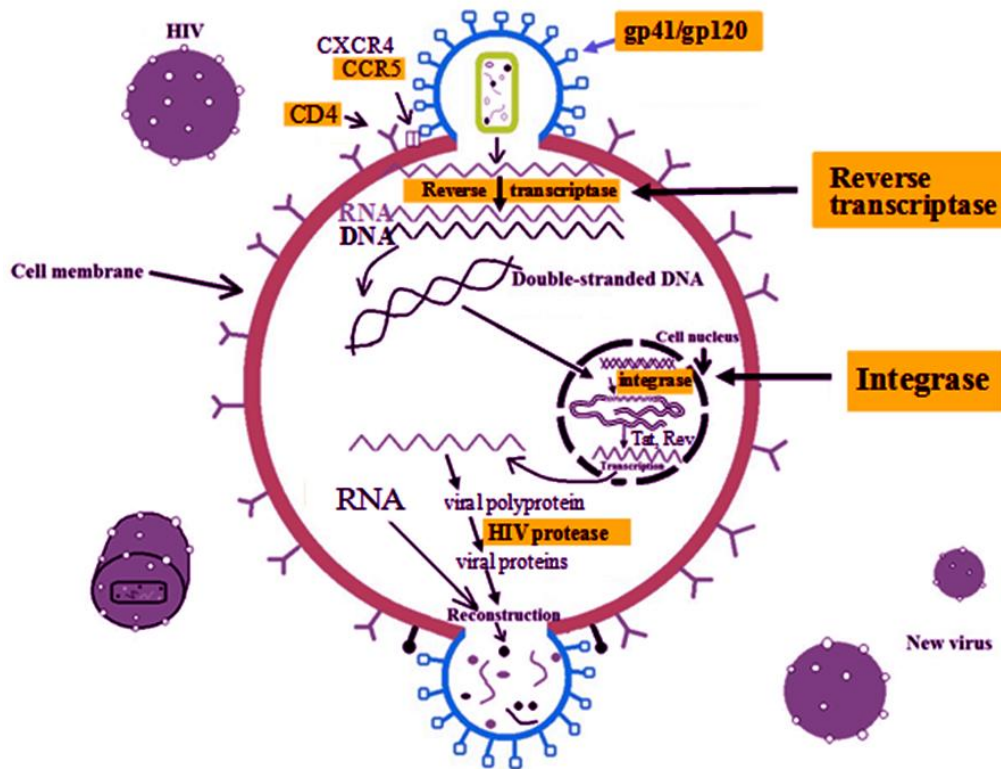
Λαμβάνοντας υπόψιν πως ένας αντιϊικός παράγοντας δεν πρέπει να έχει ως στόχο τις πρωτεΐνες του ξενιστή, ένα ιδανικό αντιϊκό φάρμακο θα έχει ως στόχο την παρεμπόδιση της προσκόλλησης του ιού στα κύτταρα του ξενιστή, τα ικά ένζυμα ή την δημιουργία και απελευθέρωση των ιικών σωματιδίων.

Κάποια από τα πιο σημαντικά αντι-ικά φάρμακα είναι η **ενφουβιρίδη** (εμπορική ονομασία Fuzeon) με δράση αναστολής εισόδου του ιού στο κύτταρο ξενιστή, η **αριλδόνη**, η **αμανταδίνη** και η **ριμανταδίνη** που δρουν έναντι του ιού της **γρίπης** (ινφλουέτζα) και το **πλεκοναρίλ** που ως ενδορρηνικό αντιϊκό εκνέφωμα-φάρμακο δρά έναντι των **ρινοϊών** αναχαιτίζοντας την απέκδυση του ιού. Επιπλέον, υπάρχουν γνωστές συνθέσεις φαρμάκων που αποτρέπουν την προσθήκη νουκλεοτιδίων στο DNA και RNA των ιών. Το πρώτο επιτυχημένο εγκεκριμένο φάρμακο, η **ακυκλοβίρη**, είναι αποτελεσματικό έναντι του **ερπετοϊού**, με το επόμενο σκεύασμα να είναι η **ζιδοβουδίνη** με δράση κατά του HIV (Human Immunodeficiency Virus), και τέλος την **λαμιβουδίνη** που αναστέλλει την δράση της αντίστροφης μεταγραφάσης και χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με τη ζιδοβουδίνη για την θεραπεία του HIV. Και οι τρεις αυτές ενώσεις λειτουργούν ως προφάρμακα όπου μετά από φωσφορύλιωση, στην τριφωσφορική τους μορφή, λειτουργούν ως υποστρώματα για το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση αποτρέποντας μετέπειτα την σωστή σύνθεση του DNA. Μερικοί άλλοι αναστολείς της αντίστροφης μεταγραφάσης είναι οι εξής: η διδεοξυϊνισίνη, η διδεοξυκυτιδίνη, το d4T (ένα ανάλογο της θυμιδίνης), το ABC (ανάλογο της γουανοσίνης) και ο FTC (ανάλογο της κυτιδίνης). Ενδεικτικά αναφέρεται ότι για την αντιμετώπιση του HIV που αποτελεί RNA ιό, εκτός από πρωτεΐνες του καψιδίου του ιού και υποδοχείς της επιφάνειας του ξενιστή που αποτελούν στόχους των αναστολέων εισόδου, τρία ικά ένζυμα αποτελούν φαρμακευτικούς στόχους και αναστολείς τους κυκλοφορούν στο εμπόριο, η ανάστροφη μεταγραφάση του ιού, η ιντεγκράση και η ική πρωτεάση. Η ιντεγκράση είναι το ένζυμο που ενσωματώνει το δίκλωνο ιικό DNA που έχει συντεθεί στο DNA του κυττάρου ξενιστή ενώ η πρωτεάση είναι ένα ιικό ένζυμο που διασπά το ενιαίο

πρωτεϊνικό μόριο που παράγεται αρχικά κατά την μεταγραφή και μετάφραση του γονιδιώματος του ιού στα επιμέρους μόρια των πρωτεϊνών του ιού.

Ειδικότερα, για την περίπτωση της ανάστροφης μεταγραφάσης (RT) εκτός από τα προφάρμακα που μιμούνται τα νουκλεοτίδια (NRTIs) τα οποία αξιοποιούνται από το ένζυμο για τη βιοσύνθεση του ιικού DNA και αλλοστερικοί αναστολείς του ενζύμου (NNRTIs) έχουν βρεθεί. Επίσης, και άλλου τύπου αναστολείς της RNA-εξαρτώμενης δράσης DNA-πολυμεράσης του ενζύμου, όπως και αναστολείς της δράσης RNάσης Η και της DNA-εξαρτώμενης δράσης DNA-πολυμεράσης του ενζύμου βρίσκονται σε ερευνητικό στάδιο [21]. Η HIV-1 RT είναι ένα ένζυμο με τρία ενεργά κέντρα που επιτελεί διαδοχικά τρεις δράσεις που έχουν ως αποτέλεσμα την παραγωγή ενός δίκλωνου μορίου DNA από το RNA του ιού [Σχήμα 10].

Με την εστίαση της ανάπτυξης αντιϊκών φαρμάκων να έχει πλέον μεταστραφεί στους αναστολείς πρωτεασών επιδεικνύεται η επιτακτική ανάγκη δημιουργίας μιας πολύ περισσότερο αποτελεσματικής τάξης φαρμάκων για την καταπολέμηση των ιϊκών λοιμώξεων. Κάποιοι **αναστολείς πρωτεασών** που έχουν βρεθεί είναι η σακίναβιρη, ριτοναβιρη, ινδιναβιρη, νελφίναβιρη και η αμπρεναβιρη κατά του HIV, μα και η μποκεπρεβιρη, τελαπρεβιρη, και η σιμεπρεβιρη κατά του ιού της Ηπατίτιδας C.



Σχήμα 10. Κύκλος ζωής του HIV. Με κίτρινο επισημαίνονται οι φαρμακευτικοί στόχοι [21].

Σημαντικό στάδιο στον κύκλο ζωής των ιών αποτελεί η έξοδος των ιϊκών σωματιδίων από το κύτταρο του ξενιστή. Το ένζυμο νευραμινιδάση επιτελεί σημαντικό ρόλο στη διαδικασία αυτή. Στον ιό της γρίπης, το ιικό σωματίο περιέχει δύο πρωτεΐνες, την αιμαγλουτινίνη με την οποία προσκολλάται στα σιαλικά οξέα των γλυκολιπιδίων και γλυκοπρωτεϊνών της κυτταρικής μεμβράνης του ξενιστή και την νευραμινιδάση. Η νευραμινιδάση αποκόπτει το σιαλικό οξύ από τις γλυκοπρωτεΐνες του κυττάρου-ξενιστή βοηθώντας και διευκολύνοντας έτσι την απελευθέρωση των ιϊκών σωματιδίων από αυτό ενώ αποκόπτει επίσης το σιαλικό οξύ από τις ιϊκές πρωτεΐνες. Λόγω της σημασίας της στον ιικό κύκλο, η νευραμινιδάση αποτέλεσε στόχο για την ανάπτυξη αντιϊκών φαρμάκων. Δύο φάρμακα που αποτελούν **αναστολείς νευραμινιδάσης** είναι η οσελταμιβίρη (Tamiflu) και η ζαναμιβίρη (Relenza) που δρουν ενάντια στους ιούς της γρίπης.

Στην αντι-ιική θεραπεία έχουν επιστρατευθεί επίσης τα αντι-νοηματικά ολιγονουκλεοτίδια. Ένα αντι-νοηματικό ολιγονουκλεοτίδιο (antisense DNA) το οποίο

είναι συμπληρωματικό κάποιου σημαντικού τμήματος του ιϊκού RNA μπορεί να προσδένεται στο στοχευμένο κομμάτι εμποδίζοντας τη διαδικασία της μετάφρασης. Η φομβιρσένη αποτελεί ένα τέτοιο αντι-νοσηματικό φάρμακο που λειτουργεί αποτελεσματικά έναντι ευκαιριακών λοιμώξεων του ματιού που προκαλούνται από κυτταρομεγαλοϊό, ενώ άλλες θεραπευτικές προσεγγίσεις βρίσκονται σε εξέλιξη [22].

2. ΑΝΟΧΗ ΣΤΗΝ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ

Το φαινόμενο των τελευταίων ετών που χαρακτηρίζεται από την έξαρση κρουσμάτων παθογόνων μικροοργανισμών που μέχρι πρότινος μπορούσαν να αντιμετωπιστούν με τα πιο κοινά αντιβιοτικά, τα οποία πλέον φαίνεται να μην είναι αποτελεσματικά, έχει λάβει πραγματικά μεγάλες διαστάσεις.

Μετά την ανακάλυψη της πενικιλίνης το 1928, και την τεράστια συνεισφορά που είχε ως αντιβιοτικό κατά τη διάρκεια του Δευτέρου Παγκοσμίου Πολέμου, ήρθε σταδιακά η μεταμόρφωση της μοντέρνας ιατρικής με τη σύνθεση νέων β-λακταμικών αντιβιοτικών από τη δεκαετία του 1950, τη μείωση των περιπτώσεων αντιμικροβιακής αντοχής και του επιπολασμού των λοιμώξεων για περισσότερο από μία δεκαετία, μέχρις ότου κάνει την εμφάνιση του ο ανθεκτικός στη μεθικιλίνη *Staphylococcus aureus* (MRSA), το 1962 και το 1968 στο Ηνωμένο Βασίλειο και τις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής αντίστοιχα. Η αντιμετώπιση του MRSA αλλά και του αρνητικού στη κοαγκουλάση σταφυλόκοκκου έγινε με την είσοδο στην αγορά του αντιβιοτικού βανκομυκίνη, το οποίο έδειξε την χρησιμότητα του ως αντιβιοτική ουσία για κάτι λιγότερο από μία εικοσαετία[23].

Εξαιτίας της ραγδαίας εμφάνισης μικροοργανισμών με αντοχή στα αντιβιοτικά, η αποτελεσματικότητα των αντιβιοτικών έχει τεθεί σε πραγματικό κίνδυνο. Μέσω των ποικίλων μεθόδων που τα βακτήρια έχουν αναπτύξει ώστε να εκφράζουν αντοχή, όπως π.χ η κάθετη μεταφορά γονιδίων και η υδρόλυση, μπορούν

και διαφεύγουν της δράσης ακόμη και των πιο σύγχρονων αντιβιοτικών ουσιών. Κάποιες οδηγίες που έχουν προταθεί από το Κέντρο Πρόληψης και Ελέγχου Ασθενειών των Η.Π.Α μπορούν να ακολουθηθούν από τους επαγγελματίες υγείας και τα κατά τόπους κέντρα ιατροφαρμακευτικής περίθαλψης, για να εξομαλυνθεί όσον το δυνατόν η κατάσταση. Οι οδηγίες περιλαμβάνουν την υιοθέτηση προγραμμάτων εποπτείας των χορηγούμενων αντιβιοτικών, τη βελτιστοποίηση των θεραπευτικών σχημάτων, την βελτίωση των πρακτικών διάγνωσης, παρακολούθησης των ασθενών και συνταγογράφησης των φαρμάκων, και την αποτροπή μετάδοσης των λοιμώξεων.

2.1 ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΩΝ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΩΝ ΕΠΟΠΤΕΙΑΣ ΤΩΝ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ

Τα προγράμματα εποπτείας των αντιβιοτικών έχουν ως κύριο στόχο την σωστή διαχείριση των χορηγούμενων αντιβιοτικών από τους ειδικούς ιατρούς έχοντας ως δέσμευση το εκάστοτε αντιβιοτικό να χρησιμοποιείτε μόνο όταν χρήζει ανάγκης και πάντα ακολουθώντας τις κατευθυντήριες γραμμές του επαγγελματία υγείας που παρακολουθεί τον/την ασθενή. Η σημαντικότητα των προγραμμάτων διαχείρισης των αντιβιοτικών αναδεικνύεται, επίσης, από μελέτες [24,25] που έδειξαν πως μπορούν να μειωθούν μέχρι και 51% οι πολυανθεκτικές νοσοκομειακές λοιμώξεις, με τον αριθμό των ανθρώπων που αποκτούν ανθεκτικές λοιμώξεις να μειώνεται ακόμη περισσότερο εάν ακολουθούνται αποτελεσματικά κοινά μέτρα ελέγχου διασποράς παθογόνων μικροοργανισμών, όπως είναι το σωστό πλύσιμο των χεριών. Σημαντικό είναι να αναφέρουμε πως τα οφέλη της σωστής εποπτείας των αντιβιοτικών που χορηγούνται παρατηρήθηκαν και στον Ελλαδικό χώρο. Μετά από την πρώτη μελέτη που έγινε στο Τζάνειο Νοσοκομείο του Πειραιά για την περίοδο 2015-2016, τα αποτελέσματα έδειξαν πως υπήρχε εξοικονόμηση χρημάτων με το ποσό να κυμαίνεται στα 55.000 €, όπως και μείωση των κρουσμάτων εντερόκοκκων ανθεκτικών στην βανκομυκίνη (VRE) από 22.5% το 2015 σε 18.2% το 2016, *K. Pneumoniae*, ανθεκτικού στη κολιστίνη από 31.9% το 2015 σε 22.1% το 2016 και *A. baumannii* ανθεκτικού στη κολιστίνη από 13.8% το 2015 σε 8.1% το 2016. Η εξοικονόμηση ενός τέτοιου ποσού σε ένα μόνο νοσοκομειακό περιβάλλον δείχνει πως τα ΠΕΑ (προγράμματα εποπτείας αντιβιοτικών) μπορούν να συνεισφέρουν

σημαντικά σε οικονομικό επίπεδο σε όλα τα δημόσια -και μη- κέντρα ιατροφαρμακευτικής περίθαλψης της χώρας. Εκτός αυτού, τα εξοικονομούμενα ποσά μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την πρόσληψη μόνιμου ειδικού προσωπικού που θα συνεισφέρει σε μόνιμη βάση στο ΠΕΑ[26].

2.2 ΕΠΙΠΤΩΣΕΙΣ ΤΗΣ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΑΝΤΟΧΗΣ

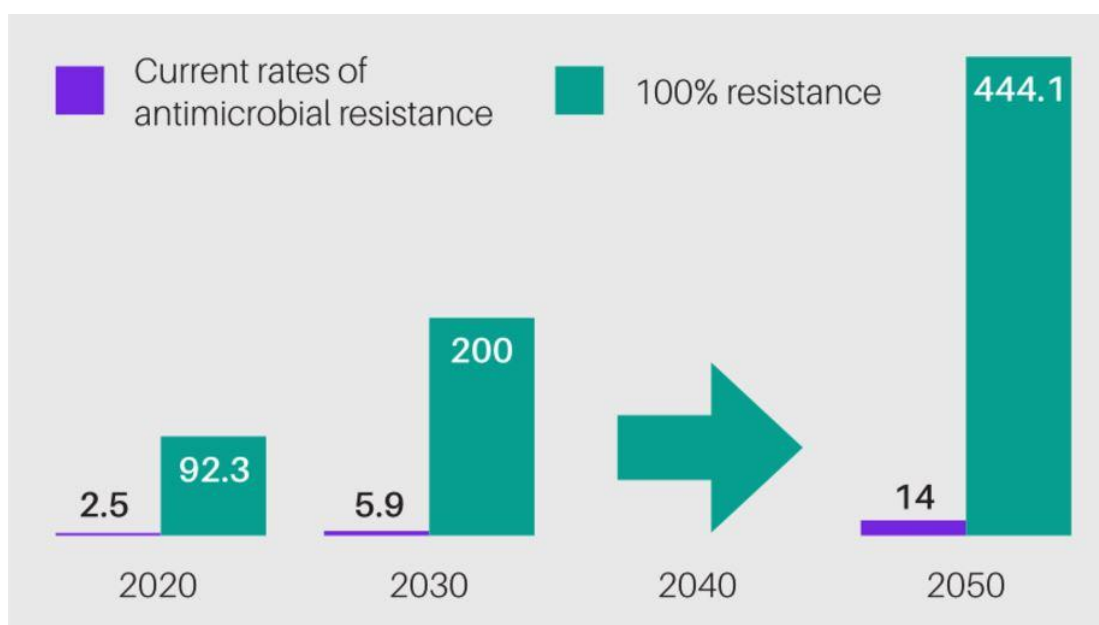
Η αποφυγή της κατάχρησης και υπερβολικής χρήσης των αντιβιοτικών θεωρούνται ως οι ακρογωνιαίοι λίθοι που θέτουν τα θεμέλια ενός καλύτερου μέλλοντος όπου θα υπάρχει ύφεση στην συχνότητα και ευκολία εξάπλωσης πολυανθεκτικών μικροοργανισμών. Το φαινόμενο αυτό ανέδειξε και ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (Π.Ο.Υ) το 2014 με μια εκτενέστατη αναφορά που εξέδωσε με σκοπό την ενημέρωση του κοινού σχετικά με το τεράστιο πρόβλημα της εξάρσης λοιμώξεων από πολυανθεκτικά βακτήρια. Το πρόβλημα εκτινεται σε οικονομικό επίπεδο (αυξημένο κόστος λόγω περισσότερων ημερών περίθαλψης των ασθενών) αλλά και σε επίπεδο υγείας λόγω των σοβαρών συμπτωμάτων που εμφανίζονται[26].

Η επιρροής που μπορεί να έχει η εξάρση της αντιμικροβιακής αντοχής στον πλανήτη όσον αφορά τη θνησιμότητα αλλά και το κόστος στη δημόσια υγεία είναι δύσκολο να εκτιμηθεί. Μία μελέτη που έγινε από το Κέντρο Πρόληψης και Ελέγχου Ασθενειών των Η.Π.Α (U.S CDC) οδήγησε στην εκτίμηση ότι στις Η.Π.Α, περισσότερο από 2.000.000 άνθρωποι κάθε χρόνο μολύνονται από στελέχη ανθεκτικά στα αντιβιοτικά ενώ τουλάχιστον 23.000 πεθαίνουν ως αποτέλεσμα της λοίμωξης. Η ίδια συγκεντρωτική μελέτη [26] αναφέρει εξίσου σημαντικά στατιστικά δεδομένα για την περιοχή της Ευρώπης, όπου κάθε χρόνο ο αριθμός των λοιμώξεων και θανάτων εξαιτίας των πιο συχνών πολυανθεκτικών βακτηρίων (*S. aureus*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecium*, *Streptococcus pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa*) ανέρχεται περίπου στις 400.000 και 25.000 αντίστοιχα.

Οι στατιστικές αναλύσεις, μάλιστα, δείχνουν πως σύμφωνα με τον Τέϊλορ και συν., το προβλεπόμενο μελλοντικό κόστος στην περιοχή της Ευρώπης θα ανέλθει μέσα στην επόμενη δεκαετία στα 5.8 τρις USD, όσο είναι δηλαδή το Ακαθάριστο Εγχώριο Προϊόν (ΑΕΠ) της Γερμανίας και του Ηνωμένου Βασιλείου μαζί. Στην

ακραία θεωρητική περίπτωση όπου μέσα στην επόμενη δεκαετία θα παρατηρηθεί απόλυτη αντίσταση έναντι οποιουδήποτε αντιμικροβιακού σκευάσματος, η αύξηση του κόστους θα είναι της τάξης των ~124.5 τρις USD, με το στατιστικό μοντέλο της μελέτης να προβλέπει το σενάριο μέσα στα επόμενα 40 χρόνια. Τα συνολικά ποσά βέβαια δεν περιλαμβάνουν και το κόστος που προέρχεται από τη χαμηλή παραγωγικότητα του πληθυσμού. Αυτό θεωρείται συνέπεια της μακράς νοσηλείας και της αδυναμίας εργασίας των επηρεαζόμενων από ανθεκτικές μικροβιακές λοιμώξεις, κόστος όμως που έχει κοινωνικό αντίκρισμα και που μπορεί να είναι πάνω από το διπλάσιο του ως τώρα υπολογιζόμενου [27,28].

Στηριζόμενοι στο παραπάνω σενάριο, υπολογίζεται πως σε περίπτωση αποτυχίας αντιμετώπισης του φαινομένου της αντοχής στην αντιμικροβιακή θεραπεία (100% AMA) αυτό θα σημαίνει πως ο παγκόσμιος πληθυσμός μέχρι το 2050 θα είναι μειωμένος κατά 11 έως 444 εκατομμύρια, από ότι θα ήταν σε περίπτωση απουσίας της AMA [Εικόνα 2].



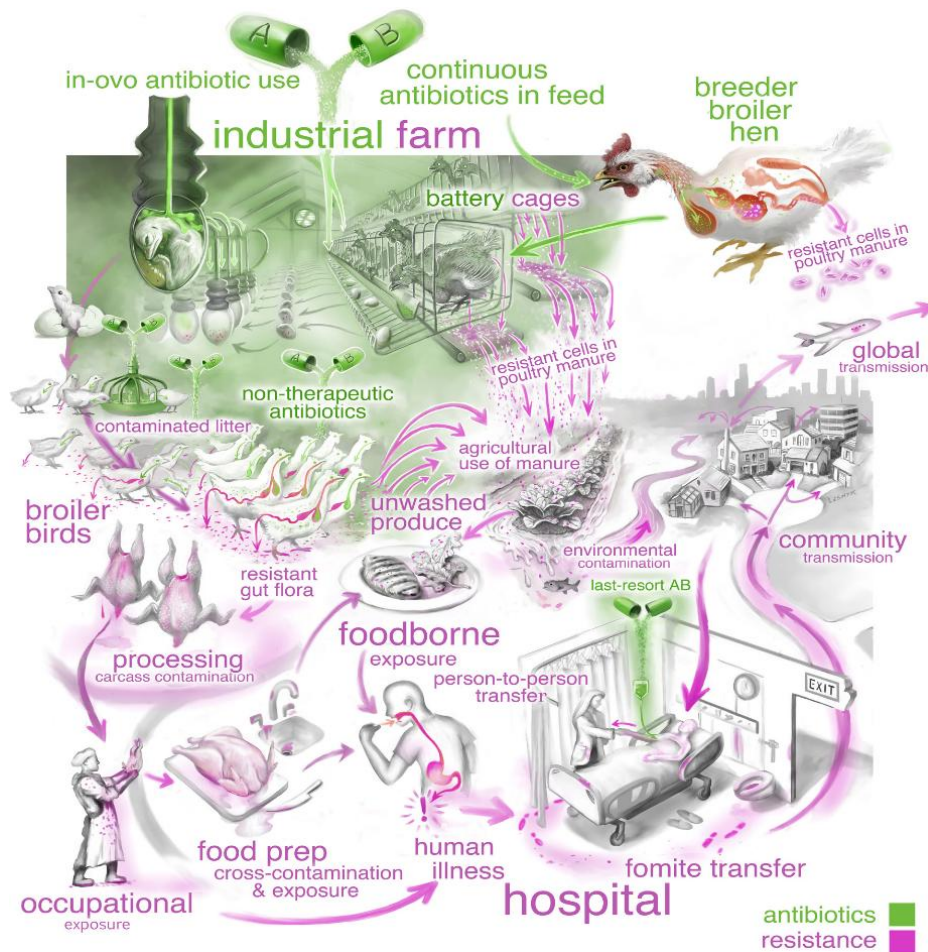
Εικόνα 2. Τα ποσοστά θανάτων που θα επέλθουν ως το 2050 σε περίπτωση που υπάρχουν οι σημερινές τιμές αντιμικροβιακής αντοχής, αλλά και στην περίπτωση της 100% αντίστασης.

2.3 ΤΡΟΠΟΣ ΔΙΑΣΠΟΡΑΣ ΤΗΣ ΑΝΤΟΧΗΣ ΣΤΗΝ ΑΝΤΙ-ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΣΕ ΣΤΕΛΕΧΗ ΜΙΚΡΟΒΙΩΝ – ΤΙ ΙΣΧΥΕΙ ΗΔΗ

Αρχικά, η χρήση και κατάχρηση πολλές φορές των αντιβιοτικών από τους ανθρώπους δεν αποτελεί τη μόνη αιτία εξέλιξης για ανάπτυξη αντοχής στα αντιβιοτικά, στις φυσικές μικροβιακές κοινωνίες. Υπάρχουν διάφορες συνθήκες και αλληλοεπιδρώμενες καταστάσεις που έχουν σημαντικό ρόλο σε αυτές τις κοινωνίες μικροβίων, και ίσως παρέχουν επιπρόσθετες πιέσεις εξέλιξης. Πολλά από τα ήδη υπάρχοντα αντιβιοτικά παράγονται από στελέχη μυκήτων και βακτηρίων που συμβαίνει να βρίσκονται εκ φύσεως σε όλα τα είδη του φυσικού περιβάλλοντος, συμπεριλαμβανομένης και της άμμου. Είναι γεγονός πως τα περισσότερα μικροβιακά στελέχη που παράγουν αντιβιοτικά φέρουν γονίδια που εκφραζόμενα, εξασφαλίζουν αντοχή έναντι των αντιβιοτικών που τα ίδια παράγουν, με τα γονίδια αυτά συνήθως να βρίσκονται στο ίδιο γονιδιακό σύμπλεγμα που βρίσκεται το μονοπάτι γονιδίων βιοσύνθεσης αντιβιοτικών. Τα αντιβιοτικά που παράγονται στο περιβάλλον δύνανται να ασκούν πιέσεις εξέλιξης σε γειτονικούς μικροοργανισμούς. Ωστόσο, είναι δύσκολο να καθορίσει κανείς τις φυσικές συγκεντρώσεις των εκάστοτε αντιβιοτικών στους μικρόκοσμους της άμμου ή την έκταση των πιέσεων εξέλιξης με σκοπό την απόκτηση μεταλλάξεων που οδηγούν σε αντιμικροβιακή αντοχή [29].

Ταυτόχρονα, υπάρχει μεγάλη πιθανότητα η μικροβιακή αντοχή σε τοξικά μόρια να συνέβει προγενέστερα της καινούριας εποχής των αντιβιοτικών. Είναι δεδομένο πως παράγοντες όπως το αρσενικό και ο υδράργυρος χρησιμοποιήθηκαν για αιώνες στη θεραπεία ασθενειών, ενόσω ο ρόλο των μικροβίων στην πρόκληση ασθενειών δεν είχε ακόμη αναγνωριστεί. Συχνά, δε, η αποτυχία της θεραπείας να προκλινόταν πιο πιθανά λόγω της τοξικότητας των τότε φαρμακευτικών φίλτρων παρά από την ίδια την ασθένεια. Πολλά από τα πλασμίδια που είχαν απομονωθεί το 1950 έφεραν γονίδια αντοχής σε άλατα αρσενικού και υδραργύρου κάτι που δεν θεωρείται καθόλου τυχαίο αφού υπάρχει πραγματική πιθανότητα η μικροβιακή αντοχή λόγω μεταλλάξεων στο γονιδίωμα να διασκορπίστηκε κατά τη διάρκεια της βιομηχανικής επανάστασης, τέλος 18ου με αρχές 19ου αιώνα. Τα περιβαλλοντικά μικροβιώματα του εν αρχή τότε βιομηχανικού κόσμου ήταν εκτεθειμένα σε υπέρογκες ποσότητες τοξικών ανόργανων και οργανικών χημικών[30]. Ένας άλλος μη αμελητέος παράγοντας διασποράς είναι η συνεισφορά της γεωργίας και

κτηνοτροφίας στο φαινόμενο, γεγονός που έχει αναδείξει και ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας στην πρόσφατη αναφορά του που προτρέπει στη μη χρήση αντιβιοτικών σε ζώα που δεν βρίσκονται υπό αυστηρή παρακολούθηση κτηνιάτρου ή την αλόγιστη χρήση σε υγιή ζώα καθαρά και μόνο για λόγους προαγωγής της ανάπτυξης τους (όπως βοοειδή, πουλερικά, χοίρους κ.α) και πρόληψης από ασθένειες [31]. Ως συνέπεια, τα χρησιμοποιούμενα αντιβιοτικά ασκούν συνεχόμενες πιέσεις εξέλιξης με αποτέλεσμα την εμφάνιση γονιδιακών μεταλλάξεων στα βακτήρια, που μπορούν να οδηγήσουν σε νέα στελέχη και ανθεκτικές ζωνόσους με κάποιες από αυτές να μπορούν να μεταδοθούν και στον άνθρωπο. Από την άλλη, ζώα όπως οι αφρικανικοί μπαμπούνοι και πίθηκοι που βρίσκονται σε επαφή με τους ανθρώπους φέρουν περισσότερα ανθεκτικά εντερικά βακτήρια από αυτά που διαμένουν σε απομακρυσμένες περιοχές χωρίς την παρουσία ανθρώπινης δραστηριότητας [29]. Αξίζει να σημειωθεί και ο σημαντικός ρόλος των άγριων πουλιών στην μεταφορά ανθεκτικών μικροβίων, πράγμα που γίνεται με διάφορους και ποικίλους τρόπους. Ο πρώτος έχει να κάνει με την ιδιότητα τους ως ζώων που αντιγράφουν την ανθρώπινη δραστηριότητα και την επίπτωση που έχει αυτή στο περιβάλλον εξαιτίας της οικολογικής θέσης των πουλιών στο οικοσύστημα μιας και εύκολα μεταφέρουν ανθρώπινα και περιβαλλοντικά βακτήρια. Επίσης, θεωρούνται ως πηγή και “χωνευτήριο” διάφορων ανθεκτικών βακτηρίων και γονιδίων αντίστασης, όπως και πιθανοί μεταφορείς της αντίστασης στα αντιβιοτικά μέσω της ικανότητας που έχουν να μεταναστεύουν διανύοντας μεγάλες αποστάσεις σε μικρό χρονικό διάστημα. Τέλος, αποτελούν μία ακόμη πιθανή πηγή ανθεκτικών βακτηρίων που δύνανται να εποικίζονται και επιμολύνουν τους ανθρώπους [Εικόνα 3] [32–34].



Εικόνα 3. Οι διάφορες πηγές προέλευσης των αντιβιοτικών και η εκδήλωση ανθεκτικότητας των βακτηρίων στα διάφορα καθημερινά περιβάλλοντα.

Έρευνα που έχει γίνει σε σχέση με την ανίχνευση πηγών μικροβίων, συνήθως με στόχο να αναγνωριστούν οι πιθανές πηγές και οι κίνδυνοι βλάβης της υγείας από διαρροές σε ακατέργαστα λύματα κλπ, έχουν δώσει νέα αποτελέσματα. Επιπροσθέτως, είναι γνωστό πως οι δυνάμεις της φύσης, όπως η κίνηση του νερού και του αέρα, μπορούν να μετακινήσουν τα βακτήρια σε μεγάλες αποστάσεις. Πολλά βακτήρια μέχρι τώρα έχουν απομονωθεί στον αέρα, συμπεριλαμβανών ειδών Μικρόκοκκου, Σταφυλόκοκκου, Βάκιλλου και γενών Αερομονάδας. Πρόσφατα, ο αέρας έχει τραβήξει την προσοχή ως μία όχι και τόσο καλά διερευνημένη πιθανή πηγή διασποράς ανθεκτικών βακτηρίων. Έτσι, η αερομεταφορά βακτηρίων θα μπορούσε να επιτρέψει την διασπορά τόσο ανθεκτικών όσο και μη-ανθεκτικών

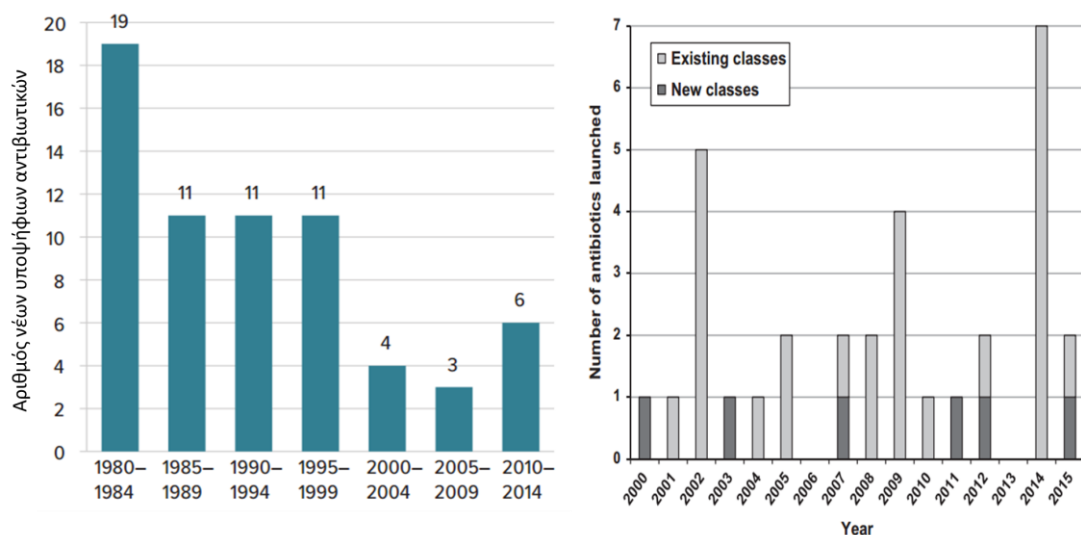
μικροοργανισμών και η οριζόντια μεταφορά γονιδίων (Horizontal Gene Transfer - HGT) αντίστασης ανάμεσα στα βακτήρια που βρίσκονται μέσα σε αεροζόλ και σε μικροσωματίδια σκόνης παραμένει μία πιθανότητα. Άρα βακτήρια που προέρχονται από περιβάλλον που θεωρείται ως στατικό, όπως η άμμος, μπορούν να μεταφερθούν με τις δυνάμεις της φύσης, με ένα παράδειγμα να αποτελεί την διηπειρωτική μεταφορά βακτηρίων μέσω σκόνης προερχόμενης από ερήμους. Τέτοια στελέχη δεν είναι πολύ πιθανόν να εγκατασταθούν μόνιμα εκτός και εάν έπειτα εκτεθούν σε αντιβιοτικά που εξασφαλίζουν καλύτερες συνθήκες ανάπτυξης αυτών[32,35]. Οι ανθρώπινες δραστηριότητες έχουν πιθανώς αυξήσει τον επιπολασμό ανθεκτικών βακτηρίων στον αέρα αλλά και στο νερό. Ως αποτέλεσμα, η αντοχή στα αντιβιοτικά είναι πιο συχνή σε απομονωμένα στελέχη *Escherichia coli* και *Staphylococcus aureus* που βρίσκονται στον αέρα στο εσωτερικό του σπιτιού από στελέχη που έχουν απομονωθεί σε εξωτερικούς χώρους εκτός σπιτιού. Τα οικοσυστήματα του θαλασσινού και γλυκού νερού περιέχουν επίσης βακτήρια που προέρχονται από διάφορες πηγές συμπεριλαμβανομένων αυτών που έχουν ανθρωπογενή προέλευση. Ακόμη, άλλα μονοπάτια μετάδοσης μεταξύ ανθρώπων και ζώων περιλαμβάνουν τα απόβλητα τροφών-ζώων που χρησιμοποιούνται ως λιπάσματα, η μετακίνηση παθογόνων μικροοργανισμών από τους αγρότες στα ζώα, όπως και μέσω των υπόγειων υδάτων[29,33].

Μελέτες που έγιναν σε νεογνά έδειξαν ότι ο εποικισμός από εντεροβακτήρια μετά τη γέννηση, γίνεται ανεξάρτητα από το αν τα νεογνά έχουν θηλάσει ή όχι. Σε μελέτη που έγινε στην περιοχή της Ινδίας σε μια ομάδα από βρέφη που είχαν θηλάσει, παρατηρήθηκε ότι ακόμη και την πρώτη μέρα της ζωής τους 14.3% αυτών έφεραν εντεροβακτηριακά στελέχη που περιείχαν ένα ένζυμο που αδρανοποιούσε τα β-λακταμικά αντιβιοτικά, μία εκτεταμένου-εύρους β-λακταμάση, αλλά αυτό αυξήθηκε στο 41.5% των βρεφών την ημέρα 60. Το περιβάλλον, το πόσιμο νερό, και το φαγητό είναι πιθανόν τα πιο σημαντικά μέσα για την εγκαθίδρυση της φυσιολογικής χλωρίδας του εντέρου. Αυτό το πολυμικροβιακό, πολυποίκιλο, ανθεκτικό, συμβιωτικό μικροβίωμα δηλαδή το σύνολο των μικροοργανισμών που δεν προκαλούν επιμόλυνση στο σημείο του σώματος όπου βρίσκονται π.χ το δέρμα ή το έντερο εγκαθίσταται από πολύ μικρή ηλικία. Οι συμβιωτικοί πληθυσμοί μικροοργανισμών στους ανθρώπους περιλαμβάνουν διάφορα είδη που είναι εκ φύσεως ανθεκτικά σε κάποια αντιμικροβιακά φάρμακα. Ωστόσο, η επιλεκτική πίεση

εξέλιξης στους μικροοργανισμούς που ασκείται από οιαδήποτε κατάσταση (όπως η έκθεση σε αντιμικροβιακά φάρμακα) επιτρέπει αυτούς που έχουν εγγενή ανθεκτικότητα ή που έχουν αποκτήσει καινούριες μεταλλάξεις ή γονίδια αντοχής να επιβιώνουν και να πολλαπλασιαστούν [36]. Πέραν τούτου η ίδια η φυσιολογική μικροχλωρίδα του εντέρου, και οι παθογόνοι μικροοργανισμοί, θέτονται σε κατάσταση αυξημένου ρίσκου ανασύστασης πολυανθεκτικών οργανισμών από ασθενείς που δέχονται θεραπεία με αντιβιοτικά λόγω του ότι συγκεκριμένα αντιβιοτικά ασκούν υπερμεταλλαξιμότητα προάγοντας σε μεγάλο βαθμό την ανθεκτικότητα[37].

2.4 ΠΡΟΣΠΑΘΕΙΑ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΝΕΩΝ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ ΣΗΜΕΡΑ – ΠΟΙΑ ΕΙΝΑΙ Η ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ

Η ανάπτυξη νέων αντιβιοτικών από τη φαρμακευτική βιομηχανία, μια τακτική που ήταν ολότελα αποτελεσματική στο παρελθόν, έχει πλέον παρεμποδιστεί εξαιτίας οικονομικών αλλά και ρυθμιστικών εμποδίων. Από τις 18 μεγαλύτερες φαρμακευτικές εταιρίες που υπάρχουν οι 15 έχουν εγκαταλείψει το πεδίο της ανακάλυψης νέων αντιβιοτικών εκτός από κάποιες όπως η Merck, η GlaxoSmithKline, η Novartis και η Roche [Εικόνα 3][38].



Εικόνα 3. Ο αριθμός των καινούριων υποψήφιων αντιβιοτικών από το 1980 έως το 2014 (αριστερά) και η παρουσίαση ενώσεων που βρίσκονται ήδη στη φάση κλινικών δοκιμών, με τις ενώσεις να προέρχονται από ήδη υπάρχουσες ή καινούριες κλάσεις αντιβιοτικών (δεξιά)

Οι συγχωνεύσεις μεταξύ φαρμακευτικών εταιριών έχουν επίσης μειώσει σημαντικά τον αριθμό και την ποικιλία των εργαστηριακών ομάδων παγκοσμίως. Η παγκόσμια οικονομική κρίση έχει κρατήσει πίσω τη διεξαγωγή έρευνας που στοχεύει στην ανακάλυψη νέων αντιμικροβιακών φαρμάκων και στη πανεπιστημιακή κοινότητα. Η επένδυση χρημάτων από τις φαρμακευτικές εταιρίες για την ανάπτυξη νέων αντιβιοτικών δεν θεωρείται πλέον ως μία εξ αυτών που θα μπορούσε να αποφέρει ουσιαστικά κέρδη με το λιγότερο δυνατό κεφάλαιο. Στα μειονεκτήματα έρχεται να προστεθεί και η μικρή διάρκεια λήψης των αντιβιοτικών αλλά και η θεραπευτική δεινότητα που δείχνουν. Ως αποτέλεσμα, τα αντιβιοτικά δεν αποτελούν φαρμακευτικές ουσίες όπως αυτές που θεραπεύουν χρόνιες καταστάσεις σαν το διαβήτη, ψυχιατρικές διαταραχές, το άσθμα ή τη γαστροοισοφαγική παλινδρόμηση που λόγω της φύσεως τους χρειάζονται μακροχρόνιας θεραπευτικής αγωγής επιφέροντας έτσι πολύ μεγαλύτερα κέρδη[23,39].

Μία κύρια υποψήφια φαρμακευτική ουσία τυπικά ανευρίσκεται μετά από διαλογή από τη συλλογή ουσιών που έχει στην κατοχή της η εκάστοτε εταιρία. Ωστόσο, η χρήση αυτής της μεθοδολογίας διαλογής με ίδιες ή παρόμοιες συλλογές σε

βάθος χρόνου έχει αποδώσει επαναλαμβανόμενα αποτελέσματα και η συνεχής εξέλιξη μηχανισμών ανθεκτικότητας έχουν κάνει την ανακάλυψη φαρμάκων ένα “δυσκίνητο” πεδίο έρευνας.

Ο έλεγχος μιας ουσίας με δοκιμές επιβεβαίωσης του φαρμακοκινητικού, αποτελεσματικού και ασφαλούς προφίλ της έχει αποδειχτεί μια πρόκληση αφού ο έλεγχος θα πρέπει όπως είναι φυσικό να περιλαμβάνει και την ανθεκτικότητα της ουσίας σε πολλαπλούς μηχανισμούς αντίστασης. Μελέτες δείχνουν πως μόνο 5 από τις 5.000-10.000 υποψήφιες ουσίες θα φτάσουν στη Φάση 1 της έρευνας με μόνο μία από τις ήδη 5 ουσίες τελικά να λαμβάνουν έγκριση από τον Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων. Αυτός είναι και ένας λόγος που οι ίδιες οι εταιρίες έχουν στρέψει την προσοχή τους στη μετατροπή ή τον συνδυασμό υπάρχουσών ενώσεων από το να μπαίνουν στη διαδικασία ανίχνευσης νέων. Ο γνωστός νόμος των αντιβιοτικών του Levy αναδεικνύει το εξής φαινόμενο: Μόλις ένα αντιβιοτικό εγκριθεί και αρχίσει η χρήση του σε κλινικό περιβάλλον τότε αντιβιοτικό ίσως αναπτυχθεί αντίσταση σε αυτό που εν τέλη θα οδηγήσει σε μειωμένη αποτελεσματικότητά του με το πέρασ του χρόνου, ένα χαρακτηριστικό που χαρακτηρίζει μόνο την Έρευνα & Ανάπτυξη των αντιβιοτικών[40].

Οι δυσκολίες που ενέχει η επιδίωξη απαραίτητων νομοθετικών εγκρίσεων από τους αρμόδιους φορείς όπως η γραφειοκρατία, η απουσία διαφάνειας, οι διαφορές των προαπαιτούμενων για την πραγματοποίηση κλινικών δοκιμών ανάμεσα στις διάφορες χώρες, οι συχνές αλλαγές των κανόνων αδειοδότησης, και τέλος τα μη αποτελεσματικά κανάλια επικοινωνίας έχουν επίσης υπογραμισθεί. Ακόμη, οι αλλαγές στις συμβατικές μεθόδους σχεδιασμού των κλινικών δοκιμών που έχουν γίνει από τον FDA (Οργανισμό Φαρμάκων και Τροφίμων) των Ηνωμένων Πολιτειών της Αμερικής τις τελευταίες δύο δεκαετίες έχουν κάνει τις κλινικές δοκιμές των αντιβιοτικών μια μεγάλη πρόκληση αφού οι μελέτες που συγκρίνουν τα αντιβιοτικά με την χρήση πλασέμπο θεωρούνται ανήθικες [23].

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, ο σημαντικός ρόλος που προηγουμένως εκπλήρωνε η φαρμακευτική βιομηχανία πλέον έχει αναληφθεί με αυξημένους ρυθμούς από την ακαδημαϊκή κοινότητα και από μεσαίου μεγέθους επιχειρήσεις (MME).

Δεν μπορεί να μη δοθεί και δέουσα σημασία και στον πολύ σημαντικό ρόλο που έχει η καινοτόμα εφαρμογή της χημείας και η ανάπτυξη ημισυνθετικών φυσικών προϊόντων όπως η δαλμπαβανκίνη, νέων προϊόντων φυσικής προέλευσης όπως η ομαδακυκλίνη, εραβακυκλίνη και πλαζομικίνη, καθώς επίσης και καινοτόμοι αναστολείς β-λακταμασών όπως η βαμπορμπακτάμη. Η προσοχή των επενδυτών αλλά και οι προτεραιότητες των κλινικών έχουν εστιάσει την έρευνα περισσότερο από τον MRSA (Methycycline Resistant Staph aureus) στο Clostridium difficile και πιο πρόσφατα στα Gram-αρνητικά βακτήρια. Με βάση τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας ένα πεδίο που πρέπει να χρηματοδοτηθεί είναι η έρευνα για νέα φάρμακα για την αντιμετώπιση της φοιματίωσης που είναι εξαιρετικά υποχρηματοδοτούμενη με μόνο δύο καινούρια φάρμακα να έχουν κυκλοφορήσει στην αγορά για την θεραπεία της τα τελευταία 70 χρόνια [38,41].

3.ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ

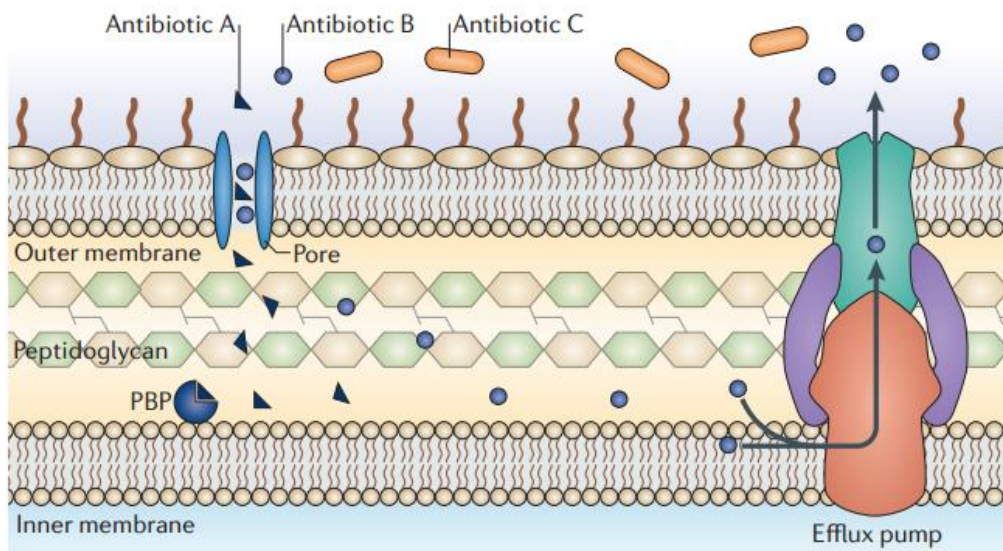
3.1 ΕΓΓΕΝΗΣ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΝΕΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ ΑΝΤΟΧΗΣ

Όπως αναφέρθηκε νωρίτερα, είναι πλέον ευρέως γνωστό πως τα βακτήρια κατέχουν εγγενής ανθεκτικότητα σε διάφορου είδους αντιβιοτικά.

Παράλληλα με την εγγενή ανθεκτικότητα των βακτηρίων [Εικόνα 4] τα ίδια μπορούν να αποκτήσουν ή να αναπτύξουν αντοχή σε διάφορα αντιβιοτικά, φαινόμενο που πραγματοποιείται με διάφορους μηχανισμούς οι οποίοι χωρίζονται σε τρεις κύριες κατηγορίες:

1. Μηχανισμοί που μειώνουν την ενδοκυττάρια συγκέντρωση του αντιβιοτικού ως αποτέλεσμα ισχνής εισχώρησης στο εσωτερικό του βακτηρίου ή εξαιτίας εκροής του αντιβιοτικού.
2. Μηχανισμοί μετατροπής του στόχου του αντιβιοτικού μέσω γενετικής μετάλλαξης ή μεταμεταφραστικής τροποποίησης του στόχου.

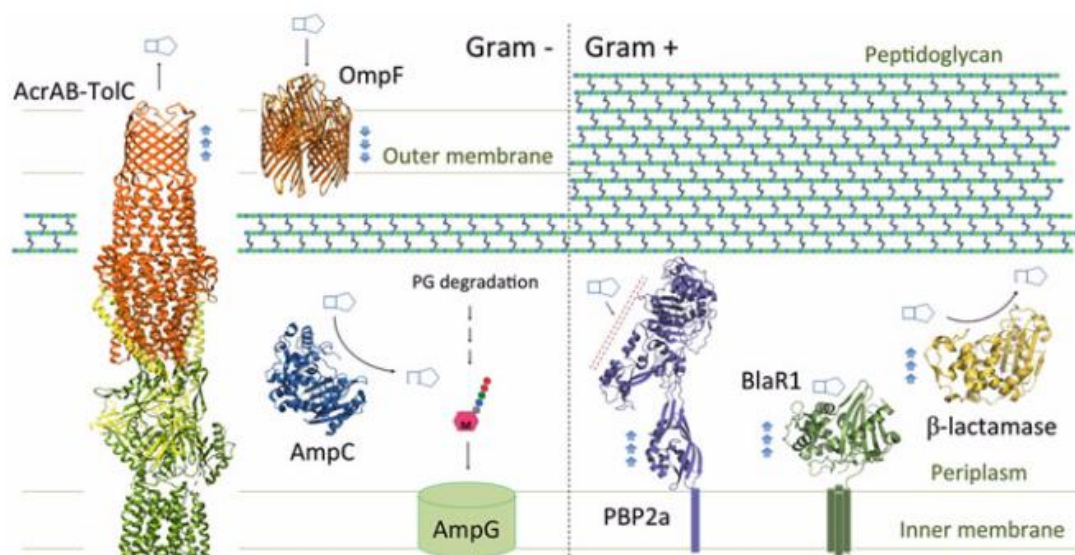
3. Μηχανισμοί αδρανοποίησης του αντιβιοτικού μέσω υδρόλυσης ή άλλου είδους μετατροπής του[42].



Εικόνα 4. Δομή της κυτταρικής μεμβράνης και αναπαράσταση διάφορων αντιβιοτικών μαζί με μεθόδους αντιμικροβιακής αντοχής. Το αντιβιοτικό C δεν εισέρχεται μέσω του πόρου λόγω μεγέθους. Το αντιβιοτικό B εισέρχεται αλλά αναγνωρίζεται από την αντλία εκροής.

Η εξωτερική μεμβράνη των Gram-αρνητικών βακτηρίων αποτελεί ένα ημιδιαπερατό εμπόδιο το οποίο έχει ένα όριο αποκλεισμού όσον αφορά το μέγεθος πρόσληψης των περισσότερων υδρόφυλων μορίων, μεγαλύτερων από ένα μοριακό βάρος. Η πρόσληψη των μορίων μέσα στο κύτταρο περιορίζεται από το μέγεθος των γεμάτων από νερό καναλιών που αποτελούνται από β-πτυχωτές πρωτεΐνες, επονομαζόμενες και ως πορίνες. Η συνολική επιφάνεια της εξωτερικής μεμβράνης που καταλαμβάνεται από αυτές τις πορίνες έχει εκτιμηθεί κοντά στο 0.6% στο E.coli. Η περιορισμένη διάχυση που ελέγχεται από αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στα μόρια που προσπαθούν να περάσουν μέσα από αυτά τα κανάλια-πορίνες και τα αμινοξέα που επενδύουν το τοίχωμα του καναλιού, περιορίζει δραματικά την πρόσληψη ορισμένων μορίων μεταξύ των οποίων κάποιες β-λακτάμες, τρισακχαρίτες και τετραπεπίδια που έχουν μεγέθη που δεν είναι πολύ μικρότερα από τους περιορισμούς μεγέθους που έχουν οι πορίνες όσον αφορά τη διάμετρο τους π.χ στο βακτήριο E. coli[43].

Στα περισσότερα Εντεροβακτήρια, οι κύριες πορίνες, όπως οι εξωμεμβρανικές πρωτεΐνες OmpF και OmpC στο *E. Coli* [Εικόνα 5], θεωρείται πως λειτουργούν ως μη ειδικά κανάλια. Επομένως, η μείωση της διαπερατότητας στην εξωτερική μεμβράνη και ο περιορισμός εισόδου των αντιβιοτικών μέσα στο βακτηριακό κύτταρο επιτυγχάνεται με την μειωμένη έκφραση των πορινών ή με την αντικατάσταση αυτών με περισσότερο επιλεκτικά κανάλια. Νέα δεδομένα, έδειξαν ότι στα Εντεροβακτήρια, στην Ψευδομονάδα spp και στα Οξυβακτήρια spp, οι μειώσεις έκφρασης των πορινών έχουν συνεισφέρει καίρια στην αντίσταση προς νέα φάρμακα, όπως οι καρβαπενέμες και οι κεφαλοσπορίνες στις οποίες η αντίσταση εμφανίζεται συνήθως με τη μορφή ενζυμικής αποδόμησης. Για παράδειγμα, η σχετιζόμενη με το κλινικό περιβάλλον αντίσταση στις καρβαπενέμες στα εντεροβακτηριακά μπορεί να συμβεί και απουσία παραγωγής καρβαπενεμάσης εάν οι μεταλλάξεις μειώσουν την προϋπάρχουσα παραγωγή πορινών ή εάν εμφανιστούν μεταλλαγμένες πορίνες [44]. Επιπλέον, απομονωμένα στελέχη Κλεμπσιέλα της πνευμονίας που εκφράζουν εναλλακτικά είδη πορινών έχουν συσχετισθεί με παγκόσμιες εξάρσεις λοιμώξεων[42].



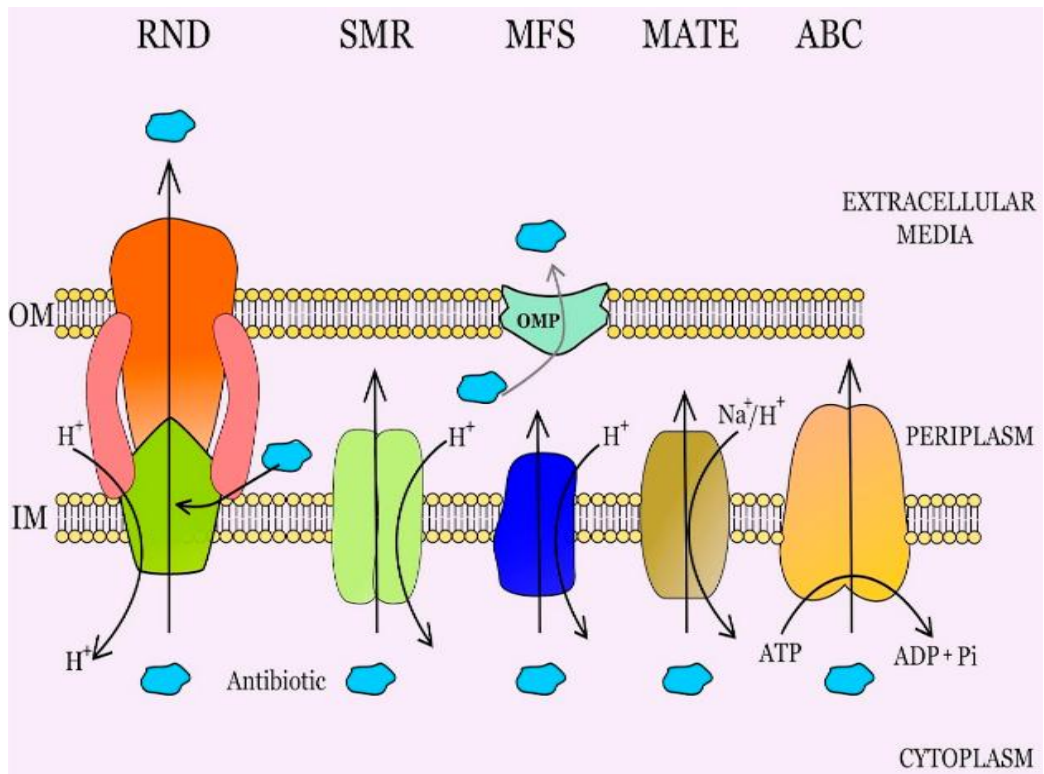
Εικόνα 5. Πορίνες και άλλες πρωτεΐνες που βρίσκονται στην περιοχή της κυτταρικής μεμβράνης τόσο σε Gram-αρνητικά όσο και σε Gram-θετικά βακτήρια.

Πειράματα ραδιοσήμανσης που έχουν γίνει σε Gram-αρνητικά βακτήρια έχουν αποκαλύψει πως μία αξιοπερίεργα μικρή ποσότητα επισημασμένων πεπτιδογλυκανών χάνεται ανά γενιά. Αντ'αυτού ανακυκλώνονται και επαναχρησιμοποιούνται δίνοντας νέες πεπτιδογλυκάνες. Η ανακύκλωση των πεπτιδογλυκανών έχει τη σημασία της στην έκφραση αντίστασης στα β-λακταμικά αντιβιοτικά όπου οι διακυμάνσεις της συγκέντρωσης αποδομημένων κομματιών πεπτιδογλυκάνης στο κυτταρόπλασμα επιτρέπουν στα βακτήρια να εκτιμούν την κατάσταση του κυττάρου, προειδοποιώντας τα για πιθανή παρουσία β-λακταμικών αντιβιοτικών στο περιβάλλον[45].

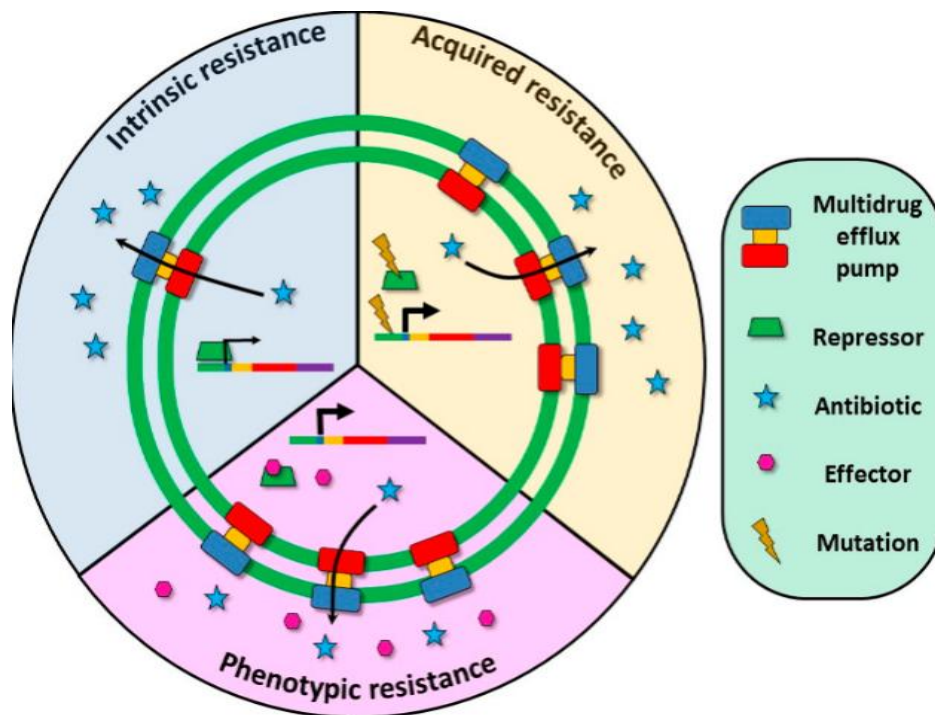
3.2 ΣΗΜΑΣΙΑ ΑΝΤΛΙΩΝ ΕΚΡΟΗΣ ΤΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ

Οι βακτηριακές αντλίες εκροής (efflux pumps) έχουν ως κύρια δράση την ενεργή μεταφορά πολλών αντιβιοτικών έξω από το κύτταρο και είναι συνεισφέρουν σημαντικά στην εγγενή ανθεκτικότητα που εμφανίζουν τα Gram αρνητικά βακτήρια σε πολλά φάρμακα που μπορούν να θεραπεύσουν Gram θετικές βακτηριακές λοιμώξεις. Μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε πρωτεύοντες ή δευτερεύοντες μεταφορείς, με τους πρώτους να σχετίζονται με την υδρόλυση του ATP και τους δεύτερους με τη μεταφορά πρωτονίων. Όταν υπερεκφράζονται, οι αντλίες εκροής μπορούν να προκαλέσουν υψηλά επίπεδα αντίστασης στα αντιβιοτικά. Είναι συχνά αποτελεσματικές σε πολλαπλά αντιβιοτικά αφού η λειτουργία τους βασίζεται σε φυσικοχημικά χαρακτηριστικά όπως η υδροφοβικότητα, ο αρωματικός χαρακτήρας ή το φορτίο. Οι αντλίες εκροής κατηγοριοποιούνται σε πέντε κύριες υπεροικογένειες [Εικόνες 6-7]:

1. Την του μείζονος υποβοηθητικού παράγοντα (Major Facilitator Superfamily - MFS).
2. Την υπεροικογένεια ATP-Binding Cassette.
3. Την υπεροικογένεια Small Multi-drug Resistance - SMR.
4. Την υπεροικογένεια Resistance-Nodulation-Cell Division - RND.
5. Την υπεροικογένεια Multi-Antimicrobial Extrusion Protein - MATE.

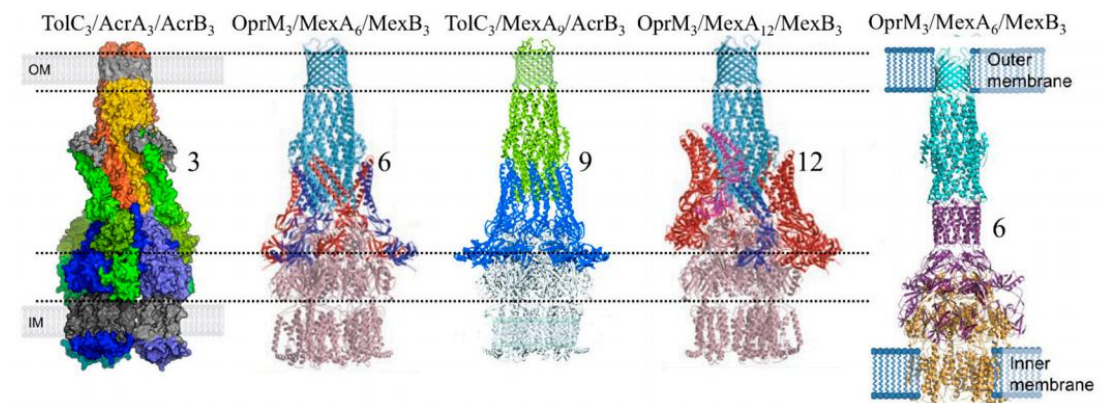


Εικόνα 6. Σχηματική αναπαράσταση των πέντε κύριων υπεροικογένειων αντλιών εκροής (Major Facilitator Superfamily, ATP-Binding Cassette., Small Multi-drug Resistance – SMR, Resistance-Nodulation-Cell Division - RND., Multi-Antimicrobial Extrusion Protein – MATE).



Εικόνα 7. Ο ρόλος των αντλιών εκροής στην ανοχή στα αντιβιοτικά.

Οι αντλίες που έχουν εξαιρετικά διευρυμένο φάσμα μορίων στα οποία μπορούν να δράσουν, χαρακτηρίζονται ως πολυανθεκτικές αντλίες εκροής (multidrug resistance efflux pumps - MDR). MDR αντλίες βρίσκονται και στις πέντε κύριες υπεροικογένειες και μπορούν να αποβάλλουν μεγάλο αριθμό διαφορετικών αντιβιοτικών[46] και μη αντιβιοτικών ενώσεων. Στα Gram-θετικά βακτήρια οι αντλίες εκροής που προέρχονται από την υπεροικογένεια του μείζονος υποβοηθητικού παράγοντα, όπως αυτή του *S. aureus* NorA, είναι κυρίως υπεύθυνες για MDR εκροή. Στα Gram-αρνητικά, από την άλλη, ως πολυανθεκτικές αντλίες, MDR, εμφανίζονται αντλίες της υπεροικογένειας Resistance-Nodulation-Cell Division - RND όπως οι MexAB-OprM και AcrAB-TolC, συνεισφέροντας με τον τρόπο τους στην εγγενή ανθεκτικότητα στελεχών όπως της *P. aeruginosa* και του *E. coli*, αντίστοιχα, στα β-λακταμικά και σε άλλα αντιβιοτικά. Συγκεκριμένα στο *E. Coli*, μελέτη που έγινε σχετικά με το προφίλ μορίων στα οποία δρά το σύστημα εκροής AcrAB-TolC [Εικόνα 8] έδειξε ότι το σύστημα εκροής AcrAB-TolC εμφανίζει πολυανθεκτικότητα δράοντας στα αντιβιοτικά χλωραμφαινικόλη, φλουορκινολόνη, τετρακυκίνη, νοβομπικίνη, ριφαμπικίνη, φουσιδικό οξύ και ναλιδιξικό οξύ [42,43,45,47].



Εικόνα 8. Διάφορα συστήματα εκροής

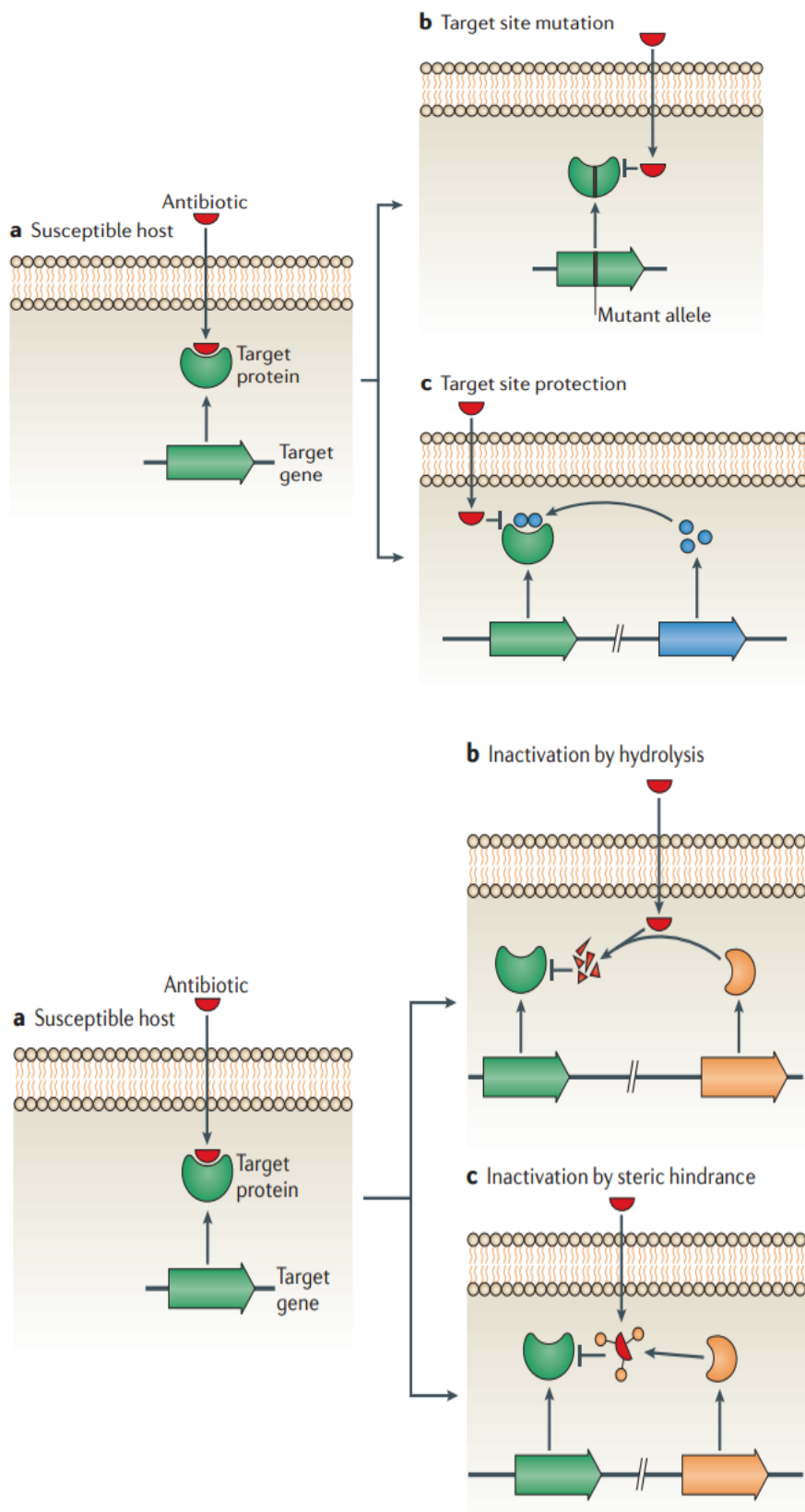
Εικάζεται πως οι αντλίες εκροής που εκφράζουν πολυανθεκτικότητα εξωθούν ακόμη και τοξικές ουσίες που έρχονται από το εξωτερικό των βακτηρίων όπως αντιμικροβιακές μικροενώσεις από ανταγωνιστές στο γύρω περιβάλλον, βαρέα μέταλλα και οργανικούς ρύπους. Ωστόσο, μπορούν να εξάγουν και ενδογενής μεταβολίτες ή να συμμετέχουν στη διακυτταρική επικοινωνία. Ένας μικροοργανισμός που δείχνει τέτοια συμπεριφορά και έχει μελετηθεί εκτεταμένα είναι η *P. aeruginosa*[46].

3.3 ΑΛΛΑΓΗ ΔΟΜΗΣ ΣΕ ΣΤΟΧΟΥΣ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ ΜΕΣΩ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ – ΓΕΝΕΤΙΚΑ ΜΕΤΑΘΕΤΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Τα περισσότερα αντιβιοτικά προσδένονται στους στόχους τους ισχυρά και έχουν ως αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της σωστής λειτουργίας του στόχου. Ποικίλες αλλαγές, όμως, στη δομή του στόχου αποτρέπουν την αποτελεσματική πρόσδεση του φαρμάκου επιτρέποντας και πάλι στο στόχο να εξακολουθεί να επιτελεί την φυσιολογική του λειτουργία, εμφανίζοντας έτσι σημάδια ανθεκτικότητας. Στη διάρκεια των λοιμώξεων υπάρχουν συχνά πολλοί και πολυποίκιλοι πληθυσμοί από παθογόνους μικροοργανισμούς. Εάν μία και μόνο σημειακή μετάλλαξη που θα συμβεί στο γονίδιο που κωδικοποιεί τον στόχο του αντιβιοτικού οδηγήσει σε

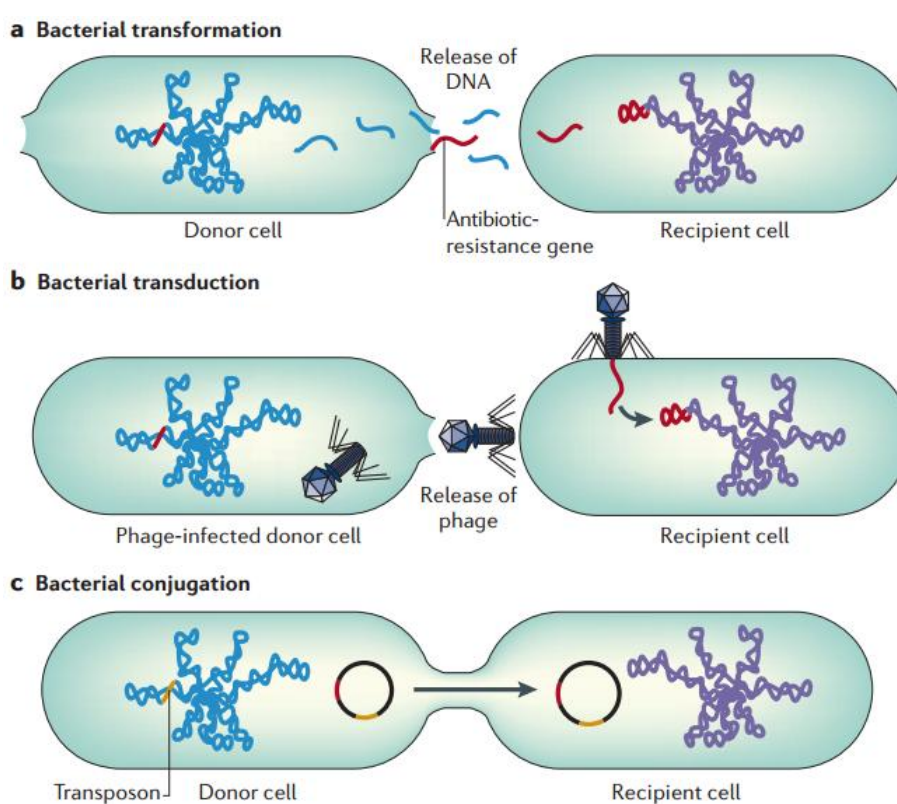
ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό αυτό, τα στελέχη με αυτή τη μετάλλαξη θα ευδοκιμήσουν και θα πολλαπλασιαστούν. Τα γονίδια που κωδικοποιούν τους στόχους κάποιων αντιβιοτικών υπάρχουν σε πολλαπλά αντίγραφα μέσα στο κύτταρο.

Ανάμεσα στα αντιβιοτικά που έχουν συσχετισθεί με δημιουργία ανθεκτικών στελεχών είναι οι φλουοροκινολόνες που παρεμβαίνουν στην αντιγραφή του DNA με το να συνδέονται με την γυράση ή την τοποϊσομεράση IV, αναστέλλοντας τη δράση τους. Η δράση όμως αυτή ενισχύει τη συχνότητα εμφάνισης λαθών στην αντιγραφή τα οποία είναι και η κύρια πηγή μεταλλάξεων [48]. Ο ρυθμός εμφάνισης ανθεκτικών βακτηρίων καθορίζεται από τους συνδυασμένους δείκτες εμφάνισης νέων μεταλλάξεων (*de novo* mutation - U) και οριζόντιας γονιδιακής μεταφοράς, HGT, δηλαδή της μεταφοράς γονιδίων που το χαρακτηριστικό τους είναι η έκφραση ανθεκτικού φαινότυπου από ένα βακτηριακό κύτταρο σε άλλο (μεταφορά πλασμιδίων). Η πρόσληψη DNA από το περιβάλλον, μέσω μεταμόρφωσης-*transformation*, μπορεί επίσης να επιφέρει ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά με δομική αλλαγή της πρωτεΐνης στόχου και μέσω του σχηματισμού “μωσαϊκών” γονιδίων[49] με τον ρυθμό μεταλλάξεων να είναι υψηλός και να φτάνει μέχρι και 10^5 ανά κύτταρο και ανά γενιά. Επιπροσθέτως, μεταλλάξεις που οδηγούν σε γονιδιωματικές ανατακατατάξεις (π.χ εισαγωγές, διαγραφές, διπλασιασμοί και αντιμεταθέσεις) συμβαίνουν με ακόμη μεγαλύτερη συχνότητα, φαινόμενο το οποίο μπορεί να επιταχύνει το ρυθμό απόκτησης ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά[50]. Έρευνες έχουν δείξει ότι πολλοί βακτηριακοί πληθυσμοί περιέχουν κύτταρα που φέρουν έναν υψηλά μεταλλαξογόνο φαινότυπο, ως συνέπεια ελαττωματικού συστήματος επιδιόρθωσης του DNA. Παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν περαιτέρω το ρυθμό μεταλλαξιμότητας είναι η φυσιολογία, η δομή του DNA, η αλληλεπίδραση μεταξύ βακτηρίου-αντιβιοτικού (π.χ διάφορες μεταλλάξεις μπορούν να εμφανιστούν σε διαφορετικές δόσεις του αντιβιοτικού), και το τωρινό αλλά και παρελθοντικό περιβάλλον στο οποίο τα βακτήρια έχουν εκτεθεί που μπορεί να έχει σχέση με την θερμοκρασία αλλά και το ειδικό θρεπτικό υπόστρωμα στο οποίο πολλαπλασιάστηκαν. Ένα τρανταχτό παράδειγμα αλλαγής στόχου είναι η απόκτηση ενός γονιδίου ομόλογου σε σχέση με τον πρωταρχικό στόχο, όπως στην MRSA, όπου η αντίσταση στη μεθικιλίνη προήλθε από την απόκτηση στοιχείων της σταφυλοκοκκικής κασέτας χρωμοσώματος *mec* (*staphylococcal cassette chromosome mec*) [Εικόνα 9][42,51].



Εικόνα 9. Επάνω: Παρουσιάζονται μετατροπές της πρωτεϊνικής δομής στόχου, Κάτω: Παρουσιάζονται απευθείας αλληλεπιδράσεις με τα αντιβιοτικά.

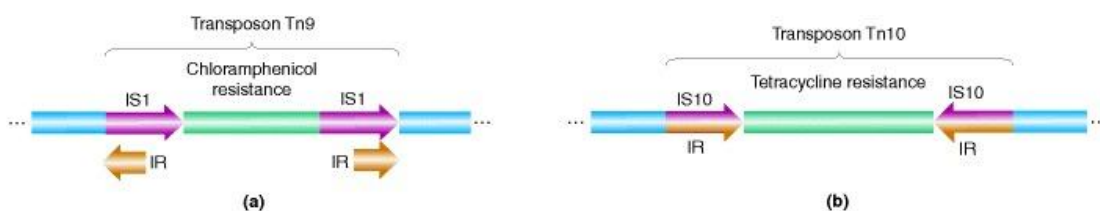
Όπως προαναφέρθηκε προηγουμένως τα γενετικά μεταθετά στοιχεία παίζουν σημαντικό ρόλο στη μεταφορά ανθεκτικών φαινοτύπων [επονομαζόμενα και ως κινητά στοιχεία ανθεκτικότητας - mobile resistance elements (MREs)] όπως και στην διασπορά της ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά αφού μπορούν να διαμοιραστούν στους βακτηριακούς πληθυσμούς μέσω της οριζόντιας γονιδιακής μεταφοράς, HGT [Εικόνα 10].



Εικόνα 10. Τρόποι Οριζόντιας Μεταφοράς Γονιδίων

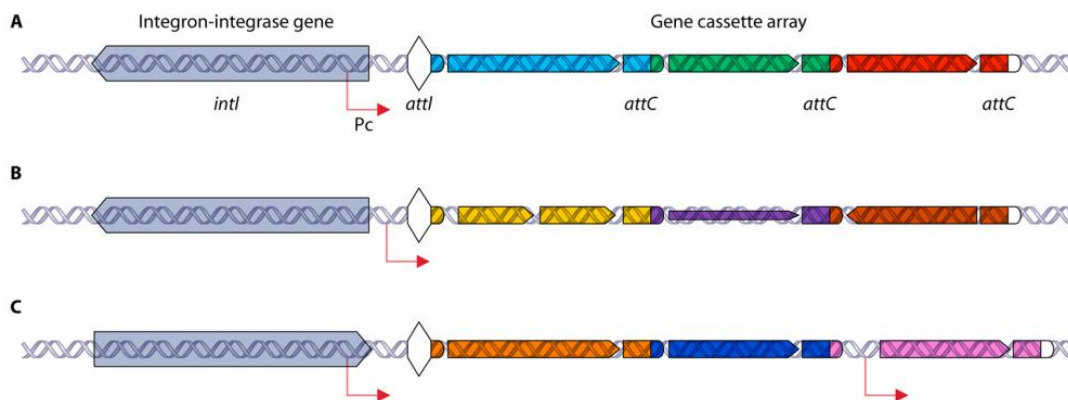
Τα MREs μεταφέρουν γονίδια που κωδικοποιούν λειτουργίες που αντιμάχονται τη δράση των αντιβιοτικών είτε μέσω ενζυμικής αδρανοποίησης, σύνθεσης εναλλακτικών ενζύμων στη θέση των “μητρικών” στόχων, ή της προστασίας του στόχου. Οι κύριοι εξελικτικοί μηχανισμοί της HGT που ξεχωρίζουν είναι τρεις: η σύζευξη, η μεταγωγή και η φυσική μεταμόρφωση. Η συχνότητα σύζευξης η μεταγωγής μπορεί να είναι μεγαλύτερη σε πειράματα *in vivo* παρά σε *in vitro*. Ανάμεσα στα MREs τα πλασμίδια είναι αυτά που θεωρούνται συνηθέστερα σε

κλινικό περιβάλλον. Διάφορα πλασμίδια επιδεικνύουν ποικίλες επιδράσεις όσον αφορά την βακτηριακή τους αρμοστικότητα, με κάποια να δείχνουν έντονες δηλητηριώδεις επιδράσεις χωρίς κάποια επίπτωση ή ακόμη πλεονέκτημα αρμοστικότητας. Αυτήν η ανομοιογένεια μπορεί να προέρχεται από την παρεμβολή των διάφορων χαρακτηριστικών που μπορεί να έχουν τα πλασμίδια [μέγεθος (Mb), εύρος ανθεκτικότητας, αριθμός αντιστάσεων κ.α] με την φυσιολογία του ξενιστή ή τις αλληλεπιδράσεις με το περιβάλλον. Η απόκτηση συμπληρωματικών-ανταποδοτικών μεταλλάξεων στο πλασμίδιο, στο βακτηριακό χρωμόσωμα ή και στα δύο μπορούν να αντισταθμίσουν το κόστος αρμοστικότητας λόγω μεταφοράς του πλασμιδίου, με τις ίδιες τις μεταλλάξεις να επηρεάζουν συχνά το ρυθμό της αντιγραφής και μετάδοσης, επιδρώντας στο διαμοιρασμό πλασμιδίων στους πληθυσμούς βακτηρίων που βρίσκονται στο περιβάλλον. Συνολικά, η σύζευξη από μόνη της συνήθως δεν θεωρείται ως ο κύριος μηχανισμός για την διατήρηση των πλασμιδίων στον πληθυσμό[51,52]. Ξεχωριστά είναι και τα τρανσποζόνια ως μεταθετά στοιχεία μέσα στα ίδια τα βακτήρια τα οποία ως DNA αλληλουχίες έχουν την ικανότητα να μετακινούνται από τη μία περιοχή του γονιδιώματος στην άλλη παίζοντας έτσι σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη του γονιδιώματος. Πέραν του εξελικτικού τους ρόλου και η συμμετοχή τους στην έκφραση πολυανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά δεν μπορεί να θεωρηθεί αμέληταία. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το *V. cholerae* το οποίο φέρει αντίσταση σε ενώσεις όπως η σουλφαμεθοξαζόλη, τριμεθοπρίμη, η στρεπτομυκίνη και η χλοραμφενικόλη [Εικόνα 11][53,54].



Εικόνα 11. Τα τρανσποζόνια Tn9 και Tn10, τα οποία φέρουν αντοχή στην χλοραμφενικόλη και τετρακυκλίνη αντίστοιχα.

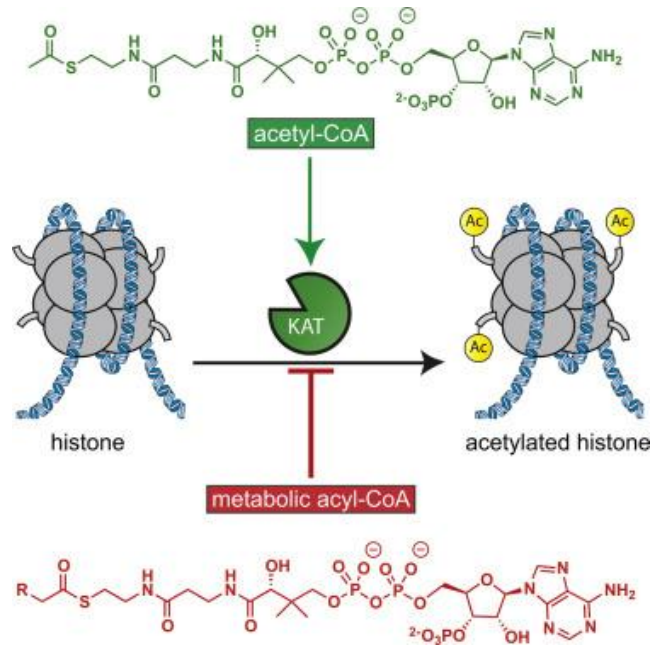
Από την άλλη έχουμε και τα ιντεγκρόνια τα οποία ως γενετικά στοιχεία παίζουν και αυτά το ρόλο τους στην διασπορά της ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά[55] έχοντας την εξέχουσα ικανότητα να αιχμαλωτίζουν και να εκφράζουν εξωγενή γονίδια. Φαίνεται να εμφανίζουν τη δράση αυτή στα Gram-αρνητικά παθογόνα βακτήρια και βρίσκονται σε όλα τα είδη περιβάλλοντος, μπορούν να κινηθούν ανάμεσα στα διάφορα είδη στελεχών και σειρών κατά τη διάρκεια της εξέλιξης τους στο χρόνο, και κατά συνέπεια έχουν πρόσβαση σε μια τεράστια “δεξαμενή” από καινούρια γονίδια των οποίων οι λειτουργίες σε μεγάλο βαθμό δεν έχουν ακόμη αποσαφηνιστεί. Τα ιντεγκρόνια, σαν σύνολο, μοιράζονται τρία απαραίτητα βασικά χαρακτηριστικά. των οποίων οι συνδυαζόμενες ενέργειες αιχμαλωτίζουν και εν συνεχεία εκφράζουν εξωγενή γονίδια ως μέρος των γονιδιακών κασετών [συμπυκνωμένα στοιχεία DNA τα οποία γενικά έχουν απλή δομή και αποτελούνται από ένα και μόνο ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (Open Reading Frame - ORF) και από ένα σημείο ανασυνδυασμού]. Το πρώτο χαρακτηριστικό είναι το γονίδιο *intI* το οποίο και κωδικοποιεί μία ιντεγκράση ιντεγκρονίων - την *IntI* - η οποία ως πρωτεΐνη καταλύει τον ανασυνδυασμό μεταξύ των εισερχομένων γενετικών κασετών και το δεύτερο κύριο στοιχείο είναι ένα συγκεκριμένο σημείο του DNA που σχετίζεται με τον ανασυνδυασμό των ιντεγκρονίων σε αυτό, γνωστό και ως *attI*. Έτσι, μόλις μία γενετική κασέτα ανασυνδυαστεί μέσα στο γενετικό υλικό του ξενιστή, εκφράζεται με τη βοήθεια του τρίτου χαρακτηριστικού που είναι ο σχετιζόμενος με τα ιντεγκρόνια προαγωγέας, *Pc*[56]. Για αυτό, το σύστημα ιντεγκρονίων έχει δύο πλεονεκτήματα-κλειδιά ως μέσο γονιδιωματικής μετεξέλιξης. Αρχικά, όπως αναφέραμε, το νέο γενετικό υλικό ενσωματώνεται μέσα στο βακτηριακό γονιδίωμα στο σημείο ανασυνδυασμού *attI* και έτσι δεν παρενοχλεί τα γύρω υπάρχοντα γονίδια. Δεύτερον, το νέο γονίδιο που έχει ενσωματωθεί εκφράζεται μέσω του προαγωγέα ιντεγκρονίων (*Pc*) και έτσι είναι αμέσως έτοιμο να υποβληθεί σε πιέσεις που θα λειτουργήσουν ως φυσική επιλογή για αυτό. Συνεπώς, όταν σε ένα πληθυσμό κυττάρων που περιέχουν ιντεγκρόνια κάθε ένα από αυτά φέρει διαφορετικές γενετικές κασέτες τότε όποια καινούρια νεογεννηθείσα παραλλαγή αυτών θα εκφράσει γονίδια σε άμεσο διάστημα που ίσως εκφέρουν πλεονεκτικούς φαινότυπους για την επιβίωση τους, όπως είναι και η πολυανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά [Εικόνα 12][57].



Εικόνα 12. Η δομή των ιντεγκρονίων

3.4 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΕΝΖΥΜΩΝ, ΡΙΒΟΣΩΜΑΤΩΝ, ΦΑΓΩΝ ΚΑΙ ΤΟΥ ΜΙΚΡΟΒΙΩΜΑΤΟΣ ΣΤΗΝ ΕΜΦΑΝΙΣΗ ΠΟΛΥΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ

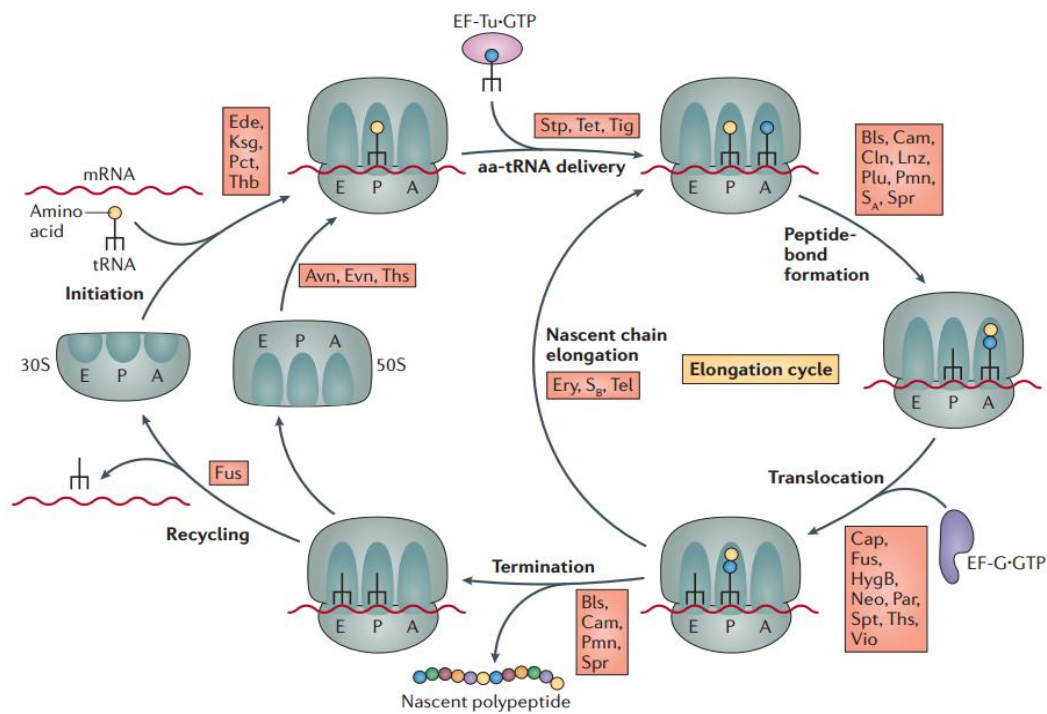
Ένας ακόμη πολύ ενδιαφέρον μηχανισμός αντίστασης είναι η προσθήκη χημικών ομάδων σε ευάλωτα σημεία του αντιβιοτικού μορίου μέσω βακτηριακών ενζύμων αποτρέποντας έτσι το ίδιο το αντιβιοτικό να συνδεθεί στην πρωτεΐνη στόχο ως αποτέλεσμα του στερεοχημικού φραγμού που έχει συμβεί. Πληθώρα χημικών ομάδων μπορούν να μεταφερθούν έτσι, συμπεριλαμβανομένων των άκυλο, φωσφορικών, νουκλεοτιδυλικών κλπ και τα ένζυμα που είναι υπεύθυνα σχηματίζουν μία μεγάλη και ποικιλόμορφη ομάδα ενζύμων ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά. Πιο συγκεκριμένα τα αμινογλυκοσιδικά αντιβιοτικά είναι ιδιαίτερα επιρρεπή στις μετατροπές από τα αμινογλυκοσιδικά ένζυμα καθώς είναι μεγάλα μόρια με πολλές υδροξυλικές και αμιδικές ομάδες εκτεθειμένες. Υπάρχουν τρεις γνωστές κλάσεις αμινογλυκοσιδικών-τροποποιητικών ενζύμων και είναι οι ακετυλοτρανσφεράσες, οι φωσφοτρανσφεράσες και οι νουκλεοτιδυλοτρανσφεράσες, οι οποίες είναι εξελικτικά διαφορετικές μεταξύ τους και ποικίλουν όσον αφορά τις αμινογλυκοσίδες που μπορούν να μετατρέψουν και το μέρος της μοριακής ένωσης που μετατρέπεται [Εικόνα 13.] [42,58].



Εικόνα 13. Μία περίπτωση ακετυλοτρανσφερασών είναι αυτές των ιστονών που παίζουν ρόλο στην ρύθμιση της δομής της χρωματίνης.

Τα ριβοσώματα ως τα εργοστάσια σύνθεσης πρωτεϊνών του κυττάρου αποτελούν την πλατφόρμα πάνω στην οποία τα αμινοξέα συνδέονται μεταξύ τους ώστε να δημιουργήσουν πολυπεπτιδικές αλυσίδες. Στην υπομονάδα 30S του ριβοσώματος, τα σημεία προσδεσιμότητας των αντιβιοτικών είναι συγκεντρωμένα κατά μήκος του μονοπατιού του mRNA και tRNA. Κάποια αντιβιοτικά που έχουν ως στόχο την υπομονάδα 30S είναι η εδεΐνη και η κασουγκαμυκίνη τα οποία αναστέλλουν την έναρξη της μετάφρασης αποτρέποντας τη σταθερή αλληλεπίδραση ανάμεσα στο εναρκτήριο tRNA και στο αρχικό κωδικόνιο στο σημείο P. Η πλειοψηφία των άλλων αντιβιοτικών που συνδέονται στην υπομονάδα 30S όπως οι τετρακυκλίνες και οι στρεπτομυκίνες έχουν ως στόχο να αναστείλουν την μετάφραση στο στάδιο της επιμήκυνσης μεσολαβώντας είτε στη μεταφορά των tRNAs στο σημείο A ή την μετατόπιση του mRNA-tRNA συμπλέγματος όπως οι αμινογλυκοσίδες υγρομυκίνη B, νεομυκίνη, πακταμυκίνη και σπεκτινομυκίνη και οι τουμπερακτινομυκίνες βιομυκίνη και καπρεομυκίνη [Εικόνα 14][Πίνακας 1][59]. Άλλα αντιβιοτικά αλληλεπιδρούν με την υπομονάδα 50S συνδεόμενα στο κέντρο της πεπτιδυλοτρανσφεράσης, σημείο όπου δημιουργούνται οι πεπτιδικοί δεσμοί και η νέα

πεπτιδική αλυσίδα επιμηκώνεται κατά ένα αμινοξύ τη φορά. Κάποια από αυτά αναστέλλουν την πρωτεϊνοσύνθεση μέσω ανταγωνισμού με την θέση σύνδεσης των αμινοξικών αλυσίδων που προέρχονται από τα εισερχόμενά aa-tRNAs στη σχισμή που υπάρχει στο σημείο A του ριβοσώματος[60]. Άλλοι γνωστοί στόχοι των αντιβιοτικών είναι το σύμπλεγμα 70S, ο παράγοντας επιμήκυνσης G όπως επίσης και ο Tu. Εύλογο είναι έτσι να σκεφτεί κανείς πως σημειακές μεταλλάξεις στους προαναφερόμενους στόχους, ολόκληρη αφαίρεση τμήματος αυτών ή και ο συνδυασμός με τις αντλίες εκροής έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση ανθεκτικότητας των στελεχών στα αντιβιοτικά[59].



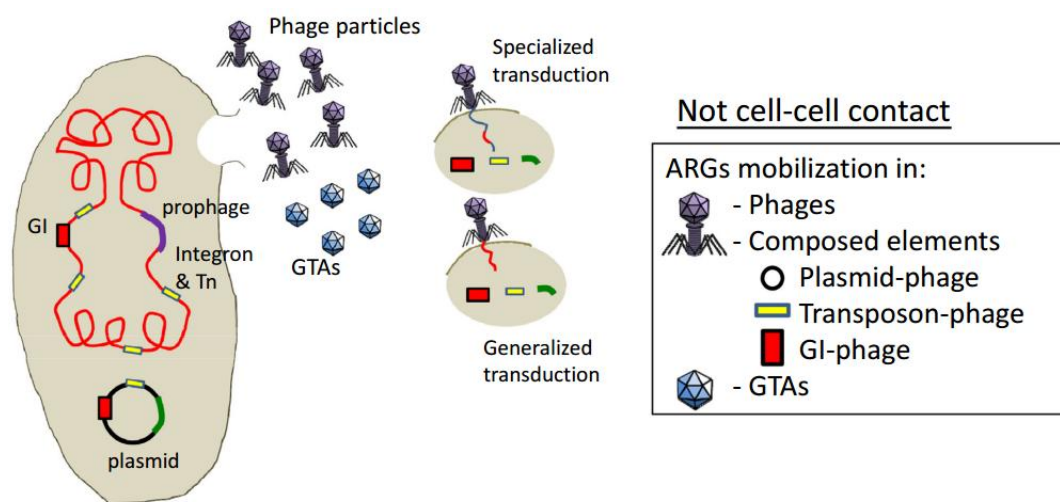
Εικόνα 14. Διάφορα αντιβιοτικά και η δράση τους σε ποικίλες στιγμές της πρωτεϊνοσύνθεσης

Πίνακας 1. Αναφορά πληθώρα αντιβιοτικών με τους ριβοσωμικούς στόχους τους και τέλος ο μηχανισμός αναστολής και αντίστασης αυτών.

Antibiotic	Molecular target	Inhibition mechanism	Resistance mechanisms*
Blasticidin S	50S	PTC, termination	DM, TM
Chloramphenicol	50S	PTC	DM, E, TA, TM
Clindamycin, lincomycin	50S	PTC	DM, E, TA, TM
Dalfopristin (S _A), quinupristin (S _B)	50S	PTC	E, TA, TM
Doxycycline, tigecycline	30S	tRNA delivery	DM, E, FP, TM
Edeine	30S	Initiation	DM, TM
Erythromycin, telithromycin	50S	Nascent chain elongation	DM, E, TA, TM
Evernimicin, avilamycin	50S	Initiation	TA, TM
Fusidic acid	EF-G	Elongation, recycling	E, FP, TM
Kasugamycin	30S	Initiation	DM, TA, TM
Kirromycin	EF-Tu	Elongation	TM
Linezolid	50S	PTC	E, TA, TM
Paromomycin, neomycin	30S	Translocation	DM, E, TA, TM
Puromycin	50S	PTC	DM
Sparsomycin	50S	PTC	E, TM
Spectinomycin	30S	Translocation	DM, E, TA, TM
Streptomycin	30S	Translocation	DM, E, TA, TM
Thermorubin	70S	Initiation	ND
Thiostrepton	50S	Factor binding	TA, TM
Tiamulin	50S	PTC	E, TA, TM
Viomycin, capreomycin	70S	Translocation	DM, TA, TM

Οι φάγοι ή βακτηριοφάγοι, όπως είναι γνωστοί, είναι ιοί που αποτελούνται από DNA ή RNA γονιδίωμα που περιβάλλεται από καψίδιο. Είναι βιολογικές οντότητες που θεωρούνται ως οι πολυπληθέστερες στη βιόσφαιρα (εκτιμώμενος πληθυσμός από 10^{30} - 10^{32}). Οι φάγοι μολύνουν βακτήρια και είτε εισάγουν το ιϊκό τους γονιδίωμα σε αυτό του ξενιστή επιτελώντας τη διαδικασία της αντιγραφής ως μέρος του λυσιγονικού κύκλου, είτε πολλαπλασιάζονται μέσα στο κύτταρο που τους φιλοξενεί και απελευθερώνονται στο στάδιο του λυτικού κύκλου. Οι φάγοι μπορούν επίσης να λειτουργήσουν και ως φορείς για ανταλλαγή γονιδίων μέσω γενικευμένης ή εξειδικευμένης μεταγωγής διαμέσου της οποίας ένα γενετικό χαρακτηριστικό μεταφέρεται από τα σωματίδια φάγων από το βακτηριακό κύτταρο-δωρητή στο κύτταρο-λήπτη. Η γενικευμένη μεταγωγή εμπλέκει την μεταφορά κάθε μέρους του γονιδιώματος-δωρητή στο κύτταρο-λήπτη είτε μέσω ενός λυτικού ή ενός λυσιγονικού φάγου, ενώ η εξειδικευμένη μεταγωγή περιλαμβάνει μόνο “ήπιους” φάγους, στους οποίους λίγα συγκεκριμένα γονίδια δυνάμενα να μεταφερθούν καταφέρνουν να μεταναστεύσουν στο κύτταρο-λήπτη. Κάποιοι “ήπιοι” φάγοι μπορούν επίσης να

προκαλέσουν μία αλλαγή στο φαινότυπο του μολυσμένου ξενιστή μέσω μίας γνωστής διαδικασίας που ονομάζεται λυσιγονική μετατροπή[61]. Τα βακτηριακά γονιδιώματα έχουν τα εξής ενδιαφέροντα στοιχεία: περιέχουν DNA ιϊκής προέλευσης το οποίο και αναλογεί περίπου στο 20% του γονιδιώματος, περιλαμβάνοντας πλήρως λειτουργικούς προφάγους (το DNA του φάγου που εισέρχεται και ενσωματώνεται στο χρωμόσωμα του βακτηριακού κυττάρου) ή απομεινάρια φάγων. Μελέτες έδειξαν ότι η εμπλοκή των φάγων στη μεταφορά ανθεκτικών στα αντιβιοτικά γονιδίων ειδικά στο περιβάλλον, σε μολυσμένες πηγές νερού[62,63] κλπ. μέσω σωματιδίων φάγων όπως και στο ανθρώπινο εντερικό σύστημα είναι σημαντική [Εικόνα 15.][64,65].



Εικόνα 15. Λύση του κυττάρου μετά από την ολοκλήρωση του λυσιγονικού κύκλου και συμμετοχή των φάγων στην μεταφορά διαφόρων γενετικών στοιχείων.

Εξαιτίας της εκπληκτικής τους ικανότητας να είναι φορείς ανθεκτικότητας και της παρουσίας τους σε διάφορου τύπου περιβάλλοντα, οι φάγοι θεωρούνται ως οι κατάλληλοι DNA μεταφορείς ακόμη και στις πιο δυσμενείς συνθήκες. Παράγοντες όπως είναι τα μεταθετά γενετικά στοιχεία, π.χ πλασμίδια, τρανσποζόνια, γονιδιωματικές νησίδες και τα ιντεγκρόνια, έχουν άμεση συσχέτιση με την ικανότητα των φάγων να μεταφέρουν γονίδια, αφού καταφέρνουν να προσλαμβάνονται από τους φάγους και να μετατίθενται στα βακτηριακά κύτταρα του περιβάλλοντος όπου βρίσκονται. Συνεπώς, μόλις ο φάγος καταφέρει και μεταφέρει τα γονίδια

ανθεκτικότητας με κάποιον από τους προαναφερόμενους τρόπους, η επιβίωση των βακτηριακών γονιδίων εξαρτάται από την ικανότητα των αλληλουχιών να ενσωματώνονται μέσα στο βακτηριακό γονιδίωμα. Εάν γονίδιο ανθεκτικότητας μετακινηθεί σε έναν εξειδικευμένο φάγο μεταγωγής, το συνολικό γονιδιωματικό του περιεχόμενο θα περιλαμβάνει και ένα γονίδιο ιντεγκράσης το οποίο θα χρησιμεύσει στην αύξηση των πιθανοτήτων μιας επιτυχημένης ενσωμάτωσης και εξελικτικής επιβίωσης[65].

Μεγάλος λόγος γίνεται τα τελευταία χρόνια για το σχετιζόμενο με τον άνθρωπο μικροβίωμα και με την σχέση που έχει το σύνολο των μικροοργανισμών που κατοικούν σε αυτό με μικροβιακά γονίδια που βρίσκονται στο περιβάλλον, και κατ'επέκταση με την γενικότερη υγεία του ανθρώπου. Με τον αριθμό των μικροβιακών γονιδίων να ξεπερνά αυτόν των ανθρώπων με την αναλογία να είναι ένα προς δέκα, είναι εύλογο γιατί αυτή η μικροβιακή κοινότητα μπορεί και επηρεάζει την ανθρώπινη υγεία. Στη θετική συμβολή των βακτηρίων εντάσσεται ο ρόλος των βακτηρίων σε διάφορες διατροφικές διαδικασίες και η αποτροπή της διείσδυσης παθογόνων. Λόγο της ευρείας χρήσης σκευασμάτων με σκοπό την υπερνίκηση βακτηριακών λοιμώξεων στο πεδίο της ιατρικής το ανθρώπινο μικροβίωμα έχει υποστεί ουσιαστικές αλλαγές στον τρόπο με τον οποίο ανταποκρίνεται στη θεραπεία. Ως συνέπεια της αλληλεπίδρασης μεταξύ της φυσιολογικής μικροχλωρίδας και του πολλαπλασιαζόμενου παθογόνου στο σημείο λοίμωξης, η ευκαιρία γενετικής ανταλλαγής ανάμεσα στα μικρόβια είναι μεγάλη. Ως εκ τούτου ένα λοιμογόνο παθογόνο μπορεί να αποκτήσει ανθεκτικότητα μέσω έμμεσης μεταφοράς γονιδίων αντοχής στα αντιβιοτικά από τα μικρόβια που υπάρχουν ως συμβιωτικοί οργανισμοί. Ο τρόπος για να ανακαλυφθεί αυτή η ανταλλαγή είναι η συσχέτιση της αλληλουχίας των σχετικών γενετικών μηχανισμών μεταξύ των δύο ομάδων (παθογόνων και φυσιολογικής εντερικής μικροχλωρίδας) με την χρήση της PCR[66]. Νέα δεδομένα, έχουν αναδείξει την επίδραση που έχουν στο μικροβίωμα του ανθρώπου μη σχετιζόμενες με τα αντιβιοτικά φαρμακευτικές ουσίες, οι οποίες αποδείχτηκε πως ανέστειλαν την ανάπτυξη τουλάχιστον ενός είδους βακτηρίων που κατοικούν εντερική μικροχλωρίδα. Οι πιθανότητες να είναι σε μεγαλύτερη έκταση αυτό το φαινόμενο είναι μεγάλες αφού οι πειραματικές διαδικασίες της συγκεκριμένης μελέτης περιελάμβαναν αυστηρά κριτήρια όσον αφορά την αποδοχή της εγκυρότητας των αποτελεσμάτων και περιορισμένο αριθμό βακτηριακών στελεχών που

αξιολογήθηκαν. Συνεπώς, η προώθηση της εμφάνισης σημείων ανθεκτικότητας στα αντιβακτηριακά-αντιβιοτικά, εξ αιτίας διάφορων μη-αντιβιοτικών σκευασμάτων, είναι ένα γεγονός που προκαλεί γενικότερη ανησυχία αφού διαπιστώνουμε πως ανακαλύπτονται νέοι τρόποι μετεξέλιξης και αντίδρασης στο στρες που προκαλούν ενώσεις οι οποίες βρίσκονται στο περιβάλλον του εντέρου[67].

4. ΟΙ ΤΟΠΟΪΣΟΜΕΡΑΣΕΣ ΩΣ ΕΝΔΙΑΦΕΡΟΝΤΕΣ ΣΤΟΧΟΙ

4.1 ΕΙΔΗ ΠΡΟΚΑΡΥΩΤΙΚΩΝ DNA ΤΟΠΟΪΣΟΜΕΡΑΣΩΝ, ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΗΣ ΓΥΡΑΣΗΣ

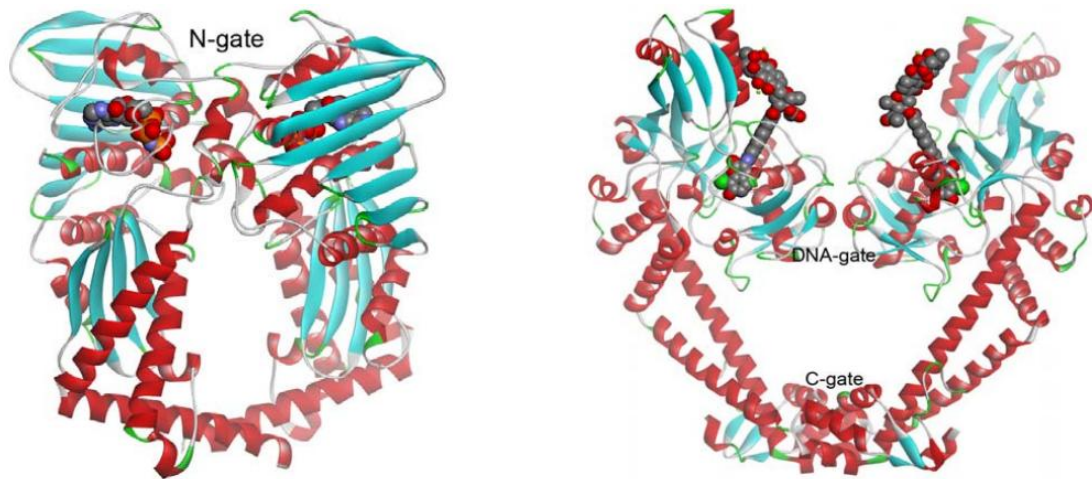
Οι DNA τοποϊσομεράσες θεωρούνται ως ένζυμα-κλειδιά λόγω του πολύ κρίσιμου ρόλου τους στις διαδικασίες αντιγραφής, μεταγραφής και ανασυνδυασμού του DNA. Οι τοποϊσομεράσες των προκαρυωτικών και των ευκαρυωτικών οργανισμών μοιράζονται παρόμοιες λειτουργίες, διαφέρουν όμως σημαντικά στην αλληλουχία και η δομή τους[68]. Οι τοποϊσομεράσες μεταβάλλουν το βαθμό ελίκωσης του DNA και χωρίζονται σε δύο κατηγορίες, τις τοποϊσομεράσες τύπου I και II. Οι τοποϊσομεράσες τύπου I επιτελούν το ρόλο τους επιφέροντας τομή στον ένα κλώνο του DNA ενώ οι τοποϊσομεράσες τύπου II, προκαλούν τομή και στους δύο κλώνους κατά τη διάρκεια της διαδικασίας[69,70]. Κάθε οικογένεια διακρίνεται σε υποοικογένειες. Κάθε βακτήριο έχει το λιγότερο από ένα τύπου κάθε είδους τοποϊσομεράσης IA και IIA τοποϊσομεράση ώστε να επιτελεί τις σχετικές λειτουργίες του [71]. Στον προκαρυωτικό μικροοργανισμό *E. coli*, για παράδειγμα, υπάρχουν τεσσάρων ειδών DNA τοποϊσομεράσες: δύο είναι τύπου I (τοποϊσομεράση I και III), και δύο τύπου II (DNA γυράση και τοποϊσομεράση IV)[72].

Κάθε τύπος τοποϊσομεράσης διακρίνεται από συγκεκριμένα χαρακτηριστικά που τον κάνουν να ξεχωρίζει από τους άλλους. Συνεπώς, οι τοποϊσομεράσες της υποοικογένειας **τύπου IA** έχουν την ιδιαιτερότητα ότι είναι στην συντριπτική τους πλειοψηφία μονομερείς και κόβουν την έλικα του DNA με ομοιοπολική σύνδεση του 5' άκρου της μίας DNA έλικας μέσω ενός φωσφοδιεστερικού δεσμού με την τυροσίνη του ενεργού κέντρου του ενζύμου. Ακόμη, όλες χρειάζονται δισθενές μαγνήσιο (Mg^{2+}) για να δράσουν, δρουν σε πλασμίδια που περιέχουν αρνητικές, και όχι θετικές, υπερελικόσεις, και καταλύουν την υπερελίκωση, τη χαλάρωση και τη διασύνδεση μονόκλωνων κυκλικών μορίων. Μέλη της τύπου IA υποοικογένειας ενζύμων διαφέρουν σχετικά με το βαθμό αρνητικής υπερελίκωσης που απαιτείται ώστε το

DNA να γίνει ένα αποτελεσματικό υπόστρωμα σε συνθήκες *in vitro*. Ο βαθμός της αρνητικής υπερελίκωσης που απαιτείται αντικατοπτρίζει το βαθμό στον οποίο τα ένζυμα μπορούν να διευκολύνουν το άνοιγμα ενός δίκλωνου μορίου DNA. Στη περίπτωση του *E. coli*, για παράδειγμα, η τοποϊσομεράση I αποτρέπει την εκτεταμένη αρνητική υπερελίκωση μόνο όταν ξεπεραστεί σε μεγάλο βαθμό αυτή και επεμβαίνει έπειτα έτσι ώστε να χαλαρώσει το DNA με σκοπό να επιστρέψει στα φυσιολογικά επίπεδα υπερελίκωσης τα οποία είναι τα βελτιστά για την εύρυθμη γονιδιακή λειτουργία[70].

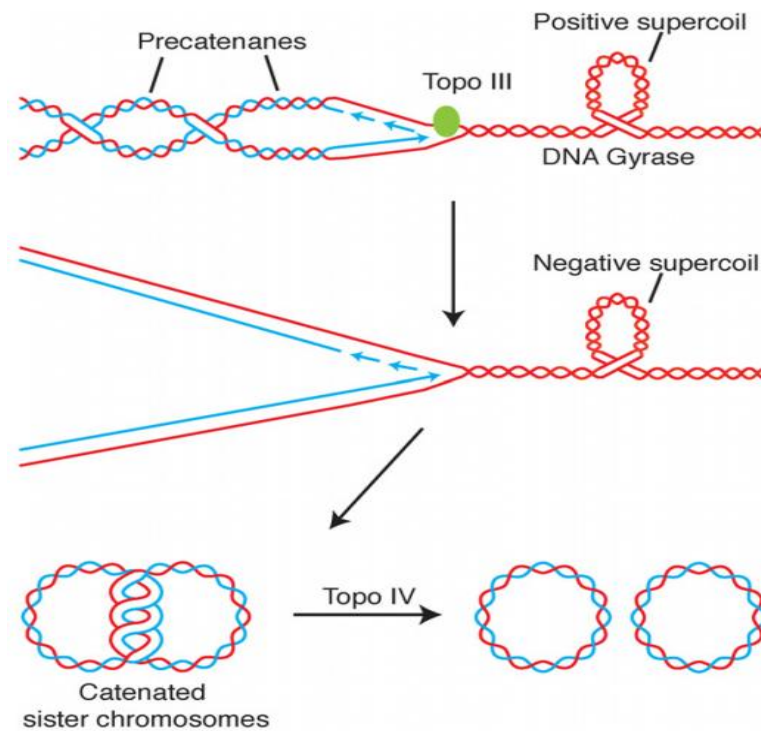
Ιδιαίτερη σημασία παρουσιάζει η DNA γυράση γνωστή και ως τύπου II τοποϊσομεράση, η οποία εκτός του ότι επιτελεί ως λειτουργία την χαλάρωση του DNA όπως κάνουν όλες οι τοποϊσομεράσες, έχει την ικανότητα να εισάγει και αρνητικές υπερελικώσεις μπροστά από το σημείο της διχάλας αντιγραφής μέσω μιας αντίδρασης η οποία απαιτεί την υδρόλυση του ATP και κατ'αυτόν το τρόπο επιτυγχάνει αποσυμφόρηση της πίεσης που δημιουργείται λόγω της στρεπτικής ροπής κατά τη διάρκεια της αντιγραφής.

Δομικά, η DNA γυράση είναι ένα τετραμερές μόριο που αποτελείται από δύο GyrA και άλλες δύο GyrB υπομονάδες οι οποίες σχηματίζουν ένα A_2B_2 σύμπλεγμα στην ενεργή μορφή του ενζύμου. Μέχρι σήμερα δεν έχει γίνει κρυσταλλογραφική μελέτη της συνολικής δομής της γυράσης, ωστόσο διάφορα τμήματα αυτής έχουν κρυσταλλωθεί και μελετηθεί. Σε αυτές τις τρισδιάστατες δομές έχουν αναγνωρίσει τρεις πύλες στη γυράση, οι οποίες φέρουν το όνομα πύλη-αζώτου (N-gate), πύλη-DNA (DNA-gate) και πύλη-άνθρακα (C-gate) που ανοίγουν και κλείνουν διαδοχικά ώστε με αυτό το τρόπο να επιτρέψουν το πέρασμα του δίκλωνου DNA σε διαφορετικά στάδια του καταλυτικού κύκλου. Ποιο αναλυτικά, η N-gate σχηματίζεται από τις δύο υπομονάδες GyrB, οι οποίες προσδένονται με το ATP, ενώ τα αμινοτελικά τμήματα των GyrA υπομονάδων σχηματίζουν τη DNA-gate και τη C-gate [Εικόνα 16.][73,74].



Εικόνα 16. Η 3D αναπαράσταση της πύλης-αζώτου, πύλης-άνθρακα και αυτής του DNA στην DNA γυράση.

Οι πληροφορίες που υπάρχουν για τις τοποϊσομεράσες III έχουν προέλθει από πειραματικές διαδικασίες που έχουν γίνει *in vitro*, με συνέπεια η πλήρη γνώση για τη λειτουργία της *in vivo* να εκλείπει σε σημαντικό βαθμό. Το ένζυμο φέρει την ιδιότητα της στενής δέσμευσης σε μονόκλωνο DNA και δεν εμφανίζει την ικανότητα τοπικής εκτόνωσης του δίκλωνου DNA ώστε να δημιουργήσει ένα σημείο δέσμευσης για να συμβεί η κατάλυση της αντίδρασης. Το ένζυμο έχει τη δυνατότητα να διαχωρίζει αποτελεσματικά συζευγμένα κυκλικά μόρια DNA όπως αυτά που προκύπτουν από την αντιγραφή κυκλικών DNA μορίων τα οποία έχουν μικρά κενά, αλλά είναι ταυτόχρονα πολύ φτωχή στο να χαλαρώνει υπερελικώσεις δείχνοντας με αυτόν τον τρόπο πως είναι απίθανο η ίδια να μπορεί να συνεισφέρει στη συντήρηση της υπερελίκωσης μέσα στο κύτταρο. Από την άλλη πλευρά, η μετάβαση της διχάλας αντιγραφής σε περίπτωση απουσίας της τοποϊσομεράσης IV μπορεί να υποστηριχθεί από την τοποϊσομεράση III, και να δημιουργήσει δύο ασύνδετα αδελφά χρωμοσώματα, με την τοποϊσομεράση III να συμμετέχει και στο διαχωρισμό του DNA [Εικόνα 17][72].



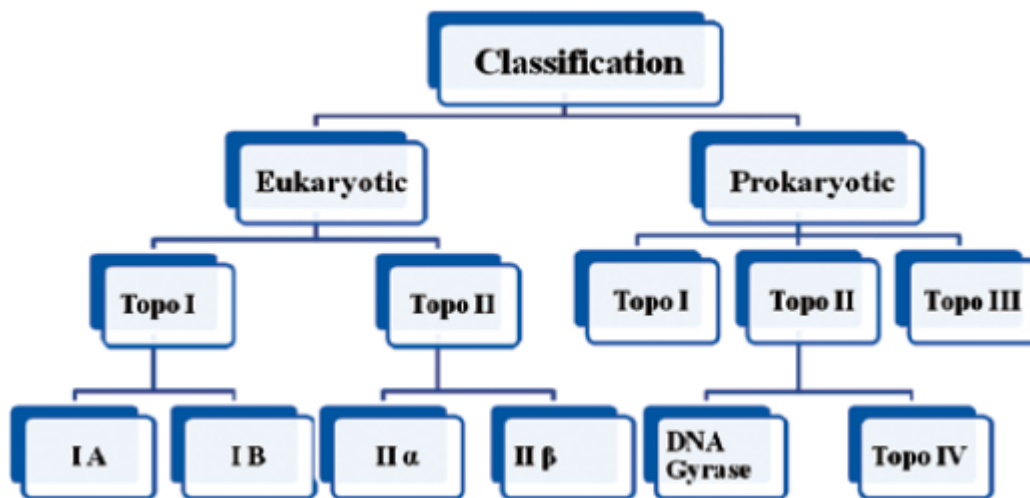
Εικόνα 17. Αναπαράσταση της λειτουργίας της τοποϊσομεράσης III και της τοποϊσομεράσης IV στο DNA κατά τη διάρκεια της αντιγραφής, καθώς επίσης στον διαχωρισμό των δύο αδελφών χρωματίδων μετά από την ολοκλήρωση αντιγραφής τους.

Η τοποϊσομεράση IV είναι εξίσου απαραίτητη για το σωστό χρωμοσωμικό διαχωρισμό και παίζει σημαντικό ρόλο στη συντήρηση και σωστή ρύθμιση της DNA υπερελίκωσης στα βακτήρια. Αποτελείται από δύο πρωτεϊνικές υπομονάδες όπου η μία είναι η ParC και η άλλη είναι η ParE οι οποίες παρουσιάζουν ομοιότητες με τις δύο υπομονάδες της DNA γυράσης, με την ParE και την GyrB να έχουν παρόμοιες δομές[75]. Η λειτουργία της είναι εξαρτώμενη από την μορφή του DNA υποστρώματος[76]. Είναι πιο δραστική σε περιπτώσεις θετικά υπερελικωμένου DNA, εμφανίζοντας προτίμηση στις στροφές προς τα αριστερά προκαλώντας τελικά την πλήρη χαλάρωση. Μπορεί επίσης να αποσυνδέσει δεξιού τύπου “πλεξούδες” αλλά αυτό συμβαίνει μόνο όταν αυτές υπερελικώνονται ώστε να σχηματίσουν αριστερόστροφους “κόμπους” και τα σημεία κοπής της φαίνεται να υπάρχουν σε μικρότερη κλίμακα σε αντίθεση με την DNA γυράση που παρουσιάζει πολλαπλούς στόχους πάνω στο χρωμόσωμα του *E. coli*. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός πως

η δράση της τοποϊσομεράσης IV δεν είναι απαραίτητη για τη διαδικασία της αντιγραφής αλλά είναι δέουσα σημασίας για το διαχωρισμό του χρωμοσώματος όπου εικάζεται πως η ρύθμιση της τοποϊσομεράσης IV και η προσβασιμότητα της πρωτεΐνης στα χρωμοσωμικά διμερή είναι ένας σημαντικός παράγοντας ελέγχου του διαχωρισμού των χρωματίδων[77].

4.2 ΕΥΚΑΡΥΩΤΙΚΕΣ DNA ΤΟΠΟΪΣΟΜΕΡΑΣΕΣ ΚΑΙ Η ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΟΥΣ

Οι DNA τοποϊσομεράσες των ευκαρυωτικών οργανισμών είναι γνωστό πως έχουν κάποιες ομοιότητες στο τρόπο δράσης με αυτές των προκαρυωτικών, με μικρές εξαιρέσεις[70]. Στην περίπτωση των ανθρώπινων τοποϊσομερασών έχουμε τις TOP1, TOP1mt, TOP2α, TOP2β, TOP3α και TOP3β, με την κάθε μία να παρουσιάζει παρόμοιες αλλά και ξεχωριστές λειτουργίες. Οι TOP2α και TOP2β χαλαρώνουν το αρνητικά υπερελικωμένο DNA, αλλά ενώ η TOP2α είναι απολύτως απαραίτητη για το διαχωρισμό του χρωμοσώματος, η TOP2β είναι απαραίτητη για τη μεταγραφή στα διαφοροποιημένα, μη-διαιρούμενα κύτταρα. Μέσω της δημιουργίας συμπλεγμάτων διαχωρισμού χωρίς πολύ αυστηρές προϋποθέσεις όσον αφορά το τμήμα της DNA αλληλουχίας, οι τοποϊσομεράσες του ανθρώπου δρουν όπου εμφανιστεί σχετικό τοπολογικό πρόβλημα. Οι τοποθεσίες όπου βρίσκονται τα ένζυμα μέσα στο κύτταρο είναι άλλες φορές συγκεκριμένες και άλλες πολλαπλές. Για παράδειγμα, οι δύο τύπου 1B τοποϊσομεράσες έχουν αποκλειστικές κυτταρικές τοποθεσίες με το πυρήνα να είναι το μέρος για την TOP1 και τα μιτοχόνδρια να είναι για την TOP1mt, ενώ οι TOP2α, TOP2β και TOP3α είναι παρούσες και στους πυρήνες αλλά και στα μιτοχόνδρια [Εικόνα 18][78].



Εικόνα 18. Κατάταξη και διαχωρισμός των ευκαρυωτικών και προκαρυωτικών τοποϊσομερασών

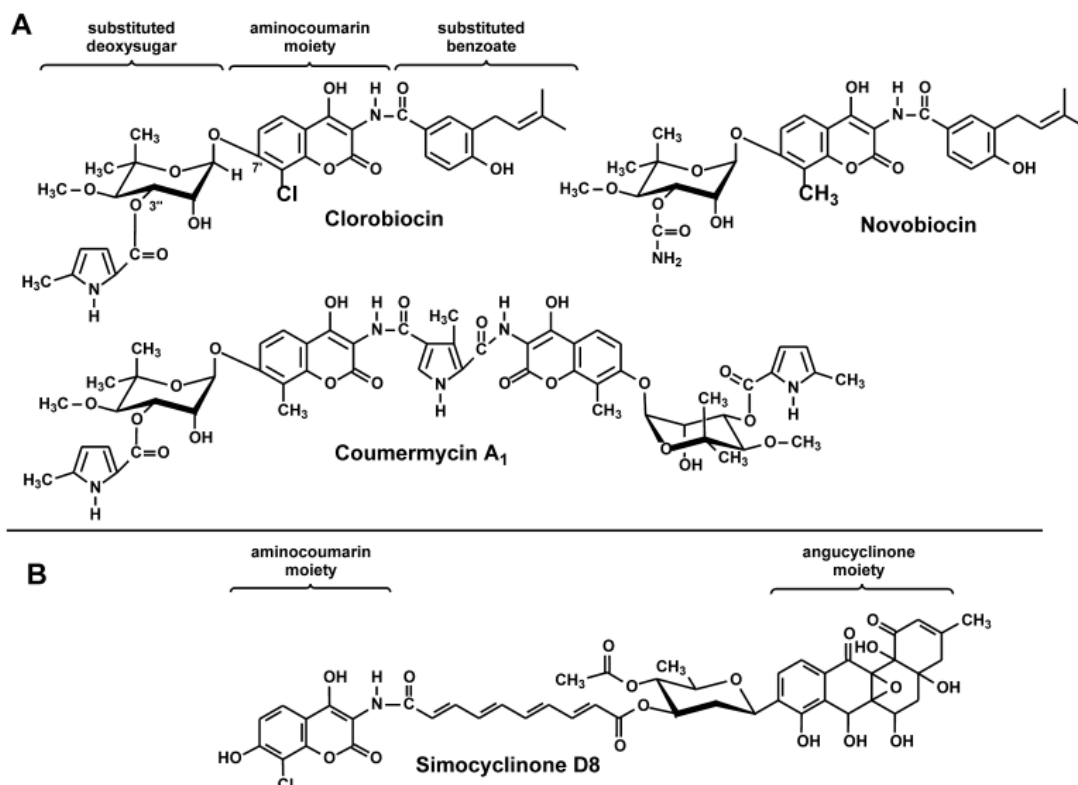
4.3 ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΠΡΟΚΑΡΥΩΤΙΚΩΝ ΤΟΠΟΪΣΟΜΕΡΑΣΩΝ

Η καίρια λειτουργία που επιτελούν οι τοποϊσομεράσες και στα ευκαρυωτικά αλλά και στα προκαρυωτικά κύτταρα, όντας βασικοί πυλώνες ρύθμισης της γονδιωματικής σταθερότητας είχε σαν συνέπεια την εκτενή μελέτη τους και την αξιοποίησή τους ως φαρμακευτικών στόχων[79]. Έτσι, έχουν αναπτυχθεί διάφορες σύνθετες χημικές ενώσεις με αντιβακτηριακή δράση και στόχο τις DNA τοποϊσομεράσες των προκαρυωτικών μικροοργανισμών[80]. Οι βακτηριακές τοποϊσομεράσες τύπου ΙΙΑ από τη δεκαετία του '60 έχουν υπάρξει στόχοι αντιβιοτικών όπως η νοβομπιοκίνη, η κουμερμυκίνη (αμινοκουμαρίνες) και το ναλιδιξικό οξύ (κινολόνη).

Οι **φλουοροκινολόνες** ανήκουν στους αναστολείς της DNA γυράσης 2^{ης} γενιάς. Κάποια παραδείγματα φλουοροκινολονών είναι η νορφλοξασίνη και η σιπροφλοξασίνη, αντιβιοτικά που συνταγογραφούνται ακόμα πολύ συχνά σε ειδικού

τύπου λοιμώξεις όπως αυτές του ουροποιητικού. Στόχος των κινολονών είναι η υπομονάδα GyrA της τοποϊσομεράσης IV και η ομόλογή της υπομονάδα ParC. Οι φλουοροκινολόνες αναστέλλουν κυρίως την αντιγραφή του DNA αλληλεπιδρώντας με το σύμπλοκο της DNA γυράσης με το μόριο του DNA και προάγοντας μη αναστρέψιμες οξειδοαναγωγικές βλάβες στο DNA. Η οξείδωση του DNA οδηγεί σε καταστροφή των βακτηριακών κυττάρων. Ωστόσο, ορισμένα κύτταρα επιβιώνουν ανταποκρινόμενα σε μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA.

Οι **αμινοκουμαρίνες** νοβομπιοκίνη, κουμερμυκίνη A1 και κλορομπιοκίνη ως φυσικά προϊόντα έχουν την ικανότητα να αναστέλλουν τη σύνθεση του DNA στα βακτήρια, με επιτυχημένη χρήση αυτών σε κλινικό επίπεδο στο βακτήριο *Staphylococcus aureus* και μεγάλη δραστηριότητα σε άλλα Gram-αρνητικά βακτήρια [Εικόνα 19.][81]. Πιο ειδικά, οι αμινοκουμαρίνες συνδέονται με το τμήμα πρόσδεσης του ATP της GyrB υπομονάδας της βακτηριακής γυράσης και της ParE υπομονάδας της βακτηριακής τοποϊσομεράσης IV και αποτελούν ανταγωνιστικούς αναστολείς της δράσης ATPάσης. Η προσπάθεια ανάπτυξης νέων αναστολέων έχει σκοπό τη δημιουργία διπλής δράσης αναστολέων της ATPάσης της GyrB και ParE υπομονάδας της γυράσης και τοποϊσομεράσης IV αντίστοιχα. Οι σιμοκυκλινόνες επίσης φέρουν αμινοκουμαρινικό μέρος που στοχεύει στη DNA γυράση[82].



Εικόνα 19. Τέσσερα από τα πιο γνωστά αμινοκουμαρινικά αντιβιοτικά

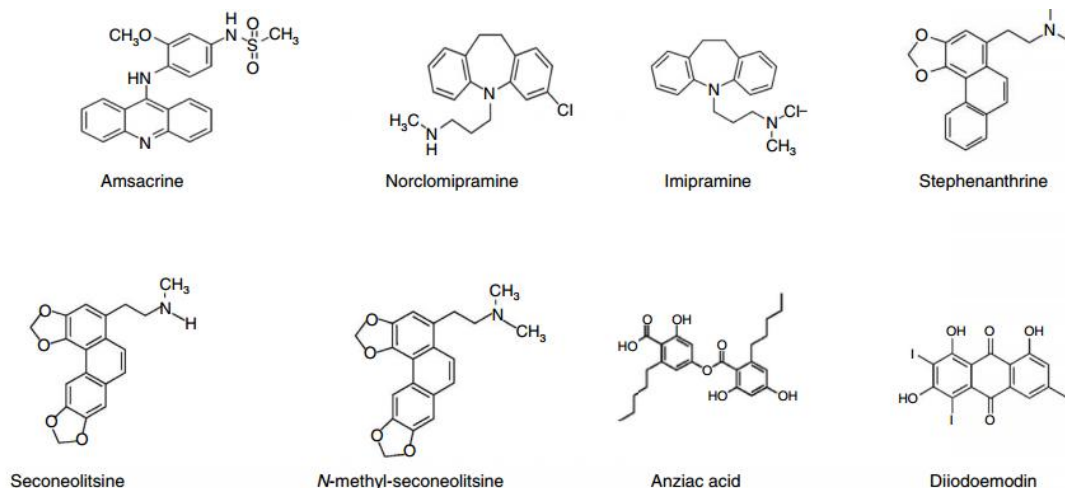
Οι τύπου II τοποϊσομεράσες είναι εξαιρετικοί στόχοι των αντιβιοτικών για τους εξής λόγους:

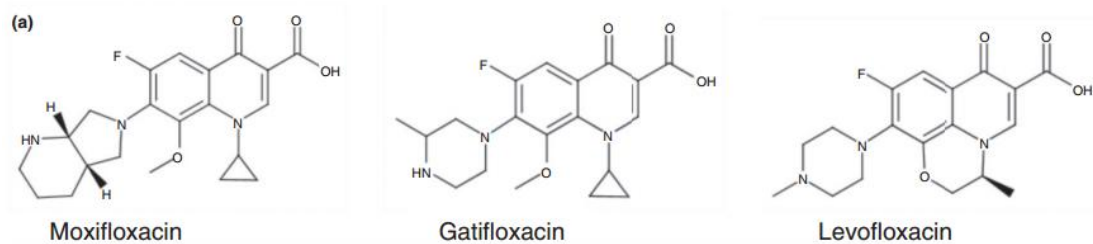
1. ενώσεις που στοχεύουν σε αυτές έχουν βακτηριοκτόνο και όχι απλά βακτηριοστατική δράση
2. είναι απαραίτητες σε όλα τα βακτήρια
3. οι αναστολείς τους δεν επηρεάζουν τα αντίστοιχα ανθρώπινα ένζυμα
4. ο υψηλός βαθμός ομολογίας ανάμεσα στη γυράση και στην τοποϊσομεράση IV έχει ως αποτέλεσμα να αναστέλεται ταυτόχρονα η δράση και των δύο ενζύμων με αποτέλεσμα την ευρεία βακτηριοκτόνο δράση με τη χρήση ενός και μόνο φαρμάκου[71,79,83].

Η **τοποϊσομεράση I**, ένα ένζυμο τύπου IA, όντας απαραίτητο και αυτό για τη βιωσιμότητα των βακτηρίων είναι επίσης ιδανικός στόχος των αντιβακτηριακών φαρμάκων. Δυστυχώς όμως, παρ'όλο που η δομή της τοποϊσομεράσης I έχει

διευκρινισθεί από τη δεκαετία του '70, μέχρι σήμερα δεν έχει επιτευχθεί η αναγνώριση ειδικών αναστολέων για την τοποϊσομεράση I και η δυνατότητα του ως φαρμακευτικού στόχου έχει αναδειχτεί σχετικά πρόσφατα με υποψήφιες ενώσεις τα φαινανθρένια, δυβενζιμιδαζόλες και τα ανζιαϊκά οξέα. Στο *E. coli* μετά από υψηλής κλίμακας αξιολόγηση ενώσεων, μόνο μία ένωση **φαινανθρενίου** έχει αναγνωριστεί ως αποτελεσματικός αναστολέας του ενζύμου και αυτή είναι το στεφαινανθρένιο και πιο πρόσφατα η σεκονεολιτσίνη και η N-μέθυλο-σεκονεολιτσίνη.

Επίσης, στην περίπτωση του **μυκοβακτηριδίου της φυματίωσης** έχουν βρεθεί μικρομοριακοί αναστολείς οι οποίοι έχουν παρόμοια δράση με την σεκονεολιτσίνη και την N-μέθυλο-σεκονεολιτσίνη. Τρεις ενώσεις που έχουν αναγνωριστεί είναι η m-AMSA (η αμσακρίνη), η οποία είναι γνωστή και για τη δράση της στις τύπου II τοποϊσομεράσες, η ιμιπραμίνη και η νορκλομιπραμίνη οι οποίες χρησιμοποιούνται και ως αντικαταθλιπτικά. Αποτελεσματικές χημικές ενώσεις κατά της γυράσης του μυκοβακτηριδίου της φυματίωσης αποτελούν η γατιφλοξασίνη και η μοξιφλοξασίνη που είναι η πιο πολλά υποσχόμενη φλουοροκινολόνη που στοχεύει στη πολυανθεκτική φυματίωση (multidrug resistant tuberculosis) [Εικόνα 20][82,84].



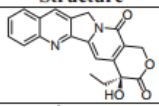
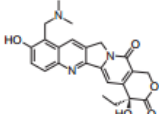
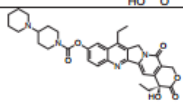
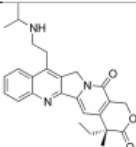
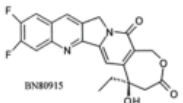
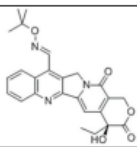


Εικόνα 20. Αποτελεσματικές ενώσεις κατά της τοποϊσομεράσης I και της DNAγυράσης

4.4 ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΕΥΚΑΡΥΩΤΙΚΩΝ ΤΟΠΟΪΣΟΜΕΡΑΣΩΝ

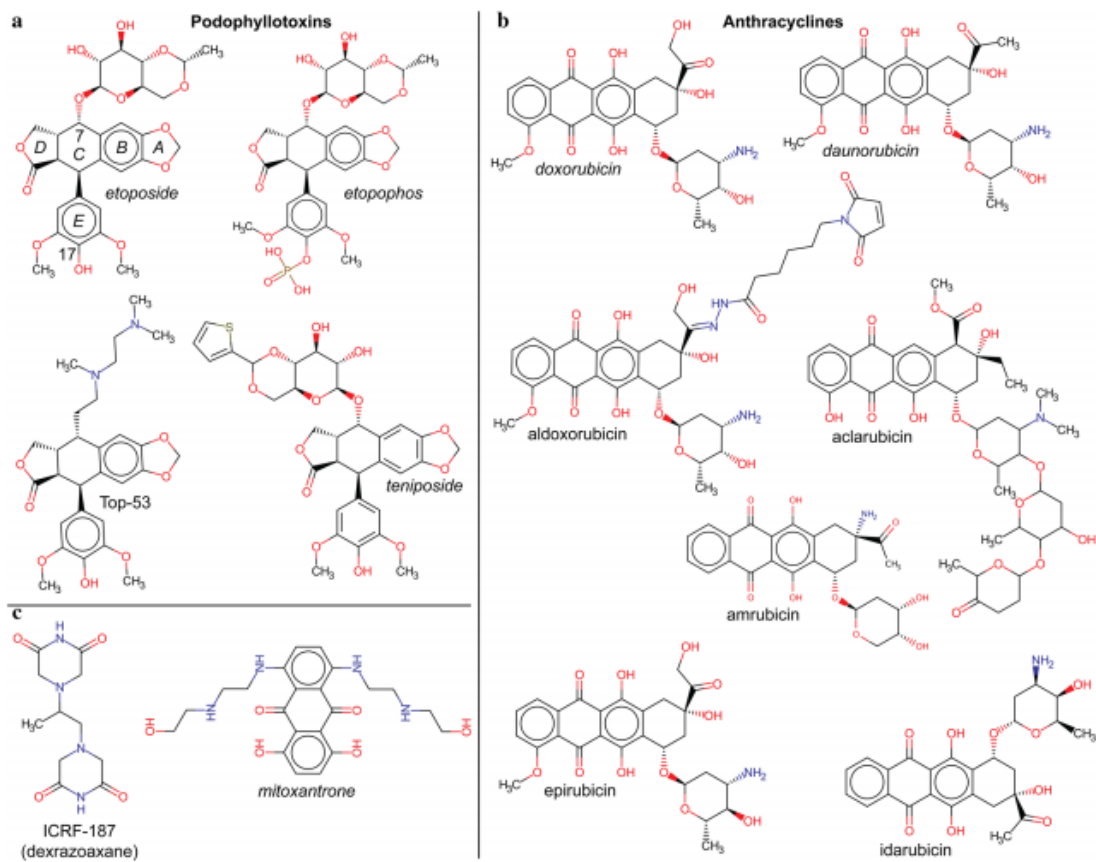
Εκτός από τις βακτηριακές τοποϊσομεράσες και τα ευκαριωτικά ένζυμα έχουν αποτελέσει φαρμακευτικούς στόχους για τη δημιουργία όμως αντικαρκινικών φαρμάκων.

Η **καμπτοθεκίνη (CPT)** είναι ένας σημαντικός φαρμακευτικός παράγοντας αφού έχει χρησιμοποιηθεί για την αντιμετώπιση του καρκίνου, αν και αργότερα αποσύρθηκε λόγω έντονων παρενεργειών. Έχοντας ως στόχο την τοποϊσομεράση I (TOP1) εκφράζει κυτταροτοξικότητα στα καρκινικά κύτταρα με αρκετά επιτυχημένη δράση[79]. Πολύ πιο αποτελεσματικά και ασφαλή παράγωγα της CPT έχουν κυκλοφορήσει στην αγορά όπως είναι η τοποτεκάνη και η ιρινοτεκάνη και έχουν χρησιμοποιηθεί για τη θεραπεία διαφόρων μορφών καρκίνου όπως είναι ο ορθοπρωκτικός, των ωοθηκών και του πνεύμονα. Και άλλοι αναστολείς τοποϊσομερασών βρίσκονται στο στάδιο της κλινικής δοκιμής, με τα πιο πολλά υποσχόμενα να είναι και πάλι παράγωγα της CPT όπως η διφλομοτεκάνη και η S39625, ενώ οι ινδενοϊσοκινολίνες, οι ινδολοκαρβαζολές και οι φαινανθρολίνες φαίνεται επίσης να έχουν καλά αποτελέσματα [Εικόνα 21] [85].

Name	Structure	Clinical Trial	Malignancy
Camptothecin		Discontinued	
Topotecan (Hycamtin)		FDA approved	Ovarian cancer, SCLC
Irinotecan (Camptosar/CPT-11)		FDA approved	Colorectal
Belotecan (CKD-602)		Approved (South Korea)	
Diflomotecan (BN80915)		Phase II (Ipsen)	Advanced metastatic cancer, SCLC
Gimatecan (ST-1481, LBQ707)		Phase I/II (Sigma-Tau, Novartis)	Advanced solid tumors

Εικόνα 21. Ενώσεις που αποτελούν παράγωγα της καμπτοθεκίνης

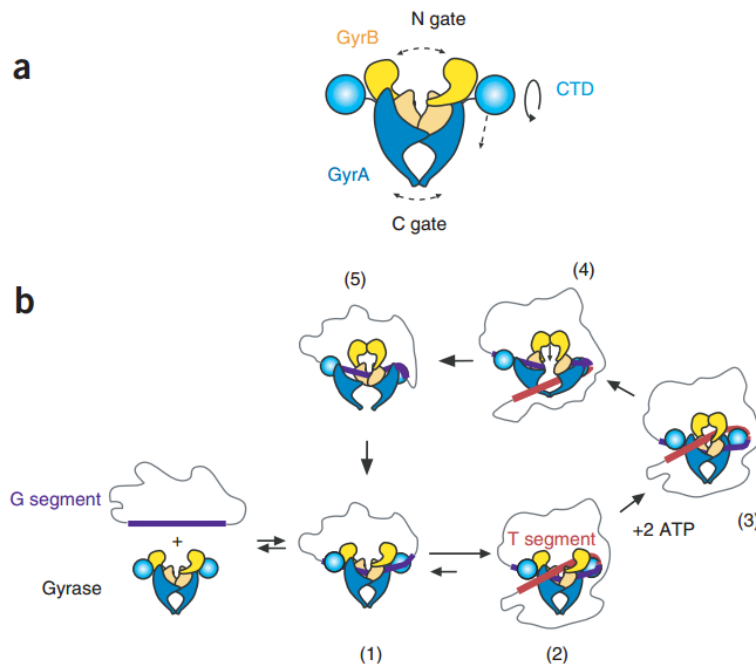
Όσον αφορά τους αναστολείς της τοποϊσομεράσης τύπου ΙΑ, πάλι στα μέσα της δεκαετίας του 1960, αναπτύχθηκαν δύο ανάλογα της ποδοφυλλοτοξίνης, η επιποδοφυλλοτοξίνη και η ετοποσιδίη (χημικοθεραπευτικό καρκίνου) και η συγγενής αυτής τενιποσιδίη, οι οποίες παρουσιάζουν αντινεοπλαστική δράση. Η δράση της ετοποσιδίου ειδικότερα ομοιάζει με αυτή της CPT, η οποία αναστέλει την TOP1B, με το να σταθεροποιεί την τοποϊσομεράση ΙΙ στα ενδιάμεσο στάδιο αποτρέποντας την επανασύνδεση των κλώνων του DNA γεγονός που προκαλεί τον κυτταρικό θάνατο. Άλλες κλάσεις φαρμάκων που έχουν πάρει την έγκριση από τον FDA και χαρακτηρίζονται ως αναστολείς τοποϊσομεράσεων τύπου ΙΙ αποτελούν τα αντιβιοτικά ανθρακυκλίνες, η δαυνορουμπικίνη, αδριαμυκίνη και τα ανάλογα τους που είναι η ιδαρουμπικίνη και επιρουμπικίνη αντίστοιχα. Η δράση τους σχετίζεται με τη δυνατότητά τους να συμπλέκονται με το δίκλωνο DNA ενώ επιπλέον επεμβαίνουν στην κυκλική διαδικασία κοπής-συγκόλλησης που επιτελεί η DNA τοποϊσομεράση ΙΙ. Μεγαλύτερη αντικαρκινική ικανότητα δείχνει η δοξορουμπικίνη (εικόνα τέσσερα στο πέπερι cuya), όμως οι παρενέργειές της είναι σοβαρές. [Εικόνα 22.][86].



Εικόνα 22. Οι ποδοφυλλοτοξίνες και ανθρακυκλίνες, με δράση έναντι της τοποϊσομεράσης II.

5. ΔΟΜΗ DNA ΓΥΡΑΣΗΣ ΤΟΥ E.COLI

Η DNA γυράση του *Escherichia coli* είναι ένα ετεροτετραμερές το οποίο αποτελείται από δύο υπομονάδες A και δύο υπομονάδες B, δομή που γράφεται και ως GyrA₂GyrB₂. Πειράματα που έχουν γίνει δείχνουν πως η γυράση συνδέεται με ένα τμήμα του DNA περίπου 140 βάσεων (bp) και στη συνέχεια το κόβει σε κοντινό σημείο στο κέντρο του με τρόπο που μοιάζει να είναι ATP-εξαρτώμενος. Η δέσμευση της γυράσης στο DNA μπορεί και σταθεροποιεί τις θετικές υπερελικώσεις που δημιουργούνται εξαιτίας του χειρόμορφου τυλίγματος του DNA γύρω από το καρβοξυ-τελικό τμήμα (C-terminal domain - CTD) των δύο GyrA υπομονάδων (GyrA - CTD). Από την άλλη, τα καρβοξυ-τελικά τμήματα της GyrB έρχονται σε άμεση αλληλεπίδραση με το DNA και τη GyrA, όπως επίσης τα αμινο-τελικά άκρα (N-terminal domain - NTD) της GyrB είναι υπεύθυνα για τη δέσμευση και υδρόλυση του ATP [Εικόνα 23][87].



Εικόνα 23. Στάδια δράσης της γυράσης

5.1 ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΚΡΥΣΤΑΛΛΟΓΡΑΦΙΚΩΝ ΔΟΜΩΝ ΤΗΣ DNA ΓΥΡΑΣΗΣ ΜΕ ΓΝΩΣΤΟΥΣ ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ

Ένας σημαντικός αριθμός πρωτεϊνικών δομών, της DNA γυράσης του *E. coli*, βρίσκονται καταχωρημένες στη βάση δεδομένων του Εθνικού Κέντρου Πληροφοριών Βιοτεχνολογίας των Η.Π.Α (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/structure/>). Πολλές από αυτές αποτελούν δομές συμπλόκων του ενζύμου με γνωστούς αναστολείς. Στον πίνακα που ακολουθεί παρατίθενται τα σημαντικότερα αμινοξέα της γυράσης που αλληλεπιδρούν με τους αναστολείς στα αντίστοιχα σύμπλοκα ενζύμου-αναστολέα που βρέθηκαν καταχωρημένα στη βάση. Ο εντοπισμός των αμινοξέων και το είδος των αλληλεπιδράσεων που προέκειψαν έγιναν με την εφαρμογή του υπολογιστικού λογισμικού LigPlot+.

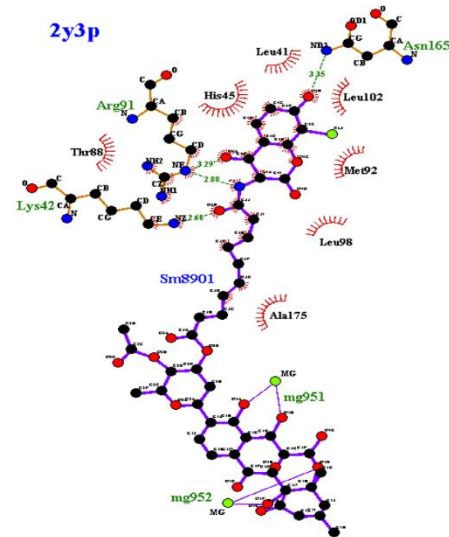
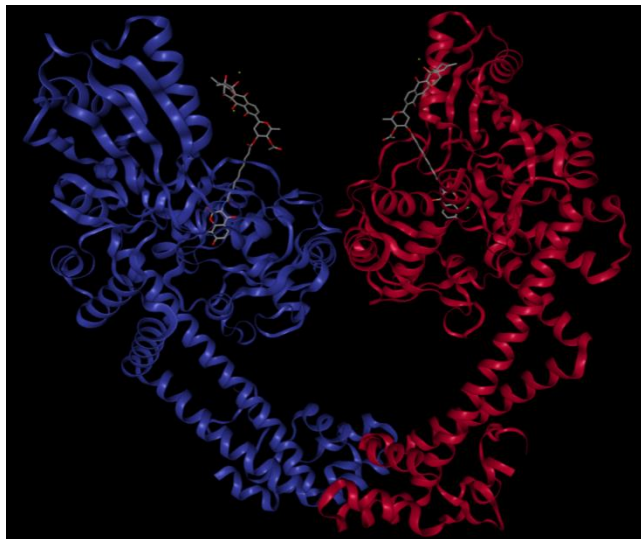
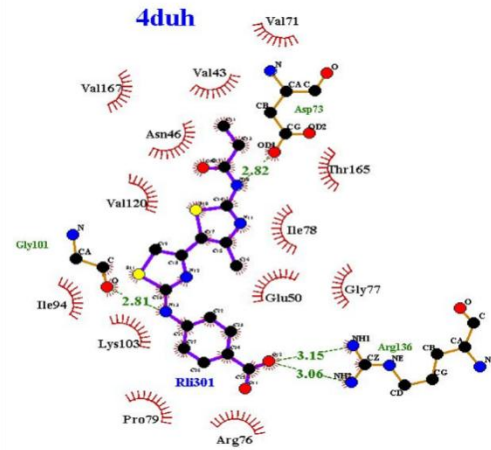
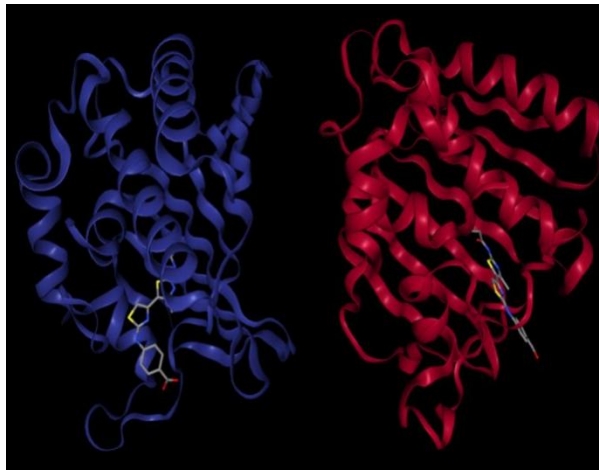
Από τη μελέτη των κρυσταλλογραφικών δομών των συμπλόκων του ενζύμου με αντιβιοτικά και γνωστούς αναστολείς προκύπτει επίσης ότι ορισμένες ενώσεις ενδέχεται να αλληλεπιδρούν με περισσότερες από μια υπομονάδες του ενζύμου[Πίνακας 2].




Πίνακας 2. Σημαντικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ αμινοξέων της DNA γυράσης του *E. coli* και γνωστών αναστολέων.

PDB ID - κωδικός πρωτεΐνης	Δεσμοί Υδρογόνου μεταξύ πρωτεΐνης - αναστολέα	Υδρόφοβες αντιδράσεις μεταξύ πρωτεΐνης - αναστολέα
4DUH (GyrB)	Asp73,Gly101,Arg136	Val171,Val43,Val167, Asn46,Val120,Ile94,Lys103, Pro79,Arg76,Thr165,Ile78 Glu50,Gly77
2Y3P(GyrB)	Arg91,Lys42,Asn165	Leu41,His45,Thr88, Leu102,Met92,Leu98,Ala175
1KZN(GyrB)	Asp73,Arg136	Val43,Asp49,Ile78, Ile90,Pro79,Val71,Thr165,

		Glu50,Ala47,Asn46,Arg76
5L3J(GyrB)	Asp73,Gly101,Arg136	Val171,Val43,Val167 Asn46,Val120,Ile94,Lys103, Pro79,Arg76,Thr165,Ile78, Glu50,Gly77
3G7E(GyrB)	Asn46,Asp73,Arg136	Val167,Val120,Met95 Ile78,Gly102,Phe104,Asp105 Pro79,Asp106,Leu130,Val143, Asp49,Ala47,Thr165,Gly77 Glu50,Arg76
4TMA*(GyrA ₂ B ₂)	Tyr515,Arg516, Asp481,Gln517,His505,Leu509 Phe777,Leu780	Met461,Leu509,Phe513,Phe777, Arg516 (426-464 QRDR μοτίβο αντίστασης στις κινολόνες)

Η δυνατότητα του συγκεκριμένου λογισμικού έγκειται, εκτός των άλλων, στο να αναπαριστά μοτίβα αλληλεπιδράσεων όπως δεσμούς υδρογόνου και υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις μεταξύ του χημικού αναστολέα και των αμινοξέων της πρωτεΐνης[88]. Η οπτικοποίηση σε 3D μορφή της κάθε καταχωρημένης δομής στην Τράπεζα Δεδομένων Πρωτεϊνών (Protein Data Bank - PDB) έγινε με τη χρήση του υπολογιστικού εργαλείου Poseview(<https://poseview.zbh.uni-hamburg.de/>), [Εικόνα 24-28][89,90].



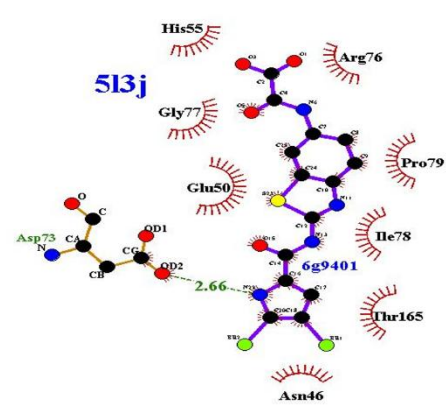
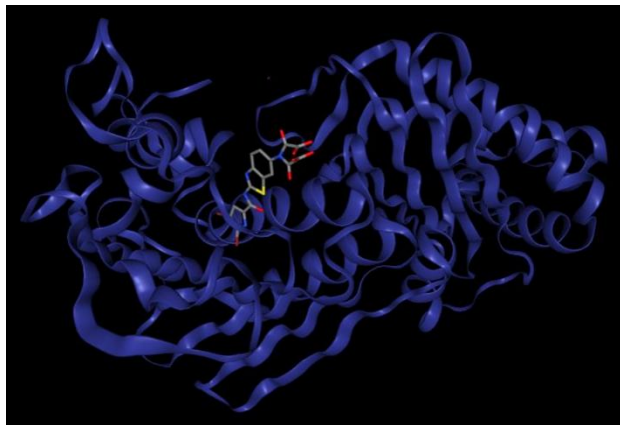
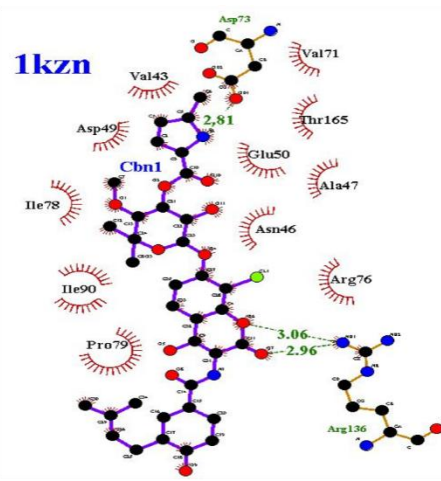
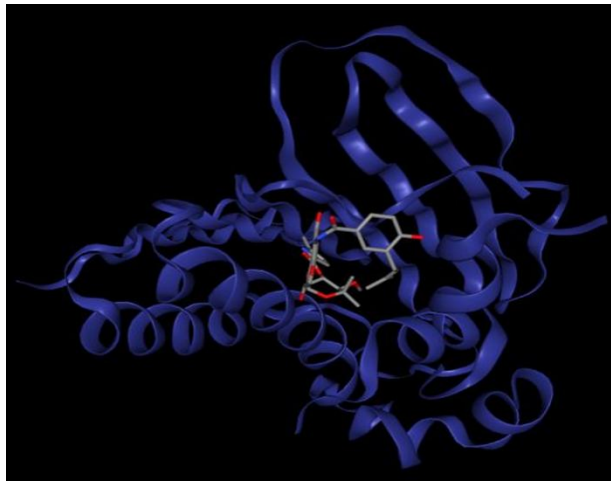
-  Δεσμοί ένωσης
-  Δεσμοί αμινοξέων
-  Δεσμοί υδρογόνου






Αμινοξέα πρωτεΐνης-στόχου εμπλεκόμενα σε υδρόφοβες αντιδράσεις

Αντίστοιχα άτομα που εμπλέκονται στις υδρόφοβες αντιδράσεις

Εικόνα 24. Δομές των καταχωρημένων στη PDB συμπλόκων της DNA γυράσης του *E. Coli* με αναστολείς με κωδικούς 4duh (επάνω) και 2y3p (κατω). Αριστερά σε κάθε δυάδα εικόνων βλέπουμε το εκάστοτε σύμπλεγμα αναστολέα-πρωτεΐνης σε τρισδιάστατη μορφή, και δεξιά σε δισδιάστατη αναπαράσταση δίνονται οι αλληλεπιδράσεις με τα αμινοξέα της πρωτεΐνης.



-  Δεσμοί ένωσης
-  Δεσμοί αμινοξέων
-  Δεσμοί υδρογόνου

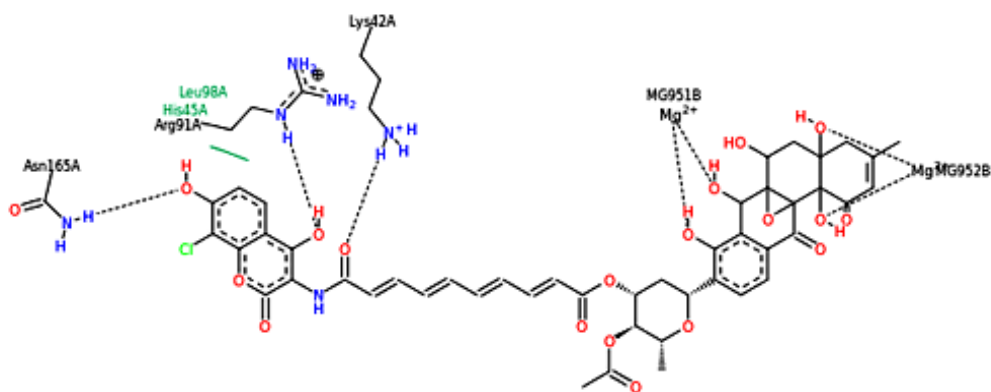
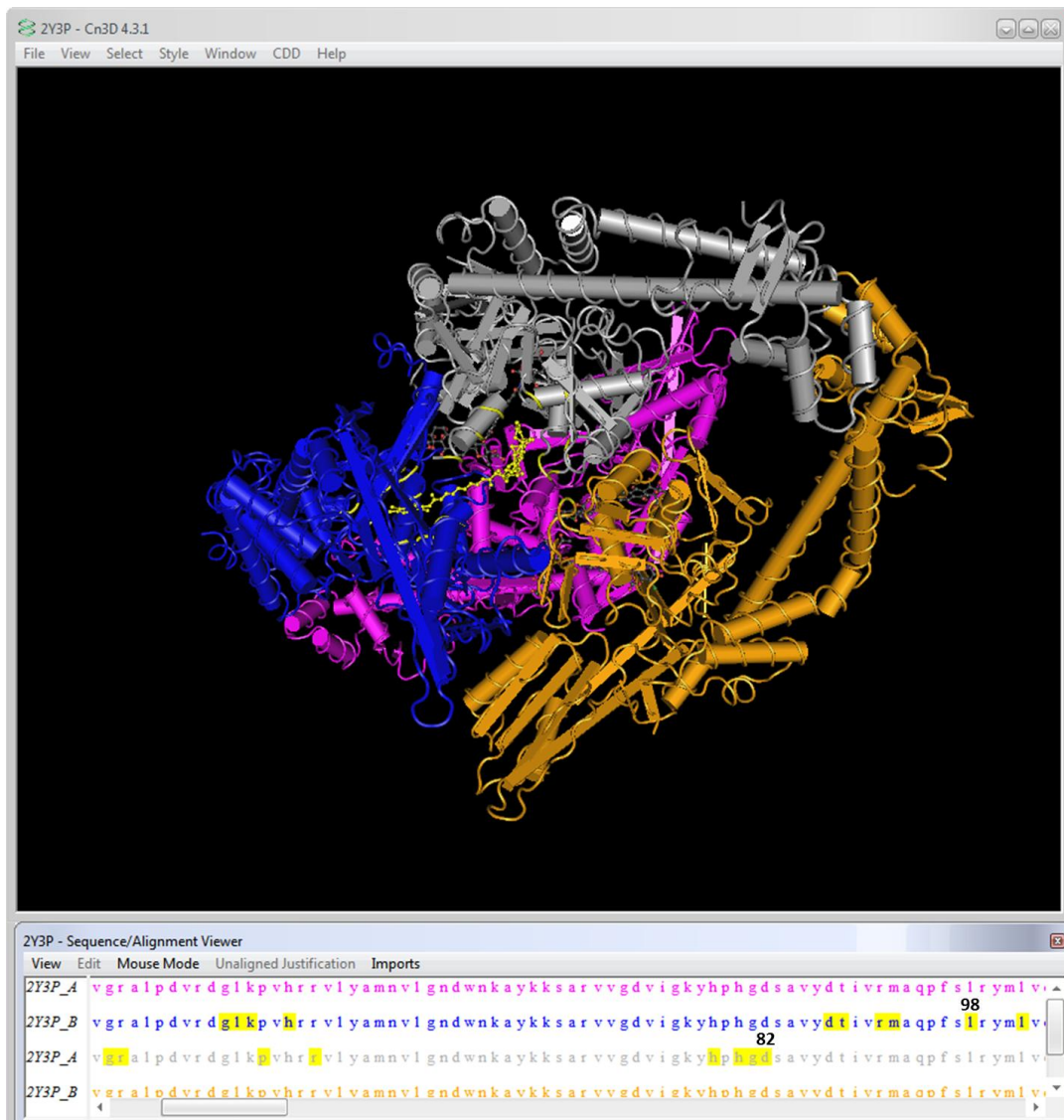


- Αμινοξέα πρωτεΐνης-στόχου εμπλεκόμενα σε υδρόφοβες αντιδράσεις
- Αντίστοιχα άτομα που εμπλέκονται στις υδρόφοβες αντιδράσεις

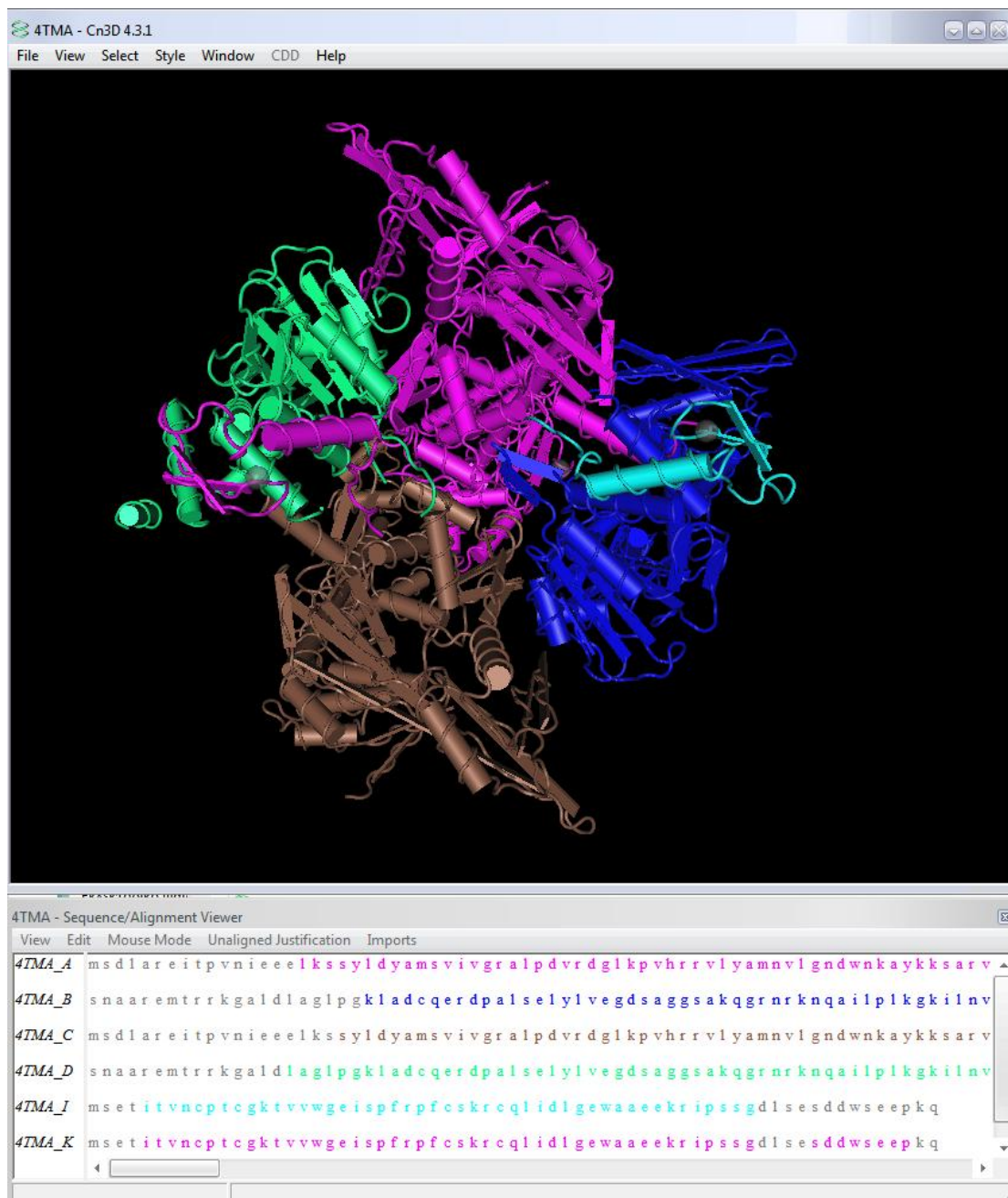
Εικόνα 25. Δομές των καταχωρημένων στη PDB συμπλόκων της DNA γυράσης του *E. Coli* με αναστολείς με κωδικούς 1kzn (επάνω) και 513j (κατω). Αριστερά σε κάθε δυάδα εικόνων βλέπουμε το εκάστοτε σύμπλεγμα αναστολέα-πρωτεΐνης σε τρισδιάστατη μορφή, και δεξιά σε δισδιάστατη αναπαράσταση δίνονται οι αλληλεπιδράσεις με τα αμινοξέα της πρωτεΐνης.



Εικόνα 26. Σύμπλοκο της γυράσης του *E.Coli* (PDB ID 4Z2E) με αναστολέα. Με κίτρινο επισημαίνονται αμινοξέα σε απόσταση 3,5 Å από τον αναστολέα.



Εικόνα 27. Σύμπλοκο της γυράσης του *E.Coli* (PDB ID 2Y3P) με αντιβιοτικό simocyclinor. Με κίτρινο επισημαίνονται αμινοξέα σε απόσταση 5 Å από τον αναστολέα.



Εικόνα 28. Δομή 4TMA του καταχωρημένου στη PDB συμπλόκου της DNA γυράσης του *E. Coli* με τον ολιγοπεπτιδικό αναστολέα YacG.

6.ΤΕΧΝΙΚΗ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΠΡΟΣΔΕΣΗΣ – ΕΝΑ ΕΡΓΑΛΕΙΟ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΕΥΡΕΣΗ ΝΕΩΝ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ ΕΝΖΥΜΩΝ

Η τεχνική της Μοριακής Πρόσδεσης (Docking Analysis) είναι μία μέθοδος που χρησιμοποιείται συχνά στην ανακάλυψη νέων αναστολέων εξαιτίας της ικανότητας της να προβλέπει, με έναν αρκετά υψηλό βαθμό ακρίβειας, τη διάταξη των μορίων (πιθανών αναστολέων) στην περιοχή του στόχου δέσμευσης. Επίσης, προβλέπει την σταθερότητα των συμπλόκων, υπολογίζοντας την ελεύθερη ενέργεια του συμπλόκου και συγκρίνοντάς την με την ελεύθερη ενέργεια του συστήματος των αρχικών ελεύθερων μορίων. Όσο χαμηλότερη είναι η ενέργεια του δημιουργούμενου συμπλόκου τόσο σταθερότερο αναμένεται ότι θα είναι το σύμπλοκο και τόσο ισχυρότερος ο αναστολέας. Άρα, τόσο αποτελεσματικότερο το πιθανό φάρμακο[91,92].

6.1 ΕΙΔΗ ΜΕΘΟΛΟΓΙΩΝ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΠΡΟΣΔΕΣΗΣ

Οι μέθοδοι που έχουν αναπτυχθεί ως σήμερα περιλαμβάνουν διάφορες παραμετροποιήσεις, ανάλογα με το σκοπό που θέλουμε, μερικές από τις οποίες είναι οι εξής:

1. Η περίπτωση που και το μόριο αλλά και ο υποδοχέας αναγνωρίζονται από το υπολογιστικό πρόγραμμα ως σταθερά-άκαμπτα σώματα, με ελάχιστη ευκαμψία.
2. Η κατάσταση όπου το σύμπλοκο είναι εύκαμπτο και ο υποδοχέας είναι άκαμπτος, πράγμα που αποτελεί κοινή προσέγγιση ανάλυσης των περισσότερων προγραμμάτων και έχει το ελάττωμα να δίδει αποτελέσματα με λιγότερη ακρίβεια με αντάλλαγμα γρήγορες αναλύσεις.
3. Όταν το σύμπλοκο και ο υποδοχέας είναι και οι δύο εύκαμπτοι, προσομοιάζοντας όσο γίνεται τις φυσικές *in vivo* καταστάσεις όπου η αλληλεπίδραση συμπλόκου-πρωτεΐνης προκαλεί δομικές αλλαγές και στα δύο

μόρια, με συνέπεια ο υπολογιστικός χρόνος αναλύσεων να είναι κατά πολύ μεγαλύτερος.

4. Χρήση του αλγόριθμου τοπικής κίνησης Monte Carlo για την πρόσδεση εύκαμπτων υποδοχέων, όπου αλλάζοντας, αρχικά, μία γωνία συστροφής η οποία ακολουθείται από άλλες έξι συνακόλουθες συστροφές ώστε να επιτρέψει την υπόλοιπη πρωτεϊνική αλυσίδα να παραμείνει στην αρχική της θέση ενώ παράλληλα θα διατηρήσει όλα τα μήκη των δεσμών και γωνιών που είναι αποθηκευμένα στο .pdb αρχείο[93].

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΣΚΟΠΟΣ

Η παρούσα ερευνητική εργασία είχε ως στόχο τον υπολογιστικό έλεγχο ενός αριθμού νέων χημικών ενώσεων για πιθανή δράση αναστολής της γυράσης του *E. Coli* με στόχο την ανάπτυξη νέων φαρμάκων με αντιβιοτική δράση και τη διερεύνηση του μηχανισμού δράσης νέων ενώσεων των οποίων η αντιμικροβιακή δράση είχε επιβεβαιωθεί.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Υλικά

Για αυτή τη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν 78 χημικές ενώσεις (ομάδα ενώσεων A) με μεγάλη δομική ποικιλομορφία που μπορούν να χωριστούν δομικά σε 8 υποομάδες και ήταν I. Θειαζολικά, II. Θειομορφολίνες, III. Πυριμιδινικά παράγωγα, IV. Παράγωγα της κινναμυλικής αλκοόλης, V. παράγωγα του βαλπροϊκού οξέος, VI. Παράγωγα τυροσίνης, VII. Παράγωγα του γαλλικού οξέος, και VIII. Παράγωγα σερίνης.

Επίσης χρησιμοποιήθηκαν 17 N-(2-φαινυλ-4-οξο-1,3-θειαζολιδιν-3-υλ)-1,2-βενζοθειαζολ-3-καρβοξαμίδια και ακεταμίδια (ομάδα ενώσεων B) των οποίων η αντιμικροβιακή δράση είχε επιβεβαιωθεί.

Οι ενώσεις είχαν συντεθεί στο Εγαστήριο Φαρμακευτικής Χημείας του Α.Π.Θ. από τις ομάδες της κ. Ρεκκα Ελένης, καθηγ. Φαρμακευτικής Χημείας και της κ. Γερονικάκη Αθηνάς, του Τμήματος Φαρμακευτικής καθηγ. Φαρμακευτικής

Χημείας.

Ο έλεγχος αντιμικροβιακής δράσης των 17 ενώσεων πραγματοποιήθηκε από ερευνητικές ομάδες Πανεπιστημίων και Ινστιτούτων της Ελλάδας και της Ιταλίας όπως φαίνονται στην εργασία που έχει ήδη δημοσιευθεί[94].

Μέθοδοι

Παραγωγή τριδιάστατων δομών ενώσεων

Το πρώτο βήμα στη διαδικασία υπολογιστικής πρόβλεψης της δράσης των ενώσεων με τη μέθοδο Docking είναι η δημιουργία της σταθερότερης ενεργειακά τριδιάστατης δομής των ενώσεων. Αρχικά, έγινε χρήση του διαδικτυακού εργαλείου OSRA - Optical Structure Recognition [Οπτική Αναγνώριση Χημικών Δομών][95], το οποίο έχει τη δυνατότητα να μετατρέπει συντακτικούς τύπους χημικών δομών που μπορεί να βρίσκονται σε μορφή εικόνας (π.χ .jpg ή .png), σε μία μορφή αρχείου που μπορεί να αξιοποιηθεί και να αναγνωριστεί από έναν ηλεκτρονικό υπολογιστή (όπως είναι η μορφή SMILES ή .sdf).

Αφού οι δομές πήραν τη μορφή SMILES, εισήχθησαν με τη μορφή αυτή στο επόμενο διαδικτυακό πρόγραμμα [SMILES Translator and Structure File Generator][84] με στόχο τη μετατροπή τους σε τριδιάστατη μορφή (μορφή αρχείου .pdb).

Υπολογιστική Πρόβλεψη Πρόσδεσης των ενώσεων με το λογισμικό PyRx

Η μελέτη πρόβλεψης δράσης των ενώσεων έγινε με το ανοικτού κώδικα λογισμικό PyRx, το οποίο δίνει τη δυνατότητα στο χρήστη του να πραγματοποιεί αναλύσεις μοριακής πρόσδεσης (Molecular Docking) μικρομοριακών ενώσεων που στηρίζεται στο Autodock Vina[97–100].

Στην περίπτωση της εργασίας αυτής και οι 89 συνολικά ενώσεις, όπως και η πρωτεΐνη που χρησιμοποιήθηκαν, μετατράπηκαν από το λογισμικό PyRx από την μορφή αρχείου .pdb σε .pdbqt ώστε να διευκολυνθεί η ανάλυση τους. Στα αποτελέσματα προσδιορίζεται η σταθερότερη θέση της ένωσης πάνω στην πρωτεΐνη και η εκτιμώμενη τιμή της ενέργειας σύνδεσης (kcal/mol). Το πρόγραμμα ορίστηκε να δίνει στις 9 πιθανότερες θέσεις σύνδεσης και τις αντίστοιχες εκτιμώμενες τιμές της ενέργειας σύνδεσης. Πρέπει να διευκρινιστεί πως η πρωτεϊνική δομή της DNA γυράσης που χρησιμοποιήθηκε (PDB ID: 4TMA) περιείχε δεσμευμένο ένα φυσικό της αναστολέα, την πρωτεΐνη YacG, το οποίο αφαιρέθηκε με τη χρήση του συστήματος UCSF Chimera[101]. Τα αμινοξέα της DNA γυράσης που αλληλεπιδρούν με τη YacG [Πίνακας 3], η οποία επιδρά ειδικά στη GyrB, χρησιμοποιήθηκαν ως σημείο αναφοράς.

Πίνακας 3. Γνωστές δομές από το Pubmed Structure οι οποίες μετά από μοντελοποίηση στο υπολογιστικό λογισμικό LigPlot+ έδωσαν τις παρακάτω αλληλεπιδράσεις μεταξύ της πρωτεΐνης και του εκάστοτε συμπλόκου με το οποίο έχει δοκιμαστεί η πρόσδεση αυτού.

PDBID - κωδικός πρωτεΐνης	Δεσμοί Υδρογόνου μεταξύ πρωτεΐνης - συμπλόκου	Υδρόφοβες αντιδράσεις μεταξύ πρωτεΐνης - συμπλόκου
4DUH (GyrB)	Asp73,Gly101,Arg136	Val171,Val43,Val167,Asn46,Val120,Ile94,Lys103,Pro79,Arg76,Thr165,Ile78Glu50,Gly77
2Y3P(GyrB)	Arg91,Lys42,Asn165	Leu41,His45,Thr88,Leu102,Met92,Leu98,Ala175
1KZN(GyrB)	Asp73,Arg136	Val43,Asp49,Ile78,Ile90,Pro79,Val71,Thr165,Glu50,Ala47,Asn46,Arg76
5L3J(GyrB)	Asp73,Gly101,Arg136	Val171,Val43,Val167Asn46,Val120,Ile94,Lys103,Pro79,Arg76,Thr165,Ile78,Glu50,Gly77
3G7E(GyrB)	Asn46,Asp73,Arg136	Val167,Val120,Met95Ile78,Gly102,Phe104,Asp105

		Pro79,Asp106,Leu130,Val143, Asp49,Ala47,Thr165,Gly77 Glu50,Arg76
4TMA* (GyrA ₂ B ₂)	Tyr515,Arg516, Asp481,Gln517,His505,Leu509 Phe777,Leu780	Met461,Leu509,Phe513,Phe777, Arg516 (426-464 QRDR μοτίβο αντίστασης στις κινολόνες)

Απεικόνιση των συμπλόκων

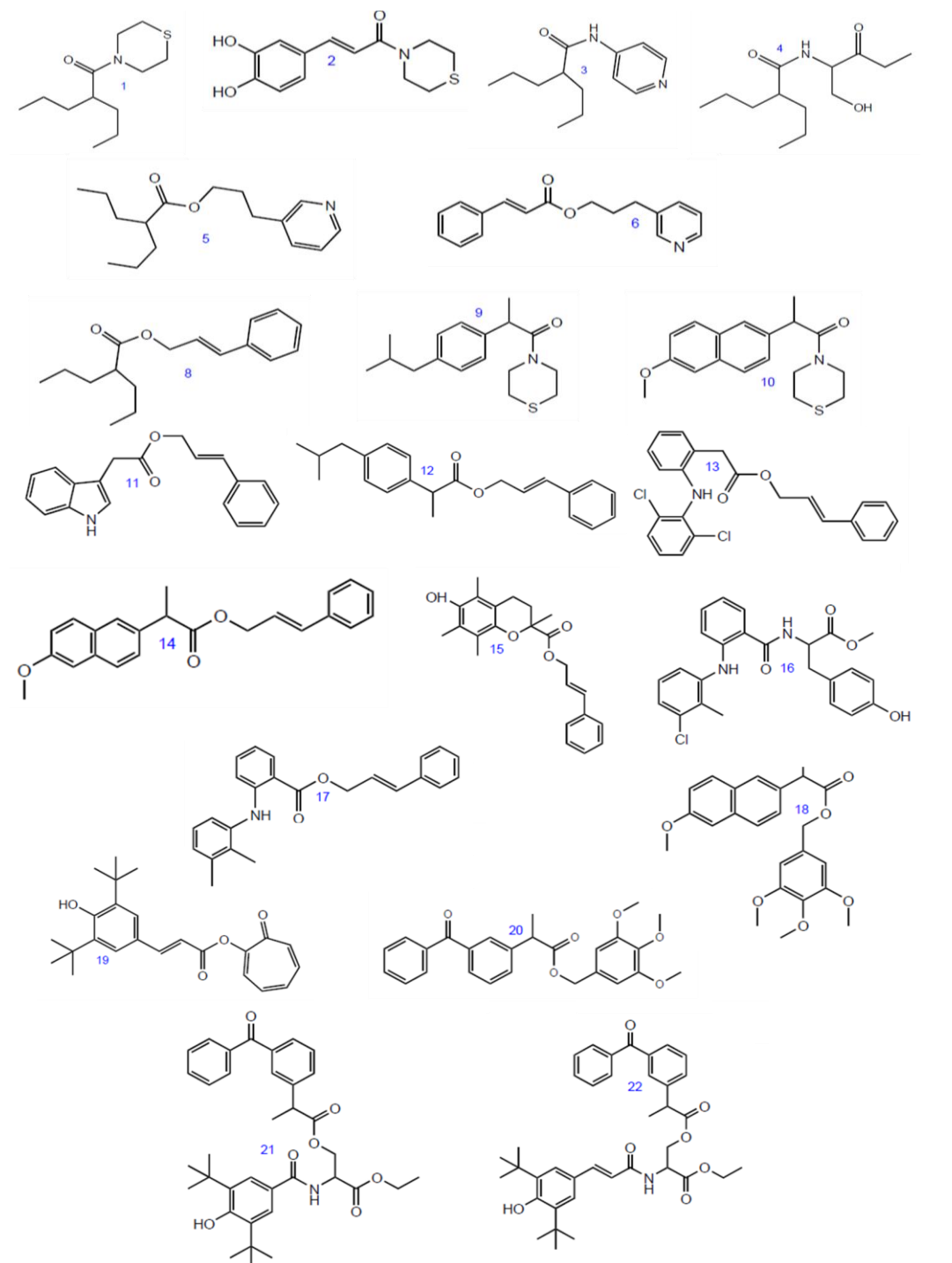
Αφότου πραγματοποιηθεί η ανάλυση των θέσεων πρόσδεσης και των εκτιμώμενων τιμών της ενέργειας σύνδεσης πραγματοποιείται απεικόνιση του κάθε συμπλόκου[102]. Η οπτικοποίηση των συμπλόκων έγινε με τη χρήση του προγράμματος απεικόνισης PyMOL[103,104].

Στα αποτελέσματα που ακολουθούν παρουσιάζονται οι ενώσεις που συνδέονται με το ένζυμο σε μια θέση πρόσδεσης γνωστού αναστολέα και η υπολογιζόμενη ελεύθερη ενέργεια σύνδεσης του συμπλόκου είναι μικρότερη των -5 kcal/mol.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Πρόβλεψη δράσης των ενώσεων της ομάδας A

Τα τελικά αποτελέσματα έδειξαν πως 22[Εικόνα 29] από τις 78 ενώσεις που εξετάστηκαν παρουσιάζουν μεγάλη πιθανότητα πρόσδεσης και αναστολής της DNA γυράσης.



Εικόνα 29. Δομές ενώσεων της ομάδας A με καλή πρόβλεψη αναστολής της γυράσης

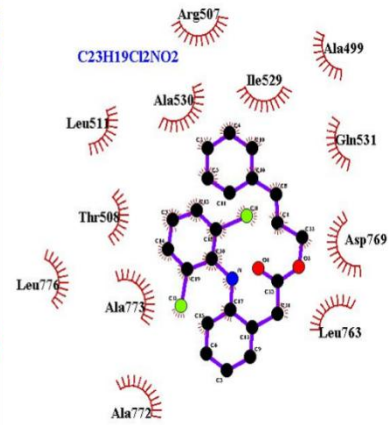
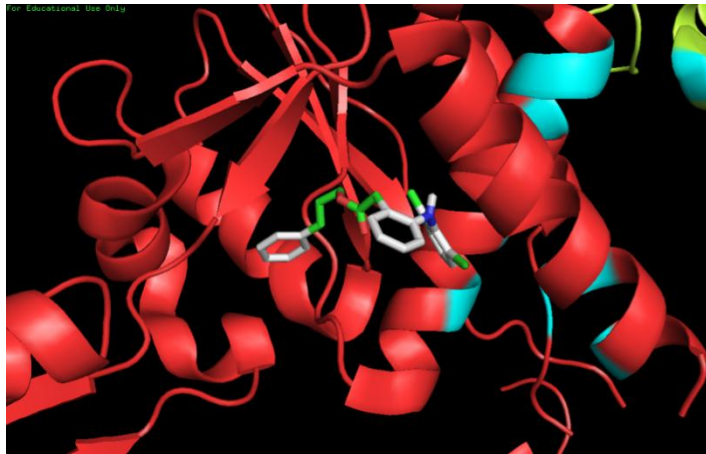
Στα αποτελέσματα παρουσιάζονται μόνο οι ενώσεις που συνδέονται με το ένζυμο σε μια θέση πρόσδεσης γνωστού αναστολέα και η υπολογιζόμενη ελεύθερη ενέργεια σύνδεσης του συμπλόκου είναι μικρότερη των -5 kcal/mol αφού συνήθως αναστολή παρατηρείται σε ενώσεις με εκτιμώμενη ενέργεια πρόσδεσης <-5.5 kcal/mol [Πίνακας 4].

Πίνακας 4. Ενώσεις της ομάδας A με εκτιμώμενη ενέργεια σύνδεσης μικρότερη των -5kcal/mol.

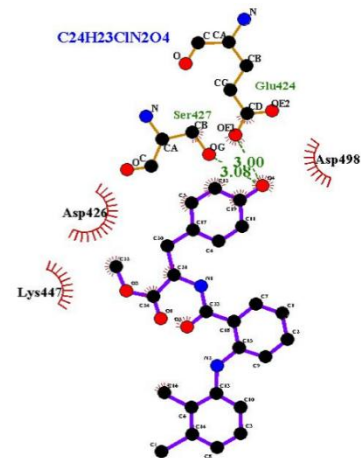
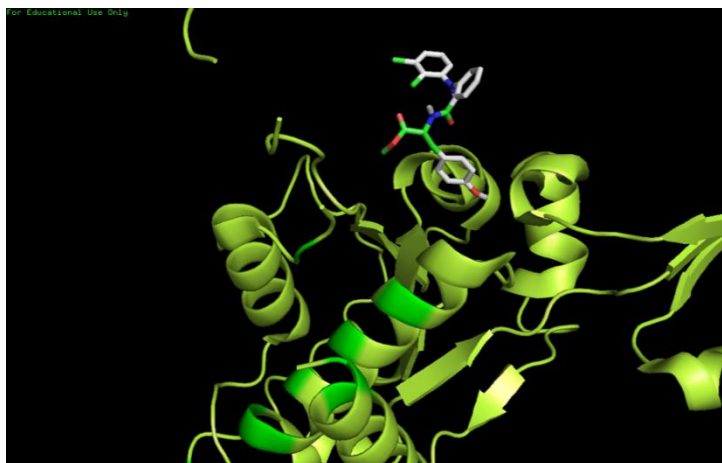
Μοριακός Τύπος Χημικής Ένωσης	Εκτιμώμενη Ενέργεια Σύνδεσης (kcal/mole)
1. C ₁₂ H ₂₃ NOS	-5.1
2. C ₁₃ H ₁₅ NO ₃ S	-7.0
3. C ₁₃ H ₂₀ N ₂ O	-5.4
4. C ₁₃ H ₂₅ NO ₃	-5.1
5. C ₁₆ H ₂₅ NO ₂	-5.9
6. C ₁₇ H ₁₇ NO ₂	-6.6
7. C ₁₇ H ₂₂ O ₂ S ₂	-5.8
8. C ₁₇ H ₂₄ O ₂	-5.1
9. C ₁₇ H ₂₅ NOS	-6.0
10. C ₁₈ H ₂₁ NO ₂ S	-6.7
11. C ₁₉ H ₁₇ NO ₂	-5.9
12. C ₂₂ H ₂₆ O ₂	-5.8
13. C ₂₃ H ₁₉ Cl ₂ NO ₂	-7.5
14. C ₂₃ H ₂₂ O ₃	-6.0
15. C ₂₃ H ₂₆ O ₄	-6.9
16. C ₂₄ H ₂₃ ClN ₂ O ₄	-7.3
17. C ₂₄ H ₂₃ NO ₂	-6.2
18. C ₂₄ H ₂₆ O ₆	-5.8
19. C ₂₄ H ₂₈ O ₄	-7.5
20. C ₂₆ H ₂₆ O ₆	-7.3
21. C ₃₆ H ₄₃ NO ₇	-6.9
22. C ₃₈ H ₄₅ NO ₇	-5.9

Από τα αποτελέσματα προκύπτει ότι οι ενώσεις με την καλύτερη πρόβλεψη δράσης είναι οι **19, 20** και **16**.

Παρακάτω παρατίθενται εικόνες 3D και 2D που δημιουργήθηκαν από το πρόγραμμα PyMOL και LigPlot+ αντίστοιχα, που δείχνουν την εκτιμώμενη θέση πρόσδεσης και τα αμινοξέα που αλληλεπιδρούν με τις 6 πιο ικανές να είναι αυτές με τον αριθμό **13, 16, 19, 20, 21** και **15**.



Ένωση 13



Ένωση 16

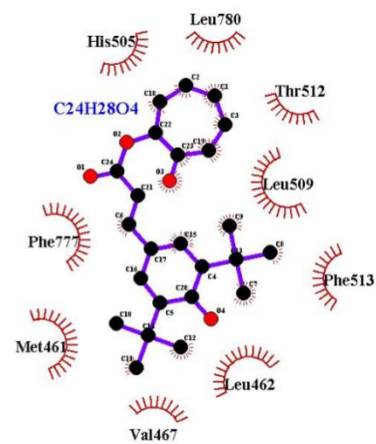
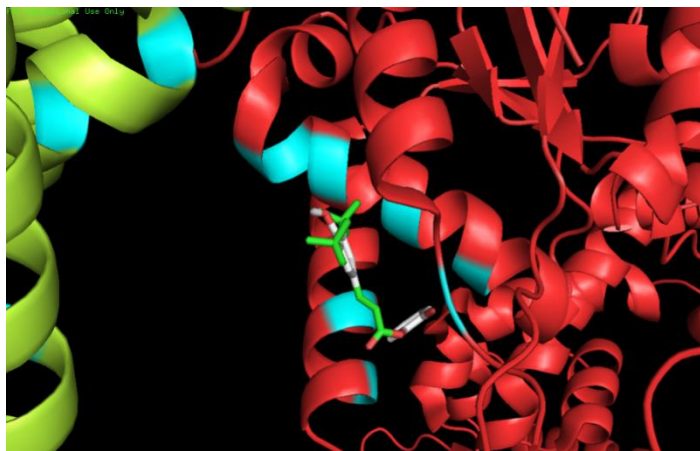
- Δεσμοί ένωσης
- Δεσμοί αμινοξέων
- Δεσμοί υδρογόνου



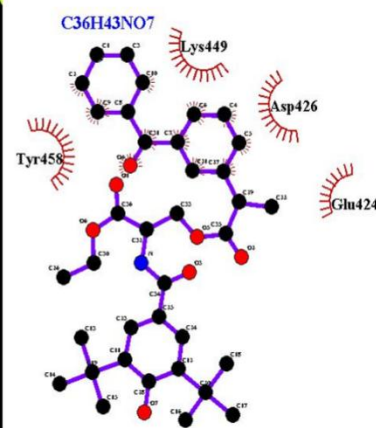
- Αμινοξέα πρωτεΐνης-στόχου εμπλεκόμενα σε υδρόφοβες αντιδράσεις
- Αντίστοιχα άτομα που εμπλέκονται στις υδρόφοβες αντιδράσεις

Εικόνα 30. Απεικόνιση πρόσδεσης των ενώσεων 13 και 16 στη DNA γυράση του *E.Coli*. Οι αλυσίδες της γυράσης έχουν χρωματιστεί με κόκκινο και κίτρινο, και τα αμινοξέα που σύμφωνα με τη βιβλιογραφία αλληλεπιδρούν με την YacG, και άρα αντιστοιχούν στο σημείο στόχο που χρησιμοποιήσαμε, έχουν χρωματιστεί είτε με




χρώμα γαλάζιο είτε με σκούρο πράσινο ανάλογα με την φωτογραφία.



Ένωση 19



Ένωση 21

-  Δεσμοί ένωσης
-  Δεσμοί αμινοξέων
-  Δεσμοί υδρογόνου

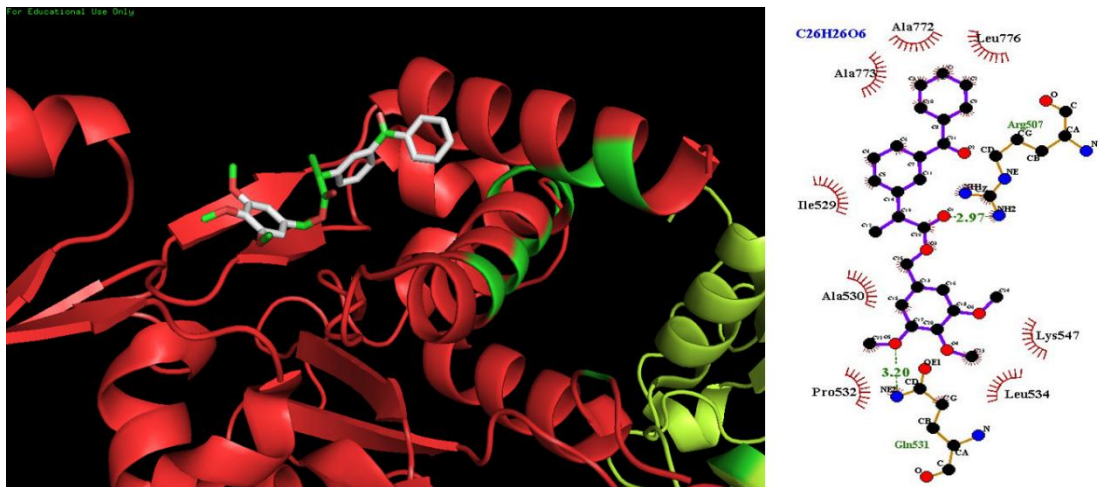


Αμινοξέα πρωτεΐνης-στόχου εμπλεκόμενα σε υδρόφοβες αντιδράσεις

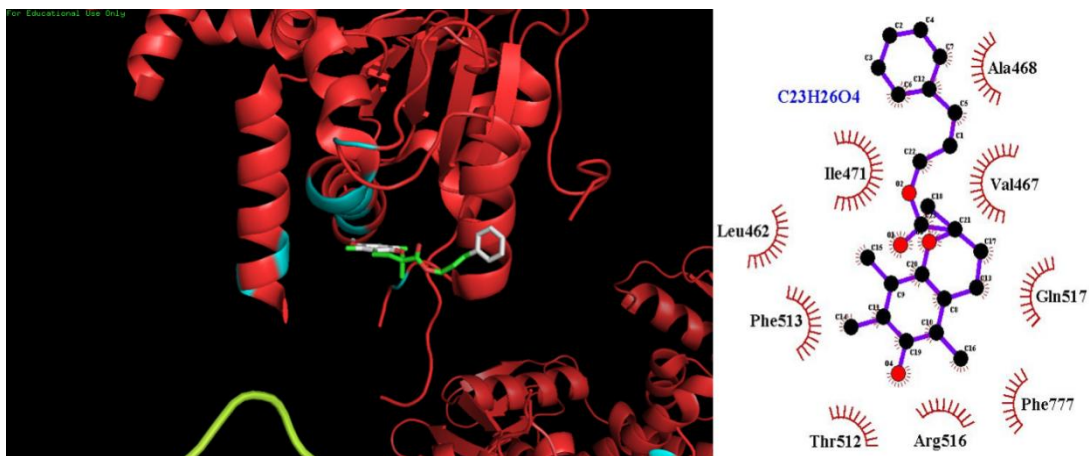
Αντίστοιχα άτομα που εμπλέκονται στις υδρόφοβες αντιδράσεις

Εικόνα 31. Απεικόνιση πρόσδεσης των ενώσεων 19 και 21 στη DNA γυράση του *E.Coli*. Οι αλυσίδες της γυράσης έχουν χρωματιστεί με κόκκινο και κίτρινο, και τα αμινοξέα που σύμφωνα με τη βιβλιογραφία αλληλεπιδρούν με την YacG, και άρα αντιστοιχού στο σημείο στόχο που χρησιμοποιήσαμε, έχουν χρωματιστεί είτε με




χρώμα γαλάζιο είτε με σκούρο πράσινο ανάλογα με την φωτογραφία.



Ένωση 20



Ένωση 15

-  Δεσμοί ένωσης
-  Δεσμοί αμινοξέων
-  Δεσμοί υδρογόνου



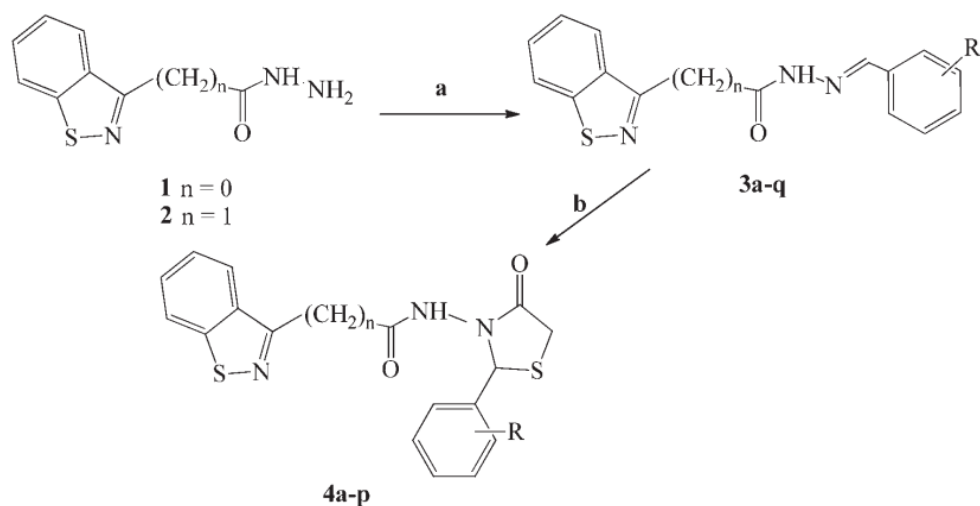
- Αμινοξέα πρωτεΐνης-στόχου εμπλεκόμενα σε υδρόφοβες αντιδράσεις
- Αντίστοιχα άτομα που εμπλέκονται στις υδρόφοβες αντιδράσεις

Εικόνα 32. Απεικόνιση πρόσδεσης των ενώσεων 20 και 15 στη DNA γυράση του *E. Coli*. Οι αλυσίδες της γυράσης έχουν χρωματιστεί με κόκκινο και κίτρινο, και τα αμινοξέα που σύμφωνα με τη βιβλιογραφία αλληλεπιδρούν με την YacG, και άρα αντιστοιχού στο σημείο στόχο που χρησιμοποιήσαμε, έχουν χρωματιστεί είτε με χρώμα γαλάζιο είτε με σκούρο πράσινο ανάλογα με την φωτογραφία.

Όπως φαίνεται στις εικόνες 30-32, η συγκράτηση των ενώσεων στις θέσεις πρόσδεσης γίνεται στις περισσότερες περιπτώσεις με υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις. Δεσμοί υδρογόνου, που εξασφαλίζουν ισχυρότερη σύνδεση παρατηρούνται στην περίπτωση των ενώσεων 20 και 16 που ανήκουν στις ενώσεις που εμφανίζουν τη χαμηλότερη ελεύθερη ενέργεια σύνδεσης.

Ενώσεις ομάδας B

Στην περίπτωση των 21 ενώσεων της ομάδας B (3h, 3i, 3j, 3o, 3p και 4a-4p) [Σχήμα 11], η ανάλυση έδειξε ότι όλες οι ενώσεις θα μπορούσαν να είναι αναστολείς γυράσης αφού όλες εμφάνισαν ελεύθερη ενέργεια σύνδεσης <-6.5 kcal/mol [Πίνακας 5].



Σχήμα 11. Ενώσεις της ομάδας Β που ελέγχθηκαν με στόχο την εκτίμηση του μηχανισμού αντι-μικροβιακής δράσης.

Ένωση	n	R	Ενώσεις	n	R
a	0	H	j	0	2,6-Cl ₂
b	0	2-F	k	1	H
c	0	3-F	l	1	2-Cl
d	0	4-F	m	1	3-Cl
e	0	2-Cl	n	1	4-Cl
f	0	3-Cl	o	1	2,6-F ₂
g	0	4-Cl	p	1	2-F,6-Cl
h	0	2,6-F ₂	q	1	2,6-Cl ₂
i	0	2-F,6-Cl			

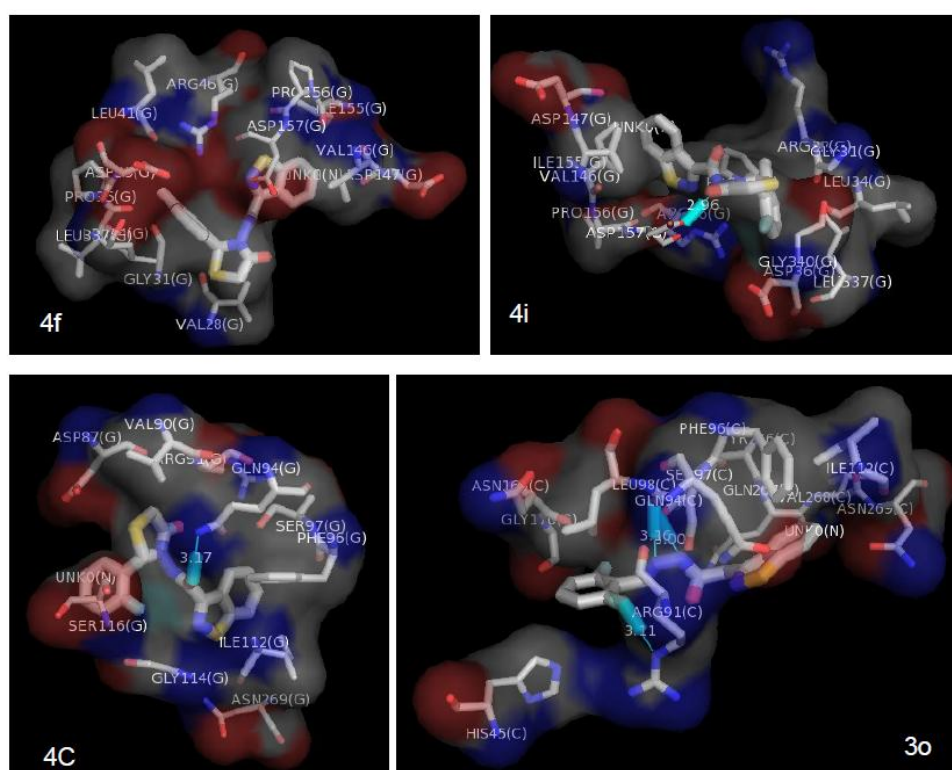
Πίνακας 5. In vitro μέτρηση της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης, MIC, και εκτιμώμενη ενέργεια πρόσδεσης (kcal ανά mole) στην E. Coli γυράση σύμφωνα με τα αποτελέσματα Ελέγχου σταθερής πρόσδεσης (Molecular Docking Analysis)

Ένωση	n	Υποκαταστάτης	E. coli MIC	Εκτιμώμενη Ενέργεια πρόσδεσης (kcal/ mole)
4f	0	3-Cl	10.2	-8.2
4h	0	2,6-F ₂	10.2	-7.3
4a	0	H	11.2	-7.8
4c	0	3-F	16.0	-8.1
4m	1	3-Cl	19.8	-6.8
4l	1	2-Cl	19.8	-7.8
4d	0	4-F	21.4	-7.0
4k	1	H	21.6	-7.5
4b	0	2-F	22.5	-7.5
4i	0	2-F,6-Cl	27.0	-8.2
4o	1	2-F,6-Cl	27.0	-7.6

4p	1	2,6-F ₂	27.2	-6.9
4n	1	4-Cl	27.3	-6.5
4e	0	2-Cl	28.2	-7.5
4j	0	2,6-Cl ₂	54.3	-7.2
4g	0	4-Cl	58.9	-7.4
3o	1	2,6-F ₂	11.6	-7.9
3j	0	2,6-Cl ₂	11.6	-7.5
3i	0	2-F,6-Cl	12.0	-7.5
3h	0	2,6-F ₂	25.2	-7.7
3p	1	2-F,6-Cl	36.2	-7.4

Η καλύτερη εκτιμώμενη ενέργεια σύνδεσης προς το *E. coli*, -8.2 kcal ανά mole, υπολογίστηκε για τις ενώσεις 4f και 4i ακολουθούμενες από την ένωση 4c (-8.1 kcal/mol) και την ένωση 3o (-7.9 kcal/mol).

Η απεικόνιση των συμπλόκων των ενώσεων με τη γυράση φαίνεται στην εικόνα 33.



Εικόνα 33. Απεικόνιση των συμπλόκων των ενώσεων 4f, 4i, 4c και 4o με τη γυράση του *E.Coli*

Με βάση τα αποτελέσματα της πρόβλεψης πρόσδεσης (crystallographic structure, PDB ID: 4TMA) οι ενώσεις συνδέονται κυρίως με τα αμινοξέα Val90, Gln94, Ser97, Asp36 and Arg46. Σύμπλοκα γνωστών αντιβιοτικών όπως το simocyclinone D8, με την γυράση του *E.Coli* έδειξαν ανάλογη θέση σύνδεσης του αντιβιοτικού [Εικόνα 27][4]. Πρόβλεψη πρόσδεσης της novobiocin, που αποτελεί γνωστό συναγωνιστικό αναστολέα της DNA γυράσης, έδειξε ελεύθερη ενέργεια σύνδεσης -8.4 kcal/mol και οι κύριες αλληλεπιδράσεις περιλάμβαναν επίσης τα αμινοξέα Gln94, Arg91, Phe96 και Ile112.

Όλες οι ενώσεις που δοκιμάστηκαν (3h, i, j, o p και 4a-p) έδειξαν ανασταλτική δράση σε όλα τα είδη βακτηρίων που εξετάστηκαν συμπεριλαμβανομένου του *E.Coli*, όμως σε διαφορετικά επίπεδα. Η προβλεπόμενη αναστολή της γυράσης δε συμβάδιζε πάντα με την *in vitro* δράση σε καλλιέργεια *E.Coli*. Υπολογιστική μελέτη που έγινε και δεν περιλαμβάνεται στην παρούσα εργασία έδειξε δυνατότητα αναστολής και του ενζύμου MurB από τις περισσότερες ενώσεις. Η διπλή αυτή δράση εξηγεί καλύτερα τα αποτελέσματα.

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η εργασία αυτή αποτελεί τμήμα μιας μεγαλύτερης ερευνητικής εργασίας και για την ολοκλήρωσή της απαιτεί τον *in vitro* έλεγχο αναστολής της γυράσης που θα επιτρέψει την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας της μεθόδου πρόβλεψης και την αναπροσαρμογή των παραμέτρων με στόχο τη βελτίωσή της.

Για τις ενώσεις της ομάδας A, ο *in vitro* έλεγχος αναστολής θα δώσει αποτελέσματα βάση των οποίων θα επιλεγούν οι ενώσεις που θα δοκιμαστούν πειραματικά σε καλλιέργειες μικροοργανισμών.

Συμπερασματικά μπορούμε να αναφέρουμε ότι από τις 78 ενώσεις της **ομάδας Α**, οι 22 φαίνεται να έχουν θετική πρόβλεψη αναστολής της γυράσης του E.Coli και η δράση τους αξίζει να διερευνηθεί in vitro.

Σχετικά με τις ενώσεις της **ομάδας Β**, όλες οι ενώσεις έδειξαν θετική πρόβλεψη αναστολής της γυράσης, ανάλογη με αυτή γνωστών αναστολέων του ενζύμου και η θέση σύνδεσης ήταν επίσης ανάλογη γνωστών αντιβιοτικών. Επομένως, η αναστολή της γυράσης μπορεί να είναι ένας μηχανισμός που εξηγεί την αντιμικροβιακή δράση αυτών των ενώσεων.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ-ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ. ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΙΚΗ ΠΡΟΒΛΕΨΗ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ ΤΗΣ DNA ΓΥΡΑΣΗΣ ΤΟΥ E.COLI ΑΠΟ ΝΕΕΣ ΧΗΜΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ DOCKING

Σκοπός Λόγω της όλο και περισσότερο αυξημένης ανάγκης για την ανεύρεση καινοτόμων ουσιών που μπορούν να φέρουν αντιβιοτική δράση, η παρούσα ερευνητική εργασία είχε ως στόχο - μέσω του υπολογιστικού ελέγχου - να εξετάσει έναν αριθμό νέων χημικών ενώσεων για την πιθανή τους δράση αναστολής της γυράσης του *E. Coli* με σκοπό την ανάπτυξη νέων φαρμάκων με αντιβιοτική δράση και τη διερεύνηση του μηχανισμού δράσης νέων ενώσεων των οποίων η αντιμικροβιακή δράση είχε επιβεβαιωθεί. **Υλικά και Μέθοδοι** Για την πραγματοποίηση αυτής της μελέτης χρησιμοποιήθηκε ένας αριθμός από 78 χημικές ενώσεις (ομάδα ενώσεων A), οι οποίες παρουσιάζουν μεγάλη δομική ποικιλομορφία. Χωρίζονται δομικά σε 8 υποομάδες και είναι I. Θειαζολικά, II. Θειομορφολίνες, III. Πυριμιδινικά παράγωγα, IV. Παράγωγα της κινανυλικής αλκοόλης, V. παράγωγα του βαλπροϊκού οξέος, VI. Παράγωγα τυροσίνης, VII. Παράγωγα του γαλλικού οξέος, και VIII. Παράγωγα σερίνης. Εκτός των παραπάνω, χρησιμοποιήθηκαν 17 N-(2-φαινυλ-4-οξο-1,3-θειαζολιδιν-3-υλ)-1,2-βενζοθειαζολ-3-καρβοξαμίδια και ακεταμίδια (ομάδα ενώσεων B) των οποίων η αντιμικροβιακή δράση είχε επιβεβαιωθεί. Η υπολογιστική πρόβλεψη των δράσεων με τη μέθοδο Docking στηρίχτηκε στη δημιουργία της σταθερότερης ενεργειακά τρισδιάστατης δομής των ενώσεων. Η μελέτη πρόβλεψης δράσης των ενώσεων έγινε με το ανοικτού κώδικα λογισμικό PyRx, το οποίο πραγματοποιεί αναλύσεις μοριακής πρόσδεσης μικρομοριακών ενώσεων που στηρίζεται στο Autodock Vina. Η αναγνώριση των αμινοξέων της *E. Coli* γυράσης που αλληλεπιδρούν με τις εξεταζόμενες προαναφερθείσες ενώσεις έγινε με το υπολογιστικό λογισμικό LigPlot+. **Αποτελέσματα** Από τις 78 ενώσεις που εξετάστηκαν, οι 22 παρουσίασαν μεγάλη πιθανότητα πρόσδεσης και αναστολής της DNA γυράσης, με αυτές που επιλέχθηκαν να εμφανίζουν αλληλεπίδραση με τα αμινοξέα που τέθηκαν ως σημείο αναφοράς - προερχόμενα από γνωστό αναστολέα - αλλά και με την ελεύθερη ενέργεια σύνδεσης αυτών να είναι μικρότερη από -5 kcal/mol (Ομάδα ενώσεων A). Στις υπόλοιπες 21 ενώσεις, που υπάγονται στην ομάδα B (3h, 3i, 3j, 3o, 3p και 4a-4p), η ανάλυση έδειξε πως όλες οι ενώσεις θα μπορούσαν να είναι αναστολείς γυράσης μιας και όλες εμφάνισαν ελεύθερη σύνδεση <-6.5 kcal/mol. Οι ενώσεις που δοκιμάστηκαν (3h,3i, 3j, 3o, 3p και 4a-p) έδειξαν ανασταλτική δράση σε όλα τα είδη βακτηρίων που εξετάστηκαν, όπως και στο *E. Coli*, όμως σε διαφορετικά επίπεδα η κάθε μία. **Συμπεράσματα** Η εργασία αυτή αποτελεί τμήμα μιας μεγαλύτερης ερευνητικής εργασίας και για την ολοκλήρωσή της απαιτεί τον *in vitro* έλεγχο αναστολής της

γυράσης που θα επιτρέψει την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας της μεθόδου πρόβλεψης και την αναπροσαρμογή των παραμέτρων με στόχο την περαιτέρω βελτίωσή της. Έτσι, από τις 78 ενώσεις της ομάδας A, οι 22 φαίνεται να έχουν θετική πρόβλεψη αναστολής της γυράσης του *E. Coli* και η δράση τους αξίζει να διερευνηθεί μετέπειτα *in vitro*, ενώ όλες οι ενώσεις της ομάδας B παρουσίασαν θετική πρόβλεψη αναστολής της γυράσης, ανάλογη με αυτή γνωστών αναστολέων του ενζύμου.

ABSTRACT

ANTIBIOTICS-MECHANISM OF ACTION. **COMPUTATIONAL INHIBITORY PREDICTION OF E. COLI'S** **DNA GYRASE FROM NEW CHEMICAL COMPOUNDS BY** **MEANS OF MOLECULAR DOCKING**

Objectives Due to the constantly increased necessity of discovering innovative substances which can carry antibiotic effects, the current research thesis project has as an aim - by means of computational screening - to examine a number of newly synthesized chemical compounds for their potential inhibitory effect against *E. Coli*'s gyrase, by having as a purpose the development of new antibiotics and the investigation of novel compounds which had their antimicrobial activity confirmed.

Materials and Methods For the completion of this study a number of 78 chemical compounds was used (group A of compounds), which exhibit a vast structural diversity. They differentiate, due to their structure, into 8 subgroups and those are I. Thiazole, II. Thiomorpholines, III. Derivatives of Pyrimidines, IV. Derivatives of Cinnamyl Alcohol, V. Derivatives of valproic acid, VI. Derivatives of tyrosine, VII. Derivatives of gallic acid, and VIII. Derivatives of serine. Apart from the aforementioned compounds, *N*-(2-phenyl-4-oxo-1,3-thiazolidin-3-yl)-1,2-benzothiazole-3-carboxamides and acetamides were used (group B of compounds), which have already their antimicrobial effect confirmed. The computational prediction of their effect by using the Docking method was based on the formation of the most energy stable structure of those compounds. The study for predicting their effect has been performed through the use of the open source software PyRx, which actualizes molecular docking analysis of micromolecular compounds that is supported by Autodock Vina. The identification of *E. Coli* gyrase's amino acids that interact with the aforementioned compounds has

been done with LigPlot+. **Results** From the 78 compounds that have been checked, 22 of them had presented a strong docking and inhibitory probability for the DNA gyrase, with those that have been selected to show interaction with the amino acids that were posed as reference point – derived from a known inhibitor – but also having their free binding energy values less than -5 kcal/mol (compounds of group A). The analysis for the rest 21 compounds, which pertain to group B (3h, 3i, 3j, 3o, 3p και 4a-4p), has shown that all of them could be gyrase inhibitors as they have exhibited binding energy <-6.5 kcal/mol. The compounds that have been tested (3h, 3i, 3j, 3o, 3p και 4a-4p), have presented inhibitory activity to all the bacterial species which have been examined to, likewise to *E. Coli*, but with diverse levels to each one. **Conclusion** This study is part of a more thorough research study and for its completion demands the *in vitro* examination of gyrase's inhibition which will allow us to evaluate the effectiveness of the docking method and to readjust its respective parameters where its further optimization is the final goal. Thus, from the 78 compounds of group A, 22 of them seem to have a positive inhibitory potential of *E. Coli*'s gyrase and their effect should be investigated - in a later time - *in vitro*, whereas all the compounds of group B have, also, demonstrated positive inhibitory potential of gyrase, in relation to the one that known inhibitors of the enzyme have shown.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Lancini G, Parenti F, Gallo GG. *Antibiotics: A Multidisciplinary Approach*. Springer US; 1995.
2. Najafpour GD. CHAPTER 11 - Production of Antibiotics. *Biochemical Engineering and Biotechnology*. Amsterdam: Elsevier; 2007. pp. 263–279.
3. Demain AL, Fang A. The natural functions of secondary metabolites. *Adv Biochem Eng Biotechnol*. 2000;69: 1–39.
4. Kuriyama T, Karasawa T, Williams DW. Chapter Thirteen - Antimicrobial Chemotherapy: Significance to Healthcare. *Biofilms in Infection Prevention and Control*. Boston: Academic Press; 2014. pp. 209–244.
5. Brown ED, Vivas EI, Walsh CT, Kolter R. MurA (MurZ), the enzyme that catalyzes the first committed step in peptidoglycan biosynthesis, is essential in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 1995;177: 4194–4197.
6. Lambert MP, Neuhaus FC. Mechanism of D-cycloserine action: alanine racemase from *Escherichia coli* W. *J Bacteriol*. 1972;110: 978–987.
7. Prosser GA, de Carvalho LPS. Kinetic mechanism and inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* D-alanine:D-alanine ligase by the antibiotic D-cycloserine. *FEBS J*. 2013;280: 1150–1166.
8. Peitsaro N, Polianskyte Z, Tuimala J, Pörn-Ares I, Liobikas J, Speer O, et al. Evolution of a family of metazoan active-site-serine enzymes from penicillin-binding proteins: a novel facet of the bacterial legacy. *BMC Evol Biol*. 2008;8: 26.
9. Pegler S, Healy B. In patients allergic to penicillin, consider second and third generation cephalosporins for life threatening infections. *BMJ*. 2007;335: 991.
10. Papp-Wallace KM, Endimiani A, Taracila MA, Bonomo RA. Carbapenems: past, present, and future. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011;55: 4943–4960.
11. Knox JR, Pratt RF. Different modes of vancomycin and D-alanyl-D-alanine peptidase binding to cell wall peptide and a possible role for the vancomycin resistance protein. *Antimicrob Agents Chemother*. 1990;34: 1342–1347.
12. Stone KJ, Strominger JL. Mechanism of action of bacitracin: complexation with metal ion and C 55 -isoprenyl pyrophosphate. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1971;68: 3223–3227.
13. Gampe CM, Tsukamoto H, Doud EH, Walker S, Kahne D. Tuning the moenomycin pharmacophore to enable discovery of bacterial cell wall synthesis inhibitors. *J Am Chem Soc*. 2013;135: 3776–3779.
14. Vooturi SK, Firestine SM. Synthetic membrane-targeted antibiotics. *Curr Med*

Chem. 2010;17: 2292–2300.

15. Pfalzgraff A, Brandenburg K, Weindl G. Antimicrobial Peptides and Their Therapeutic Potential for Bacterial Skin Infections and Wounds. *Front Pharmacol.* 2018;9: 281.
16. Velkov T, Roberts KD, Nation RL, Thompson PE, Li J. Pharmacology of polymyxins: new insights into an “old” class of antibiotics. *Future Microbiol.* 2013;8: 711–724.
17. Robert W. Bauman, Ph. D. , Amarillo College. *Microbiology with Diseases by Body System.* Pearson; ©2015.
18. Dawn Merton Boothe, DVM, PhD, Professor, Department of Anatomy, Physiology, and Pharmacology, College of Veterinary Medicine, Auburn University. Sulfonamides and Sulfonamide Combinations - Pharmacology - Veterinary Manual [Internet]. Available: <https://www.msdsvetmanual.com/pharmacology/antibacterial-agents/sulfonamides-and-sulfonamide-combinations>
19. Suarez J, Rangelova K, Jarzecki AA, Manzerova J, Krymov V, Zhao X, et al. An oxyferrous heme/protein-based radical intermediate is catalytically competent in the catalase reaction of *Mycobacterium tuberculosis* catalase-peroxidase (KatG). *J Biol Chem.* 2009;284: 7017–7029.
20. Elsea SH, Osheroff N, Nitiss JL. Cytotoxicity of quinolones toward eukaryotic cells. Identification of topoisomerase II as the primary cellular target for the quinolone CP-115,953 in yeast. *J Biol Chem.* 1992;267: 13150–13153.
21. Geronikaki A, Eleftheriou P, Poroikov V. Anti-HIV Agents: Current Status and Recent Trends. In: Saxena AK, editor. *Communicable Diseases of the Developing World.* Cham: Springer International Publishing; 2018. pp. 37–95.
22. Bhattacharjee MK. *Chemistry of Antibiotics and Related Drugs.* 2016.
23. Ventola CL. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *P T.* 2015;40: 277–283.
24. Ventola CL. The antibiotic resistance crisis: part 2: management strategies and new agents. *P T.* 2015;40: 344–352.
25. Mendes A, Palmer SJ. Antibiotic resistance crisis and the urgent need for effective prescribing. *Nurse Prescribing.* Mark Allen Group; 2018;16: 6–8.
26. Chrysou K, Zarkotou O, Kalofolia S, Papagiannakopoulou P, Chrysos G, Themeli-Digalaki K, et al. First-year results of an antibiotic stewardship program in a Greek tertiary care hospital. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2018;37: 333–337.
27. Taylor J, Hafner M, Yerushalmi E, Smith R, Bellasio J, Vardavas R, et al. Estimating the economic costs of antimicrobial resistance. *Model and Results (RAND Corporation, Cambridge, UK).* 2014; Available:

https://www.rand.org/pubs/research_reports/RR911.html

28. Prestinaci F, Pezzotti P, Pantosti A. Antimicrobial resistance: a global multifaceted phenomenon. *Pathog Glob Health*. 2015;109: 309–318.
29. Allen HK, Donato J, Wang HH, Cloud-Hansen KA, Davies J, Handelsman J. Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. *Nat Rev Microbiol*. search.proquest.com; 2010;8: 251–259.
30. Strachan CR, Davies J. The Whys and Wherefores of Antibiotic Resistance. *Cold Spring Harb Perspect Med*. perspectivesinmedicine.cshlp.org; 2017;7. doi:10.1101/cshperspect.a025171
31. Antibiotic resistance. In: World Health Organization [Internet]. [cited 3 May 2018]. Available: <http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance>
32. Bengtsson-Palme J, Kristiansson E, Larsson DGJ. Environmental factors influencing the development and spread of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev*. academic.oup.com; 2018;42. doi:10.1093/femsre/fux053
33. Koch BJ, Hungate BA, Price LB. Food-animal production and the spread of antibiotic resistance: the role of ecology. *Front Ecol Environ*. 2017;15: 309–318.
34. Bonnedahl J, Järhult JD. Antibiotic resistance in wild birds. *Ups J Med Sci*. 2014;119: 113–116.
35. Forsberg KJ, Reyes A, Wang B, Selleck EM, Sommer MOA, Dantas G. The shared antibiotic resistome of soil bacteria and human pathogens. *Science*. science.sciencemag.org; 2012;337: 1107–1111.
36. Crofts TS, Gasparrini AJ, Dantas G. Next-generation approaches to understand and combat the antibiotic resistome. *Nat Rev Microbiol*. nature.com; 2017;15: 422–434.
37. Holmes AH, Moore LSP, Sundsfjord A, Steinbakk M, Regmi S, Karkey A, et al. Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance. *Lancet*. Elsevier; 2016;387: 176–187.
38. Jackson N, Czaplewski L, Piddock LJV. Discovery and development of new antibacterial drugs: learning from experience? *J Antimicrob Chemother*. 2018; doi:10.1093/jac/dky019
39. Bartlett JG, Gilbert DN, Spellberg B. Seven ways to preserve the miracle of antibiotics. *Clin Infect Dis*. 2013;56: 1445–1450.
40. Luepke KH, Mohr JF 3rd. The antibiotic pipeline: reviving research and development and speeding drugs to market. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2017;15: 425–433.
41. Kmietowicz Z. Few novel antibiotics in the pipeline, WHO warns. *BMJ*. 2017;358: j4339.

42. Blair JMA, Webber MA, Baylay AJ, Ogbolu DO, Piddock LJV. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol.* search.proquest.com; 2015;13: 42–51.
43. Mayers DL, editor. *Antimicrobial Drug Resistance: Mechanisms of Drug Resistance.* Human Press; 2009.
44. Wozniak A, Villagra NA, Undabarrena A, Gallardo N, Keller N, Moraga M, et al. Porin alterations present in non-carbapenemase-producing Enterobacteriaceae with high and intermediate levels of carbapenem resistance in Chile. *J Med Microbiol.* 2012;61: 1270–1279.
45. (Editor-in-Chief) MG, Berghuis A, Matlashewski G, Wainberg MA, Sheppard D, editors. *Handbook of Antimicrobial Resistance.* 2017.
46. Blanco P, Hernando-Amado S, Reales-Calderon JA, Corona F, Lira F, Alcalde-Rico M, et al. Bacterial Multidrug Efflux Pumps: Much More Than Antibiotic Resistance Determinants. *Microorganisms.* mdpi.com; 2016;4. doi:10.3390/microorganisms4010014
47. Sun J, Deng Z, Yan A. Bacterial multidrug efflux pumps: mechanisms, physiology and pharmacological exploitations. *Biochem Biophys Res Commun.* Elsevier; 2014;453: 254–267.
48. Long H, Miller SF, Strauss C, Zhao C, Cheng L, Ye Z, et al. Antibiotic treatment enhances the genome-wide mutation rate of target cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* National Acad Sciences; 2016;113: E2498–505.
49. Boc A, Makarenkov V. Towards an accurate identification of mosaic genes and partial horizontal gene transfers. *Nucleic Acids Res.* 2011;39: e144.
50. Martinez JL, Baquero F. Mutation frequencies and antibiotic resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* Am Soc Microbiol; 2000;44: 1771–1777.
51. Durão P, Balbontín R, Gordo I. Evolutionary Mechanisms Shaping the Maintenance of Antibiotic Resistance. *Trends Microbiol.* 2018; doi:10.1016/j.tim.2018.01.005
52. Lopatkin AJ, Meredith HR, Srimani JK, Pfeiffer C, Durrett R, You L. Persistence and reversal of plasmid-mediated antibiotic resistance. *Nat Commun.* 2017;8: 1689.
53. Bellanger X, Payot S, Leblond-Bourget N, Guédon G. Conjugative and mobilizable genomic islands in bacteria: evolution and diversity. *FEMS Microbiol Rev.* academic.oup.com; 2014;38: 720–760.
54. Muñoz-López M, García-Pérez JL. DNA transposons: nature and applications in genomics. *Curr Genomics.* 2010;11: 115–128.
55. Collis CM, Hall RM. Expression of antibiotic resistance genes in the integrated cassettes of integrons. *Antimicrob Agents Chemother.* Am Soc Microbiol; 1995;39: 155–162.

56. Stalder T, Barraud O, Casellas M, Dagot C, Ploy M-C. Integron involvement in environmental spread of antibiotic resistance. *Front Microbiol.* frontiersin.org; 2012;3: 119.
57. Gillings MR. Integrons: past, present, and future. *Microbiol Mol Biol Rev. Am Soc Microbiol*; 2014;78: 257–277.
58. Pontes DS, de Araujo RSA, Dantas N, Scotti L, Scotti MT, de Moura RO, et al. Genetic Mechanisms of Antibiotic Resistance and the Role of Antibiotic Adjuvants. *Curr Top Med Chem.* europepmc.org; 2018;18: 42–74.
59. Wilson DN. Ribosome-targeting antibiotics and mechanisms of bacterial resistance. *Nat Rev Microbiol.* nature.com; 2014;12: 35–48.
60. Lin J, Zhou D, Steitz TA, Polikanov YS, Gagnon MG. Ribosome-Targeting Antibiotics: Modes of Action, Mechanisms of Resistance, and Implications for Drug Design. *Annu Rev Biochem.* 2018; doi:10.1146/annurev-biochem-062917-011942
61. Balcazar JL. Bacteriophages as vehicles for antibiotic resistance genes in the environment. *PLoS Pathog.* journals.plos.org; 2014;10: e1004219.
62. Lood R, Ertürk G, Mattiasson B. Revisiting Antibiotic Resistance Spreading in Wastewater Treatment Plants - Bacteriophages as a Much Neglected Potential Transmission Vehicle. *Front Microbiol.* 2017;8: 2298.
63. Marti E, Variatza E, Balcazar JL. The role of aquatic ecosystems as reservoirs of antibiotic resistance. *Trends Microbiol.* Elsevier; 2014;22: 36–41.
64. Quirós P, Colomer-Lluch M, Martínez-Castillo A, Miró E, Argente M, Jofre J, et al. Antibiotic resistance genes in the bacteriophage DNA fraction of human fecal samples. *Antimicrob Agents Chemother.* Am Soc Microbiol; 2014;58: 606–609.
65. Brown-Jaque M, Calero-Cáceres W, Muniesa M. Transfer of antibiotic-resistance genes via phage-related mobile elements. *Plasmid.* Elsevier; 2015;79: 1–7.
66. Sommer MOA, Church GM, Dantas G. The human microbiome harbors a diverse reservoir of antibiotic resistance genes. *Virulence.* 2010;1: 299–303.
67. Maier L, Pruteanu M, Kuhn M, Zeller G, Telzerow A, Anderson EE, et al. Extensive impact of non-antibiotic drugs on human gut bacteria. *Nature.* nature.com; 2018;555: 623–628.
68. Bansal S, Bajaj P, Pandey S, Tandon V. Topoisomerases: Resistance versus Sensitivity, How Far We Can Go? *Med Res Rev. Wiley Online Library*; 2017;37: 404–438.
69. Ghilarov DA, Shkundina IS. DNA topoisomerases and their functions in a cell. *Mol Biol.* 2012;46: 47–57.
70. Champoux JJ. DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. *Annu Rev Biochem.* 2001;70: 369–413.

71. Tse-Dinh Y-C. Targeting bacterial topoisomerases: how to counter mechanisms of resistance. *Future Med Chem.* 2016;8: 1085–1100.
72. Perez-Cheeks BA, Lee C, Hayama R, Marians KJ. A role for topoisomerase III in *Escherichia coli* chromosome segregation. *Mol Microbiol.* 2012;86: 1007–1022.
73. Tomašić T, Mašič LP. Prospects for developing new antibacterials targeting bacterial type IIA topoisomerases. *Curr Top Med Chem.* ingentaconnect.com; 2014;14: 130–151.
74. Collin F, Karkare S, Maxwell A. Exploiting bacterial DNA gyrase as a drug target: current state and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2011;92: 479–497.
75. Kang C, Li Y, Cherian J, Liu B, Ng HQ, Lee MY, et al. Biophysical Studies of Bacterial Topoisomerases Substantiate Their Binding Modes to an Inhibitor. *Biophys J.* 2015;109: 1969–1977.
76. Terekhova K, Gunn KH, Marko JF, Mondragón A. Bacterial topoisomerase I and topoisomerase III relax supercoiled DNA via distinct pathways. *Nucleic Acids Res.* 2012;40: 10432–10440.
77. El Sayyed H, Le Chat L, Lebailly E, Vickridge E, Pages C, Cornet F, et al. Mapping Topoisomerase IV Binding and Activity Sites on the *E. coli* Genome. *PLoS Genet.* journals.plos.org; 2016;12: e1006025.
78. Pommier Y, Sun Y, Huang S-YN, Nitiss JL. Roles of eukaryotic topoisomerases in transcription, replication and genomic stability. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2016;17: 703–721.
79. Pommier Y. Drugging topoisomerases: lessons and challenges. *ACS Chem Biol.* 2013;8: 82–95.
80. Kathiravan MK, Khilare MM, Nikoomanesh K, Chothe AS, Jain KS. Topoisomerase as target for antibacterial and anticancer drug discovery. *J Enzyme Inhib Med Chem.* 2013;28: 419–435.
81. Heide L. New aminocoumarin antibiotics as gyrase inhibitors. *Int J Med Microbiol.* Elsevier; 2014;304: 31–36.
82. Hiasa H. DNA Topoisomerases as Targets for Antibacterial Agents. *Methods Mol Biol.* Springer; 2018;1703: 47–62.
83. Heisig P. Type II topoisomerases--inhibitors, repair mechanisms and mutations. *Mutagenesis.* 2009;24: 465–469.
84. Nagaraja V, Godbole AA, Henderson SR, Maxwell A. DNA topoisomerase I and DNA gyrase as targets for TB therapy. *Drug Discov Today.* 2017;22: 510–518.
85. Xu Y, Her C. Inhibition of Topoisomerase (DNA) I (TOP1): DNA Damage Repair and Anticancer Therapy. *Biomolecules.* mdpi.com; 2015;5: 1652–1670.
86. Cuya SM, Bjornsti M-A, van Waardenburg RCAM. DNA topoisomerase-

- targeting chemotherapeutics: what's new? *Cancer Chemother Pharmacol*. Springer; 2017;80: 1–14.
87. Nöllmann M, Stone MD, Bryant Z, Gore J, Crisona NJ, Hong S-C, et al. Multiple modes of *Escherichia coli* DNA gyrase activity revealed by force and torque. *Nat Struct Mol Biol*. 2007;14: 264–271.
 88. Laskowski RA, Swindells MB. LigPlot+: multiple ligand-protein interaction diagrams for drug discovery. *J Chem Inf Model*. 2011;51: 2778–2786.
 89. Stierand K, Maass PC, Rarey M. Molecular complexes at a glance: automated generation of two-dimensional complex diagrams. *Bioinformatics*. 2006;22: 1710–1716.
 90. Stierand K, Rarey M. Drawing the PDB: Protein-Ligand Complexes in Two Dimensions. *ACS Med Chem Lett*. 2010;1: 540–545.
 91. Ferreira LG, Dos Santos RN, Oliva G, Andricopulo AD. Molecular docking and structure-based drug design strategies. *Molecules*. 2015;20: 13384–13421.
 92. de Ruyck J, Brysbaert G, Blossey R, Lensink MF. Molecular docking as a popular tool in drug design, an in silico travel. *Adv Appl Bioinform Chem*. 2016;9: 1–11.
 93. Meng X-Y, Zhang H-X, Mezei M, Cui M. Molecular docking: a powerful approach for structure-based drug discovery. *Curr Comput Aided Drug Des*. 2011;7: 146–157.
 94. Incerti M, Vicini P, Geronikaki A, Eleftheriou P, Tsagkadouras A, Zoumpoulakis P, et al. New N-(2-phenyl-4-oxo-1,3-thiazolidin-3-yl)-1,2-benzothiazole-3-carboxamides and acetamides as antimicrobial agents. *Med Chem Commun. The Royal Society of Chemistry*; 2017;8: 2142–2154.
 95. National Institute of Health, U.S.A. OSRA: Optical Structure Recognition - National Cancer Institute [Internet]. [cited 3 Jun 2018]. Available: <https://cactus.nci.nih.gov/cgi-bin/osra/index.cgi>
 96. Oellien F. Online SMILES Translator [Internet]. [cited 3 Jun 2018]. Available: <https://cactus.nci.nih.gov/translate/>
 97. Dallakyan S, Olson AJ. Small-molecule library screening by docking with PyRx. *Methods Mol Biol*. 2015;1263: 243–250.
 98. Santoso B. Comparison of Free Docking Tools. Universitas Muhammadiyah Surakarta; 2014; Available: <https://publikasiilmiah.ums.ac.id/xmlui/handle/11617/5318>
 99. Trott O, Olson AJ. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J Comput Chem*. 2010;31: 455–461.
 100. Forli S, Huey R, Pique ME, Sanner MF, Goodsell DS, Olson AJ. Computational protein-ligand docking and virtual drug screening with the

AutoDock suite. *Nat Protoc.* 2016;11: 905–919.

101. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, et al. UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem.* 2004;25: 1605–1612.
102. Vos SM, Lyubimov AY, Hershey DM, Schoeffler AJ, Sengupta S, Nagaraja V, et al. Direct control of type IIA topoisomerase activity by a chromosomally encoded regulatory protein. *Genes Dev.* 2014;28: 1485–1497.
103. Seeliger D, de Groot BL. Ligand docking and binding site analysis with PyMOL and Autodock/Vina. *J Comput Aided Mol Des.* 2010;24: 417–422.
104. Koeppe JR, Kadima WC, Roberts R, Craig PA. Using Computational and Wet-Lab Methods to Determine Enzyme Function in an Undergraduate Biochemistry Lab Course. *Biophys J. Elsevier;* 2018;114: 184a.